

ISTOCHIMICA



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).

ISTOCHIMICA:

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**

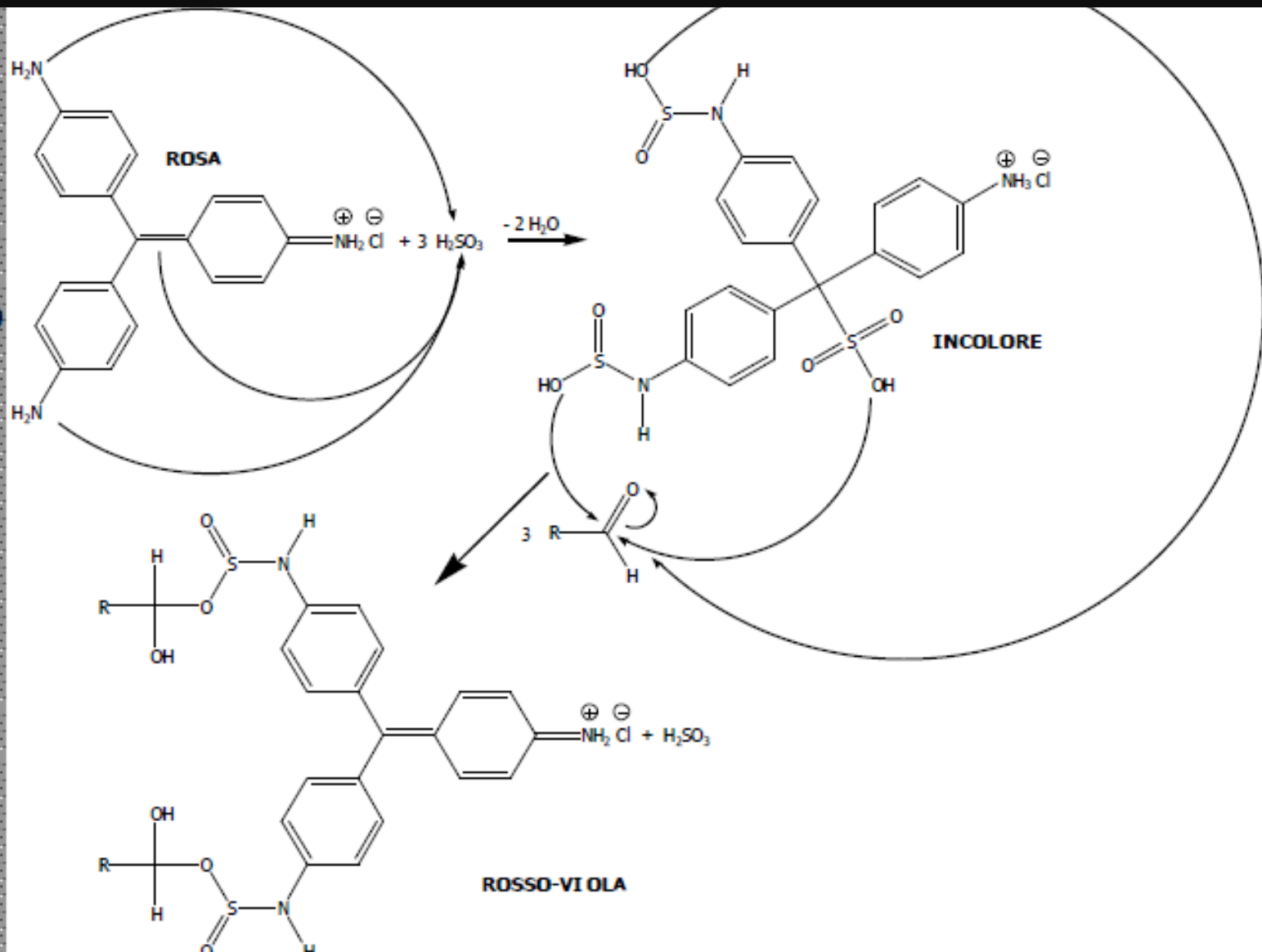
Le reazioni istochimiche possono essere classificate anche come:

- 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 SO_2 in eccesso, dà luogo a un prodotto colorato (rosso magenta). Ci sono vari metodi per preparare questo reattivo (metodo di Lison ecc).

Meccanismo della reazione di Schiff



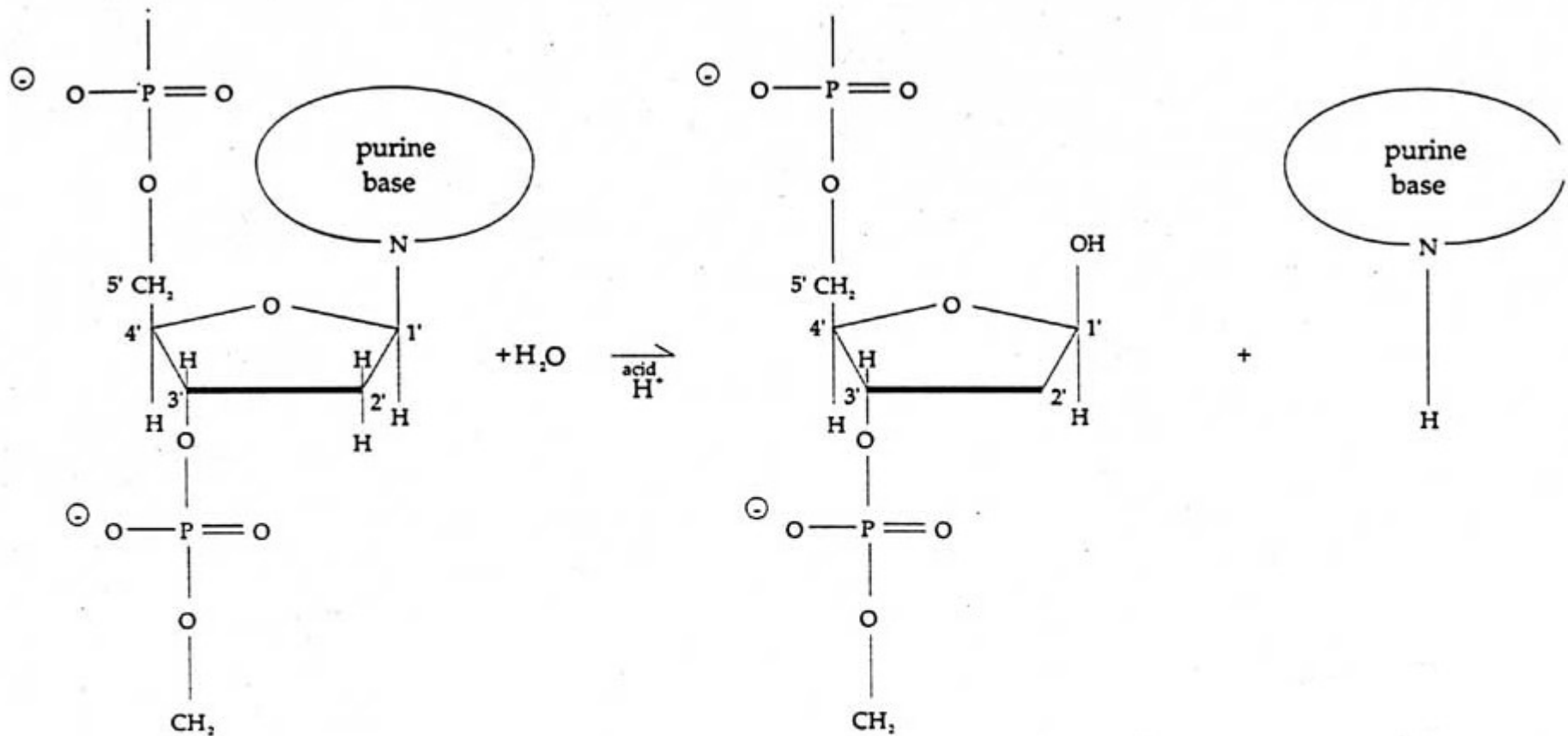
ACIDI NUCLEICI E NUCLEOPROTEINE:

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:



A

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 :

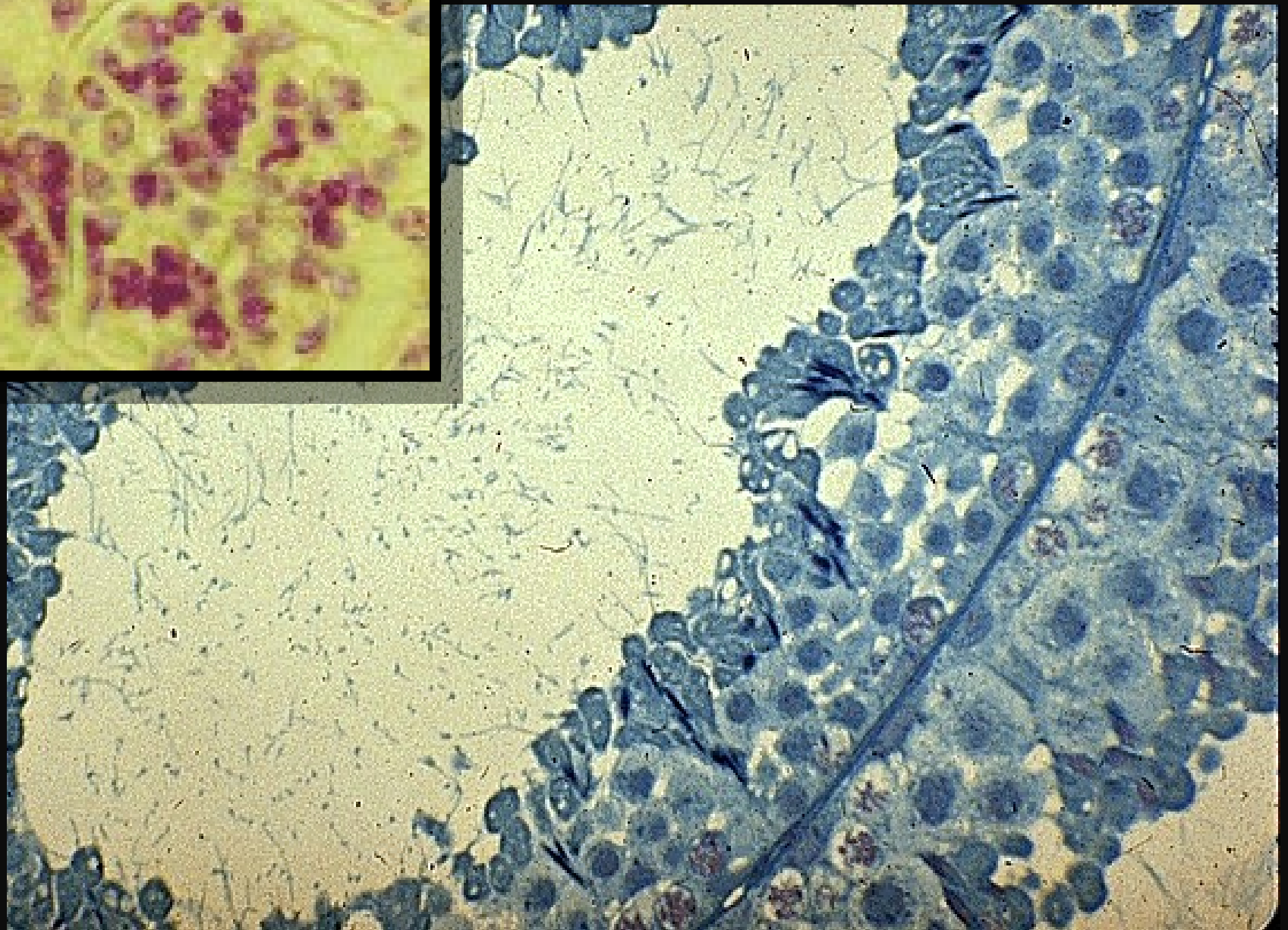
DNA → **rosso magenta** (in modo elettivo)

(Citoplasma → **verde** se uso il light green come contrasto)

REAZIONE DI FEULGEN:

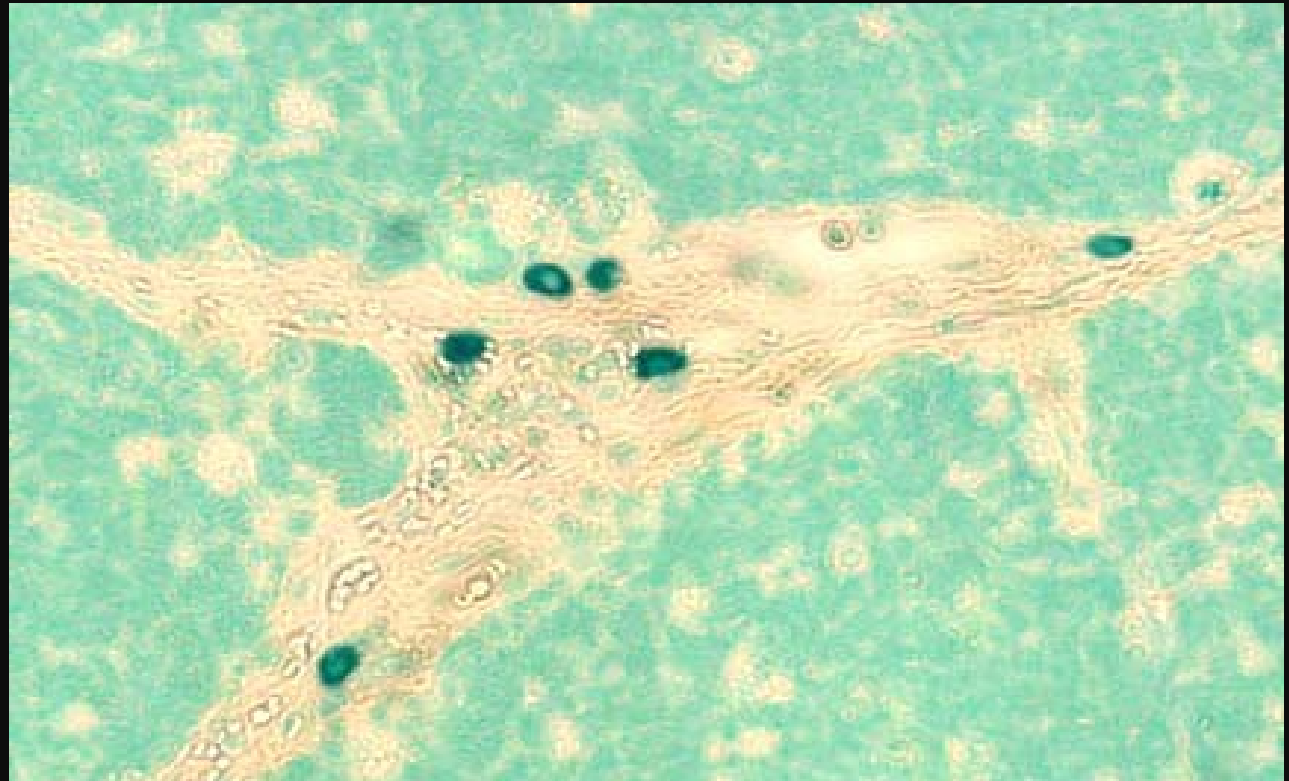
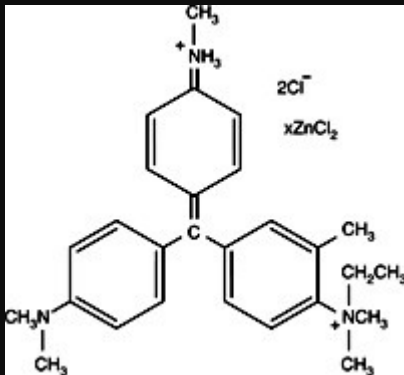
- sezioni in H₂O distillata
- idrolisi in HCl 1 N a 60 °C per un tempo ottimale in relazione al fissativo usato da 4' a 25' (*usare anche HCl 5N a RT*) (10')
- lavare in HCl 1 N freddo e poi in H₂O distillata
- reattivo di Schiff (40' - 60')
- lavare in metabisolfito di sodio (2')
- lavare in H₂O (15')
- contrasto citoplasmatico con verde luce (1')
- lavare in H₂O (2')
- disidratare in etanolo 95° (4')
- disidratare in etanolo 100° (4') (3 cambi)
- chiarificare in xilolo (3 cambi)
- montare in mezzo d'inclusione (*Entellan* o *balcama Canada*)

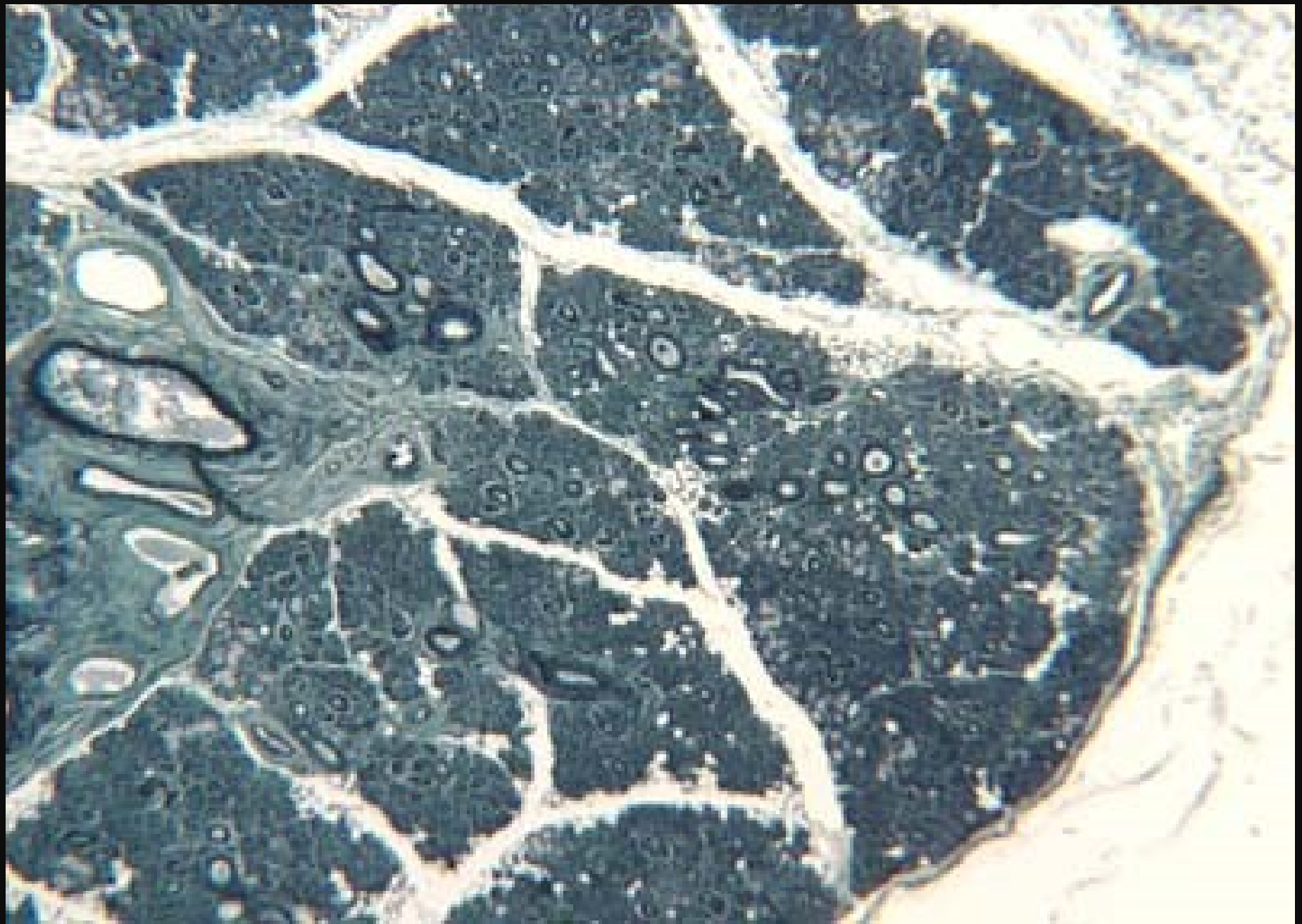




COLORAZIONE CON VERDE DI METILE:

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.





