



*Seminari divulgativi*



*FAST - Servizio Tecnico Scientifico Grandi Strumentazioni e Core Facilities*

*Microscopia confocale a  
scansione laser:  
i sorprendenti colori  
dell'invisibile*

*Dr Serena Cecchetti, PhD  
Confocal Microscopy Unit*

*3 maggio 2017*

# Microscopia ottica

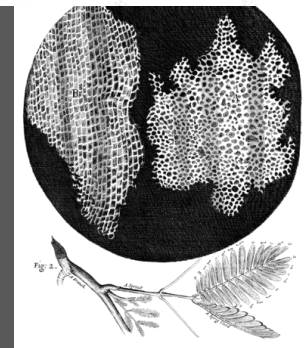
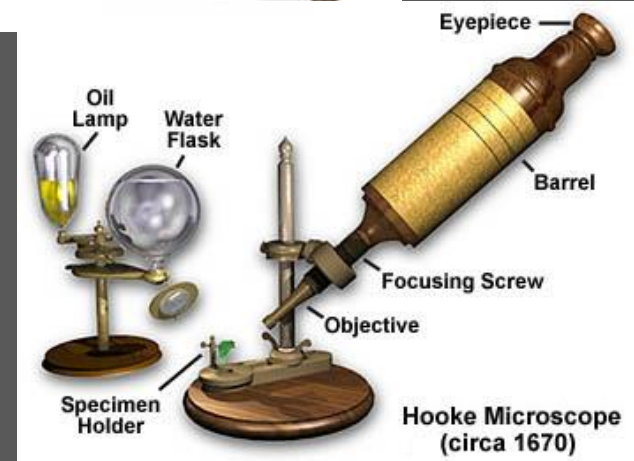
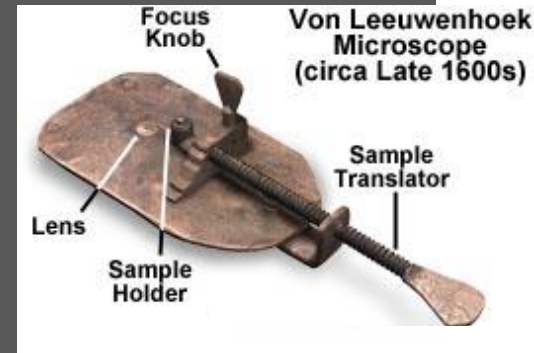
Il microscopio ottico è uno strumento progettato e costruito per ingrandire le immagini  
Il più semplice è costituito da un tubo porta ottiche che sorregge due lenti convesse allineate in serie: l'obiettivo e l'oculare

I primi esempi di ingrandimento ottico risalgono alle **civiltà mesopotamiche**

**1610** Galileo Galilei sviluppò un microscopio composto da una lente convessa ed una concava

**1648** Anton van Leeuwenhoek osservò e descrisse numerosi microorganismi, utilizzando un microscopio semplice, ma in grado di raggiungere elevati ingrandimenti (400x)

**1665** Robert Hooke, utilizzò una forma molto rudimentale di microscopio ottico composto



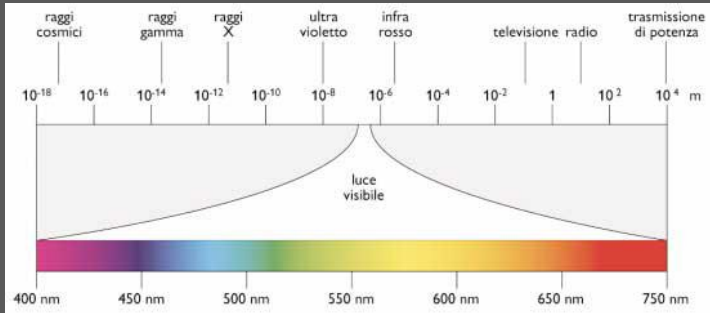
# Microscopio ottico

Caratteristiche principali di un microscopio ottico sono:

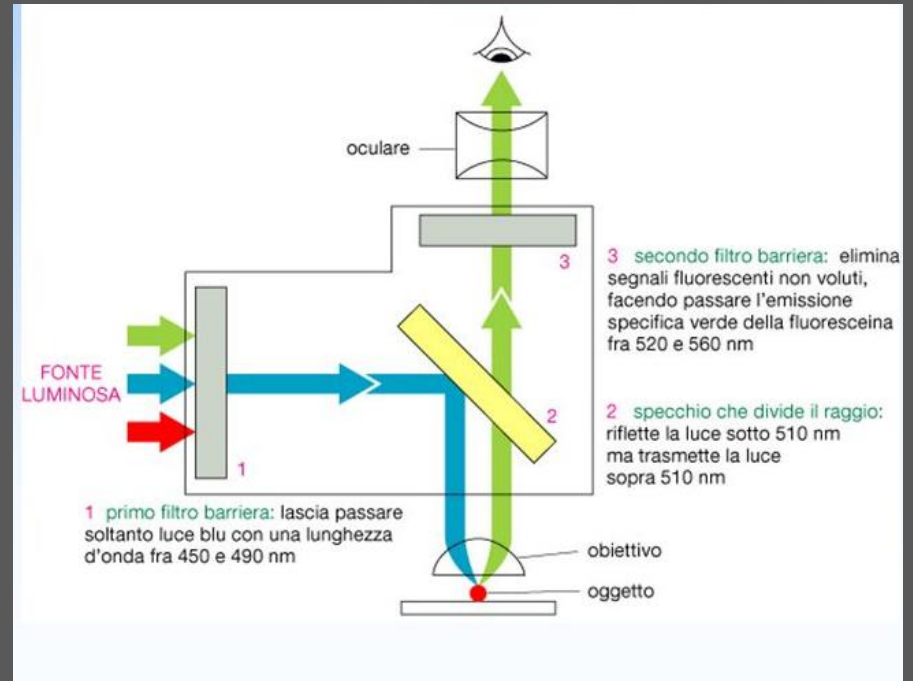
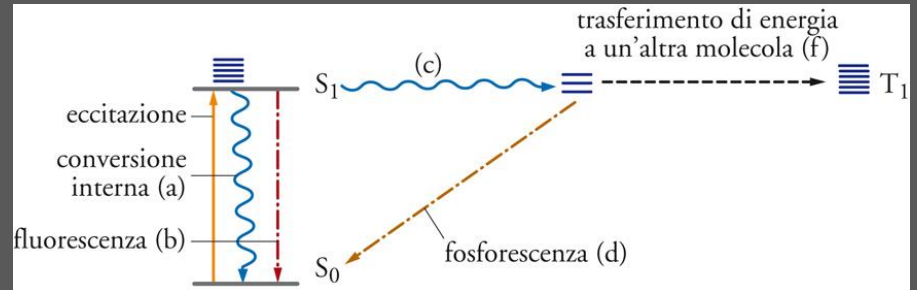
- ✓ **Il potere di ingrandimento** è il rapporto fra le dimensioni dell'immagine e quelle dell'oggetto e dipende dal prodotto degli ingrandimenti forniti dall'oculare e dall'obiettivo
- ✓ **Il potere di risoluzione** è un indice della ricchezza di particolari che si possono osservare nella struttura di un'immagine, si aggira normalmente sui 0,2 micron

# Microscopia a fluorescenza

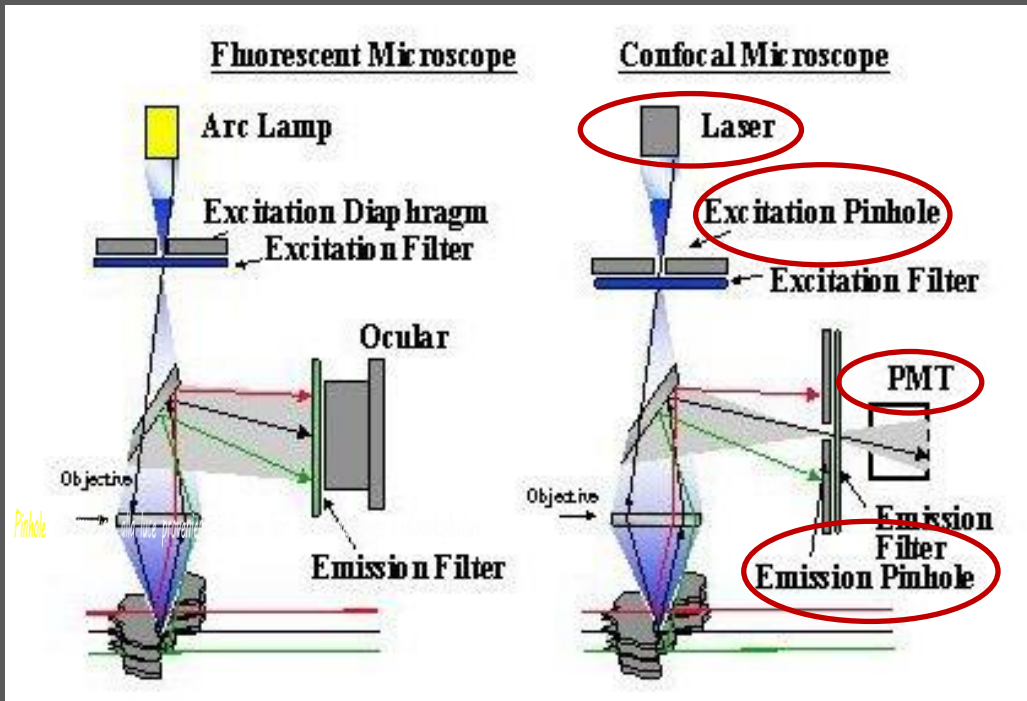
La fluorescenza è la proprietà di alcune sostanze di riemettere le radiazioni incidenti ricevute (nella maggior parte dei casi l'emissione ha una lunghezza d'onda maggiore all'interno dello spettro del visibile)



Lo spettro del visibile comprende solo una piccola parte delle radiazioni luminose tra 400 nm e 750 nm



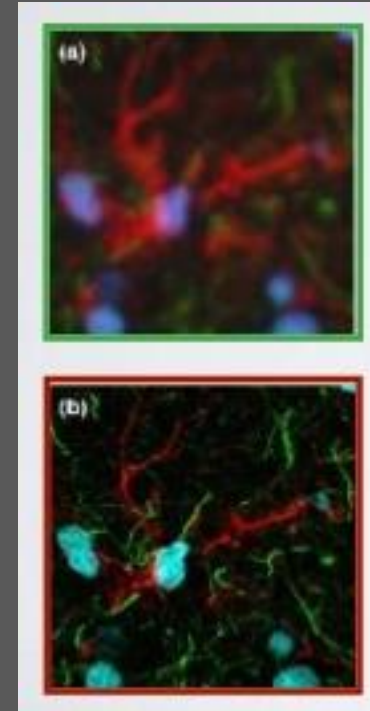
# Microscopia Confocale a Scansione Laser



*Laser: sorgente luminosa puntiforme molto intensa*

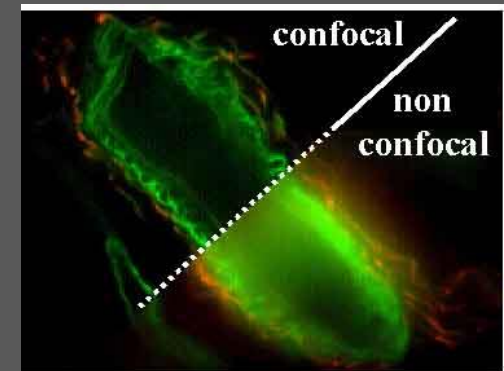
*Fotomoltiplicatore: trasforma l'intensità luminosa in un segnale elettrico di intensità proporzionale*

