

CI Biologia animale

Citologia : 24 + 3 ore di esercitazioni

Prova in itinere: a fine corso (prima settimana di novembre) non obbligatoria valida fino a settembre 2007.

Il voto della prova in itinere non si può rifiutare; chi non lo supera ha diritto di vedere il compito.

Chi non vuole sostenere la prova in itinere o chi non la supera può dare l'esame orale assieme alle altre materie del CI.

Materiale didattico Citologia

- **Diapositive on line**

- **Libri:** * *Compendio di Istologia*
Junqueira Carneiro
Ed. Piccin

* *Istologia e
Anatomia Microscopica
Veterinaria*
Dellmann Eurell
Casa Ed. Ambrosiana

Parte 1

Concetti generali

Metodi di studio

Tipi di preparazioni istologiche

- Preparati a fresco**
- Preparati in sopravvivenza**
- Preparati fissati**

Colture

- ☐ Una coltura è la coltivazione *in vitro* di singole cellule o frammenti di tessuto al di fuori dell'organismo di appartenenza.
- ☐ Espianti: piccoli frammenti di tessuto.
- ☐ Colture primarie-secondarie (colture di pelle umana durano in *genere* due o tre mesi dividendosi da 50 a 100 volte).
- ☐ Linee cellulari : la coltura è diventata immortale.
- ☐ Clone: linea cellulare originata da una singola cellula progenitrice

Tessuti Fissati

- ☐ Fissazione
- ☐ Inclusione
- ☐ Sezionamento

Microscopio ottico

Il microscopio ottico a luce ordinaria è composto di parti meccaniche ed ottiche. I componenti ottici comprendono tre sistemi di lenti: condensatore, obiettivo ed oculare.

Il condensatore proietta un cono di luce che illumina l'oggetto.

L'obiettivo ingrandisce l'oggetto.

L'oculare ingrandisce ulteriormente l'oggetto e proietta l'immagine alla retina dell'osservatore.

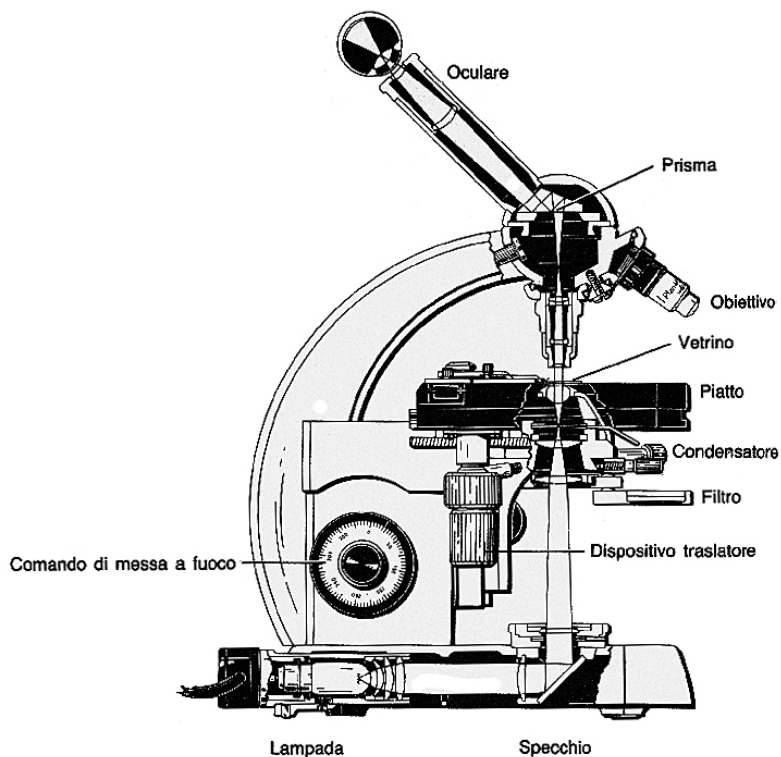
L'ingrandimento totale si calcola moltiplicando il potere di ingrandimento dell'obiettivo per quello dell'oculare.

Un fattore critico per ottenere una buona immagine è costituito dal potere di risoluzione del microscopio che dipende principalmente dall'obiettivo. Il potere di risoluzione è la più piccola distanza alla quale due punti si vedono ancora distinti tra loro.

Il miglior microscopio ottico ha un potere di risoluzione di 0,2 micrometri (μm), o 200 nanometri, migliorando così la visione a occhio nudo di circa 500 volte.