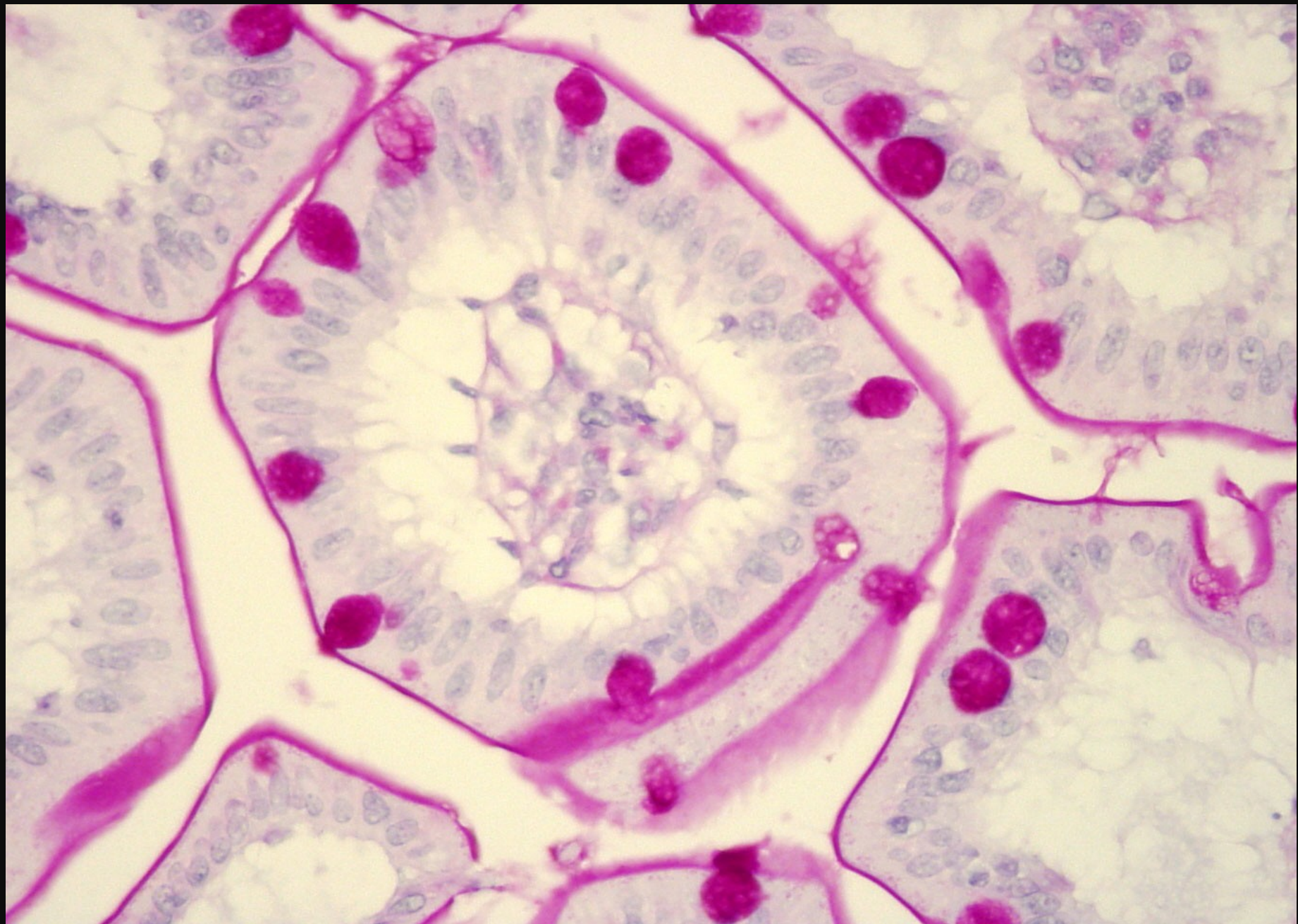
CARBOIDRATI (REAZIONE PAS):

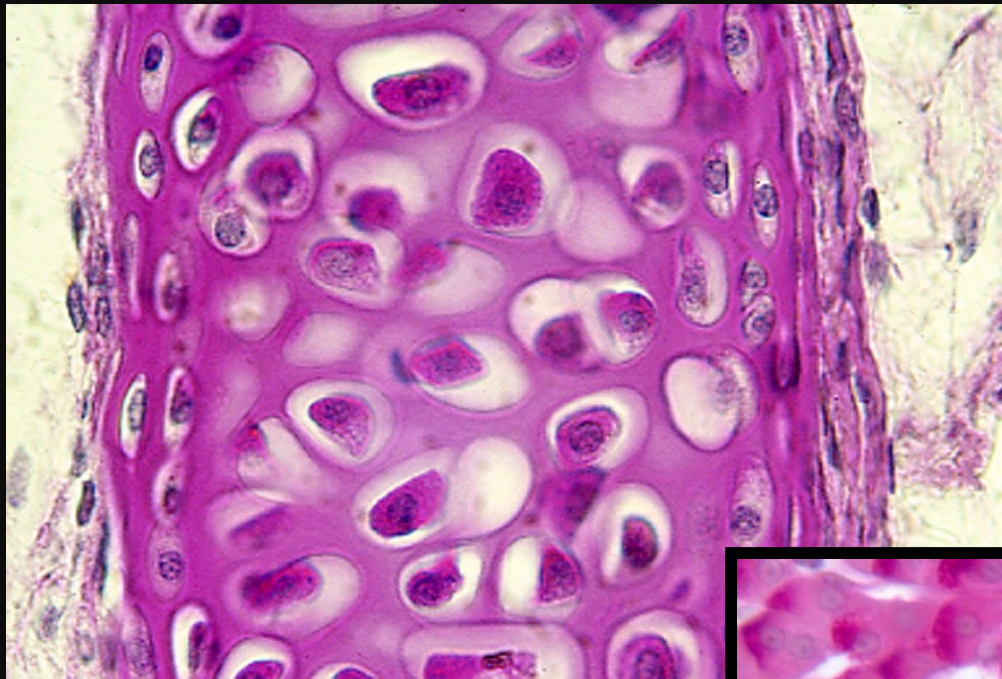
Per la dimostrazione dei glicidi si utilizza la **reazione PAS** (dell'acido periodico di Schiff). Il metodo si fonda sul seguente principio: i polisaccaridi (semplici e mucopolisaccaridi), quando ossidati a mezzo dell'acido periodico (H_5IO_6), danno origine ad aldeidi. I gruppi aldeidici vengono quindi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

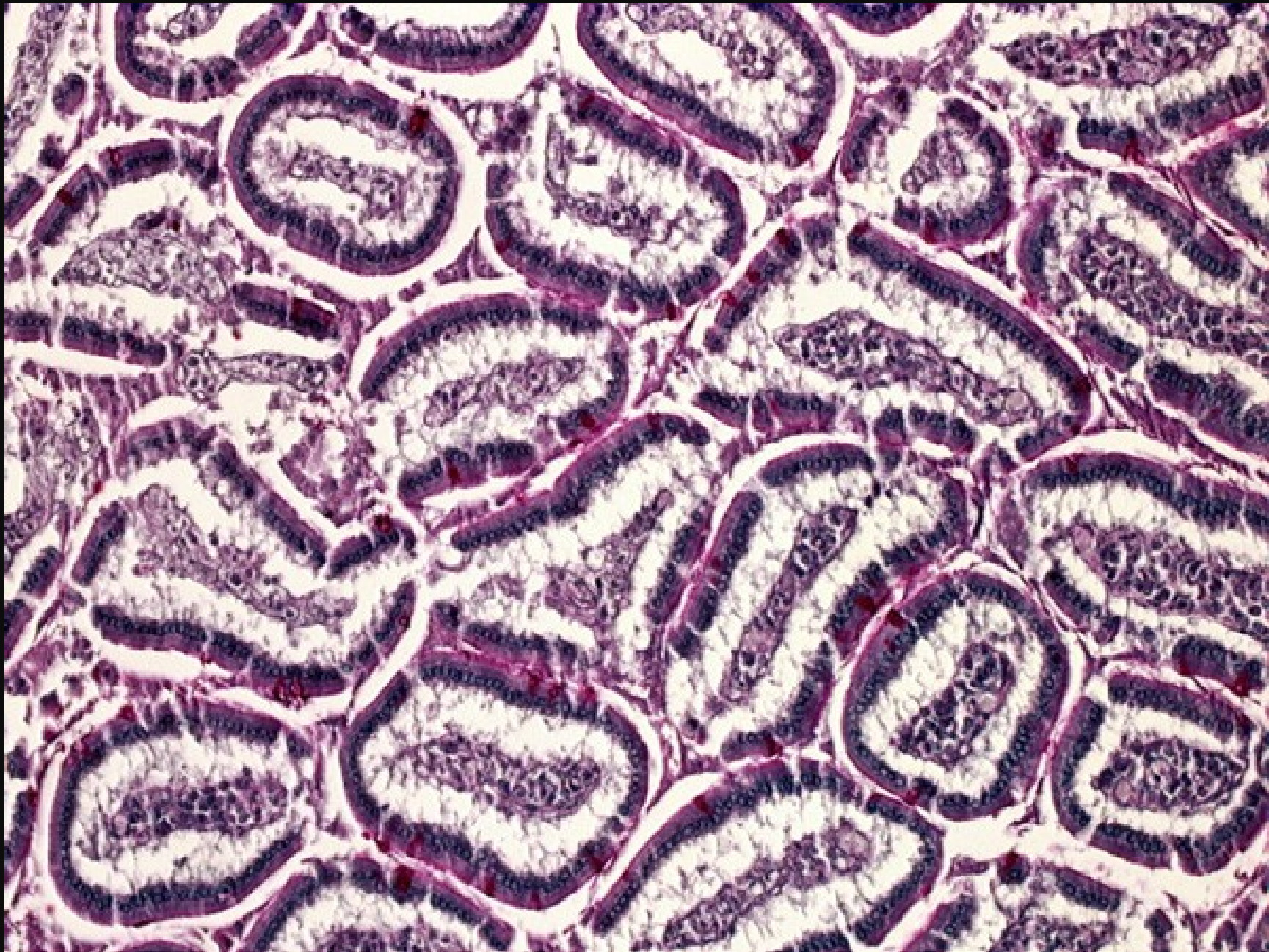
Risultati:

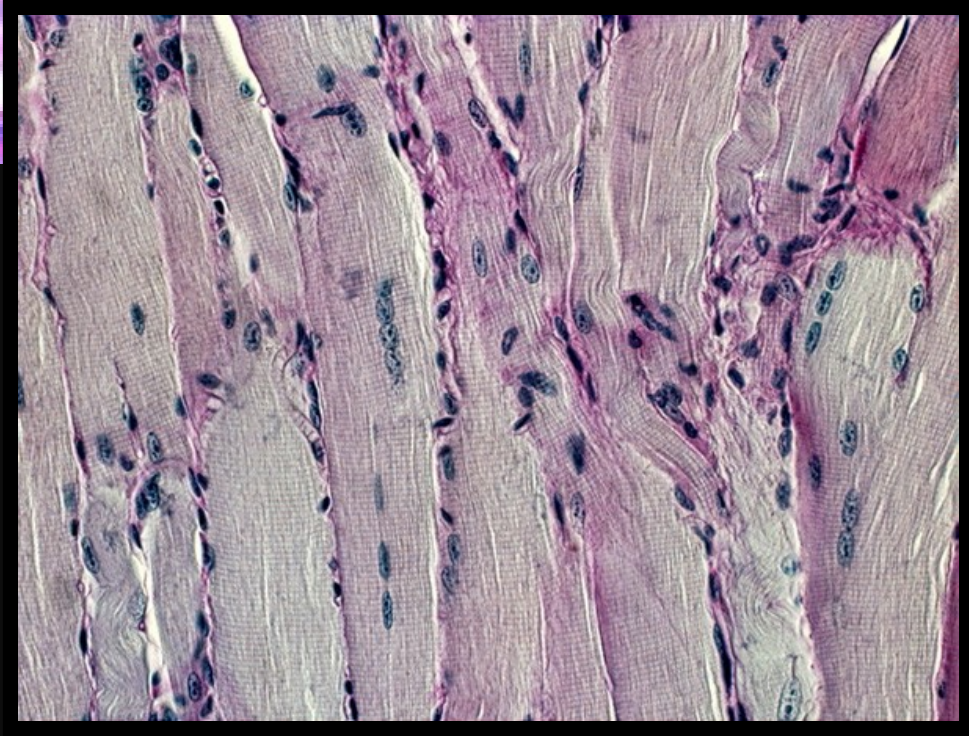
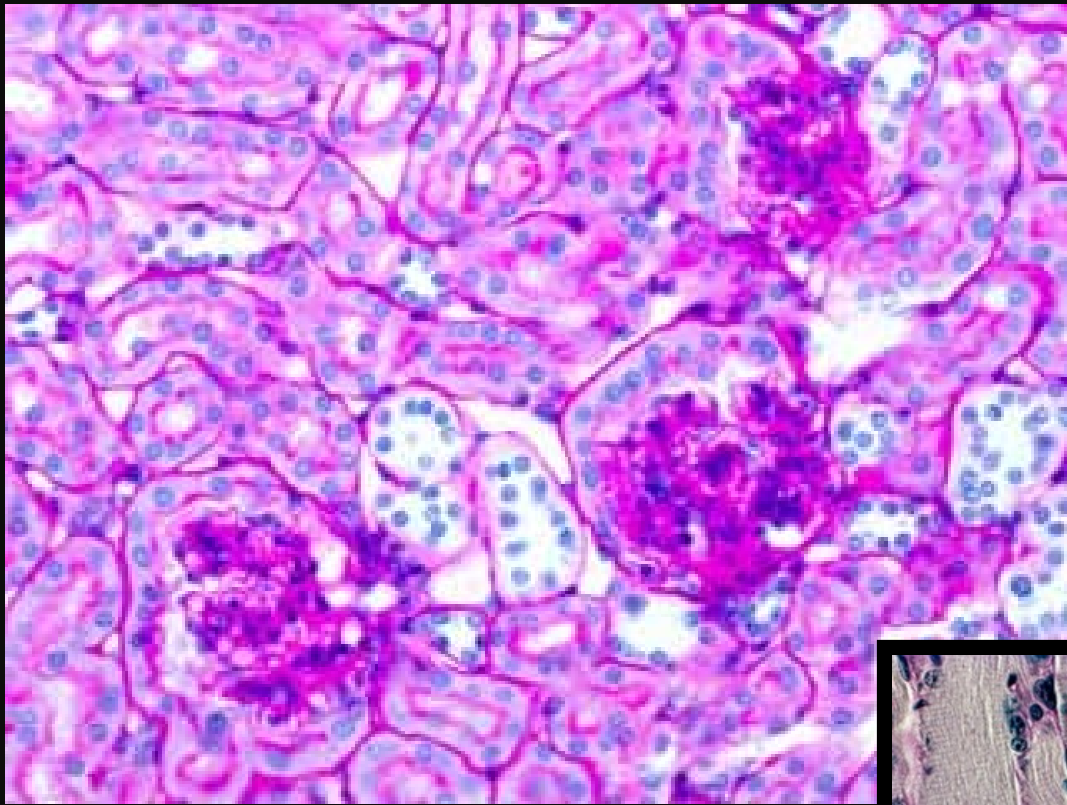
Sostanze PAS-positive → **rosso magenta**

Nuclei → **viola-blu**









REAZIONE PAS:

La reazione del 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 sfingomieline, 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 all'uso 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.

