

Zoologia

lunedì 12 ottobre 2020 16:50

La biologia studia la vita e le sue caratteristiche (*bios*=vita e *logos*=discorso). La zoologia è un ramo della biologia ed è lo studio del regno animale. Il primo congresso di zoologia su nel 1907 in America. Il mondo vivente caratterizzato da:

- **Unità:** tutte le forme di vita vengono da un organismo ancestrale che evolvendosi ha fatto comparire organismi viventi diversi, quindi tutti hanno caratteristiche simili;
- **Diversità:** in base agli ambienti e agli stimoli ognuno ha sviluppato caratteristiche diverse.

Le 7 caratteristiche fondamentali in comune ai viventi sono:

- ❖ **Cellule e organizzazione:** le cellule vanno a formare tessuti, che vanno a unirsi formando organi che lavorano assieme per formare sistemi
- ❖ **Uso energia e metabolismo:** alcuni ricavano energia dalla luce (fotosintesi), altri da sostanze chimiche (autotrofi). Gli eterotrofi ricavano energia da altri organismi. Tutto questo avviene grazie ai processi metabolici, una serie di reazioni chimiche per ottenere energia (ATP negli animali);
- ❖ **Risposta a mutamenti ambientali;**
- ❖ **Regolazione e omeostasi:** mantenere stabili le condizioni interne;
- ❖ **Crescita e sviluppo:** aumento numero di cellule e aumento complessità organismo;
- ❖ **Riproduzione;**
- ❖ **Evoluzione biologica:** cambiamenti visibili (fenotipo) o invisibili (mutazioni interne).

Vita sulla terra

Compare circa 3,5-4 miliardi di anni fa sotto forma di cellule primitive, organizzazione di RNA all'interno di goccioline. Con una serie di evoluzioni e mutazioni si è passati ai primi organismi unicellulari per poi arrivare alle specie attuali. I cambiamenti evolutivi coinvolgono modifiche di strutture esistenti (zampa roditore, ala pipistrello e pinna delfino). Esistono due meccanismi evolutivi:

1. **Discendenza verticale con mutazioni**
2. **Trasferimento genico orizzontale**

Discendenza verticale con mutazioni

Di padre in figlio ci sono mutazioni casuali che vengono ereditate. Queste possono portare alla formazione di una nuova specie. Le mutazioni non sempre sono positive, possono essere favorevoli, neutre o negative (diminuiscono sopravvivenza).

Trasferimento genico orizzontale

Cambiamento genetico tra specie diverse, sono casuali, molto rare. Un esempio è quello nei batteri, ad esempio un gene per la resistenza all'antibiotico che viene trasferito da *Escherichia coli* a *Streptococcus*.

Non si parla più di albero della vita ma di rete della vita perché ci sono questi trasferimenti.

Evoluzionismo

venerdì 16 ottobre 2020 09:01

13.7 miliardi di anni fa l'universo ebbe inizio con il Big Bang, il nostro sistema solare invece 4.6 miliardi di anni fa. 4.5 miliardi di anni fa si formò la Terra, raggiunse una distanza tale da rendere possibile la vita. La terra iniziò a raffreddarsi per consentire la solidificazione degli strati esterni e formazioni oceanici.

Inizia a formarsi la vita:

1. **Si originano molecole organiche**, nucleotidi e amminoacidi;
2. **Si originano dei polimeri organici**, si formano DNA, RNA e proteine;
3. **Formazione strutture di confine**, i polimeri furono circondati da membrane;
4. **Origine del mondo a RNA**, i polimeri circondati da membrane sviluppano proprietà cellulari.

Origine molecole organiche

Ci sono 3 ipotesi:

1. Sulla terra primordiale le condizioni possono essere state favorevoli alla formazione spontanea del **brodo primordiale**. Il laboratorio hanno cercato di riprodurre le condizioni che c'erano sulla terra, quindi vapore acque, idrogeno, metano e ammoniaca. Ricreando un ambiente gassoso simile a quello sulla terra, hanno dato una scarica elettrica (temporali), si raffredda il vapore acqueo, si condensa e raccolta in una beuta. Analizzandola hanno visto che era possibile una sintesi di amminoacidi e nucleotidi.
2. **Ipotesi extraterrestre**: meteoriti hanno portato molecole organiche, però questo materiale sarebbe andato distrutto durante il viaggio e la collisione con la terra.
3. **Camini vulcanici sottomarini**: esistono vulcani sul fondo del mare che eruttano, esce il magma che si raffredda subito. Questo contatto va a creare un processo chimico per sintesi di queste molecole. Anche in questo caso venne fatto in laboratorio e videro che era possibile. Esistono tutt'ora microrganismi che vivono vicino ai camini vulcanici, ricavano energia da dei processi chimici.

Polimeri organici

I nucleotidi e gli amminoacidi polimerizzano. Questo però non avviene in acqua facendo decadere l'ipotesi del brodo primordiale. Questa polimerizzazione può invece avvenire su **superfici argillose**, quindi **più probabile ipotesi dei camini vulcanici**.

Formazione strutture di confine

Si forma una primordiale membrana cellulare, dando vita a una semplice organizzazione, prende il nome di **protobionte**:

- Ha una struttura di confine
- Contiene informazioni genetiche
- Poteva svolgere funzioni enzimatiche, semplici vie metaboliche
- Erano capaci di duplicarsi.

Possono essersi formati da:

- **Coacervati**: goccioline d'acqua che formano spontaneamente dall'associazione di polimeri carichi;
- **Microsfere**: ipotetiche macromolecole aveva incapsulato dell'acqua creando piccole vescicole;
- **Liposomi**: formazione di vescicole costituite da un doppio strato lipidico, sull'argilla ci possono essere fenomeni che catalizzano la formazione di liposomi (ipotesi camini vulcanici).

Mondo a RNA

Si formano i protobionti, cellule primordiali con dentro molecole di RNA, l'unica catena polipeptidica che riesce a svolgere diverse funzioni allo stesso tempo:

- Immagazzinare informazioni;
- Ha funzioni enzimatiche (ribozimi);
- Capacità di duplicazione.

Il DNA e proteine non sono capaci di svolgere tutte e tre.

C'è stata quindi una selezione chimica:

1. Ad un certo punto l'RNA subisce delle mutazioni casuali e va ad assumere una capacità autoreplicante. Per selezione quelli di prima vanno persi, gli altri invece aumentano di numero;
2. Ci possono essere altre mutazioni, capacità di sintetizzare ribonucleotidi. Queste due caratteristiche servono e iniziano a formarsi solo protobionti con entrambi.

Con una serie di mutazioni si sarebbero formati DNA e proteine. Si passa da mondo a RNA a mondo a DNA/RNA/proteine:

- Il DNA conserva informazioni e meno soggetto a mutazioni;
- Proteine hanno maggiore efficienza e potenziale catalitico

Mondo DNA/RNA/proteine

Il protobionte quando passa a DNA/RNA/proteine andrà a dare vita alle prime forme di vita, **cellule procariote**, cellule senza il nucleo con DNA libero nel citoplasma. Inoltre erano **anaerobiche** perché non c'era ossigeno sulla terra. Erano **eterotrofe**, si nutrivano di altre molecole già presenti. Gli **autotrofi** comparvero quando diminuì la disponibilità di molecole organiche, potevano o morire o adattarsi.

La prima cellula prende il nome di LUCA (ultimo antenato comune universale), dalla quale tutto il mondo vivente ha avuto origine. Ci sono stati

cambiamenti genetici e modifiche ambientali:

- Clima/temperatura
- Atmosfera
- Masse continentali
- Inondazioni
- Glaciazioni
- Impatti meteoriti responsabili di estinzioni

Per studiare cosa era avvenuto si usano:

- **Stratigrafia sedimentaria**: non molto precisa, si basa sul deposito continuo che va a formare i sedimenti dove si incastrano i fossili. La loro datazione dipende dalla posizione rispetto ad altri. Il problema è che gli strati vanno in contro a fenomeni di erosione, slittamento, rovesciamento e un fossile può passare da uno strato all'altro;

- **Datazione con radioisotopi:** gli isotopi tendono a decadere in un certo tempo e cambiano, si vede ad esempio quando carbonio 14 è diventato azoto 14 e in base a quanto C è rimasto e quanto N si è formato si determina l'età del fossile.

Evoluzione

Accumulo di cambiamenti ereditabili nel corso di uno o più generazioni. Questi portano a caratteristiche specifiche di una specie. Analizzato in diversi modi:

- **Piccola scala:** mutamento singolo gene in una popolazione;
- **A scala maggiore:** formazione di una nuova specie, accumulo più mutazioni. Gruppi di individui hanno caratteristiche nuove rispetto alla specie precedente e non possono più riprodursi con loro ma solo tra loro stessi.

Il primo che introduce il concetto di specie fu John Ray nel 1600. Linneo introduce il concetto di tassonomia. Per loro tutto quello che osservavano era sempre stato così. Nel 1800 grazie a Lamarck si introduce in concetto di evoluzione, secondo cui le caratteristiche fenotipiche sono ereditate.

Darwin pubblica l'origine della specie, aveva molte idee simili ad Alfred Wallace:

- L'evoluzione definita con introduzione di una nuova caratteristica che dava origine a diversità;
- La selezione naturale era la causa che portava all'evoluzione.

Tutto viene descritto da 5 osservazioni:

1. Tutti gli individui hanno un potenziale per dar vita a una crescita esponenziale;
2. Il numero degli individui rimane sempre lo stesso;
3. Le risorse naturali sono limitate

Da queste tre arriva alla prima deduzione: esiste una lotta per la sopravvivenza che limita la crescita esponenziale e quindi il numero rimane costante.

Le altre due sono:

1. Individui diversi fra loro;
2. La variazione è ereditabile

Altre due deduzioni: individui diversi hanno capacità riproduttive diverse, la selezione naturale va ad accumulare nuovi individui più adatti alla sopravvivenza.

Teorie di Darwin:

- Cambiamento continuo, mondo vivente non è costante ma in cambiamento;
- Discendenza comune;
- Moltiplicazione delle specie attraverso la trasformazione delle specie esistenti;
- Gradualismo, le differenze si accumulano lentamente
- Selezione naturale, le mutazioni possono essere positive, neutre o negative. Se sono positive la selezione agisce naturalmente e seleziona individui con quelle caratteristiche, se è negativa ci sarà una selezione di individui senza quelle caratteristiche. Quelle neutrali saranno tramandati e non selezionati in maniera specifica.

Le prime dimostrazioni furono le **omologie anatomiche**, strutture con stessa discendenza (antenato comune) ma funzioni diverse. Le **strutture vestigiali** invece derivano da un antenato comune ma non hanno una funzione (muscoli orecchie).

Per vedere se c'è un antenato comune si vanno a vedere le **omologie di sviluppo**, somigliante durante i primi stadi dello sviluppo (nell'uomo si formano branchie e poi vengono riassorbite). Si possono anche studiare **omologie molecolari**, ossia somiglianza nelle cellule a livello molecolare. Si stima che esistono circa 100 milioni di specie ma ne sono state identificate circa 1.4 milioni.

Classificazione organismi

lunedì 12 ottobre 2020 18:06

Esistono due tipi di classificazione:

Classificazione tassonomica

studia la teoria, pratica e regole di classificazione.

La TASSONOMIA si occupa di raggruppare le specie in base a un progenitore comune. Tutti gli organismi vengono classificati in 3 domini:

- **Batteri**, procarioti unicellulari, non hanno nucleo ma materiale genetico disperso;
- **Archebatteri**, procarioti unicellulari, non hanno nucleo ma materiale genetico disperso;
- **Eucarioti**, unicellulari e pluricellulari, 4 regni:
 - *Protisti*: unicellulari o pluricellulari piccoli
 - *Funghi*: unicellulari e pluricellulari
 - *Piante*
 - *Animali*

Dominio -> Regno -> Phylum -> Classe -> Ordine -> Famiglia -> Genere -> Specie

La classificazione tassonomica è basata su morfologia comparata. Utilizza una **nomenclatura binomia data da Genere specie**.

Classificazione sistematica

Ricerca relazioni evolutive tra organismi. Studio della diversità biologica e delle relazioni evolutive tra gli organismi, sia estinti che attuali.

I gruppi tassonomici sono basati sulle ipotesi della sistematica.

Concetti di specie

Per classificare una specie si possono vedere diverse caratteristiche:

1. **Filogenetico**: strutture genomiche diverse;
2. **Biologico**: sono capaci di riprodursi tra loro o meno;
3. **Evoluzionistico**: hanno antenato in comune ma hanno sviluppato diverse caratteristiche;
4. **Ecologico**: occupano una determinata nicchia dove quelli della stessa specie competono per la sopravvivenza.

Possono essere analizzati per caratterizzare nuovi individui di cui non si sa la specie, si vanno a sommare i vari risultati.

Dallo studio della biodiversità biologica e delle relazioni evolutive tra organismi, si costruiscono quindi **alberi evolutivi o filogenetici**, ci due tipi di fenomeni:

- **Anagenesi**: da una specie evolve una sola specie,
- **Cladogenesi**: una specie diverge in due o più specie

Quando vado a vedere l'antenato da cui si originano tutti gli altri prende il nome di **CLADE** o **GRUPPO MONOFILETICO** (insieme di specie che hanno origine da un antenato comune)

Riproduzione

mercoledì 14 ottobre 2020 13:52

Tramandare materiale genetico tra le generazioni:

- **Aessuale:** si generano molte copie identiche, poca spesa energetica, non c'è variabilità genetica;
- **Sessuale:** poche copie non identiche, molta spesa energetica ma porta a maggiori possibilità di variabilità utile per l'adattamento.

Riproduzione aessuata

Un solo genitore, no fusione gameti. Non esistono organi e cellule sessuali. Si generano quindi dei **cloni** del genitore. Questo tipo di riproduzione viene usata da specie che vivono in ambienti stabili, con poche pressioni selettive (temperatura, umidità....) che danno vita a diversità genetica. Gli adulti sono immediatamente in grado di riprodursi, non devono infatti raggiungere una maturità sessuale. I vantaggi di questo tipo di riproduzione sono:

- Ci si può riprodurre anche se isolati;
- Riproduzione rapida;
- Tutti possono generare prole;
- Tanti discendenti.

