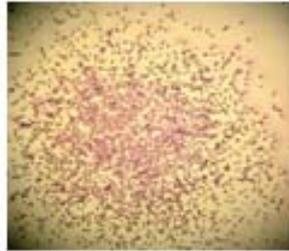


IL TEST DI CITOTOSSICITÀ

Questo test permette di valutare *in vitro* la capacità di un agente di inibire la crescita cellulare. La riduzione nel numero delle colonie può derivare sia dal blocco della proliferazione che dall'induzione di morte cellulare.

L'efficienza clonale, ossia la capacità di formare colonie, è un parametro capace di misurare un danno anche parziale al complesso assetto enzimatico di cui la cellula necessita per replicarsi ed è particolarmente idonea a delineare una risposta dose-relata ad elevata sensibilità.

End-point: colonie di almeno 50 cellule



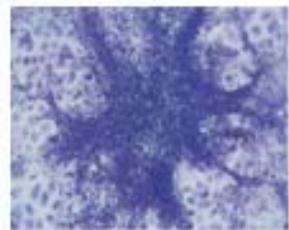
IL TEST DI TRASFORMAZIONE

I test di trasformazione *in vitro* misurano l'acquisizione di caratteristiche maligne in cellule di mammifero esposte a sostanze chimiche. Permettono di rilevare l'attività trasformante sia di cancerogeni genotossici che non genotossici.

La linea di fibroblasti murini BALB/c 3T3 viene trattata con gli agenti in esame quindi mantenuta in coltura per 4-6 settimane.

L'endpoint di questo test, facilmente individuabile, è rappresentato dal focus trasformato. Il numero di foci maligni è direttamente correlato alla dose di trattamento.

End-point: focus di trasformazione



IL TEST DI TRASFORMAZIONE "TWO-STEPS"

Il test di trasformazione cellulare *in vitro* su cellule BALB/c 3T3 può essere modificato in modo da discriminare tra cancerogeni iniziatori e promoventi.

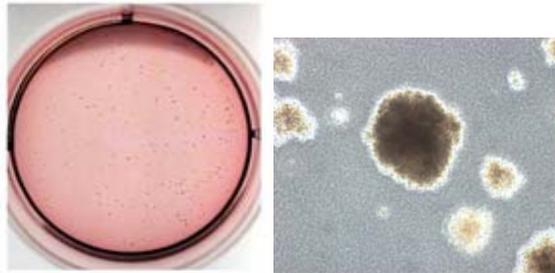
È quindi possibile indagare l'attività di una sostanza ritenuta promotrice esponendo cellule "iniziate" da dosi sub-trasformanti di un cancerogeno noto alla presunta azione promotrice di un agente chimico. Dopo 4-6 settimane fissazione e colorazione vengono contati i foci di trasformazione.

IL TEST DI CRESCITA IN SOFT-AGAR

Questo metodo indaga la capacità delle cellule di formare colonie in assenza di adesione al substrato. La crescita in terreno semi- solido è generalmente utilizzata come indice di trasformazione neoplastica connessa alla tumorigenicità.

Le cellule vengono seminate in piastre contenenti agar allo 0,3% e dopo incubazione a 37° C per 15 giorni viene valutato il numero medio di colonie / piastra al fine di caratterizzare la capacità di crescita ancoraggio-indipendente e la sua eventuale modulazione da parte di diverse classi di composti chimici.

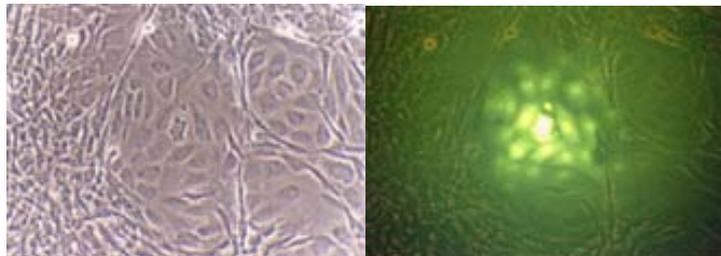
End-point:
formazione di colonie



IL TEST DI COMUNICAZIONE MEDIATA DA GAP JUNCTION

La modulazione della comunicazione intercellulare mediata da gap-junctions (GJIC) rappresenta un endpoint per lo screening delle sostanze promoventi.

I canali GJ consentono il flusso diretto di piccole molecole tra il citoplasma di cellule adiacenti, contribuendo all'omeostasi cellulare, fortemente implicata nella crescita delle cellule maligne. La GJIC, è stata valutata mediante visualizzazione in microscopia a fluorescenza del trasferimento di un colorante, il Lucifer Yellow, da singole cellule micro-iniettate alle cellule adiacenti.