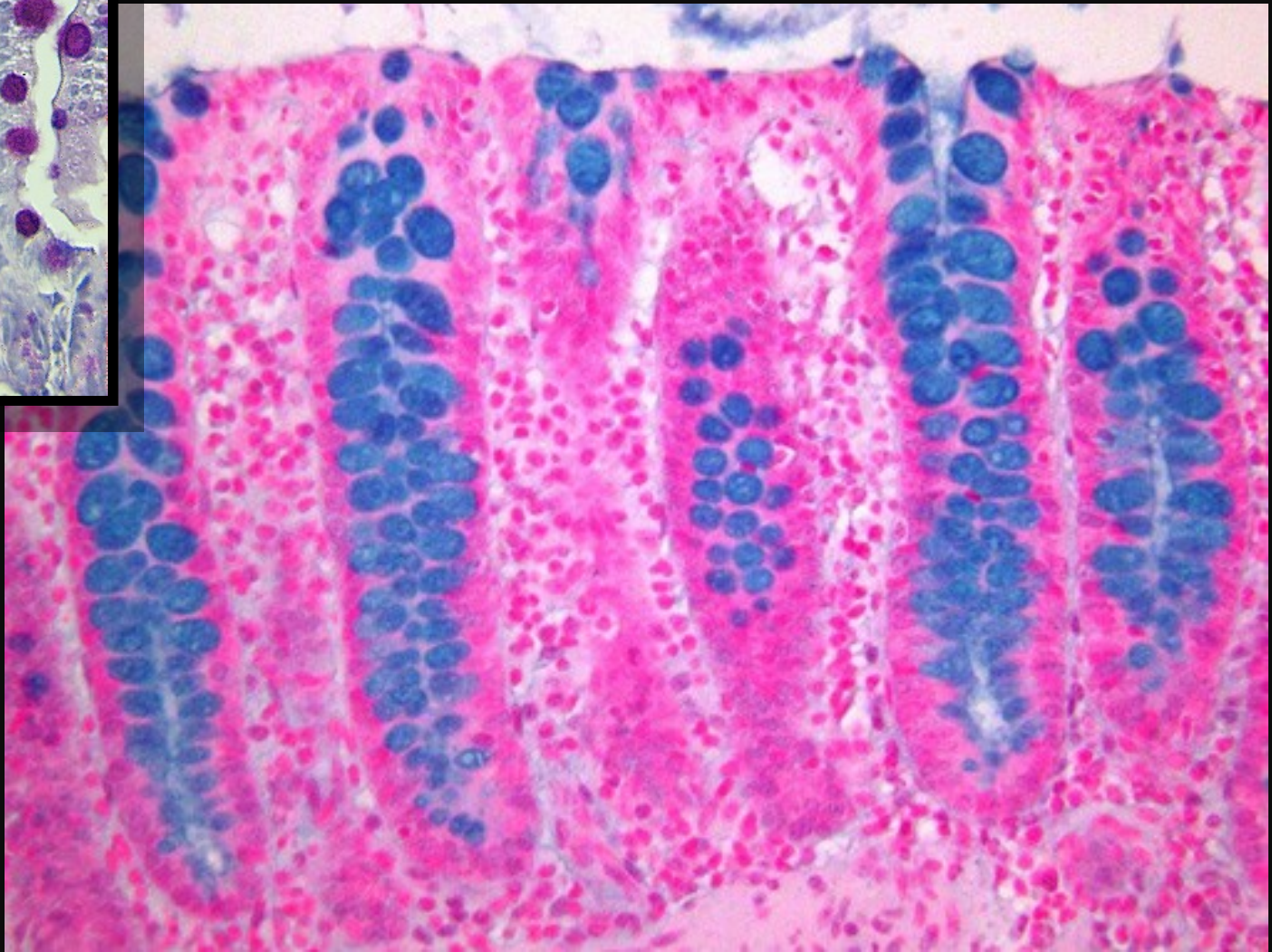
Nel metodo a pH 2,5 il colorante viene trasformato nel pigmento Monastral blu con una soluzione di sodio tetraborato, questo pigmento è insolubile e si presta quindi ad ulteriori manipolazioni senza peraltro diffondere nel tessuto (Alcian blu - PAS).

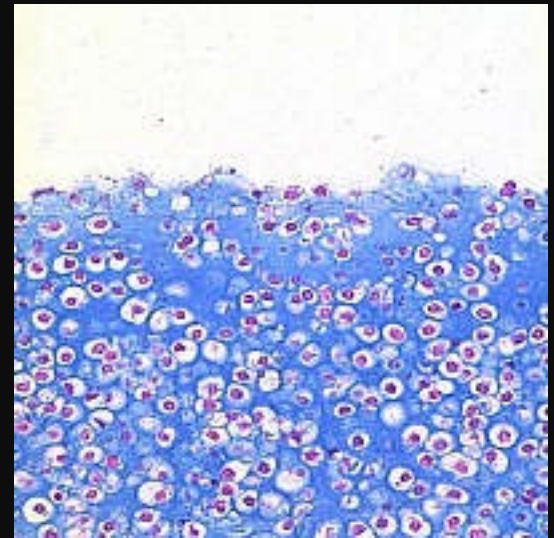
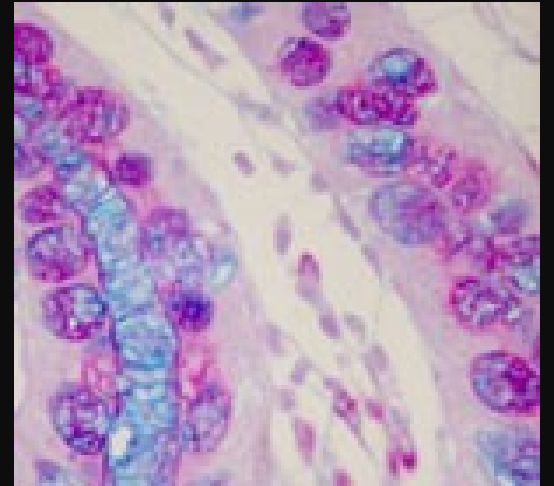
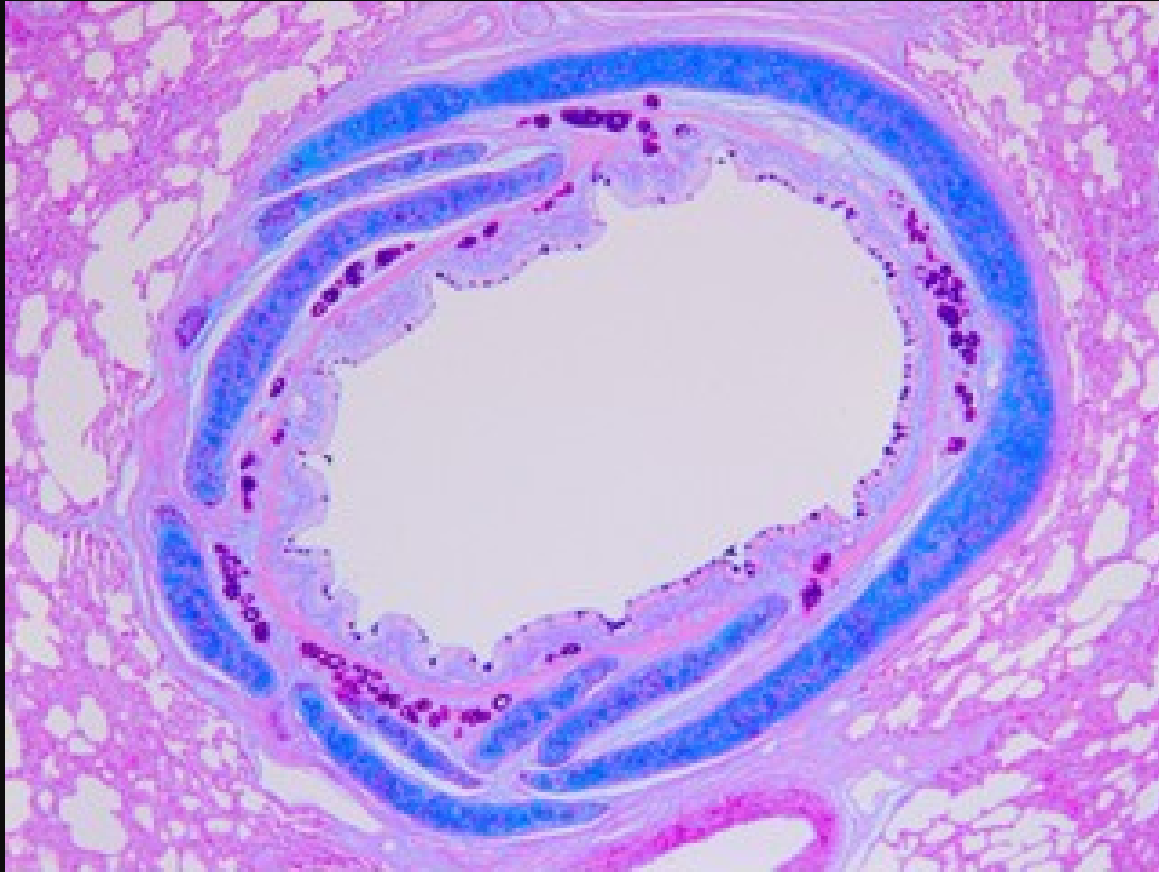
I polianioni con i quali l'Alcian blu reagisce sono costituiti da radicali solforici e carbossilici (i radicali fosfati degli acidi nucleici non reagiscono), di conseguenza reagiscono solo le mucine acide.

Risultati:

Mucopolisaccaridi acidi → blu - turchese

Nuclei → rosso



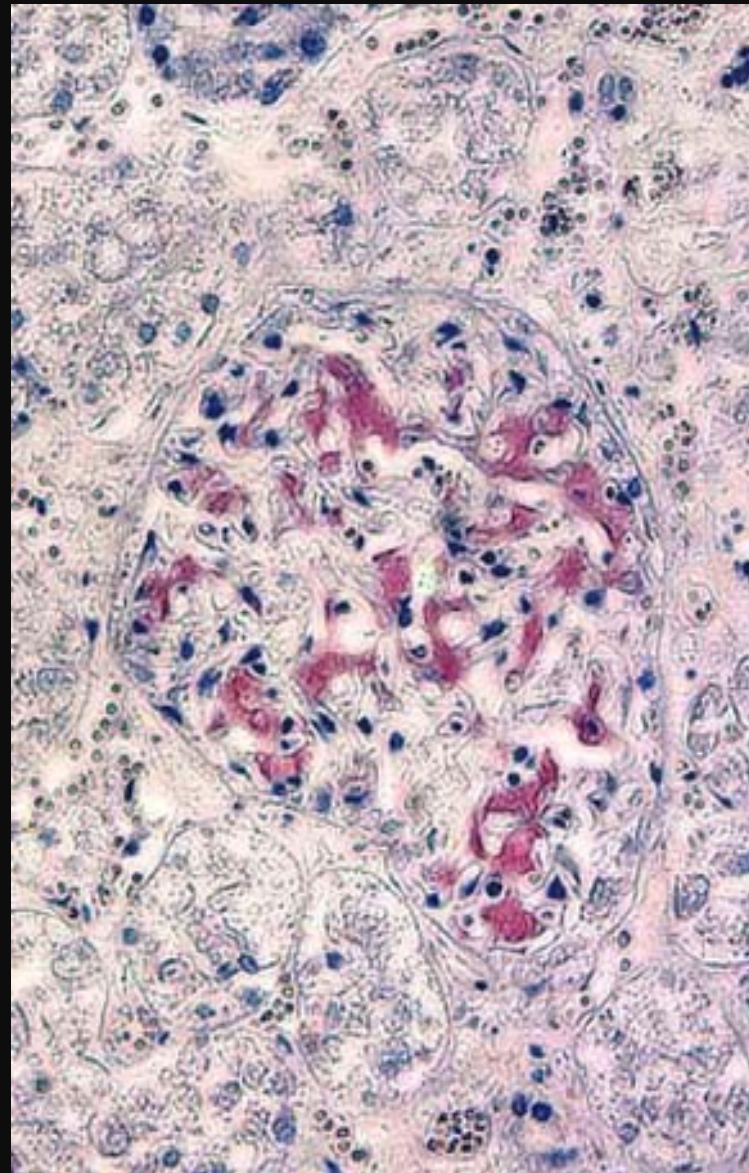
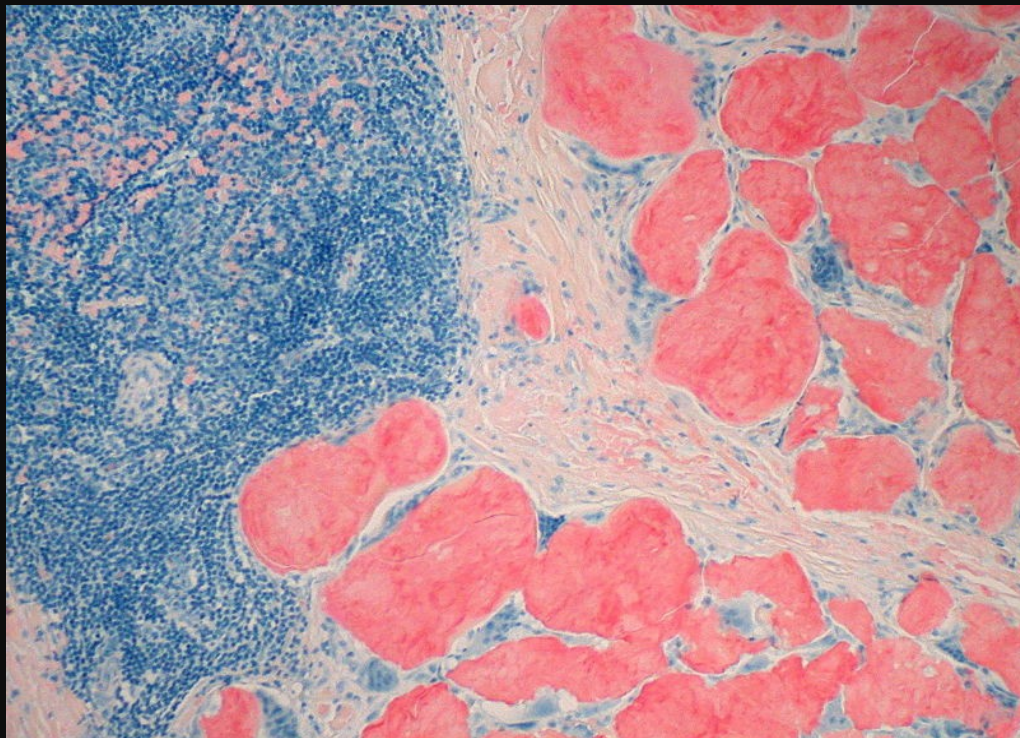
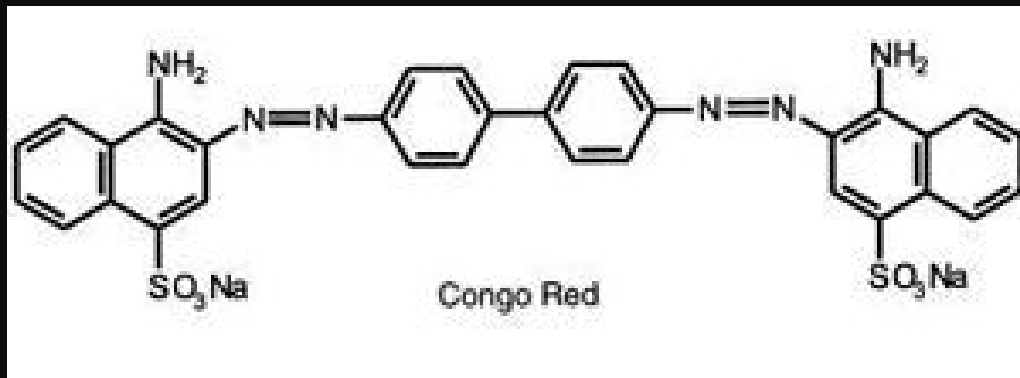


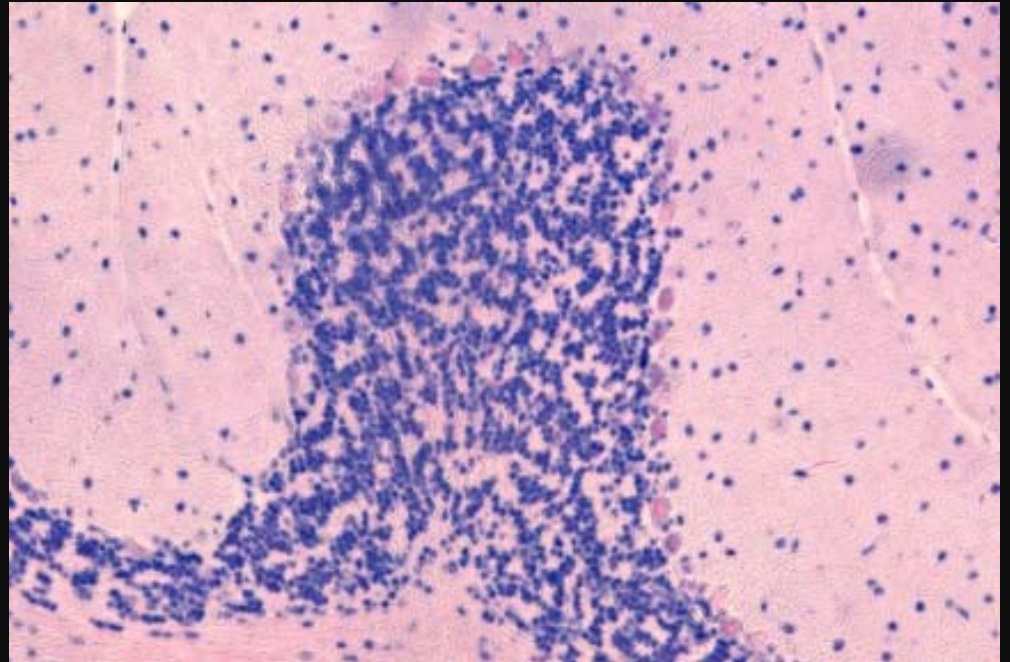
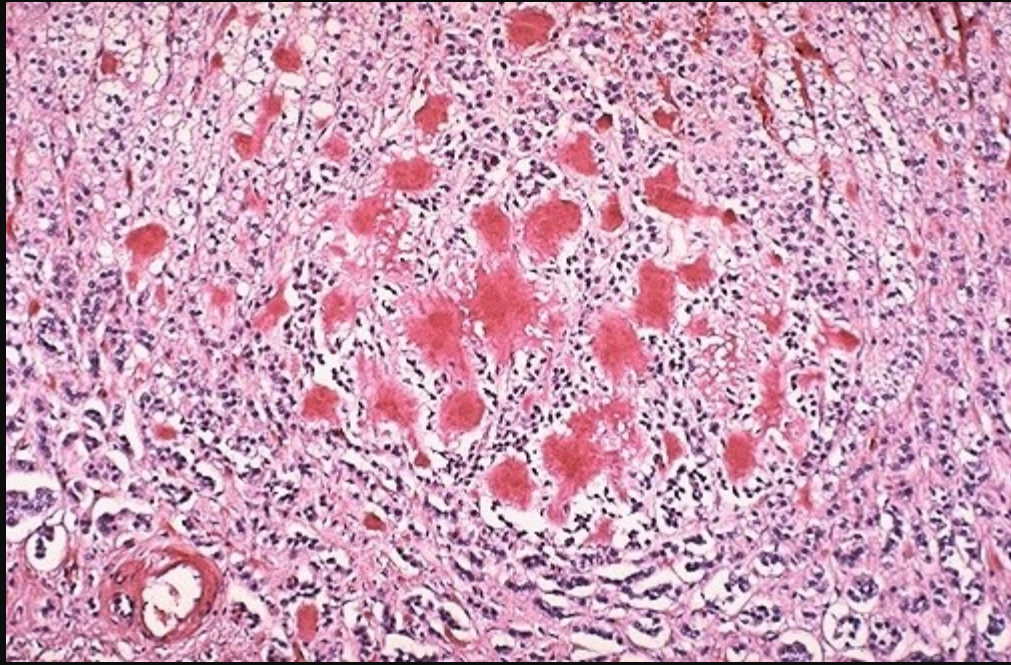
METODI PER RILEVARE L'**AMILOIDE**:

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 .