Le diverse forme sono:

1. **Scissione binaria:** batteri, protisti e plattelminti (unicellulari semplici), si riproducono per mitosi, i discendenti saranno cloni;
2. **Scissione multipla (schizogonia):** unicellulari, anellidi, protozoi. Il nucleo della cellula va incontro a mitosi multiple dentro la stessa cellula creando uno schizonte (cellula con tanti nuclei) e quando è maturo avviene la citodieresi creando molti figli chiamati merozoit, perfettamente identici alla cellula madre;
3. **Gemmazione:** divisione ineguale dell'organismo, un'escrescenza da un individuo adulto che diventa sempre più grande finché non si stacca e forma un nuovo individuo, organismi pluricellulari;
4. **Gemmazione:** spugne, all'interno dell'adulto si forma la gemmula, aggregato di varie cellule tenute insieme da una capsula glicoproteica e vi rimane fino a quando non ci sono periodi adatti per la nascita di nuovi individui (nelle belle stagioni);
5. **Frammentazione:** in organismi semplici pluricellulari (spugne, plattelminti, anellidi, echinodermi), un individuo multicellulare viene tagliato in vari frammenti dai quali si rigenerano gli organismi. Hanno cellule staminali al loro interno

Riproduzione sessuata

Incontro tra due gameti aploidi, prodotti generalmente da due individui diversi. L'ovocita viene fecondato dallo spermatozoo e si forma lo zigote diploide. Il genotipo della progenie sarà diverso da quello dei genitori, questo fa aumentare la **variabilità genetica**. C'è più adattamento ambientale attraverso la selezione naturale.

I tipi di riproduzione sono:

1. **Coniugazione:** unicellulari privi di gameti, due organismi si uniscono con un pilo (ponte) e si trasferiscono materiale genetico da uno all'altro, porta a ricombinazione genetica;
2. **Riproduzione sessuale biparentale:** due individui di sesso diverso (organismi dioici), i gameti maturi aploidi si fondono e formano lo zigote diploide, diverso dai genitori, può essere di due tipi a seconda dell'ambiente:
 - **Fecondazione esterna:** ambiente acquatico per proteggere dall'essiccamento, molte uova e spermatozoi rilasciati in acqua e si incontrano, a volte alcuni pesci riprendono le uova fecondate per proteggerle dai predatori;
 - **Fecondazione interna:** spermatozoi all'interno del tratto riproduttore femminile, protegge gameti dai pericoli ambientali. Poche cellule uovo, dipende anche dalla specie.
3. **Ermafroditismo:** all'interno dello stesso individuo c'è gamete femminile e maschili (animali monoici), è sincrono quando l'individuo è sia maschio che femmina e si autofecondano, non c'è molta variabilità genetica quindi molto frequente si accoppiano con altri individui (doppia capacità riproduttiva). Quello sequenziale si ha nei pesci, i due sessi non si trovano contemporaneamente, cambiano a seconda dell'ambiente o per necessità (pochi maschi e troppe femmine):
 - **Proteroginia**, prima femmina e poi maschio, più frequente;
 - **Proterandria**, prima maschio poi femmina.
4. **Partenogenesi:** sviluppo embrionale dal solo uovo senza fecondazione:
 - **Ameiotica:** ovocita non subisce meiosi e si genera un clone (plattelminti, rotiferi, crostacei, insetti);
 - **Meiotica:** ovocita è aploide, diventa diploide tramite duplicazione cromosomica (insetti) o attraverso la fusione cellulare (si fonde ovocita e globulo polare, in insetti stecco).

In alcuni casi la partenogenesi è legata alla determinazione del sesso: **aploidiploidia** (api operaie (fecondazione), fuchi (no fecondazione) e regine).

Nei rettili la determinazione del sesso dipende dalla temperatura:

- ❖ Tartarughe, temperatura alta nascono maschi e bassa femmine;
- ❖ Lucertole e alligatori opposti a tartarughe;
- ❖ Testuggini, gecko invece nasce femmina a temperatura normale, invece maschio a temperature estreme.

<p>I costi della riproduzione sessuata sono:</p> <ul style="list-style-type: none"> ❖ Produzione gameti; ❖ Ricerca e competizione per accoppiamento; ❖ Solo metà della popolazione genera progenie; ❖ Cura prole ❖ Intervalli prolungati tra atti riproduttivi 	<p>I benefici sono:</p> <ul style="list-style-type: none"> ❖ Aumento della capacità di rispondere agli stimoli ambientali e tramandarli alla progenie (aumento della fitness)
---	---

Esistono diversi sistemi per accoppiamento:

- **Poliginici:** maschi monopolizzano il possesso delle femmine, le difendono;
- **Poliandrici:** pochi casi, femmine sottoposte a selezione sessuale, femmine scelte dal maschio (solitamente è l'opposto)
- **Monogamici:** le femmine impediscono la riproduzione alle subordinate (in molti uccelli, pochi mammiferi)

Le cure parentali sono presenti in molti mammiferi. La suzione (dare il latte) è importante, il colostro sono le prime gocce di latte piene di immunoglobuline, fonte di immunità. Oltre a questo c'è l'insegnamento, comunicazione non verbale con mimica facciale, riconoscimento olfattivo e socialità.

Ci sono alcuni casi in cui gli organismi non devono nascere. Questo si chiama **meccanismo di isolamento riproduttivo**:

- ❖ **Pre-zigotici**: impediscono ai gameti di venire a contatto, meccanismi comportamentali, stagionali (la femmina va in calore in un determinato periodo e il maschio non è capace di fecondare), ecologico (ambienti diversi), anatomo-fisici o reazioni di fecondazione (spermatozoo non riesce d entrare nell'ovocita);
- ❖ **Post-zigotici**: impediscono agli zigoti di svilupparsi o agli ibridi che si creano di non essere in grado di riprodursi a loro volta.

Considerando in numero di figli sono state adottare due strategie:

- ❖ **Selezione R prodiga o opportunistica**: negli ambienti stabili, tanti figli piccoli, scelta partner, maturazione rapida e poche cure parentali;
- ❖ **Selezione K prudente o equilibrata**: in ambienti instabili, pochi figli grandi, tante cure parentali, scelta accurata del partner per geni migliori.

Gestazione

Sviluppo embrione. Può avvenire dentro o fuori corpo materno:

- **Vivipari**: embrione dentro corpo materno e quando è maturo viene rilasciato all'esterno;
- **Ovipari**: embrione si sviluppa dentro uovo depositato da madre, sviluppo fuori dal corpo, riduce investimento metabolico della femmina ma aumenta la predazione;
- **Ovovivipari**: uova ricoperte da un sottile guscio che si schiude all'interno del corpo materno ma la prole non riceve nutrimento diretto dalla madre.

La gravidanza inizia quando l'embrione si stabilisce nell'utero. La durata varia tra le specie, più lunga negli organismi più grandi. 3 tipi di gravidanza:

- **Monotremi**: depongono uova (ornitorinco);
- **Marsupiali**: alla nascita gli organismi non hanno completato lo sviluppo che viene completato nel marsupio (canguro);
- **Euteri**: portano alla nascita di organismi sviluppati, nutriti attraverso placenta.

I tempi di riproduzione sono variabili. Le specie tropicali si riproducono più volte l'anno. Nelle zone temperate invece hanno cicli riproduttivi stagionali.

Vertebrati

venerdì 23 ottobre 2020 09:07

Tutti gli animali vertebrati sono:

- Eucarioti
- Pluricellulari
- Eterotrofi
- Dotati di movimento in almeno uno stadio della loro vita
- Presenza di cavità digerente dove cibo viene digerito
- Irritabilità, capaci di riconoscere gli stimoli esterni e rispondere attraverso reazioni
- Riproduzione sessuata
- Simmetria corporea:
 - **Radiale**: struttura sferica o a cilindro, ci sono infiniti piani che la dividono in due parti. Molto semplici, poco movimento (flottanti), organi interni distribuiti in modo uniforme. l'asse si chiama asse **orboreale**
 - **Bilaterale**: presenza unico piano che attraverso organismo e lo divide in due parti speculari. Le due parti non sono simmetriche, organi non sono distribuiti in maniera simmetrica, dotati di grande capacità di movimento, moto complessi, più encefalizzazione.

Eucarioti -> deuterostomi -> cordati -> vertebrati

I cordati hanno il notocorda, asse scheletrico durante sviluppo embrionale, simmetria bilaterale, celomati hanno il celoma, ossia la cavità celomatica dove c'è l'apparato digerente. Scheletro interno. Devono avere un sistema nervoso munito di tubolo neurale parallelo al notocorda. Devono avere le fessure branchiali. Queste caratteristiche devono averle in almeno uno stadio del loro sviluppo.

- **Urocordati**: chiamati tunicati, costituiti da un sacco (tunica), gelatinoso che può essere più o meno dura e resistente. Attaccati al suolo nell'adulto, si muovono le larve appena nate. Il notocorda regredisce, le cellule del tubolo neurale sono sparse nella tunica. Fecondazione interna o esterna, deposizione di uova che producono larve, quando devono diventare adulti si attaccano con i dischi adesivi al suolo, diventano flottanti, una parte attaccata e una parte si muovo;
- **Cefalocordati**: animali marini, pesci più semplici. Sottili e quasi trasparenti, possono nuotare per tutta la vita. Vivono nelle profondità delle acque. Si nutrono per filtrazione. Riproduzione sessuata, fecondazione esterna.
- **Vertebrati**: tutti i vertebrati hanno:
 - Il notocorda è presente, si trasforma nella colonna vertebrale, asse portante
 - Tra parti: testa, tronco e coda. Il più specializzato è la testa per encefalizzazione. Organi di senso molto sviluppati
 - Fessure branchiali, permangono nelle creature acquatiche, in altri regrediscono e lasciano spazio ai polmoni
 - Il celoma costituisce la cavità addominale, contenente vari organi

Anfibi

Prima parte della vita legata all'acqua. Si sviluppano come girini e poi subiscono **metamorfosi** che fa cambiare caratteristiche morfologiche. Da girini diventa adulto, le fessure branchiali vengono riassorbite per diventare polmoni, poco funzionanti e performanti, infatti non si staccano completamente dalla vita marina. Gli compaiono le zampe palmate. Sviluppano un'altra via di **respirazione**, quella **cutanea**, cellule che sono in grado di assorbire ossigeno. La cute non può essere secca ma sempre umida.

La **riproduzione è esterna**, depongono le uova sono prive di guscio esterno e di materiale gelatino e vengono deposte in acqua.

La **circolazione sanguigna è doppia**, la piccola va da polmone e cute a cuore, la grande irroro tutto organismo. Sangue ossigenato e non vengono mescolati e il sistema viene definito incompleto.

Sono **ectodermi**, non controllano temperatura corporea. Nelle regioni fredde passano l'inverno in stato di **ibernazione**. L'animale diminuisce le attività metaboliche per avere meno necessità di energia.

I girini son **erbivori**, gli adulti invece **carnivori**.

Esistono due ordini, presenza o no coda:

- **Urodeli**: salamandra, hanno la coda, le zampe ma non possono fare salti molto ampi, zampe palmate;
- **Anuri**: rane e rospi, privi di coda e possono saltare, zampe palmate;

Rettili

Primi che hanno piena capacità di vivere sulla terraferma. La cute li protegge dalla disidratazione, hanno squame. I polmoni sono funzionanti. **Fecondazione interna**, depongono le uova sulla terra, hanno **guscio** che permette lo sviluppo dell'embrione:

- **Guscio calcareo**, permette scambio gassoso, impedisce disidratazione;
- **Albumi**, gelatinoso, riserva nutritiva;
- **Tuorlo o sacco vitellino**, fornisce sostanze alimentari;
- **Allantoide**, insieme al **corion**, fa da tramite per gli scambi gassosi con ambiente, accumulo sostanze rifiuto;
- **Amnios**, delimita camera piena di fluido in cui cresce embrione, protegge da urti.

Sacco vitellino, allantoide, corion e amnios sono presenti anche negli altri animali.

La **circolazione è doppia e incompleta**. Sono **ectodermi**, devono usare abitudini in base agli ambienti. Possono **ibernarsi**. **L'estivazione** è il processo simile all'ibernazione ma quando ci sono temperature molto elevate. Divisi in:

- **Cheloni**: testuggini e tartarughe, terra e acqua. Hanno il carapace che le ricopre collegato a vertebre, il piastrone è posto sotto collegato alla costole.
- **Loricati**: caimani, coccodrilli e alligatori. Hanno la corazza cornea o ossificata, molto resistenti. Hanno mascella grande, dai 30 a 40 denti tutti uguali. Svolgono cure parentali (come i mammiferi);
- **Squamati**: struttura esterna più morbida, squame cornee. Fanno la muta. Divisi in:
 - Sauri: lucertole hanno zampe. Cambiano colore (camaleonti). L'autonomia, possono tagliare parti del loro corpo in caso di pericolo
 - Ofidi: serpenti, non hanno zampe

Pesci

Vivono in acqua. Hanno le **branchie** che non regrediscono. Quando bevono l'acqua, mandata alle branchie dove ci sono strutture per assorbire ossigeno. Le branchie sono vascolarizzate e avviene l'ossigenazione del sangue. c'è sono un atrio e un ventricolo, circolazione unica, c'è una vena che corre parallela alla spina dorsale. I denti variano alla specie, alcuni si nutrono per filtrazione.

Hanno un senso in più, la **linea laterale** corre lungo il corpo, ha piccoli canali con sostanza gelatinosa per recepire dall'esterno la variazione dei campi elettrici. **Fecondazione esterna**. In alcuni casi può essere interna (vivipari).