È teoricamente impossibile costruire un microscopio ottico migliore di così: il fattore limitante è la lunghezza d'onda della luce che è di circa 0,4 micrometri per la luce viola e di circa 0,7 micrometri per quella rossa.

Nel microscopio ottico la luce passa attraverso il preparato, attraversa un gruppo di lenti (obiettivo e oculare), e giunge all'occhio umano.



Tipi di microscopio

Microscopio in contrasto di fase

Le varie componenti cellulari mostrano indici di rifrazione diversi al passaggio della luce; queste diversità possono essere trasformate in cambiamenti di intensità luminosa che al microscopio ottico possono essere rilevate.

Microscopio ad interferenza

Sfrutta principi simili al precedente, ma riesce a fornire anche dati quantitativi sulla densità dei vari componenti osservati utilizzando un raggio luminoso che non interseca il campione.

Microscopio in campo oscuro

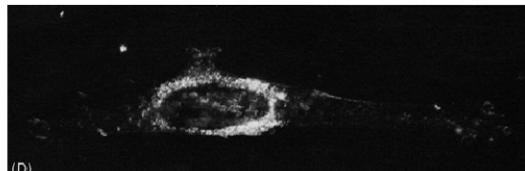
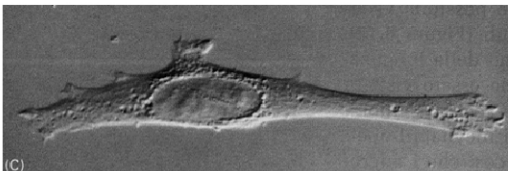
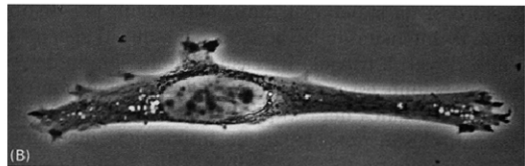
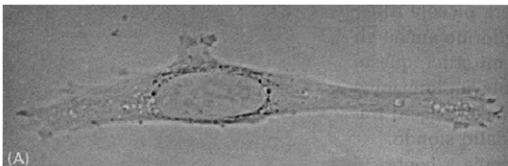
Consiste nell'impiego di un ordinario microscopio ottico dove però il condensatore illumina l'oggetto obliquamente in modo che le varie strutture cellulari riflettono la luce verso l'occhio dell'osservatore mentre il resto rimane scuro.

Microscopio a luce polarizzata

Viene utilizzato per l'analisi di strutture cristalline o fibrose con un elevato grado di orientazione molecolare. Le strutture di questo tipo non trasmettono la luce con la stessa velocità in tutte le direzioni e quindi quando sono colpite da un raggio luminoso, lo scindono in due raggi perpendicolari tra loro. Questi si propagano con velocità diverse e forniscono così informazioni sull'organizzazione strutturale degli elementi osservati.

Microscopio a fluorescenza

Le molecole fluorescenti assorbono la luce ad una lunghezza d'onda e la riemettono ad una più lunga. Ciò può essere rilevato tramite un sistema di filtri



Microscopio invertito

Serve per la osservazione di cellule viventi coltivate in vitro.

In questo microscopio gli obbiettivi e gli oculari sono sistemati al disotto del tavolino porta-oggetti mentre la lampada di illuminazione ed il condensatore sono situati superiormente.