La ***METACROMASIA*** è una proprietà di alcuni coloranti basici come quelli dell'anilina (tiazine, blu di toluidina, violetto di genziana) di virare dal colore originario venendo a contatto con determinate sostanze polianioniche (dette metacromatiche).

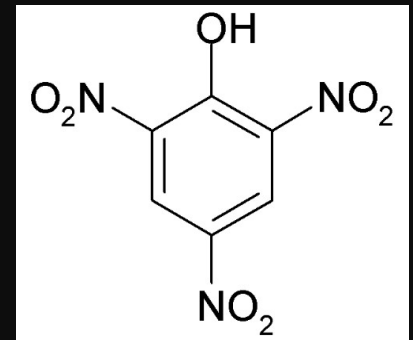
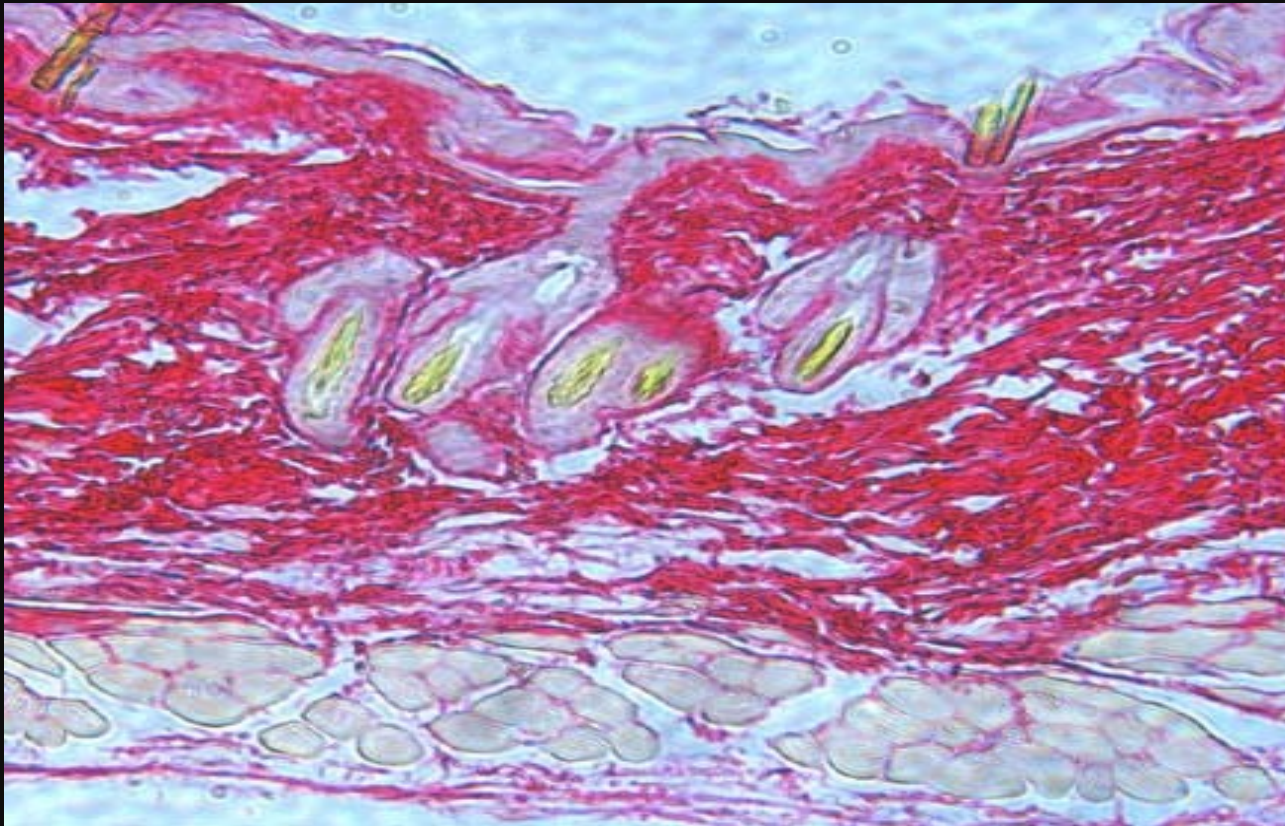
ROSSO CONGO PER L'AMILOIDE



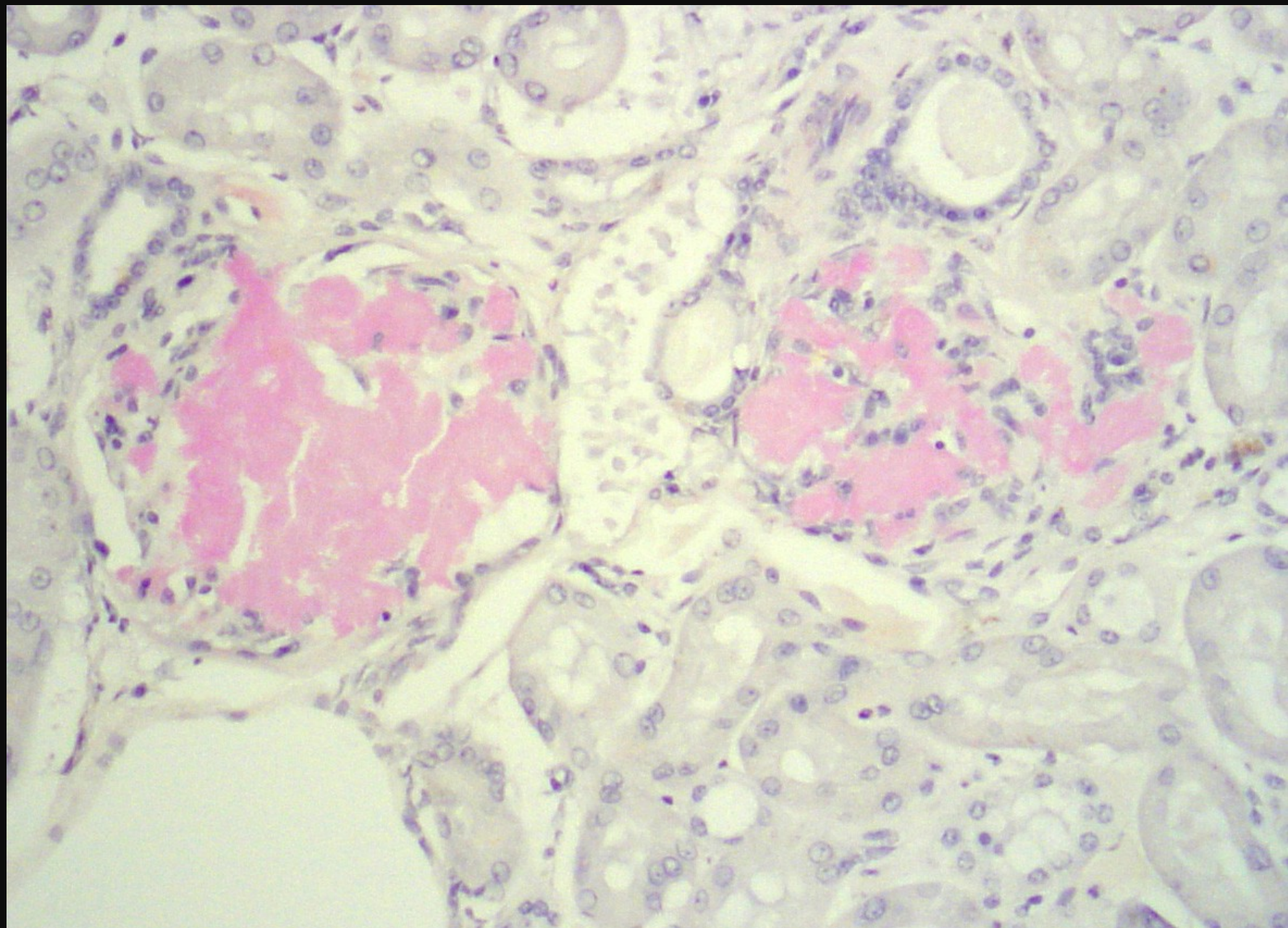


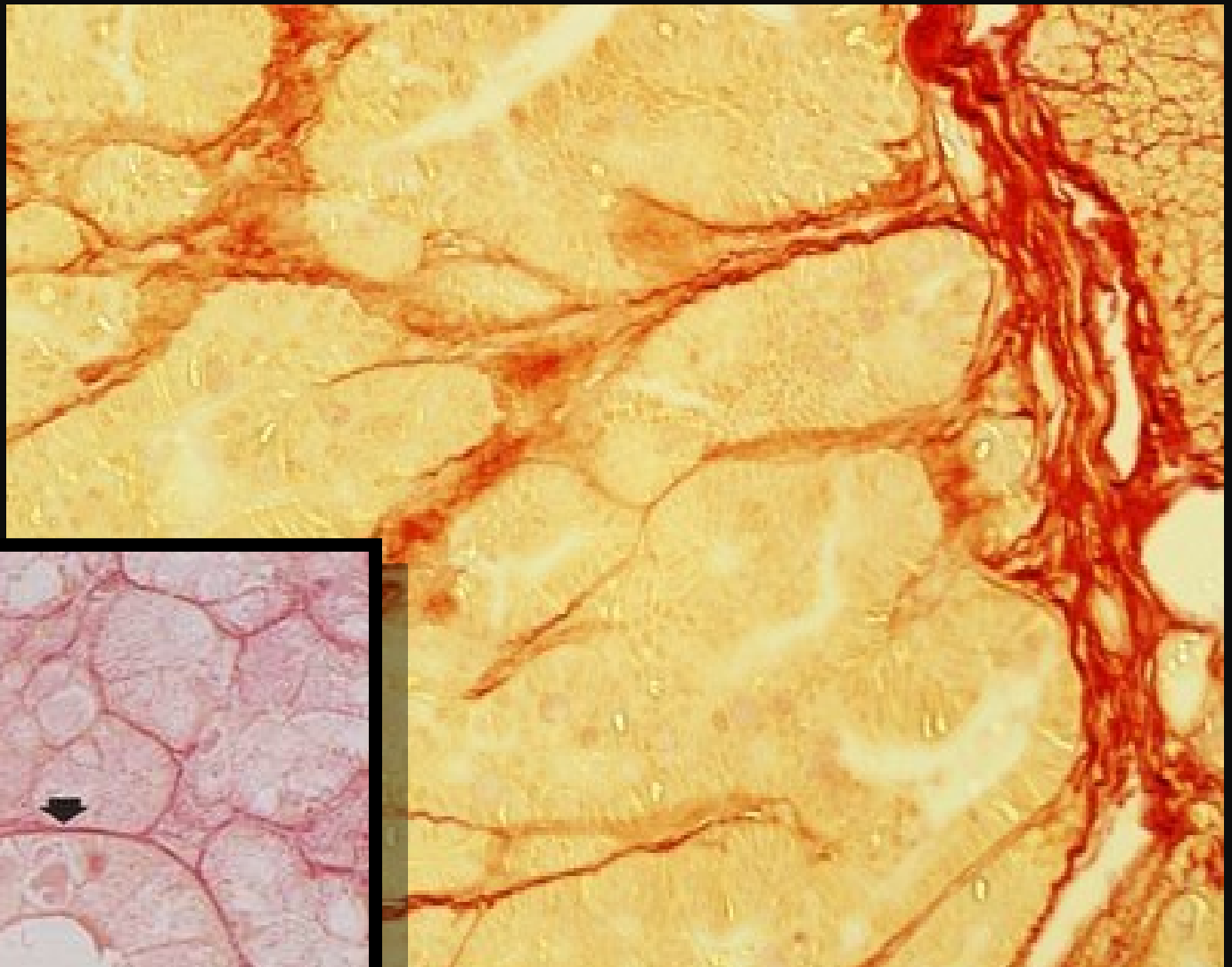
Picro-Sirius RED

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.



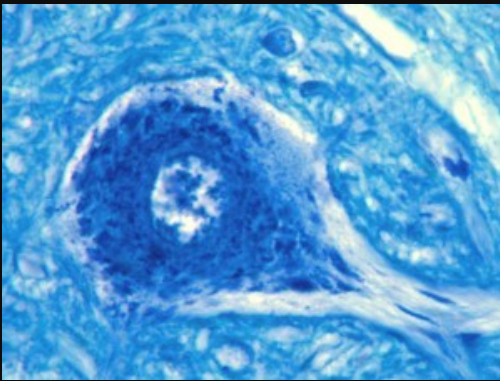
Acido picrico





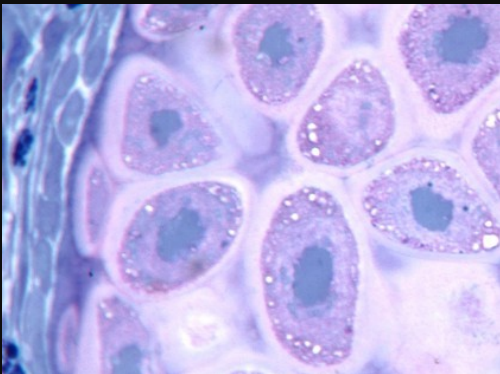
BLU DI TOLUIDINA:

È un colorante basofilo. 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.



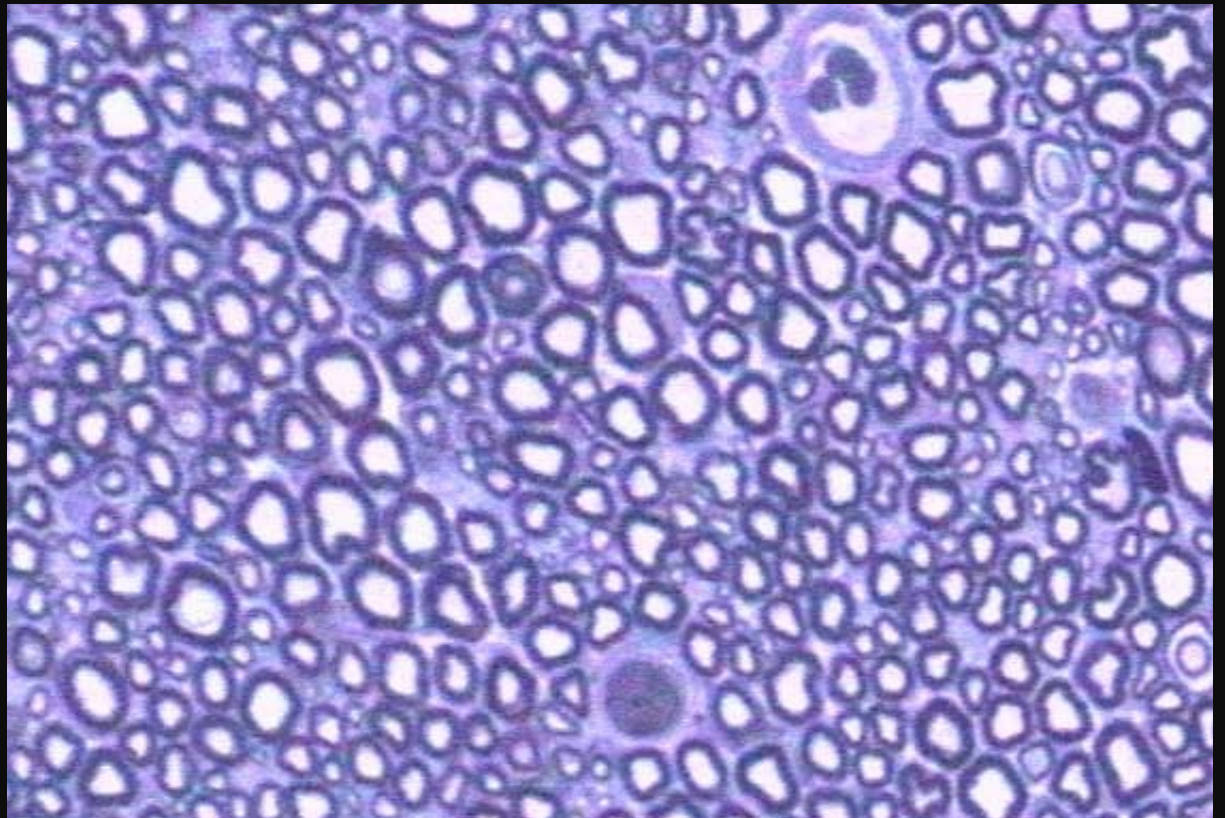
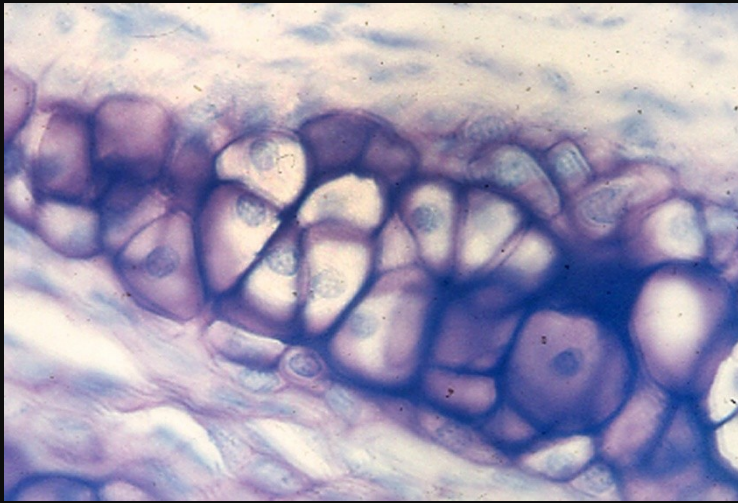
Come colorante ortocromatico, si usa frequentemente per il tessuto nervoso, dove colora la cromatina e i corpi di Nissl.