*Pinhole: che impedisce alla luce proveniente dalle zone fuori fuoco di raggiungere il fotomoltiplicatore*



*In questo modo solo il segnale luminoso relativo al piano di fuoco viene registrato e utilizzato nella formazione dell'immagine finale. Il risultato è un'immagine poco disturbata dalla diffusione della luce delle zone non a fuoco*

*Focalizzare con estrema precisione un laser sul preparato, aumentando notevolmente la risoluzione e la profondità di campo*

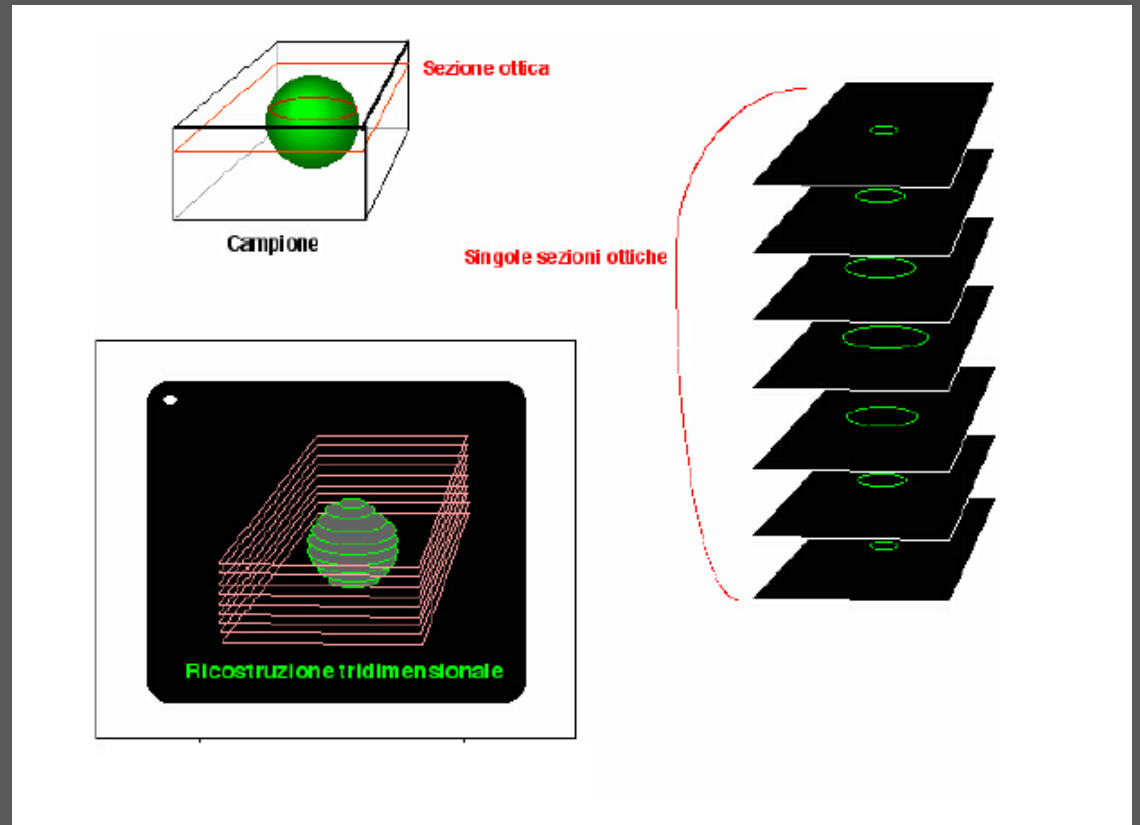


# Microscopia Confocale a Scansione Laser

*Ricostruzioni tridimensionali con risoluzione submicrometrica di una grande varietà di campioni, biologici e non (anche per la caratterizzazione di materiali, microstrutture e dispositivi)*

Anche la luce di *eccitazione* ha un *pinhole*, in modo da illuminare solo una porzione microscopica del campione. Per ottenere la rappresentazione del campione, si muove il fascio di luce di punto in punto, in modo che tutto il piano situato alla profondità voluta venga illuminato dal fascio di luce secondo una precisa sequenza.

Spostando il campione *lungo l'asse z* dopo ogni scansione, è possibile eseguire una serie di scansioni successive corrispondenti ai piani focali via via più profondi all'interno del campione. Queste scansioni prendono il nome di *sezioni ottiche* e la loro sovrapposizione ordinata, eseguita via software, consente di ricostruire un'immagine complessiva dell'intero volume scandito, in cui tutti i piani sono contemporaneamente a fuoco.



# Leica TCS SP2 (2002)

Laser diodo UV 405 nm

Laser Ar/Kr 488 nm

Laser He/Ne 543/594 nm

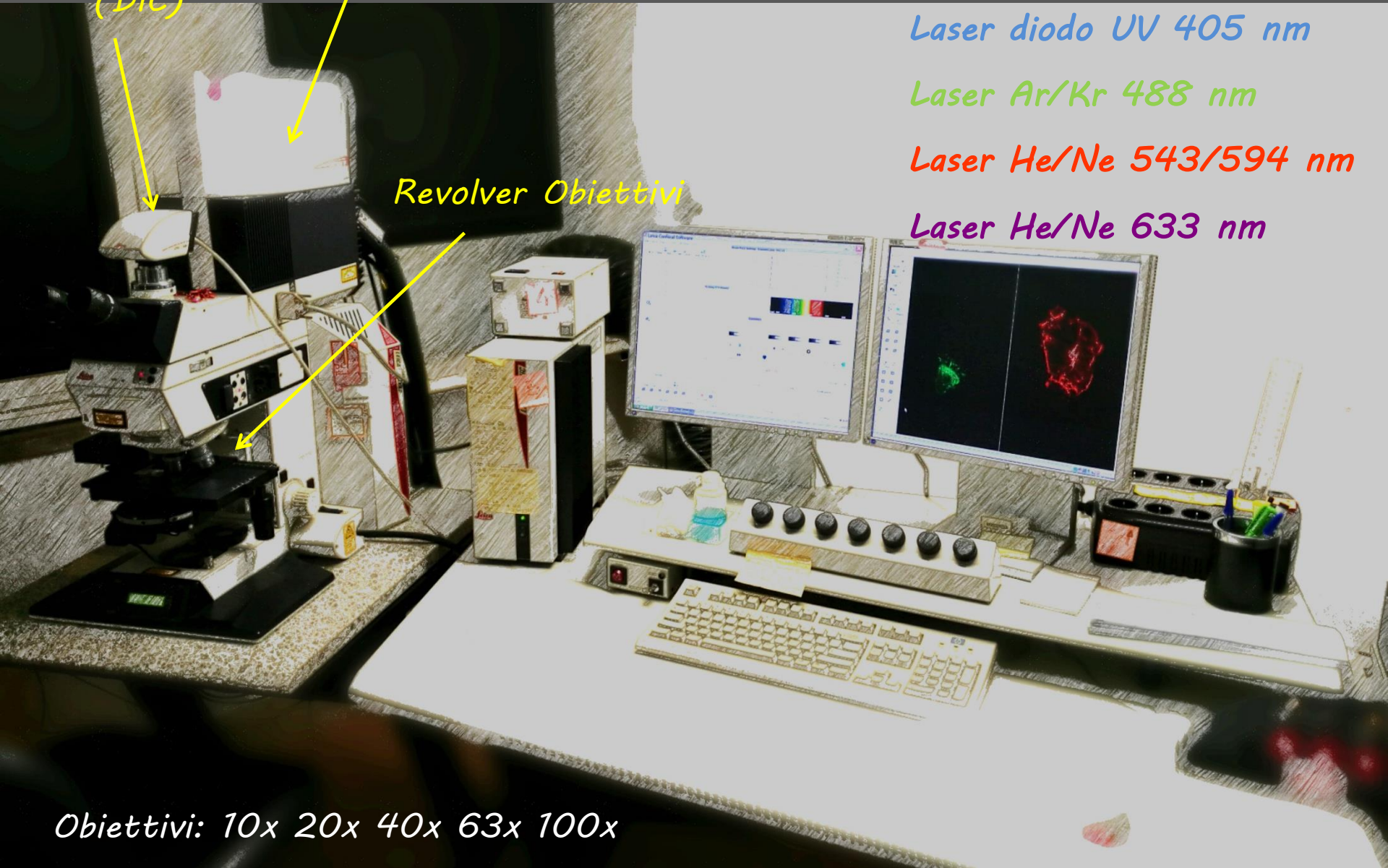
Laser He/Ne 633 nm


Camera Digitale  
(DIC)

