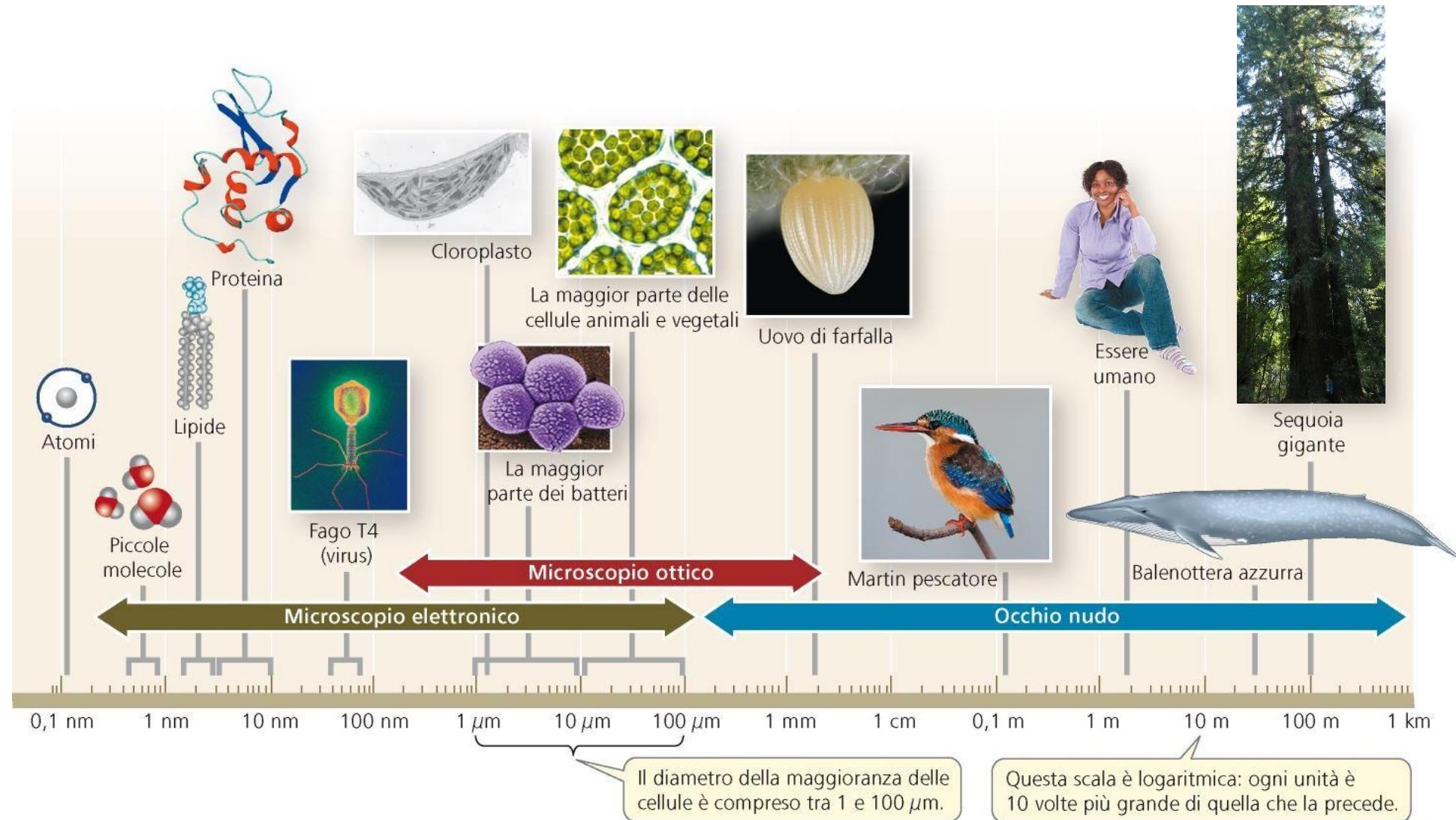


Corso di Biologia cellulare

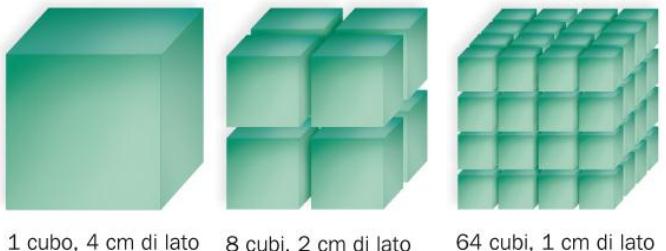
Tecniche di studio della cellula

NECESSITÀ DELLA MICROSCOPIA PER LO STUDIO MORFOLOGICO



LA DIMENSIONE DELLA CELLULA

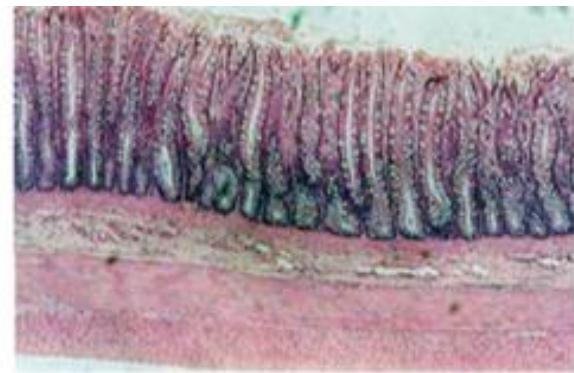
- Una cellula piccola ha un rapporto **superficie/volume maggiore** di una cellula grande della stessa forma



Numero e misure dei cubi	Area totale	Volume totale	Rapporto area/volume per ogni cubo
1 cubo, 4 cm di lato	96 cm ²	64 cm ³	1,5/1
8 cubi, 2 cm di lato	192 cm ²	64 cm ³	3/1
64 cubi, 1 cm di lato	384 cm ²	64 cm ³	6/1

- Volumi ridotti** → **Superfici più ampie**

- Le cellule dei villi intestinali hanno un elevato rapporto S/V, che consente loro un efficace assorbimento di sostanze dal lume intestinale



LA SCOPERTA E LA CONOSCENZA DELLA CELLULA PROCEDONO PARALLELAMENTE ALLO SVILUPPO DELLE TECNICHE DI MICROSCOPIA



- 1665 Hooke scopre le cellule osservando il sughero e dà loro questo nome
- 1670 van Leeuwenhock osserva cellule vive (batteri, protozoi, spermatozoi)
- 1838 Schleiden conclude che tutti i tessuti vegetali sono fatti di cellule
- 1839 Schwann estende le osservazioni di Schleiden ai tessuti animali
- 1950 l'introduzione del ME (inventato nel 1931) permette la descrizione della maggior parte delle strutture sub-cellulari

I DUE PRINCIPALI TIPI DI MICROSCOPI

OTTICO VS
ELETTRONICO

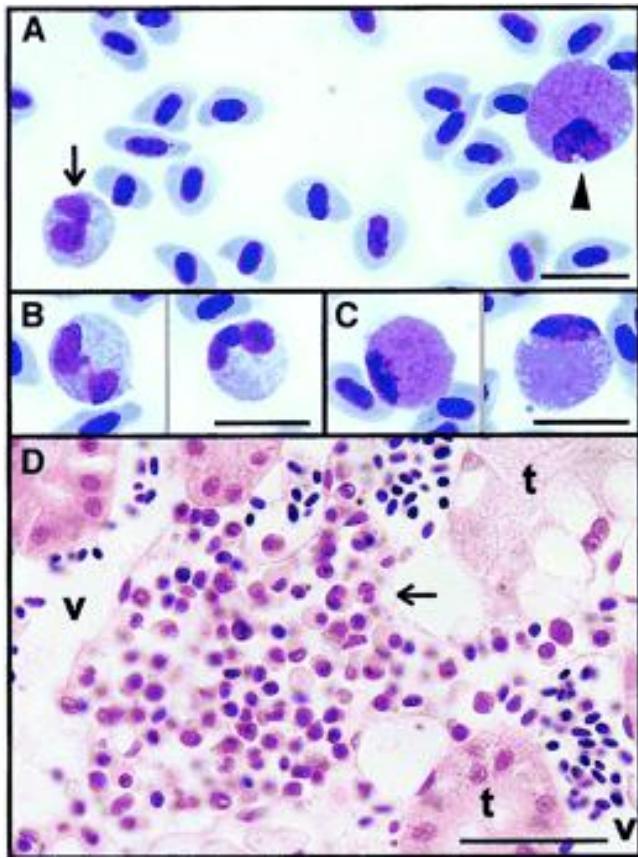


I DUE PRINCIPALI TIPI DI MICROSCOPI

OTTICO VS ELETTRONICO		TIPO DI OSSERVAZIONE	
FONTE DI ENERGIA	Superficie esterna	Sezioni di tessuto	
	Luce visibile	Stereomicroscopio	Microscopio ottico convenzionale
Elettroni	Microscopio elettronico a scansione (SEM)	Microscopio elettronico a trasmissione (TEM)	

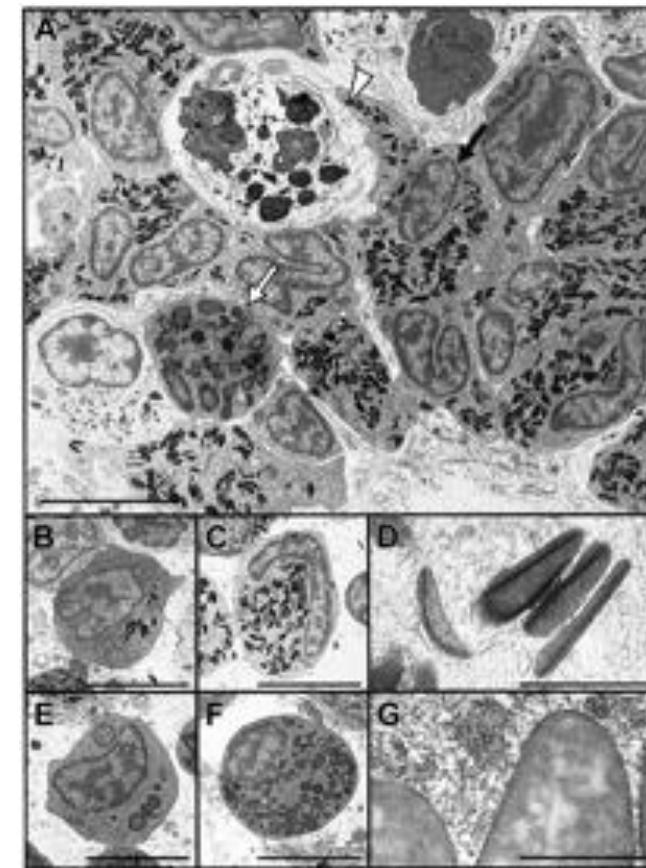
I DUE PRINCIPALI TIPI DI MICROSCOPI

MICROSCOPO OTTICO



Zebrafish, *Danio rerio*

MICROSCOPIO ELETTRONICO



I PARAMETRI IMPORTANTI IN MICROSCOPIA: INGRANDIMENTO, RISOLUZIONE, CONTRASTO

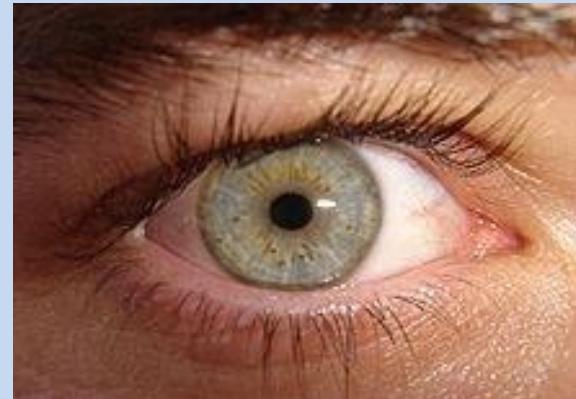


**DA ESSA DIPENDONO LA NITIDEZZA E LA RICCHEZZA IN DETTAGLI
DELL'IMMAGINE**

I MICROSCOPI AMPLIANO LE CAPACITÀ DEI NOSTRI OCCHI

LIMITE DI RISOLUZIONE = distanza minima che deve sussistere tra 2 oggetti perché essi possano essere percepiti come effettivamente separati.

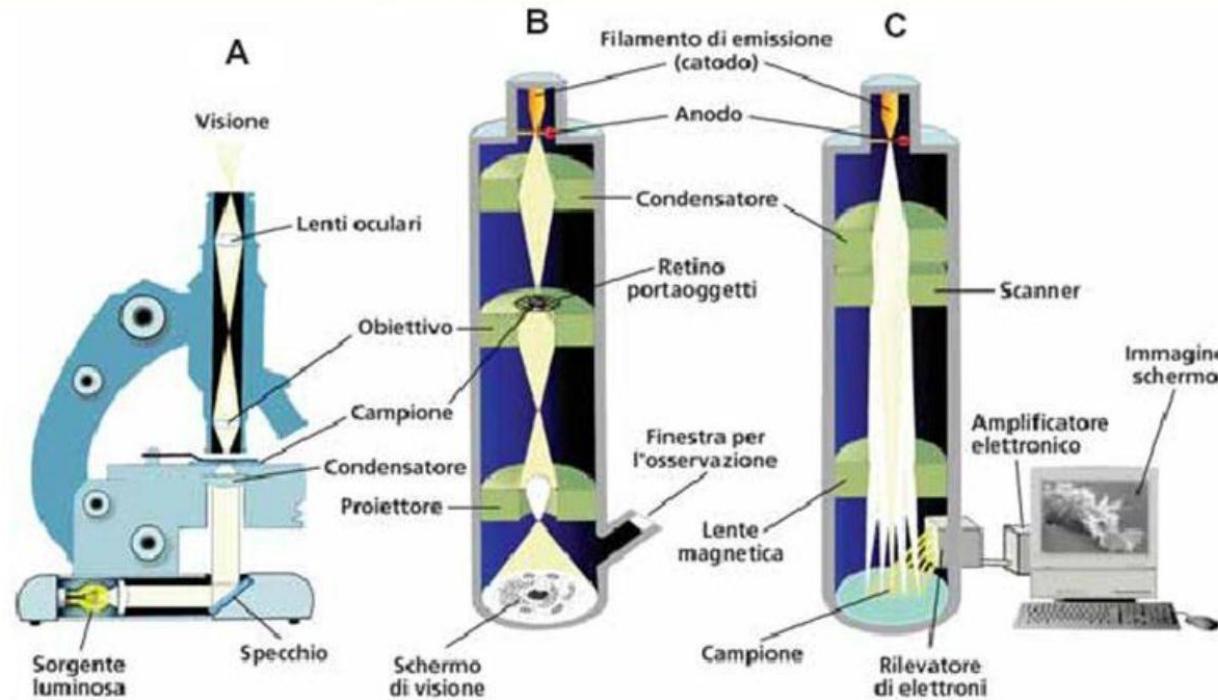
- **OCCHIO UMANO** = $100 \mu\text{m}$ = 100.000 nm
- **MICROSCOPIO OTTICO** = $0,2 \mu\text{m}$ = 200 nm
- **SEM** = 10 nm
- **TEM** = $0,2 \text{ nm}$ (**per campioni biologici 1-2 nm**)



MICROSCOPIO OTTICO E MICROSCOPIO ELETTRONICO

- Il microscopio è uno strumento fondamentale per effettuare gli studi su cellule, tessuti e organi.

	Microscopio ottico	Microscopio elettronico
	Luce visibile	Fasci di elettroni
Massima risoluzione	0.2 µm	0.2 nm

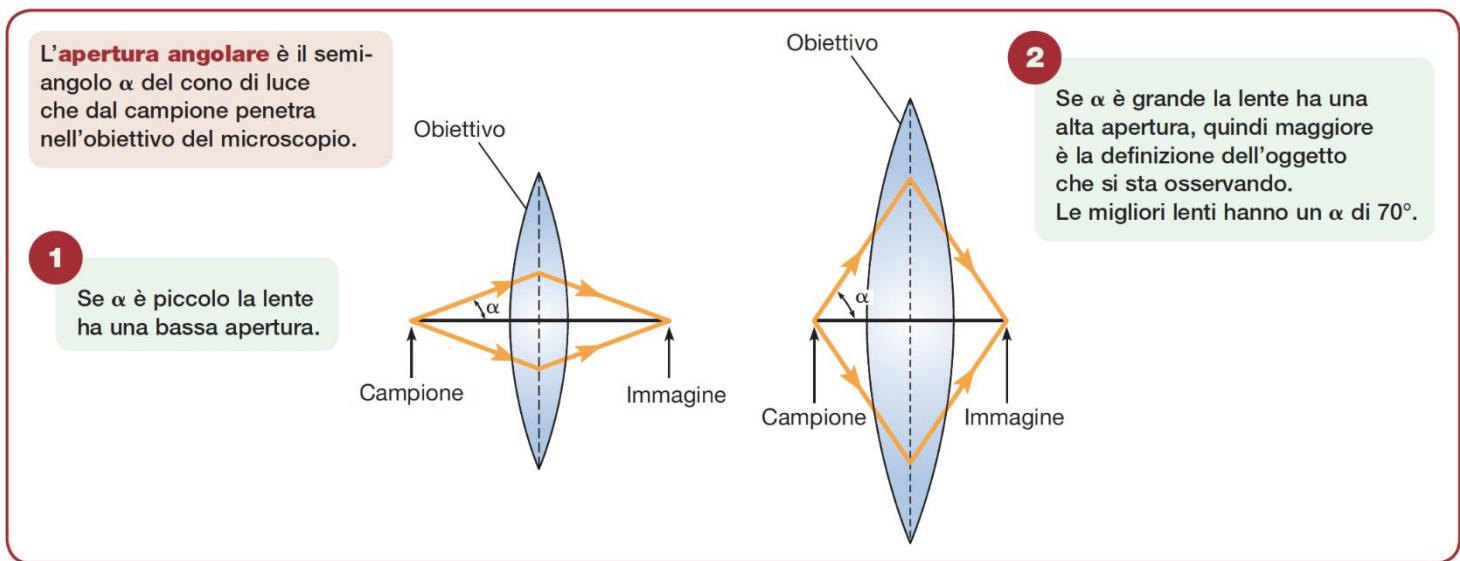


DA COSA DIPENDE IL LIMITE DI RISOLUZIONE?