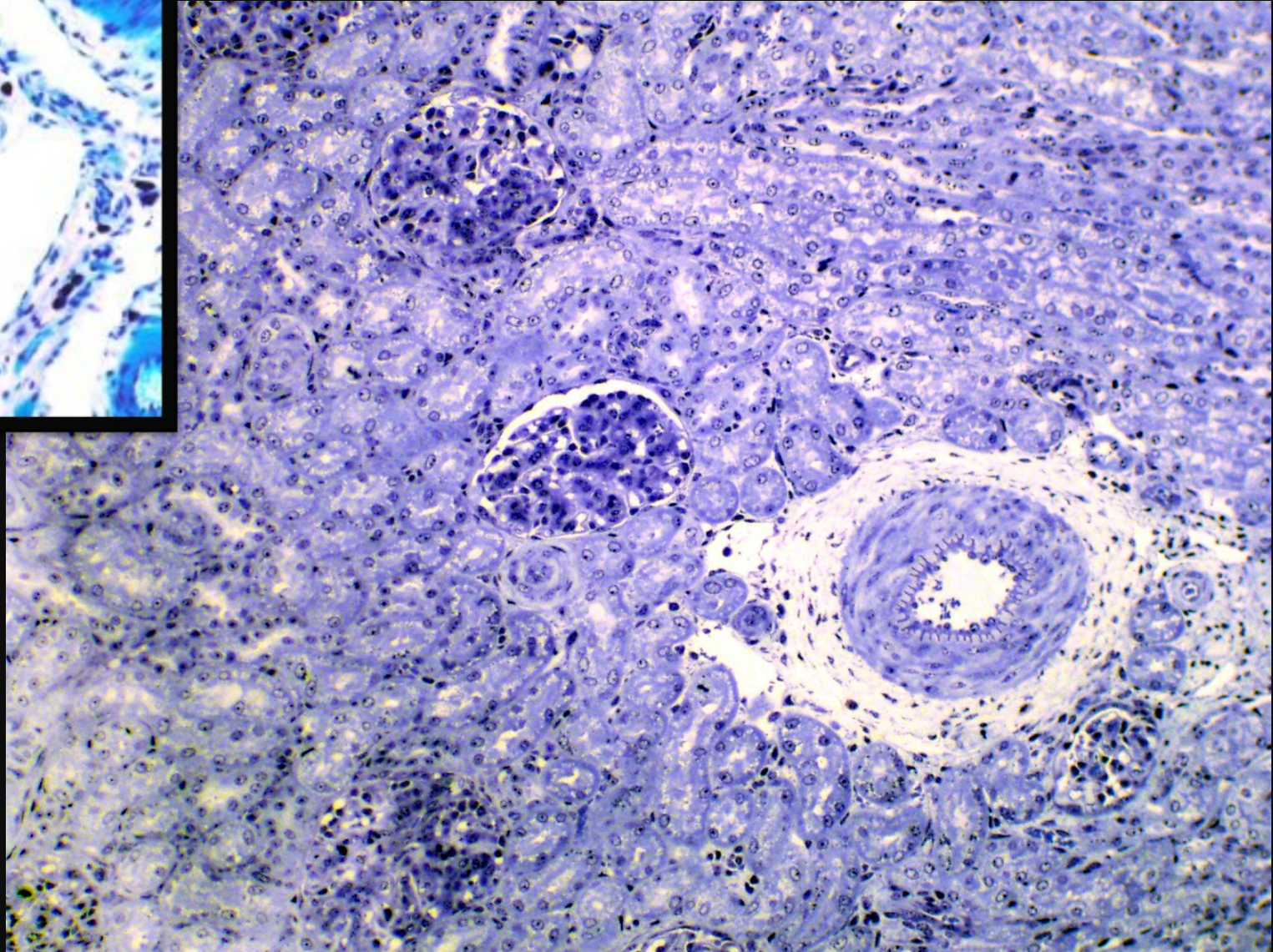
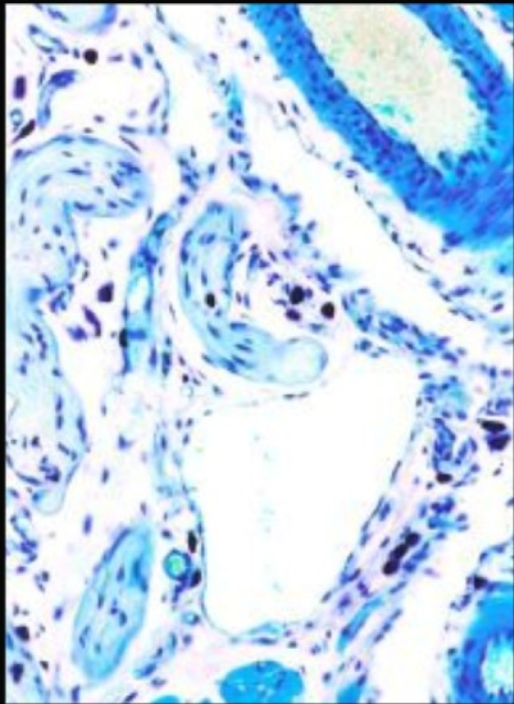
Risultati: strutture basofile → azzurre



Il blu di toluidina colora metacromaticamente le strutture ricche di proteoglicani solfatati (per esempio la cartilagine).

Risultati: strutture metacromatiche → violetto





Dimostrazione dei **LIPIDI** mediante coloranti lisocromi:

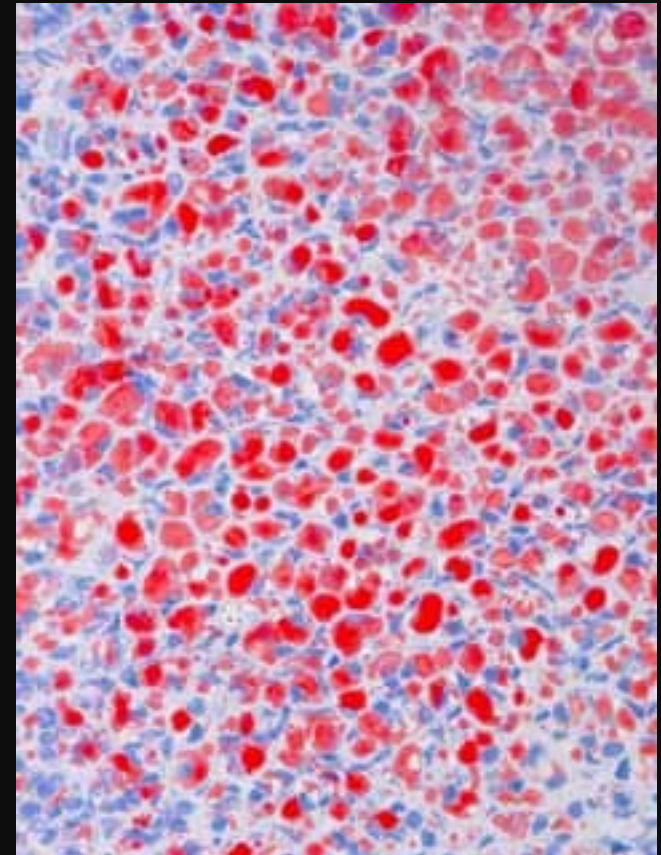
La colorazione dei lipidi mediante coloranti liposolubili (lisocromi) si basa sulla ripartizione di colore tra il solvente e il lipide.

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.

METODO DELL' OIL RED O

- sezioni in H₂O distillata
- immergere in alcool isopropilico 60 % (5')
- soluzione di Oil Red O [0,5 % in 200 ml di alcool isopropilico 100°] agitata a caldo e filtrata (20')
- differenziare in alcool isopropilico (20'')
- lavare in H₂O di fonte (5')
- eventuale colorazione nucleare con ematossilina
- lavare in H₂O di fonte
- montare in glicerina

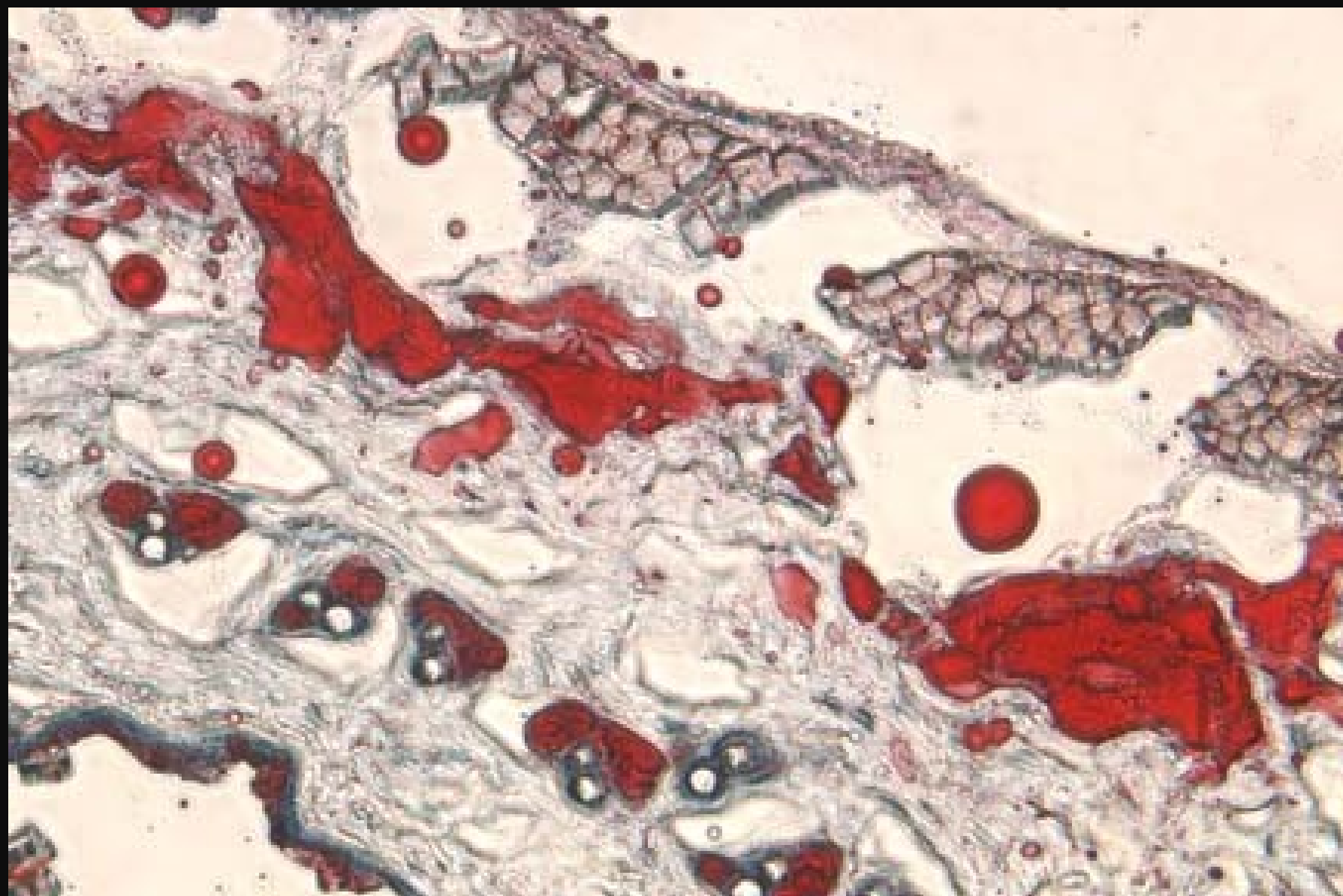


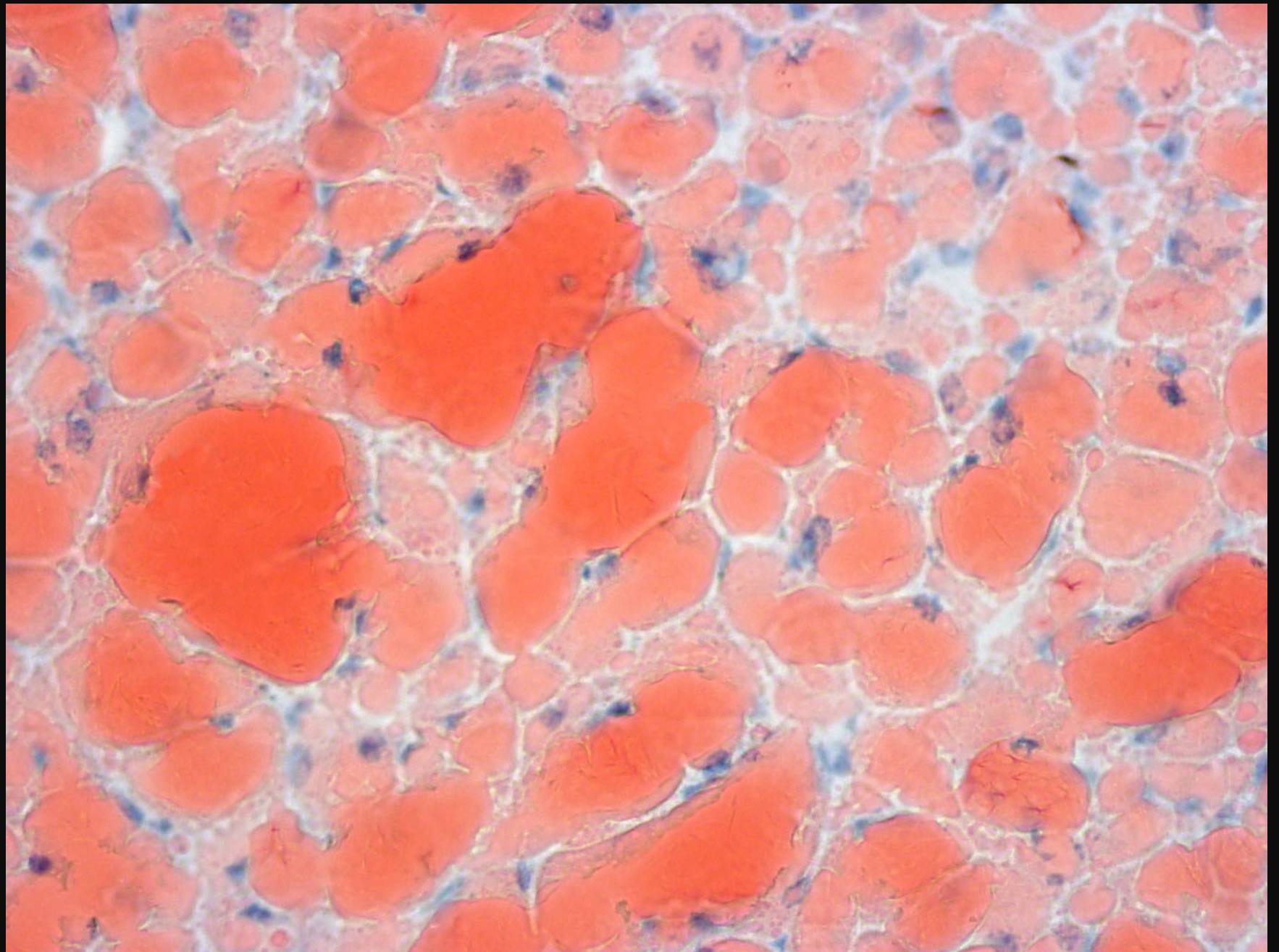
Risultati :