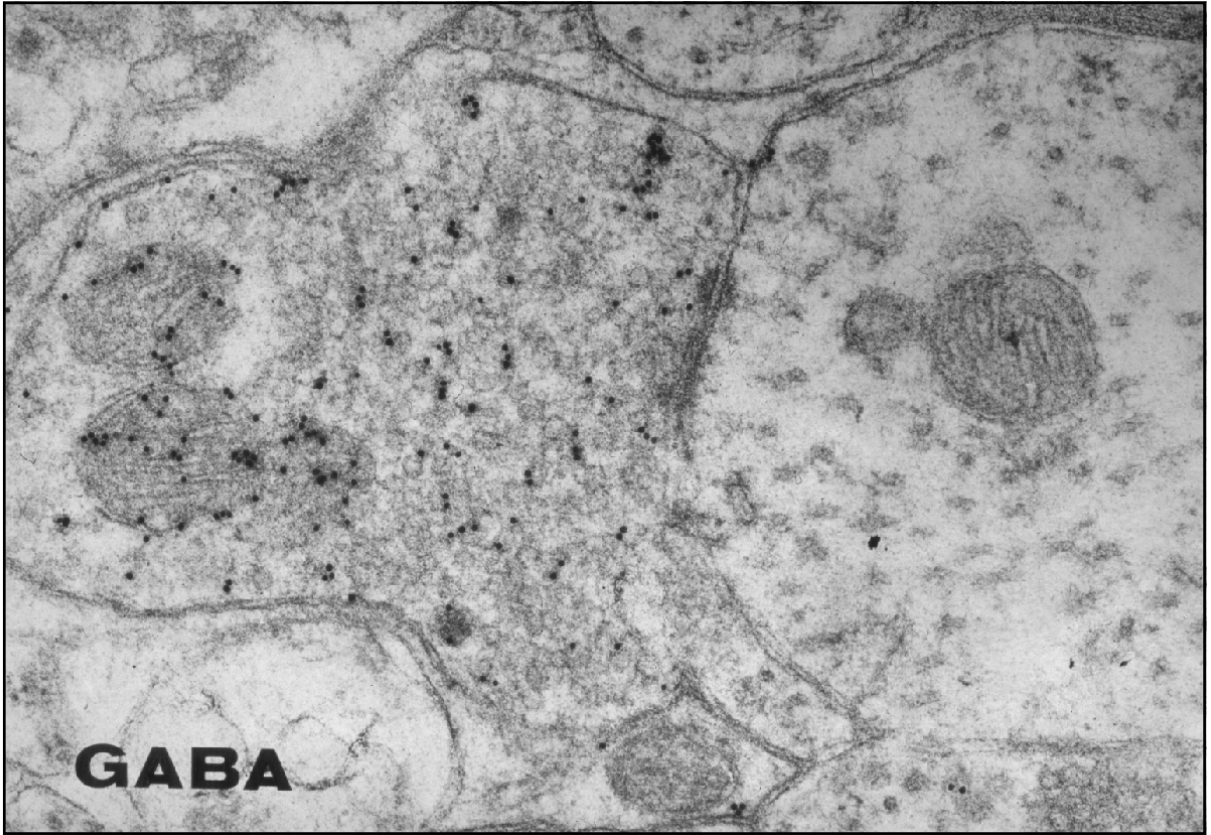
In questo modo è possibile osservare le cellule anche se queste stanno all'interno di recipienti con pareti spesse.

Microscopio elettronico a trasmissione

Consente un notevole aumento di risoluzione rispetto al microscopio ottico.

La sorgente luminosa qui è un fascio di elettroni emessi da un filamento di tungsteno, mentre le lenti sono costituite da un campo elettromagnetico che può deviare gli elettroni.

L'immagine viene poi visualizzata su uno schermo fluorescente o fissata su una lastra fotografica. Il suo limite di risoluzione è di 0,3-0,5 nm.

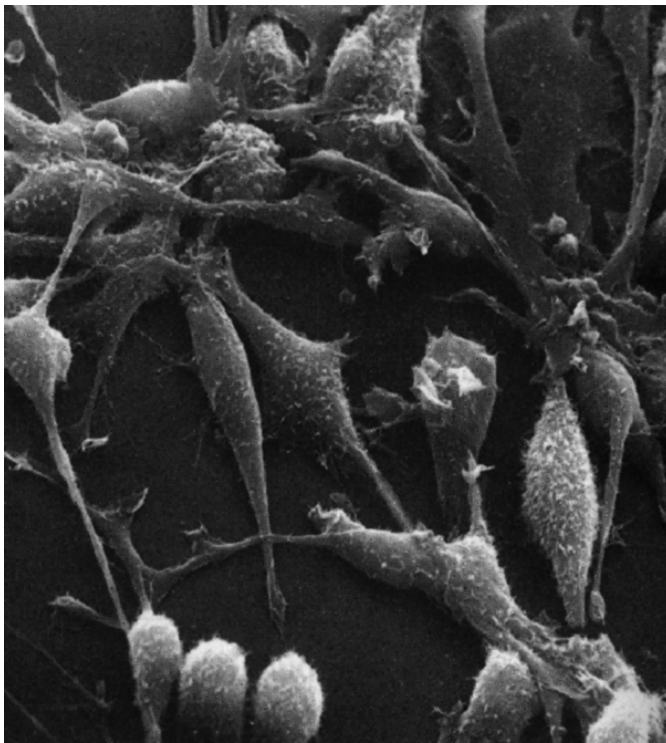


Microscopio elettronico a scansione

Rispetto al microscopio a trasmissione ha un potere risolutivo più basso (10 nm), ma permette di valutare il rilievo degli oggetti.