Equazione di Abbè

$$r = 0.61 \frac{\lambda}{n \sin \alpha}$$

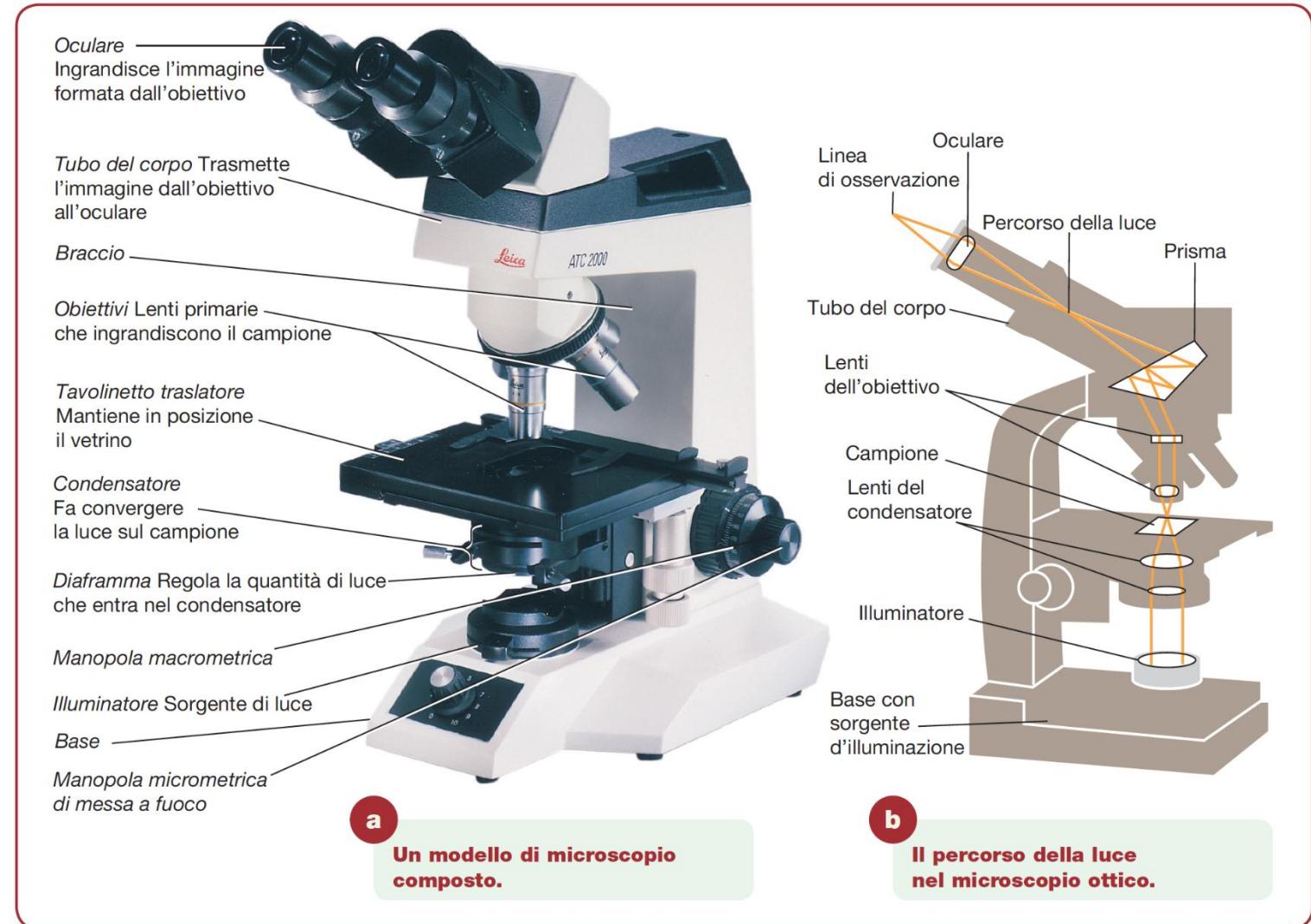
- λ = lunghezza d'onda
- n = indice di rifrazione del mezzo interposto tra campione e obiettivo
- α = apertura angolare della lente dell'obiettivo
- $n \sin \alpha$ è indicato anche come NA, cioè apertura numerica



▲ Figura 2.13
L'apertura angolare di una lente.

MICROSCOPIO OTTICO COMPOSTO

- I microscopi che ingrandiscono l'immagine in passaggi successivi utilizzando più lenti sono detti composti.



▲ Figura 2.12 Il microscopio ottico composto.

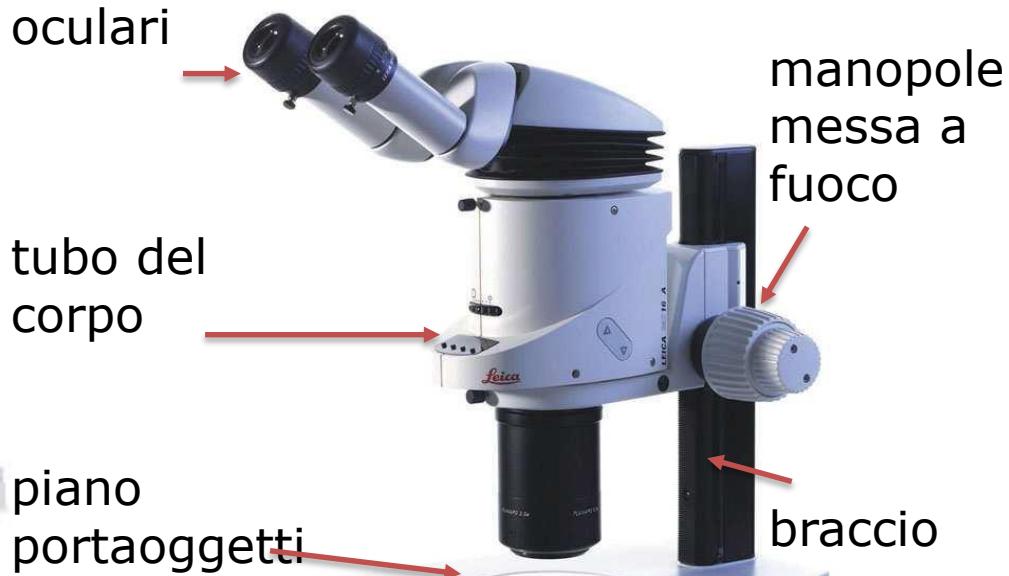
Anatomia di un microscopio:

- parte meccanica o stativo;
- parte ottica, ovvero un sistemi di lenti:
 - CONDENSATORE
 - OBIETTIVO
 - OCULARE

MICROSCOPIO E STEREOMICROSCOPIO



Microscopio

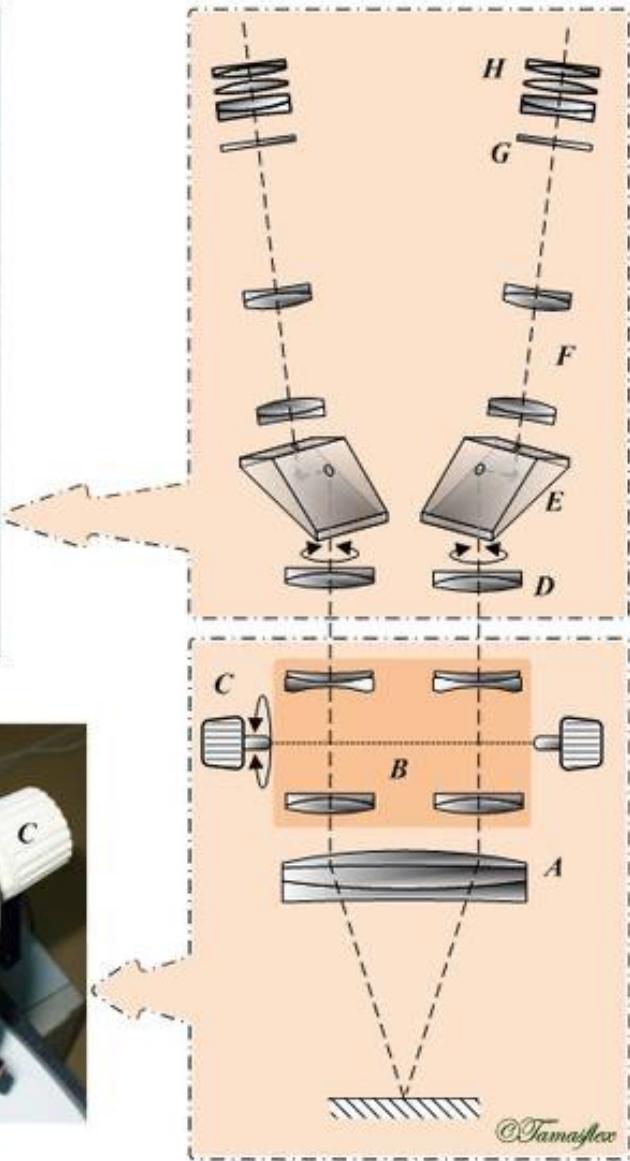


Stereomicroscopio

CARATTERISTICHE e VANTAGGI DELLO STEREOMICROSCOPIO:

- Immagine dritta (non invertita) e tridimensionale
- Possibilità di osservare campioni a fresco, non necessariamente su vetrino
- Notevole distanza tra obiettivo e piano di osservazione: ciò è utile per campioni non piatti e per utilizzare strumenti da dissezione
- Illuminazione del preparato dall'alto e/o dal basso

PRINCIPIO DI FUNZIONAMENTO



Lo stereomicroscopio, poiché ha due obiettivi e due oculari, è come se fosse costituito da due microscopi distinti, uno per ciascuno degli occhi dell'osservatore.

- Entrambi i microscopi puntano sulla stessa zona dell'oggetto in esame, ma da due angolazioni leggermente diverse.
- In questo modo si formano due immagini diverse sulle due retine; ciascun occhio osserva la stessa cosa ma da una direzione diversa.
- Questo sdoppiamento dell'immagine consente di percepire la tridimensionalità degli oggetti.

TIPI DI MICROSCOPI OTTICI

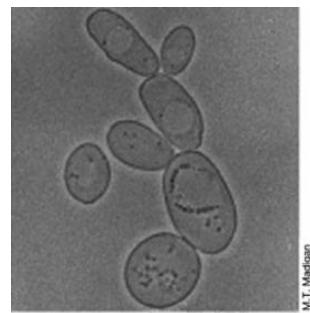
funzionano con raggi luminosi e utilizzano lenti di ingrandimento e lenti correttive

- **MICROSCOPI IN CAMPO CHIARO** (la luce passa direttamente attraverso il campione).
- **MICROSCOPI IN CAMPO OSCURO** (la luce è diretta sul campione con un determinato angolo).
- **MICROSCOPI A CONTRASTO DI FASE**: utilizzano un sistema di lenti che produce immagini visibili di campioni trasparenti. Utili soprattutto per osservare cellule vive.
- **MICROSCOPI A FLUORESCENZA**: sfruttano e rilevano la fluorescenza dei campioni. Utili per lo studio della distribuzione delle molecole di interesse nel campione.
- **MICROSCOPI A LUCE POLARIZZATA**: grazie ad un filtro polarizzatore evidenziano sostanze cristalline o altamente ordinate che danno birifrangenza (es: collagene, microtubuli, microfilamenti).

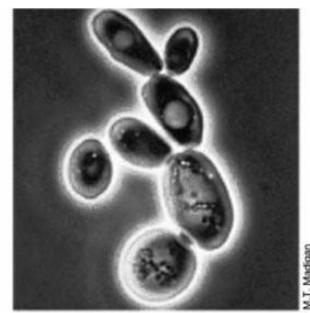
TIPI DI MICROSCOPI OTTICI

MICROSCOPIO IN CAMPO CHIARO

- E' lo strumento più in uso per lo studio dei preparati fissati nei quali sarà possibile ottenere un aumento di contrasto sfruttando specifiche colorazioni.
- E' dotato di un dispositivo di illuminazione rappresentato da una lampada a basso voltaggio.



M.O.
campo chiaro

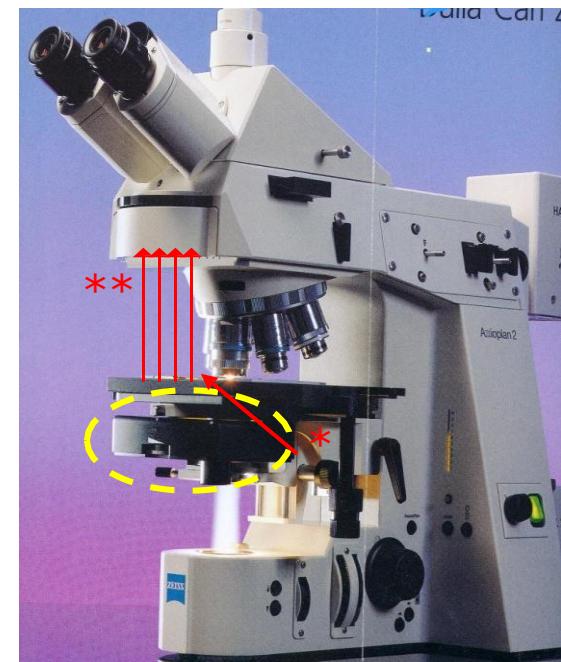


M.O.
campo scuro

MICROSCOPIO IN CAMPO SCURO

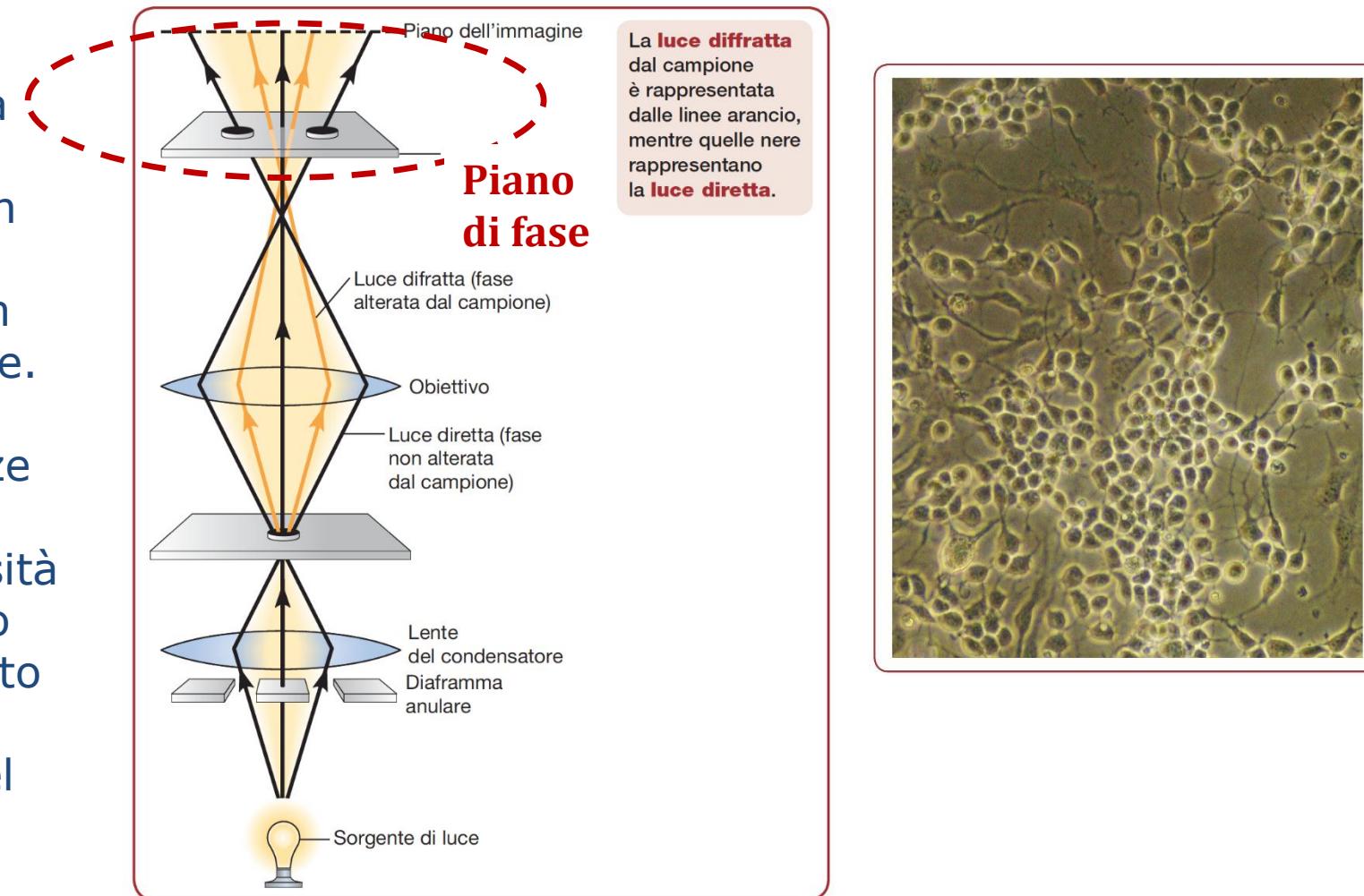
- Nel microscopio in campo oscuro si sostituisce il normale condensatore in campo chiaro con un condensatore che deflette il fascio di luce in modo tale che attraversi l'oggetto con forte obliquità proseguendo in massima parte fuori dal sistema ottico.

- Sul fondo scuro così ottenuto è possibile riconoscere come immagini luminose quelle strutture che, colpite dal fascio obliquo * e avendolo in parte difratto, divengono punti di partenza di raggi ** diretti attraverso il sistema ottico



MICROSCOPIO - a contrasto di fase

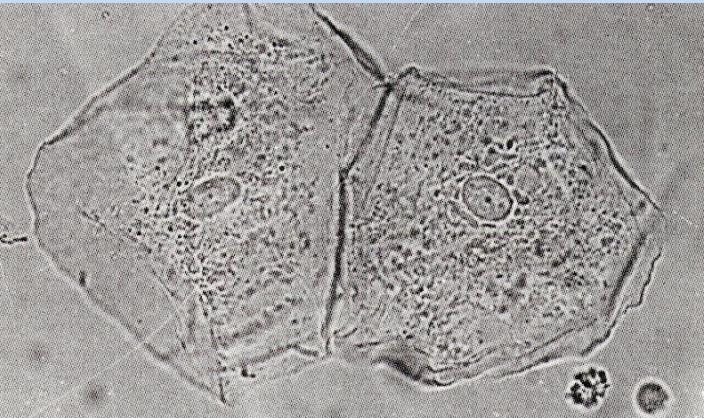
- I raggi di luce che attraversano una cellula subiscono dei piccoli rallentamenti e quindi un cambiamento di fase rispetto a quelli che non attraversano il campione.
- Queste piccole differenze sono convertite in cambiamenti di luminosità del campione attraverso un **piano di fase** inserito lungo il percorso della luce sopra l'obiettivo del microscopio.
- In tal modo il campione presenta **aree chiare e aree scure** molto contrastate su uno sfondo uniformemente illuminato.



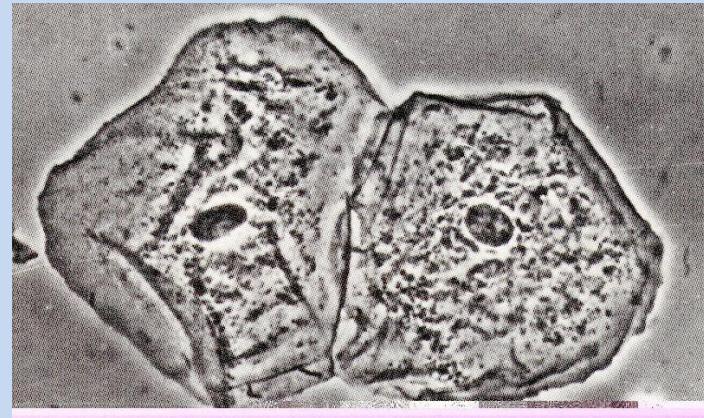
◀ Figura 2.15 Osservazione al microscopio a contrasto di fase di una coltura di cellule staminali neurali.