Sono le specie di vertebrati più numerosi. Divisi in:

- **Ossei**: scheletro osseo o parzialmente osseo. Sono la maggior parte dei pesci, si trovano in tutte le acque del globo. Sono ricoperti da squame chiamate

ganoidi (proteina che li costituisce, ganoia simile alla dentina ma più lucida e trasparente), scaglie in maniera obliqua. Hanno la vescica natatoria, serbatoio di ossigeno per rimanere a una determinata profondità senza sforzarsi. L'opercolo è l'apertura delle branchie.

→ **Cartilaginei**: scheletro cartilagineo. Hanno depositi oleosi a livello del fegato che li aiuta a galleggiare. Sono razze e squali, non vivono in superficie ma sui fondali. Non hanno opercolo ma fessure branchiali chiamate elesmo. Hanno gli spirafori per far entrare acqua. Non ci sono scaglie ma hanno strutture simili a denti fatte di dentina. Fecondazione interna o esterna. Vista poco sviluppata. Hanno le ampolle di Lorenzini disposte lungo il muso, sono pori che si ritrovano in un ampolla con una sostanza gelatinosa che permette di ricevere segnali, gli permette di percepire variazioni di campi elettrici, magnetici e temperatura.

I mantoidi (razze e mante) non hanno le pinne, hanno coda lunga per virare, movimento ondulatorio, sono animali bentonici che vivono vicino ai fondali, fessure branchiali sulla parte superiore.

Uccelli

Tra i vertebrati terrestri hanno il numero maggiore di specie. Si sono evoluti dai rettili. Non tutti gli uccelli sanno volare. Tutti hanno:

- Palpebra accessoria per proteggere occhio
- Penne e piume, le piume controllano temperatura corporea, le penne hanno funzione nel volo
- Apparato visivo molto sviluppato
- Circolazione doppia e completa, non c'è mescolamento tra sangue refluo e ossigenato. Frequenza cardiaca molto elevata
- Depongono le uova, ovipari, fecondazione interna. Le uova vengono covate
- Non hanno denti ma becco (parte esterna), diverse forme del becco dipendono da specie a specie. Il dente di diamante è un piccolo dentino sul becco che serve al pulcino per rompere le uova dall'interno, poi viene perso
- Il ventriglio, permette tritatura del cibo
- Alcuni sanno volare, capacità legata a variazioni morfologiche: le penne servono al volo ne esistono tre:
 - Copritrici sono su tutto il corpo, sagoma aerodinamica
 - Remiganti, sulle ali, per svolgere manovre
 - Timoniere, della coda per controllare l'altezza
- Hanno ossa leggere per volare, sono cave e non hanno midollo, se ci sono fratture non possono guarire
- Le zampe non hanno muscoli ma solo tendini, prendono le cose con le zampe consumando meno energia
- Hanno sacchi aerei, sacchetti appoggiati ai polmoni. Raccolgono l'aria e aumentano la leggerezza. Deposito maggiore di ossigeno per uccelli che volano in ambienti rarefatti. Respirazione efficiente. Inspirano, arrivano ai sacchi posteriore e va ai polmoni per due volte. Poi c'è l'espiazione, dal sacco aereo anteriore alla trachea viene a chiudersi e l'area va dal polmone al sacco anteriore e portato all'esterno.

Mammiferi

In tutti gli ambienti terrestri, aerei e acquatici. **Endodermi** sanno controllare la loro temperatura. Vivipari a parte monotremi (ornitorinco). Cure parentali e allattamento (mammella). Presenza pelo, nei cetacei ci sono durante lo sviluppo fetale, per isolamento termico (sottopelo), mimetizzazione, attrarre i rappresentanti dell'altro sesso, protezione (porcospino), organi tattili (vibrisse).

Hanno **ghiandole**, sono annesse al bulbo pilifero:

- Mammarie, molto sviluppate nelle femmine per latte;
- Sudoripare: eliminazione acqua in eccesso;
- Sebacee:
- Odoripare: per marcare territorio, attrarre altro sesso.

I palchi e le corna. I palchi sono tipici dei cervi, sono estroflessioni ossee circondate da velluto e il loro sviluppo è sotto controllo di organi riproduttivi dopo la stagione riproduttiva si spaccano, vascolarizzate. Le corna (ruminanti) sono circondate da epidermide cheratinizzata, non cadono e non sono ramificate. Nel rinoceronte il corno è indipendente dal cranio, è un organo specializzato.

Sistema circolatorio doppio e completo. Respirazione polmonare aiutata da presenza **diaframma**. Il sistema nervoso è il più complesso. Fecondazione interna. I monotremi depongono uova su terra o le tengono dentro il corpo in una borsa chiamata borsa cutanea.

I marsupiali non depongono uova, i piccoli nascono troppo presto e completano lo sviluppo nel marsupio della madre.

I placentati portano alla nascita un organismo completo. Durata varia in base alla grandezza organismo

Invertebrati

venerdì 6 novembre 2020 08:37

Asimmetrici: organismi semplici con nessun piano che li divide in parti uguali

Simmetrici: esiste almeno un piano che li divide in parti uguali. Negli asimmetrici ci sono i poriferi, nei simmetrici si dividono in bilaterali e i radiati.

Gli Animali, a seconda se sono dotati o meno di una colonna vertebrale, si possono dividere in due grandi gruppi: i **VERTEBRATI** e gli **INVERTEBRATI**
Gli invertebrati costituiscono più del 97% del Regno Animale, mentre i Vertebrati non raggiungono il 3%.

Poriferi

Spugne, unici asimmetrici. Molto semplici, pluricellulari, non hanno una struttura complessa. Definiti bentonici perché attaccati al fondale. Sono filtranti. Corpo a forma di sacco la cui cavità centrale è aperta verso l'alto (**osculo**). Presenza sul corpo di pori inalanti (**osti**). I **coanociti** hanno estroflessioni chiamati flagelli. Il battito dei flagelli genera una corrente d'acqua che entra dai pori inalanti, gli osti, e fuoriesce dall'osculo. Le particelle di cibo, in sospensione nell'acqua, sono trattenute dai filamenti retrattili dei coanociti e digerite dalle cellule all'interno della spugna. Quello in eccesso fuoriesce dall'osculo.

Corpo sostenuto da una impalcatura scheletrica formata da spicole di carbonato di calcio o silice, oppure da fibre proteiche di spongina. Possono assumere varie forme, colori e dimensioni (da 1 mm a 1 m).

Possono riprodursi in modo **asessuato** (per gemmulazione) o in modo **sessuato** (ermafroditi oppure dioici, ci sono i gameti maschili e femminili).

Fecondazione interna o esterna. Trasformazione coanociti in spermatozoi (liberati in acqua e catturati) e/o uova. Formazione di larve dette anfiblastula che fuoriescono attraverso i canali acquiferi e vengono rilasciate in acqua. Anfiblastula polo di cellule grandi e non flagellate (macromeri) e un altro di cellule piccole e flagellate (micromeri e coanociti).

Celenterati

Meduse, coralli e anemoni. Sono simmetrici, radiati (piano orboreale li divide in parti simmetriche). Vivono in acqua salata e alcune in acqua dolce. Hanno la forma a polipo o a medusa. Hanno tutti una medesima struttura:

- corpo simile ad un sacco,
- una sola apertura, circondata da tentacoli, che funge da bocca ma serve anche per espellere il materiale non digerito, un polipo bocca rivolta verso l'alto (bentonico legato al suolo), medusa bocca rivolta verso il basso (natante, si muove).

La cavità interna, detta **celenteron**, è una vera cavità gastrovascolare. I **tentacoli** sono forniti di cellule urticanti che paralizzano la preda prima che sia inghiottita. Il loro corpo è formato da tre rivestimenti:

- **Endoderma** (pelle interna),
- **Mesoglea** (strato intermedio gelatinoso)
- **Ectoderma** (pelle esterna)

Possono riprodursi in modo **asessuato** (gemmazione, frammentazione) o **sessuato**.

I Celenterati presentano tipicamente alternanza di una generazione asessuata rappresentata dal polipo ed una sessuata rappresentata dalla medusa (metagenesi).

Le meduse, si riproducono sessualmente. L'individuo maschile disperde in acqua i suoi gameti che raggiungono l'ovulo nel celenteron di una medusa femmina. Lo zigote diploide viene disperso in acqua, dove dà origine a una larva ciliata liberamente natante detta **planula**. Dopo un breve periodo, la planula si fissa sul fondo e si sviluppa un polipo. Questo, a maturità, darà origine per via asessuata alle **efire**, giovani meduse destinate a diventare individui adulti capaci a loro volta di riprodursi sessualmente.

Platelminti

I PLATELMINTI (**vermi piatti**) hanno un corpo molle, sottile e appiattito. Sono i più semplici tra gli animali a simmetria bilaterale. Possono essere a vita libera oppure parassiti. Sono inoltre i primi animali cefalizzati, forniti cioè di un capo, e direzionali, ossia con direzione di avanzamento orientato.

Nei platelminti, compaiono tre distinti strati di cellule:

- **ectoderma**, il più esterno;
- **mesoderma**, intermedio;
- **endoderma**, il più interno.

Turbellaria	Trematoda	Monogenea	Cestoda
Animali a vita libera con il corpo ricoperto da un epitelio ciliato con funzione di movimento. I turbellari vivono solitamente nel mare, ma non mancano eccezioni nelle acque dolci e nei terreni umidi, sempre in presenza di acqua. La maggior parte delle specie sono predatrici di microrganismi, piccoli invertebrati, oppure spazzine o vegetariane. Si possono ripartire in ordini in base alla forma dell'intestino e al faringe	Sono parassiti e possiedono ventose o uncini con cui aderire all'ospite. Rispetto ai turbellari presentano delle modificazioni strutturali quali la perdita delle ciglia epiteliali e degli occhi e un maggiore sviluppo di cellule ghiandolari. Risiedono prima in uno o più ospiti intermedi, rappresentati da invertebrati, per poi stabilirsi in un vertebrato come ospite definitivo.	Sono ectoparassiti di vertebrati acquatici (pesci ed anfibi) che durante il loro ciclo vitale occupano un solo ospite. Fasciola hepatica presente nei vertebrati.	Sono parassiti in cui mancano il sistema digerente e gli organi di senso. In generale sono costituiti da tre parti: scolice , collo e strobilo . Lo scolice possiede delle strutture di ancoraggio, dei rostri e delle ventose, tramite cui si attacca all'epitelio intestinale dell'ospite. Un esempio è la tenia .

La **Tenia** (Verme Solitario) è segmentato e forma dei nastri talora lunghissimi, anche fino a 12 m, composti di moltissimi segmenti o **proglottidi**. Presenta una porzione anteriore detta testa o **scolice**, provvista di ventose con cui si attacca alla parete dell'intestino dell'ospite e un collo che prolifica formando sempre nuove proglottidi. Gli ultimi segmenti, giunti a maturità, sono pieni di **uova microscopiche** e vengono emessi con le feci. Se queste imbrattano l'erba, l'uovo può venire ingerito da altri animali, nel cui stomaco sguscia una piccolissima larva che s'insinua nella parete dell'intestino e, attraverso la circolazione del sangue, va a situarsi nei muscoli. Qui la larva si trasforma in **cisticerco**, che è come una piccola vescica che contiene lo scolice. Mangiando carni infette, il cisticerco s'installa nell'intestino e si trasforma in tenia adulta.

Apparati specializzati:

- ❖ **Tessuto Muscolare:** Nella parete del corpo, al di sotto della membrana basale, vi sono una serie di strati di fibre muscolari lisce disposte

- ◊ circolarmente, longitudinalmente e diagonalmente. Queste consentono movimenti ondulatori utili per torsione e nuoto.
- ◊ **Sistema nervoso:** Varia a seconda della specie. A eccezione dei turbellari più semplici, i neuroni si differenziano in sensori, motori e asso ciativi. In alcuni turbellari è più primitivo e costituito da un plesso nervoso subepidermico. Nelle altre specie troviamo gangli cefalic i dai quali si dipartono cordoni nervosi che innervano l' intero organismo e sono collegati ad organi di senso.
- ◊ **Organi di senso: cellule tattili e chemiorecettive** sulla superficie; **statocisti** per l'equilibrio; **reorecettori** per captare la direzione dell'acqua; **ocelli fotosensibili** che reagiscono alla luce e al buio, ma non sono capaci di formare un'immagine.
- ◊ **Sistema escretore**, costituito da **protonefridi**, ha la funzione di eliminare i prodotti di rifiuto e di regolare la quantità di liquidi presenti nel mesoderma (osmoregolazione).

I plateminti sono organismi **aprocti**, cioè il loro apparato digerente è formato da:

- **bocca** (unica apertura del canale alimentare)
- **faringe** (struttura che in alcune specie serve per catturare il cibo)
- **intestino** a fondo cieco semplice o ramificato (dove avvengono due tipi di digestione: extra e intracellulare)

Tramite la bocca o attraverso l'estroflessione del faringe, il cibo viene portato nell'intestino dove viene degradato grazie alla presenza di enzimi digestivi e di cellule specializzate. Ciò che non viene digerito, è espulso tramite il faringe. Esistono alcune differenze nella modalità di nutrimento a seconda della specie:

- ▶ **Turbellari:** secrezione di muco paralizzante e inglobamento del cibo tramite il faringe. Molti di essi si cibano di altri organismi, al cuni si nutrono di microalghe, altri sono ecto-commensali
- ▶ **Cestodi:** privi di apparato digerente, assorbono nutrimento attraverso il tegumento
- ▶ **Monogenei e Trematodi:** essendo specie parassite si nutrono di residui di cellule e di liquidi corporei dell'ospite grazie ai muscoli del faringe.

Riproduzione asessuata

- **Scissione trasversale o longitudinale:** Plateminti di acqua dolce e alcuni Trematodi
- **Rigenerazione:** ricostruzione delle parti mancanti dell'organismo. (Tipico delle Planarie, tra i più noti Turbellari).
- **Amplificazione:** durante i diversi stadi di sviluppo, una larva si divide e dà origine ad altre larve (frequente dei Trematodi e Cestodi).

