

Tecniche Istologiche

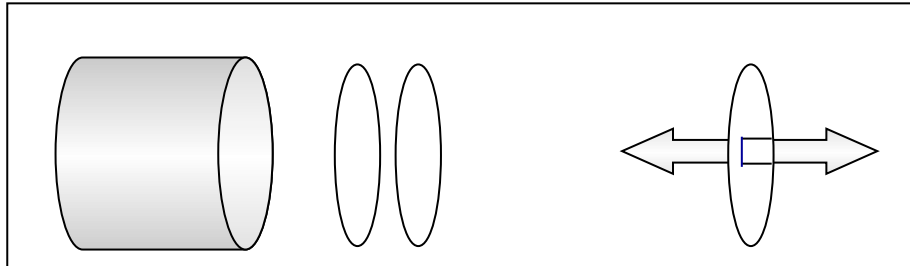
(Scienze Biologiche II° anno) CFU=3

Programma

Allestimento di preparati istologici. Prelievo dei campioni. Fissazione: tipi di fissativi e classificazione funzionale, miscele di fissazione. Disidratazione, chiarificazione, inclusione. Sezionamento: il microtomo. Colorazione: origine, struttura e classificazione chimica dei coloranti. Cromofori e auxocromi. Metacromasia. Modalità di esecuzione delle colorazioni. Colorazioni istomorfologiche: Esempi vari. Colorazioni istochimiche: esempi vari. Colorazioni immunoistochimiche. Montaggio dei vetrini. Osservazione: il microscopio ottico. Microscopia a fluorescenza. Coloranti nucleari. Immunofluorescenza. Microscopia elettronica a trasmissione e a scansione. Allestimento di preparati per la microscopia elettronica. Ultramicrotomo. Tecnica dell'immunogold.

Allestimento di preparati istologici

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



Sezionamento sottile di un campione

Inoltre, data la trasparenza del campione, il preparato sottile deve essere adeguatamente trattato con sostanze coloranti per contrastare le strutture cellulari.

I procedimenti messi in atto per la preparazione del campione possono essere, a grandi linee, così riassunti:

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

Prelievo

Per ottenere buoni preparati, è necessario che il materiale prelevato sia molto fresco. Infatti, dopo il prelievo, la fase successiva di fissazione deve avvenire nel più breve tempo possibile, per evitare le alterazioni autolitiche. Se non possibile, i preparati devono almeno essere refrigerati in attesa del trattamento con i fissativi.

In secondo luogo, è conveniente che i pezzi da fissare non superino 1 cm di diametro. Pertanto, dopo l'espianto, è necessario operare un sezionamento del tessuto o organo, utilizzando pinzette e forbici (o lame) molto affilate, cercando di evitare al massimo deformazioni o compressioni improprie.

La fase di sezionamento preliminare deve avvenire sempre in ambiente umido, per evitare l'essiccamento del campione che potrebbe produrre alterazioni nel tessuto. Quindi, il sezionamento deve avvenire a campione immerso in soluzione fisiologica, o anche al di sopra di garze preventivamente imbevute di soluzione.

Una volta sezionati, i campioni dovranno essere lavati con soluzione fisiologica per eliminare tracce di sangue o altri liquidi organici.

Fissazione

La fissazione può essere considerata l'operazione più importante della tecnica istologica, da essa dipendendo la buona riuscita di un preparato microscopico. Ha essenzialmente un triplice scopo: quello di immobilizzare i costituenti cellulari e tissutali del campione in uno stato più vicino possibile a quello di vita. Secondo, quello di consentire al preparato di sopportare gli stress fisici e chimici insiti nelle successive fasi di disidratazione, inclusione e sezionamento. Inoltre, quello di preservare i campioni dall'attacco di muffe e batteri che potrebbero proliferare, nutrendosi delle strutture non più in grado di proteggersi. Tra l'altro, alcuni tipi di fissativi devono anche mantenere inalterate le reattività enzimatiche della cellula (solo nei casi è necessario evidenziare determinati enzimi cellulari).

Esiste una varietà di sostanze utilizzate come fissativi. La scelta di un reattivo di fissazione rispetto ad un altro dipende sia dalle dimensioni del campione che dal grado di preservazione strutturale richiesto dalle caratteristiche di risoluzione del microscopio ottico usato. Ad esempio, la capacità di penetrazione di un fissativo deve essere molto elevata nel trattamento di campioni voluminosi.

Il fissativo deve essere scelto in funzione della natura dei costituenti chimici della cellula che si desiderano conservare: ad esempio, le strutture proteiche sono facili da preservare, mentre gli zuccheri semplici sono piuttosto labili.

Comunque, dal momento che la massima parte dell'architettura cellulare è costituita da *proteine*, un buon agente di fissazione per l'istologia deve essere principalmente un ottimo stabilizzatore di queste macromolecole. L'esatto meccanismo con cui le proteine vengono fissate non è completamente conosciuto. Si sa, tuttavia, che i fissativi istologici producono una coagulazione o una insolubilizzazione, associate a un certo grado di polimerizzazione, di questi costituenti organici. Infatti, i fissativi istologici convenzionali si combinano con numerosissimi gruppi funzionali delle molecole proteiche, per la formazione di legami intramolecolari, che portano alla costruzione di edifici macromolecolari insolubili nelle diverse soluzioni applicate per le successive fasi di disidratazione, inclusione e colorazione. Tra l'altro, i tessuti sottoposti a fissazione subiscono un notevole indurimento, particolarmente utile per la fase successiva del sezionamento del campione.

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

Caso particolare. Nel caso di studi più fini, la fissazione può essere attuata prima della escissione del tessuto, utilizzando il torrente circolatorio per far giungere il fissativo fino all'organo bersaglio (*perfusion*). La perfusione richiede abilità tecnica operatoria e buona conoscenza dell'anatomia dell'animale operato, in quanto è necessario individuare una arteria adatta in cui inserire l'ago attraverso il quale iniettare il fissativo.



Perfusione con fissativo per via sanguigna

Un'ultima informazione importante che riguarda la fissazione (spesso trascurata in istologia) è che per facilitare la penetrazione del fissativo nel campione, è indispensabile utilizzare flaconi o contenitori di dimensioni ampie e ponendoli in agitazione continua, per non far stationare il campione nella stessa posizione. Inoltre, il volume di fissativo da usare deve essere almeno 40-50 volte superiore al volume del campione stesso, e dovrebbe essere cambiato con fissativo fresco se la fissazione deve durare molte ore.

Nel caso si voglia conservare la reattività enzimatica del tessuto, la fissazione può essere effettuata tramite congelamento rapido del tessuto, utilizzando ghiaccio secco o azoto liquido. In questo caso, i campioni passeranno direttamente alla fase di sezionamento, saltando disidratazione ed inclusione.

Classificazione chimica dei fissativi chimici

I composti utilizzati come fissativi in istologia possono essere suddivisi in più classi chimiche:

- *Aldeidi* (es: formaldeide)
- *Alcooli* (es: etanolo)
- *Acidi organici e minerali* (es: acido acetico, tricloroacetico, picrico, cromatico)
- *Sali di metalli pesanti* (es: bicromato di potassio, cloruro mercurico)

Classificazione funzionale dei fissativi

I fissativi sono suddivisi, per le loro proprietà, in FISSATIVI PRIMARI COAGULANTI e FISSATIVI PRIMARI NON COAGULANTI.

FISSATIVI PRIMARI COAGULANTI

Etanolo ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$)

Usato a concentrazioni tra il 70-100%, è un fissativo generale piuttosto *blando*, essendo moderatamente penetrante e presenta l'inconveniente di *indurire* eccessivamente il materiale biologico sottoposto alla sua azione. Il suo effetto è quello di precipitare le proteine denaturandole, liberare i lipidi legati a proteine ed annullare quasi totalmente la reattività enzimatica. Può essere usato in miscele con formaldeide o acido acetico.

Cloruro di mercurio (HgCl_2)

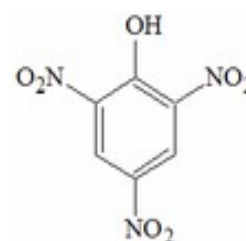
Molto tossico, è presente in soluzione acquosa al 7% ed usato anche in *miscele*, come il *SUBLIMATO ACETICO*, che contiene acido acetico 1%. E' un eccellente stabilizzatore delle proteine, penetra rapidamente ma poco profondamente, è usato per campioni piccoli di dimensioni. E' un forte ossidante perché l'anione HgCl_2^- , liberatosi dall'idrolisi, si lega ai gruppi NH_2 ed SH delle proteine, formando ponti crociati. Altera lievemente il citoplasma e la morfologia di alcuni organuli.

Triossido di cromo (CrO_3)

Usato in soluzione acquosa 0,5-1 %, in cui si formano acido cromico (H_2CrO_4), ioni bicromato (Cr_2O_7^-) e cromato acido (HC_2O_4^-). E' il più ossidante fra i fissativi e fissa tutte le proteine bloccando i gruppi COOH , quindi impedisce in parte l'azione dei coloranti basici. Inoltre, precipita il DNA e converte gli zuccheri in aldeidi. E' scarsamente penetrante, ma viene considerato ottimo per il nucleo e cromosomi. Fa buone miscele con cloruro mercurico, tetrossido di osmio ed acido acetico, ma non con etanolo e formaldeide, con i quali reagisce.

Acido picrico (2,4,6-trinitrofenolo)

Composto esplosivo, è in forma di cristalli gialli e conferisce al campione un caratteristico colore giallo. E' usato in soluzione acquosa al 1-2 %. E' un eccellente stabilizzatore proteico, con cui forma PICRATI. Non scioglie i lipidi e non fissa i carboidrati. Non indurisce molto il tessuto, ma li coarta, per cui spesso viene usato in miscela con acido acetico, che ne previene questo effetto.



FISSATIVI PRIMARI NON COAGULANTI

Formaldeide (H-CHO)

E' il più usato, poiché possiede diverse ottime qualità per la fissazione istologica. Innanzitutto, ha un elevato grado di *penetrazione* e non provoca un indurimento eccessivo dei tessuti. Inoltre, non dissolve i lipidi ed è possibile mantenere per varie ore i preparati immersi. Allo stato naturale è un gas, ma in istologia viene usata in forma di *soluzione acquosa*, denominata *formalina*, normalmente utilizzata a concentrazioni tra 4-10%, singola o anche in miscele. Normalmente,

per la buona riuscita delle colorazioni successive, è opportuno neutralizzare la formalina usata nelle miscele aggiungendo una goccia di rosso neutro 1-2% e poi un eccesso di carbonato di calcio in polvere. E' molto tossica per le mucose nasali e per gli occhi, quindi necessita di precauzioni particolari per il suo impiego.

