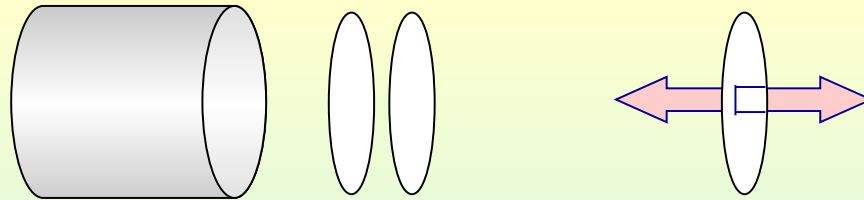


MICROSCOPIA OTTICA

Tecnica che permette l'osservazione al microscopio di preparati cellulari o tissutali

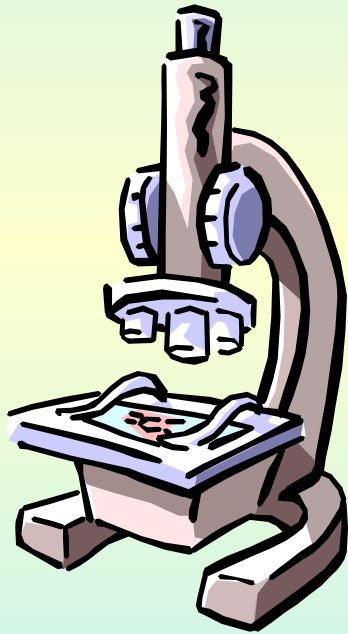
- Preparazione di un campione sottile (sezione istologica) che possa essere attraversato dalla luce del microscopio



- Il campione è trasparente, quindi deve essere trattato con sostanze coloranti che contrastino le strutture cellulari



ALLESTIMENTO DI UN PREPARATO PER L'OSSERVAZIONE AL MICROSCOPIO OTTICO



Prelievo

Fissazione

Lavaggio

Disidratazione

Chiarificazione

Inclusione

Sezionamento

Reidratazione

Colorazione

Disidratazione

Montaggio

Osservazione

Prelievo

➤ Espianto dell'organo/tessuto

- materiale prelevato fresco
- evitare le alterazioni autolitiche (tenere in ghiaccio)

➤ Sezionamento

- pinze e forbici (o lame) molto affilate
- dimensioni max: 1 cm di diametro
- evitare deformazioni o compressioni improprie
- Sezionare il campione in ambiente umido per evitare l'essiccamento del campione

➤ Lavaggio

- soluzione fisiologica

Fissazione

FISSAZIONE CHIMICA

(soluzioni liquide)



- Soluzioni isotoniche
- pH fisiologico (7,4)

Evitare collassamento o rigonfiamento dei campioni

FISSAZIONE FISICA

(congelamento)



- ghiaccio secco
- azoto liquido (-170°C)

Non si effettuano disidratazione ed inclusione, direttamente si passa al sezionamento

Fissazione

- immobilizzazione dei costituenti cellulari e tissutali del campione in uno stato più vicino possibile a quello di vita
- consentire al preparato di sopportare gli stress fisici e chimici insiti nelle fasi successive
- preservare i campioni dall'attacco di muffe o batteri, che distruggerebbero le strutture cellulari
- mantenimento delle reattività enzimatiche della cellula (solo in alcuni casi)

Fissazione

Scelta del fissativo

- dimensioni del campione
- preservazione strutturale richiesta
- natura dei costituenti chimici della cellula

La massima parte dell'architettura cellulare è costituita da PROTEINE, quindi un buon agente di fissazione deve essere principalmente un ottimo stabilizzatore di queste macromolecole.

Effetto dei fissativi sulle proteine

- Coagulazione o insolubilizzazione
- Polimerizzazione: Legami intramolecolari, costruzione di edifici macromolecolari insolubili nelle soluzioni applicate per le successive fasi
- Indurimento, particolarmente utile per il sezionamento

Fissazione

Importante per la fissazione

Per facilitare la penetrazione del fissativo nel campione:

- dimensioni ampie dei flaconi o contenitori
- agitazione continua, per non far stazionare il campione nella stessa posizione.
- Il volume di fissativo da usare: almeno 40-50 volte superiore al volume del campione
- cambiare fissativo con soluzione fresca, se la fissazione deve durare molte ore.



In alcuni casi più delicati, la fissazione può essere attuata per PERFUSIONE dell'organo (quindi prima dell'escissione), utilizzando il circolo sanguigno.