TIPI DI MICROSCOPI OTTICI

M.O. IN CAMPO CHIARO



M.O. CONTRASTO DI FASE



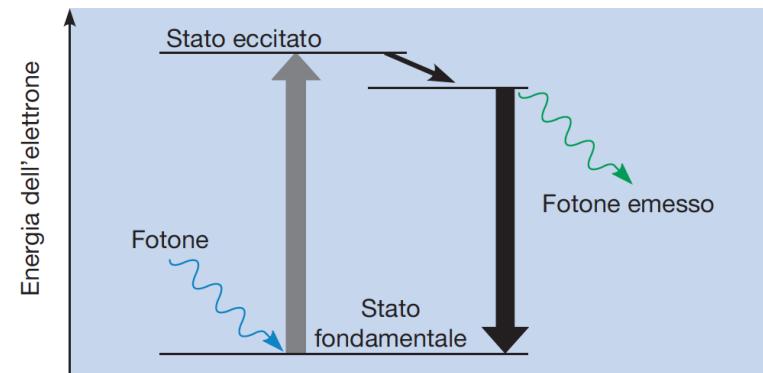
- Per lo studio di cellule e tessuti viventi di spessore inferiore a 5 micron si usa M.O. contrasto di fase: accentuazione del basso contrasto offerto dal materiale biologico che è molto idratato.

MICROSCOPIO A FLUORESCENZA

- Fluorescenza = capacità di alcune molecole di assorbire la luce ad una determinata lunghezza d'onda e di emetterla ad una lunghezza d'onda maggiore.
- Questo tipo di microscopio usa luce monocromatica per stimolare la fluorescenza nelle cellule/tessuti che si stanno osservando.

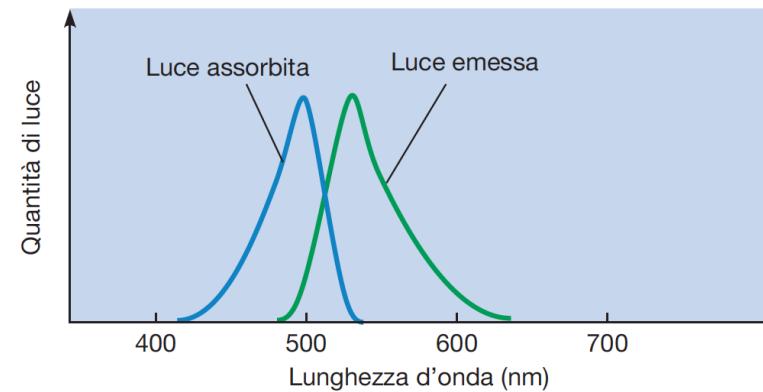
1

La luce blu viene assorbita da un atomo il cui **elettrone** salta dal suo stato fondamentale allo stato eccitato. Quando ritorna allo stato fondamentale emette un **fotone** con energia più bassa quindi con lunghezza d'onda maggiore (luce verde).



2

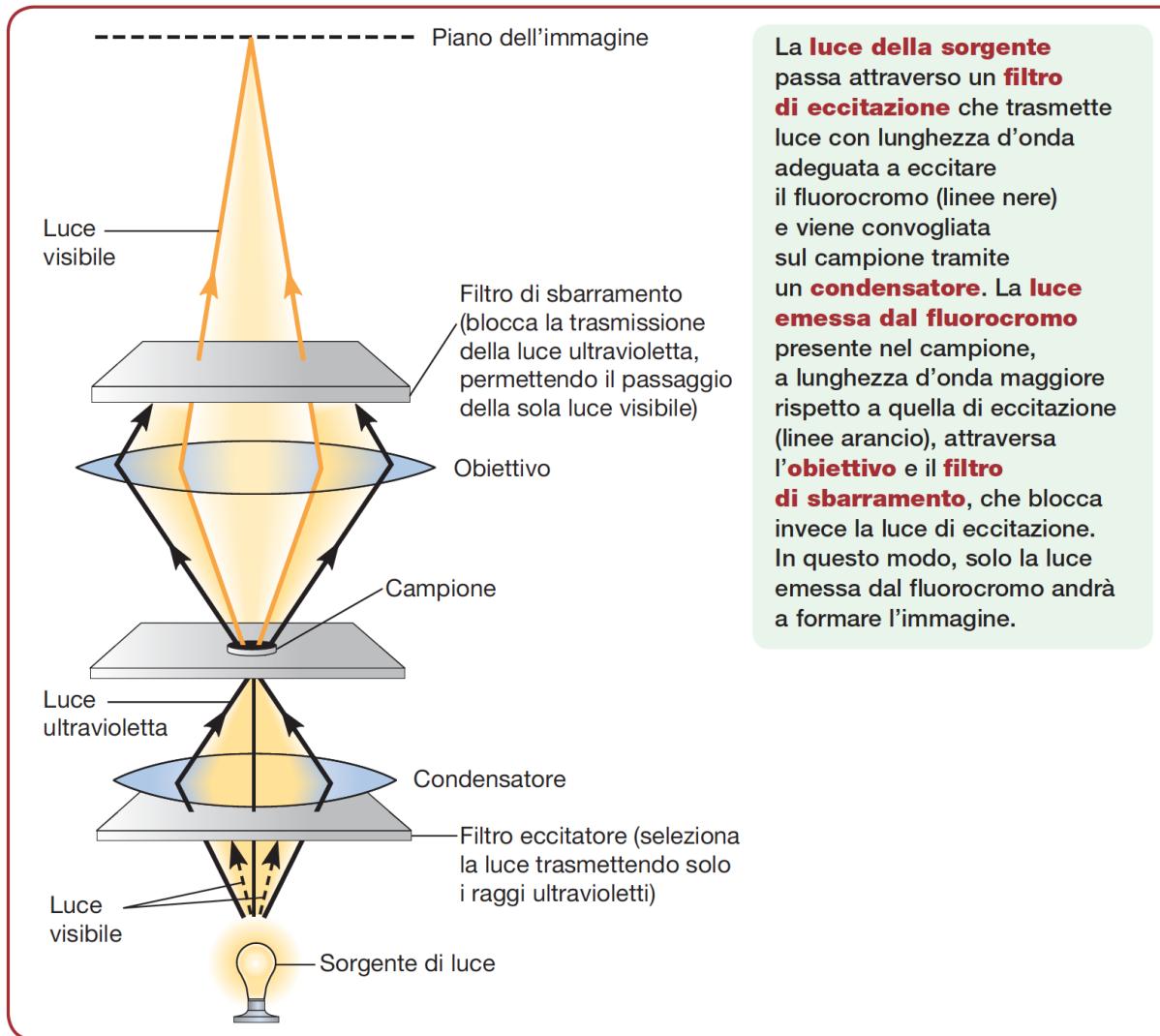
Spettri di assorbimento e di emissione di una tipica **molecola fluorescente**. La curva blu rappresenta la luce assorbita, quella verde la luce emessa.



▲ Figura 2.18 I principi della fluorescenza.

MICROSCOPIO A FLUORESCENZA

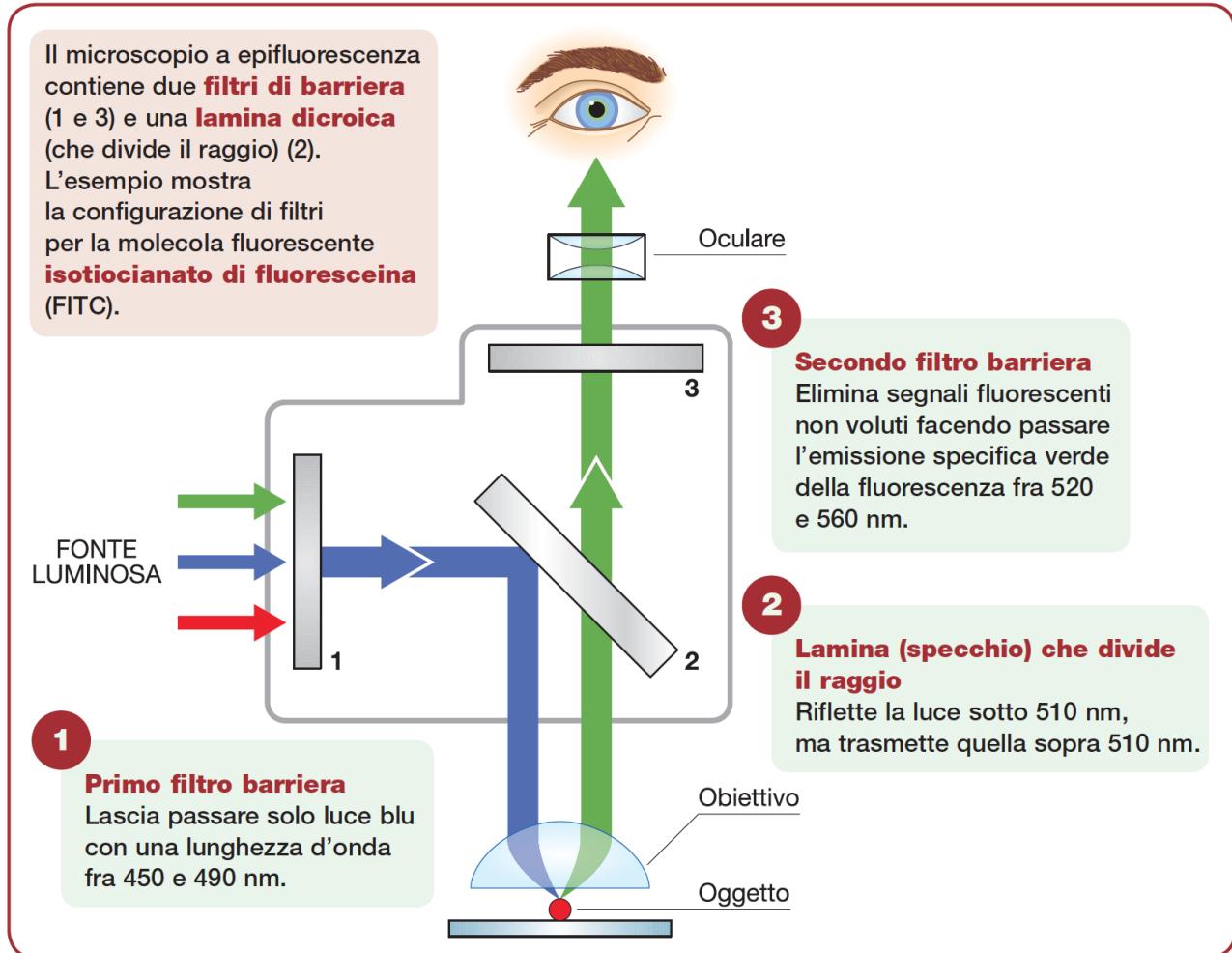
► Figura 2.19
Percorso ottico della luce
fluorescente monocromatica.



MICROSCOPIO A FLUORESCENZA

- I microscopi usati oggi sono del tipo ed epifluorescenza: l'obiettivo funge anche da condensatore e la luce di eccitazione arriva sul campione grazie alla riflessione di una lamina dicroica.
- La lamina riflette la luce al di sotto di una determinata lunghezza d'onda (caratteristica per ogni lamina) e trasmette la luce con lunghezza d'onda superiore

► Figura 2.20
Il microscopio a epifluorescenza.



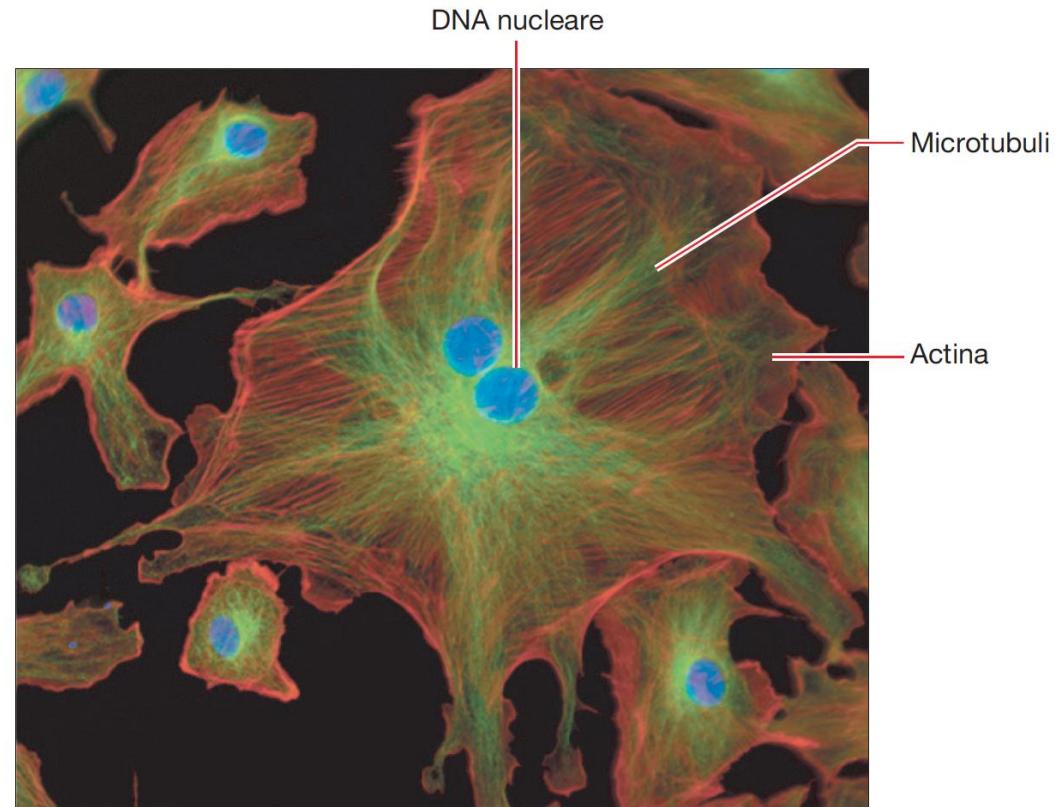
MICROSCOPIO A FLUORESCENZA

- Nella microscopia a fluorescenza vengono usate molecole naturali e sintetiche capaci, se eccitate opportunamente, di emettere ognuna una luce fluorescente di lunghezza d'onda e di colore caratteristici.

Si possono studiare due tipi di fluorescenza:

- F. NATURALE O AUTOFLUORESCENZA, prodotta da sostanze normalmente presenti nel tessuto;
- FLUORESCENZA SECONDARIA, indotta da una colorazione con sostanze fluorescenti, dette *fluorocromi*.

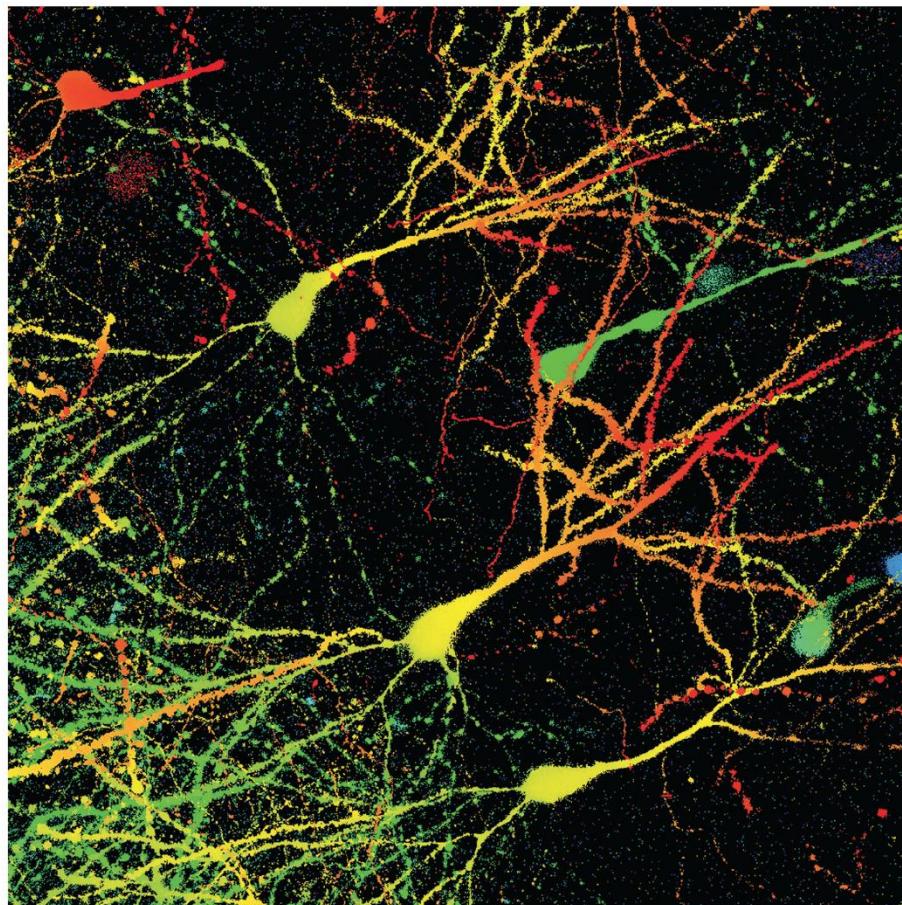
La **microscopia a fluorescenza** permette di evidenziare all'interno di una cellula diverse componenti utilizzando diversi marcatori. Il **DNA nucleare** è marcato di blu con DAPI. I **microtubuli**, riconosciuti dopo trattamento con un anticorpo primario anti- β -tubulina, sono di colore verde, mentre i filamenti di **actina** appaiono rossi dopo trattamento con Texas Red falloidina.



▲ Figura 2.8 Microscopia a fluorescenza.

MICROSCOPIO A FLUORESCENZA

- Un grande contributo alla studio delle cellule si deve all'uso delle proteine fluorescenti naturali come la *green fluorescent protein (GFP)*.



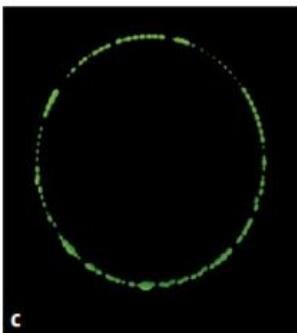
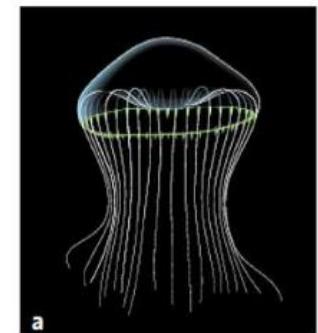
Il giallo indica i **neuroni** più profondi, il verde quelli più superficiali.

◀ Figura 2.21 Neuroni marcati con la *Green Fluorescent Protein (GFP)*.