Tetrossido di osmio (OsO_4)

Si presenta come cristalli gialli, molto tossici. Va conservato al buio e al fresco, per prevenire la sua riduzione. Penetra molto lentamente e rende il tessuto molto friabile per il sezionamento. Fissa bene le proteine, con le quali reagisce bloccando i gruppi NH_2 , non precipita il DNA e forma un composto nero con i lipidi, quindi è molto buono per evidenziare le membrane. E' il fissativo per eccellenza della microscopia elettronica.

Bicromato di potassio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$)

Usato sempre in *miscele*, è in forma di cristalli giallo-rossi e si usa in soluzione al 10%. Produce gli stessi ioni prodotti dal triossido di cromo. Migliora la stabilizzazione del citoplasma ed ha una spiccata affinità per i fosfolipidi di membrana (si lega al gruppo fosfato), rendendo i fosfolipidi insolubili ai solventi per i lipidi, quindi è molto usato per fissare i mitocondri. Dopo la fissazione con bicromato, i lavaggi devono essere molto prolungati per evitare la formazione di precipitati insolubili di ossido di cromo.

Acido acetico ($\text{CH}_3\text{-COOH}$)

Usato sempre in *miscele*. Viene chiamato "*glaciale*", perché solidifica a 17 °C. Ha un eccellente potere di penetrazione; fissa molto bene i nuclei, ma non coagula le proteine, né fissa o solubilizza i lipidi. Non indurisce il tessuto.

Tra le *miscele di fissazione*, ricordiamo il Liquido di Bouin, il Liquido di Carnoy ed il Liquido di Zenker:

Liquido di Bouin

E' uno dei migliori e più utilizzati fissativi. Possiede un'elevatissima capacità di penetrazione ed è particolarmente indicata nel trattamento di pezzi anche voluminosi. E' una miscela di *acido picrico*, *acido acetico* e *formalina*.

Liquido di Carnoy

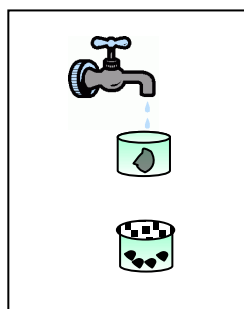
E' una miscela di *etanolo*, *cloroformio* ed *acido acetico*. Si usa per fissare cellule isolate.

Liquido di Zenker

E' una miscela molto penetrabile di sublimato corrosivo 5%, bicromato di potassio 2,5% solfato di sodio 1%.

Lavaggio

Dopo la fissazione, i preparati devono essere, nella massima parte dei casi, (tranne quelli fissati in fissativi contenenti acido picrico e bicromato di potassio) lavati accuratamente in acqua corrente. L'operazione viene eseguita per eliminare l'eccesso di fissativo che, non avendo interagito con i componenti tissutali, è rimasto all'interno dei campioni e potrebbe interagire con i reattivi impiegati nelle fasi successive, in particolare con le sostanze usate per la colorazione dei campioni. Il lavaggio dei campioni di grandi dimensioni può essere effettuato mantenendo i pezzi all'interno del contenitore ove si è effettuata la fissazione ed esponendoli direttamente al flusso di acqua corrente.



Lavaggi post-fissazione

I campioni più piccoli non possono seguire lo stesso procedimento: prima di essere sottoposti al lavaggio sotto acqua corrente, dovranno infatti essere preventivamente inseriti in appositi contenitori provvisti di piccoli fori, per impedire che si perdano.

Disidratazione

Avvenuta la fissazione, il destino dei campioni biologici sarà quello di essere sezionati finemente per ottenere delle “fettine” molto sottili che saranno poste sui vetrini per l’osservazione al microscopio ottico. Per tale ragione, prima di essere sezionati, i campioni devono essere infiltrati con opportuni mezzi (paraffina, resine varie) che, solidificando, includono il materiale nel loro interno, consentendo il sezionamento del campione. Queste sostanze includenti hanno però lo svantaggio di essere *idrofobiche* e quindi non riuscirebbero ad infiltrare i campioni che contengono acqua nei tessuti e nelle cellule. Quindi, è necessario procedere ad una disidratazione dei campioni, per sostituire l’acqua con un mezzo che sia miscibile con le sostanze di inclusione.

La disidratazione può essere effettuata con un qualsiasi agente chimico anidro, capace di sostituire l’acqua presente nei tessuti, in grado di non provocare eccessiva coartazione dei campioni e con la proprietà di essere solubile e miscibile con i solventi intermedi che devono essere applicati prima dell’infiltrazione in paraffina. Da un punto di vista pratico, è comunque l’etanolo ad essere maggiormente utilizzato, con l’applicazione di soluzioni a concentrazione crescente di questo disidratante in acqua; i tempi di permanenza sono variabili a seconda delle dimensioni del campione (comunque da non superare in totale le 2-3 ore):

- *etanolo 70%*
- *etanolo 80%*
- *etanolo 90%*
- *etanolo 95%*
- *etanolo 100%* (effettuando 2 cambi)

Normalmente, non è consigliabile far permanere il preparato per tempi lunghi nella stessa soluzione, è preferibile fare diversi cambi di pochi minuti con la stessa soluzione di etanolo. Un’eccessiva esposizione all’ etanolo, infatti, potrebbe provocare un notevole indurimento del campione, che influenzerebbe la successiva fase di sezionamento. Inoltre, è consigliabile mantenere i contenitori in agitatori rotanti, in modo da rendere omogenea la disidratazione.



Chiarificazione (o diafanizzazione)

Dal momento che l'etanolo, ora contenuto nel preparato dopo la disidratazione, non è miscibile con la sostanza che dovrà infiltrarlo per la fase di inclusione (paraffina), occorre sostituire l'etanolo con un solvente intermedio, che sia miscibile sia con l'etanolo che con la paraffina. Questo processo prende il nome di *chiarificazione*, in quanto la procedura rende molto trasparenti i campioni. Gli agenti di chiarificazione più utilizzati sono lo xilolo e il toluene, ed in minor misura il benzolo e il cloroformio.

Tutte queste sostanze sono molto tossiche per l'operatore, quindi vanno prese le adeguate misure di sicurezza.

xilolo: sostituisce rapidamente l'etanolo ed indurisce fortemente.

toluene: sostituisce rapidamente l'etanolo ed indurisce mediamente.

benzolo/cloroformio: sostituiscono lentamente l'etanolo, induriscono poco.

Nella pratica comune, si immergono i campioni (disidratati in etanolo) in:

- *etanolo/xilolo (50%-50%)*
- *xilolo puro*

Inclusione

L'inclusione è la procedura che consente di preparare il tessuto in modo tale da ottenerne sezioni di spessore adatto al tipo di osservazione (e quindi al tipo di microscopio) cui saranno sottoposte: 10-40 µm nel caso della microscopia ottica.

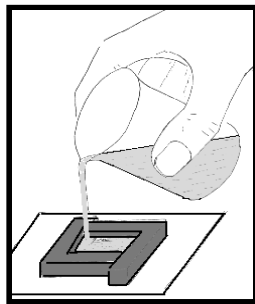
Perché sia possibile ottenere le sezioni, è necessario che il tessuto abbia una consistenza adatta, e questo è, appunto, lo scopo dell'inclusione. La massima parte dei campioni utilizzati nella tecnica istologica viene inclusa, dopo la fissazione, disidratazione e chiarificazione, in un mezzo solido che ne permette il sezionamento. La sostanza più utilizzata in microscopia ottica per la preparazione dei blocchetti di materiale incluso è la paraffina. La paraffina è una miscela di idrocarburi saturi ad elevato peso molecolare, insolubili sia in acqua che in etanolo (per questo occorre la fase di chiarificazione con xilolo).

La paraffina è allo stato solido a temperatura ambiente, ma diventa liquida se portata a temperature superiori al suo punto di fusione, tra i 35°C e i 70°C, generalmente 56-58 °C. La paraffina, prima dell'uso, deve essere sciolta a temperatura, e poi filtrata per eliminare eventuali impurità.

I passaggi di infiltrazione, da effettuare alla temperatura di 56-58 °C, sono i seguenti:

- *xilolo /paraffina (50%-50%)*
- *paraffina pura* (con 2-3 cambi)

I tempi minimi di incubazione sono di tre ore; tempi massimi non ce ne sono, poiché il campione, una volta infiltrato dalla paraffina, non si deteriora. Ad infiltrazione completata, i campioni vengono immersi in contenitori sagomati in cui viene fatta colare paraffina liquida, ed il tutto viene lasciato solidificare a temperatura ambiente. Quindi, il blocchetto solido viene estratto dal contenitore e processato per la successiva fase di sezionamento.



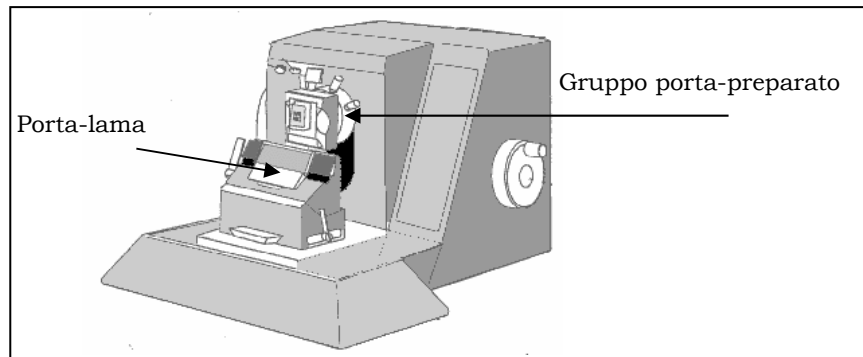
Inclusione



Porta-inclusioni

Sezionamento

Il sezionamento del tessuto viene effettuato utilizzando apparecchiature speciali, i microtomi. Il tipo più diffuso, utilizzato per la preparazione di sezioni per la microscopia ottica, è il microtomo a rotazione.