Testa Confocale

Revolver Obiettivi

Obiettivi: 10x 20x 40x 63x 100x

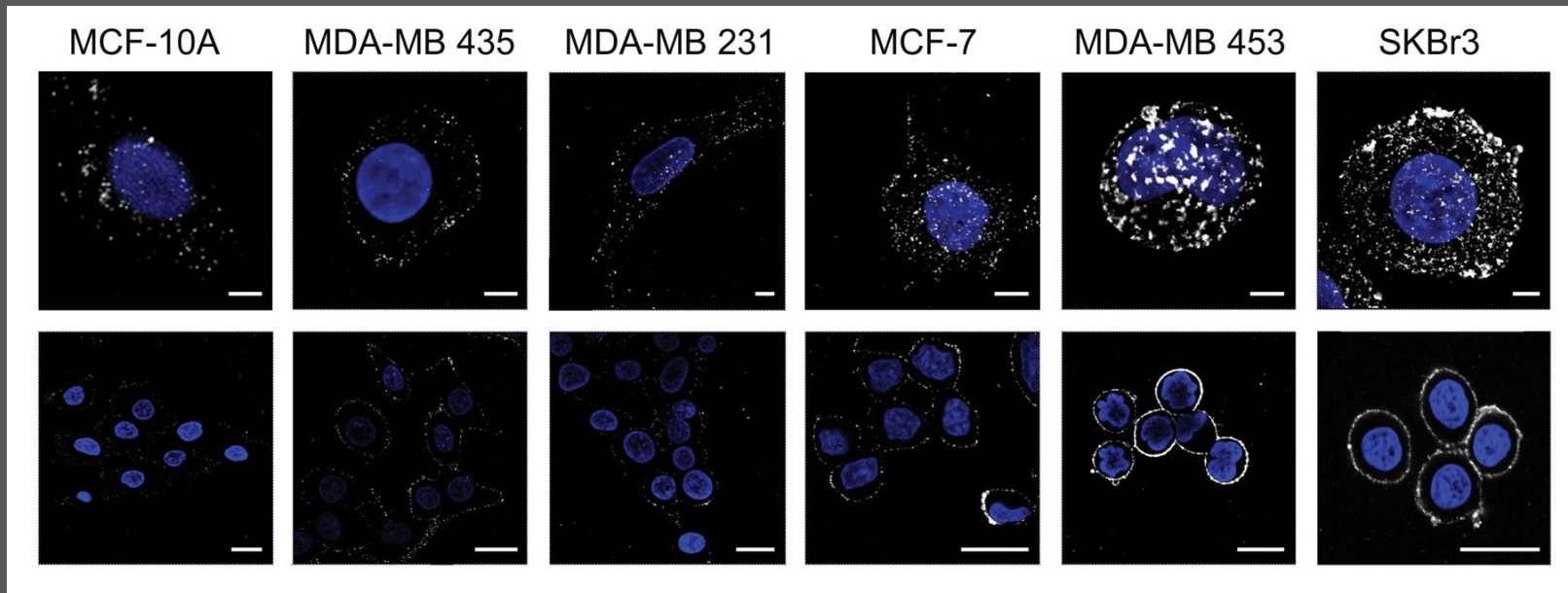




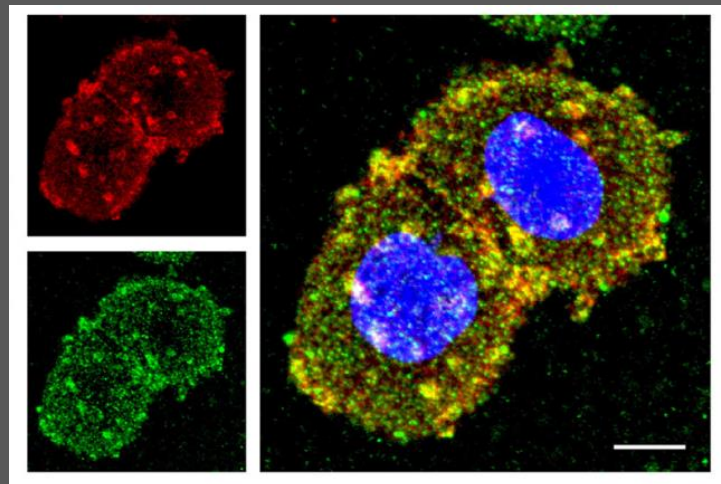
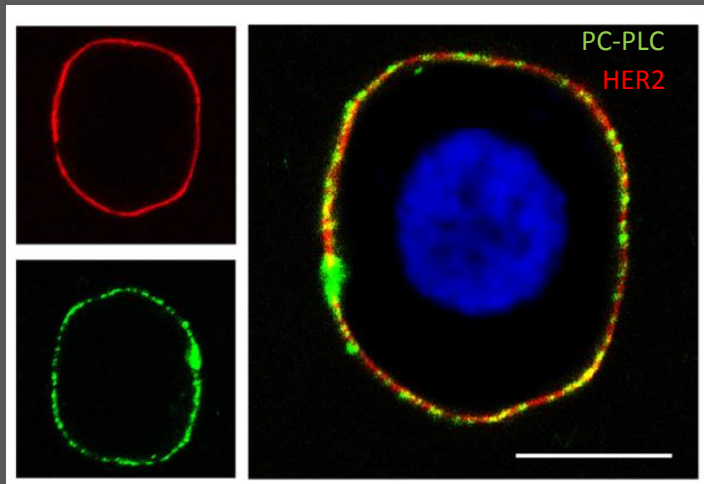
*Applicazioni della microscopia confocale  
a scansione laser*



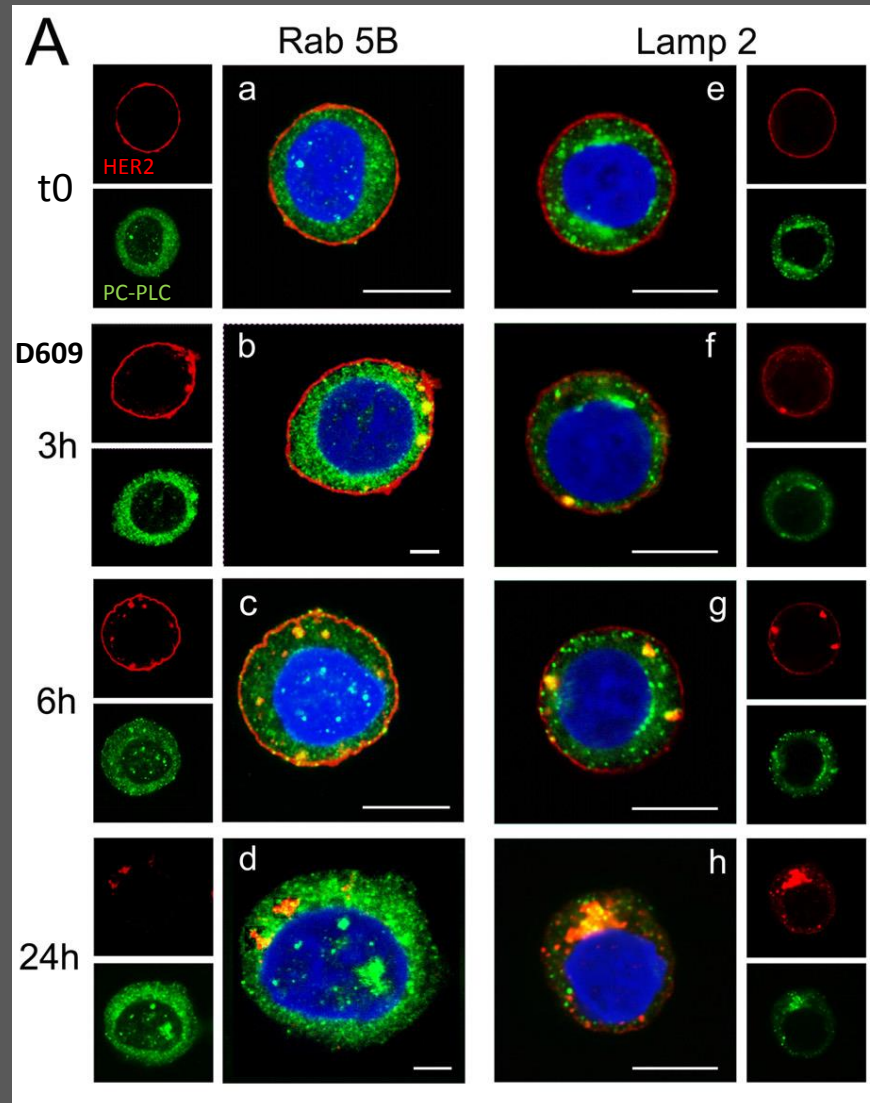
# Espressione della PC-PLC nel carcinoma mammario



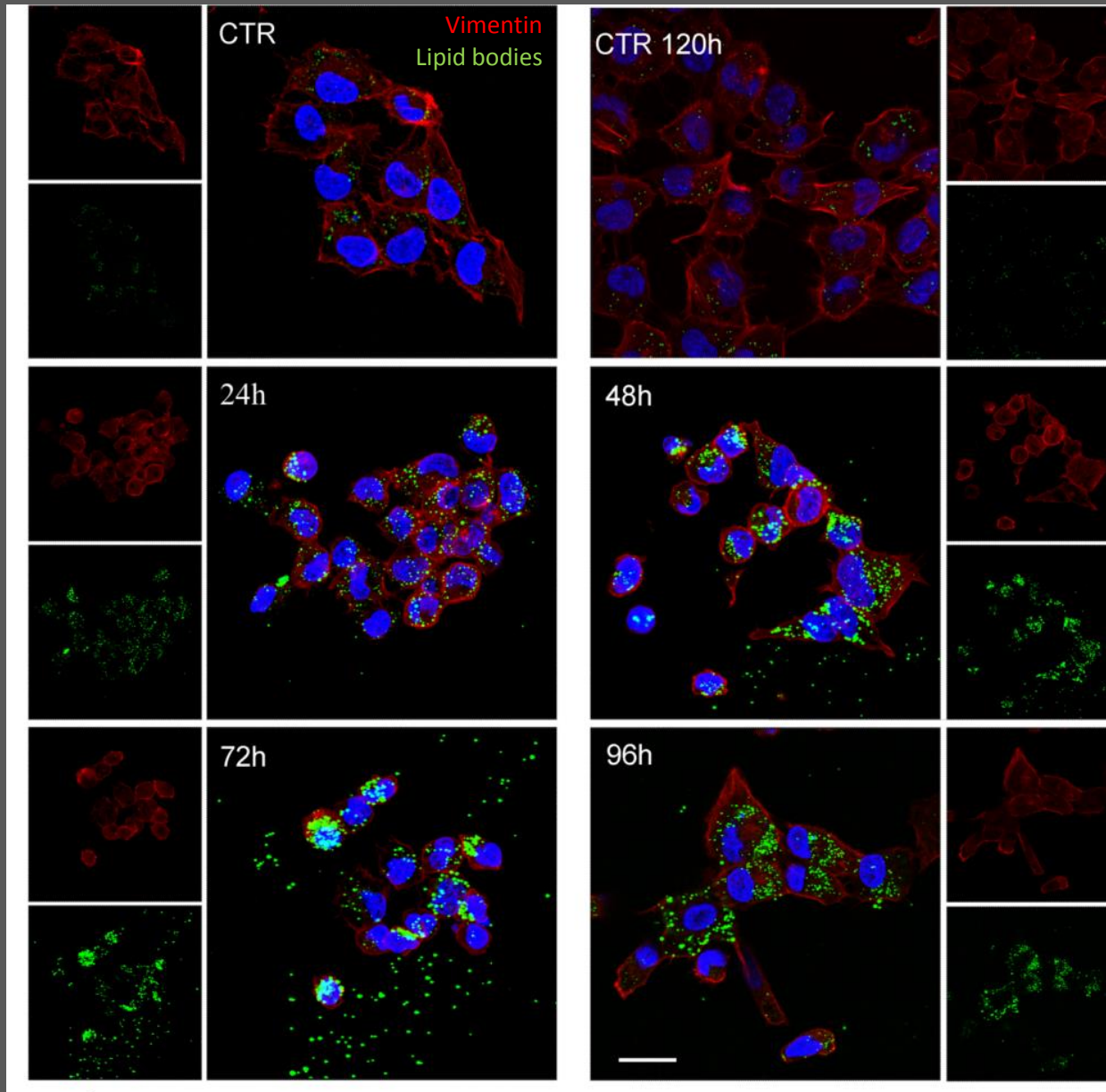
Singola  
sezione  
ottica



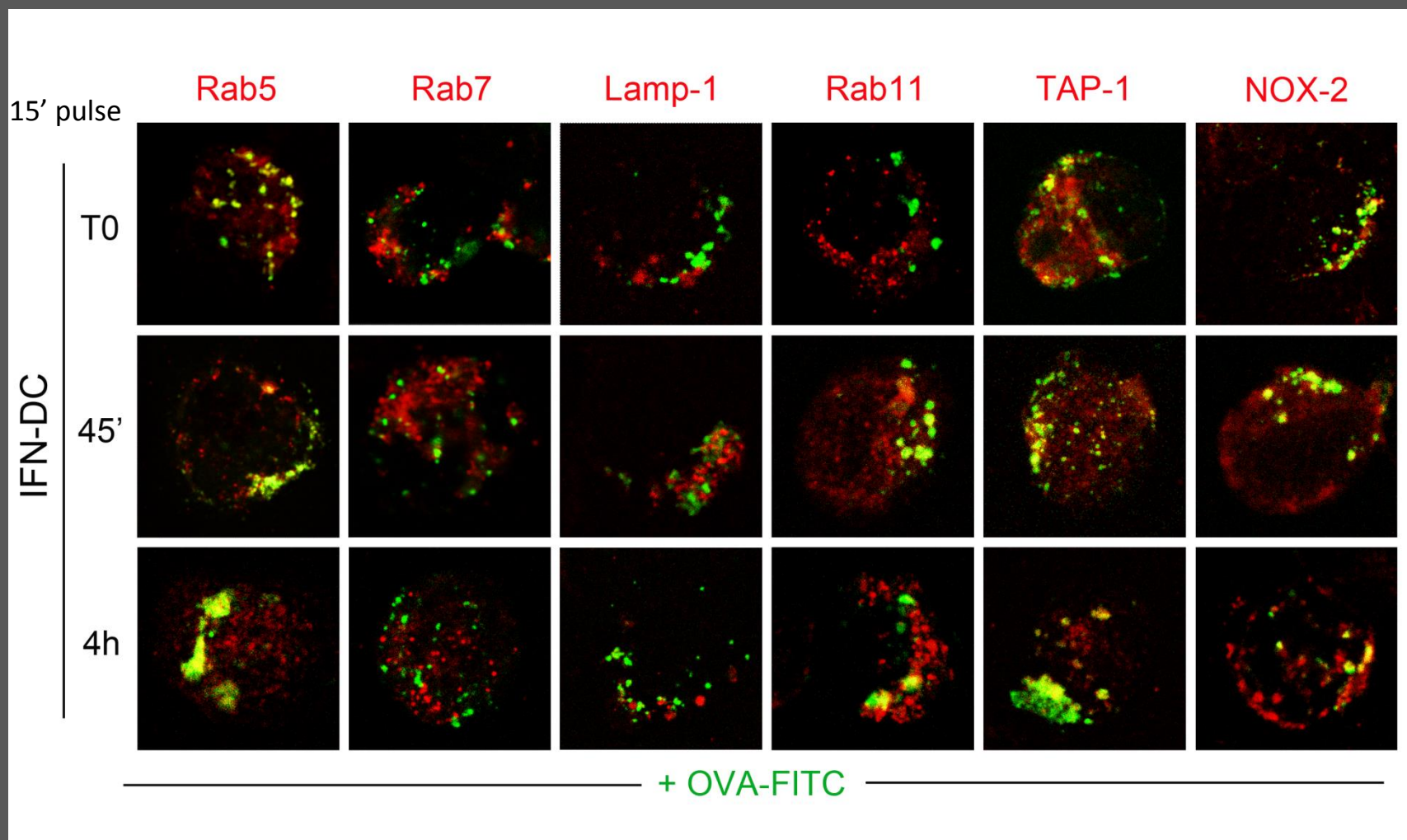
# Traffico intracellulare della PC-PLC nel carcinoma mammario