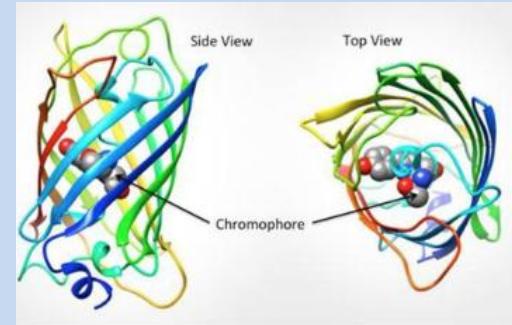
- Nel 2008 Chalfie, Shimomura e Tsien hanno ricevuto il **Premio Nobel per la Chimica per la scoperta e lo sviluppo della GFP**.
- Essa ha il vantaggio di poter essere usata per lo studio di cellule e tessuti vitali.

GREEN FLUORESCENT PROTEIN

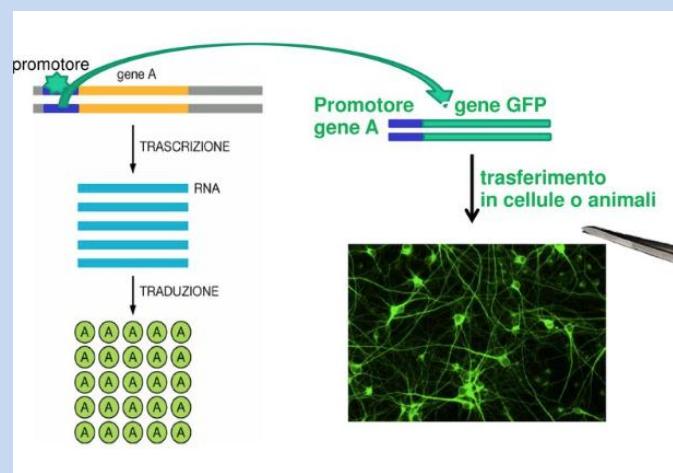
- Scoperta nel 1962 in una medusa, *Aequorea victoria*.



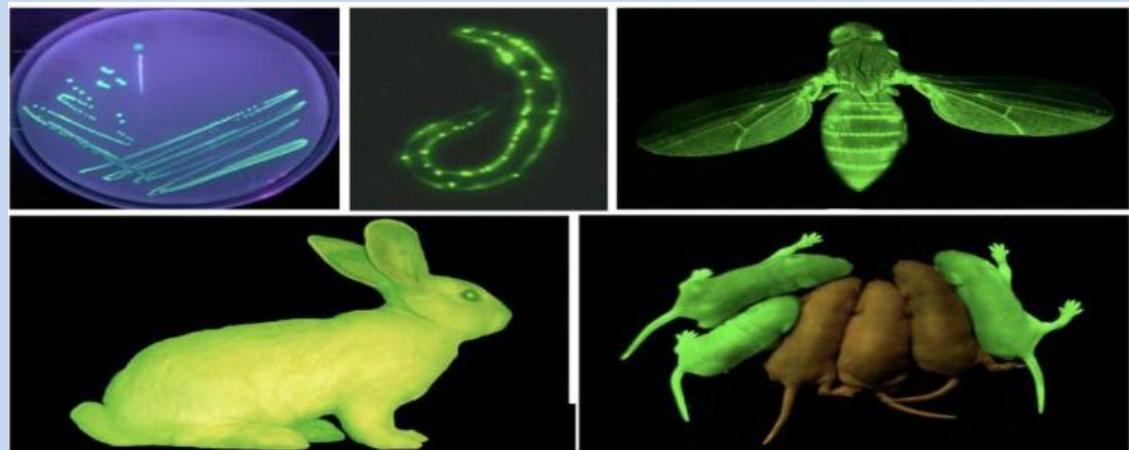
The jellyfish *Aequorea victoria* lives in the sea off the west coast of North America (a). The jellyfish's bioluminescent organ is located along the edge of the "umbrella" (b and c).



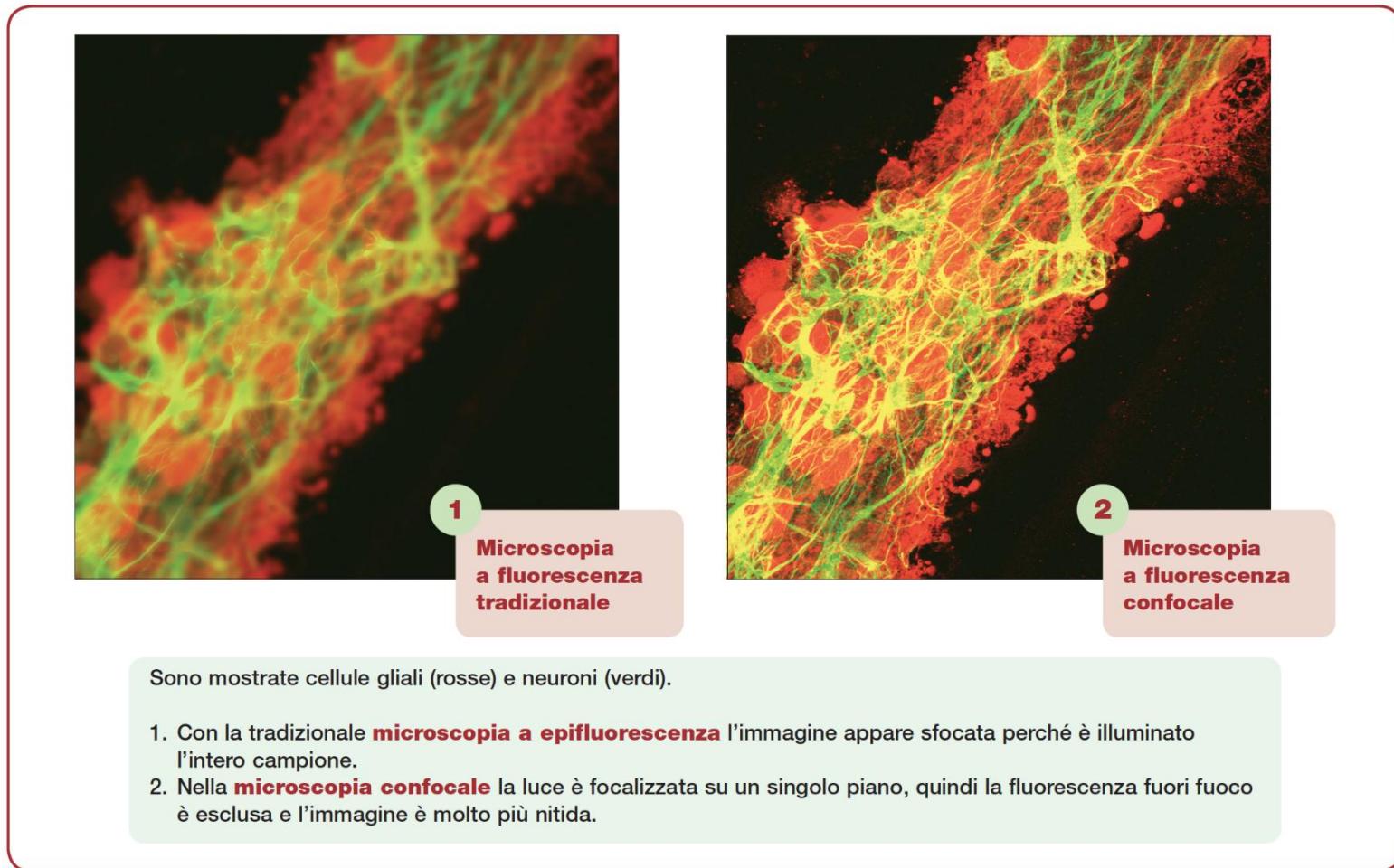
- Proteina di piccole dimensioni (238aa) con fluoroforo.



- GFP come tracciante, per studiare espressione e destino delle proteine.



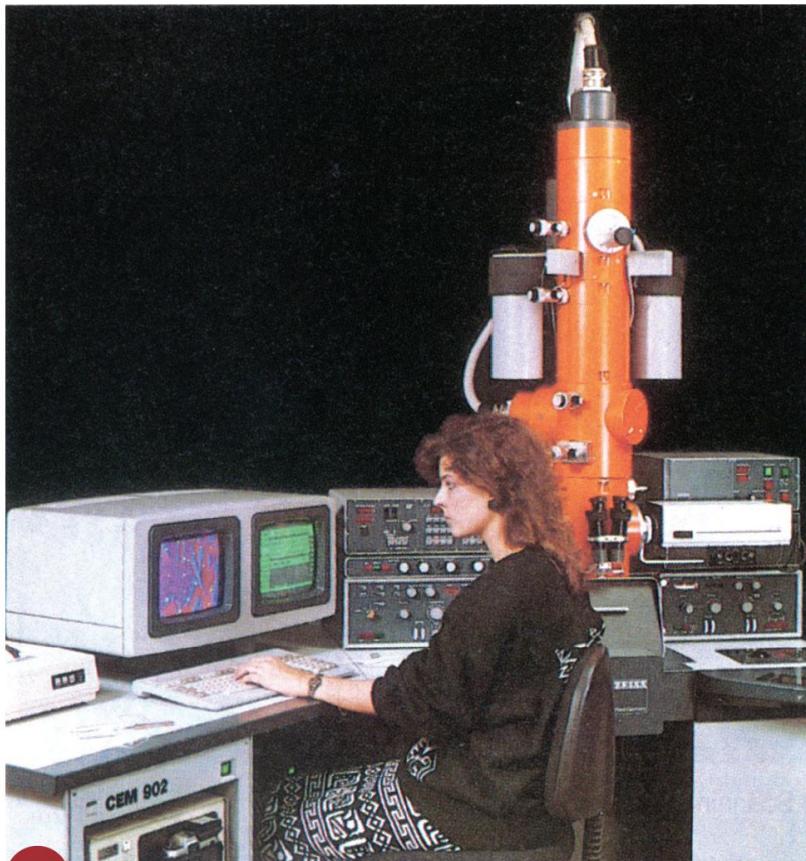
MICROSCOPIA confocale



▲ Figura 2.22 Confronto tra microscopia a fluorescenza confocale e microscopia a fluorescenza tradizionale.

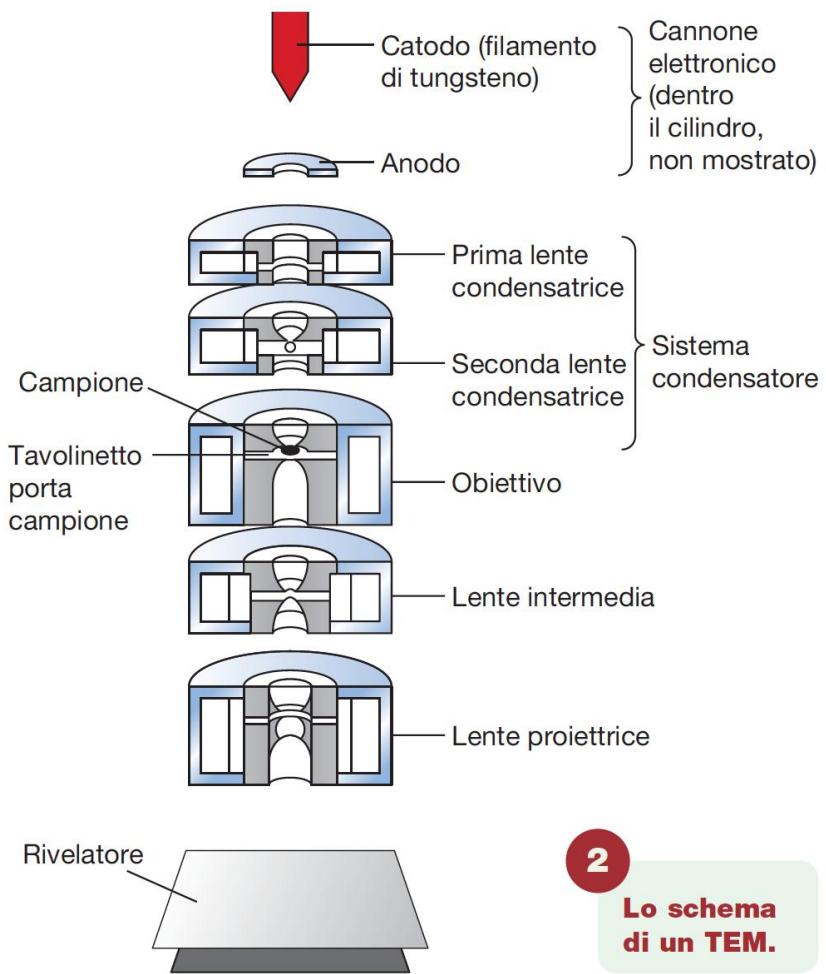
- Nel confocale la luce proveniente da un laser passa attraverso il campione che emette la luce fluorescente.
- Tale fluorescenza passa attraverso una piccola apertura (=apertura confocale grande quanto il foro di uno spillo) prima di raggiungere il rivelatore.
- Questo sistema prende in considerazione un solo piano di fuoco del campione ed esclude gli altri piani per evitare la sfocatura dell'immagine.

MICROSCOPIO ELETTRONICO A TRASMISSIONE (TEM)



1

Un modello di TEM.



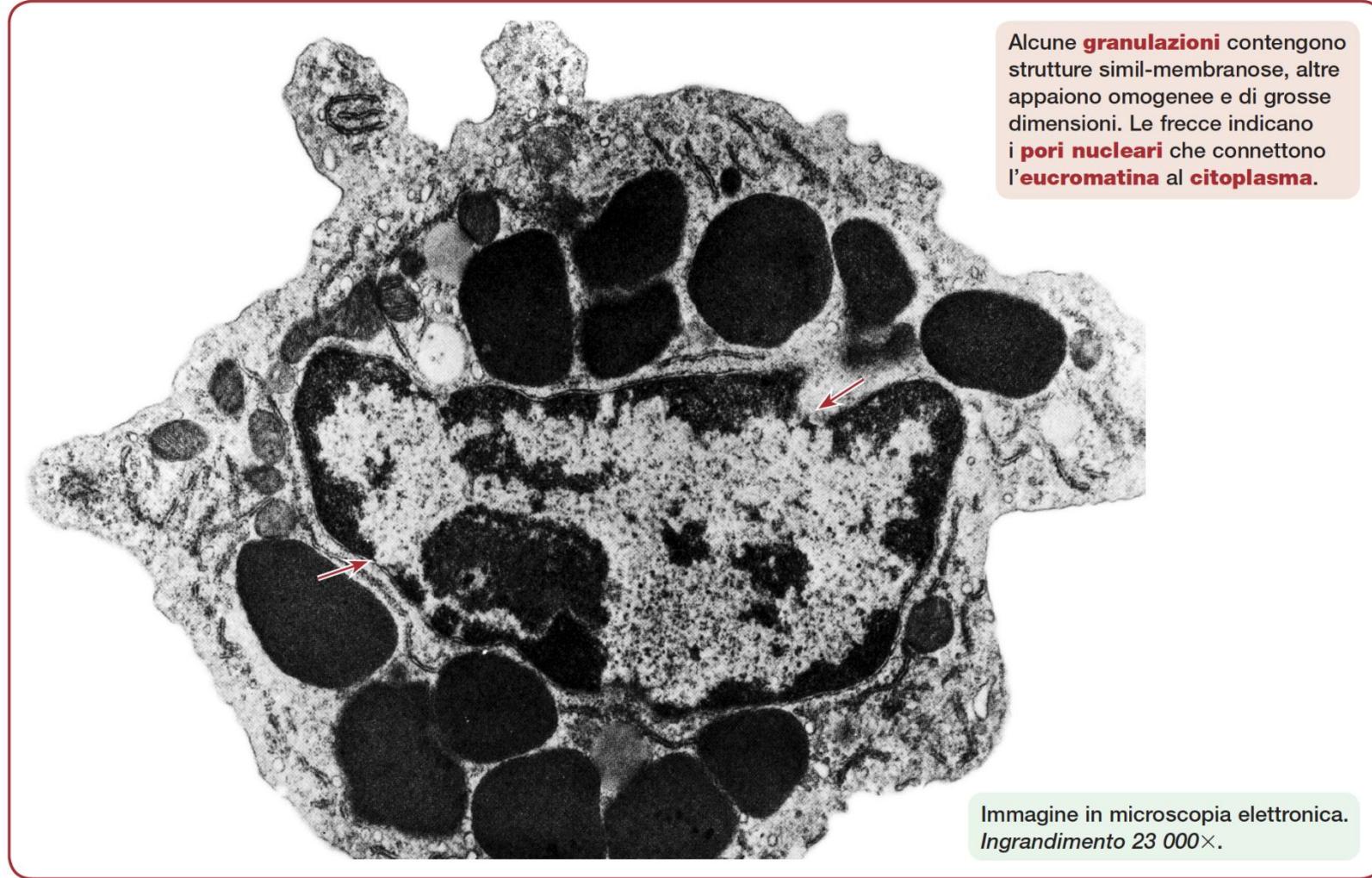
2

Lo schema di un TEM.

- Un raggio di elettroni è trasmesso attraverso il campione che è stato preventivamente fissato e colorato con sali di metalli pesanti che aumentano il contrasto.
- Gli elettroni che passano sono utilizzati per creare un'immagine su uno schermo rivelatore o per impressionare una pellicola.

▲ Figura 2.25 Il microscopio elettronico a trasmissione (TEM).