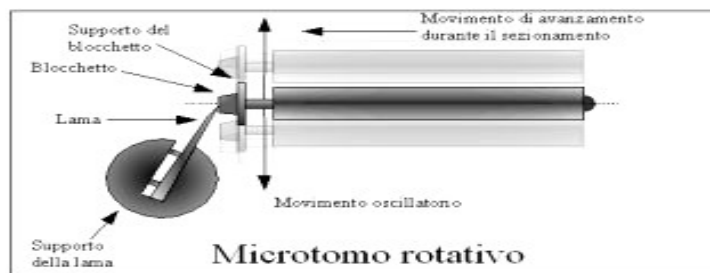


Microtomo a rotazione

I microtomi rotativi sono, in genere, apparecchi semplici, meccanici, dotati di poche, ma cruciali, regolazioni. Lo strumento può essere considerato costituito da tre elementi fondamentali: un gruppo porta-preparato, un dispositivo porta-lama e un corpo che li supporta entrambi. Il principio di funzionamento vede la presenza di un *braccio oscillante* su cui si monta il blocchetto di paraffina contenente il tessuto. Il blocchetto, ad ogni oscillazione, scivola contro una lama di acciaio molto affilata, sistemata con un angolo adatto a sezionare il blocchetto senza causargli eccessive compressioni.

Il blocchetto contenente il tessuto va *sagomato* con una lametta (a formare una sezione di forma trapezoidale) e fissato al supporto semplicemente facendo fondere leggermente la paraffina sul fondo del blocchetto in modo che, indurendosi, aderisca al supporto.

Il movimento basculante del braccio del microtomo è azionato da una manovella ed è il regolare movimento di questa che causa anche il progressivo avvicinamento del blocchetto alla lama. Ad ogni passaggio, il blocchetto viene avvicinato alla lama di una distanza pari allo spessore della sezione desiderato. Il meccanismo di avanzamento può essere impostato da una manopola su spessori predeterminati, che possono variare da 1 a 50 μm , con intervalli di 1 μm .

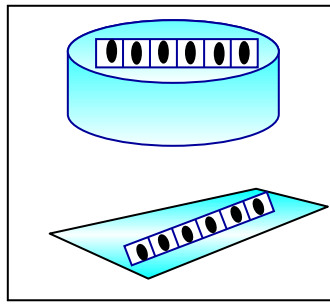


L'affilatura perfetta e la perfetta pulizia della lama sono, ovviamente, requisiti indispensabili per ottenere buone sezioni. Oggi spesso sono utilizzate delle lame “usa e getta” che offrono sempre un filo nuovo e perfetto al taglio. La particolarità del microtomo rotativo è quella di formare dei “nastri” di sezioni. Ogni sezione successiva, infatti, scorrendo sul filo della lama, allontana la sezione precedente. Il bordo di base della nuova sezione aderisce al bordo superiore della sezione precedente e, a causa del leggero riscaldamento dovuto all'attrito sulla lama, le due sezioni aderiscono fra loro. Con un po' di pratica, ed un ritmo costante, né lento né troppo veloce, nel sezionamento, si possono ottenere lunghi nastri di sezioni poste in serie ordinate.



Il nastro ottenuto con il microtomo può essere lungo da pochi centimetri a qualche decina. Non va toccato direttamente, perché il calore delle dita potrebbe sciogliere la paraffina. Man mano che cresce durante il taglio, il nastro dovrà essere retto utilizzando un pennellino. Ottenuto un numero di sezioni soddisfacente, sarà necessario prelevare l'intero nastro e appoggiarlo in una vaschetta contenente acqua distillata riscaldata (40-45°C), che distenderà il nastro. Quindi si raccolgono le sezioni sul vetrino portaoggetto semplicemente immergendo quest'ultimo nell'acqua al di sotto delle sezioni, e facendolo riemergere in posizione obliqua.

Il vetrino sarà posto ad asciugare su una piastra riscaldata e poi in un termostato a 30-40°C.



Raccolta delle sezioni su vetrino

I campioni fissati per congelamento rapido non saranno sottoposti a disidratazione ed inclusione, ma montati direttamente in un microtomo particolare detto *criostato*, un microtomo rotativo posto in una camera raffreddata uniformemente tra 0 °C e -45°C, che consente di sezionare il tessuto, non fissato, mantenendolo tutto il tempo alla temperatura di congelamento.

Colorazione

Vengono definite “coloranti” in ambito istologico, citologico ed ultrastrutturale quelle sostanze chimiche che si legano a componenti cellulari aumentandone il *contrasto*. Nella microscopia ottica l'effetto di risalto è dato da una caratteristica colorazione delle strutture che rivelano affinità al colorante utilizzato.

Caso particolare. Alcuni coloranti vengono utilizzati direttamente su cellule vive (e quindi non sottoposte a preparazione istologica), per studiare direttamente al microscopio la localizzazione di determinate strutture cellulari o identificare particolari funzioni. Questi sono detti coloranti vitali. Sono incorporati direttamente dalle cellule e si vanno a localizzare nelle strutture verso cui sono preposti. Ad esempio: il *Trypan Bleu* (usato molto per identificare i macrofagi e per studiare la fagocitosi); il *Verde Janus* (per localizzare i mitocondri); il *Blu di Metilene* (per localizzare le fibre nervose).

La colorazione è un procedimento che aumenta il contrasto presente tra diverse strutture cellulari, tale da permetterne il riconoscimento nelle sezioni istologiche.

Scopo della colorazione

Il termine “colorazione” è anche usato in modo improprio anche in campo ultrastrutturale (per indicare i procedimenti con cui si rendono elettron-opache le strutture in *microscopia elettronica*) o nel campo della *microscopia a fluorescenza*

(per indicare la procedura con cui le molecole fluorescenti si legano alle strutture cellulari).

Per “*colorante*” si intende una molecola solubile e fornita di colore proprio, capace di legarsi stabilmente a substrati cellulari e tessutali. Tutti i coloranti possono essere suddivisi, per la loro origine, in:

- 1) Naturali animali (es: il carminio ricavato dalla cocciniglia)
- 2) Naturali vegetali (es: l’ematossilina ricavata dal *legno azzurro* di una pianta sudamericana)
- 3) Artificiali (denominati anche colori di anilina)

Struttura dei coloranti

Il cromoforo (gruppo di atomi capaci di conferire colore a una sostanza) e l’auxocromo (gruppo chimico che introdotto in una sostanza colorata, la trasforma in sostanza in grado di colorare), formano insieme il colorante completo. Nel caso di “fluorocoloranti”, si parla rispettivamente di fluoroforo e di auxofluoroforo.

Il *cromoforo* è un composto capace di assorbire radiazioni elettromagnetiche visibili (lunghezze d’onda nel visibile, da 360 nm a 790 nm). Il colore che esso riflette (o trasmette), che è quello osservato, è correlato a quello di assorbimento. Ad esempio, una sostanza che appare giallo-arancione ha spettro di assorbimento nel blu-violetto. Oppure, una sostanza che appare verde ha spettro di assorbimento nel rosso.

L’*auxocromo* è un gruppo chimico ionizzabile, unito covalentemente al cromoforo. E’ responsabile della solubilità in acqua del colorante, della sua ionizzabilità e della capacità di contrarre legami stabili con le sostanze tissutali. A seconda della carica assunta in soluzione, l’auxocromo può essere acido (quando ionizza come anione) o basico (quando ionizza come catione). Questa caratteristica dell’auxocromo genera la fondamentale distinzione dei coloranti istologici in acidi e basici. Gli auxocromi acidi sono il gruppo solfonico (-SO₃H), carbossilico (-COOH) ed idrossilico (-OH). Gli auxocromi basici sono il gruppo amminico (-NH₂) e suoi derivati ed i metalli.

Tutte le sostanze utilizzate per la colorazione istologica possono essere raggruppate in tre categorie chimiche:

- *coloranti neutri* (es: rosso neutro)

- *coloranti basici* (es: ematossilina, blu di metilene, blu di toluidina)
- *coloranti acidi* (es: eosina, Trypan Bleu, blu pirrolo)

Ciascuno di questi coloranti ha delle affinità per tipi di cellule e strutture citoplasmatiche particolari, e quindi la scelta del colorante viene fatta sulla base delle esperienze passate e della resa che si ottiene.

Questa classificazione non si basa sulla loro capacità a funzionare come acidi o basi in soluzione, bensì si riferisce alla caratteristica *anionica* o *cationica* dei loro gruppi reattivi. Se questo è costituito da un gruppo amminico (NH_2), il colorante sarà definito “basico”. Questo, in soluzione si protonerà (NH_3^+) agendo come un *catione*, e quindi legherà cariche negative (es: acidi nucleici). Al contrario, se è costituito da un gruppo carbossilico (COOH), il colorante sarà definito “acido”. Questo, in soluzione perderà un protone caricandosi negativamente (COO^-), agendo come un *anione*, legando cariche positive (es: proteine, citoplasma).

Più propriamente, quindi, *i coloranti basici possono esser definiti anche coloranti cationici, mentre quelli acidi coloranti anionici*. Dal punto di vista pratico, colorando una cellula si noterà che i coloranti basici tendono a colorare principalmente i nuclei (la cromatina) mentre i coloranti acidi si legano al citoplasma ed a buona parte delle strutture connettive.

In generale, il principale tipo di legame tra un colorante e il substrato è quello ionico. In istochimica esistono anche reazioni che danno luogo alla formazione di legami covalenti o semicovalenti. Legami deboli non sono in genere alla base di colorazioni istochimiche.

IL FENOMENO DELLA METACROMASIA

La METACROMASIA è un particolare comportamento di alcuni coloranti basici (blu di toluidina, blu di metilene, Azur I e II, cristal violetto, blu brillante di cresile). Indica un cambiamento (o *viraggio*) del colore, una volta che il colorante sia stato assunto da determinate sostanze, definite perciò cromotrope. I coloranti metacromatici sono basici. La metacromasia non deve essere confusa con l'*allocromasia*, dovuta alla distribuzione di determinati coloranti verso strutture tissutali o cellulari più affini, differenziando queste parti con un colore diverso da quello del resto del preparato.