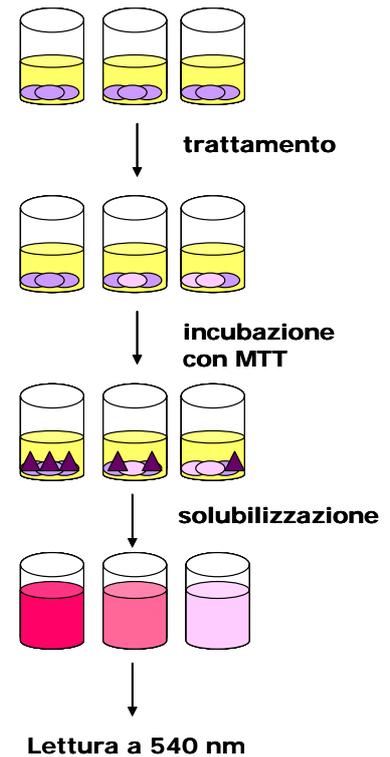
TEST DI VITALITA'

E' un test colorimetrico che permette di stimare il numero di cellule vive presenti in coltura e quindi di valutare l'effetto del trattamento con un contaminante sulla vitalità della popolazione cellulare.

Il test si basa sulla capacità del composto MTT (sale di tetrazolio, [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) di venire metabolizzato da un enzima mitocondriale, la succinato deidrogenasi. La riduzione del MTT porta alla formazione di cristalli di un prodotto blu, il formazano, insolubile in acqua.

Le cellule vitali, a differenza di quelle non vitali, riducono l' MTT e l'ammontare del formazano prodotto è proporzionale al numero di cellule presenti.

I cristalli formati vengono solubilizzati e i valori di assorbanza rilevati mediante lettura al multiwell reader Ascent a 540nm.



Test di chemiotassi

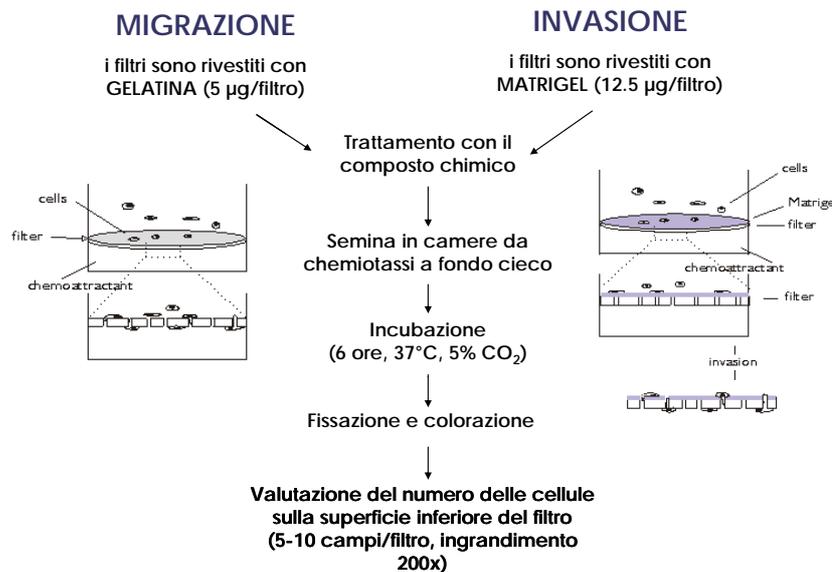
Consente la valutazione della capacità di una popolazione cellulare di rispondere a uno stimolo chemiotattico. Per il test viene utilizzato un sistema dotato di due compartimenti separati da una membrana porosa. Le cellule sono indotte a migrare da un compartimento superiore ad uno inferiore applicando un gradiente chemiotattico. La porosità della membrana deve essere scelta a seconda delle dimensioni delle cellule. La larghezza dei pori deve essere sufficientemente piccola da impedire il passaggio passivo delle cellule, ma sufficientemente grande da permetterne la migrazione attiva.

Test di invasione in vitro

L'invasione della membrana basale è una tappa critica del processo di metastasi. L'uso di una membrana basale ricostituita in vitro (Matrigel), applicata sopra ai filtri porosi impiegati nel test di chemiotassi, permette una valutazione rapida e quantitativa del potenziale invasivo di cellule tumorali.

L'invasività in vitro è direttamente correlata al potenziale metastatico in vitro in molti sistemi cellulari.

Questo test viene considerato uno strumento utile per lo studio dei meccanismi coinvolti nell'invasione e per lo screening di agenti anti-invasivi.