# PC-PLC nel differenziamento del carcinoma mammario

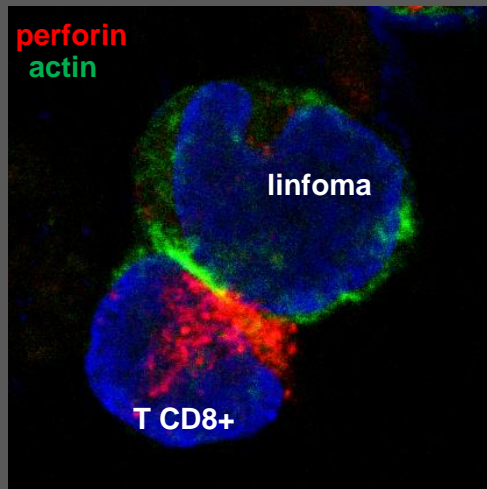
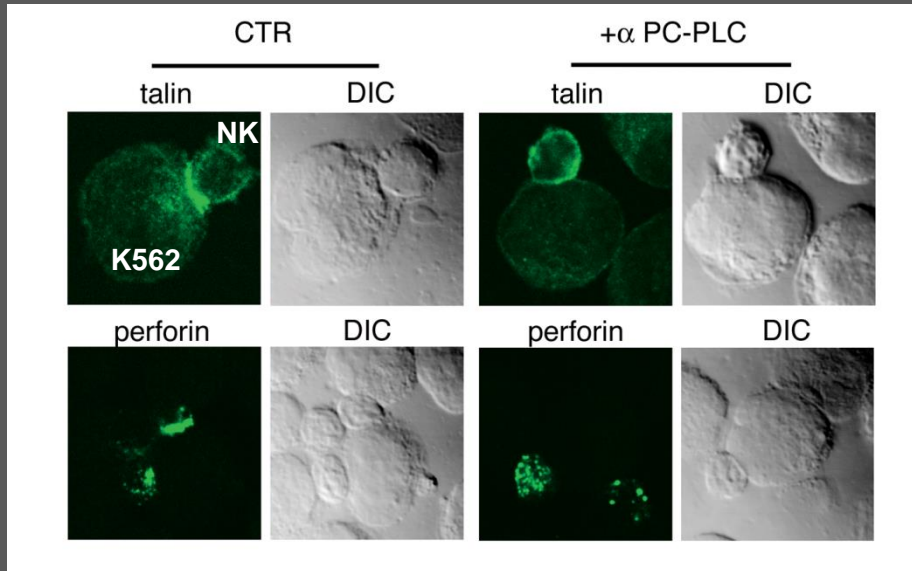


# *Uptake e traffico intracellulare dell'ovalbumina in cellule dendritiche*

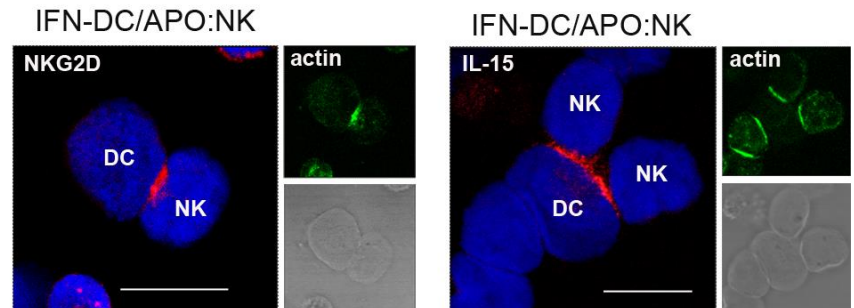
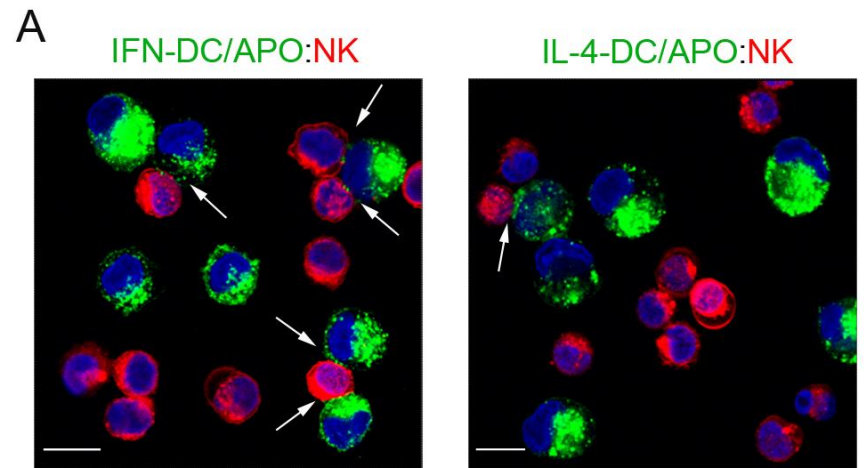


# Studio delle sinapsi immunologiche

## Sinapsi citolitiche

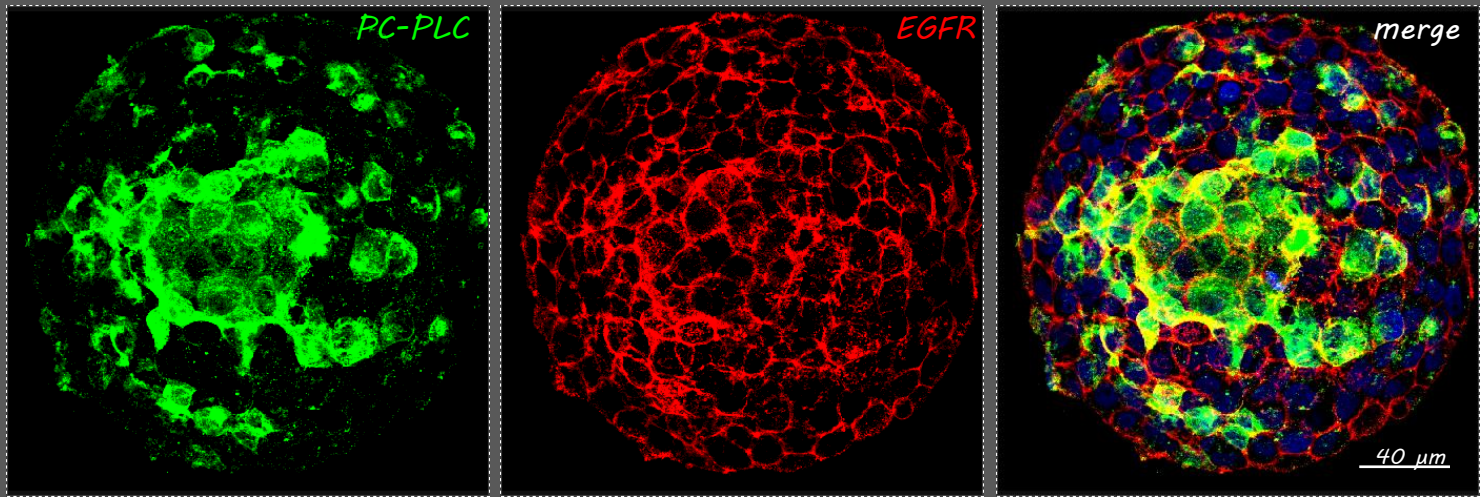


## Sinapsi immunoregolatorie



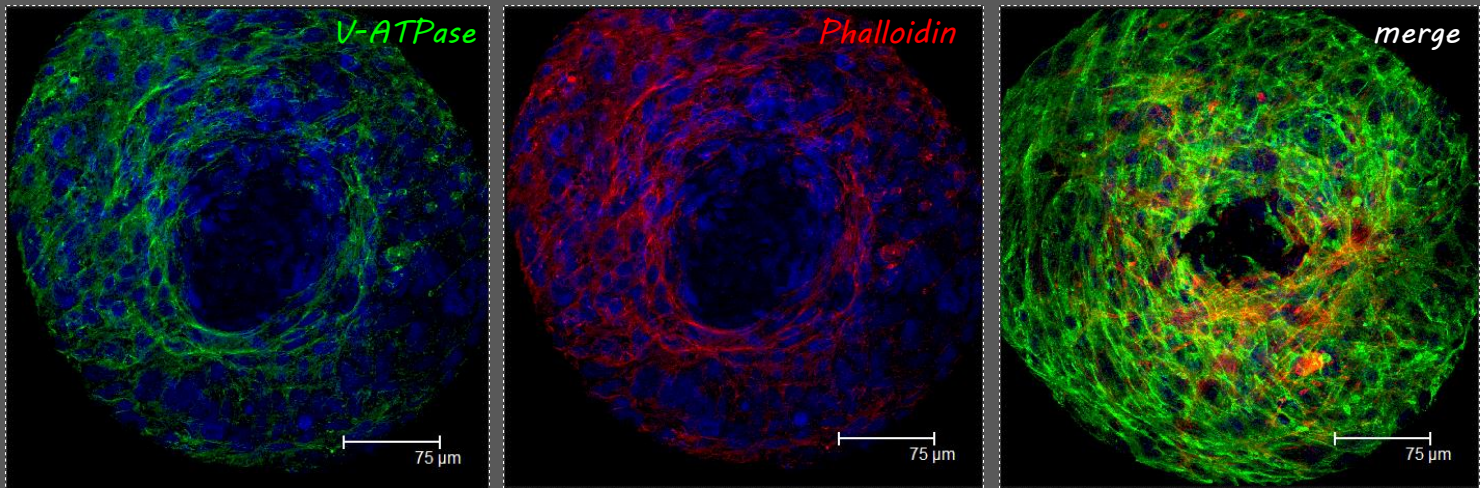
# Ricostruzioni tridimensionali di strutture cellulari