Modalità di esecuzione delle colorazioni

La modalità di colorazione dipende da vari criteri:

- A seconda se si fa prima o dopo il sezionamento del campione, troviamo:
 - 1) colorazioni in blocco:** su frammenti di tessuto *prima* che siano sezionati (es. *colorazione di Cayal*)
 - 2) colorazioni di sezioni:** si opera *dopo* che il tessuto è stato sezionato.
- A seconda se si fa direttamente o dopo trattamento con mordente (*mordenzatura*, cioè trattamento del campione con sostanze chimiche particolari), troviamo:
 - 1) colorazioni dirette:** il preparato non richiede trattamenti prima di essere immerso nel colorante.
 - 2) colorazioni indirette:** precedute da una mordenzatura.
- A seconda del tempo di trattamento col colorante e della sua concentrazione, troviamo:
 - 1) colorazioni progressive** (ad esempio l'*ematossilina di Ehrlich*, di Mayer e di Harris): usano concentrazioni più basse di colorante e colorano selettivamente la cromatina nucleare senza intaccare le strutture citoplasmatiche. L'intensità è in funzione del tempo.
 - 2) colorazioni regressive** (ad esempio *ematossilina di Harris*, Giemsa o Papanicolau): agiscono in modo intenso su tutte le strutture nucleari e citoplasmatiche. Per ottenere la risposta cromatica corretta, occorre rimuovere il colorante in eccesso dalla sezione di tessuto.
- A seconda del numero di coloranti usati, troviamo:
 - 1) colorazioni semplici:** si usa un solo colorante
 - 2) colorazioni complesse:** si usa più di un colorante contemporaneamente o in successione.
- A seconda del bersaglio *animale o cellulare* che dobbiamo colorare, troviamo:
 - 1) colorazioni vitali** (ad esempio *trypan blu*, *inchiostro di china*). Sono quelle applicate ad animali viventi. Queste presuppongono l'intervento di processi vitali per l'assunzione delle molecole coloranti all'interno di cellule o nella sostanza intercellulare.
 - 2) colorazioni sopravitali** (ad esempio il *verde Janus* per mitocondri): quando il colorante è usato per trattare tessuti o cellule isolate, ancora vive

CLASSIFICAZIONE DEI COLORANTI A SECONDA DEL CROMOFORO

A seconda della natura chimica del cromoforo, i coloranti appartengono a svariate classi chimiche, delle quali qui si riportano le più importanti, con relativi esempi:

- **Nitroso coloranti** (Fast Green)
- **Nitro coloranti** (Giallo naftolo)
- **Azoici:** *Monoazoici* (Orange G), *diazoici* (Rosso Congo), *poliazoici*
- **Sali di diazonio** (Fast Red G)
- **Sali di tetrazolio** (Nitro Blu)
- **Stilbenici**
 - **Derivati dell'arilmetano:** *Difenilmetani*, *Diamminotrifenilmetani*, *Triamminotrifenilmetani*
- **Xantenici:** *Amminoxanteni* (Pironina G, Rodamina B), *Idroxanteni* (Eosina B)
- **Acridinici** (Arancio di acridina)
- **Chinone-imminici:** *Indammine* (Blue di Toluidina), *Tiazine* (Blu di Metilene)
- **Antrachinonici** (Rosso di Alizarina)
- **Ftalocianine** (Alcian Blu)

CLASSIFICAZIONE DELLE COLORAZIONI

Le colorazioni, indipendentemente dal meccanismo d'azione del colorante, possono essere divise in 2 gruppi:

- 1- COLORAZIONI ISTOMORFOLOGICHE (nucleo, citoplasma, tessuti, collagene, ecc.)
- 2- COLORAZIONI ISTOCHIMICHE (per mettere in evidenza particolari sostanze chimiche contenute nella cellula o nei tessuti, e anche la loro localizzazione)

Svariati esempi di colorazioni istomorfologiche ed istochimiche saranno esposti più avanti, alla voce "APPENDICE ALLE COLORAZIONI ISTOLOGICHE".

Ora, proseguendo nella preparazione del campione istologico, osserveremo come si effettua tecnicamente la fase di colorazione delle sezioni ottenute con il microtomo e poste su vetrino.

FASE DI COLORAZIONE DOPO LA FASE DI SEZIONAMENTO

Per tornare alla preparazione del campione istologico, siamo giunti all'allestimento del vetrino con le sezioni derivate dal sezionamento del campione. Queste ora devono subire la fase di colorazione.

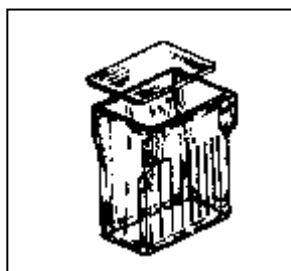
I coloranti sono sciolti, quasi sempre, in acqua o in soluzioni acquose; la loro applicazione alle sezioni comporta che il tessuto sia fondamentalmente *idrofilo*, e si lasci penetrare dal colorante. Le sezioni in paraffina sono invece idrofobe e, per poterle colorare, necessitano l'allontanamento della paraffina stessa (*sparaffinatura*), l'infiltrazione con etanolo, e poi con acqua.

Quindi è necessario trattare i vetrini con:

- *xilolo*
- *xilolo/etanolo (50%-50%)*
- *etanolo 100%*
- *etanolo 95%*
- *etanolo 70%*
- *etanolo 50%*
- *acqua distillata*

A questo punto, il vetrino sarà pronto per essere immerso nel colorante, per il periodo di tempo necessario richiesto dalla metodica.

La colorazione viene effettuata quasi sempre per *immersione* del vetrino portaoggetto nella soluzione colorante. Si utilizzano per questo scopo dei contenitori speciali, dotati di coperchio e forniti di scanalatura all'interno per potervi inserire, in verticale, una decina di vetrini evitando che aderiscano l'un l'altro, rovinando le sezioni. Simili contenitori vengono utilizzati anche nei passaggi di sparaffinatura e reidratazione di cui sopra.



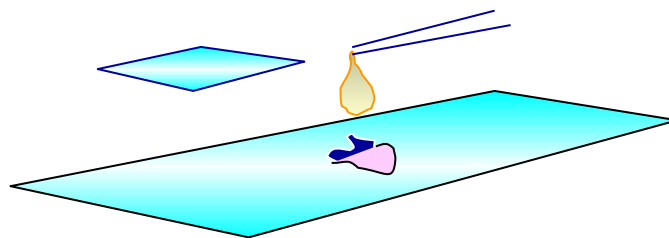
Contenitore per reidratazione e colorazione vetrini

Montaggio

Terminata la colorazione (normale, citochimica o immunoistochimica), è necessario chiudere il preparato con un *vetrino copri-oggetto*, per rendere stabile nel tempo il vetrino. Il vetrino copri-oggetto deve essere saldato saldamente al vetrino porta-oggetto. Per far ciò, si utilizzano delle resine naturali o sintetiche che garantiscono la perfetta adesione dei due vetrini fra loro e che, seccando, rendono il preparato stabile ed inalterabile. Queste sostanze, di cui la più comune è il Balsamo del Canadà, *non sono miscibili con l'acqua*, ma sono ben miscibili con lo xilolo. Per questo motivo, si devono disidratare le sezioni ancora una volta e riportarle allo xilolo:

- *acqua distillata*
- *etanolo 70%*
- *etanolo 90%*
- *etanolo 95%*
- *etanolo 100% (2 cambi)*
- *xilolo*

Sulle sezioni umide di xilolo viene fatto gocciolare da una bacchettina di vetro qualche goccia di *Balsamo del Canadà*, che tenderà a spandersi. Su questo si poggia con cura un vetrino copri-oggetto pulitissimo, si preme con una bacchetta e si rimuove l'eccesso di Balsamo che esce dai bordi con carta da filtro. A questo punto il vetrino è pronto per l'osservazione al microscopio ottico.



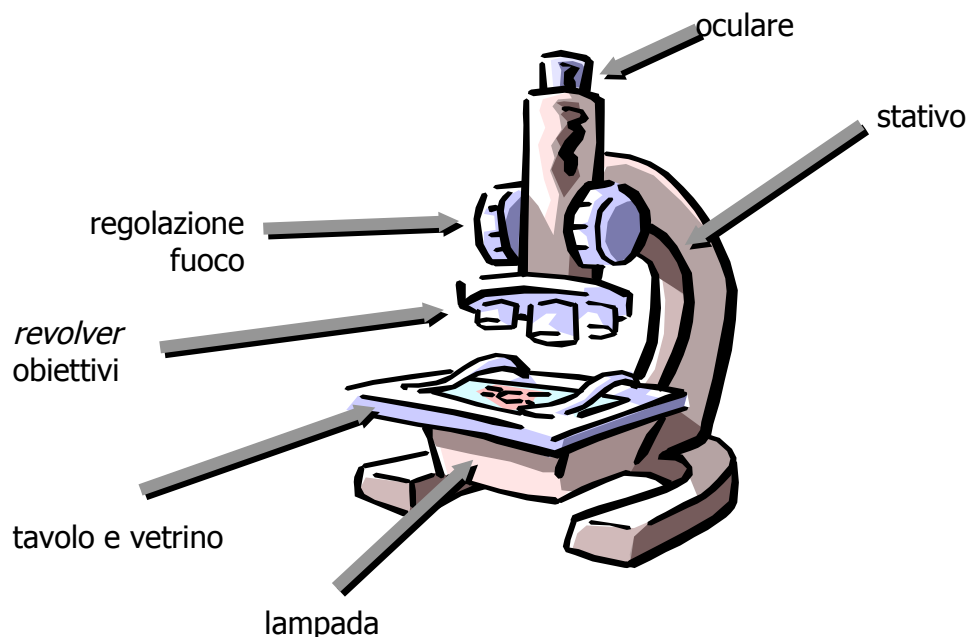
Montaggio del vetrino copri-oggetto

Osservazione - il microscopio ottico

L'osservazione delle strutture biologiche è resa difficile sia dalle loro piccole dimensioni che dalla loro trasparenza. La microscopia ottica ha il compito di rendere visibili i campioni biologici sia aumentando fortemente le loro *dimensioni*, sia aumentandone il *contrasto*, ovviando alla trasparenza delle cellule. L'aumento delle dimensioni osservabili di un campione è tanto maggiore quanto maggiore sarà il *potere risolutivo* del microscopio ottico usato, cioè la sua capacità di dare immagini distinte di due punti dell'oggetto molto vicini fra loro. Ogni microscopio possiede pertanto un limite di risoluzione, che viene definito come la minima distanza alla quale due punti risultano distinti tra loro. Questo parametro raggiunge valori di circa $0,2\text{ }\mu\text{m}$ nei microscopi usati convenzionalmente (dato che $1\text{ }\mu\text{m}$ corrisponde alla millesima parte di 1 mm , il limite di risoluzione del microscopio è circa 5000 volte inferiore a 1 mm).