Fissazione

CLASSIFICAZIONE CHIMICA DEI FISSATIVI

I composti utilizzati come fissativi in istologia possono essere suddivisi in 4 classi chimiche:

- **Aldeidi** - **CHO**
- **Alcooli** - **OH**
- **Acidi organici e minerali (ac, acetico, picrico)**
- **Sali di metalli pesanti (bicromato di potassio)**

Alcuni fissativi sono usati singolarmente, ma la maggior parte sono usati in *miscele di fissazione*, unitamente ad altri composti.

Fissazione

CLASSIFICAZIONE FUNZIONALE DEI FISSATIVI

➤ FISSATIVI PRIMARI COAGULANTI

- ETANOLO (alcol etilico)**
- CLORURO DI MERCURIO**
- TRIOSSIDO DI CROMO (CrO_3)**
- ACIDO PICRICO**

➤ FISSATIVI PRIMARI NON COAGULANTI

- FORMALDEIDE (H-CHO)**
- TETROSSIDO DI OSMIO**
- BICROMATO DI POTASSIO**
- ACIDO ACETICO**

Fissativi coagulanti

Etanolo



- usato a concentrazioni tra il 70-100%
- moderatamente penetrante, fissativo generale blando
- indurisce eccessivamente il materiale biologico
- precipita le proteine denaturandole
- libera i lipidi legati a proteine
- annulla quasi totalmente la reattività enzimatica
- può essere usato in miscele con formaldeide o acido acetico

Fissativi coagulanti

Cloruro mercurico



- Molto tossico, è detto sublimato corrosivo
- Si usa in soluzione acquosa al 7%, ma anche in miscela con l'acido acetico, formando il sublimato acetico
- buon stabilizzatore proteico
- 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
- penetra rapidamente ma poco profondamente, quindi usato per campioni molto piccoli (qualche mm di diametro)

Fissativi coagulanti

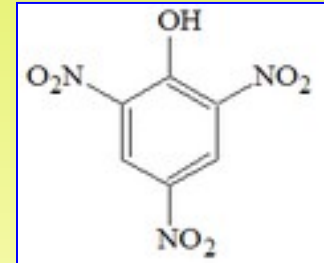
Triossido di cromo



- Usato in soluzione acquosa 0,5-1 %, in cui si formano acido cromico (H_2CrO_4), ioni bicromato ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$) e cromato acido (HCrO_4^-).
- E' il più ossidante fra i fissativi e fissa tutte le proteine bloccando i gruppi COOH , quindi limita in parte l'azione dei coloranti basici.
- Precipita il DNA e converte gli zuccheri in aldeidi.
- Scarsamente penetrante, ma ottimo per nucleo e cromosomi.
- Buone miscele con cloruro mercurico, tetrossido di osmio ed acido acetico, ma non con etanolo e formaldeide, con i quali reagisce.

Fissativi coagulanti

Acido picrico (2,4,6-trinitrofenolo)



- esplosivo, in forma di cristalli gialli, usato in soluzione acquosa al 1-2 %
 - eccellente stabilizzatore proteico, con cui forma PICRATI
 - non scioglie i lipidi
 - non indurisce molto ma coarta i tessuti, per cui spesso viene usato in miscela con acido acetico, che ne previene questo effetto
 - conferisce un caratteristico colore giallo
-

Fissativi NON coagulanti

Formaldeide H-CHO

E' il fissativo più usato. In forma di gas, ma usata come soluzione acquosa 4-10%, usata singola o in miscele (FORMALINA)

- elevato grado di penetrazione, fissa le proteine e non dissolve i lipidi
- non provoca un indurimento eccessivo dei tessuti, è possibile mantenere per varie ore i preparati immersi
- 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
- molto tossica per le mucose nasali e per gli occhi, quindi necessita di precauzioni particolari per il suo impiego.

Tetrossido di osmio OsO_4

- Cristalli gialli, molto tossico. 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.

Fissativi NON coagulanti

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.
- Spiccata affinità per i fosfolipidi di membrana, rendendo i fosfolipidi insolubili ai solventi per i lipidi, quindi molto usato per i mitocondri. Dopo la fissazione, lavaggi 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.