Riproduzione sessuata

Organismi ERMAFRODITI (maggior parte dei Turbellari)

Fecondazione interna

- **Fecondazione incrociata:** i due organismi si fecondano a vicenda.
- **Autofecondazione:** quando i due apparati riproduttori sono in comunicazione. (frequente nei Cestodi).

Nematodi

Vermi cilindrici. I NEMATODI sono detti anche vermi cilindrici: hanno il corpo filiforme non segmentato, sprovvisto di organi di locomozione. Generalmente sono lunghi pochi centimetri, ma molti sono microscopici.

Sono i **primi animali a presentare un canale alimentare con due aperture:** una bocca e un ano terminale. Molte specie conducono vita libera nelle acque dolci, marine, nel terreno umido, dalle regioni polari sino a tropici, si nutrono di batteri, lieviti, ife e alghe, oppure possono essere saprozoi o coprozoi. Numerosissime specie sono parassite all'interno di animali o piante (Ascaridi, Ossiuri, Filarie, Trichinella).

Apparati specializzati:

- ◊ **Cuticola:** Robusta, Indeformabile, Barriera protettiva, Matrice extra-cellulare di natura proteica (presenza di collagene), Tri-stratificata
- ◊ **Ipoderma:** Strato di tessuto epiteliale sinciziale, formano dei sincizi (fusioni)
- ◊ **Tessuto muscolare:** longitudinale, Contrazioni alternate di fasci ventrali e dorsali → movimento ondulatorio
- ◊ **Cavità centrale o pseudoceloma:** Indivisa e ripiena di liquido (liquido pseudocelomatico), pressione idrostatica dà al corpo un certo turgore e gli permette di compiere i movimenti ondulatori → **scheletro idrostatico** o idroscheletro, fluido sostituisce nella funzione di trasporto i sistemi circolatorio e respiratorio.
- ◊ **Apparato digerente:** un unico tubo. Sono organismi eterotrofi.
- ◊ **Apparato riproduttore maschile e/o femminile**

Sono **dioici**, i casi di ermafroditismo sono piuttosto rari. La **fecondazione è interna** e lo sviluppo è diretto: i giovani nematodi, simili agli adulti, crescono senza andare incontro a metamorfosi. In alcune specie parassite si osserva un'abnorme dilatazione dell'utero: in taluni casi l'utero contenente i piccoli nematodi in via di sviluppo può diventare parecchie decine di volte più grande dell'intero corpo della femmina.

Le uova prodotte in un organismo vengono rilasciate attraverso le feci. Quando nascono sono individui adulti non ancora maturi. Può entrare nell'organismo con l'alimentazione o attraverso la pelle e con la circolazione raggiunge gli alveoli. Qui hanno la possibilità di arrivare alla trachea, nell'apparato digerente e poi nell'intestino dove raggiunge la maturità e ricomincia il ciclo.

Anellidi

Gli ANELLIDI sono anche detti "**vermi segmentati**", per il loro corpo cilindrico, vermiforme, diviso in segmenti (anelli o metameri). Essi hanno colonizzato la maggior parte degli ambienti, infatti vi sono specie terrestri, d'acqua dolce e specialmente marine, con forme parassite e mutualistiche. Le loro dimensioni possono variare dal millimetro fino ai tre metri.

- ◊ **Celoma:** cavità interna piena di liquido che contiene e protegge i principali organi.
- ◊ **Numerosi metameri**, tutti uguali tranne i primi due (che portano gli organi di senso e la bocca) e l'ultimo (che porta l'ano).
- ◊ **Tessuto muscolare:** robusti muscoli circolari e longitudinali adattati a nuotare, a strisciare e a scavare.
- ◊ **Sistema circolatorio** comprende sei cuori pulsanti e due lunghi vasi longitudinali (dorsali e ventrali), collegati per mezzo di una coppia di vasi trasversali per ogni metamerio.
- ◊ Non esistono organi dedicati alla **respirazione**, che è essenzialmente di tipo **cutanea**, cioè avviene attraverso l'epidermide grazie alla presenza della rete di capillari superficiali.
- ◊ **Apparato digerente:** un tubo diritto che attraversa tutto il corpo dell'animale.
- ◊ **Sistema escretore:** coppia di nefridi per ciascun metamerio. Il liquido presente nel celoma viene spinto nel nefridio, dove le sostanze necessarie vengono riassorbite e i prodotti di rifiuto vengono eliminati.
- ◊ **Apparato riproduttore**

Oligocheti

Gli oligocheti vivono soprattutto nelle acque dolci o nel terreno. Il rappresentante più noto è il **lombrico**. I lombrichi svolgono un ruolo fondamentale nell'ecologia del suolo, che viene

Policheti

La maggior parte dei policheti vive in ambiente marino. In questo ambiente troviamo specie scavatrici, sedentarie, striscianti sui fondali o natanti. Maggior parte **dioici** con la **fecondazione** quasi

Irudinei

Gli Irudinei o **sanguisughe** sono parassiti o predatori. Le due estremità del corpo sono trasformate in ventose e la bocca si apre nella ventosa anteriore.

<p>smosso, ossigenato e reso fertile dalla loro azione. Maggior parte ermafroditi con organi riproduttori localizzati in alcuni segmenti del corpo. La fecondazione è esterna (deposizione delle uova) e reciprocamente fra due differenti individui; gli organi maschili e femminili giungono a maturazione in diversi periodi (dicogamia), ciascun animale funzionando e da maschio e da femmina, ma non contemporaneamente. La riproduzione per scissione e gemmazione può essere il modo normale di riproduzione anche per lunghi periodi.</p>	<p>sempre esterna. Alla fine del processo di segmentazione dell'uovo si ha uno stadio larvale. Pochi ermafroditi Fenomeni di semplice scissione, con neoformazione di nuove parti, hanno luogo nei Policheti allorché, in una certa zona del corpo, generalmente in prossimità dei segmenti posteriori, In alcuni si ha una riproduzione asessuata per gemmazione (Dall'individuo gemmante si distaccano individui sessuati, maschi e femmine). Veramente eccezionale è la gemmazione multipla, a differenti livelli del corpo</p>	<p>Le sanguisughe sono diffuse soprattutto nelle acque dolci. Le specie che si nutrono di sangue si attaccano ad ospiti, sia vertebrati che invertebrati, ed incidono la pelle con le mascelle, succhiando il sangue per mezzo di una proboscide. Maggior parte ermafroditi. Non presentano riproduzione asessuata o capacità rigenerative.</p>
--	---	--

Molluschi

Al phylum dei MOLLUSCHI appartengono animali invertebrati caratterizzati da un corpo molle non segmentato e, spesso, da una conchiglia calcarea con funzioni protettive.

Sono presenti in tutti gli habitat, sebbene raggiungano il massimo della diversità biologica nell'ambiente marino.

Tutti i molluschi mostrano la stessa organizzazione fondamentale del corpo in cui si possono distinguere tre parti:

- ❖ Il **capo-piede**, che contiene organi di senso e motori (movimento);
- ❖ La **massa viscerale** che contiene gli organi per la digestione, escrezione e riproduzione;
- ❖ Il **mantello**, un tessuto specializzato che avvolge e racchiude la massa viscerale e produce la conchiglia. Nei calamari la conchiglia è interna

Nella cavità del mantello, sono situate le **branchie** (organi per la respirazione) e vengono scaricati i prodotti dell'apparato escretore, di quello riproduttivo e i rifiuti della digestione. Il **tubo digerente** è semplice e nella bocca sono presenti delle mascelle chitinee. I molluschi possiedono un **apparato circolatorio** costituito da un organo che pompa il sangue (cuore) e da vasi che lo trasportano.

Gasteropodi	Bivalvi	Cefalopodi
<p>Comprendono animali con una sola conchiglia (la chiocciola) e le lumache (prive di conchiglia). Sono organismi prevalentemente acquatici (pochi terrestri). Anteriormente sono presenti "antenne" che sono sensibili agli odori e al tatto, alcune sono dotate di occhi. Caratterizzati da una scarsa capacità di movimento, sono spesso ermafroditi.</p>	<p>Comprendono organismi come le vongole, le ostriche. Presentano una conchiglia, che racchiude il corpo, è divisa in due valve unite posteriormente da una cerniera. Uno o due muscoli adduttori sono utilizzati per aprire e chiudere le due valve. Il corpo del mollusco risulta appiattito tra le due valve. Molti bivalvi sono sessili ed erbivori, vivono filtrando l'acqua dolce o salata in cui vivono, trattenendo sulle branchie le particelle di cibo. Fecondazione esterna.</p>	<p>Comprendono molluschi come il polpo, la seppia e il calamaro. Essi possono essere privi di conchiglia come il polpo o averla interna come la seppia. <u>Esiste un'unica specie di cefalopodi che presenta una conchiglia esterna: il Nautilus</u>. Il piede è trasformato in tentacoli. Il movimento è assicurato da una formazione muscolare fatta ad imbuto (sifone), da cui viene espulsa l'acqua in modo violento permettendo il movimento "a reazione". Questi molluschi sono organismi prevalentemente marini ed attivi predatori. La testa possiede occhi prominenti e la bocca è circondata da tentacoli. Sono dotati di una buona capacità di movimento e possiedono delle sacche dalle quali possono espellere un liquido nero in modo di confondere il nemico. Sono capaci anche di mimetizzarsi con il fondale. Fecondazione interna.</p>

La maggior parte dei Molluschi è **dioica**. Le uova fecondate subiscono una segmentazione e danno origine, nelle specie marine, ad una **larva natante** capace di nutrirsi di **microplankton**.

Alla metamorfosi viene prodotta una minuta conchiglia. La produzione di uova da parte dei molluschi marini è molto elevata poichè una parte di esse non vengono fecondate, altre vengono predate insieme con le larve, e altre larve si disperdono in luoghi inospitali. I Cefalopodi tuttavia producono poche uova a sviluppo diretto ricche in materiali nutritivi e la madre spesso prende cura delle uova e degli embrioni. I Molluschi delle acque interne e quelli terrestri sono ermafroditi insufficienti con fecondazione interna, gli stadi larvali sono soppressi e lo sviluppo è diretto. Alcuni molluschi di acqua dolce sono vivipari.

Artropodi

Aracnidi, crostacei, insetti e miriapodi. Il phylum degli artropodi è il più vasto del regno animale: ne sono state descritte oltre 1 milione di specie e ciò dimostra come la loro struttura di base sia versatile e adattabile a diversi modi di vita. Gli Artropodi sono infatti diffusi in quasi tutti gli habitat.

Gli ARTROPODI sono animali invertebrati caratterizzati da uno **scheletro esterno** costituito da **chitina (esoscheletro)** e da **appendici articolate** (nelle forme più primitive sono presenti in tutti i segmenti). Nelle forme più complesse, le zampe tendono a rimanere solo nei segmenti toracici. Le appendici delle altre zone del corpo spariscono o si trasformano per assolvere ad altre funzioni (antenne, mandibole, chele).

L'**esoscheletro** conferisce resistenza e impermeabilità all'intera struttura. Dal momento però che la robustezza e l'elasticità dell'esoscheletro diminuiscono con l'aumentare della massa corporea, gli artropodi non raggiungono mai grandi dimensioni. L'esoscheletro è una struttura rigida che non si può dilatare, impedisce la crescita. Per questo gli artropodi vanno incontro a numerose **mute**, in occasione delle quali perdono la vecchia cuticola per svilupparne un'altra, via via più grande. Subito dopo la muta, quando la nuova cuticola non è ancora ben sclerificata, l'animale è particolarmente vulnerabile.

Il corpo è suddiviso in tanti segmenti o metameri, che nelle forme più primitive tendono ad essere uguali (come già visto negli Anellidi), mentre nelle forme più evolute si sono differenziati a formare regioni corporee ben definite: il **capo**, il **torace** (o cefalotorace) e l'**addome**.

MIRIAPODI

Animali dal corpo metamero formato di un capo che porta due antenne e di solito ocelli ed un lungo tronco composto da una serie di segmenti uguali, che portano le zampe:

- Diplopodi - (Millepiedi): ogni segmento del tronco ha due paia di zampe, quindi 4 zampe per ogni segmento
- Chilopodi - (Centopiedi): ogni segmento del tronco porta un solo paio di zampe

CROSTACEI

Comprendono quasi esclusivamente animali acquatici marini, sebbene siano ampiamente rappresentati anche nelle acque dolci e sia nota qualche specie terrestre (porcellino di terra). Sono di dimensioni molto variabili, da microscopiche a qualche decina di centimetri. Caratteristica comune ai crostacei è la presenza di due coppie di **appendici sensoriali** (antennule e antenne) sul capo. Hanno un elevato numero di zampe (almeno 5 paia) e spesso presentano il primo paio di appendici trasformate in robuste "**chele**", utilizzate per la difesa e per l'offesa. Nella maggior parte dei crostacei, il torace e il capo sono fusi

assieme a costituire un **cefalotorace**. Esso è ricoperto da un **piastrone**, detto **carapace**, reso più rigido dalla deposizione di carbonato di calcio.

ARACNIDI

Sembrano essere stati fra i primi animali a colonizzare la terraferma.

Il corpo degli aracnidi è diviso in due parti :

- ▶ Il **cefalotorace**, che non ha antenne e porta gli organi di senso e sei paia di appendici. Il primo paio di appendici sono i **cheliceri**, che possono terminare con chele o con una punta velenosa; il secondo paio è rappresentato dai **pedipalpi**, che possono avere la funzione di presa del cibo o di organi di senso; le altre quattro paia sono le **zampe**.
- ▶ L'**addome**, privo di appendici, porta gli orifici genitali.

Molti aracnidi sono **predatori** di piccoli insetti, ma certe specie, come ad esempio le tarantole catturano facilmente topi o piccole lucertole.

Normalmente la **digestione del cibo avviene all'esterno del corpo**, prima dell'ingestione, mediante fluidi digestivi secreti dall'organismo direttamente sugli alimenti.