Il microscopio ottico è composto da uno *stativo* che unisce la parte superiore (che contiene il *binoculare* e gli *obiettivi*) con la parte inferiore, che contiene l'apparato di illuminazione ed il *tavolo porta-vestrino*.

Il binoculare dà un ingrandimento di 10 volte (10x), ed è dotato di un dispositivo di allargamento-restringimento della distanza dei due oculari. Il revolver degli obiettivi è rotante e consta generalmente di 4 obiettivi ad ingrandimento crescente (4x, 10x, 40x e 100x). L'ingrandimento finale è dato dalla moltiplicazione dell'ingrandimento dell'obiettivo con quello dell'oculare.



Il vetrino viene posto sul tavolino (con il vetrino copri-oggetto verso l'alto) e fissato in posizione mediante un meccanismo di fissaggio. Questo meccanismo sposterà il vetrino quando si azioneranno le due manopole di spostamento: queste danno gli spostamenti destra-sinistra e nord-sud del vetrino, al fine di inquadrare la sezione istologica al centro dell'obiettivo.

Il fuoco viene regolato da una manopola laterale, che sposta in alto e in basso il tavolino, avvicinandolo o allontanando quindi il vetrino dall'obiettivo. Tale manopola consente sia gli spostamenti macrometrici che quelli micrometrici.

Al di sotto del tavolino vi è la lampada, la cui luce viene filtrata attraverso un diaframma e quindi attraversa il campione da osservare.

COLORAZIONI ISTOMORFOLOGICHE

Colorazione Ematossilina – Eosina (EE)

L'ematossilina è un colorante basico che colora il nucleo. L'eosina è un colorante artificiale debolmente acido, di cui esistono varie forme, che colora i citoplasmi, il tessuto connettivo e la sostanza intercellulare in varie tonalità di rosa. L'eosina è chimicamente una tetrabromofluoresceina. Più precisamente, sono di comune utilizzo due molecole di eosina denominate Y e B.

L'ematossilina è una sostanza vegetale isolata da un estratto di legno azzurro (legno di campeggio), un albero originario del centro America. Di per sé è incolore (o sotto forma di cristalli giallo-bruni), incapace di colorare. Il vero colorante non è l'ematossilina, ma il suo prodotto di ossidazione: l'emateina (per questo all'ematossilina vanno aggiunte sostanze ossidanti come il permanganato di potassio, l'idrato di potassio, iodato di sodio, ecc...).

L'emateina è colorata e costituisce il cromoforo, è anionica e non ha particolari affinità con gli acidi nucleici. Per conferire al composto una carica positiva è necessario aggiungere un mordente (che fa da auxocromo, ad es. l'allume potassico) che costituirà con l'emateina, una lacca relativamente insolubile: l'emallume.

A seconda del mordente usato, alluminio, ferro, cromo, ecc..., si distinguono ematossiline alluminiche (o emallumi), ematossiline ferriche, ematossiline cromatiche, ecc... . Le soluzioni ematossiliniche emalluminiche più usate in istologia sono: Ematossilina di Mayer; di Harris; di Delafield; di Carazzi; di Ehrlich; di Weigert; di Heidenhain.

La più usata è quella di Mayer, costituita da: ALLUME DI POTASSIO; EMATOSSILINA; IODATO DI SODIO (comburente); ACIDO CITRICO; CLORALIO.

METODI CITOLOGICI

La colorazione EE si utilizza per lo studio topografico e generale per tessuti e organi. Ci sono però alcuni metodi in grado di mettere in evidenza strutture specifiche, per esempio per evidenziare il tessuto connettivo piuttosto che quello nervoso, o anche per lo studio fine di organuli cellulari.

METODI CITOLOGICI CON COLORAZIONE REGRESSIVA DI LACCHE DI EMATOSSILINA

Si tratta di metodi di cui non si conosce ancora appieno il meccanismo di azione.

EMATOSSILINA FERRICA (Metodo di Heidenhain): Metodo di elezione per lo studio della cariocinesi. Regolando la differenziazione, si possono mettere in evidenza anche i centrioli o inclusioni citoplasmatiche.

STUDIO DEI TESSUTI ED ORGANI

TESSUTO NERVOSO

Vanno ricordate le colorazioni per mettere in evidenza i Corpi di Nissl. Uno di questi metodi prevede l'uso del **Cresyl Violet**, un colorante basico che lega rapidamente le componenti acide del citoplasma dei neuroni (soprattutto l'RNA ribosomale e i nuclei). Questo colorante mette ben in evidenza i Corpi di Nissl che sono appunto aggregazioni del RER tipiche dei neuroni. L'RNA si colora in nero, le altre strutture in viola.

Per quanto riguarda lo studio della *forma* dei neuroni, si usano metodi colorimetrici sia vitali che non (un esempio di colorazione vitale usata nei vertebrati è quella con il Blu di Metilene). Risultati migliori si ottengono mediante impregnazioni metalliche elettive. Fra questi metodi il più noto è quello dell' **impregnazione cromoargentina di Golgi (sec. Cajal)** che utilizza la precipitazione elettiva di cromato di argento sulle cellule nervose quando queste sono fissate con tetrossido di osmio e bicromato di potassio. Oltre l'argento si può usare anche l'oro.

Metodo di Bielschowsky: specifico per le neurofibrille. Metodo di elezione per la visualizzazione di neurofibrille, assoni, dendriti, placca senile. I metodi di impregnazione argentea sono fra i metodi più comunemente usati in neuroistologia. Il principio su cui si basano le tecniche di impregnazione è il seguente: l'argento, presente in alcuni composti allo stato di ossidazione +1 (es. AgNO₃), può essere ridotto da alcune componenti tissutali allo stato metallico insolubile. Selettività del metodo Bielschowsky: il diverso grado di argirofilia degli elementi cellulari presenti del tessuto nervoso permette attraverso una opportuna calibrazione della soluzione riducente di evidenziare selettivamente neurofibrille, assoni, dendriti, placca senile.

Colorazione Luxol Fast Blue: colora i fosfolipidi in modo soddisfacente, specie se disciolti in alcool isopropilico e quindi evidenzia bene la mielina integra, che si colora in blu-azzurro (costituita dalla membrana cellulare della cellula di Schwann). Tale colorazione è spesso associata al Cresyl Violet (Metodo di Klüver-Barrera).

TESSUTO CONNETTIVO

COLORAZIONE AZAN-MALLORY

Acronimo di AZocarmine-ANilin blue, modificata da Mallory). E' una delle tecniche di colorazione utilizzate per mettere in evidenza le *fibre collagene del tessuto connettivo*. Si utilizzano in sequenza due coloranti: Azocarminio (colora i nuclei in rosso vivo ed il citoplasma in rosso chiaro); Miscela di Mallory (Blu d'anilina, Orange G e acido ossalico, evidenzia il connettivo in azzurro).

COLORAZIONE MAY-GRÜNWALD-GIEMSA (MGG)

Doppia colorazione utilizzata normalmente per colorare gli strisci di sangue. Il sangue viene strisciato su un vetrino portaoggetti, fissato per almeno 30 min. all'aria e colorato prima con la miscela di May-Grünwald (blu di metilene e eosina). Quindi, lavaggio e colorazione con l'eosinato azzurro (colorante di Giemsa) composto da eosina, blu di metilene, azzurro A e B e violetto di metilene. I globuli rossi saranno rosa-arancio, i nuclei dei leucociti blu-porpora, i granuli eosinofili in rosso brillante e i granuli basofili in blu.

COLORAZIONE VERHOEFF-VAN GIESON

Si tratta di un metodo combinato. Il metodo di Verhoeff è una colorazione specifica per le fibre elastiche (in particolare per la proteina elastina). La colorazione di Van Gieson è specifica per il collagene. In questo metodo le sezioni sono colorate regressivamente con ematossilina (usando un eccesso di mordente, il cloruro ferrico, in modo da avere una maggiore affinità della stessa ematossilina ferrica per le fibre elastiche rispetto agli altri elementi).

COLORAZIONE WEIGERT-VAN GIESON

Metodo per la visualizzazione contemporanea delle fibre elastiche, del connettivo, del collagene e dei nuclei. Il metodo Weigert sfrutta l'affinità per le fibre elastiche del precipitato (cresofucsina) ottenuto facendo reagire resorcina, fucsina basica e cristalvioletto con perclorato di ferro. Il contrasto con la colorazione tricromica di Van Gieson permette di differenziare il collagene dal connettivo visualizzando nel contempo anche i nuclei. Le fibre elastiche saranno blu scuro-nero, i nuclei neri, il collagene rosso, mentre connettivo, eritrociti e il resto in giallo.

COLORAZIONE TRICROMICA DI GOLDNER

Conosciuta anche come Masson-Goldner, utilizza l'ematossilina, rosso Ponceau, orange G e Light Green. Gli acidi nucleici si colorano in marrone-nero, le strutture debolmente acidofile in rosso-arancio e le strutture fortemente acidofile (fibre collagene) in azzurro-verde.

COLORAZIONE TRICROMICA DI MASSON

Metodo di elezione per il tessuto connettivo. Prevede una colorazione nucleare (con ematossilina ferrica di Weigert), una colorazione delle emazie (con acido picrico) e una colorazione del connettivo (con due coloranti acidi, il Light Green oppure blu di anilina+blu di metile). I nuclei e i gameti si colorano in nero, citoplasma, cheratina, fibre muscolari, granuli acidofili in rosso, collagene, muco, granuli basofili dell'ipofisi in blu-verde, eritrociti in giallo.

COLORAZIONE PENTACROMICA DI MOVAT

Rivela contemporaneamente le mucosostanze acide e i diversi componenti del connettivo. Coloranti utilizzati: alcian blu, resorcifucsina, blu di celestina, ematossilina di Weigert e miscela di Van Gieson. Le mucine acide e la sostanza fondamentale sarà blu, il collagene rosso, l'elastina rosso porpureo, il muscolo giallo e i nuclei neri.

COLORAZIONI ISTOCHIMICHE

I metodi di colorazione di tipo istomorfologico non ci danno notizie sulla natura chimica delle sostanze contenute nei vari tessuti. Tali dettagli si ottengono sottoponendo le sezioni a vere e proprie reazioni chimiche che, senza arrecare danno alle strutture cellulari, danno luogo a prodotti colorati.