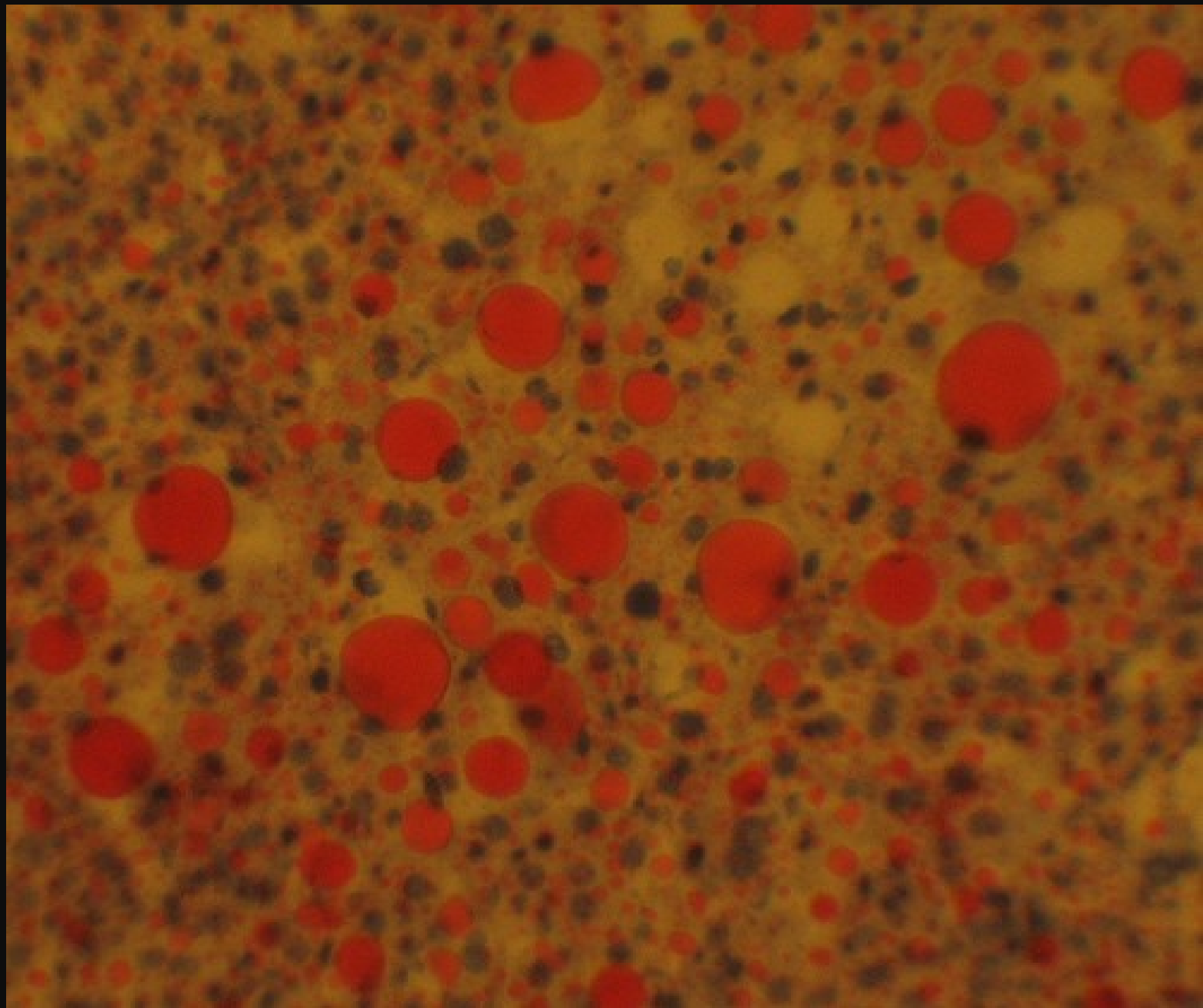
lipidi neutri ed esteri del colesterolo → rosso

fosfolipidi → rosa pallido

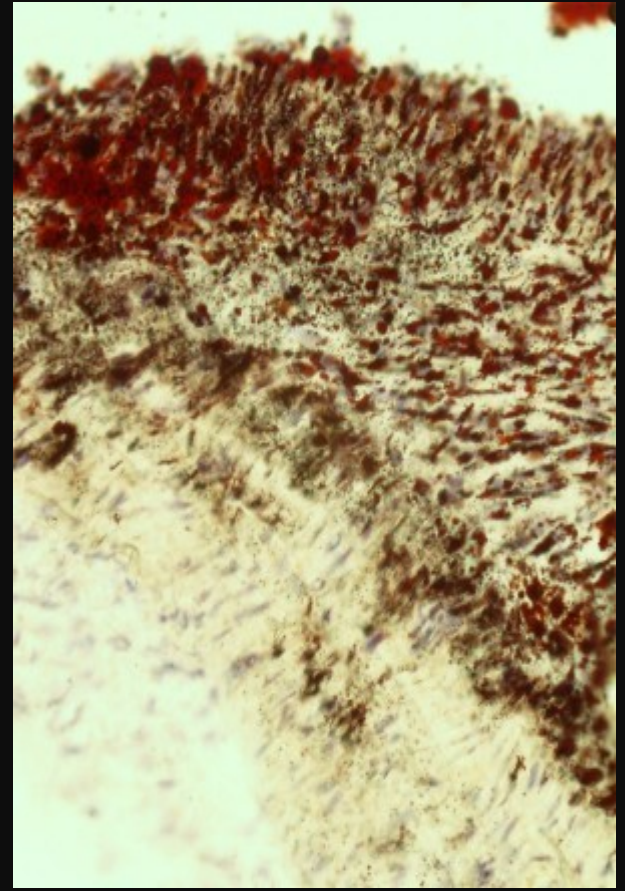
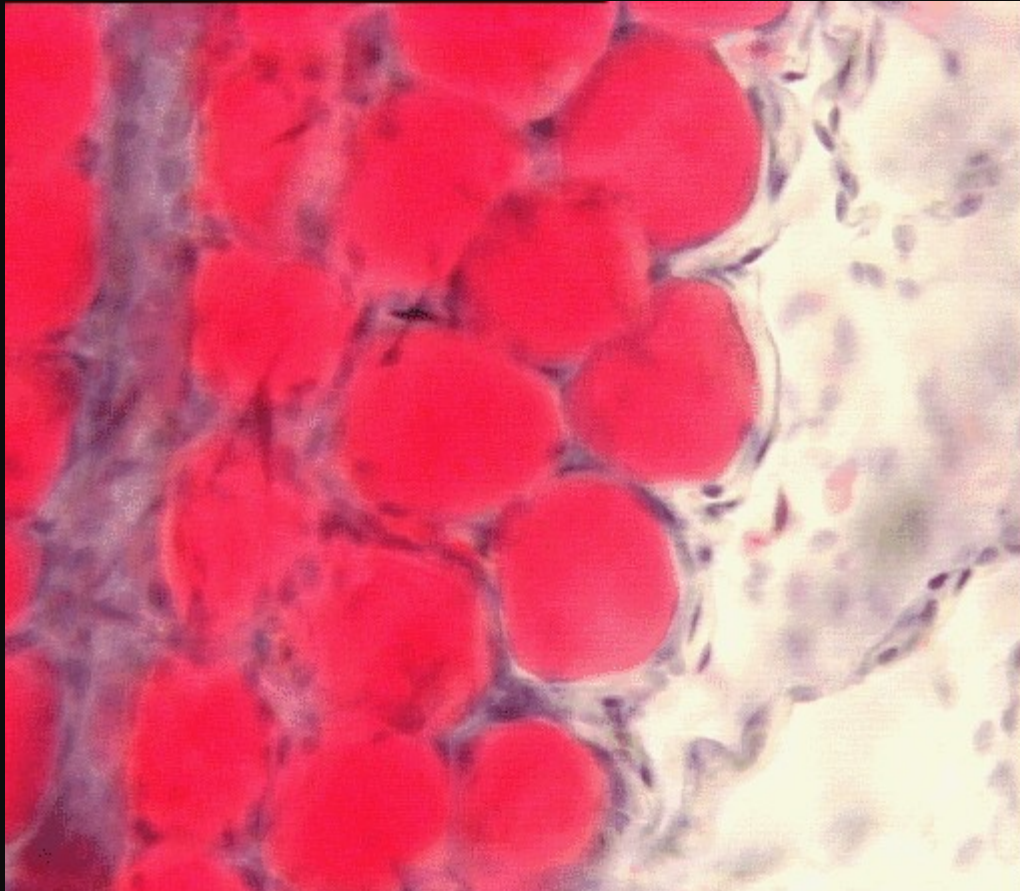
nuclei → blu



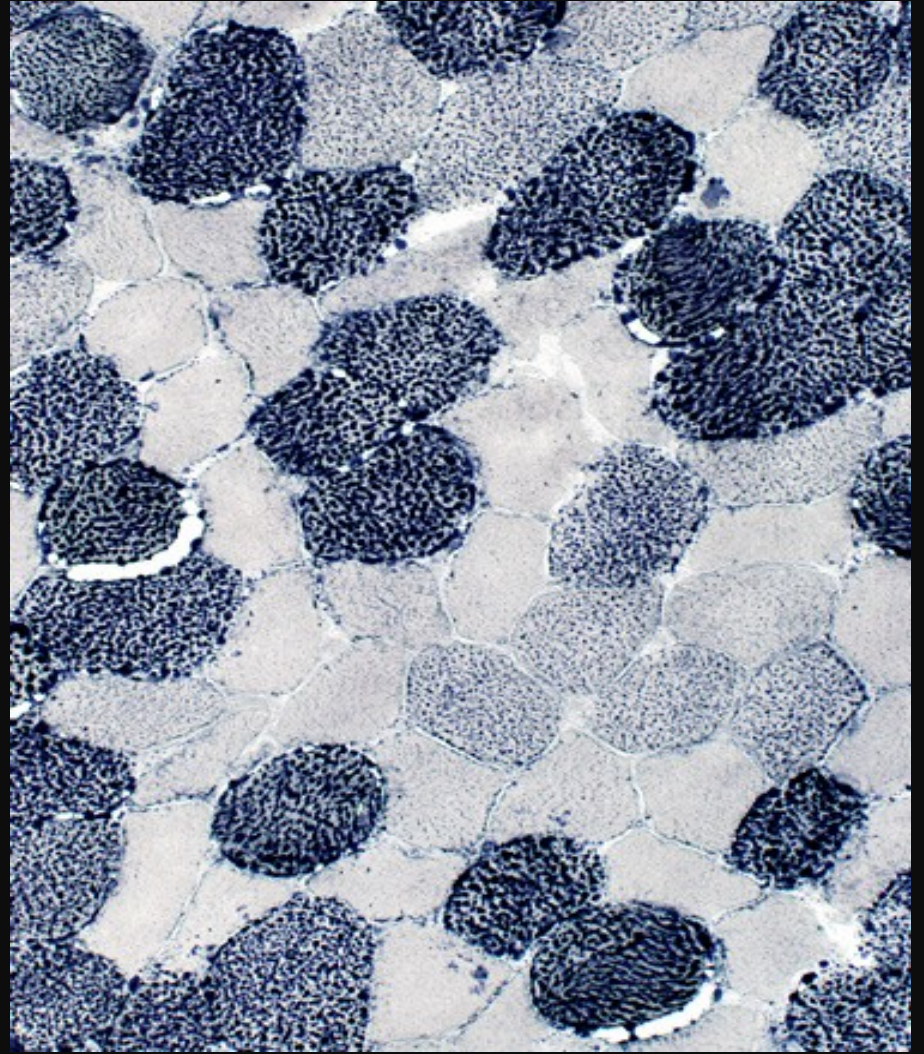
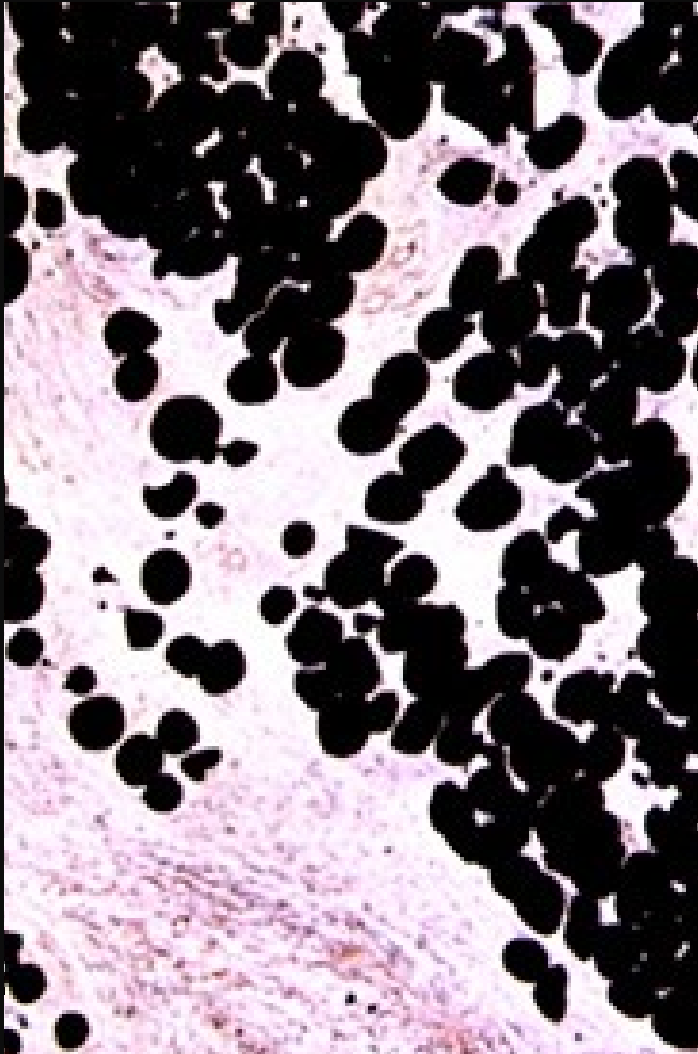




Sudan IV



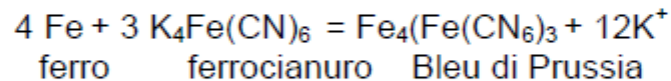
Sudan nero B



PERLS (BLU DI PRUSSIA):

Questa tecnica serve per rivelare il **ferro** che si localizza nelle cellule sotto forma di granuli di emosiderina.

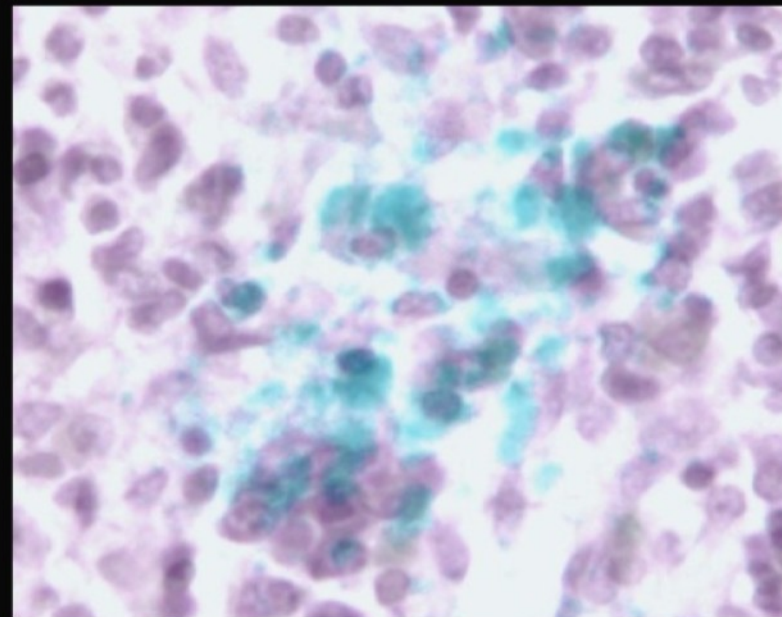
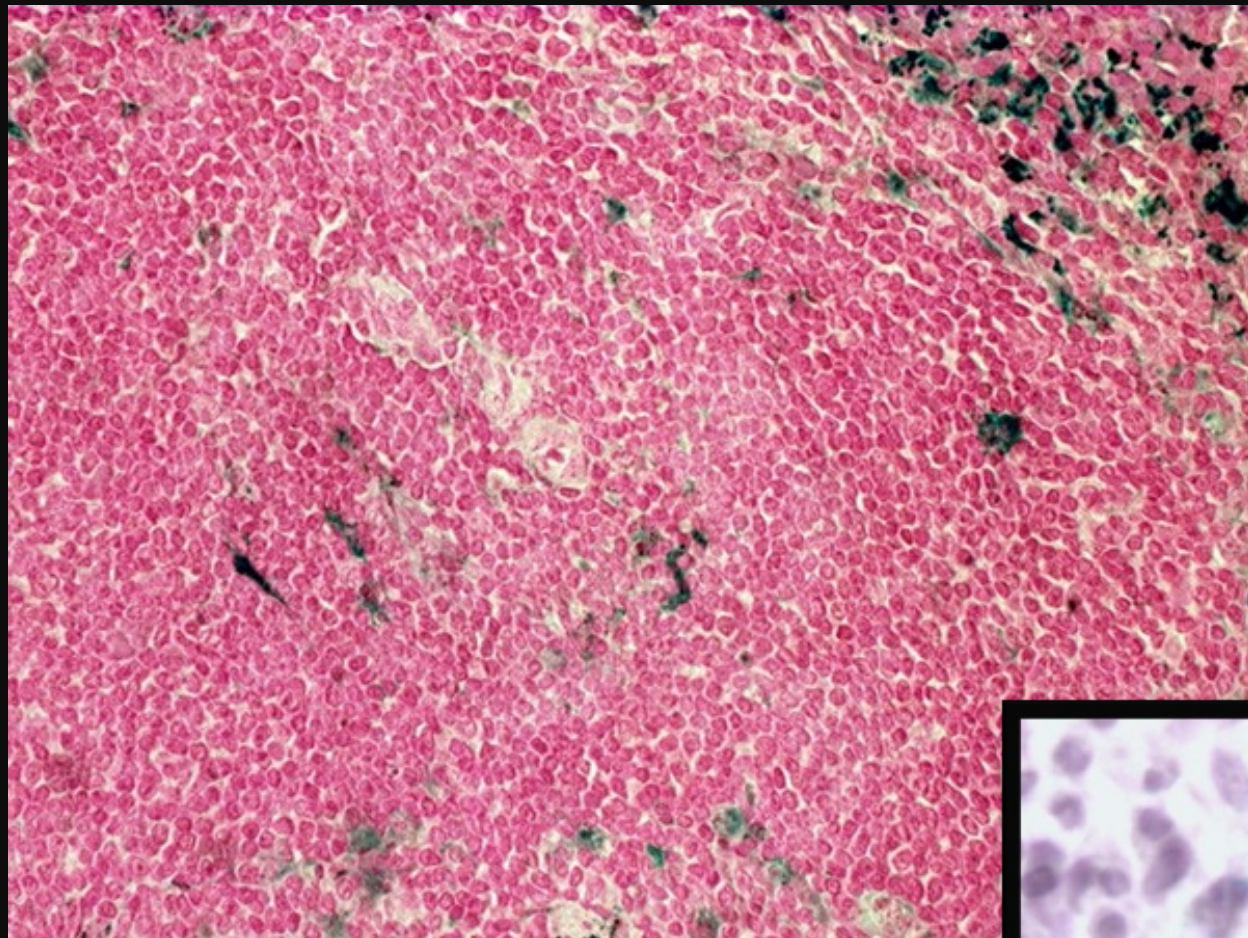
La reazione di Perls si basa sulla liberazione degli ioni Fe associati alle proteine mediante l'azione dell'acido cloridrico; questi ioni una volta liberati reagiscono con il ferrocianuro di potassio formando un precipitato blu detto ferrocianuro ferrico o blu di Prussia.