Fissazione

MISCELE DI FISSAZIONE

Liquido di Bouin

- miscela più utilizzata
- acido picrico 15, formalina 5, acido acetico 1
- molto penetrante
- usato anche per pezzi voluminosi_____

Liquido di Carnoy

- usato per fissare cellule isolate
- etanolo 6, cloroformio 3, acido acetico 1

Liquido di Zenker

- buona penetrabilità
- acqua 100 ml, sublimato corrosivo 5 gr, bicromato di

Lavaggio

I lavaggi devono essere effettuati in acqua corrente

Eccezioni: fissazione con acido picrico o bicromato di potassio

Scopo:

ELIMINARE L'ECCCESSO DI FISSATIVO RIMASTO ALL'INTERNO DEI CAMPIONI, CHE POTREBBE REAGIRE CON I COLORANTI SUCCESSIVI

Procedura:

I contenitori immersi direttamente sotto il flusso

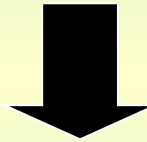
(per i campioni piccoli, i contenitori devono avere un coperchio forato, per impedire che si perdano)



Disidratazione

I campioni devono essere inclusi in resine particolari che induriscono, permettendo il sezionamento.

Queste resine sono IDROFOBICHE, quindi non sono in grado di infiltrare il campione, che contiene acqua



DISIDRATAZIONE

Sostituzione graduale dell'acqua con etanolo,
che non provoca coartazione dei campioni

Disidratazione

UTILIZZO DI CONCENTRAZIONI CRESCENTI DI ETANOLO in acqua

ETANOLO 70%

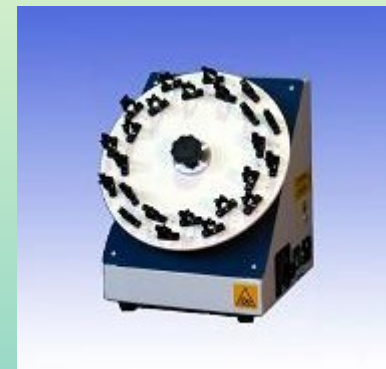
ETANOLO 80%

ETANOLO 90%

ETANOLO 95%

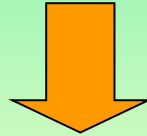
ETANOLO 100% (per 2 volte)

- I tempi di trattamento sono variabili a seconda delle dimensioni del campione
- Consigliabile non superare le 2 ore totali (altrimenti eccessivo indurimento)
- leggera agitazione dei contenitori durante il trattamento

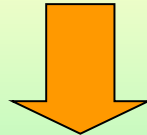


Chiarificazione

L'agente disidratante (etanolo 100%) non è miscibile con le resine per l'inclusione



Sostituzione dell'etanolo con un agente intermedio, che sia miscibile sia con l'etanolo che con le resine



CHIARIFICAZIONE

(gli agenti intermedi schiariscono il campione, rendendolo trasparente)

Chiarificazione

AGENTI CHIARIFICANTI



XILOLO

rapida sostituzione, forte indurimento

TOLUENE

rapida sostituzione, medio indurimento

BENZOLO

CLOROFORMIO

lenta sostituzione, basso indurimento

Procedura

ETANOLO/XILOLO 50% - 50%

XILOLO 100%

Inclusione

Lo scopo dell'inclusione è ottenere campioni duri per il sezionamento

INFILTRAZIONE IN **PARAFFINA**

- Miscela di idrocarburi saturi di PM elevato, insolubile in acqua e alcool
- Solida a T ambiente, liquida tra 35-70°C (56-58 °C)

- 1) Scioglimento a 58°C
- 2) Filtrazione per eliminare impurità

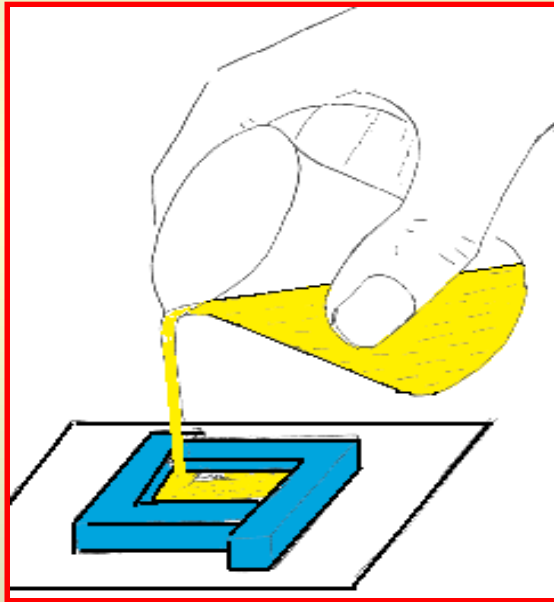
Procedura di infiltrazione a 58°C

XILOLO-PARAFFINA (50%-50%) 2-3 ore

PARAFFINA pura (2-3 cambi) min. 2 ore

Inclusione

- Posizionamento del campione in contenitori sagomati
- Riempimento con paraffina liquida
- Solidificazione a Temp. ambiente