Dal punto di vista chimico le reazioni devono essere:

- 1) *Specifiche*
- 2) *Sensibili*
- 3) *Sicure*

Le reazioni istochimiche possono essere classificate anche come:

- 1) Dirette (la sostanza da identificare forma un prodotto con il reattivo dando una colorazione specifica)
- 2) Indirette (la sostanza viene prima modificata, per es. dal fissativo, e poi fatta reagire con il reattivo)

ALDEIDI E CHETONI

Il reattivo di Schiff (leucofucsina o fucsina bianca) è il nome tradizionale dato all'acido bis-N-aminosolfonico responsabile della colorazione in rosso dei gruppi aldeidici liberati dall'acido periodico nella reazione PAS. Tale reattivo, in presenza di aldeidi, in ambiente acido e in presenza di SO₂ in eccesso, dà luogo a un prodotto colorato (rosso magenta). Ci sono vari metodi per preparare questo reattivo (metodo di Lison ecc).

ACIDI NUCLEICI E NUCLEOPROTEINE

Le nucleoproteine sono proteine (di solito basiche) coniugate agli acidi nucleici. Istochimicamente si mettono in evidenza meglio i composti azotati degli acidi nucleici rispetto ai gruppi fosfato ecc.

Colorazioni specifiche per il DNA sono:

- Reazione di Feulgen
- Colorazione con verde di metile
- Colorazione con Arancio di acridina, Hoechst ecc (FLUORESCENZA)

REAZIONE DI FEULGEN

Il DNA è l'unica sostanza in grado di legare il reattivo di Schiff formando un composto colorato dopo una leggera idrolisi acida. Questa idrolisi separa le basi azotate dallo zucchero (il cui gruppo aldeidico è ora libero di reagire con il reattivo di Schiff).

Risultati : DNA in rosso magenta (in modo elettivo), citoplasma in verde se si usa il light green come contrasto.

COLORAZIONE CON VERDE DI METILE

Questa reazione (come quella di Feulgen) si presta anche per determinazioni quantitative (istofotometria). Il metodo si basa sul fatto che i coloranti del trifenilmetano colorano selettivamente gli acidi nucleici polimerizzati (legandosi stabilmente in proporzione stechiometrica). È più usato come colorante di contrasto.

CARBOIDRATI (REAZIONE PAS)

Per la dimostrazione dei glicidi si utilizza la reazione PAS (dell'acido periodico di Schiff). Il metodo si fonda sul seguente principio: i polisaccaridi (semplici e mucopolisaccaridi), quando ossidati a mezzo dell'acido periodico (H_5IO_6), danno origine ad aldeidi. I gruppi aldeidici vengono quindi rivelati istologicamente a mezzo del reattivo di Schiff. Quindi, in definitiva, questa reazione permette alle strutture contenenti polisaccaridi di assumere una colorazione rossa.

Risultati: Sostanze PAS-positive in rosso magenta, nuclei in viola-blu.

REAZIONE PAS: La reazione PAS si rivela anche aspecifica nei riguardi di lipidi e di proteine. Infatti l'azione ossidante dell'acido periodico, con liberazione di gruppi aldeidici, si estrinseca non soltanto sul gruppo 1-2 glicolico, ma anche sui gruppi aminico primario, aminico secondario e 1-idrossi-2-chetonico. Per quanto concerne i lipidi, danno reazione PAS-positiva alcuni fosfatidi, come la sfingomielina, i cerebrosidi e i gangliosidi. I mucopolisaccaridi acidi (acido ialuronico, condroitinsolfato, cheratansolfato, eparina) pur risultando portatori di gruppi 1-2 glicolici non sono PAS-positivi, in quanto la loro natura polianionica e, di conseguenza, la loro carica elettrica fortemente negativa impedirebbe il contatto con l'acido periodico. Uno dei coloranti basici più frequentemente utilizzati è l' Alcian blu.

ALCIAN BLUE/PAS

L' Alcian blu è una ftalocianina rameica idrosolubile ed è un colorante cationico che si lega ai polianioni dei mucopolisaccaridi acidi (mucine acide) per mezzo di ponti salini.

Nel metodo a pH 2,5 il colorante viene trasformato nel pigmento Monastral blu con una soluzione di sodio tetraborato, questo pigmento è insolubile e si presta quindi ad ulteriori manipolazioni senza peraltro diffondere nel tessuto (Alcian blu - PAS).

I polianioni con i quali l'Alcian blu reagisce sono costituiti da radicali solforici e carbossilici (i radicali fosfati degli acidi nucleici non reagiscono), di conseguenza reagiscono solo le mucine acide.

Risultati: mucopolisaccaridi acidi in blu-turchese; nuclei in rosso.

METODI PER RILEVARE L'AMILOIDE

L'amiloide è una sostanza che si forma solo in condizioni patologiche (tumori, malattia di Alzheimer ecc). Risulta costituita da proteine fibrillari, aventi strettissime analogie con le proteine di Bence-Jones (catene leggere delle immunoglobuline). Vengono rilevate principalmente con colorazioni metacromatiche (es. Rosso Congo, violetto di genziana, rosso Sirius) oppure mediante fluorescenza. Il Sirius red si usa da solo (rilevazione amiloide) ma anche insieme all'acido picrico (metodo Picro-Sirius) per mettere in evidenza le fibre collagene e placche aterosclerotiche.

BLU DI TOLUIDINA

È un colorante basofilo, che si può comportare come colorante ortocromatico (dando un colore azzurro) o metacromatico (dando un colore rosso-violetto) in modo dipendente dal pH e dalla natura chimica della sostanza da colorare. Come colorante ortocromatico, si usa frequentemente per il tessuto nervoso, dove colora la cromatina e i corpi di Nissl in azzurro, mentre colora metacromaticamente le strutture ricche di proteoglicani solfati (es: cartilagine) in violetto.

DIMOSTRAZIONE DEI LIPIDI MEDIANTE COLORANTI LISOCROMI

La colorazione dei lipidi mediante coloranti liposolubili (lisocromi) si basa sulla ripartizione di colore tra il solvente e il lipide. Per lo studio dei lipidi si ricorre a fissazione in formalina o in liquidi contenenti bicromato. Poiché la formalina estrae in una certa misura i lipidi (soprattutto fosfolipidi) è necessario usare brevi tempi di fissazione e di lavaggio. Dopo la fissazione i campioni vengono tagliati direttamente al congelatore o al criostato. I coloranti lisocromi più usati sono rappresentati dai Sudan rossi (Sudan III e Sudan IV) e dall' Oil red O. Il Sudan nero B è usato invece prevalentemente per i fosfolipidi.

COLORAZIONE DI PERLS (BLU DI PRUSSIA)

Serve per rivelare il ferro che si localizza nelle cellule sotto forma di granuli di emosiderina. La reazione di Perls si basa sulla liberazione degli ioni Fe associati a

proteine mediante l'azione dell'acido cloridrico; questi ioni reagiscono con il ferrocianuro di potassio, formando un precipitato blu detto ferrocianuro ferrico o blu di Prussia.

METODO DI DAHL ALL' ALIZARIN RED S (CALCIO)

Il rosso di alizarina è un colorante antrachinonico in grado di formare complessi con il calcio. Risultati: depositi di calcio in arancio-rosso.

METODO DI VON KOSSA (CALCIO)

La colorazione di von Kossa è usata per quantificare la mineralizzazione nelle colture cellulari e nelle sezioni di tessuti (cioè la presenza di Sali di calcio). Il metodo si basa sulla fissazione da parte dei sali di calcio dell'argento metallico ottenuto per riduzione dal nitrato mediante esposizione alla luce solare o ultravioletta. Il metodo di von Kossa trova, pertanto, utile applicazione nello studio dell'osso non decalcificato. Di solito si fa anche una colorazione successiva con fast red per visualizzare i nuclei. Risultati: depositi di calcio in nero; nuclei in rosso.

FONTANA-MASSON PER LA MELANINA

Metodo di elezione per la visualizzazione del pigmento melanotico su sezioni di tessuto istologico. La reazione argentaffine è basata sull'intrinseca capacità di alcune componenti tissutali di agire quali sostanze riducenti sull'argento di una soluzione ammoniacale facendolo precipitare come argento metallico ◇ si tratta quindi di una pmpregnazione argantica (colorazione con fast red per i nuclei). Risultati: melanina in nero; nuclei in rosso.

GOMORI METENAMINA SILVER

Metodo impiegato per la visualizzazione di elementi argirofili e mucopolisaccaridici (membrane basali, miceti, batteri, ecc.) su sezioni di tessuto. E' il metodo di elezione per lo studio della membrana basale nella biopsia renale. Si basa sul principio che l'acido periodico agendo su gruppi glicolici e glicoaminici presenti nella catena mucopolisaccaridica li ossida a gruppi aldeidici con conseguente rottura della catena. L'argento cloruro, facente parte del complesso argento-metenamina è quindi ridotto ad argento metallico da questi nuovi gruppi aldeidici derivati dai polisaccaridi diventando così visibile. Spesso si colora con verde di metile per i nuclei.

Risultati: membrane basali, glicogeno, miceti e batteri in nero; nuclei in verde.