Anche qui è presente un fascio di elettroni che viene fatto spostare da punto a punto attraverso la superficie da esaminare dando origine così a elettroni riflessi e ad elettroni secondari. Questi ultimi sono utilizzati per formare un'immagine della topografia della superficie.

La differenza con il ME a trasmissione può essere paragonata alla differenza che c'è nell'osservare una foto di una persona o la sua radiografia.



Microscopio elettronico a scansione

Tipo di microscopio	Tecnica	Applicazioni
Microscopio elettronico a trasmissione	Convenzionale	Analisi ultrastrutturale generica di cellule e tessuti
	Criofrattura	Analisi ultrastrutturale delle membrane cellulari
Microscopio elettronico a scansione	Convenzionale	Analisi di superficie di cellule, tessuti o parti di organi

Unità di misura della cellula e degli organuli subcellulari

- ❑ Cm: organi, cellule giganti
- ❑ Mm: organi, cellule giganti
- ❑ Um (1/1000 di mm) : cellule ed organuli cellulari
- ❑ Nm (1/1000 di um) : ultrastruttura degli organuli cellulari
- ❑ A° (1/10 di nm) : ultrastruttura di organuli e macromolecole

Microscopio confocale

Permette l'analisi per strati dei campioni biologici.

E' dotato di un sistema ottico che da luogo ad un cono di luce in grado di scansionare punto per punto e un piano dopo l'altro tutti i livelli di un campione tridimensionale.

I dati così ottenuti vengono elaborati elettronicamente e ciò permette di conoscere non solo la struttura esterna degli oggetti ma anche la loro struttura interna.

Metodiche istochimiche

Sfruttano la proprietà di alcuni reagenti di formare con certi composti chimici della cellula prodotti di reazione colorati visibili al microscopio ottico.

I lipidi ad es. possono essere visualizzati con coloranti come il SudanIII solubili nei grassi che danno colore nero.

Per i carboidrati la reazione più nota è quella dell'acido periodico-Schiff che conferisce un colore rosso-porpora.

Per le proteine si sfruttano reagenti che formano con certi gruppi chimici degli aminoacidi, prodotti colorati.

Anche alcuni enzimi possono essere messi in evidenza all'interno della cellula come le fosfatasi, le perossidasi, le deidrogenasi ecc.

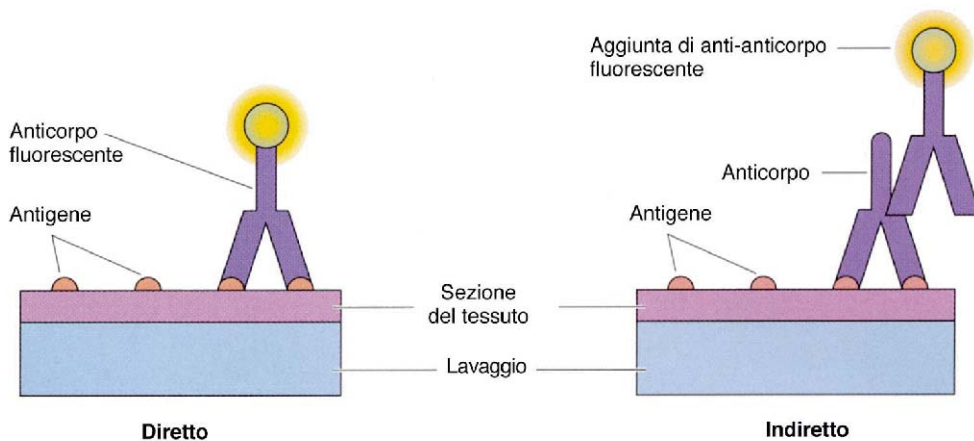
Gli stessi acidi nucleici possono essere colorati con metodiche istochimiche come quella di Feulgen che colora DNA in rosso porpora.

IMMUNOISTOCHIMICA

E' una variante dell'istochimica che permette la localizzazione istologica di molecole sfruttando le loro caratteristiche antigeniche. E' quindi una reazione tra un *antigene e il suo relativo anticorpo*.

Gli anticorpi sono proteine prodotte dal sistema immunitario come difesa contro sostanze estranee; sono proteine del gruppo delle globuline (*immunoglobuline*).

Sono moltissimi tipi diversi ognuno con un sito di legame diverso che riconosce una specifica molecola bersaglio o *antigene*.