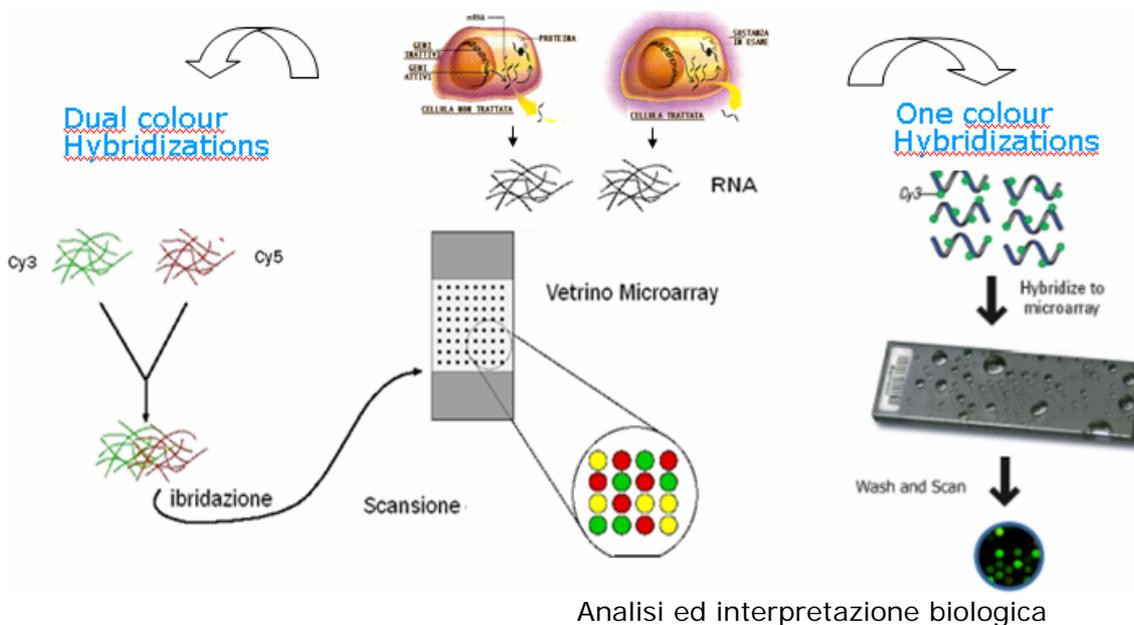


Espressione genica: MICROARRAY

Le cellule vengono esposte al composto in esame quindi lisate per raccogliere l'RNA messaggero (mRNA). L' mRNA viene retrotrascritto a DNA complementare (cDNA) e si effettua una trascrizione in vitro a cRNA in presenza di un nucleotide marcato col fluorocromo di interesse, cianina 3 o cianina 5. Abbiamo sviluppato sia approcci a due colori, in cui trattato e controllo sono marcati con Cy5 e Cy3, rispettivamente, e co-ibridati sulla medesima slide, che a un colore in cui trattato e controllo sono marcati con Cy 3 e ibridati su slide distinte.

I cRNA marcati vengono posti a contatto con la slide per 16 ore a 65°C. Il legame si ottiene quando il cRNA del campione trova la sequenza di basi complementari nella spot sul vetrino. Tale legame significa che il gene è attivo o "espresso" nel campione. La slide viene inserita nello scanner, che dopo eccitazione dei fluorocromi, legge l'emissione in fluorescenza. Il software di Feature extraction effettua poi una prima elaborazione dei segnali di intensità in modo da ricavare l'informazione di modulazione genica.

I dati vengono poi sottoposti ad analisi statistica ed interpretati dal punto di vista biologico. Gli esperimenti vengono condotti secondo le linee guida MIAME (Minimum Information About about microarray experiment) definite dalla Microarray Gene Expression Data Society. La conformità alle linee guida MIAME viene verificata riportando i dati di microarray in data-base MIAME compatibili (Array Express, European Bioinformatic Institute, Cambridge).



Validazione dati microarray: REAL-TIME PCR

1µg di RNA totale viene retrotrascritto ad opera di una versione modificata di M-MLV maggiormente termostabile (SuperScriptTM III Reverse Transcriptase). Il cDNA così ottenuto viene amplificato utilizzando primer specifici in presenza di SYBR Green (SYBR GreenER qPCR SuperMix for iCycler, Invitrogen). Il gene della glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), espresso in maniera costitutiva in tutte le cellule, viene utilizzato per la normalizzazione. Tutti i campioni vengono amplificati almeno in triplicato. L'analisi dei risultati è stata eseguita secondo il metodo comparativo.