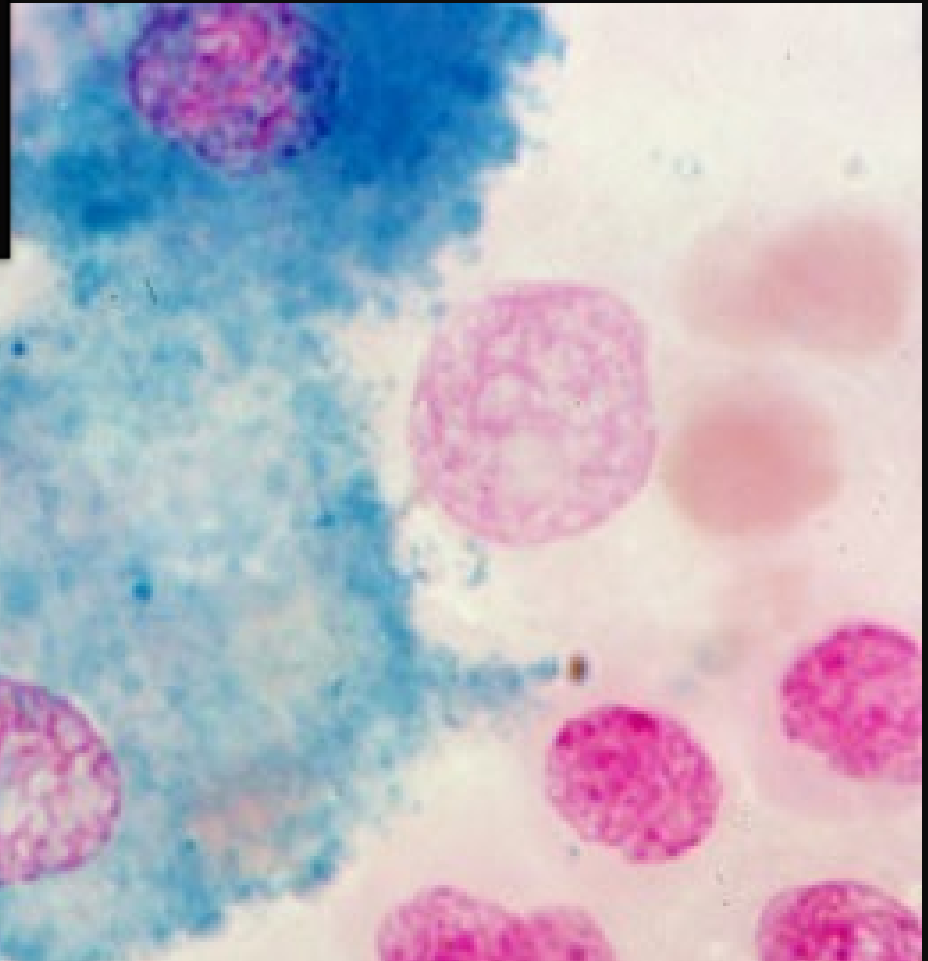
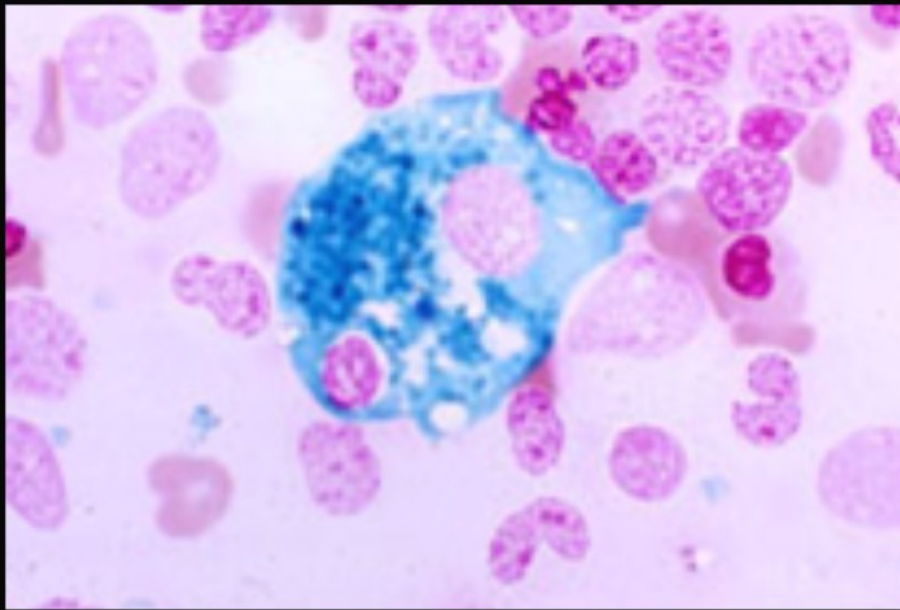


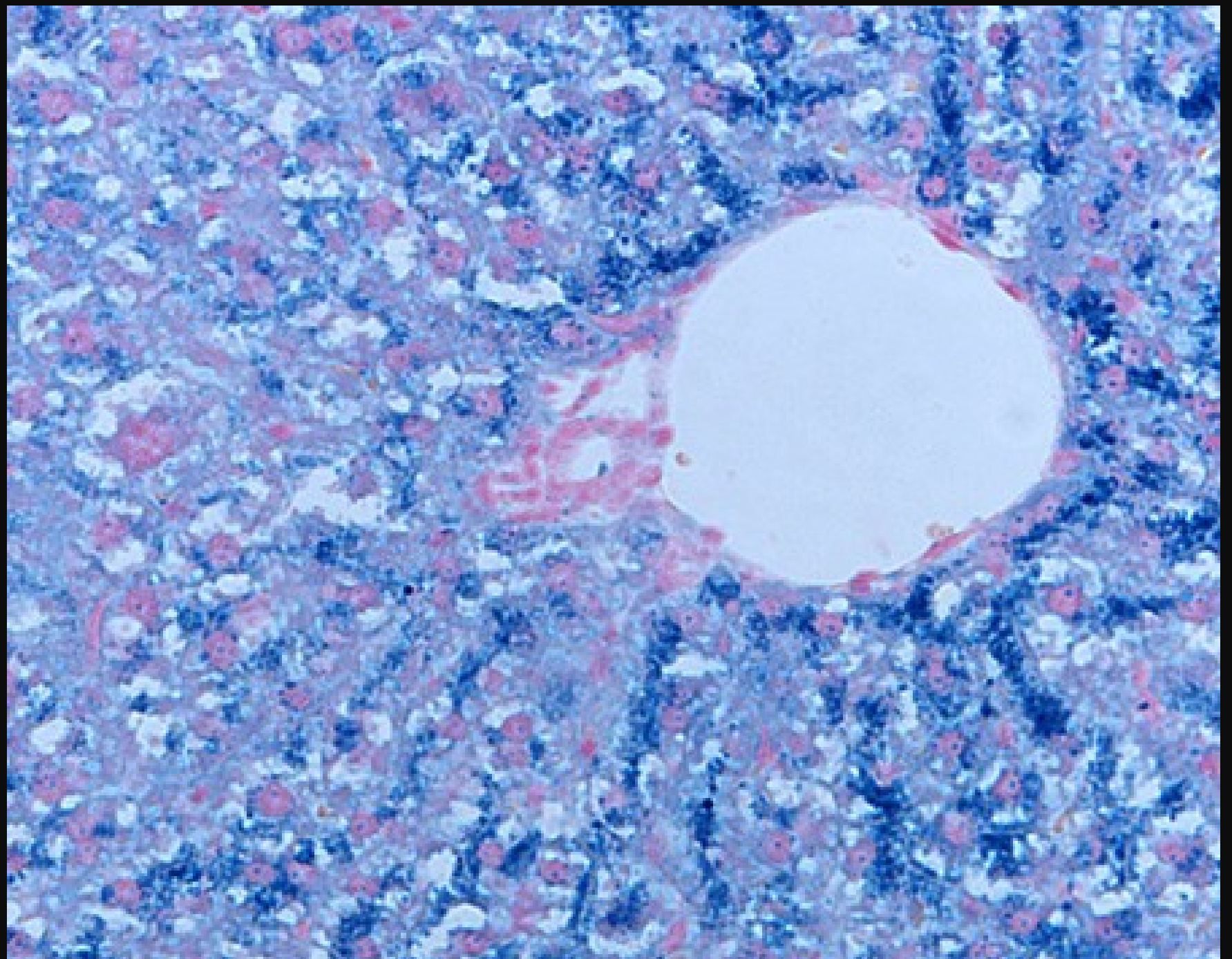
I nuclei si possono colorare con l'ematossilina (emallume di Mayer).
Si può associare con il Van Gieson.

Risultati:

Precipitati dove si trova il ferro → **blu**





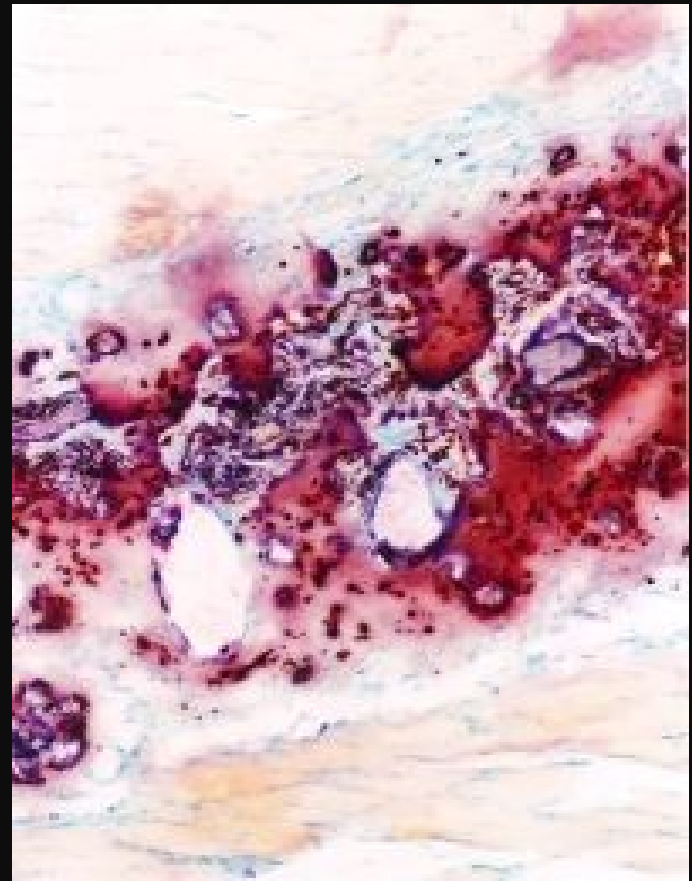
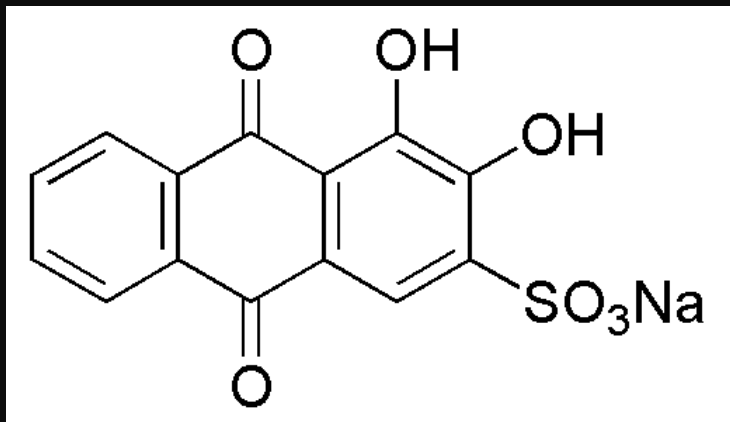


Metodo di Dahl all' **Alizarin red S** (calcio):

Il rosso di alizarina è un colorante antrachinonico in grado di formare complessi con il calcio.

Risultati:

Depositi di calcio → **arancio-rosso**





Metodo di von Kossa (calcio):

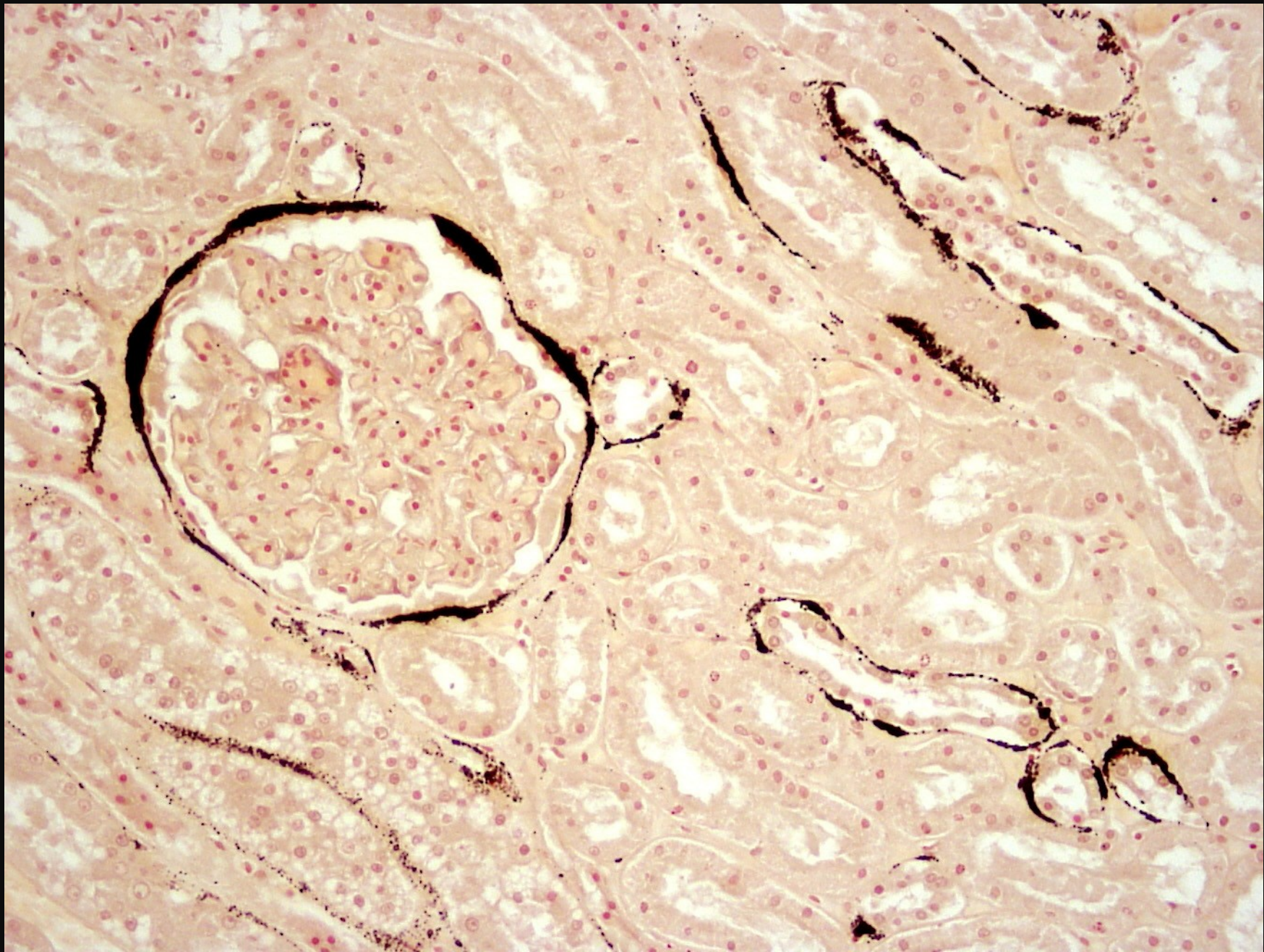
La colorazione di von Kossa è usata per quantificare la mineralizzazione nelle colture cellulare e nelle sezioni di tessuti (cioè la presenza di Sali di calcio). Il metodo si basa sulla fissazione da parte dei sali di calcio dell'argento metallico ottenuto per riduzione dal nitrato mediante esposizione 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 → nero