Spheroids CSCs



Cecchetti S et al, PlosOne 2015

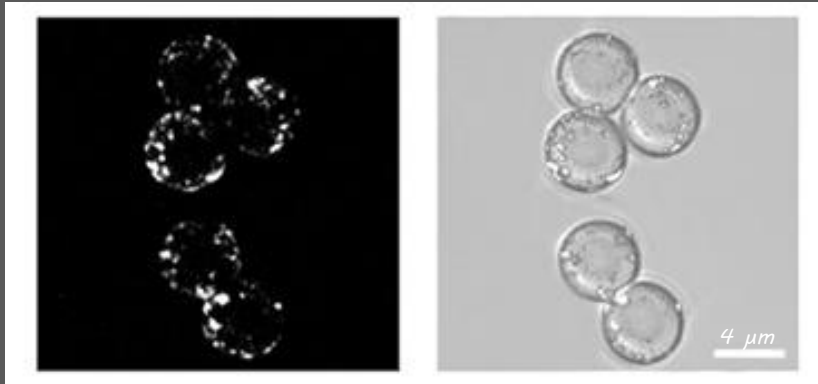
Sphere MSC



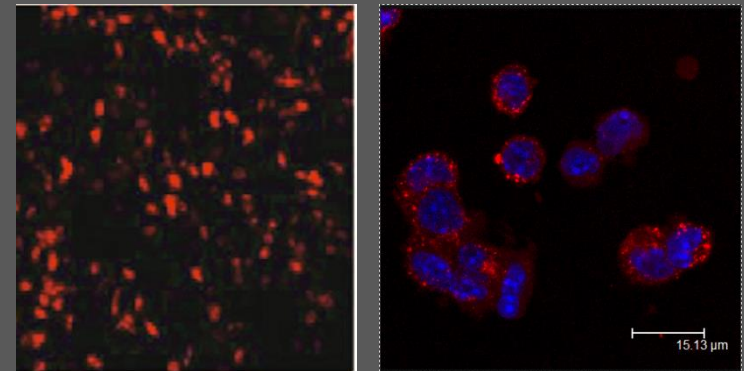
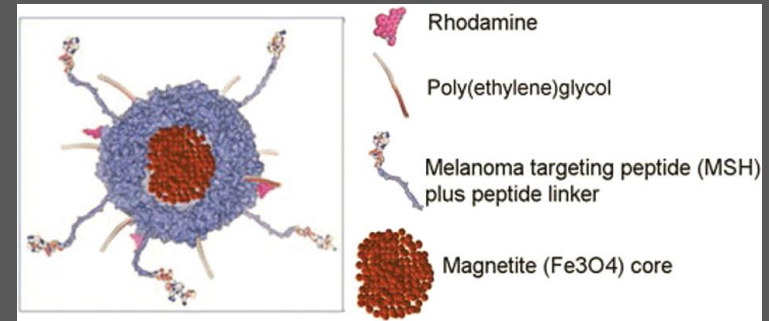
Lugini L et al, Oncotarget 2016

# Studio di nanovescicole e nanoparticelle

## Exosomi delle Natural Killer

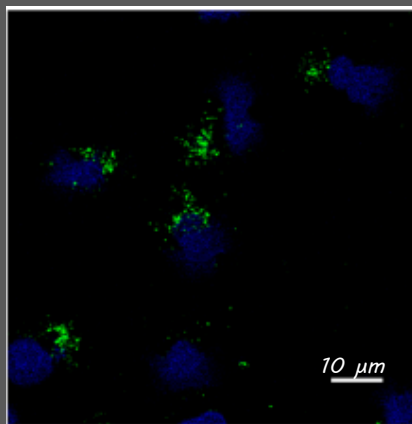


Lugini L, Cecchetti S et al, *J Immunol* 2012



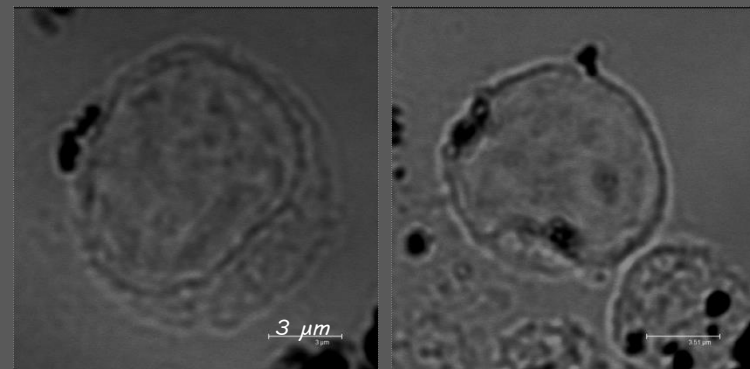
Vannucci L et al, *J Biomed Nanotech* 2015

## HIV-1-based Viral Like Particles (VLPs)



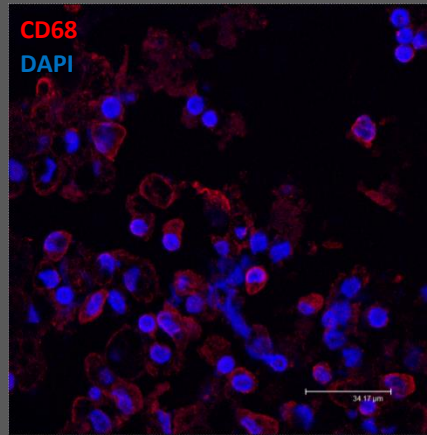
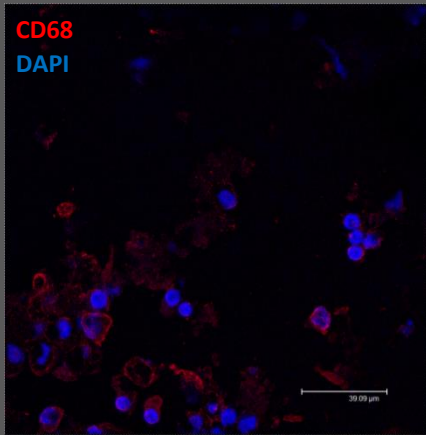
Sabbatucci M et al, *Retrovirology* 2015

## Diesel exhaust particles (Euro 4 e 5)

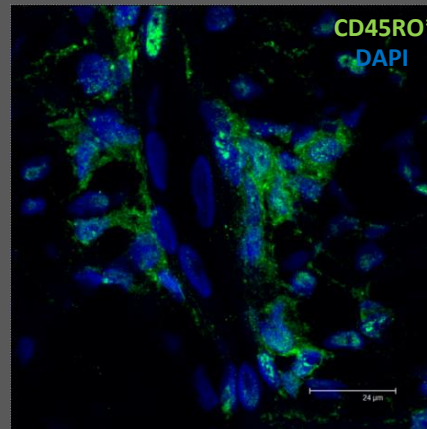
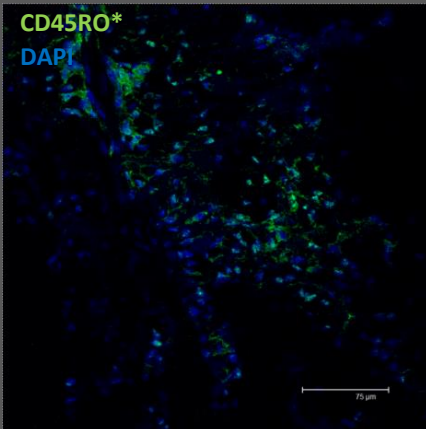
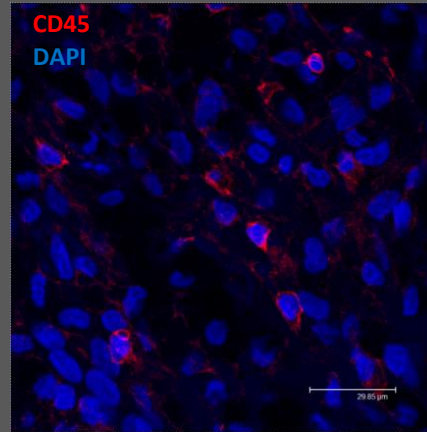
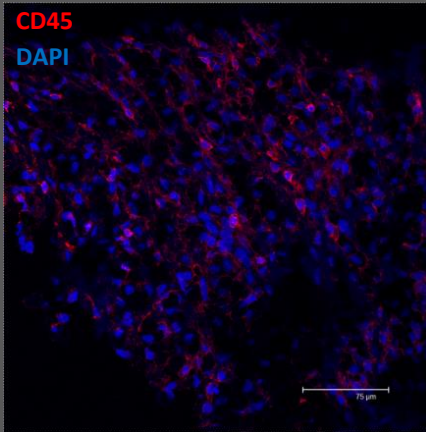


Pierdominici M et al, *Particle and Fibre Toxicology* 2014

# Analisi di tessuti bioptici

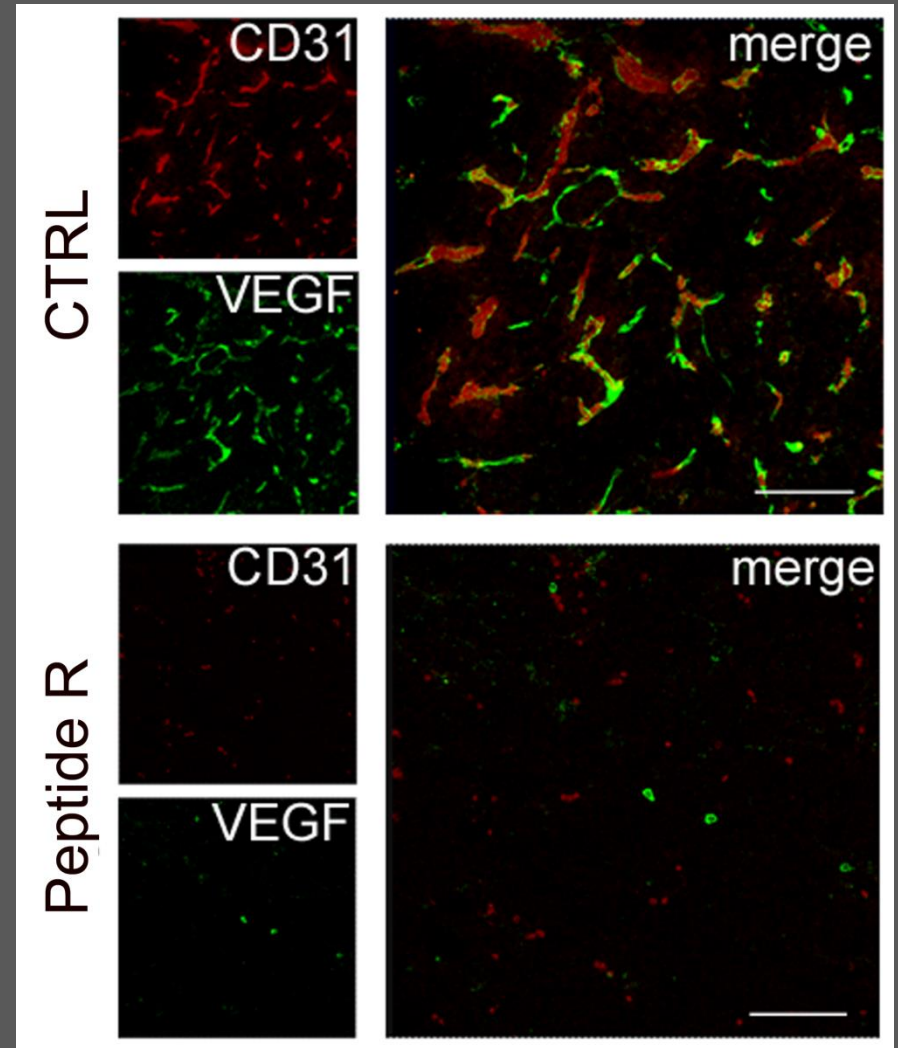
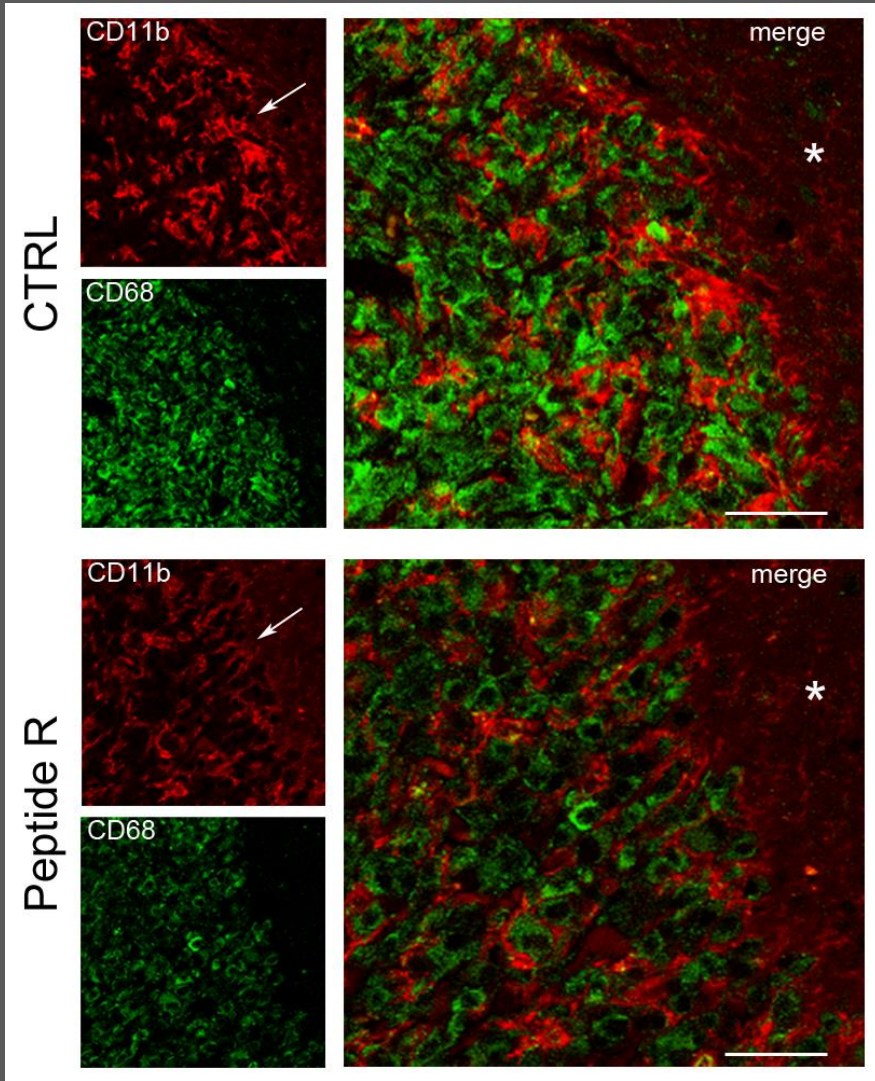