IMMAGINE AL TEM

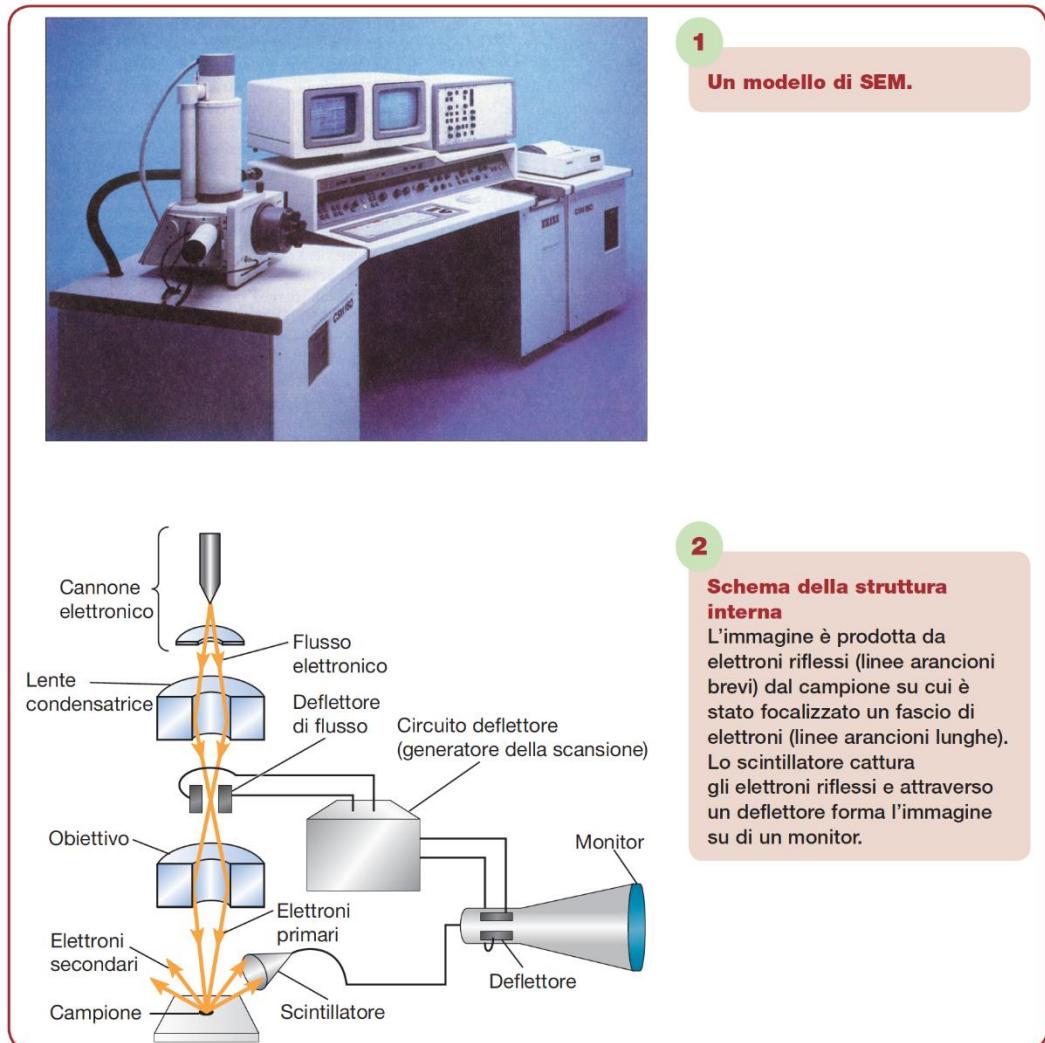


▲ Figura 15.15 Immagine in microscopia elettronica di basofilo.

- Si distinguono aree bianche, nere e con diverse tonalità di grigio in base al percorso degli elettroni.
- Aree chiare (dette elettrontrasparenti) dove gli elettroni sono transitati con facilità.
- Aree scure (dette elettronopache o elettrondense) dove gli elettroni sono stati assorbiti o deflessi.

MICROSCOPIO ELETTRONICO A SCANSIONE (SEM)

- Il SEM fornisce immagini tridimensionali

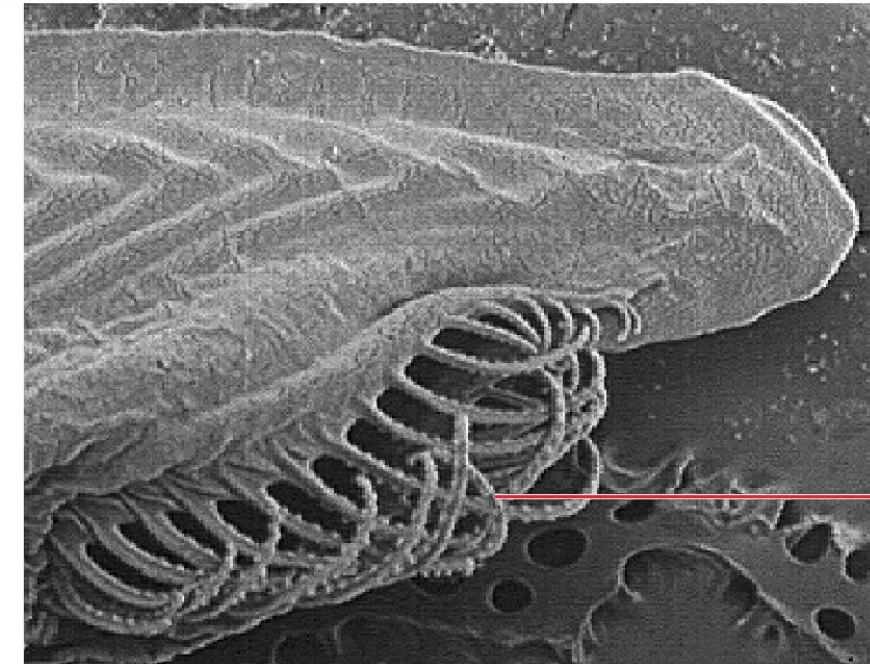


▲ Figura 2.30 Microscopio elettronico a scansione (SEM).

- Un raggio di elettroni viene sparato sulla superficie del campione che è stato opportunamente preparato (doratura).
- Gli elettroni del raggio sono riflessi dalla superficie insieme agli elettroni che il campione emette come effetto del bombardamento, sono amplificati e trasmessi ad uno schermo, dove l'immagine può essere vista e fotografata.

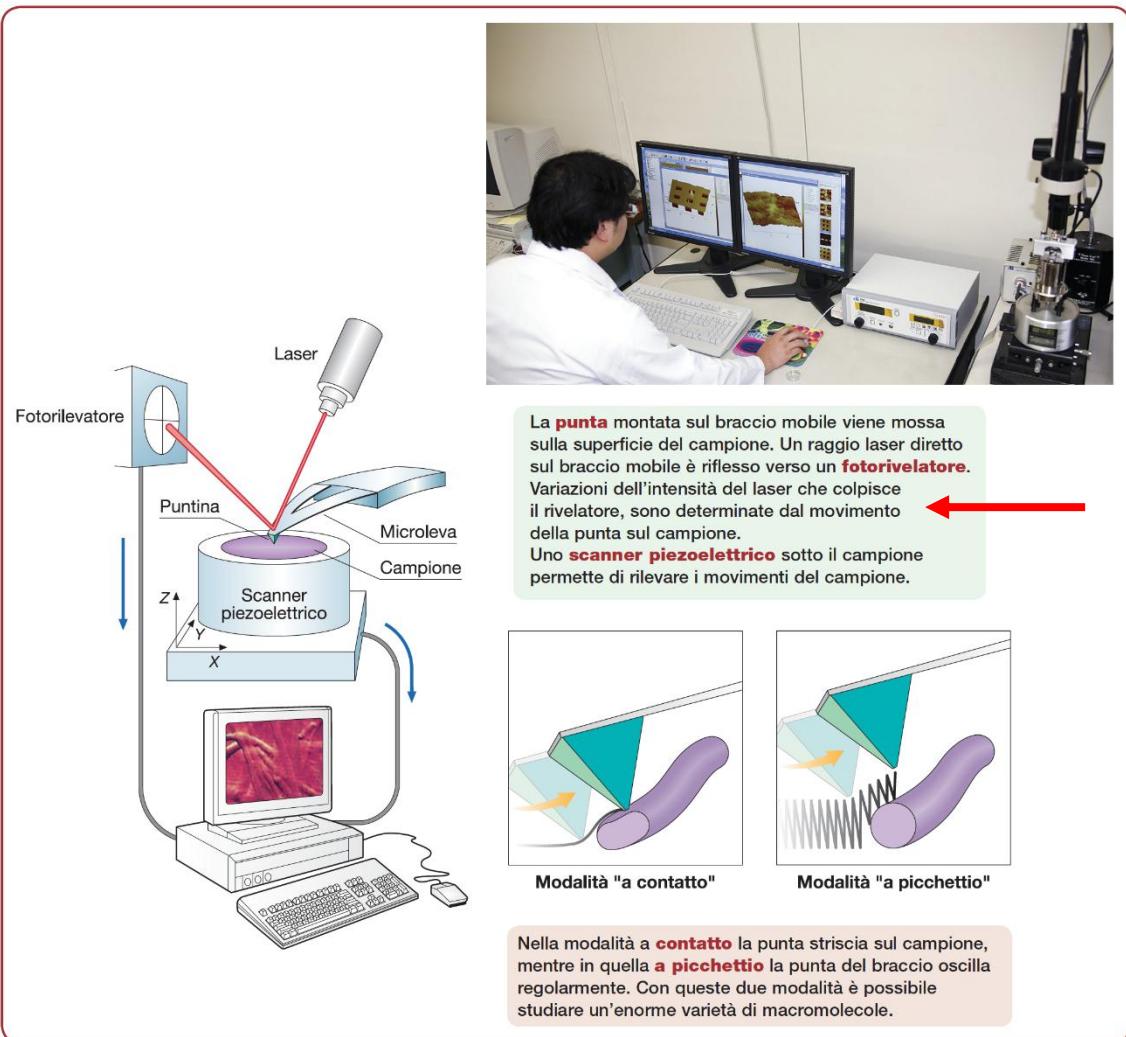
IMMAGINE AL SEM

► Figura 2.31 Porzione rostrale di un anfiosso adulto (*Branchiostoma floridae*) visto al SEM.

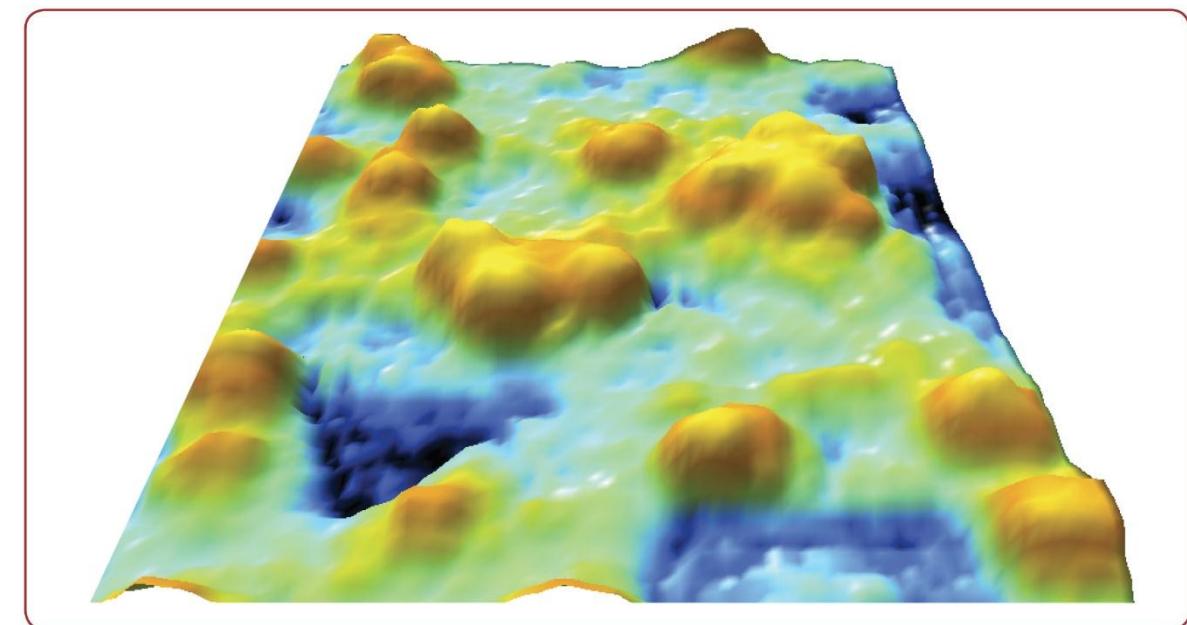


Sul lato ventrale sono visibili i **cirri** che circondano l'**apertura orale**.

NEW ENTRY: MICROSCOPIO A FORZA ATOMICA



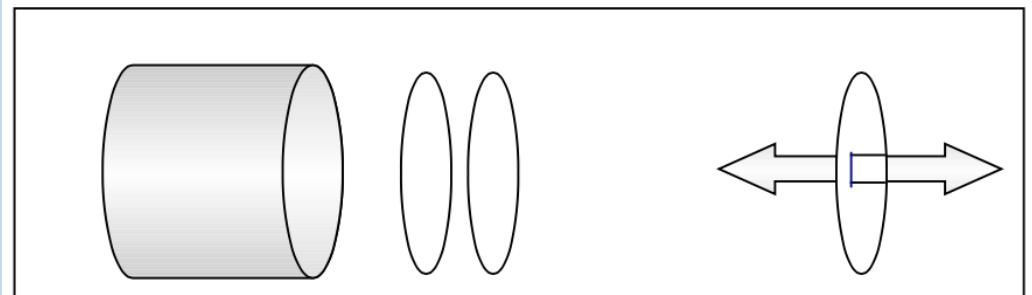
- È un potentissimo microscopio a scansione di sonda inventato nel 1986 che permette di osservare campioni, anche biologici, con una risoluzione molecolare e atomica.
- Non è necessario il trattamento preventivo del campione.



▲ Figura 2.33 Immagine di proteine di membrana ottenuta con il microscopio a forza atomica ed elaborata al computer.

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

- L'allestimento di un preparato biologico per l'osservazione al microscopio ottico necessita di una serie di procedimenti che rendano il campione prelevato talmente sottile da essere attraversato dalla luce posta al di sotto dell'apparato oculare del microscopio.



- Sezionamento sottile di un campione

- Inoltre, data la trasparenza del campione biologico, il preparato sottile deve essere adeguatamente trattato con sostanze coloranti per contrastare e rendere visibili al microscopio le strutture tissutali e cellulari.

- I procedimenti messi in atto per l'allestimento di un preparato istologico possono essere così riassunti:

Prelievo - Fissazione - Lavaggio - Disidratazione - Chiarificazione – Inclusione - Sezionamento - Reidratazione - Colorazione - Disidratazione - Montaggio – Osservazione.

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI PER LA MICROSCOPIA

1



1) Dissezione/
prelievo

2



2) Fissazione

3



3) Inclusione

4



4) Taglio

5



5) Colorazione

Vetrini pronti per
L'OSSERVAZIONE



PREPARAZIONE DEI CAMPIONI: DISSEZIONE/PRELIEVO

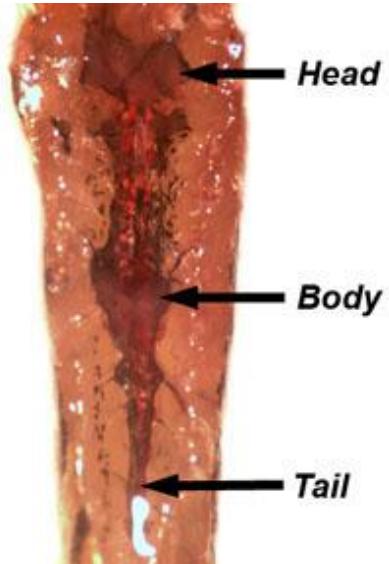
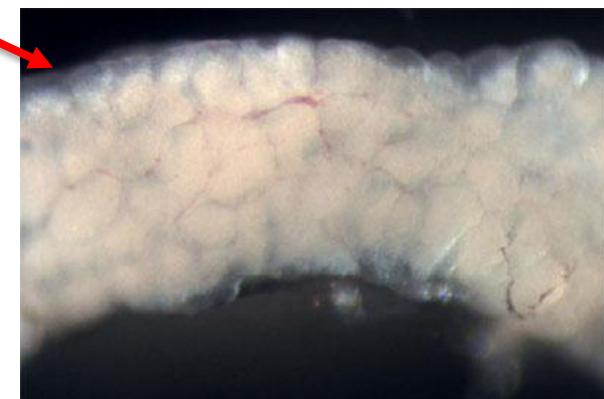
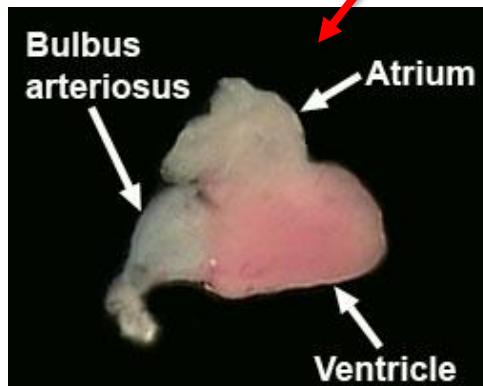
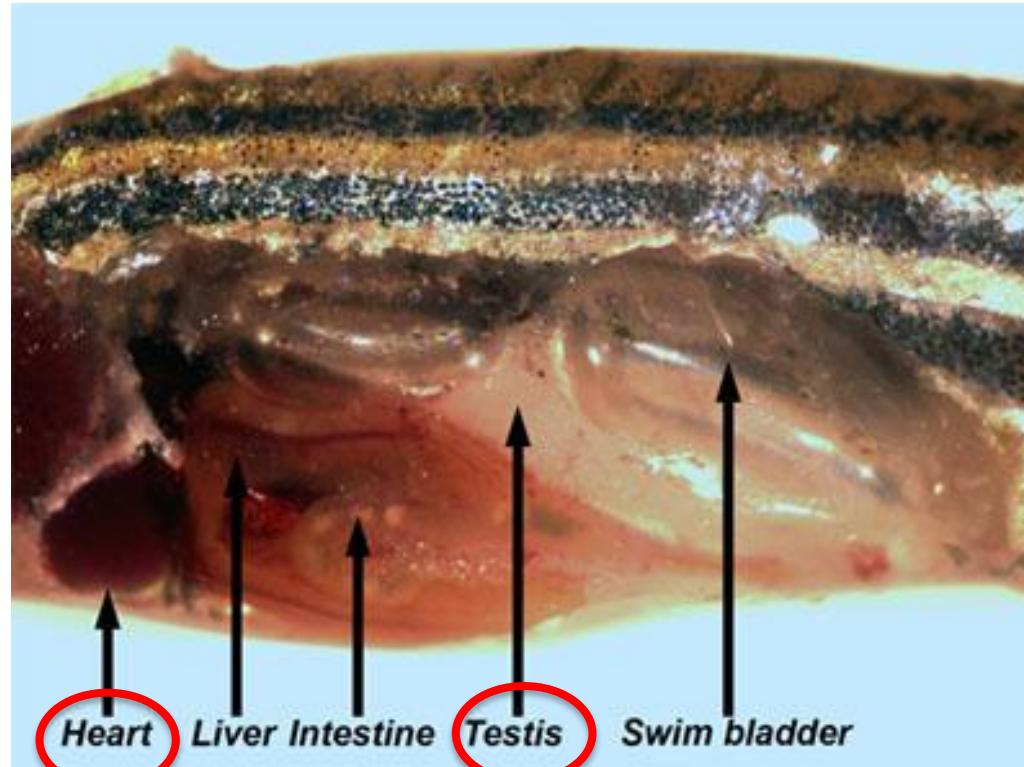
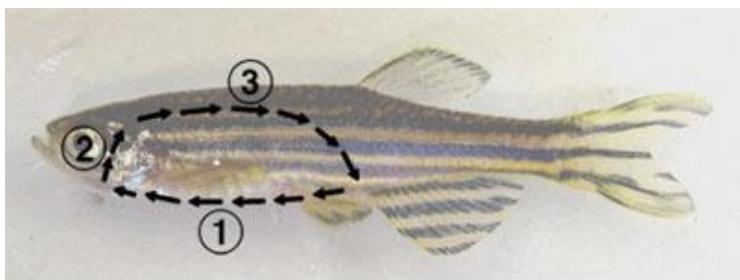
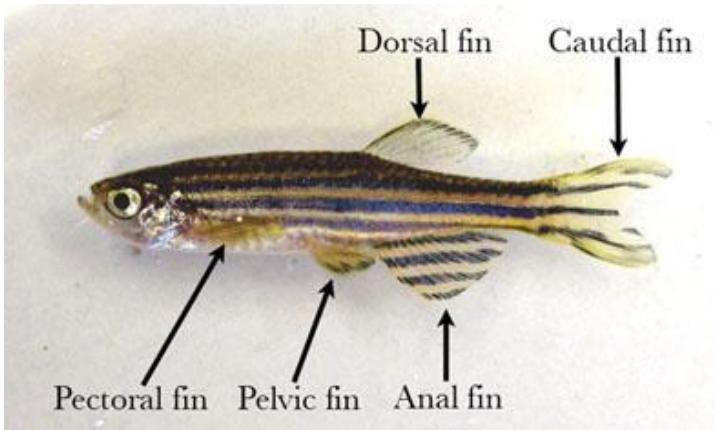
SCOPI DELLA DISSEZIONE:

- Studiare la morfologia (anatomia interna)
- Preparare organi e tessuti per l'analisi istologica/istochimica
- Rinvenire parassiti negli organi
- Definire la condizione riproduttiva
- Espiantare materiale vivente per trapianti o colture cellulari

PROCEDURA e ATTREZZATURA:

1. Preparare gli strumenti necessari: bisturi (coltelli), pinze e pinzette, forbici, aghi manicati, specilli e sonde, eventualmente **stereomicroscopio**.
2. Orientare correttamente l'animale: generalmente gli invertebrati vengono dissezionati dalla superficie dorsale, i vertebrati da quella ventrale.
3. Aprire con cautela le cavità corporee per non danneggiare gli organi e procedere in base alla finalità della dissezione.