Sezionamento

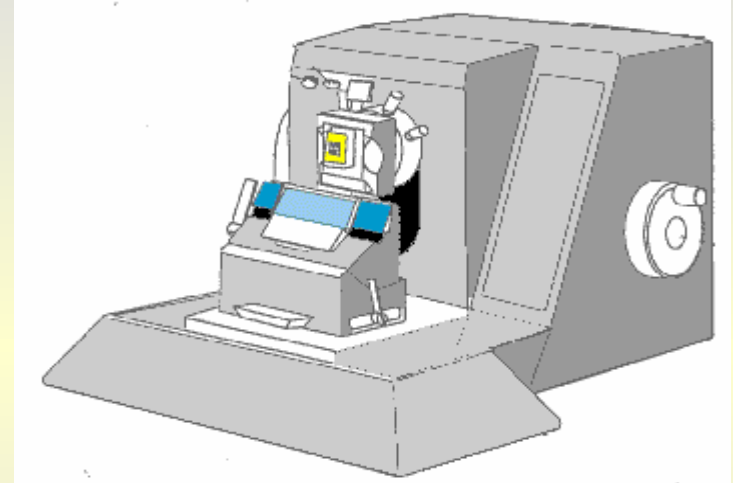
Microtomo a rotazione



CORPO

Gruppo porta-preparato

Porta-lama



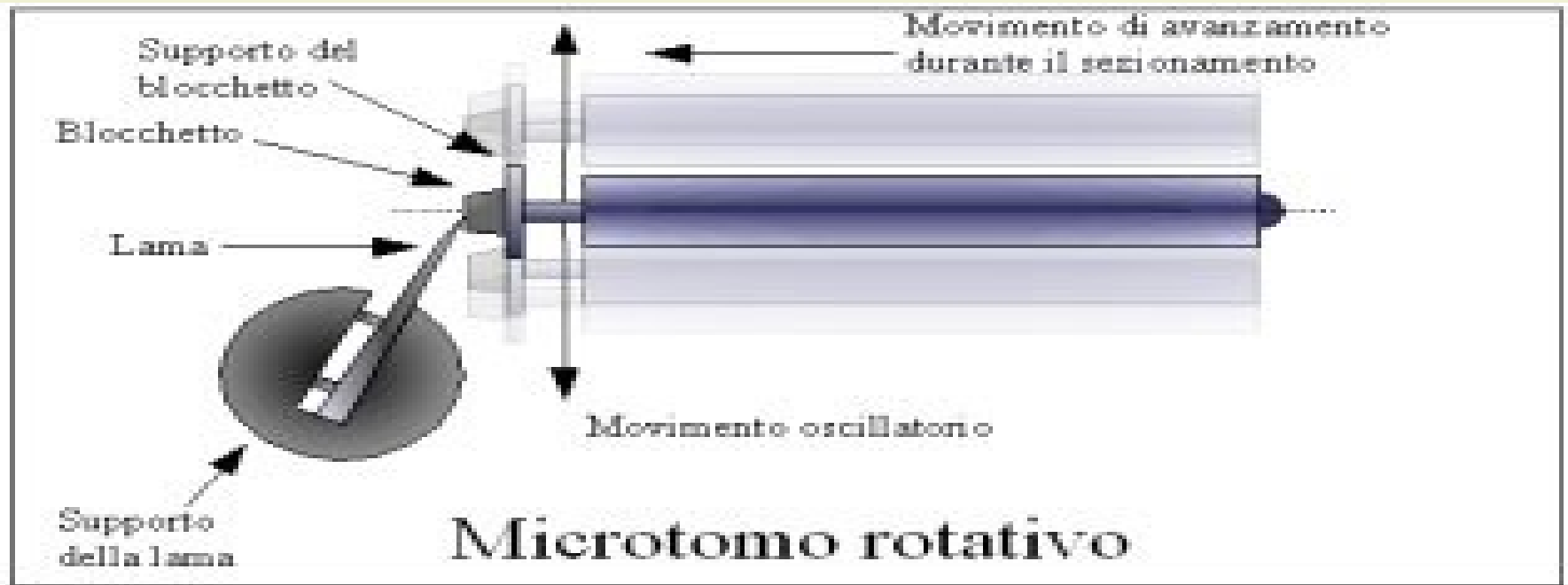
- Sagomatura del campione a forma di trapezio
- Montaggio sul gruppo porta-preparato
(fondendo paraffina e facendola risolidificare)

I campioni fissati per CONGELAMENTO rapido:

- NO disidratazione, NO inclusione in paraffina
- TAGLIO AL **CRIOSTATO (0°C -45°C)**

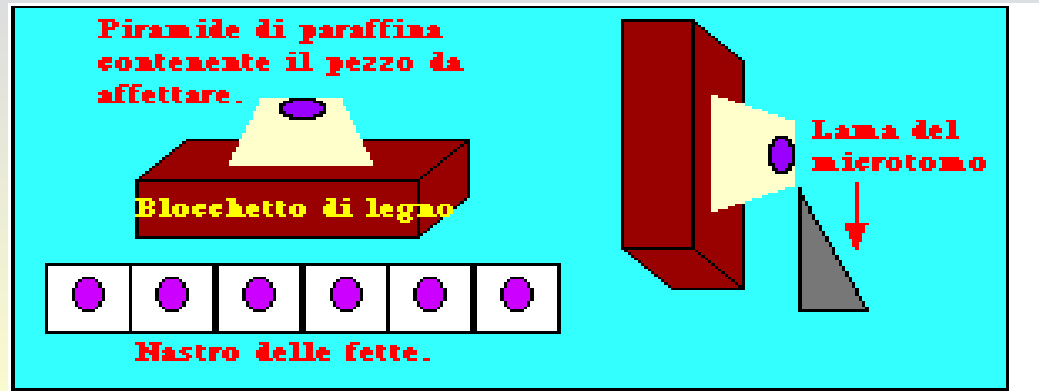
Sezionamento

- Campione montato sul braccio oscillante
- Manovella rotatoria che fa oscillare il braccio
- Regolazione distanza di avanzamento ($1\text{-}50\text{ }\mu\text{m}$)

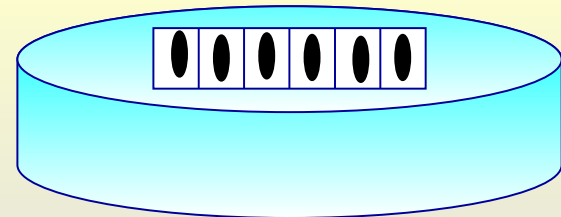


Sezionamento

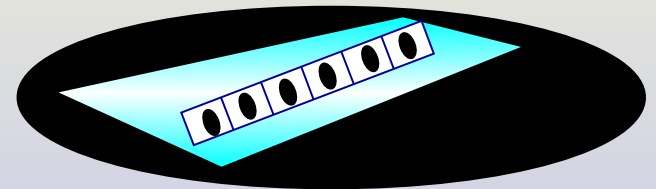
Ritmo costante di taglio: formazione di un nastrino di sezioni



Con l'aiuto di un pennellino,
le sezioni vanno sistemate
in vaschetta con acqua
distillata riscaldata (40-45 °C)



Raccolta su vetrino
Asciugatura su piastra riscaldata



Colorazione

Le sezioni sono incolori e prive di contrasto

COLORANTI ISTOLOGICI: sostanze chimiche che si legano a costituenti cellulari aumentandone il contrasto.

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. Esempi:

Trypan Bleu (macrofagi, fagocitosi);

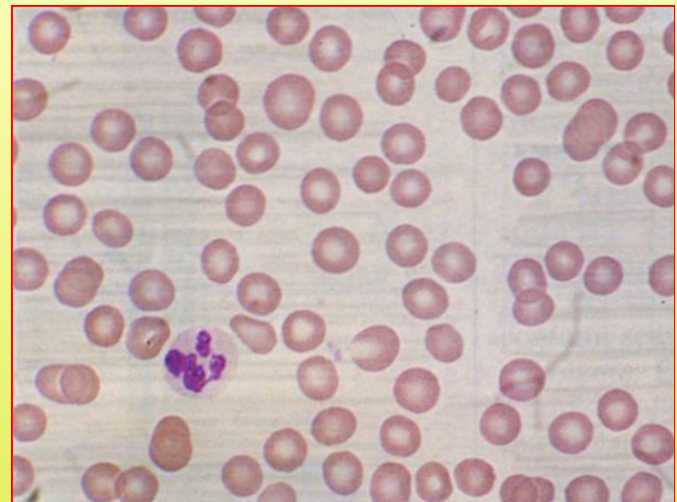
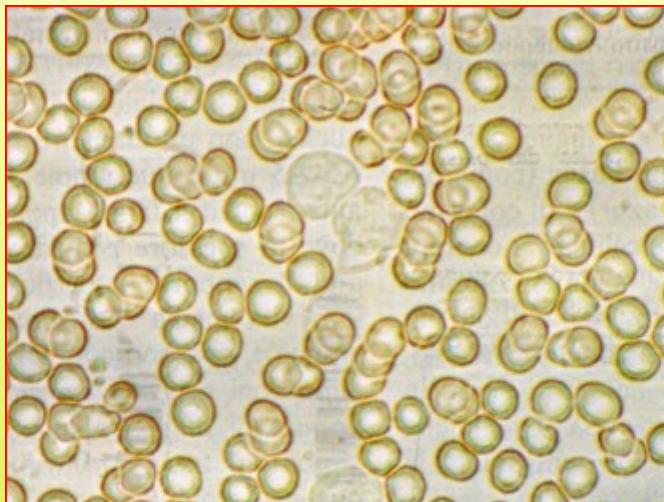
Verde Janus (mitocondri);