*Biopsia (melanoma, 2 linfonodi positivi alla PET, no progressione malattia)*

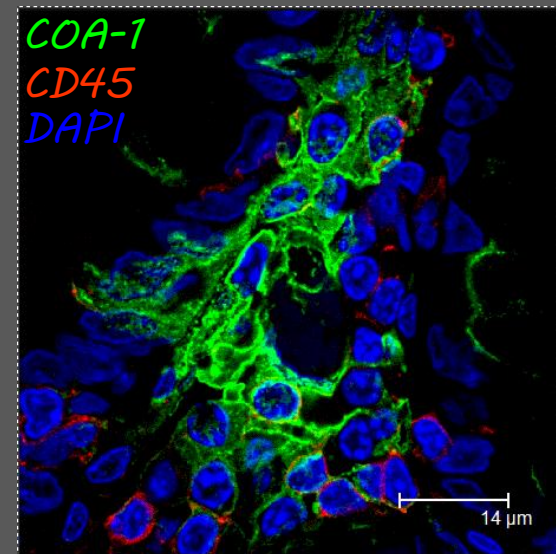
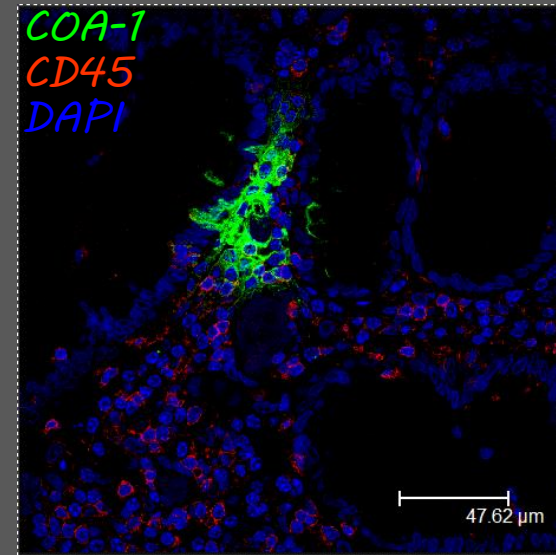
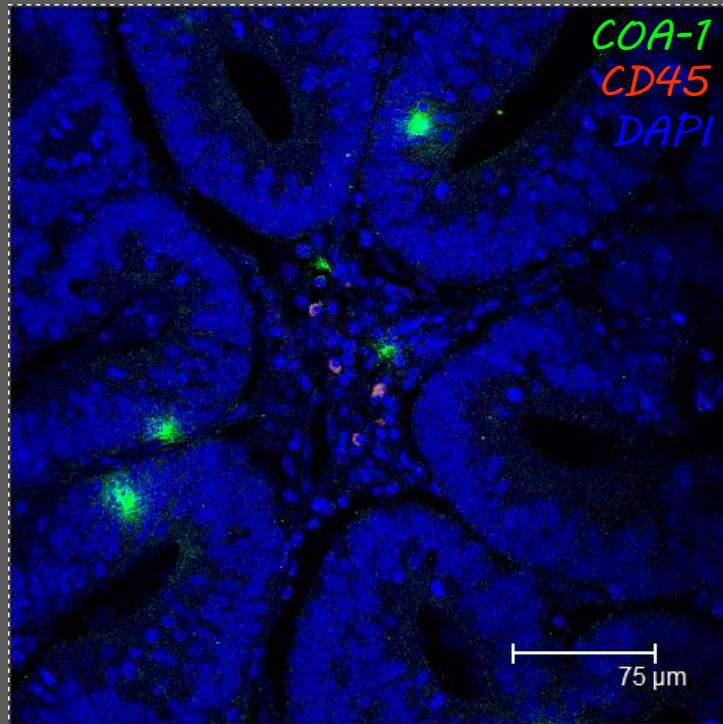




# Effetti del Peptide R sul microambiente del glioblastoma



# Analisi di Colon Cancer Tissue Array



*Sestili P, Moschella F*

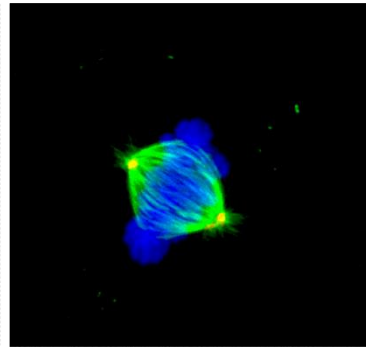
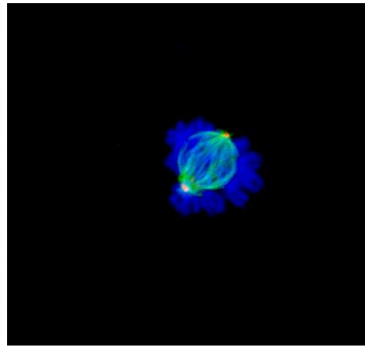
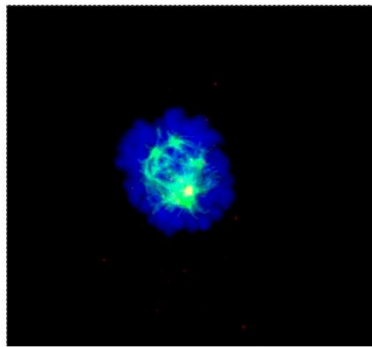
# Studio del ciclo cellulare

*profase*

*prometafase*

*metafase*

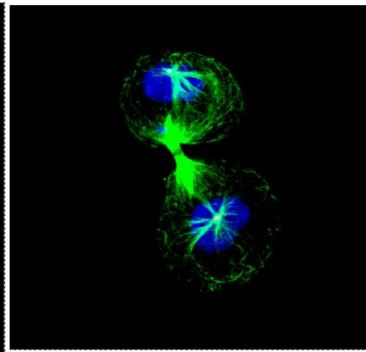
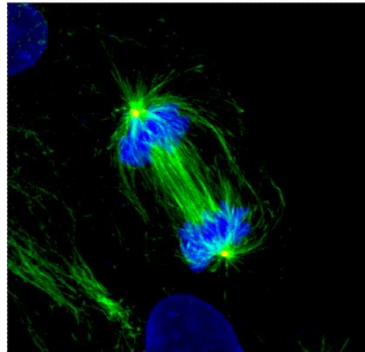
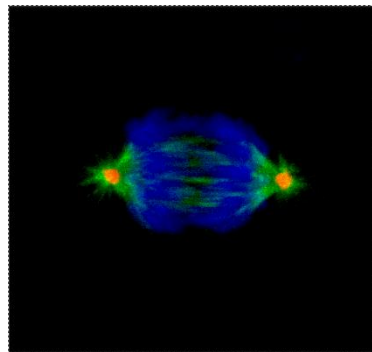
$\beta$ -tubulin  
Pericentrin  
DAPI



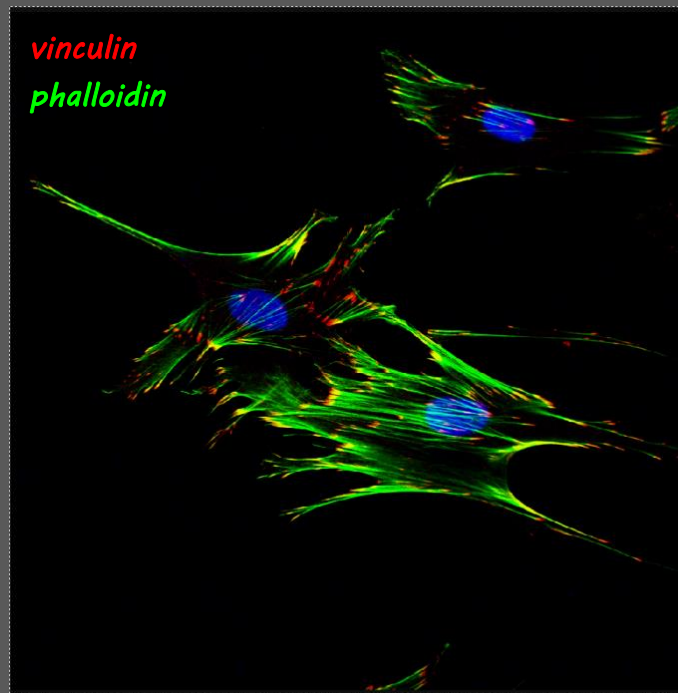
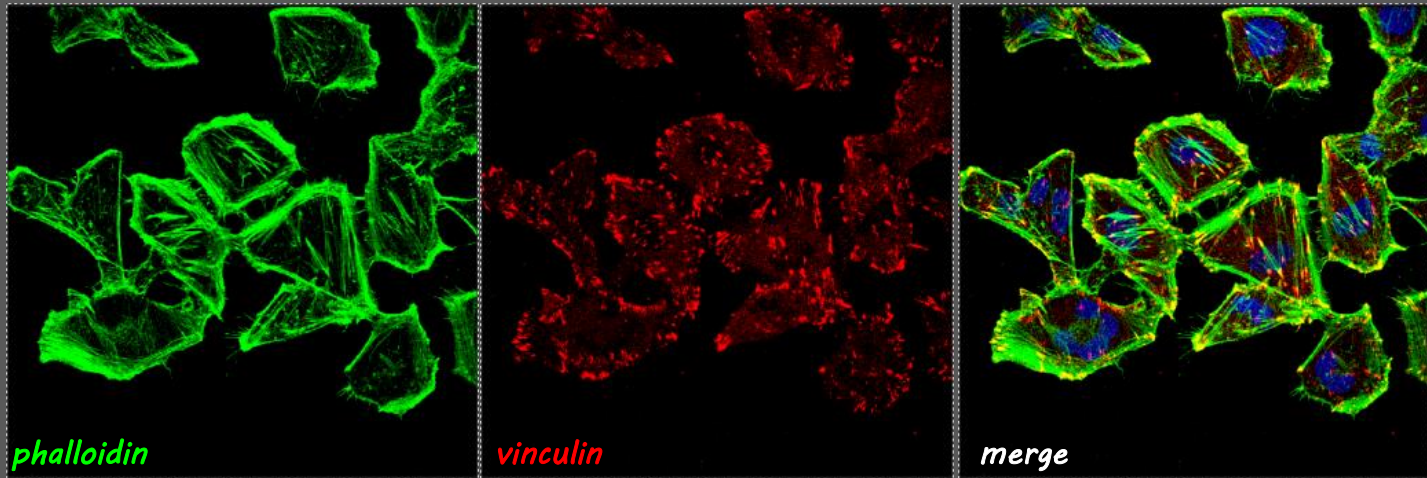
*anafase*