ZEBRAFISH



Head kidney

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI: DISSEZIONE/PRELIEVO

- Per ottenere buoni preparati, è necessario che il **materiale prelevato sia molto fresco**. Infatti, dopo il prelievo, la fase successiva di fissazione deve avvenire nel più breve tempo possibile, per evitare le alterazioni autolitiche. Se non possibile, i preparati devono almeno essere refrigerati, in attesa del trattamento con i fissativi.
- E' conveniente che **i pezzi da fissare non superino 1 cm di diametro**. Pertanto, dopo l'espianto, è necessario operare un sezionamento del tessuto o organo, utilizzando pinzette e forbici (o lame) molto affilate, cercando di evitare al massimo deformazioni o compressioni improprie.
- La fase di sezionamento preliminare può avvenire in ambiente umido (campione immerso in soluzione fisiologica, o anche al di sopra di garze preventivamente imbevute di soluzione), per **evitare l'essiccamiento del campione** che potrebbe produrre alterazioni nel tessuto.
- Una volta sezionati, **i campioni dovranno essere lavati con soluzione fisiologica** per eliminare tracce di sangue o di altri liquidi organici.

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI PER LA MICROSCOPIA

1



1) Dissezione/
prelievo

2



2) Fissazione

3



3) Inclusione

4



4) Taglio

5



5) Colorazione

Vetrini pronti per
L'OSSERVAZIONE



PREPARAZIONE DEI CAMPIONI: FISSAZIONE

- **SCOPI DELLA FISSAZIONE:**

- 1) impedire alterazioni *post mortem* dei tessuti (autolitiche e ad opera di agenti esterni);
 - 2) immobilizzare i costituenti cellulari e tissutali del campione; conservare il materiale nelle condizioni più simili possibili a quelle vitali;
 - 3) proteggere i tessuti dagli stress fisici e chimici insiti nelle successive fasi di disidratazione, inclusione e sezionamento.
- Esiste una **varietà di sostanze utilizzate come fissativi**. La scelta di un reattivo di fissazione rispetto ad un altro dipende sia dalle dimensioni del campione che dal grado di preservazione strutturale richiesto dalle caratteristiche di risoluzione del microscopio usato (ad esempio, la capacità di penetrazione di un fissativo deve essere molto elevata nel trattamento di campioni voluminosi).
 - **Il fissativo deve essere scelto in funzione della natura dei costituenti chimici della cellula che si desiderano conservare** (ad esempio, le strutture proteiche sono facili da preservare, mentre gli zuccheri semplici sono piuttosto labili).

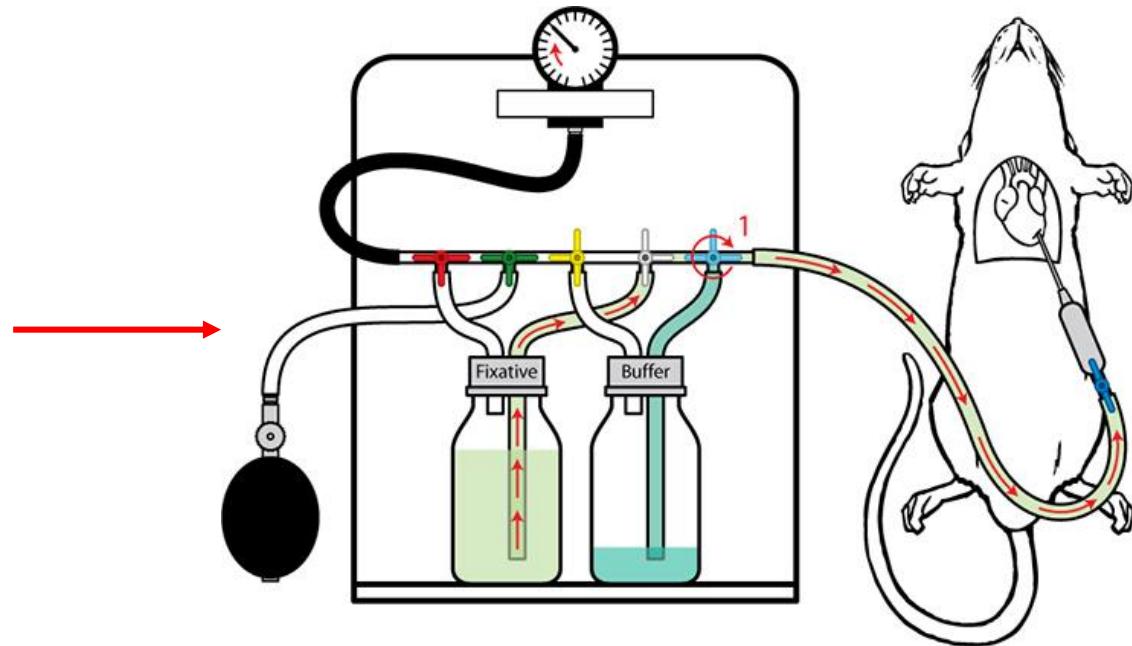
PREPARAZIONE DEI CAMPIONI: FISSAZIONE

- La massima parte dell'architettura cellulare è costituita da proteine per cui un buon agente di fissazione deve essere principalmente un ottimo stabilizzatore di queste macromolecole.
- Un notevole vantaggio della fissazione è costituito dal fatto che i tessuti trattati subiscono un notevole indurimento, particolarmente utile per la fase successiva del sezionamento del campione.
- Tutti i fissativi, utilizzati in singolo o in combinazione, devono necessariamente essere preparati come soluzioni isotoniche a pH 7.4, per impedire fenomeni di collassamento o rigonfiamento del campione, legati agli stress osmotici.
- ***Nel caso si voglia conservare la reattività enzimatica del tessuto, la fissazione può essere effettuata tramite congelamento rapido del tessuto, utilizzando ghiaccio secco o azoto liquido. In questo caso, i campioni passeranno direttamente alla fase di sezionamento, saltando disidratazione ed inclusione.***

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI: FISSAZIONE

- **METODI DI FISSAZIONE:**
 - 1) **FISICI:** utilizzo di alte o basse temperature.
 - 2) **CHIMICI:** utilizzo di sostanze o miscele, chiamate *fissativi*.

- Generalmente i campioni vengono immersi in tali fissativi oppure si fa la **PERFUSIONE**:
 - consiste in una fissazione attuata prima della escissione del tessuto, utilizzando il torrente circolatorio per far giungere il fissativo fino all'organo bersaglio.



FATTORI CRUCIALI PER UNA BUONA **FISSAZIONE**

- a. **Tempestività della fissazione (non appena si disseziona).**
- b. **Scelta del fissativo.**
- c. **Quantità di fissativo-rapporto 10:1 v/v tra fissativo e campione.**
- d. **Tempo di fissazione per evitare sotto- o sovra-fissazione:**
Variabile in base a: capacità di penetrazione del fissativo, dimensioni e tipo di campione (es: tessuti uniformi o a tessitura complessa), temperatura.

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI: FISSAZIONE

PRINCIPALI FISSATIVI

- **Classificazione chimica**

1. **Aldeidi:** FORMALINA, soluzione acquosa di formaldeide (4-10%), uno dei più utilizzati in istologia (12-24h); Glutaraldeide (2-3 %): fissativo per piccoli pezzi destinati al TEM.
2. **Alcoli:** etanolo (70-100 %).
3. **Acidi organici e minerali:** acido acetico, a. tricloroacetico, a. picrico, a. cromico.
4. **Sali di metalli pesanti:** bicromato di potassio, cloruro di mercurio
5. **Tetrossido di osmio.**



- **Classificazione funzionale**

- **FISSATIVI COAGULANTI** e **FISSATIVI NON COAGULANTI.**

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI: **FISSAZIONE**

MISCELE DI FISSAZIONE:

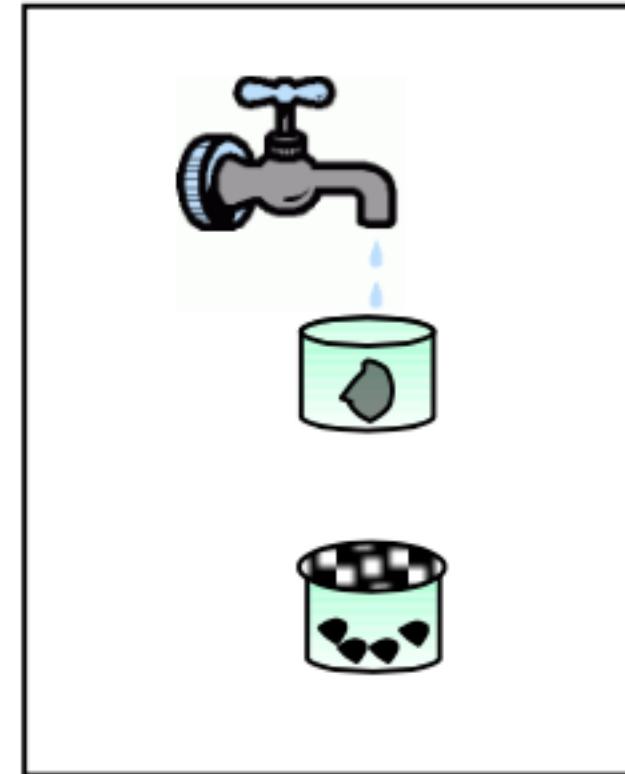
- **LIQUIDO DI BOUIN:** miscela di acido picrico, acido acetico e formalina (colore giallo intenso). Ottimo fissativo, indicato per pezzi voluminosi (8-10 h).
- **LIQUIDO DI CARNOY:** miscela di etanolo, cloroformio ed acido acetico. Usato soprattutto per fissare cellule isolate.



Tutti i fissativi devono necessariamente essere preparati come soluzioni isotoniche e a pH 7.4, per impedire fenomeni di collassamento o di rigonfiamento dei campioni, legati agli stress osmotici.

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI: LAVAGGIO

- **Dopo la fissazione, i preparati devono essere lavati accuratamente in acqua corrente per eliminare l'eccesso di fissativo (potrebbe interagire con i reattivi impiegati nelle fasi successive, per esempio i coloranti).**
 - Il lavaggio dei campioni di grandi dimensioni può essere effettuato mantenendo i pezzi all'interno del contenitore ove si è effettuata la fissazione ed esponendoli direttamente al flusso di acqua corrente.
 - I campioni più piccoli dovranno essere preventivamente inseriti in appositi contenitori provvisti di piccoli fori, per impedire che si perdano.



PREPARAZIONE DEI CAMPIONI: INCLUSIONE (DISIDRATAZIONE)

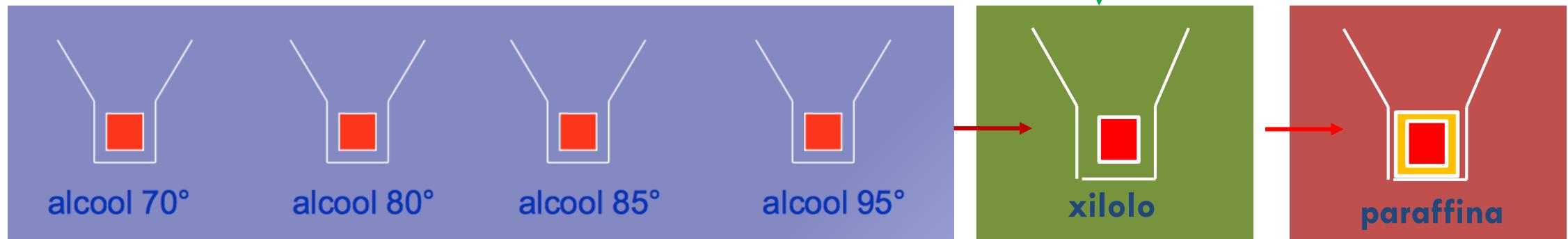
- Dopo la fissazione **i campioni devono essere disidratati** immergendoli in etanolo a concentrazione crescente.
- **La disidratazione è necessaria perché la maggior parte delle sostanze indurenti che permetteranno il sezionamento non sono idrosolubili.**



- La disidratazione può essere effettuata con un qualsiasi agente chimico anidro, capace di sostituire l'acqua presente nei tessuti, in grado di non provocare eccessiva coartazione dei campioni e con la proprietà di essere solubile e miscibile con i solventi intermedi che devono essere applicati prima dell'infiltrazione in paraffina.

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI: INCLUSIONE (CHIARIFICAZIONE o DIAFANIZZAZIONE)

- L'etanolo non è miscibile con la sostanza che dovrà infiltrarlo per la fase di inclusione (paraffina) e occorre sostituirlo con un solvente intermedio (processo di **chiarificazione**).
- Terminata la disidratazione, il campione è trattato con un **solvente** che favorisca l'infiltrazione nel tessuto con il mezzo indurente (paraffina);

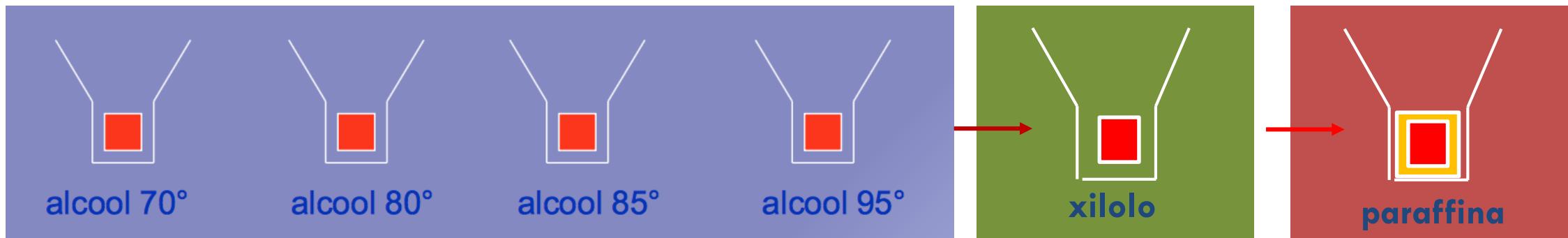


PREPARAZIONE DEI CAMPIONI: INCLUSIONE (AGENTI CHIARIFICANTI)

- **XILOLO**
rapida sostituzione, forte indurimento;
- **TOLUENE**
rapida sostituzione, medio indurimento;
- **BENZOLO CLOROFORMIO**
lenta sostituzione, basso indurimento.

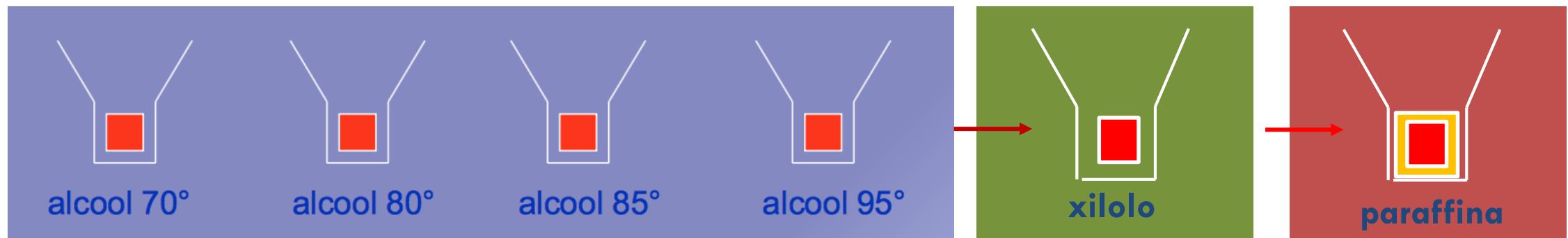


- **Procedura:**
 - ETANOLO/XILOLO 50% - 50%
 - XILOLO 100%



PREPARAZIONE DEI CAMPIONI: INCLUSIONE (CHIARIFICAZIONE o DIAFANIZZAZIONE)

- L'etanolo non è miscibile con la sostanza che dovrà infiltrarlo per la fase di inclusione (paraffina) e occorre sostituirlo con un solvente intermedio (processo di **chiarificazione**).
- Terminata la disidratazione, il campione è trattato con un solvente (xilolo) che favorisca l'infiltrazione nel tessuto con il mezzo indurente (paraffina), **nel frattempo portato al punto di fusione**.
- **Una volta raffreddato, il blocchetto di paraffina contenente il preparato potrà essere tagliato in sezioni sottili.**