Blu di Metilene (fibre nervose).

SCOPO DELLA COLORAZIONE

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

Il termine “colorazione” è anche usato in modo improprio anche in campo ultrastrutturale (per indicare i procedimenti con cui si rendono elettrone-opache le strutture al **M.E.**) o nel campo della **microscopia a fluorescenza** (per indicare la procedura con cui le molecole fluorescenti si legano alle strutture cellulari).



Cosa si intende per colorante

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)



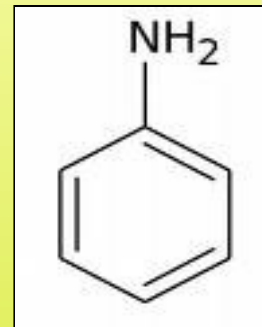
2) **Naturali vegetali**

(es: l'ematossilina ricavata dal legno azzurro)



3) **Artificiali**

(denominati anche colori di anilina)



STRUTTURA DEI COLORANTI

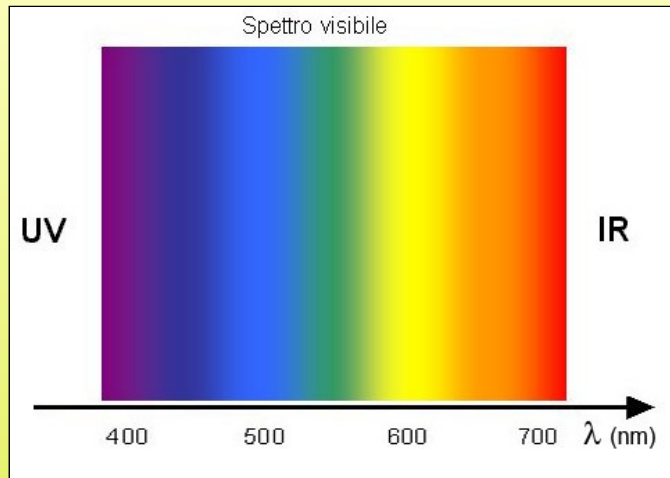
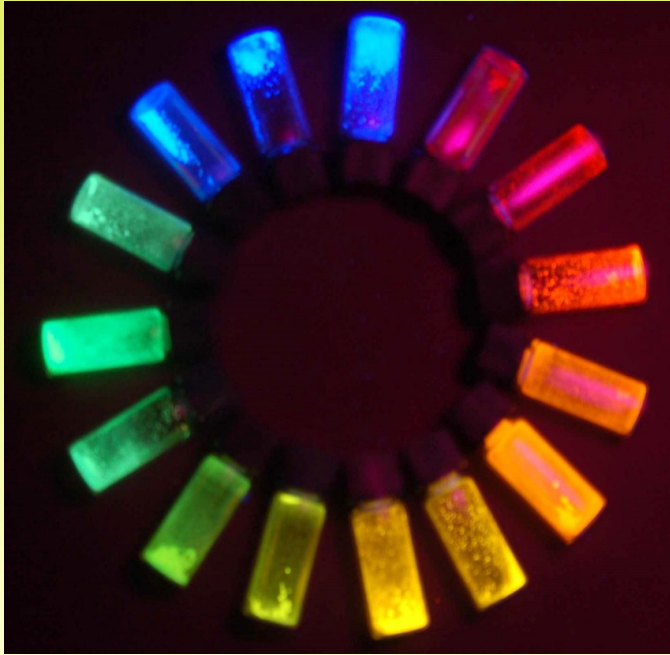
Il **cromoforo** (gruppo di atomi capaci di conferire colore a una sostanza) e l'**auxocromo** (gruppo chimico che introdotto in una sostanza colorata, la trasforma in sostanza in grado di colorare), formano insieme il colorante completo.