Nuclei → rosso





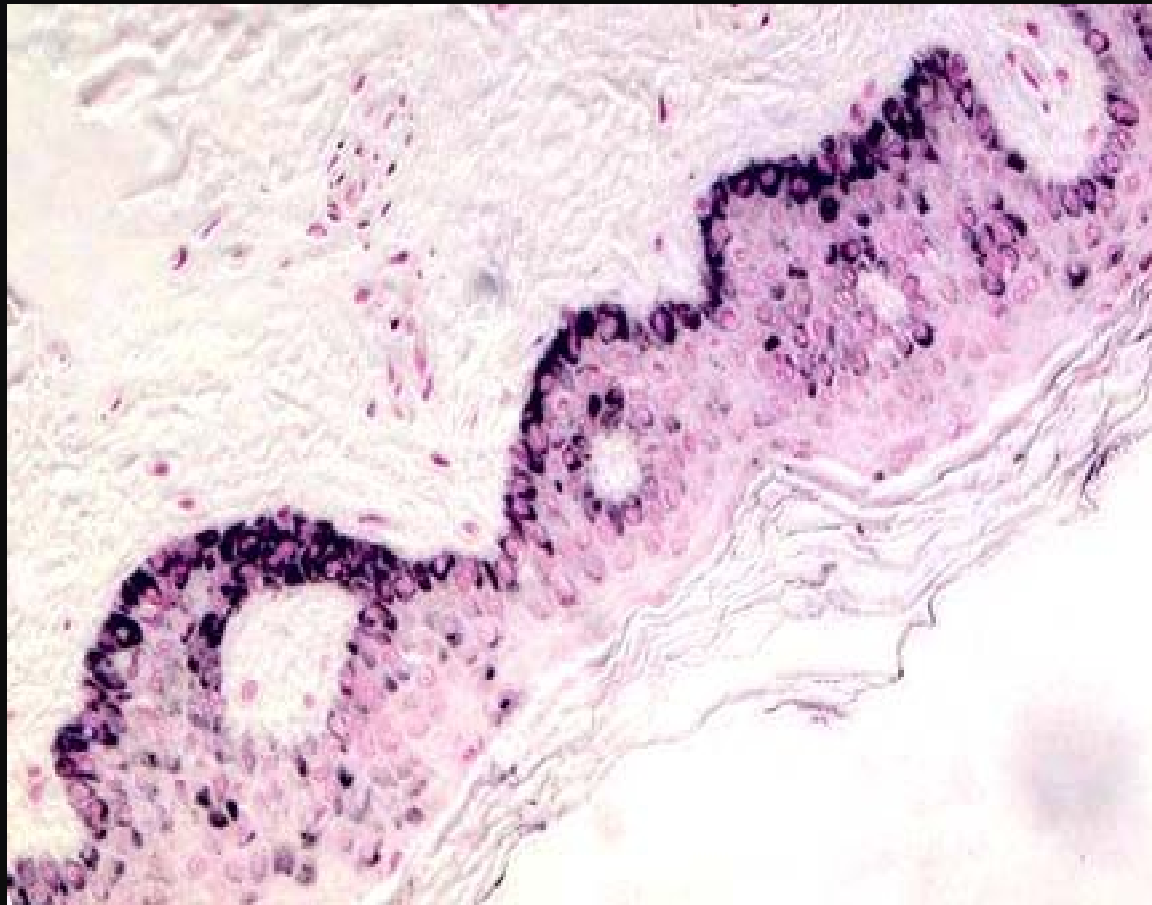
Fontana-Masson per la melanina:

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 tessutali 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 → nero

Nuclei → rosso



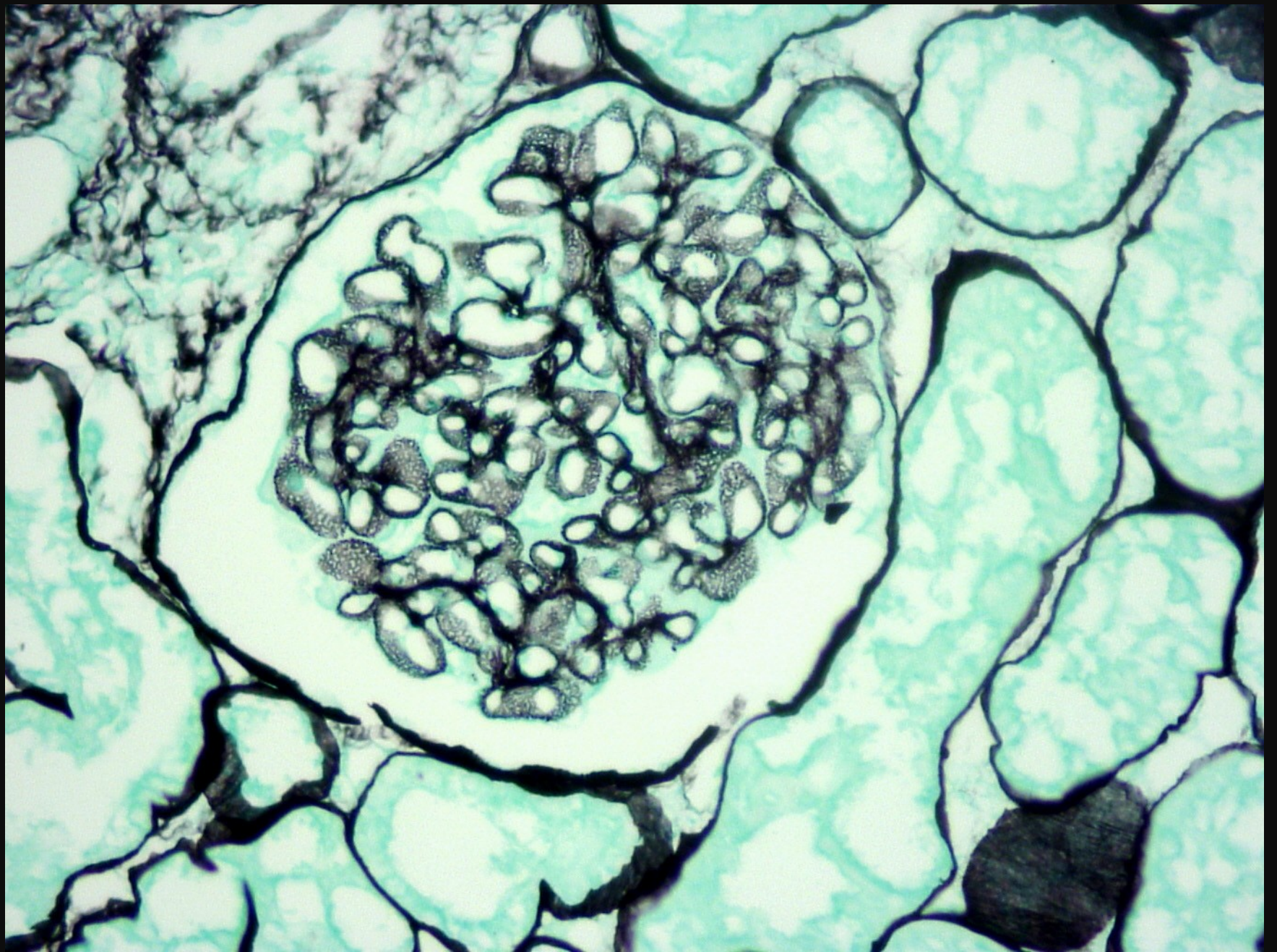
Gomori metenamina silver:

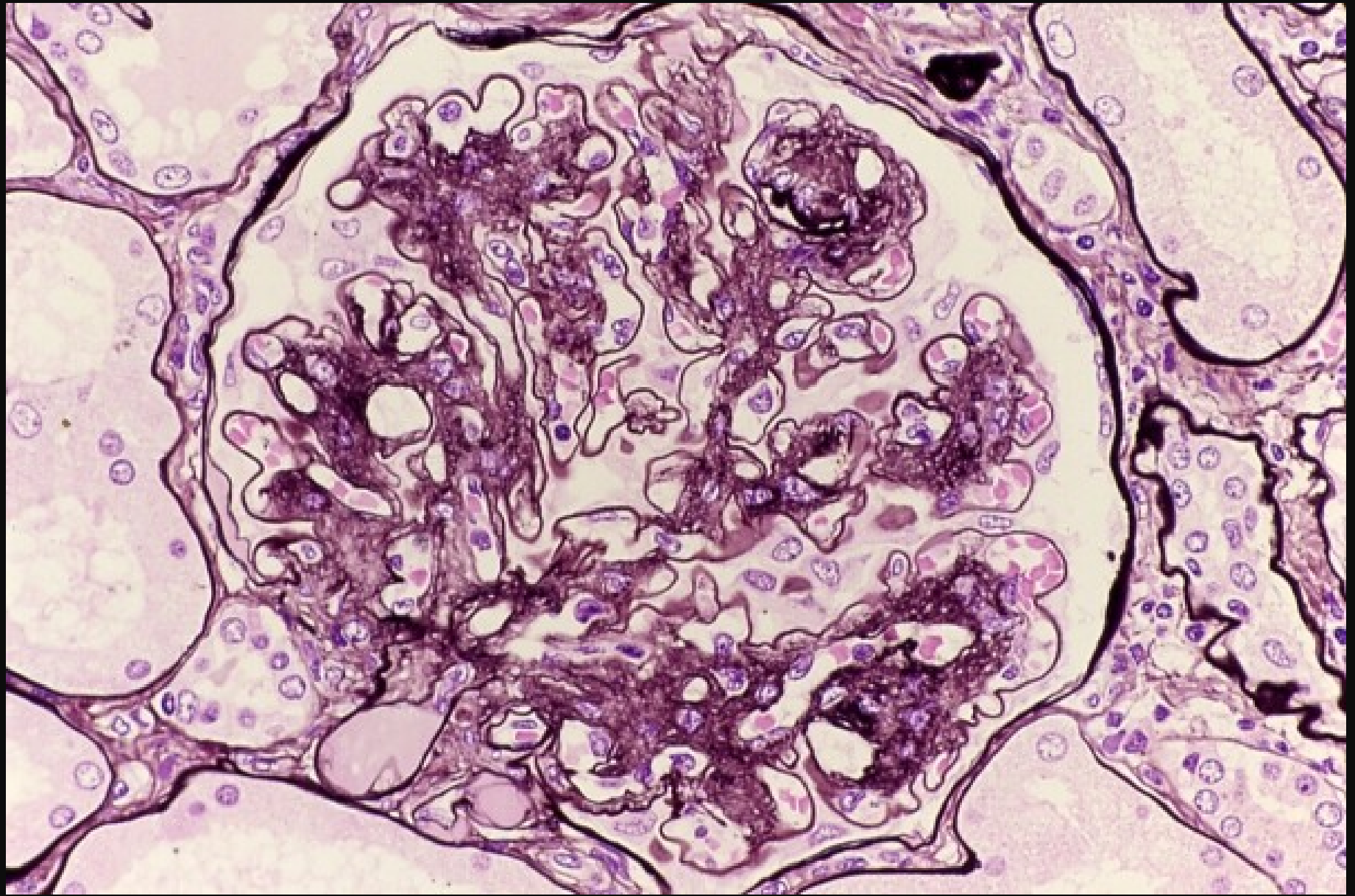
Metodo impiegato per la visualizzazione di elementi argirofili e mucopolisaccaridici (membrane basali, miceti, batteri, ecc.) su sezioni di tessuto. E' il metodo di elezione per lo studio della membrana basale nella biopsia renale. Si basa sul principio che l'acido periodico agendo su gruppi glicolici 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 → nero

Nuclei → verde



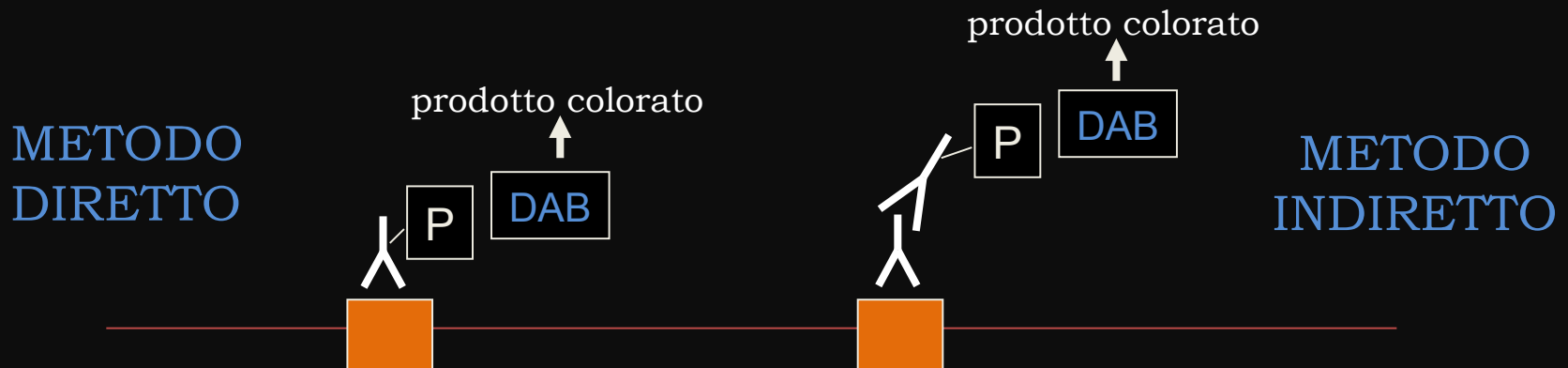


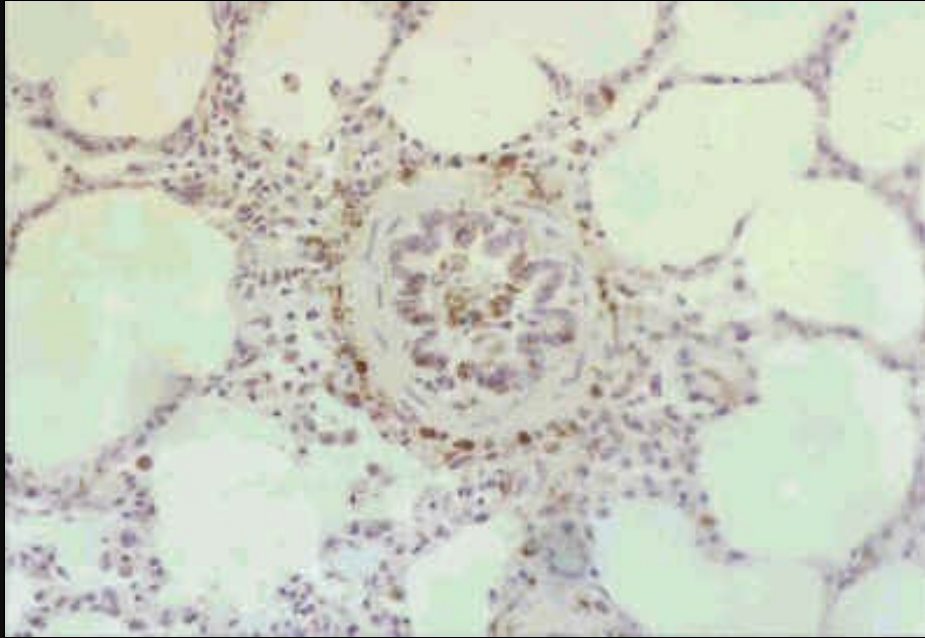
Tecniche immunoistochimiche

Gli anticorpi (immunoglobuline) specifici sono diretti verso uno o più parti dell'antigene (i *determinanti antigenici*), ciascuno dei quali sarà riconosciuto da un singolo anticorpo.

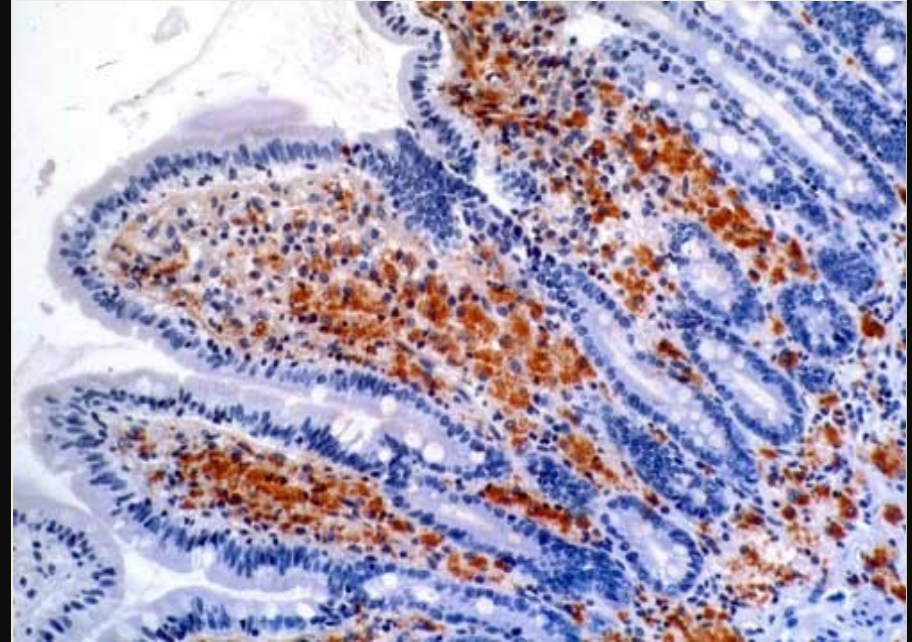
Le tecniche immunoistochimiche sfruttano la capacità degli anticorpi di legarsi all'antigene specifico.

- anticorpo coniugato con l'enzima **perossidasi**
- incubazione con la sezione, dove si legherà all'antigene
- incubazione con un substrato dell'enzima (**diamminobenzidina**)
- la perossidasi trasforma la diamminobenzidina in un prodotto colorato nel punto esatto ove si era legato l'anticorpo, rivelando così la localizzazione dell'antigene.





Localizzazione immunoistochimica di cellule epiteliali e macrofagi bronchiali



Localizzazione immunoistochimica di cellule della lamina propria