PREPARAZIONE DEI CAMPIONI: INCLUSIONE

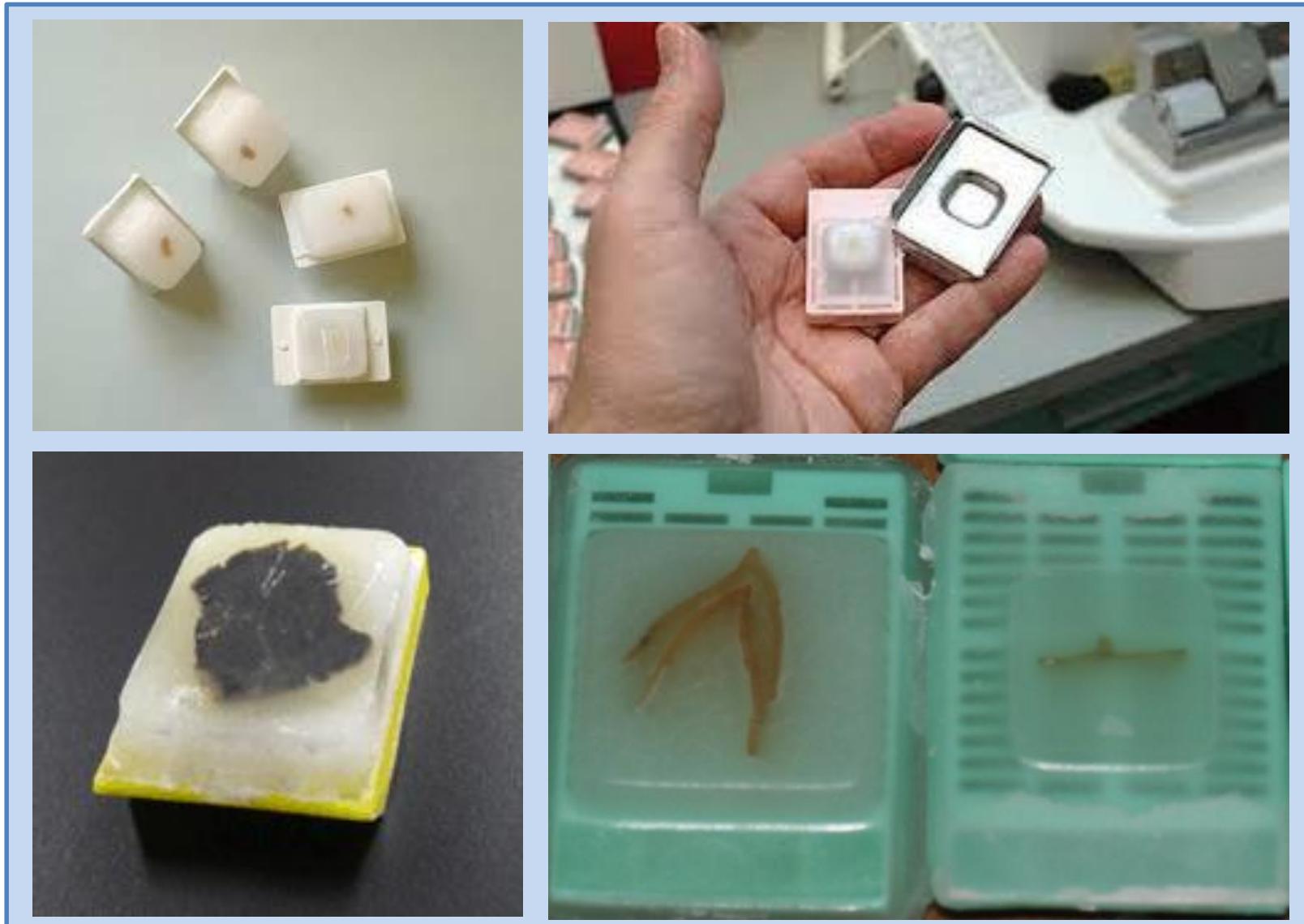
- INCLUSIONE = infiltrazione del campione con un mezzo di inclusione allo scopo di conferire al frammento la durezza e la compattezza necessarie per procedere alla sezione in sottili fettine. Di solito si usa la paraffina.

FASI DELL'INCLUSIONE:

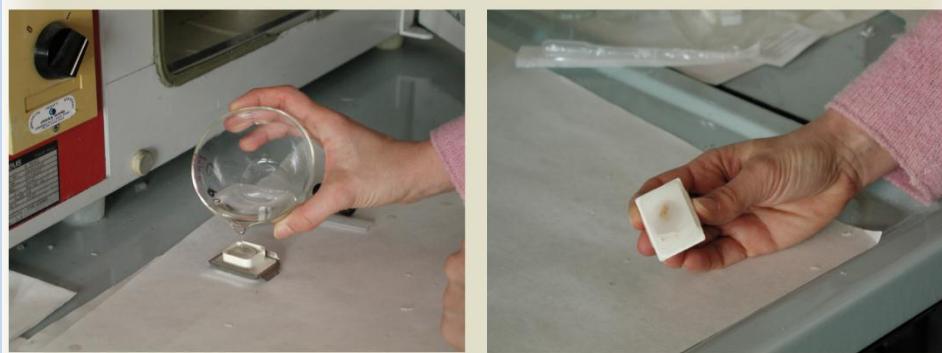
- a. disidratazione in solventi organici (etanolo) a gradazione crescente;
- b. chiarificazione o diafanizzazione: immersione nel solvente (xilolo) del mezzo di inclusione;
- c. passaggi nel mezzo di inclusione allo stato liquido (paraffina fusa);
- d. solidificazione del mezzo di inclusione contenente il campione (= blocco incluso) all'interno di un'apposita formella (di plastica o metallo) che verrà poi rimossa. Eventuale aggiunta di un supporto che funga da base di aggancio al microtomo.



ESEMPI DI BLOCCHETTI DI CAMPIONI INCLUSI IN PARAFFINA



PREPARAZIONE DEI CAMPIONI: INCLUSIONE



- **Paraffina solida: conferisce al campione la consistenza necessaria perché possa essere tagliato in sezioni sottili.**

- **Strumenti utili** per includere e normalmente presenti nei laboratori di istologia sono:



a. processatore automatico

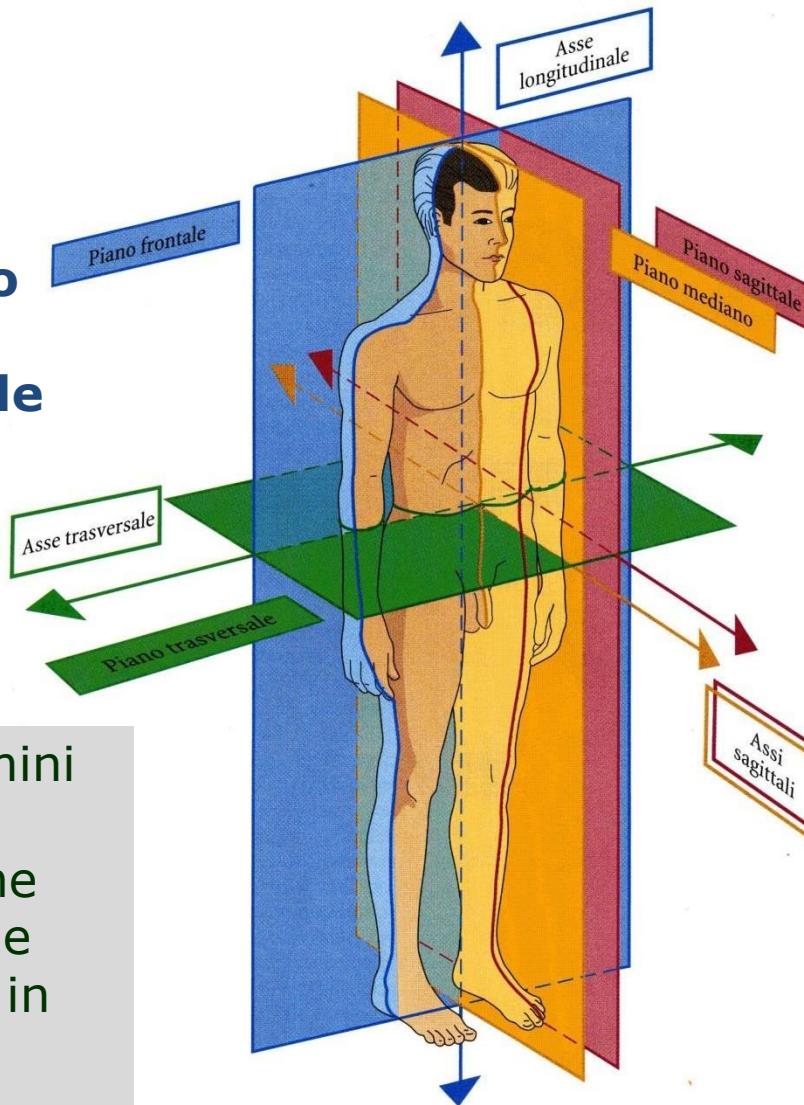


b. centralina di inclusione

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI: PIANI DI TAGLIO

Tutti gli animali a simmetria bilaterale presentano i seguenti versanti:

- un versante **destro** e uno **sinistro**;
- un versante **dorsale** e uno **ventrale**;
- un versante **cefalico/craniale** e uno **caudale**

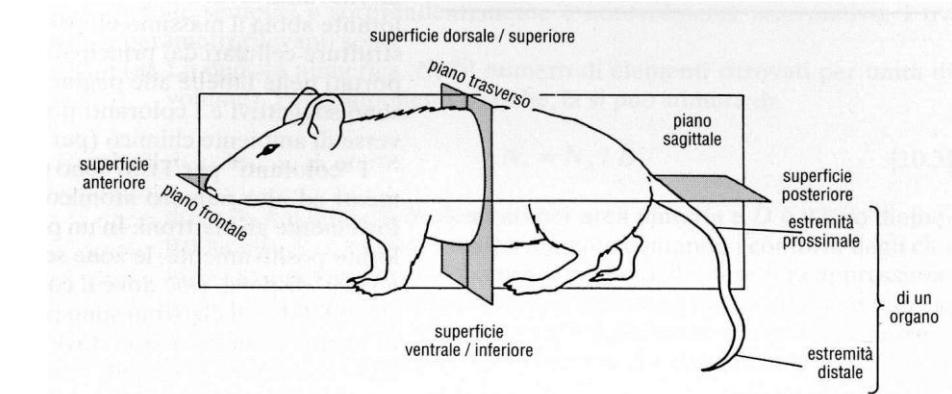


ATTENZIONE: i termini «anteriore» e «posteriore» come pure «superiore» e «inferiore» variano in base alla postura dell'animale

- Quando si procede al taglio di un organismo *in toto* o di un organo è necessario orientarlo in base al tipo di sezione che si vuole ottenere.

PIANI CORPOREI:
SAGITTALE
FRONTALE
TRAVERSALI

SEZIONI DI TAGLIO:
SAGITTALE
LONGITUDINALE
TRAVERSALE

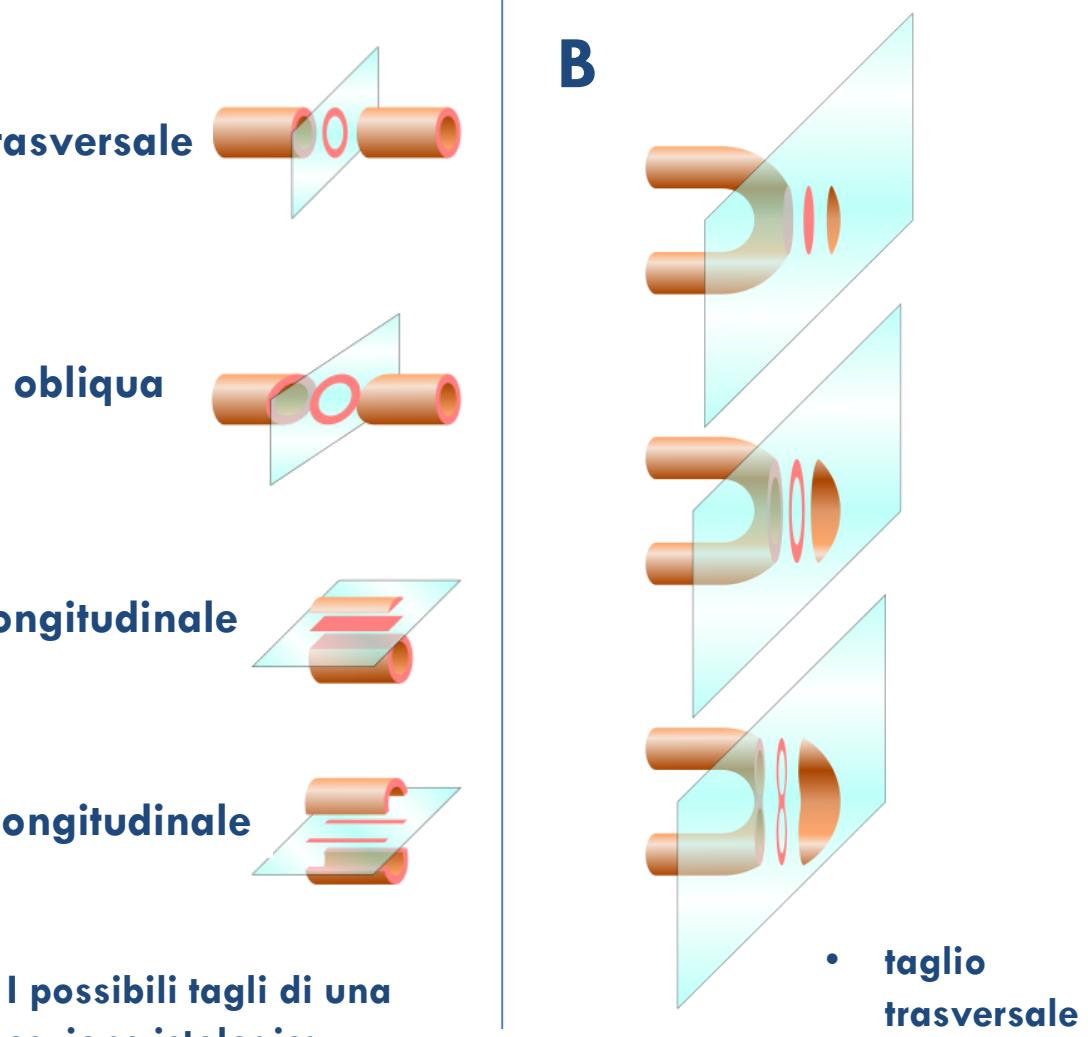


PREPARAZIONE DEI CAMPIONI: piani di sezione istologica

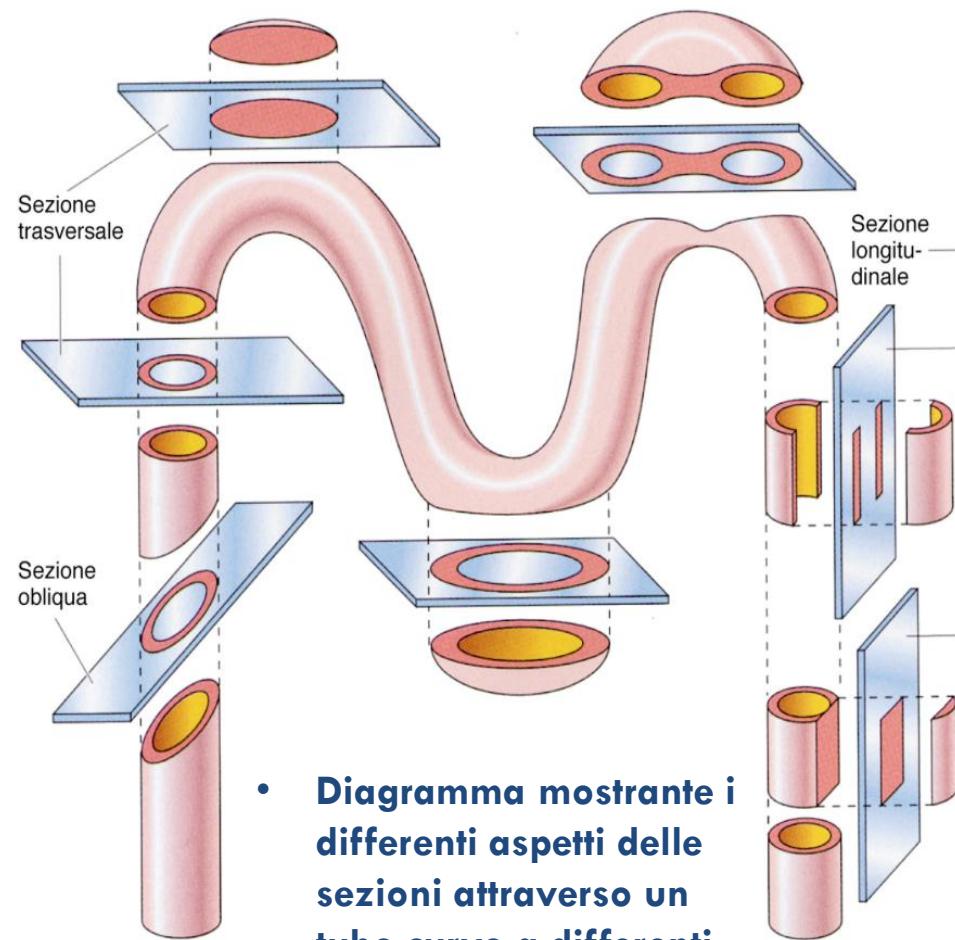
A



B



C



- I possibili tagli di una sezione istologica.

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI: MICROTOMIA

- **1770, George Adams Jr. – primo microtomo noto.**
- Già alla **fine dell'800** erano in vendita microtomi di struttura e meccanismo uguale a quelli odierni, dotati dello stesso tipo di lame che oggi sono reperibili sul web a basso costo.
- Anche **Sigmund Freud**, medico, che prima di “inventare” la psicanalisi si occupava di neurologia, possedeva un microtomo a slitta apparentemente del tutto simile a quelli venduti a **fine anni 70**.
- Ovviamente il perfezionamento tecnico dei microtomi e delle lame ha oggi reso possibile spessori di taglio inimmaginabili a quei tempi, ma la forma ed il meccanismo rimane quasi invariato.