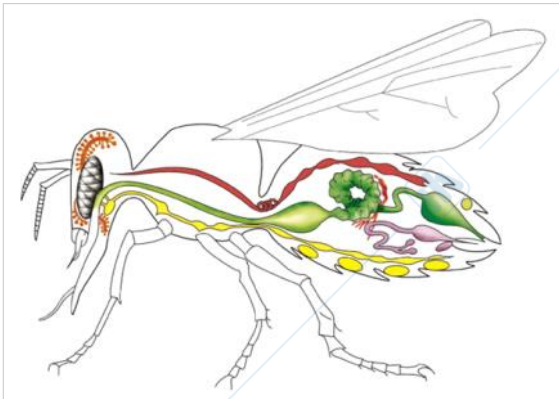
INSETTI

Sono i più complessi e perfezionati animali invertebrati. Questa classe rappresenta il più grande tra i raggruppamenti di animali che popolano la Terra, annoverando oltre un milione di specie, pari ai cinque sesti dell'intero regno animale. Gli insetti sono distribuiti in tutto il mondo, dalle regioni polari ai tropici, e popolano ambienti disparati, terrestri e acquatici. Le loro dimensioni corporee variano molto: da insetti più piccoli di un millimetro si arriva a farfalle con apertura alare di 30 cm.

Gli insetti hanno il corpo suddiviso in 3 parti: **capo, torace e addome**. Presentano 3 paia di zampe attaccate al torace e **ali** (in numero massimo di 2 paia, possono mancare completamente in alcuni insetti, oppure possono cadere spontaneamente in un determinato momento della vita dell'insetto).

Sul capo sono presenti:

- **Antenne**: sono organi essenziali, usati per percepire gli stimoli esterni e relazionarsi con l'ambiente circostante (tatto, variazioni di pressione, suono, umidità dell'aria, e temperatura);
- **Apparato boccale**: composto da labbro superiore, mandibole, mascelle e labbro inferiore. (apparato boccale masticatore, lambente succhiatore ☐ api; lepidotteri hanno una **spiritromba**, vera e propria «cannuccia»);
- **Occhi composti**: organi della vista, posti sui lati del capo. La superficie è suddivisa in **facette esagonali**, ognuna delle quali corrisponde a un'unità visiva che percepisce solo una piccola parte del campo visivo. Sommando come in un mosaico le immagini parziali di ogni ommatidio, l'occhio composto raccoglie l'immagine completa;
- **Ocelli**: occhi primitivi, più semplici, presenti in numero di 3, meno frequentemente 2, oppure assenti del tutto.



Gli insetti hanno un **apparato escretore**, costituito da numerosi tubi che raccolgono le sostanze di rifiuto dalla cavità addominale e le espellono all'esterno. L'**apparato circolatorio** è in parte vascolare e in parte lacunare, comprende, il cuore a forma di tubo pulsante e l'aorta dove circola l'emolinfa. L'**apparato respiratorio** è formato da trachee ramificate in comunicazione con l'esterno per mezzo di aperture dette stigmi. Il **sistema nervoso** è molto complesso e diviso anch'esso in tre parti: sistema nervoso centrale, viscerale, e periferico. L'**apparato digerente** è suddiviso in tre parti: intestino anteriore, medio e posteriore, la digestione vera e propria avviene nell'intestino medio.

La classe degli insetti può essere suddivisa in due sottoclassi: gli **apterigoti** (insetti senza ali) e gli **pterigoti** (insetti con ali allo stadio adulto).

La **riproduzione** avviene in genere per via **sessuale**, attraverso la deposizione di uova fecondate. Sono presenti anche forme di riproduzione non sessuale, come la **partenogenesi**. Gli insetti sono nella quasi totalità ovipari.

Molte specie hanno uno sviluppo indiretto, cioè attraversano una o più fasi larvali prima di diventare adulti (**metamorfosi**).

Nel caso di metamorfosi completa, l'**uovo** dell'insetto si schiude per produrre una **larva**, completamente diversi dagli adulti anche per quanto riguarda l'alimentazione. Questa si nutre e accresce le proprie dimensioni compiendo un numero di **mute** in genere compreso tra tre e nove. Alla fine del periodo larvale l'insetto fila un **bozzolo** intorno al proprio corpo, oppure si costruisce una **cella sotterranea** e si trasforma in **pupa** o **crisalide**. In questa fase l'insetto è quiescente e non si nutre, mentre il suo corpo, attraverso un'intensissima attività metabolica, assume gradualmente la forma dell'insetto maturo. Quando la pupa è completamente sviluppata, esce dal bozzolo o dalla cella sotterranea ed emerge sotto forma di **insetto completo**.

Echinodermi

Gli ECHINODERMI sono invertebrati marini. Di questo gruppo fanno parte tra gli altri le **stelle marine** e i **ricci di mare**. Il nome "echinodermi" deriva dall'**aspetto spinoso** della superficie corporea esterna. Caratteristica degli Echinodermi è la presenza di uno scheletro sotto la pelle (**dermascheletro**), costituito da numerose piastre calcaree.

Gli echinodermi hanno, all'interno del corpo, un sistema di **canali acquiferi**:

- Respirare
- Catturare la preda
- Locomozione.

L'acqua, passa attraverso un complicato sistema di canali connesso con piccoli **pedicelli ambulacrali**. Ogni animale possiede centinaia di pedicelli ambulacrali, che escono attraverso minuscoli fori del dermascheletro e terminano con una **ventosa**. Regolando il flusso del liquido nei canali l'animale può allungare o ritirare i pedicelli, permettendo l'adesione al substrato e il movimento su di esso. A parte qualche rara eccezione, gli echinodermi sono **dioici** e non presentano nessun tipo di dimorfismo sessuale. La riproduzione degli echinodermi avviene sempre per **fecondazione esterna**. La riproduzione avviene attraverso la deposizione di uova da parte della femmina, che poi vengono fecondate nell'acqua dal maschio.

Esercitazioni

lunedì 2 novembre 2020

16:22



www.unidocs.it - Appunti e dispense per superare i tuoi esami universitari

www.unidocs.it - Appunti e dispense per superare i tuoi esami universitari

Biologia RNA e sistematica

mercoledì 21 ottobre 2020 13:39

DNA contiene info per sintesi RNA e proteine. Acido nucleico costituito da due filamenti polimerici collegati. I monomeri sono nucleotidi (deossinucleotidi), 3 unità:

- Una base azotata
- Zucchero pentoso, DNA desossiribosio
- Gruppo fosfato

Le basi si legano allo zucchero con un legame N-glicosidico. Le basi sono **adenina (A)**, **timina (T)**, **citocina (C)** e **guanina (G)**:

- **Purine**, 2 anelli azotati, A e G;
- **Pirimidine**, un anello, T e C.

Disposizione nucleotidi costituisce l'info genetica. Il DNA definito come doppia catena polinucleotidica, antiparallela e des torsa. Due filamenti uniti a formare doppia elica grazie a legami a idrogeno tra basi, A-T due legami, C-G tre legami. Associato con proteine chiamate **istoni** per formare **chromosomi**. Questo per evitare azioni di endonucleasi nel nucleo per preservare materiale genetiche. Ogni cromosoma ha una serie di geni, ogni speci e ha un numero fisso di cromosomi distinguibili per forma e grandezza (**cariotipo** = disposizione spaziale ordinata cromosomi per forma e grandezza).

Tutto il materiale genetico costituisce il **genoma** le cui informazioni permettono di costruire l'intero organismo. Passa da genitori a figli e tra cellule durante la divisione.

I **geni strutturali** codificano per proteine, ogni cellula produce determinate proteine che determinano la struttura, le caratteristiche e le funzione delle cellule. Un'unità di trascrizione che codifica per una singola proteina o per un singolo RNA ribosomiale o transfer è detta **cistron**. Il genoma produce il **proteoma**, il pattern proteico della cellula. La **regolazione genica** e l'**espressione** sono importanti per creare tipi cellulari differenti.

l'espressione genica è divisa in trascrizione e traduzione:

- **Trascrizione:** produce una copia di RNA o trascritto di un gene. I geni strutturali generano un RNA messaggero (mRNA) che specifica la sequenza aminoacidica di un polipeptide/proteina;
- **Traduzione:** sintesi polipeptide/proteine con uno specifico ribosoma

Trascrizione

La trascrizione ha lo scopo di copiare o «trascrivere» il messaggio contenuto nel DNA in una molecola complementare di **RNA**. L'RNA è una biomolecola simile al DNA ma ha alcune differenze:

- Lo zucchero è il ribosio;
- Al posto della timina è presente l'**uracile**;
- È composto da un filamento singolo.

Esistono tre diversi tipi di RNA, ognuno con funzioni specifiche:

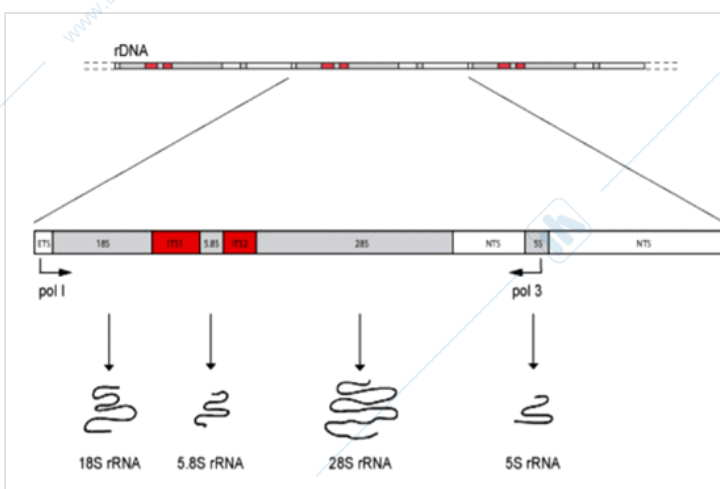
- **mRNA** (messaggero), contiene l'informazione per la sintesi delle proteine;
- **tRNA** (di trasporto), traduce mRNA in aminoacidi;
- **rRNA** (ribosomiale), parte dei ribosomi.

La trascrizione è catalizzata dall'enzima **RNA polimerasi**. L'RNA polimerasi e il DNA scorrono uno sull'altra permettendo così la sintesi dell'mRNA a partire dal filamento stampo di DNA. Ci sono vari enzimi che intervengono:

- RNA elicasi che apre la doppia catena di DNA
- DNA ligasi che lega i filamenti di DNA una volta finito il processo

RNA polimerasi indica enzimi complessi per sintesi RNA complementare a filamento stampo di DNA. Ne esistono 3 tipi:

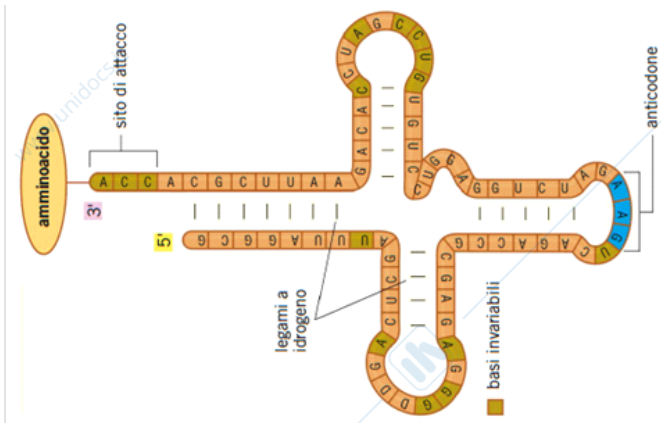
- RNA pol I per trascrizione di buona parte rRNA (28S, 18S)
- RNA pol II per trascrizione mRNA
- RNA pol III per tRNA e per unità 5S di rRNA



rRNA è quello più presente nella cellula, componente dei ribosomi per sintesi proteine. I ribosomi hanno 2 subunità, una di 60S e una di 40S. Tre rRNA sono trascritti a partire da un solo gene nella forma di un unico lungo precursore (45S), mentre il quarto (5S) è trascritto a partire da un altro gene

ITS1 interspace sequence.

L'rRNA fornisce un meccanismo per la decodifica dell'mRNA in sequenze di aminoacidi garantendo l'interazione dell'mRNA con il tRNA



Il tRNA ha forma a trifoglio, da una parte anticodone che lega codone nell'mRNA, da altra parte ha amminoacido che si aggiunge alla catena in crescita nel ribosoma. Ci sono legami a idrogeno che mantiene la forma del tRNA.

mRNA codifica per proteine, porta informazioni dal nucleo al citoplasma per sintesi proteica. Viene trascritto sotto forma di precursore (**pre-mRNA**) per poi subire modificazioni (maturazione):

- Lo **splicing**, **esoni** sono codificanti, **introni** non codificanti che vengono rimossi in questa fase, ad opera dello spliceosoma;
- Il **capping**, cappuccio in posizione 5'
- La **poliadenilazione**, in 3', montaggio di varie adenine. Più è lunga e più il trascritto ha vita lunga nella cellula

Moltissimi anticorpi possono essere trascritti da un unico trascritto grazie allo splicing alternativo.

Traduzione

Passaggio dai nucleotidi agli amminoacidi. mRNA viene letto in gruppi di tre basi nucleotidiche o **codoni** o triplette. Ogni codone corrisponde ad un amminoacido, il codice genetico è formato da 64 triplette. Il codice genetico è comune a tutti i viventi. Un codone codifica per un solo amminoacido. In tutte le specie ogni codone corrisponde allo stesso amminoacido. I codoni sono molti di più rispetto agli amminoacidi (20), si dice pertanto che il codice è **ridondante** o degenерato, triplette diverse codificano per lo stesso amminoacido. Codoni di inizio e di stop che danno un segnale per indicare inizio e fine trascritto. La struttura primaria di ogni tipo di proteina è formata da una specifica disposizione lineare dei 20 differenti amminoacidi.

Inizio AUG metionina.