Tecniche immunoistochimiche

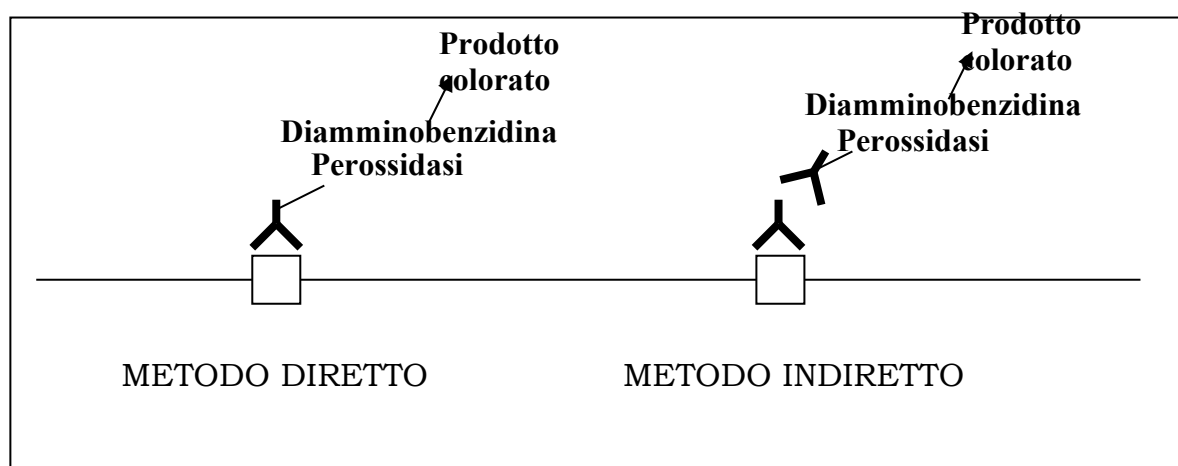
La maggior parte delle molecole biologiche sono degli *antigeni*, cioè possiedono gruppi chimici con proprietà immunogeniche, cioè hanno la capacità di indurre l'attivazione del sistema immunitario in un organismo ospite che venga a contatto con esse. Conseguenza di questa attivazione è la formazione, da parte dell'ospite, di *anticorpi* (immunoglobuline) specifici diretti verso uno o più parti dell'antigene (i *determinanti antigenici*), ciascuno dei quali sarà riconosciuto da un singolo anticorpo.

Le tecniche immunoistochimiche sfruttano la capacità degli anticorpi di legarsi all'antigene specifico. L'anticorpo, previamente coniugato con l'enzima *perossidasi*, è fatto incubare con la sezione, dove si legherà all'antigene cercato. Quindi segue un trattamento con un substrato di questo enzima (*diamminobenzidina*) che sarà trasformata dalla perossidasi in un *prodotto colorato* nel punto esatto ove si era legato l'anticorpo, rivelando così la localizzazione dell'antigene.

Vi sono due metodi immunoistochimici: diretto ed indiretto.

Nel metodo diretto, l'anticorpo è coniugato con la perossidasi.

Nel metodo indiretto, l'anticorpo non è coniugato, ma si usa anche un anticorpo *secondario* (che riconosce il primo) coniugato con la perossidasi.



Microscopia a fluorescenza

La fluorescenza consiste nella capacità di alcune sostanze di assorbire radiazioni elettromagnetiche di una certa lunghezza d'onda e di emettere una frazione dell'energia assorbita con radiazione elettromagnetiche di una lunghezza d'onda differente e superiore a quella assorbita, sotto forma di *fluorescenza*. La tecnica della *microscopia a fluorescenza* permette di esaminare le sezioni di tessuto in *luce ultravioletta*, a una lunghezza d'onda (200-400 nanometri) vicina a quella dello spettro del visibile, e i loro componenti vengono analizzati in base alla fluorescenza che emettono nello spettro visibile. Infatti, molti gruppi chimici che fanno parte di svariate molecole biologiche, quando illuminati, sono in grado di assorbire la luce visibile e di riemettere luce, sotto forma di fluorescenza, nello spettro del visibile.

Si possono studiare due tipi di fluorescenza: quella naturale (*autofluorescenza*), prodotta da sostanze normalmente presenti nel tessuto, e la *fluorescenza secondaria*, che è indotta da una colorazione con sostanze fluorescenti, dette *fluorocromi* (come la fluoresceina o la rodamina). Infatti, differenti proteine possono essere marcate con una molecola fluorescente senza denaturare la molecola.

Nel caso dell'*autofluorescenza*, molte strutture cellulari sono in grado di essere evidenziate: ad esempio, il citoplasma (emette una debole luce bluastro), i granuli (un'intensa luce giallognola), e i mitocondri (hanno una forte emissione fluorescente). Il nucleo, al contrario, non è fluorescente affatto.

Il vantaggio più importante della microscopia a fluorescenza è la sua elevata sensibilità. Questo fatto assume una particolare importanza nello studio di cellule *in vivo*, poiché è sufficiente una bassa concentrazione della molecola che emette autofluorescenza per essere evidenziata al microscopio. Similmente, anche nel caso di utilizzo di *fluorocromi* per marcare determinate strutture cellulari (fluorescenza secondaria) è sufficiente utilizzare una bassa concentrazione di fluorocromo, che quindi non altera la normale fisiologia cellulare. Una delle applicazioni della fluorescenza molto usata è quella per lo studio della morfologia dei nuclei cellulari:

Studio della morfologia nucleare con la fluorescenza

Il colorante HOECHST fa parte della famiglia di coloranti che evidenziano il DNA al microscopio a fluorescenza. Pertanto, è utilizzato per visualizzare i nuclei e i mitocondri in blu-azzurro.

Un altro colorante fluorescente molto usato è l'ARANCIO DI ACRIDINA, che differenzia il DNA dall'RNA, colorando il primo in verde e il secondo in rosso.

Immunofluorescenza

Similmente alle tecniche immunoistochimiche prima descritte, *l'immunofluorescenza* è una delle diverse metodologie che sfruttano le proprietà immunitarie degli organismi per individuare la presenza e la localizzazione entro cellule e tessuti di composti diversi.

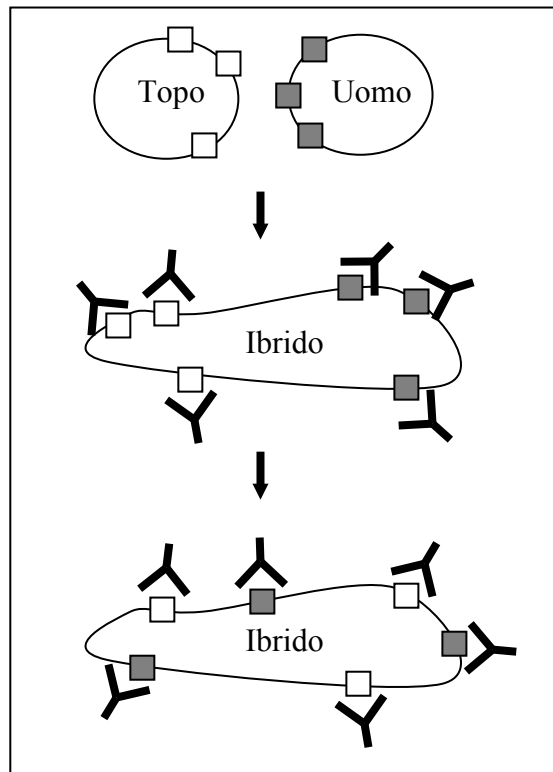
La tecnica utilizza un normale microscopio a fluorescenza ed il trattamento dei campioni da osservare con *anticorpi* specifici diretti contro l'antigene che si vuole evidenziare. Questi anticorpi, ovviamente dovranno essere marcati specificamente con una molecola fluorescente che emetterà fluorescenza nel punto in cui l'anticorpo si sarà legato all'antigene in esame.

Gli anticorpi specifici per il nostro antigene, se non presenti in commercio, possono essere purificati dal plasma di conigli iniettati con l'antigene stesso.

La tecnica dell'immunofluorescenza è risultata decisiva nell'affermazione del *modello a mosaico fluido* della membrana plasmatica. Brevemente:

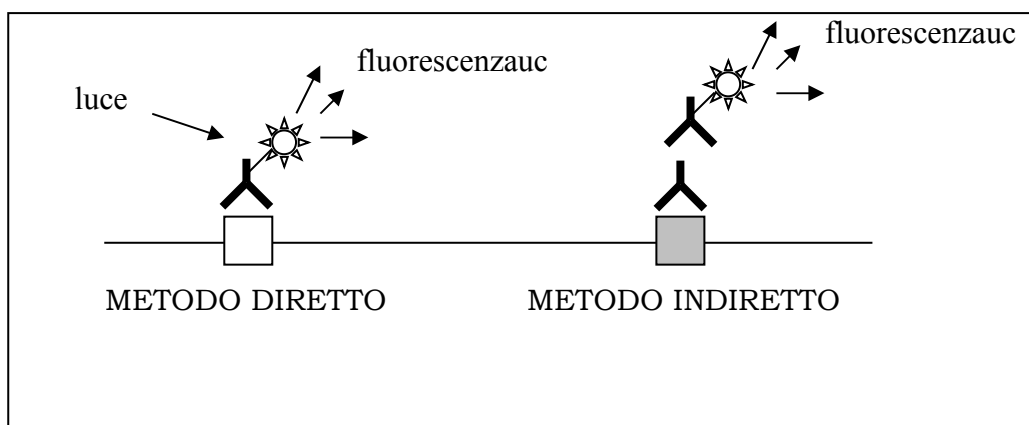
- le proteine di membrana di cellule di uomo furono iniettate in un coniglio, che produsse anticorpi specifici per queste proteine.
- le proteine di membrana di cellule di topo furono iniettate in un altro coniglio, che produsse anticorpi specifici per queste proteine.
- I due tipi di anticorpi furono estratti dai due conigli e marcati separatamente con due fluorocromi diversi, uno di colore *blu* e uno di colore *verde*.
- Utilizzando il virus Sendai, cellule di uomo e cellule di topo furono fuse tra loro, quindi gli ibridi cellulari furono trattati con entrambi gli anticorpi, che si legarono alle proteine di membrana di topo e di uomo, mescolate.

- Al microscopio a fluorescenza, inizialmente i colori *blu* e *verde* si mantenevano separati, ma, con il passare del tempo, si osservò che le colorazioni si mescolavano. Questa fu la prova inconfutabile della teoria del *modello di membrana a mosaico fluido*, secondo cui le proteine sono immerse nella membrana e si possono spostare liberamente all'interno di essa.



Dimostrazione del modello di membrana a mosaico fluido mediante immunofluorescenza

Similmente all'immunoistochimica, anche l'immunofluorescenza si divide in METODO DIRETTO e METODO INDIRETTO, a seconda se si utilizza solo un anticorpo primario marcato, o un primario + un secondario marcato.