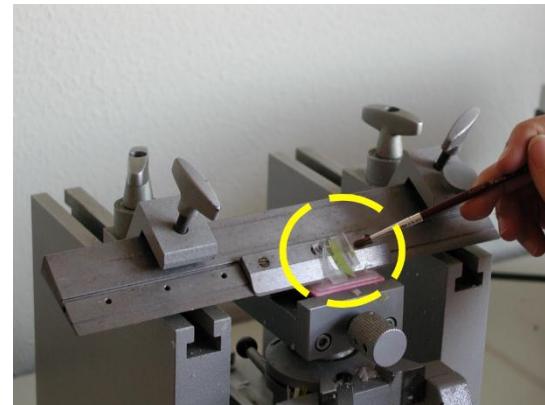
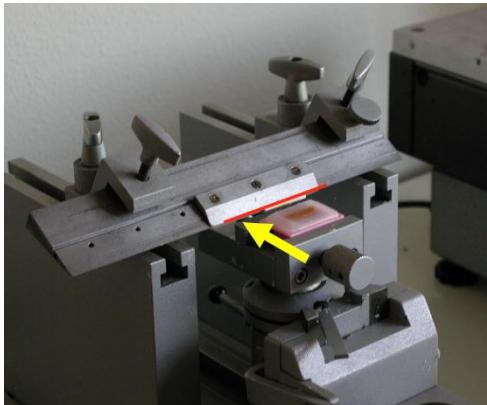
Il microtomo a slitta di Sigmund Freud



Microtomo a slitta moderno

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI: MICROTOMIA

OGGETTO CHE ESEGUE IL TAGLIO	
MICROTOMO A LAMA	E' LA LAMA CHE VENENDO IN CONTATTO COL PEZZO ESEGUE IL TAGLIO (LA LAMA SI MUOVE OD IL PEZZO SI MUOVE)
MICROTOMO A LAMA VIBRANTE (VIBROTOME)	LA VIBRAZIONE TRASMESSA ALLA LAMA AIUTA LA AZIONE DI TAGLIO – UTILE PER IL TAGLIO DI PREPARATI A FRESCO – TAGLIA FETTE NON MOLTO SOTTILI (>10 MICRON PER TESSUTI INCLUSI E >30 MICRON PER TESSUTI FRESCI)
MICROTOMO A LAMA VIBRANTE TIPO "COMPRESSTOME"	IL TESSUTO VIENE COMPRESSO IN UN DISPOSITIVO A TUBO IN MODO SIMILE A QUANTO AVVIENE IN UN TUBETTO DI DENTIFRICIO. LA COMPRESSIONE IRRIGIDISCE IL TESSUTO ED AIUTA IL TAGLIO DA PARTE DELLA LAMA VIBRANTE



PREPARAZIONE DEI CAMPIONI: MICROTOMIA

MODALITA' DI SCORRIMENTO LAMA/PEZZO E POSIZIONE DELLA LAMA	
MICROTOMO A SLITTA – MODELLO CON LAMA MOBILE “SLEDGE MICROTOME”	LA LAMA SI MUOVE CONTRO IL PORTAPEZZI CHE E' FISSO E SI ALZA AD OGNI TAGLIO – LA LAMA E' FISSATA DI LATO RISPETTO AL PEZZO – TAGLIA FETTE DA 1 A 60 MICRON
MICROTOMO A SLITTA – MODELLO CON LAMA FISSA (“BASE SLEDGE MICROTOME”)	LA LAMA E' FISSA, DI SOLITO POSTA “A PONTE” AL CENTRO DELLO STRUMENTO, ED IL PORTAPEZZI SI ALZA AD OGNI TAGLIO
MICROTOMO ROTATIVO (MINOT⁵¹)	LA AZIONE ROTATIVA DI UNA MANOVELLA SPOSTA CICLICAMENTE IN MODO TANGENZIALE IL MORSETTO PORTAPEZZO CONTRO LA LAMA CHE E' FISSA – IL PEZZO SI ALZA AD OGNI PASSATA – TAGLIA FETTE DA 0,5 A 60 MICRON
MICROTOMO OSCILLANTE - ROCKING MICROTOME (CAMBRIDGE)	IL PEZZO VIENE A CONTATTO CON LA LAMA COMPIENDO UN ARCO DI CERCHIO REALIZZATO DALLA OSCILLAZIONE A PENDOLO DI UN BRACCIO MECCANICO



Microtomo a slitta



Microtomo rotativo



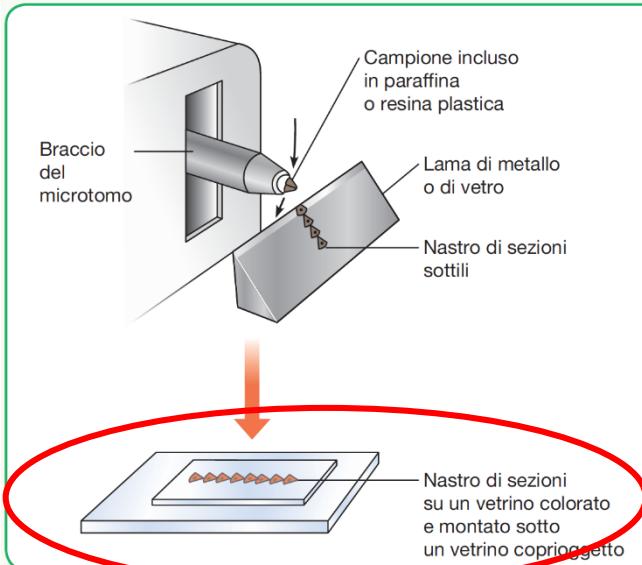
Microtomo oscillante

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI: MICROTOMIA



Il **microtomo** permette di ottenere sezioni di 4-6 µm di spessore. Il microtomo, manuale o motorizzato, può essere rotativo o a slitta, è dotato di una lama di acciaio e può tagliare campioni inclusi in paraffina o in resina sintetica (in genere poliestere, metacrilato o resina epoxidica come l'araldite).

▲ Figura 1 Microtomo rotativo per materiale incluso in paraffina.



Meccanismo di sezionamento con un **microtomo rotativo**. Il nastro di **sezioni parificate** si ottiene facendo battere il blocchetto sulla lama. Ogni volta che il braccio fa uno spostamento dall'alto verso il basso, il braccio avanza di un certo numero di µ.m. Le sezioni vengono distese su di un **vetrino portaoggetto**, colorate e chiuse con un **vetrino coprioggetto**.

▲ Figura 2 Meccanismo di sezionamento con un microtomo rotativo.



Bagnomaria per far stendere le sezioni

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI: MICROTOMIA

TEMPERATURA DI TAGLIO

CRIOSTATO	E' DI FATTO UN FRIGORIFERO ALL'INTERNO DEL QUALE SI TROVA IL MICROTOMO
MICROTOMO A LAMA RAFFREDDATA (SIA A SLITTA CHE "SLEDGE")	E' UN MICROTOMO CHE HA LA LAMA ED IL PEZZO OPPURE LA SOLA LAMA RAFFREDDATA (CON APPOSITI SISTEMI FRIGORIFERI SEPARATI CHE RAFFREDDANO LA SOLA LAMA O ANCHE IL MORSETTO PORTAPEZZO) LA LAMA ED IL PEZZO SONO RAFFREDDATI (DI SOLITO CON UN GETTO DI ANIDRIDE CARBONICA) IN ALCUNI MODELLI (DA BANCO) LA LAMA E' FISSATA AD UN MECCANISMO "A CERNIERA" E TAGLIA COMPIENDO UN ARCO DI CERCHIO

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI: MICROTOMIA

► Figura 3 Particolare di un criostato.



CRIOSTATO:

- **Particolare microtomo, contenuto all'interno di una cella frigorifera, usato per tagliare campioni congelati.**
- Il congelamento è un processo alternativo alla fissazione chimica e successiva inclusione ed è utile *per campioni che necessitino di diagnosi rapida o di cui non si voglia alterare la composizione.*

- **Le sezioni criostatiche hanno uno spessore 10-30 µm, vengono fatte aderire ai vetrini che si conservano a -80°C fino a quando verranno sottoposte a colorazione.**

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI: MICROTOMIA

SOTTIGLIEZZA DEL TAGLIO

ULTRAMICROTOMO

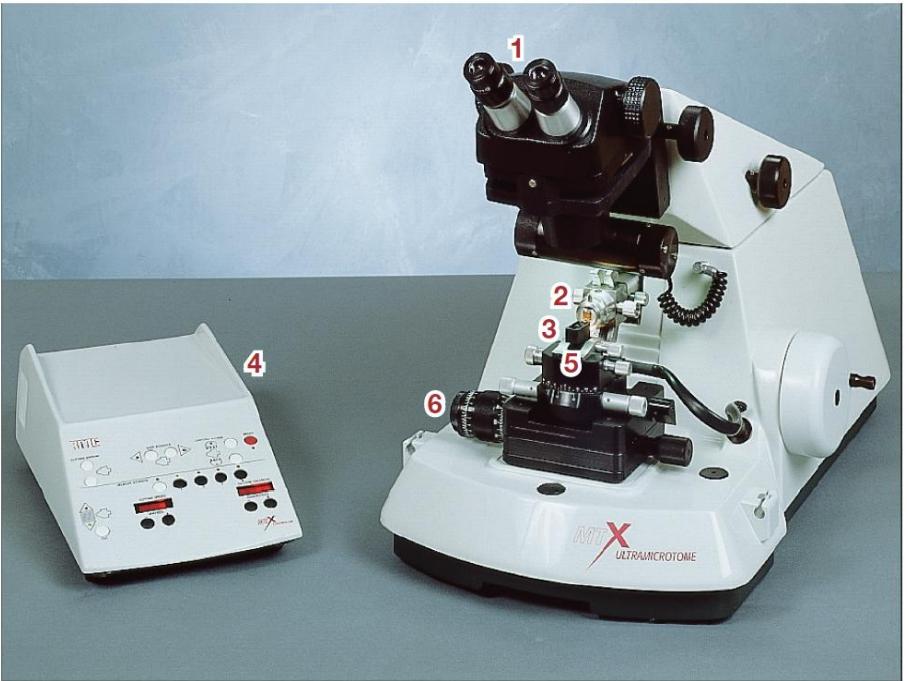
PUO' TAGLIARE FETTE SOTTILISSIME
SINO A 10 NANOMETRI -
DI SOLITO USA LAME DI VETRO O DI DIAMANTE



PREPARAZIONE DEI CAMPIONI: MICROTOMIA

Un tipico ultramicrotomo è costituito da:

1. un microscopio stereoscopico;
2. un apparato di illuminazione;
3. un portacampioni;
4. una centralina di comando;
5. un portalama,
6. un comando per l'avanzamento manuale del campione.



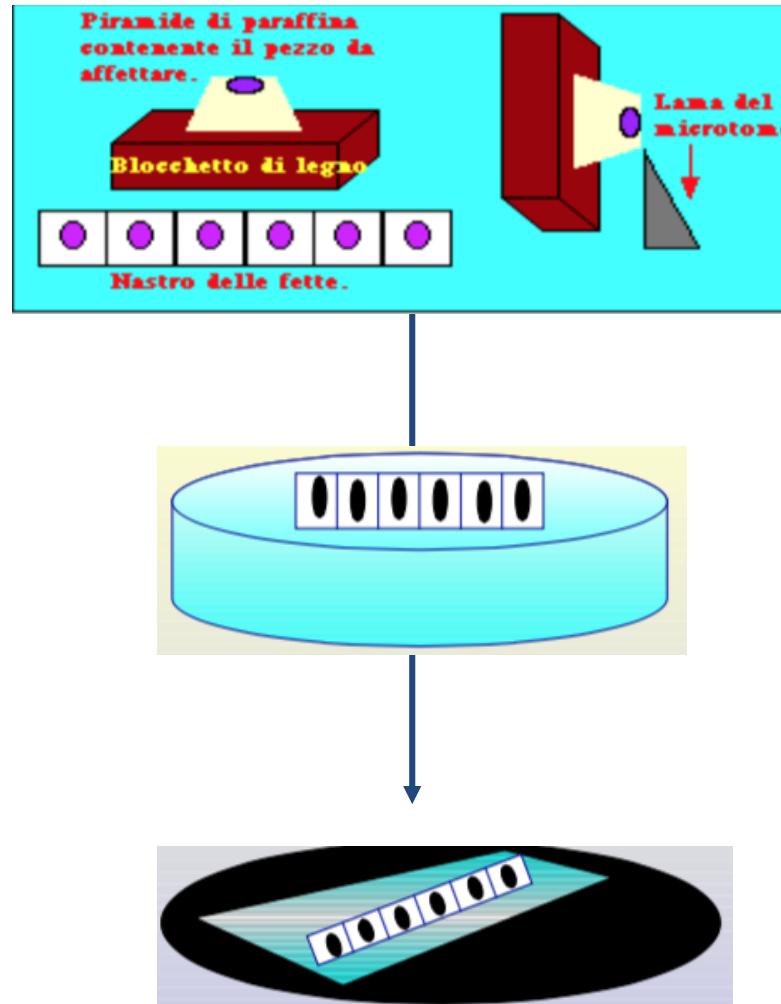
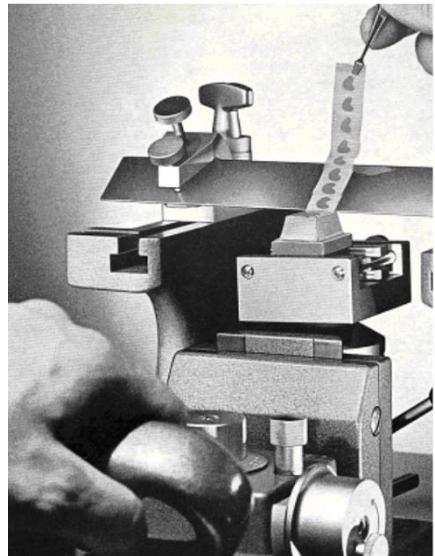
◀ Figura 4
Modello di ultramicrotomo.

- Sezioni SEMIFINI 1-1.5 µm che si raccolgono su vetrini e si colorano per esempio con blu di toluidina.
- Sezioni ULTRAFINI 50-100 nm che si raccolgono su una griglietta metallica. Le ultrafini sono sottoposte a colorazione di contrasto con sali di metalli pesanti (acetato di uranile e citrato di piombo).

ULTRAMICROTOMO:

- Serve per tagliare campioni inclusi in resine epossidiche (araldite o epon) destinati all'osservazione al TEM.
- E' provvisto di un binoculare ed utilizza una lama di vetro o di diamante. Permette di ottenere sezioni molto sottili.

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI: MICROTOMIA/SEZIONAMENTO



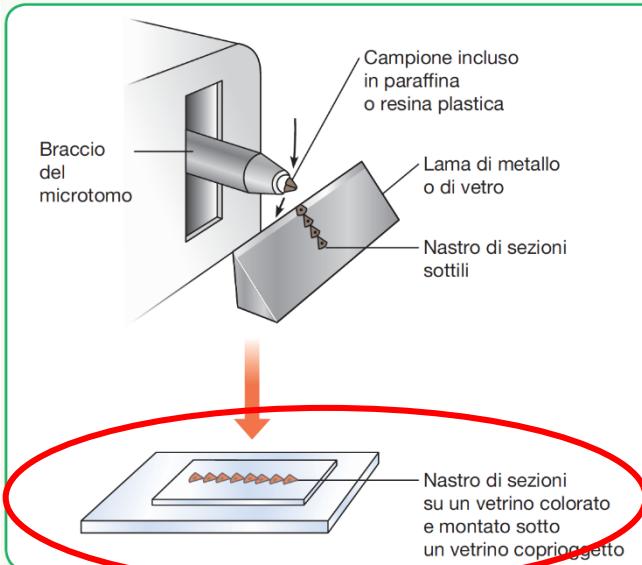
1. Ritmo costante di taglio: formazione di un nastrino di sezioni
2. Con l'aiuto di un pennellino, le sezioni vanno sistemate in vaschetta con acqua distillata riscaldata (40-45 °C).
3. Raccolta su vetrino Asciugatura su piastra riscaldata

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI: MICROTOMIA



Il **microtomo** permette di ottenere sezioni di 4-6 µm di spessore. Il microtomo, manuale o motorizzato, può essere rotativo o a slitta, è dotato di una lama di acciaio e può tagliare campioni inclusi in paraffina o in resina sintetica (in genere poliestere, metacrilato o resina epoxidica come l'araldite).

▲ Figura 1 Microtomo rotativo per materiale incluso in paraffina.

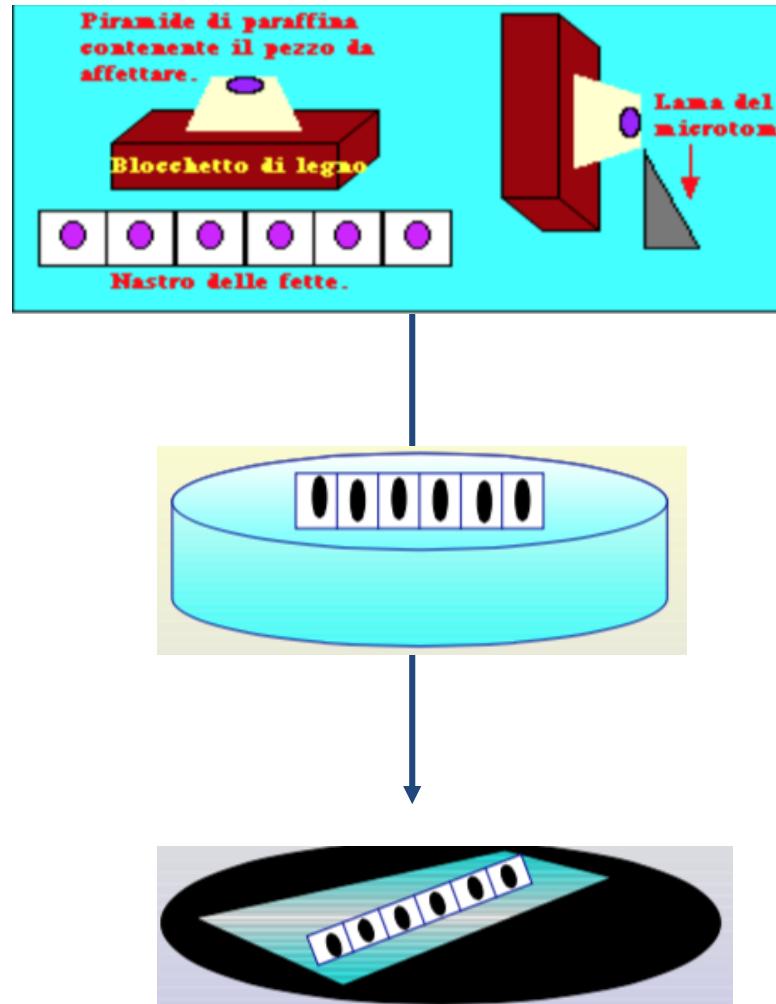
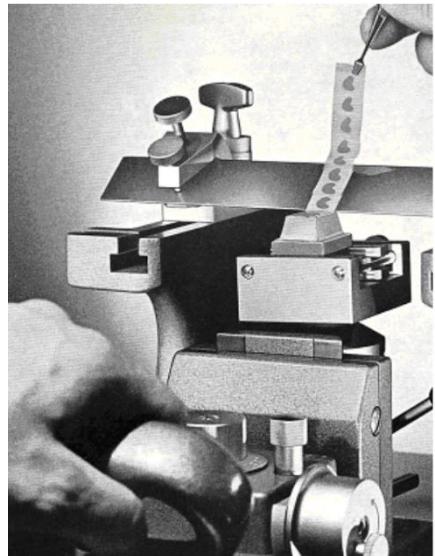


Meccanismo di sezionamento con un **microtomo rotativo**. Il nastro di **sezioni paraffinate** si ottiene facendo battere il blocchetto sulla lama. Ogni volta che il braccio fa uno spostamento dall'alto verso il basso, il braccio avanza di un certo numero di µ.m. Le sezioni vengono distese su di un **vetrino portaoggetto**, colorate e chiuse con un **vetrino coprioggetto**.

▲ Figura 2 Meccanismo di sezionamento con un microtomo rotativo.



PREPARAZIONE DEI CAMPIONI: MICROTOMIA/SEZIONAMENTO



1. Ritmo costante di taglio: formazione di un nastrino di sezioni
2. Con l'aiuto di un pennellino, le sezioni vanno sistamate in vaschetta con acqua distillata riscaldata (40-45 °C).
3. Raccolta su vetrino Asciugatura su piastra riscaldata