Es. di reazione immunoistochimica enzimatica in microscopia ottica:

Ac. primario costituito da IgG prelevate da siero di coniglio prodotte contro la proteina actina (antigene).

Ac. secondario costituito da IgG di capra dirette contro le IgG di coniglio coniugato con l'enzima perossidasi

Trattamento con perossido di idrogeno e colorante diaminobenzidina (DAB).

Formazione di un precipitato marrone visibile al M.O. nel sito di legame antigene-anticorpo.

Es.di reazione immunoistochimica in microscopia elettronica:

Ac. primario prodotto da siero di topo diretto contro la proteina insulina

Ac. secondario ottenuto da siero di coniglio diretto contro le IgG di topo coniugato con particene di oro colloidale di 20 nm.

Le particene di oro colloidale sono visibili al microscopio elettronico.

Ibridazione in situ

Prevede l'uso di sonde, brevi sequenze di DNA o RNA preparate in laboratorio marcate con enzimi o altre sostanze con cui viene incubato il tessuto.

Per ottenere l'unione della sonda a DNA con la sua complementare nel tessuto da trattare è necessario che il DNA, normalmente a doppia catena, venga ridotto a singola catena.

Per le sonde a RNA questo non è necessario perché RNA è già a singola catena nelle cellule animali.

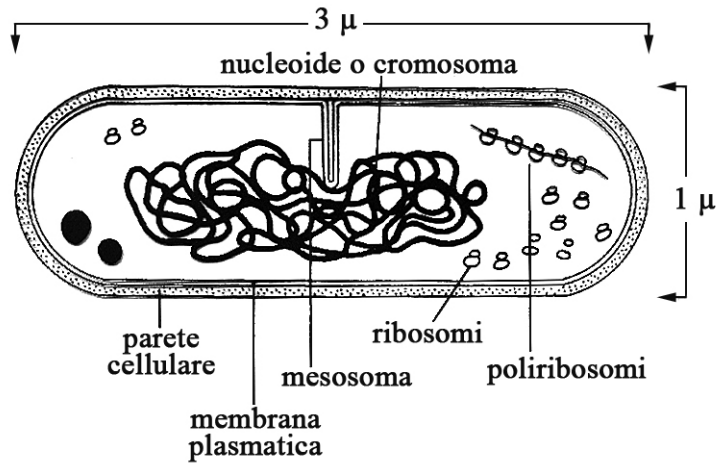
Se la reazione avviene, quindi se quella cellula possiede un tratto di DNA o di RNA complementare alla sonda si instaura il legame che può essere evidenziato tramite reazione colorimetrica come in ICC.

Parte 2

Citologia

Caratteri generali delle cellule procariote ed eucariote

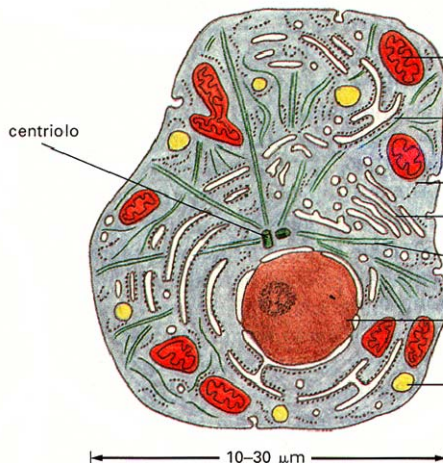
Cellule Procariote (es. batteri)	Cellule Eucariote
Assenza di un involucro nucleare che separa il DNA dagli altri costituenti cellulari	Presenza di un involucro nucleare che separa il DNA dagli altri costituenti cellulari
Assenza di istoni (proteine legate al DNA)	Presenza di istoni
Assenti (generalmente) gli organelli membranosi	Sono presenti organelli membranosi (es. reticolo endoplasmatico, apparato di Golgi)
Dimensioni comprese fra 1 e 5 μm	Dimensioni (generalmente) superiori a 5 μm



Schema della struttura di un batterio, ricavato da sezioni longitudinali osservate al microscopio elettronico.