Nel caso di “fluorocoloranti”, si parla rispettivamente di fluoroforo e di auxofluoroforo.

CROMOFORO

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) è correlato a quello assorbito.



ESEMPI:

1) una sostanza che appare **giallo-arancione** ha spettro di assorbimento nel **blu-violetto**

2) una sostanza che appare **verde** ha uno spettro di assorbimento nel **rosso**.

AUXOCROMO

L'auxocromo è un gruppo chimico ionizzabile, unito covalentemente al cromoforo. E' responsabile:

- 1) della **solubilità** in acqua del colorante
- 2) della sua **ionizzabilità**
- 3) 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 ($-\text{SO}_3\text{H}$), quello carbossilico ($-\text{COOH}$), quello idrossilico ($-\text{OH}$).

Gli auxocromi **basici** sono il gruppo amminico ($-\text{NH}_2$) ed i suoi derivati ed i metalli.

Colorazione

TIPI DI COLORANTI

Classificati per la natura cationica o anionica dei gruppi reattivi.

COLORANTI NEUTRI

Rosso neutro

COLORANTI BASICI (NH_3^+)  **DNA, RNA (basofile)**
(cationici)

Ematossilina, Blu di metilene, Blu di toluidina

COLORANTI ACIDI (COO^-)  **citoplasma, proteine**
(anionici) **(acidofile)**

Eosina, Trypan Bleu, blu pirrolo

In generale, il principale tipo di legame tra colorante e 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.

METACROMASIA

E' un particolare comportamento di alcuni coloranti basici (blu di toluidina, blu di metilene, Azur I e II, cristal violetto, blu brillante di cresile).

Questo termine 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 (1)

1) colorazioni in blocco: è una colorazione di frammenti di tessuti prima che siano sezionati (es: colorazione di Cayal)

2) colorazioni di sezioni: è la colorazione che avviene dopo che il tessuto è stato sezionato

1) colorazioni dirette: sono quelle in cui il preparato non richiede trattamenti particolari prima di essere immerso nel colorante

2) colorazioni indirette: sono quelle in cui la colorazione deve essere preceduta da una mordenzatura (trattamento con sostanze chimiche per facilitare i legami)

1) colorazioni progressive (ad esempio l'ematossilina di Ehrlich, di Mayer e di Harris): hanno una concentrazione più bassa 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

Modalità di esecuzione delle colorazioni (2)

1) colorazioni semplici: si usa un solo colorante

2) colorazioni complesse: si usa più di un colorante contemporaneamente o in successione l'uno dopo l'altro

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

- **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 due gruppi:

1. Colorazioni **istomorfologiche** (nucleo, citoplasma, tessuto epiteliale, collagene, ecc...)
2. Colorazioni **istochimiche** (per mettere in evidenza le sostanze chimiche contenute nei tessuti e la loro posizione)

Colorazione

I coloranti sono soluzioni acquose: i tessuti devono essere idrofili
Le sezioni incluse in paraffina sono idrofobe: per poterle colorare, la paraffina deve essere allontanata: **REIDRATAZIONE** per immersione del vetrino negli alcoli presenti in contenitori speciali, forniti di scanalatura all'interno per potervi inserire, in verticale, i vetrini in verticale:

Xilolo

Xilolo/Etanolo (50%-50%)

Etanolo 100%

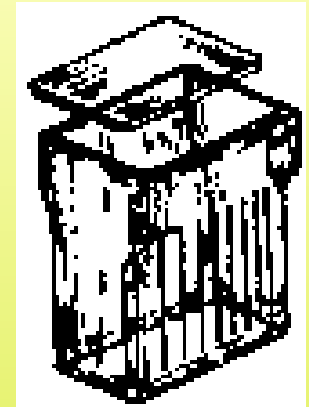
Etanolo 95%

Etanolo 70%

Etanolo 50%

Acqua distillata

COLORAZIONE



Montaggio

Colorazione (la sezione è idratata)

Chiusura del preparato con vetrino copri-oggetto

Resine naturali o sintetiche: balsamo del Canada.

Ma il balsamo non è miscibile con l'acqua (ma è ben miscibile con lo xilolo).