Avviene nei ribosomi. I ribosomi sono costituiti da proteine e RNA ribosomiale (rRNA). Ogni ribosoma è formato da due subunità (maggiore e minore). Quella maggiore ha tre siti di legame chiamati A(amminoacido), P (peptidico) ed E (exit). Coinvolge anche l'RNA di trasporto (tRNA) che traduce i codoni dell'mRNA negli amminoacidi che costituiscono la proteina. Dopo che due amminoacidi si sono uniti scorrono tutti per liberare spazio. 3 fasi:

1. **Inizio**: subunità minore si lega a mRNA, tRNA con metionina si lega al codone di inizio AUG occupando il sito P. La subunità maggior e si unisce a quella minore e completa il ribosoma;
2. **Allungamento**: aggiunta secondo tRNA. Metionina si lega al secondo amminoacido per essere espulso dal sito E;
3. **Terminazione**: codone di stop si lega al sito A, non corrisponde nessun amminoacido e la traduzione termina.

Tassonomia e sistematica molecolare

La sistematica studia la natura e la diversità degli organismi e tutti i rapporti tra di loro. Sfrutta similitudine fenotipiche o anche la biologia molecolare. La sistematica molecolare serve a comprendere un organismo nel suo processo evolutivo, si associano prossimità, similarità o entrambe. l'analisi molecolare permettere di rilevare somiglianze genetiche.

Evoluzione molecolare: modificazioni molecolari nel materiale genetico che sono alla base dei cambiamenti fenotipici associati all'evoluzione.

I geni omologhi si dividono in:

- ❖ **Geni Ortologhi**: geni omologhi di specie diverse che si sono evoluti da un gene ancestrale comune mediante speciazione; in genere gli ortologhi conservano la medesima funzione nell'evoluzione, codificano probabilmente per proteina con stessa funzione. Due geni trovati in specie diverse sono ortologhi quando le proteine che codificano mostrano 60/70% di identità; quasi certamente queste proteine hanno la stessa struttura tridimensionale, gli stessi domini funzionali e la stessa funzione biologica;
- ❖ **Geni Paraloghi**: geni omologhi originatisi per duplicazione nel genoma di una stessa specie, in genere tendono ad evolversi acquisendo funzioni diverse da quelle del gene originario anche se ad esse correlate.

Per evoluzione biologica si intende il processo evolutivo applicato a DNA, RNA e proteine. Il rimescolamento degli esoni tra geni diversi, porta a mutazioni con acquisizione o perdita di funzioni da parte di proteine specifiche. Se proteina vantaggiosa si diffonde.

L'accumulo di mutazione può portare a speciazione. Possiamo costruire un albero filogenetico. La filogenesi molecolare viene usata per tracciare questi alberi, danno info su distanze e tempi evolutivi specie. La radice rappresenta l'antenato comune.

Si possono individuare somiglianze genetiche, sequenze genetiche simili indicano 'parentela' tra specie. Più similitudini hanno le sequenze tanto più due specie possono essere definite filogeneticamente simili (antenato comune). La classificazione biologica rappresenta una codifica dei risultati degli studi sistematici. La sistematica molecolare permette di costruire alberi filogenetici molecolari. Sequenze genetiche simili indicano specie con un progenitore ancestrale comune. Alcune zone del genoma sono particolarmente variabili. Osservando queste regioni è possibile capire la filogenesi dell'organismo in questione.

I metodi sfruttati dalla sistematica molecolare per ricostruire il percorso evolutivo di una specie sono:

- **Tipizzazione ribosomiale (Ribotyping)**: identificare e caratterizzare con info su rRNA. l'rRNA viene amplificato con PCR. L'rRNA viene 'tagliato' grazie ad enzimi di restrizione (tagliano sequenze specifiche), il pool ottenuto viene amplificato grazie a primers universali (sequenze di DNA complementari a varie zone del genoma). I frammenti ottenuti vengono amplificati e fatti 'correre' attraverso gel elettroforesi (frammenti di diverse dimensioni sottoposti a campo elettrico si muovono con velocità direttamente proporzionale alla dimensione). Le bande ottenute sono specifiche per ogni specie e vengono chiamate impronte o fingerprint;
- **Sequenziamento rRNA**: più le sequenze sono simili e più gli organismi sono filogeneticamente vicini. Sequenziamento next generation o Sequenziamento sanger (elettroforesi in un capillare che riesce a discernere le diverse basi azotate). Il sequenziamento si rivolge alle sequenze in tutto alle sequenze genetiche in un campione;
- **Sequenziamento regioni ITS**: più le sequenze sono simili e più gli organismi sono filogeneticamente vicini, regioni ITS molto specie specifiche. Ci sono delle sequenze molto conservate nell'evoluzione, come sito attacco RNA polimerasi 1 o 3. I trascritti vengono purificati, quantificati e riuniti in ordine di

sequenza. Queste sequenze vengono allineate tra loro e valutate le differenze. Si possono classificare in modo tassonomico le sequenze e ricostruire il percorso evolutivo della specie;

- **Ibridazione fluorescente in situ (FISH)**: rileva e localizza sequenze specifiche nei cromosomi. Consiste nell'ibridazione (appaiamento) di sonde specifiche (sequenze complementari di DNA) per ITS1 e 2 o per rRNA 18S. In questo modo è possibile valutare la posizione nel genoma dell'rRNA. Questo ci permette di capire se e quanto due specie sono filogeneticamente simili. Il genoma può essere marcato con fluorocromo. Scelta della sonda, marcata con composti fluorescenti, campione in esame preparato, allestito cariotipo, DNA denaturato in modo che la sonda può inserirsi nel DNA, il preparato osservato con microscopio a fluorescenza.

I componenti tipici di un microscopio a fluorescenza sono:

- Sorgente luminosa (lampada a vapori di mercurio);
- Filtro di eccitazione, seleziona particolare lunghezza d'onda (350 nm - 700 nm);
- Specchio dicroico, sposta fascio luminoso verso il campione;
- Filtro di emissione, porta luce emessa del fluorocromo verso l'oculare, luce con lunghezza d'onda maggiore dell'onda che ha colpito il campione.

I fluorocromi o fluorofori sono molecole fluorescenti. Risultano fluorescenti dopo essere state eccitate ad una data lunghezza d'onda (lunghezza d'onda di assorbimento). Tornano allo stato di equilibrio ed emettono energia sotto forma di luce con frequenza specifica quanto più è precisa la frequenza di incidenza, ma comunque maggiore di quella assorbita (shift-stokes). Esistono in commercio diversi tipi di fluorocromi, caratterizzati in base allo spettro di assorbimento e di emissione. I fluorocromi sono in grado di emettere fluorescenza anche a concentrazioni molto basse. Uno dei limiti è che non permette di eccitare in modo distinto due fluorocromi contemporaneamente.

Tecniche molecolari per classificazione tassonomica

mercoledì 28 ottobre 2020 14:24

1. Gli acidi nucleici vanno liberati dal legame con le proteine e dai lipidi nella membrana citoplasmatica e nucleare
2. Estrazione degli acidi nucleici dal miscuglio di composti che ne risulta
3. Separazione degli acidi nucleici da eventuali contaminanti nelle soluzioni usate per l'estrazione
4. Conservazione degli acidi nucleici in condizioni chimico-fisiche idonee e compatibili con le analisi e le eventuali utilizzazioni successive

Preparazione campione

l'estrazione di acidi nucleici può essere fatta a partire da:

- Diversi tessuti biologici
- Sezioni incluse in paraffina
- Colture cellulari derivate dai diversi tessuti biologici
- Liquidi biologici (plasma/siero)

Il DNA è una molecola molto stabile e non necessita di particolari accorgimenti. Invece l'RNA deve essere preservato fino all'arrivo in laboratorio (RNA later, pulizia superficie con candeggina 4% o RNasi Zap che degradano ribonucleasi).

Se il campione da estrarre è presente in laboratorio (colture cellulari), si può procedere con lo snap freezing (congelamento rapido fino a -196°C) le cellule vanno centrifugate per creare un pellet, depositato di cellule e poi immerso in azoto liquido e poi conservato in freezer o portato in laboratorio.

Estrazione acidi nucleici

1. Lisi delle membrane: vari metodi:
 - a. Mortaio e pestello, previo congelamento con azoto liquido, usata per cellule vegetali e per tessuti animali
 - b. Diversi cicli congelamento e scongelamento per ingrossamento cellule e rottura, non per estrazione di RNA perché sensibile
 - c. Sonicazione, onde sonore ad alta frequenza
 - d. Lisi meccanica con lama rotante, riscalda campione e quindi deve essere messo nel ghiaccio
 - e. Omogenizzazione, uso omogenizzatori che sfruttano utilizzo biglie che grazie al movimento portano a rottura membrane
2. Rimozione delle proteine fatto con proteinasi K, rompe le strutture proteiche per non portarle dietro nel processo di estrazione. Si attiva a temperature elevate
3. Precipitazione dell'acido nucleico
4. Solubilizzazione

Estrazione RNA/DNA con metodo fenolo/cloroformio

1. **Lisi delle membrane:** uso di trizol (tiocianato di guanidina, può avere pH neutro o alcalino o acido), per il tessuto va associata a questo anche la lisi meccanica (sonicatore). L'energia prodotta produce bolle di vapore che implodono e causano onde d'urto. O con uso di omogenizzatore che sfrutta l'agitazione meccanica di biglie per lisi tessuto. In entrambi i casi non ci deve essere riscaldamento soluzione
2. **Rimozione delle proteine:** processo fisico. Ci saranno tre fasi: acquosa con entrambi acidi nucleici con entrambi i tipi di pH (neutro o alcalino) o solo RNA se trizol ha pH acido, interfase con proteine denaturate con entrambi i pH, fase fenolica con lipidi di membrana e proteine solubili e con pH acido anche DNA
3. **Precipitazione:** isopropanolo, overnight per aumentare concentrazioni acido nucleico precipitato
4. **Solubilizzazione:** in acqua DEPC (dietilpirocarbonato che rende acqua priva di nucleasi).

Estrazione RNA/DNA con colonnine

Le colonnine sono formate con membrane ad alta affinità con gli acidi nucleici. Procedura di estrazione semplice e veloce, alta resa, purezza ed integrità. 3 step: Legame alla membrana – lavaggio – eluizione acido nucleico (uso di soluzione acquosa che non contiene Sali che rompe legami tra RNA o DNA e membrana di silice).

La prima fase viene fatta con stessi metodi di fenolo/cloroformio.

Il principio di base è l'uso di membrane a **scambio anionico**: interazione tra cariche negative dei gruppi fosfato del DNA (o dell'RNA) e cariche positive della membrana (costituita da gel di silice). Per avvenire questo legame si usano dei buffer con un'altra concentrazione di Sali, per questo anche l'acqua in cui sono inseriti deve essere priva di Sali.

Deve includere uno step di rimozione dell'acido nucleico indesiderato (RNasi per estrarre DNA, DNasi per estrarre RNA).

L'aggiunta di etanolo elimina le molecole d'acqua che circondano RNA e si fa immediatamente dopo la lisi, dopo proteinasi K per liberare la copertura dei gruppi fosfato.

Le nucleasi sono enzimi che degradano acidi nucleici:

- DNAsi (enzimi che degradano il DNA): richiedono ioni metallici per la loro attivazione sono termolabili cioè facilmente inattivate da agenti chelanti (sequestrano ioni metallici) o sterilizzazione in autoclave
- RNAasi (enzimi che degradano l'RNA): non richiedono cofattori possono adsorbirsi a vetro e plastica e rimanere attive, resistono anche all'autoclave.

Esistono de kit per estrarre contemporaneamente DNA e RNA

Quantificazione acidi nucleici

Con metodo spettrofotometrico, principio di assorbimento, atomi o molecole in soluzioni in campi energetici possono assorbire quantità specifiche di energia. Specifica λ per ogni sostanza. Lo spettrofotometrico è fatto da una lampada al tungsteno, un monocromatore per scegliere lunghezza d'onda, cuvetta per campione e rilevatore per assorbanza campione proporzionale alla concentrazione del campione.

Il campione viene messo nella cuvetta attraversabile da un raggio. È presente anche una lampada e viene selezionata una particolare lunghezza d'onda selezionata dal monocromatore che blocca le lunghezze d'onda che non ci interessano. L'onda attraversa il campione che viene eccitato, una parte dell'energia rimane nel campione e una lunghezza d'onda esce che viene letta da un detector. Ci viene fornita la concentrazione del campione. L'assorbanza è direttamente proporzionale alla grandezza di DNA o RNA, Beer invece dice che l'assorbanza dipende dalla concentrazione. Utilizza la legge di Lambert e Beer, intensità ottica campione è data da prodotto concentrazione, lunghezza cammino ottico e costante di estinzione molare che dipende da soluzione in cui c'è il campione. Viene fatto rapporto tra intensità luce emessa dalla macchina e intensità luce che esce dal campione e si ottiene trasmittanza.

Quantificazione DNA

1. In una cuvetta di quarzo porre 200 microlitri di acqua (bianco, le sue lunghezze d'onda non vengono lette dal computer)
2. Azzerare lo strumento
3. Preparare una cuvetta di quarzo contenente 199 microlitri di H₂O e aggiungere 1 microlitri della soluzione di DNA (diluizione 1:200).
4. Introdurre la cuvetta nello spettrofotometro e leggere l'assorbanza (A).
5. Con i risultati ottenuti, calcolare la concentrazione di DNA attraverso la formula $A_{260} \times \text{dilution} \times 50 = \mu\text{g DNA/mL}$.

Per trovare la purezza del DNA:

- Calcolare il rapporto delle letture a 260nm e 280nm.
- Tale rapporto dovrebbe essere compreso tra 1.7 e 1.9 per una preparazione pura di DNA.
- Se il rapporto è <1,7 significa che è presente una contaminazione da parte di proteine.
- Calcolare il rapporto 260/230
- Le sostanze che assorbono a 230 includono: EDTA, fenolo e cloridrato di guanidina.
- Soluzioni di DNA hanno un rapporto 260/230 maggiore o uguale a 2.
- Se il rapporto è <2.0 significa che è presente una contaminazione da sali nel campione.