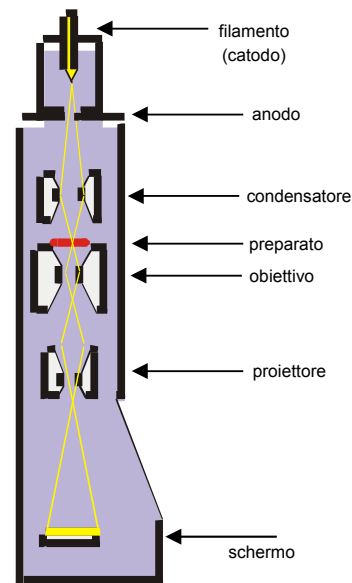
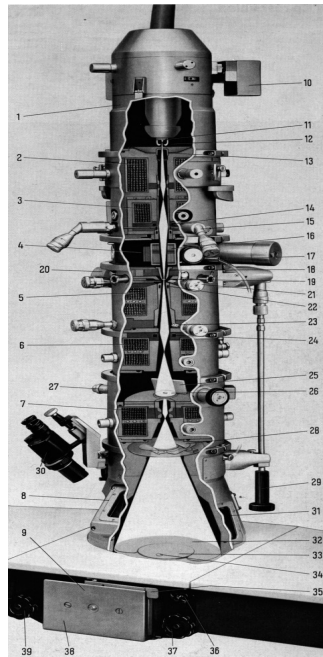
Microscopia elettronica

Il microscopio elettronico possiede un limite di risoluzione molto più grande di quello ottico. La differenza fondamentale con la microscopia ottica è che non viene utilizzata la luce per rivelare il preparato, ma un *fascio di elettroni*, che viene accelerato fortemente. Questo produce delle immagini ultrastrutturali del preparato in bianco e nero, e non colorate come nella microscopia ottica.

La microscopia elettronica è suddivisa in 2 tecniche principali, che si avvalgono di 2 strumenti molto differenti fra loro: la MICROSCOPIA ELETTRONICA A TRASMISSIONE e la MICROSCOPIA ELETTRONICA A SCANSIONE. Quindi fondamentalmente esistono *due tipi di microscopi elettronici*, che producono immagini ultrastrutturali molto differenti e per tale motivo danno informazioni diverse sul preparato. Nel primo caso (a trasmissione), il campione viene sezionato ed il microscopio permette la visualizzazione delle strutture interne alla cellula. Nel secondo, il campione NON viene sezionato e lo strumento visualizza la superficie esterna del campione, fornendo così un'immagine tridimensionale del preparato.

MICROSCOPIO ELETTRONICO A TRASMISSIONE

E' costituito sostanzialmente da un lungo tubo chiuso in cui viene fatto il vuoto da una serie di pompe da vuoto. In alto, vi è un filamento di *tungsteno* (catodo) che viene fortemente riscaldato, producendo un *fascio di elettroni* che, attirati da un *anodo*, vengono accelerati nel vuoto da un'elevata differenza di potenziale (circa 80 – 100 kV). Gli elettroni attraversano una serie di campi magnetici che fungono da lenti (*condensatori*), per andare poi ad attraversare la sezione ultrafine del campione e raggiungere uno schermo di materiale fluorescente, la cui luminosità rende visibile l'immagine del campione. L'immagine così prodotta non è colorata, ma composta da diversi toni di grigio.



Le varie fasi di preparazione del campione per l'osservazione al microscopio elettronico a trasmissione differiscono leggermente da quelle per la microscopia ottica:

Prelievo

I campioni di tessuto devono essere lavati in tampone fisiologico e tagliati in frammenti molto piccoli (1mm diametro).

Fissazione

La fissazione è doppia: *glutaraldeide*, quindi lavaggi in soluzione fisiologica, e poi *tetrossido di osmio* (OsO_4).

Disidratazione

Effettuata in *etanolo*, ed è simile alla microscopia ottica

Inclusione

Si utilizzano resine liquide che solidificano a temperature di circa 70°C e divengono molto dure. L'inclusione viene effettuata in piccoli contenitori cilindrici.

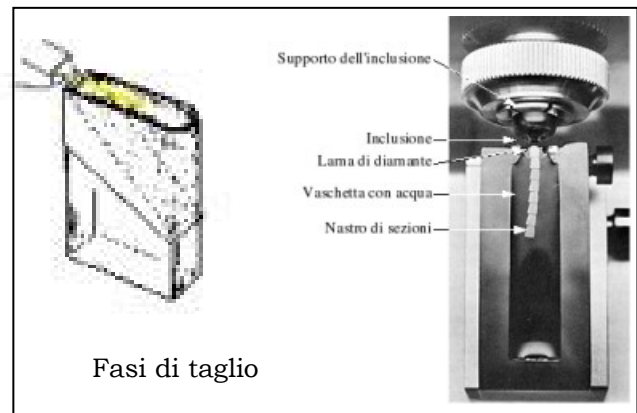
Sezionamento

Il taglio delle sezioni avviene all'*ultramicrotomo*, un microtomo particolare dotato di binoculare per l'osservazione. Il funzionamento di base è simile a quello del microtomo. La lama, di *diamante*, è collegata ad un contenitore

contenente acqua distillata nel quale cadrà il nastrino delle sezioni (dette sezioni *ultrafini*, 50-70 nanometri di spessore), che verrà poi raccolto NON su vetrini ma su particolari griglie di forma circolare (*retini*) di 0,5 cm di diametro.



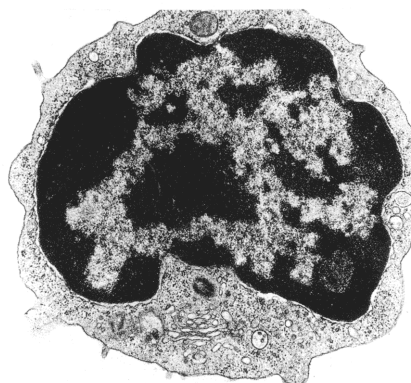
Ultramicrotomo



Fasi di taglio

Colorazione (contrastazione)

Il materiale biologico risulta estremamente poco contrastato all'osservazione, in quanto gli elettroni lo attraversano molto facilmente. Questo problema viene ovviato rendendo le strutture *opache agli elettroni*, arricchendole con atomi di *metalli pesanti*, che hanno la capacità di deviare o assorbire gli elettroni del fascio che li colpiscono. La formazione dell'immagine nel microscopio elettronico a trasmissione è legata alle differenti capacità di assorbire e deviare gli elettroni di differenti strutture della cellula. I metalli più utilizzati sono l'uranio (come *acetato di uranile*) ed il piombo (come *citrato di piombo*). Una volta asciutti, i retini sono lavati abbondantemente con acqua distillata, per eliminare l'eccesso di colorante, e, una volta asciugati all'aria, possono essere subito osservati al microscopio elettronico a trasmissione.



Linfocito al microscopio elettronico a trasmissione

MICROSCOPIO ELETTRONICO A SCANSIONE

Come già accennato precedentemente, nella microscopia a TRASMISSIONE il campione viene sezionato, gli elettroni accelerati *attraversano* la sezione ultrafine, producendo su uno schermo fluorescente un'immagine in *bianco e nero* fortemente ingrandita. Il risultato è l'immagine dell'ultrastuttura interna del campione.

Al contrario, nella MICROSCOPIA A SCANSIONE il campione NON viene sezionato, ma lasciato intero. La funzione per cui viene prevalentemente utilizzato il microscopio elettronico a scansione sta nell'osservazione particolareggiata delle *superfici* dei campioni utilizzati, quindi consente di osservare a forte ingrandimento e con minuzia di particolari la superficie di piccoli organismi, cellule o parti di esse.

Dopo il prelievo, lavaggio, fissazione (simili ai precedenti), segue una fase di essiccamento per eliminare l'acqua (con un essiccatore a CO₂) e quindi una fase di ricopertura (con oro o argento), operata con uno strumento chiamato *metallizzatore*. Brevemente, in questo strumento a camera stagna viene fatto vaporizzare oro o argento, e la nube ionica ricopre totalmente la superficie del campione. A questo punto, il campione è pronto per essere inserito nel microscopio elettronico a scansione. L'immagine della superficie viene ottenuta grazie agli *elettroni secondari* emessi dalla superficie colpita dal fascio elettronico primario, quello generato da un cannone elettronico. Questi elettroni secondari, provenienti da tutte le direzioni dal campione, vengono raccolti da un sensore ed integrati in un monitor a formare *l'immagine tridimensionale* della struttura esterna del campione.



Microscopio elettronico a scansione



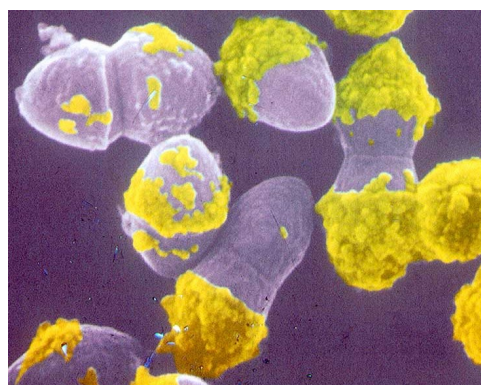
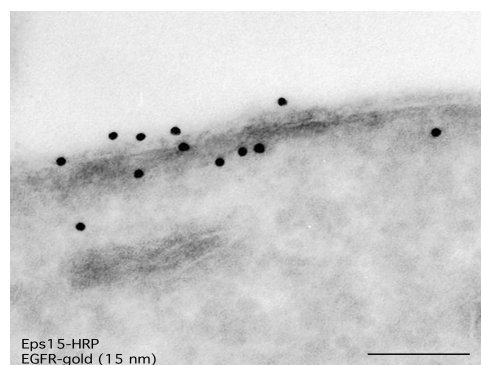
Testa d'insetto al microscopio elettronico a scansione

La tecnica dell'immunogold

Similmente alle tecniche immunoistochimiche per la microscopia ottica, anche in microscopia elettronica si sfruttano le proprietà degli *anticorpi* per localizzare determinati costituenti cellulari.

Una delle tecniche più diffuse è la tecnica dell'immunogold, che utilizza particelle sferoidali di oro colloidale, disponibili in diversi diametri (da 5 a 30 nanometri), che vengono coniugate con anticorpi specifici, in modo da andare a legarsi, nella sezione di tessuto, nella posizione occupata dagli antigeni. La posizione delle particelle è direttamente rilevabile al microscopio elettronico sia a trasmissione che a scansione, poiché l'oro è opaco agli elettroni e forma, quindi, un'ombra scura sull'immagine del campione.

Inoltre, utilizzando contemporaneamente particelle di oro colloidale di diametri differenti, è possibile effettuare doppie o triple localizzazioni, cioè la *localizzazione simultanea* di antigeni differenti.



Immunogold per recettori di membrana
al microscopio elettronico a trasmissione (a)
e a scansione (b)