*telofase*

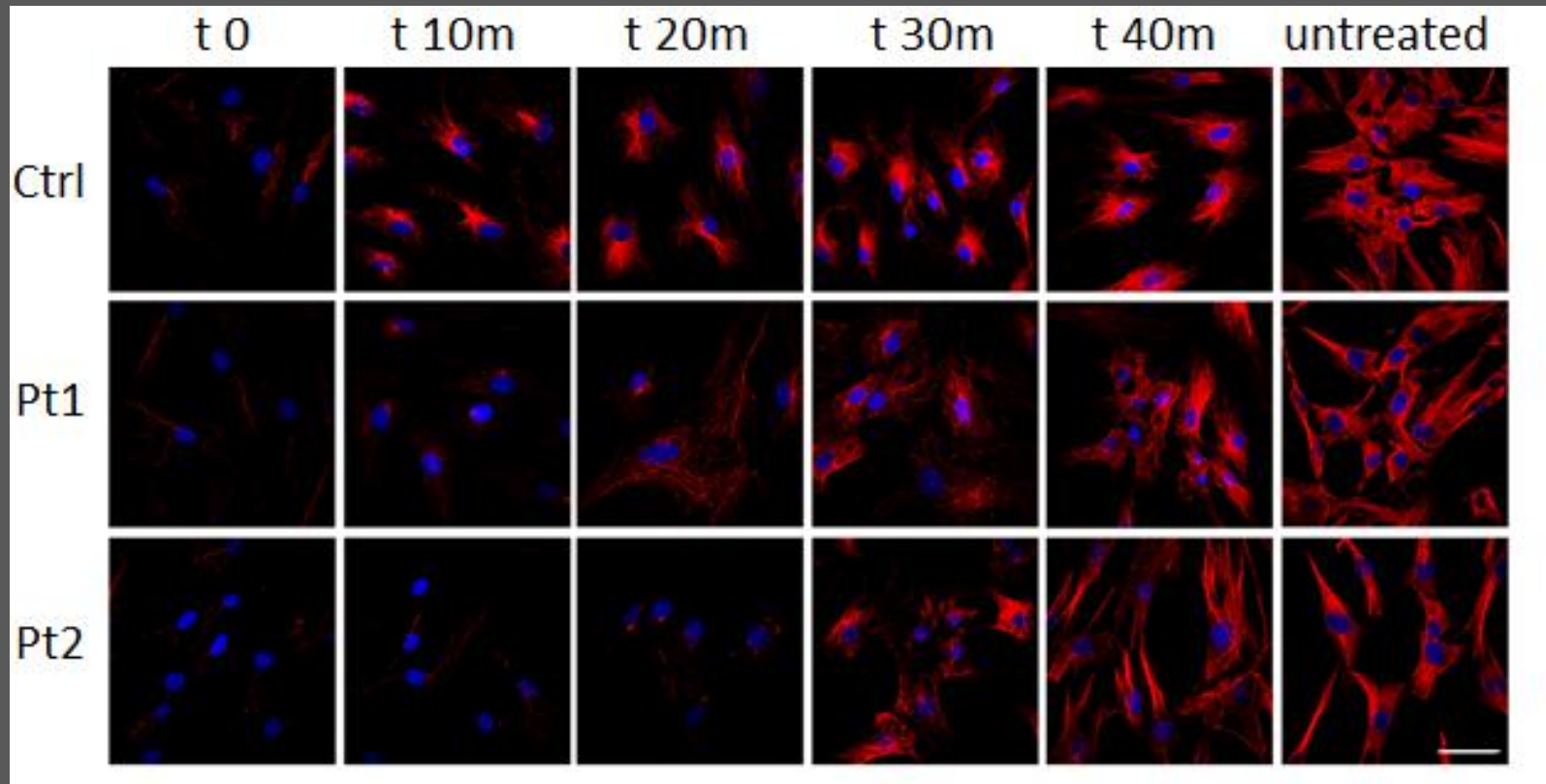
*tarda telofase*



# Analisi dei componenti del citoscheletro



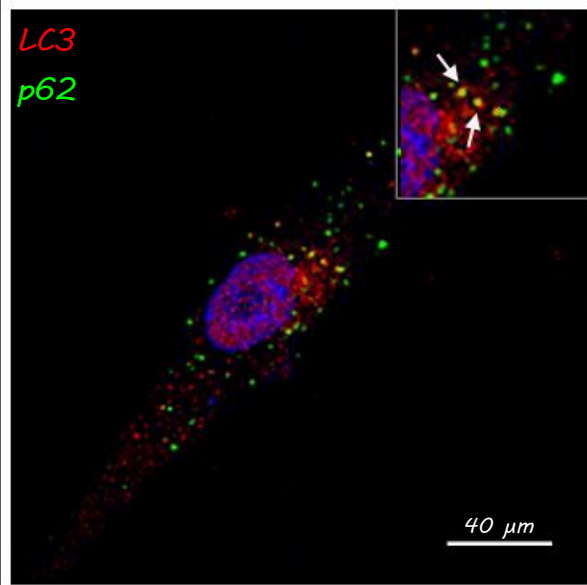
# Ripolimerizzazione della $\alpha$ -tubulina