Quantificazione RNA

1. Stesse procedure del DNA
2. Con i risultati ottenuti, calcolare la concentrazione di DNA attraverso la formula $A_{260} \times \text{dilution} \times 40 = \mu\text{g DNA/mL}$.

Per trovare la purezza del RNA:

- Calcolare il rapporto delle letture a 260nm e 280nm.
- Tale rapporto dovrebbe essere compreso tra 1.8 e 2.0 per una preparazione pura di RNA.
- Se il rapporto è <1,8 significa che è presente una contaminazione da parte di proteine.
- Altre parti uguali a DNA

Una conferma ulteriore del processo di estrazione si può avere facendo 'correre' il campione all'interno di un campo elettrico controllato (gel elettroforesi). Gli acidi nucleici hanno carica negativa, quindi sono attratti dal polo positivo. Nel gel la prima cosa

da caricare è un marcatore di peso molecolare noto per paragonare il campione al marcatore.

Elettroforesi su gel d'agarosio (integrità DNA o RNA)

Il gel è costituito da Agarosio al 2% (dipendente dall'analisi), si pone in una soluzione tamponata (TAE o TBE) all'interno della cella elettroforetica. I pozzetti vengono riempiti con la soluzione di DNA o RNA. I frammenti di dimensioni minori corrono a velocità maggiore rispetto a quelli di grandi dimensioni. Al termine della corsa il gel viene posto sopra una lampada UV. Se il DNA rimane nel pozzetto vuol dire che è integro, altrimenti è degradato. L'RNA essendo più piccolo migra, se è integro si formano tre bande, se è presente una banda sopra a queste tre c'è stata una contaminazione da DNA

Il gel elettroforesi è un Gel di agarosio preparato facendo sciogliere l'agarosio nella soluzione di tampone elettroforetico (TAE o TBE) a 100°C. Al gel si aggiunge il Bromuro di Etidio, prima della polimerizzazione che si lega al DNA/cDNA. Il caricamento è facilitato dall'utilizzo di un loading dye composto da glicerolo, blu di bromofenolo e blu di xilencianolo che migrano a velocità diverse durante la corsa.

Per vedere la banda il gel viene colorato con bromuro di etidio (BrEt) è un colorante fluorescente che assorbe a 300 nm (UV) dando colore giallo-arancio. Risulta utile anche per 'quantificare' il campione, in quanto l'intensità di fluorescenza è direttamente proporzionale alla quantità di DNA/cDNA presente (analisi semi quantitativa, non è quantificazione assoluta ma relativa).

Retrotrascrizione

L'RNA è particolarmente labile (singolo filamento), è necessario quindi trasformarlo in una molecola di DNA complementare o cDNA (retrotrascrizione o trascrizione inversa). Questo è possibile grazie ad enzimi generalmente chiamati DNA polimerasi RNA dipendenti, producono DNA a partire da RNA. Per iniziare la reazione di polimerizzazione è necessario l'utilizzo di primer (oligonucleotidi), complementari alla zona d'interesse. Le trascrittasi inverse comprendono:

- TERT che mantiene la lunghezza corretta dei telomeri nei cromosomi eucariotici, prevede degradazione cromosomica;
- HIV-1 tipica del virus dell'immunodeficienza umana di tipo 1.
- AMV del virus della mieloblastosi aviaria.
- M-MLV del virus della leucemia murina di Moloney.

Le trascrittasi inverse usate per la retrotrascrizione sono enzimi ricombinanti modificati per avere un basso tasso di errore (AMV, M-MLV).

Inizia con dei primer che danno il via alla reazione possono essere oligo-dT (DNA costituito da sole T che sia appai con le code di poli-A negli mRNA) oppure random primers (trascrive RNA totale) o oligonucleotide antisense gene-specifico (solo se si usa la tecnica one-step RT-PCR, in un solo step si fa retrotrascrizione e polimerasi).

La reazione sarà generalmente composta da:

- Campione
- dNTPs, dinucleotidtrifosfato
- Primer
- Enzima trascrittasi inversa
- Tampone
- Acqua DEPC per arrivare a volume per reazione

One step RT-PCR e two step

One step:	Two step:
→ Veloce	→ Flessibile
→ Sensibile	→ Sensibile
→ Non permette di analizzare più trascritti in un campione	→ Possibilità di analizzare più trascritti in un singolo campione
→ Riduce la possibilità di avere contaminazioni	→ Possibilità di mettere da parte il cDNA per ulteriori analisi
→ Ideale per analizzare un grande numero di campioni	→ Prima retrotrascrizione e poi amplificazione trascritto
→ Una volta copiato RNA in DNA, l'enzima trascrittasi inversa copia e digerisce mRNA per ottenere DNA a doppio filamento	

PCR: amplificazione selettiva in vitro di una sequenza di DNA/cDNA grazie a primer specifici. Primer disegnati per avere sequenza di interesse, coppia di oligonucleotidi, uno complementare a 5'3' e uno al filamento 3'5' per permettere alla polimerasi di copiare i filamenti. Ad ogni ciclo le copie raddoppiano. Consiste nella ripetizione, per un dato numero di cicli, di tre fasi:

- Denaturazione (94-95°C), la polimerasi è termostabile, divisione due filamenti
- Allineamento (circa 60°C), sequenza target con i primer
- Allungamento (72°C)

La reazione a catena della polimerasi è caratterizzata da 3 fasi:

- ESPONENZIALE: All'aumentare dei cicli si ha una progressiva aumento copie DNA presenti
- LINEARE: Diminuzione dell'attività della polimerasi
- PLATEAU: Riallineamento dei filamenti ottenuti. Le cause possono essere competizione con filamenti precedenti, inattivazione termica enzima, riduzione rapporto molare tra DNA polimerasi e DNA, accumulo di pirofosfati (inibitori attività polimerasi), distruzione amplificati, diminuzione concentrazione uno e più componenti necessari a reazione

(primer o dNTPs).

I primers che danno il via alla reazione sono una coppia di oligonucleotidi disegnati ad hoc per la sequenza target. La reazione è composta da:

- DNA/cDNA
- dNTPs
- Primers
- DNA polimerasi DNA dipendente
- MgCl₂, cloruro di magnesio per attività polimerasica
- Tampone
- Acqua DEPC per arrivare a volume.

I cicli di solito sono 40.

DNA polimerasi DNA dipendente

Appartengono alle traferasi, catalizzano reazione di polimerizzazione nel filamento da copiare. Nessuna può iniziare la sintesi *de novo*, ma ha bisogno di primer complementari al filamento stampo. La polimerasi più utilizzata è la Taq polimerasi, isolata dal batterio *Thermophilus aquaticus*. Essendo termostabile ha consentito di effettuare la fase di estensione a 72 °C questo ha permesso di aumentare la resa e la specificità del prodotto di reazione. Inoltre alcune Taq sono state modificate per avere attività di proofreading, che consente la correzione di errori durante l'amplificazione.

Conservazione

Il DNA si caratterizza per una struttura stabile e poco reattiva, di facile manipolazione; può essere conservato a + 4°C o liofilizzato a -20°C. Gli RNA al contrario sono strutture estremamente labili, facilmente degradati dalle RNasi, enzimi cellulari ubiquitari, con attività ampia e notevole resistenza alla denaturazione. L'estrazione degli RNA impone condizioni di sterilità e di particolare accuratezza, l'uso di vetreria e reagenti sterili e dedicati esclusivamente all'estrazione degli RNA. Gli RNA vanno conservati a -70°C in condizioni denaturanti (0,5% SDS, formaldeide).

Tecniche di microscopia

venerdì 16 ottobre 2020 13:27

I tipi di preparati sono sezioni di campioni o cellule in coltura:

1. **Prelievo**, subito dopo morte animali oppure biopsie (animale vivo e si prelevano piccole parti di tessuto);
2. **Fissazione**;
3. **Inclusione**, campione messo in sostanze che diventano dure;
4. **Sezionamento**, le fette saranno sottili quanto più saranno rigidi;
5. **Colorazione**.

Esame dei preparati:

- **Microscopio ottico**: Usa fasci di luce (lunghezza d'onda visibile). Luce passa attraverso un condensatore, va nel vetrino con il campione, luce raccolta dall'obiettivo e insieme alle lenti dentro focalizzano l'immagine a livello dell'oculare, l'immagine vista è come se fosse posizionata a 250 mm da occhio. **LIMITE DELLA RISOLUZIONE** attorno a micrometro.
- **Microscopio elettronico**: a trasmissione e a scansione, usa fascio di elettroni. Si possono vedere cose più piccole del microscopio ottico. Gli elettroni hanno basse lunghezze d'onda e usate lenti elettromagnetiche. **LIMITE DELLA RISOLUZIONE** a livello sub - atomico

POTERE RISOLUTIVO: capacità di riconoscere come distinti due punti, la distanza limite è il limite di risoluzione. Maggiore è il limite e minore è il potere risolutivo. Microscopio ottico limite di risoluzione di 0,2 micrometri, uomo di 100 micrometri, microscopio elettronico a scansione poco di più di 1 nm, a trasmissione invece fino ad atomi. Oltre a ingrandire l'immagine ci deve essere un aumento del potere di risoluzione per non far apparire immagine sfuocata

Prelievo

Pezzi di organi o organi interi, cellule. Il prelievo va fatto seguire nel più breve tempo possibile dalla fissazione, se non è possibile bisogna conservarlo a freddo (ghiaccio fondente).

Fissazione

Impedisce autolisi e putrefazione. Arresta le funzioni biologiche senza alterare l'organizzazione strutturale delle componenti. I fissativi più comuni sono: aldeidi che legano tra loro proteine formando un reticolo. Si usano anche miscele fissative e fissativi fisici (calore, essiccazione e congelamento) molto rapidi ma non consentono la conservazione. I tempi di fissazione non supera le 24 ore perché senò indurisce il campione e va a coartare vasi sanguigni e linfatici.

Inclusione

Indurire il preparato per fare sezioni molto piccole di 5-10 micron. Varie fasi:

1. Fissazione
2. Lavaggio per eliminare il fissativo in eccesso, con acqua corrente
3. **Disidratazione**, elimina acqua e sostituita con alcol (50° poi 75° poi 90° e in fine assoluto), poi con xilene (chiarificazione) miscibile con etanolo e con resine per inclusione e poi sostituito con paraffina. Deve essere fatta in leggera agitazione con uno shaker per fare penetrare meglio etanolo.
4. Infiltrazione della paraffine nel tessuto
5. Indurimento del mezzo di inclusione, includere il campione in un materiale duro e omogeneo per essere tagliato in sezioni non superiori a 10 micrometri

La stessa cosa può essere fatta anche con le resine (epossidiche e metacrilati). Si usa anche il congelamento con uso di OCT, molto veloce, massima conservazione struttura molecolare ma scarsa conservazione della morfologia, il vantaggio di questo è che non richiede fissazione.

Tempi minimi di infiltrazione sono di 3 ore. L'inclusione è facilitata dall'inclusore che riscalda e scioglie la paraffina. Il campione va messo in un contenitore sagomato, messo sotto il rubinetto della paraffine e su un tappeto a 60 gradi per non far solidificare la paraffina. Riempito parzialmente si lascia raffreddare per qualche secondo a 4 gradi, si procede poi con inclusione completa. Poi viene tutto spostati e solidificati a temperatura ambiente. Il blocchetto poi viene processato per il sezionamento. Prima si deve mettere a -20 gradi per indurire completamente il blocchetto.

Sezionamento

Rimozione paraffina in eccesso. Le sezioni solitamente sono di 5 - 15 micrometri, poi la sezione viene messa in acqua distillata a 40-50 gradi e poi recuperata con un vetrino porta oggetti e poi acqua in eccesso viene fatta evaporare.

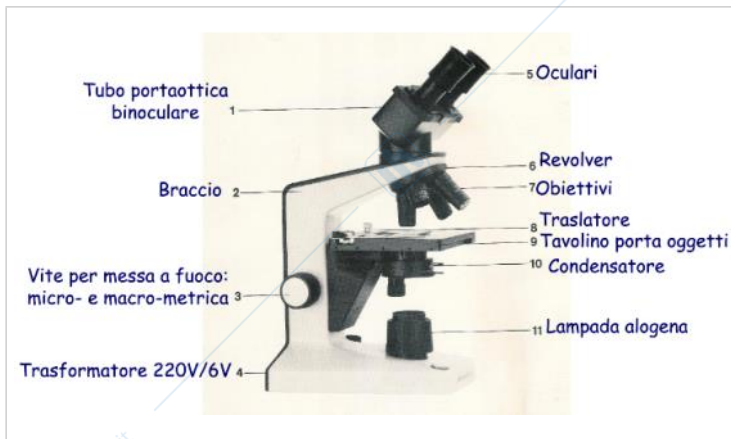
Microtomi: affettatrici con fette molto sottili

Colorazione

Le cellule sono trasparenti se non vengono colorate. Vengono usate sostanze diverse in base ai componenti cellulari per far aumentare il contrasto e per essere visibili. Il colorante è una molecola solubile di colore proprio che può legarsi a substrati. È formato da un cromoforo (gruppo di atomi che dà colore) e auxocromo che trasforma una sostanza colorata in una sostanza in grado di colorare. Le colorazioni sono:

- Istomorfologiche che colorano nucleo, citoplasma
- Istochimiche mettono in evidenza sostanze chimiche

Bisogna allontanare la paraffine attraverso l'idratazione con alcoli. Per rendere la colorazione permanente deve essere di nuovo disidratata e inserita una colla montante che lega vetrino portaoggetti e copia oggetti. Si reinserisce lo xilene, si fa gocciolare la colla e si poggia un vetrino sopra oggetti.