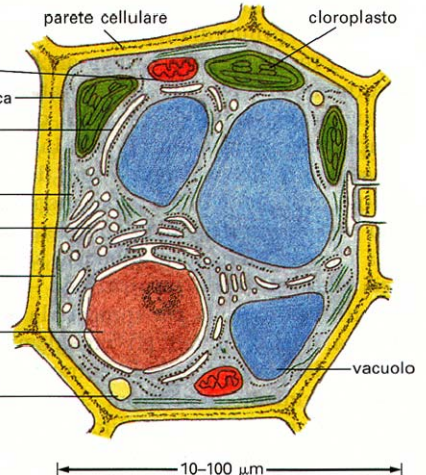
CELLULA ANIMALE

sezione di una cellula animale



CELLULA VEGETALE

sezione di una cellula vegetale di una pianta superiore



Forma delle cellule

E' variabile in relazione a:

- ☐ Tipo e grado di differenziazione
- ☐ Interazioni di ordine meccanico
- ☐ Stato funzionale
- ☐ Ambiente in cui si trova la cellula

Grandezza delle cellule nei Mammiferi

- ☐ E' in genere compresa fra i 4 ed i 40 μm .
- ☐ Alcune cellule nervose hanno corpi cellulari di dimensioni superiori ai 100 μm .
- ☐ La cellula uovo dei Mammiferi raggiunge i 300 μm .
- ☐ Le cellule uovo degli Uccelli raggiungono gli 8-8,5 cm (struzzo)

Legge della grandezza cellulare costante (legge di Driesch)

- ☐ Cellule dello stesso tipo in animali di mole somatica diversa hanno la stessa grandezza.
- ☐ Eccezioni: fibre muscolari scheletriche, neuroni
- ☐ Variazioni in conseguenza di stimoli funzionali:
 - ipertrofia cellulare
 - ipotrofia cellulare

La diversa dimensione degli organismi dipende quindi dal diverso numero e non dal diverso volume delle cellule.

Composizione chimica delle cellule

Acqua: è il costituente chimico più abbondante della materia vivente; è presente nella cellula in due forme, libera e combinata. La prima rappresenta *circa* il 95% dell'acqua cellulare totale; la percentuale combinata è legata alle proteine.

Nell'acqua si trovano disciolti molti ioni; K^+ e Mg^{+2} si trovano più abbondanti nell'interno della cellula. Gli ioni Na^+ e Cl^- sono più abbondanti invece nei liquidi extracellulari.

Le proteine sono i costituenti macromolecolari principali della cellula e possono *essere* divise in proteine strutturali, costituenti delle varie strutture cellulari e in proteine di secrezione.

Gli acidi nucleici, fondamentali in quanto portano l'informazione genetica ed essenziali per la sintesi proteica.

Esistono due tipi di acidi nucleici: DNA e RNA.

Glucidi: i carboidrati appartengono a tre classi: monosaccaridi, oligosaccaridi e polisaccaridi.

Tra questi ultimi i più importanti sono ad es. il glicogeno e la cellulosa delle cellule vegetali.

Tra i monosaccaridi invece rientrano il ribosio e il desossiribosio che fanno parte della struttura del RNA e del DNA.

Gli oligosaccaridi comprendono invece ad es. Il saccarosio ed il lattosio che sono disaccaridi.

Suddivisione generale della cellula eucariota

- ☐ Organuli
(metabolicamente attivi)
- ☐ Inclusioni
(metabolicamente inerti)
- ☐ Citoscheletro

Compartimentalizzazione della cellula

II citoplasma cellulare forma la maggior parte della massa della cellula.

Esso è costituito per il 70% da acqua, dal 15-20 % di proteine e contiene numerosi organuli ognuno dei quali ha funzioni specifiche.

Il citoplasma esterno agli organuli cellulari è detto *citosol*. Il citosol contiene numerosi enzimi e proteine strutturali.

La maggior parte del metabolismo intermedio (insieme delle reazioni chimiche attraverso le quali la cellula degrada alcune piccole molecole e ne sintetizza altre come precursori delle macromolecole necessarie per la struttura, la funzione e l'accrescimento) si svolge nel citosol.

Il citosol contiene inoltre una serie di inclusi metabolicamente inattivi ed è attraversato da una rete di filamenti proteici che costituiscono il citoscheletro.

Le membrane interne che formano gli organuli citoplasmatici suddividono la cellula in compartimenti specializzati

- ☐ II nucleo
- ☐ II citosol
- ☐ II reticolo endoplasmatico
- ☐ I Ribosomi
- ☐ L'apparato di Golgi
- ☐ I mitocondri
- ☐ I lisosomi
- ☐ I perossisomi

*L'esistenza di questi
compartimenti fra loro
segregati consente alla
cellula di effettuare tutta
una serie di reazioni chimiche
che altrimenti sarebbero
incompatibili*