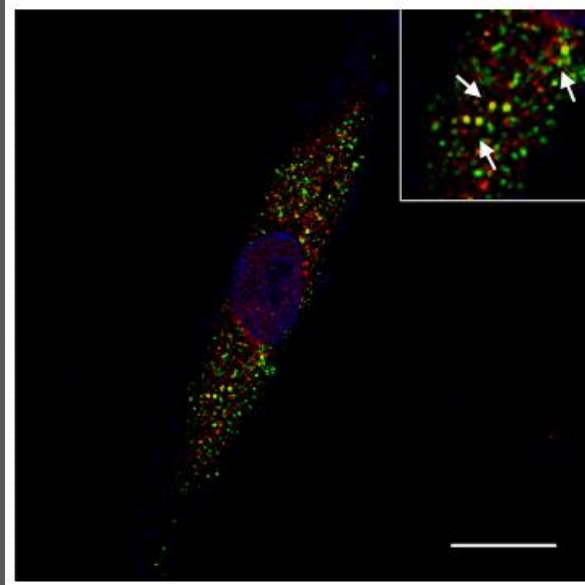
*Sferra A et al, Am J Hum Genet 2016*

# Analisi di co-localizzazioni

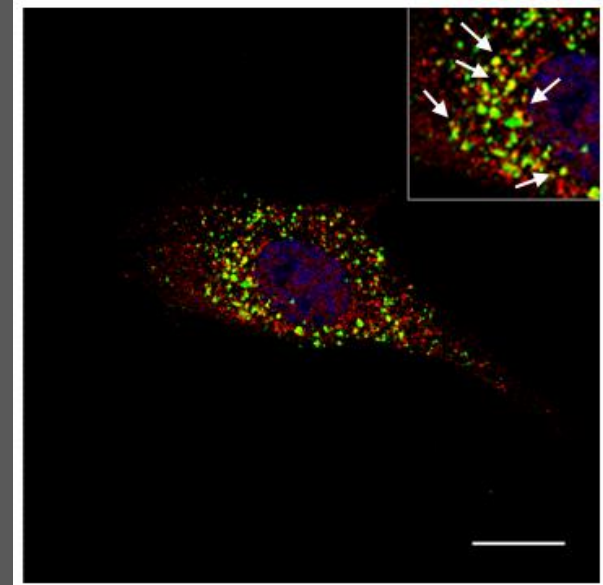
CTR



bafilomycin



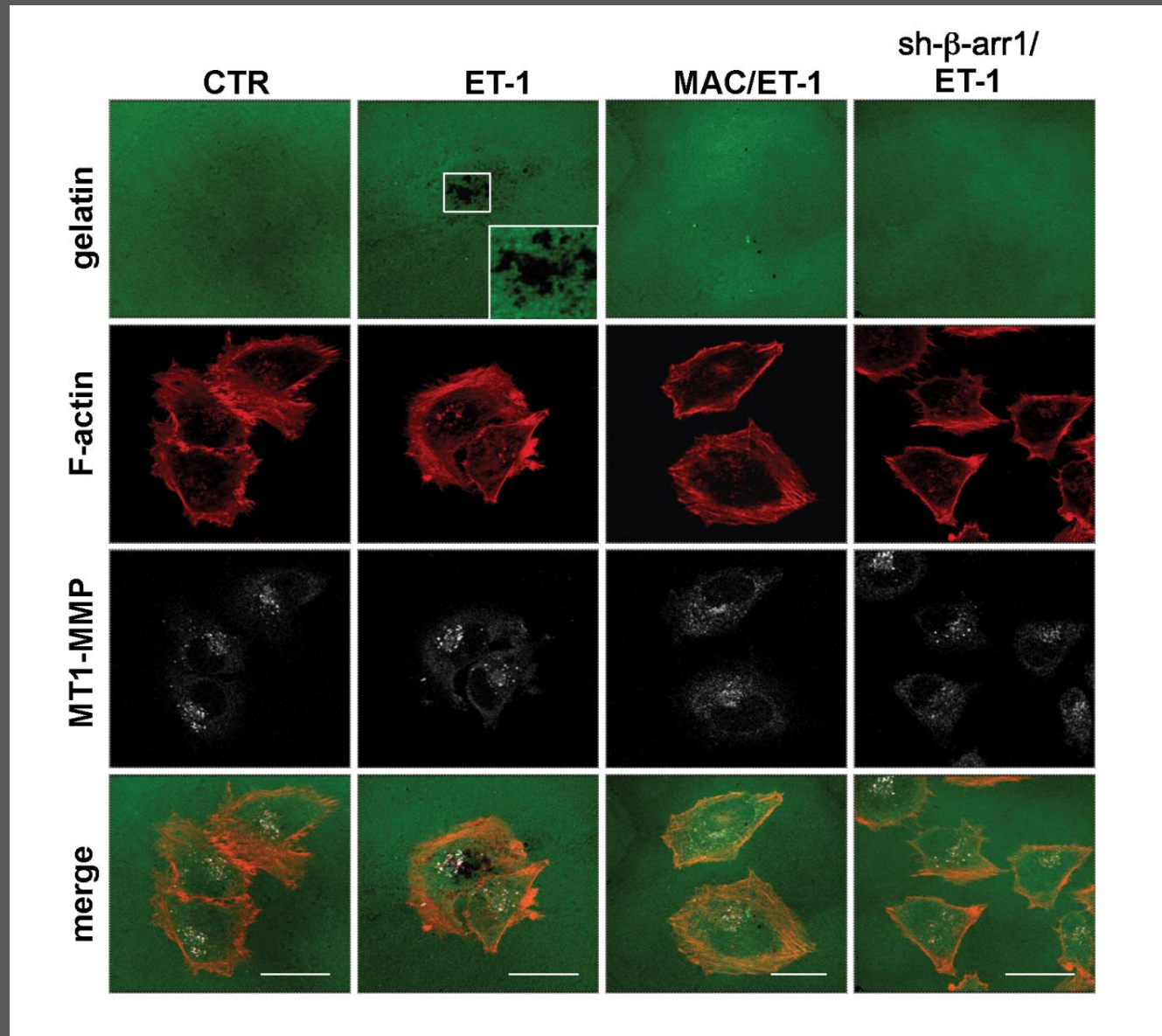
MG132 + bafilomycin



Muto V, Tartaglia M

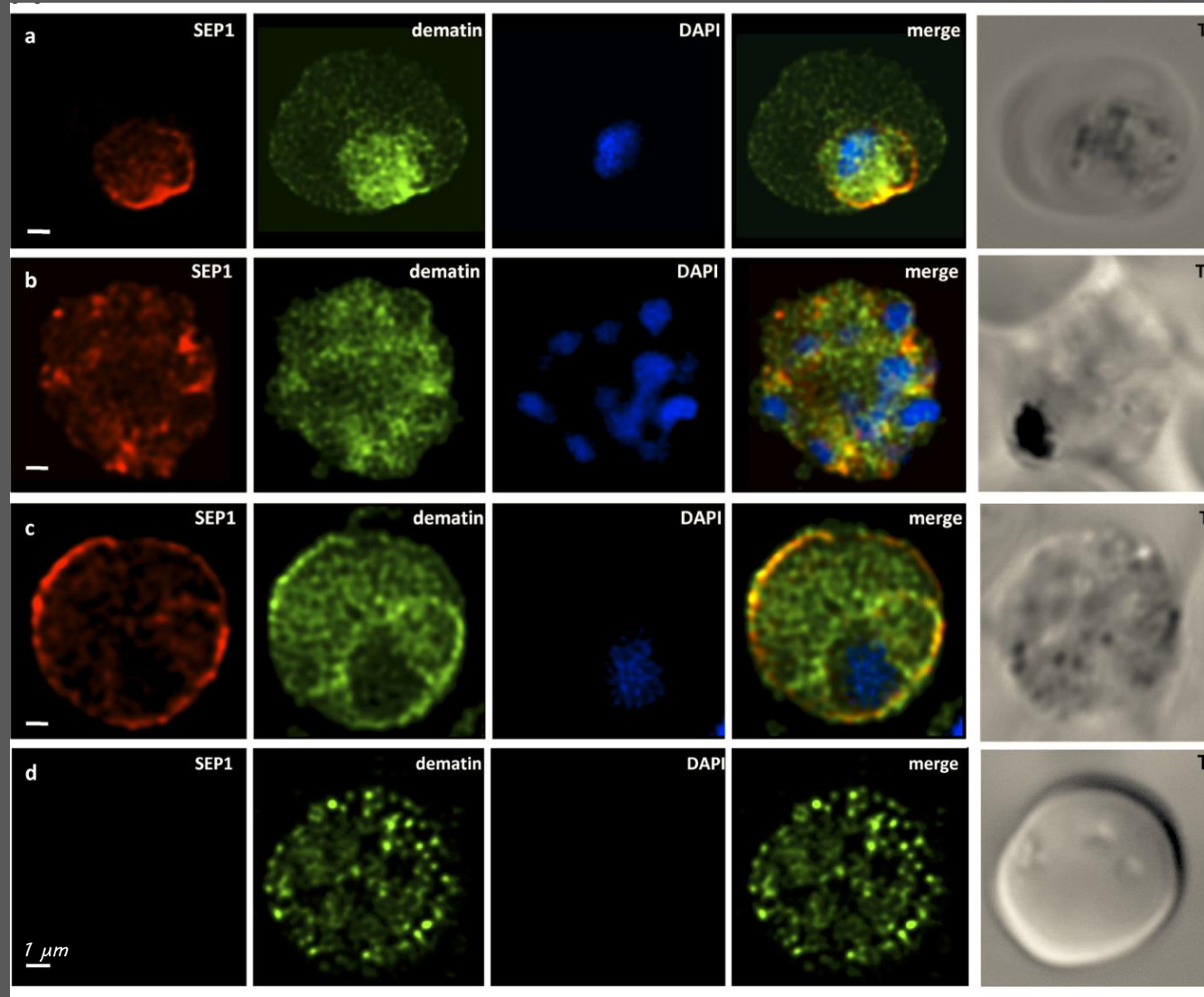
→ software

# Degradazione della matrice extracellulare



# Studio di microorganismi unicellulari (protozoi parassiti)

*Plasmodio berghei*



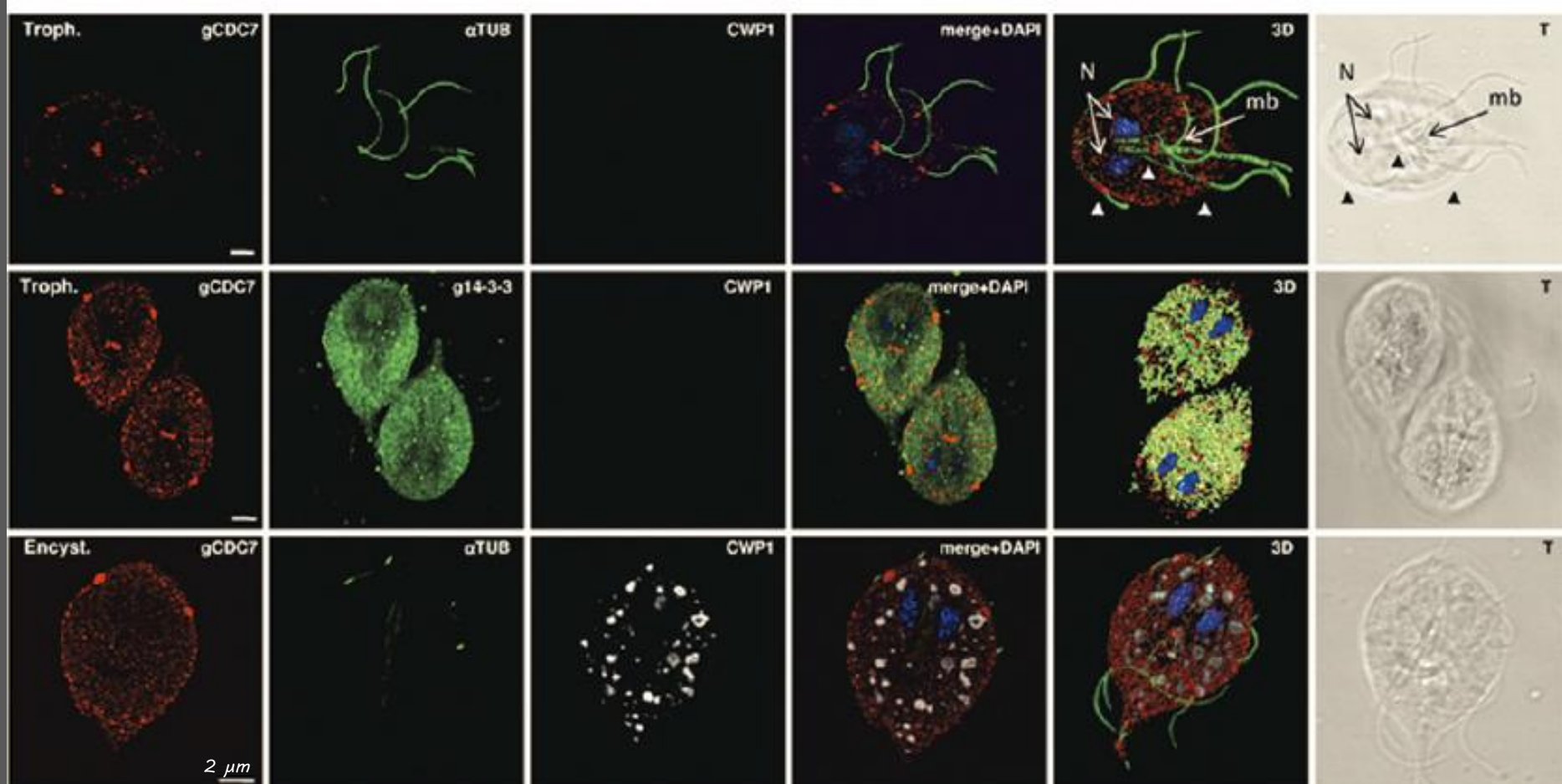
*Dematina*  
componente  
citoscheletro  
degli eritrociti  
viene  
internalizzata  
dal parassita

*SEP1* proteina  
vacuolo  
parassitoforo



# Studio di microorganismi unicellulari (protozoi parassiti)

## *Giardia duodenalis*



# Ringraziamenti

## Francesca Spadaro

### Dipartimento EOMM

Elisabetta Flex  
Viviana Cordeddu  
Emilia Stellacci  
Valentina Muto  
Marco Tartaglia  
Caterina Lapenta  
Stefano Santini  
Simona Donati  
Stefania Parlato  
Giovanna Schiavoni  
Fabrizio Mattei  
Laura Bracci  
Lucia Gabriele  
Laura Fantuzzi  
Federica Moschella  
Paola Sestili  
Federica Felicetti  
Alessandra Carè  
Sandra Gessani  
Katia Fecchi  
Massimo Sargiacomo  
Maria Ferrantini  
Enrico Proietti  
Filippo Belardelli

### Istituto Dermopatico dell'Immacolata (IDI)

Maria Cristina Failla

### Dipartimento BCN

Marina Pierdominici  
Angela Maselli  
Elena Ortona  
Luisa Minghetti

### Istituto Nazionale Tumori Milano

Ileana Bortolomai  
Silvana Canevari  
Silvia Miotti

### CNR Roma

Veronica Morea  
Pierpaolo Ceci

### Azienda Ospedaliera Sant'Andrea

Maria Christina Cox

### Reparto di Imaging Molecolare e Cellulare

Carlo Ramoni  
Franca Podo  
Luisa Paris  
Laura Mercurio  
Laura Abalsamo  
Giulia Carpinelli  
Rossella Canese  
Egidio Iorio

### Dipartimento MIPI

Marco Lalle  
Marta Ponzi  
Furio Spano  
Fabio Tosini  
Silvia Vendetti

### Dipartimento Farmaco

Luana Lugini  
Stefano Fais  
Maria Giovanna Quaranta

### Istituto Nazionale Tumori "G Pascale" Napoli

Stefania Scala  
Luigi Portella

### Università Sapienza Dipartimento di Biologia e Biotecnologie

Loretta Tuosto  
Nicla Porciello  
Paola Del Porto

### Istituto Nazionale Tumori Regina Elena

Laura Rosanò



*Grazie per l'attenzione!!!*