Osservazione campione

L'osservazione avviene dopo che il montante è asciutto. La risoluzione è la capacità di poter distinguere due punti distinti, nell'occhio umano circa 0,2 mm, quelle di una cellula sono 10-30 micron. L'ingrandimento deve essere proporzionale alla risoluzione. Si vedono batteri ma non si vedono i virus, macromolecole. C'è la fonte luminosa, il condensatore per mandare la luce al campione, trasmette dall'obiettivo che ingrandisce l'immagine. Gli obiettivi possono avere diversi fattori di ingrandimento, 4x 10x 20x 40x. Il fuoco si ottiene con manopole chiamate macrometrica (per avvicinarsi al fuoco) e micrometrica (per mettere a fuoco).

Fluorescenza

Un raggio UV colpisce il campione che emette una luce fluorescente di colore caratteristico per i diversi fluorocromi. Un elettrone viene eccitato e assorbe energia, torna allo stato fondamentale e viene liberata energia sotto forma di luce fluorescente, lunghezza d'onda emessa è maggiore di quella incidente. Due tipi:

- Primaria o autofluorescenza: data da alcune sostanze nel tessuto
- Secondaria: indotta da marcature con fluorocromi o fluorofori e visti con microscopio a fluorescenza. I componenti tipici di un microscopio a fluorescenza sono:
 - o Sorgente luminosa (lampada a vapori di mercurio) ha un tot di ore di utilizzo;
 - o Filtro di eccitazione, seleziona particolare lunghezza d'onda;
 - o Specchio diroico, sposta fascio luminoso verso il campione;
 - o Filtro di emissione, porta luce emessa del fluorocromo verso l'oculare, luce con lunghezza d'onda maggiore dell'onda che ha colpito il campione.

Si possono usare degli anticorpi che danno fluorescenza. I **fluorocromi o fluorofori** sono molecole fluorescenti. Risultano fluorescenti dopo essere state eccitate ad una data lunghezza d'onda (lunghezza d'onda di assorbimento). Tornano allo stato di equilibrio ed emettono energia sotto forma di luce con frequenza specifica quanto più è precisa la frequenza di incidenza, ma comunque maggiore di quella assorbita (shift di Stokes). I fluorocromi sono in grado di emettere fluorescenza anche a concentrazioni molto basse. Uno dei limiti è che non permette di eccitare in modo distinto due fluorocromi contemporaneamente. I fotoni emessi sono direttamente proporzionali alla concentrazione del fluorocromo. Possono essere usati nella **FISH** (associati a oligonucleotidi) e nella **immunofluorescenza** (associati a anticorpi).

Nell'immunofluorescenza il fluorocromo viene legato all'anticorpo (anticorpo coniugato) che si lega al target. Tecnica reversibile perché si creano tramite legami covalenti. L'anticorpo può reagire con un solo antigene. Due tipi:

- Nella tecnica di **immunofluorescenza diretta** il fluorocromo è legato all'anticorpo che riconosce una proteina specifica chiamata antigene o target (anticorpo primario coniugato). Ogni antigene ha un anticorpo primario specifico.
- Nella tecnica di **immunofluorescenza indiretta** il fluorocromo è legato all'anticorpo (secondario) che riconosce l'anticorpo primario che si è legato al target (anticorpo secondario coniugato). Il controllo negativo è l'osservazione di un campione che SICURAMENTE non esprime l'antigene

Microscopio confocale: colora uno strato sottilissimo di molecole.

Microscopio elettronico

Permette di vedere microrganismi e strutture cellulari più piccole del limite di risoluzione del microscopio ottico. Il suo funzionamento è basato su fasci di elettroni. Gli elettroni hanno bassissime lunghezze d'onda, quindi si ottengono risoluzioni più elevate. Vengono usate lenti elettromagnetiche (presenza di campo elettrico e magnetico che devia il fascio). Le lenti elettromagnetiche mettono a fuoco un fascio di elettroni. Si possono quindi osservare due punti separati fino ad una distanza di 0,005 nm (maggiore risoluzione). Le immagini acquisite sono in bianco e nero. Microscopia elettronica a TRASMISSIONE (TEM, elettroni accelerati e dopo campione colpiscono schermo fluorescente) e microscopia elettronica a SCANSIONE (SEM, immagine tridimensionale).

RISOLUZIONE: Il potere risolutivo di un microscopio è la capacità di riconoscere come distinti due punti estremamente vicini tra loro.

TEM	SEM
-----	-----

Ingrandimento maggiore (posso vedere virus e macromolecole). Il microscopio elettronico a trasmissione proietta il fascio di elettroni attraverso un campione sottile. L'immagine viene ingrandita e proiettata su uno schermo o una fotocamera fluorescente. Le lenti devono essere elettromagnetiche, tra queste c'è un condensatore che indirizza fascio di elettroni, poi prima lente magnetica che funge da obiettivo e una seconda che funge da proiettore e blocca elettroni, poi c'è un rivelatore che cattura elettroni secondari emessi come conseguenza dell'attraversamento del campione.

I campioni devono essere fissati e tagliati in sezioni molto più sottili (50-100 nm) di quelle per il microscopio ottico (viene usato ultramicrotomo). Il campione sarà attraversato dal fascio di elettroni. Non vengono usati coloranti ma sostanze dense agli elettroni per dare contrasto (metalli pesanti come i sali di piombo). Il fascio elettronico è prodotto dal cannone elettronico, va nell'apertura del condensatore, attraversa il campione e le lenti dell'obiettivo.

Visione tridimensionale di strutture superficiali dei microrganismi. Il SEM focalizza il fascio di elettroni su un punto sottile, che esplora la superficie del campione. Gli elettroni sono prodotti come risultato dell'interazione fascio-campione e vengono emessi dagli strati superficiali del campione e successivamente raccolti dai rivelatori di elettroni. Le lenti devono essere elettromagnetiche, tra queste c'è un condensatore che indirizza fascio di elettroni, poi prima lente magnetica che funge da obiettivo e una seconda che funge da proiettore e blocca elettroni, poi c'è un rivelatore che cattura elettroni rifratti una volta colpito il campione.

Il campione viene ricoperto da un sottile strato di un metallo pesante come l'oro. Gli elettroni dispersi dal metallo vengono raccolti e utilizzati per produrre immagini su schermo. Si possono ottenere ingrandimenti che vanno da 15X a oltre 100000X. Si può visualizzare solo la superficie di un oggetto.

Preparazione del campione

- LAVAGGIO DELLA SUPERFICIE (SEM)
- FISSAZIONE (SEM e TEM)
- DISIDRATAZIONE (SEM e TEM),
- INCLUSIONE (TEM), in una resina
- TAGLIO/SEZIONAMENTO (TEM)
- MONTAGGIO- su matrice (SEM) o su griglia (TEM)
- ESSICCAZIONE DA PUNTO CRITICO (SEM)
- COLORAZIONE (SEM e TEM), sostanza densa agli elettroni

FISSAZIONE (SEM e TEM)

Processo utilizzato per preservare la struttura in uno stato che sia il più possibile vicino allo stato in vivo. Limita le alterazioni provocate dai trattamenti successivi. I fissativi legano proteine tessuto e tessuto stesso (proteine solubili al citoscheletro). Blocca i processi degenerativi e mantenere inalterata la morfologia del campione.

1. FISSATIVO PRIMARIO: 1-2,5% glutaraldeide. Penetra bene i tessuti, ma velocità di diffusione bassa, Forma rapidamente cross-links con gli aminoacidi del preparato, I legami sono stabili e permanenti, Eccellente fissativo per le proteine, Non fissa i lipidi (OsO₄). 2-4 ore a 4°C
2. FISSATIVO SECONDARIO: 1-2% tetrossido di osmio. Penetra ed agisce molto lentamente, Fissa i lipidi e la componente lipidica delle lipoproteine, Forma precipitati, Fornisce una sorta di colorazione del campione, interagendo in maniera differente con le diverse componenti cellulari. 2 ore a 4°C al buio (fotosensibile).

DISIDRATAZIONE (TEM e SEM)

La disidratazione è necessaria per rimuovere l'acqua presente nel campione. Si immerge il campione in soluzioni a concentrazioni maggiori di alcol. L'acqua viene rimossa gradualmente per evitare variazioni osmotiche eccessive. Il volume di alcool deve essere sufficiente a coprire il campione. I tempi di permanenza nella soluzione devono essere adattati al tipo di campione. La disidratazione in alcool etilico prevede un solvente di transizione.

ESSICCAMENTO DA PUNTO CRITICO (Critical Point Drying) SEM

Previene danni dovuti all'essiccamento ad aria che danneggia i campioni a causa della tensione superficiale. Alla temperatura di punto critico ed alla pressione adeguata il liquido è convertito in gas senza nessuna tensione superficiale; non usata acqua perché ha punto critico dell'acqua (374 °C), CO₂ (31,2 °C) usata come essiccatore non è miscibile con acqua quindi è necessario un passaggio in acetone (fluido intermedio). A specifiche temperature o livelli di pressione il campione non è danneggiato da tensione superficiale perché ridotta al minimo.

I campioni vengono inseriti in recipienti porosi poi trasferiti nella camera porta campioni all'interno dell'essiccatore.

SPUTTER COATING ('COLORAZIONE') SEM

Il campione viene montato su dischi di alluminio (15-25 mm) grazie ad un nastro adesivo o vernice a base metallica. Per colorare un campione devono essere usati atomi con peso molecolare più alto, infatti la superficie del campione deve essere rivestita con uno strato sottile di metallo (Au/Pd) che agisce come una sorgente di elettroni secondaria (sputtering). Una volta rivestiti viene inserito nella camera di sputtering per far aderire strato sottile al campione stesso.

DISIDRATAZIONE-INCLUSIONE TEM

È necessario adoperare un solvente di transizione in quanto l'etanolo usato per la disidratazione non è miscibile con le resine usate per l'inclusione. Il solvente di transizione usato è l'ossido di propilene è miscibile con etanolo, acetone e resine possitiche. L'ossido di propilene reagisce con la componente anidridica delle resine, diventando parte integrante del polimero. L'ossido di propilene è altamente infiammabile, molto volatile, cancerogeno e mutageno.

Poi si deve procedere con la fase d'infiltrazione della resina dentro il campione, con graduale sostituzione del mezzo di transizione, sostituito da soluzioni a concentrazioni crescenti di resina.

INCLUSIONE TEM

La fase di infiltrazione si ha sostituendo gradualmente il mezzo di transizione con resine epossidiche. Successivamente il campione viene incluso in resina per poter essere tagliato. Le resine sono insolubili in alcol etilico. Le resine sono liquide a temperatura ambiente, polimerizzano a 60-70°C. il processo di polimerizzazione è irreversibile. Se la resina è troppo dura si varia la velocità di taglio. Non si deve interrompere la polimerizzazione perché il campione può presentare diversità di durezza nel campione stesso. Sono ideali come mezzo includente per la TEM in quanto hanno eccellenti proprietà di taglio e sono stabili sotto il fascio di elettroni.

SEZIONAMENTO TEM

Prima del sezionamento si deve rimuovere la resina intorno e sopra al campione (trimimng della piramide), poi c'è il sezionamento. Il tessuto incluso può essere tagliato in sezioni sottilissime (25-100 nm) grazie ad un ultramicrotomo; L'ultramicrotomo è dotato di uno stereomicroscopio che permette di osservare la fetta di tessuto tagliata. Le sezioni vengono poste su un retino di supporto grazie ad un'apposita asta perché seno si romperebbero. I retini sono dischetti di materiale conduttore, solitamente di rame o d'oro, formati da una rete di maglie su cui appoggiare le sezioni. Sopra ci deve essere una pellicola si supporto su cui le sezioni aderiscono.

COLORAZIONE TEM

È essenziale per amplificare le diverse capacità di assorbire elettroni da parte delle differenti strutture biologiche attraversate dal fascio. Le molecole organiche hanno un basso contrasto perché molecole hanno basso peso molecolare. Si usano atomi con peso atomico più alto. Il tessuto viene trattato con dei metalli pesanti, quali uranio e piombo, che sono in grado di legarsi preferenzialmente ad alcune strutture. L'acetato di uranile evidenzia gli acidi nucleici, mentre il citrato di piombo lega le membrane. I retini vanno conservati in dei box privi di aria e umidità.

- Porre il retino su una goccia di acetato di uranile (15 min);
- Lavare con dH₂O (acqua distillata) ed asciugare con carta da filtro senza toccare le sezioni;
- Porre il retino su una goccia di citrato di piombo (ricoperta con un velo di olio di vasellina, conservata al buio e a temperatura ambiente) (10 min);
- Lavare con dH₂O ed asciugare con carta da filtro senza toccare le sezioni;
- Tutti i passaggi sono fatti al buio in una camera chiusa a temperatura ambiente.

TEM

FISSAZIONE - utilizzando prodotti chimici o tecniche di congelamento.

DISIDRATAZIONE - Solitamente utilizzando solventi (etanolo o acetone).

INCLUSIONE - I campioni vengono infiltrati e inclusi in resine che vengono polimerizzate con UV o calore. Questo supporta il campione durante il sezionamento, prevenendone il collasso.

SEZIONAMENTO - Vengono usati ultramicrotomi per sezionare campioni con spessori compresi tra 50 e 200 nm. Le sezioni vengono posizionate su GRIGLIE come supporto nel microscopio.

COLORAZIONE - l'ulteriore colorazione sui campioni aumenta il contrasto, solitamente si usano citrato di piombo e l'acetato di uranile di Reynold.

SEM

FISSAZIONE - utilizzando prodotti chimici o tecniche di congelamento.

DISIDRATAZIONE - Solitamente utilizzando solventi.

FRATTURA - I campioni vengono aperti in due per rivelare le strutture interne.

MONTAGGIO - I campioni vengono montati su STUB che si adattano al porta campioni. È possibile utilizzare linguette di carbonio, nastro adesivo o vernice conduttiva per incollare i campioni sullo stub.

RIVESTIMENTO - I campioni vengono rivestiti con carbonio o rivestimento metallico tramite un processo chiamato SPUTTER COATING. Questo aiuta a disperdere qualsiasi accumulo di carica nel campione e con il rivestimento in metallo può migliorare il segnale.