DISIDRATAZIONE

Acqua distillata

Etanolo 70%

Etanolo 90%

Etanolo 95%

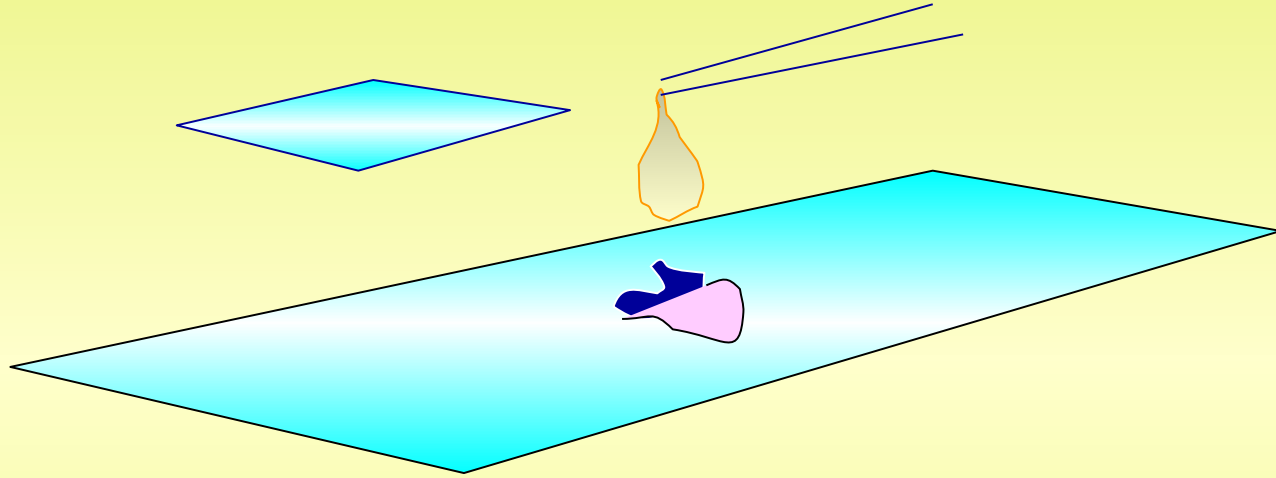
Etanolo 100%

Etanolo/Xilolo (50%-50%)

Xilolo

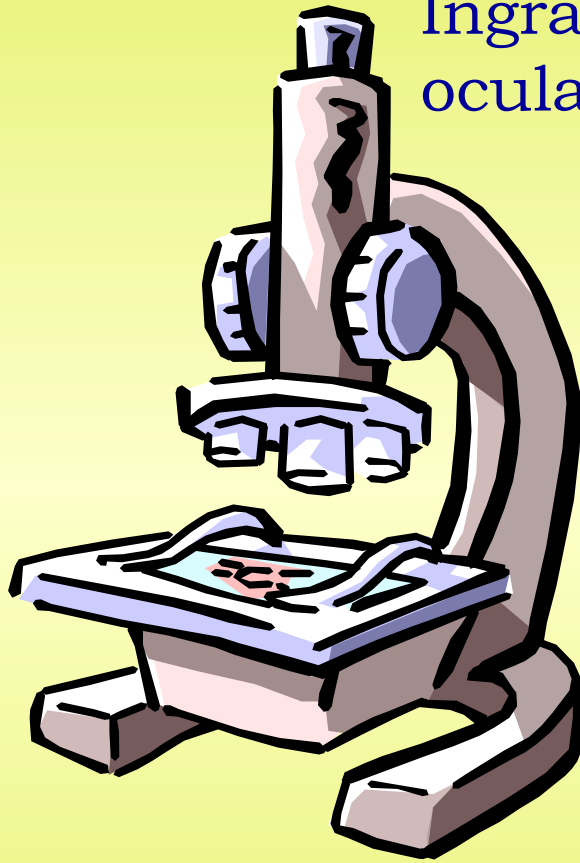
Montaggio

Sulle sezioni umide di xilene viene fatto gocciolare da una bacchettina di vetro qualche goccia di balsamo del Canada.



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.

Osservazione



Ingrandimento
oculare: 10X

Ingrandimenti
obiettivi: 4X - 10X - 40X - 100X

Ingrandimento finale: Ingr. oculare $\times$ Ingr. obiettivo
40X - 100X - 400X - 1000X

Osservazione

L'aumento delle dimensioni è tanto maggiore quanto maggiore sarà il potere risolutivo del microscopio, cioè la sua capacità di dare immagini distinte di due punti dell'oggetto molto vicini fra loro. Ogni microscopio ha un **limite di risoluzione**, la minima distanza alla quale due punti risultano distinti tra loro. (circa $0,2\ \mu\text{m}$)

$1\ \mu\text{m}$ corrisponde alla millesima parte di $1\ \text{mm}$, il limite di risoluzione del microscopio è circa 5000 volte inferiore a $1\ \text{mm}$

Microscopio ottico

