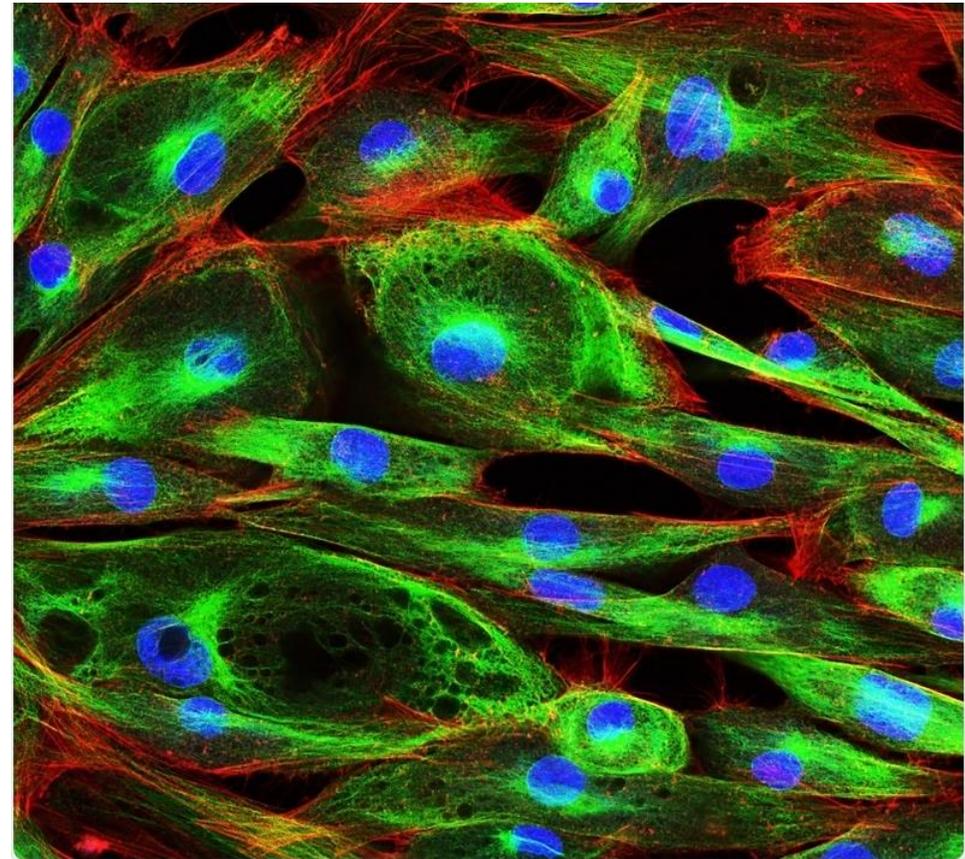


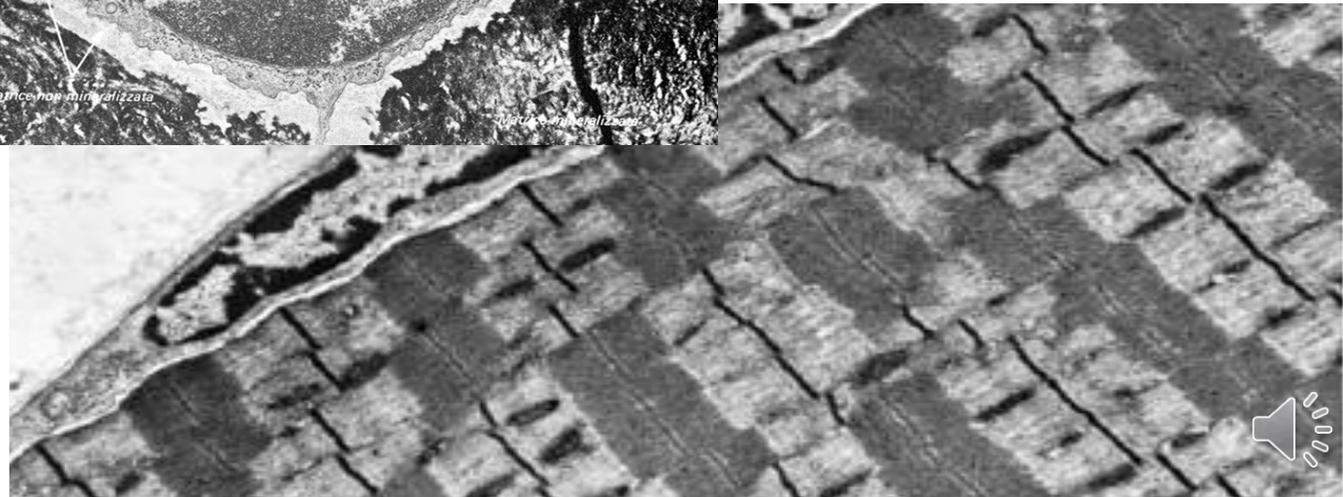
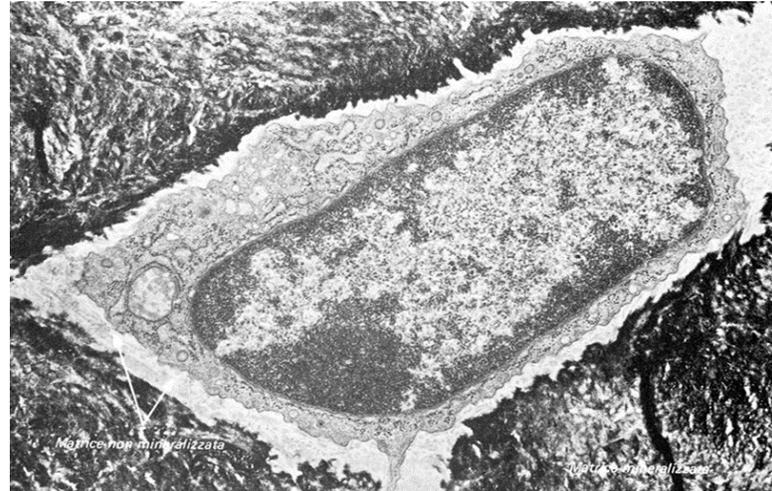
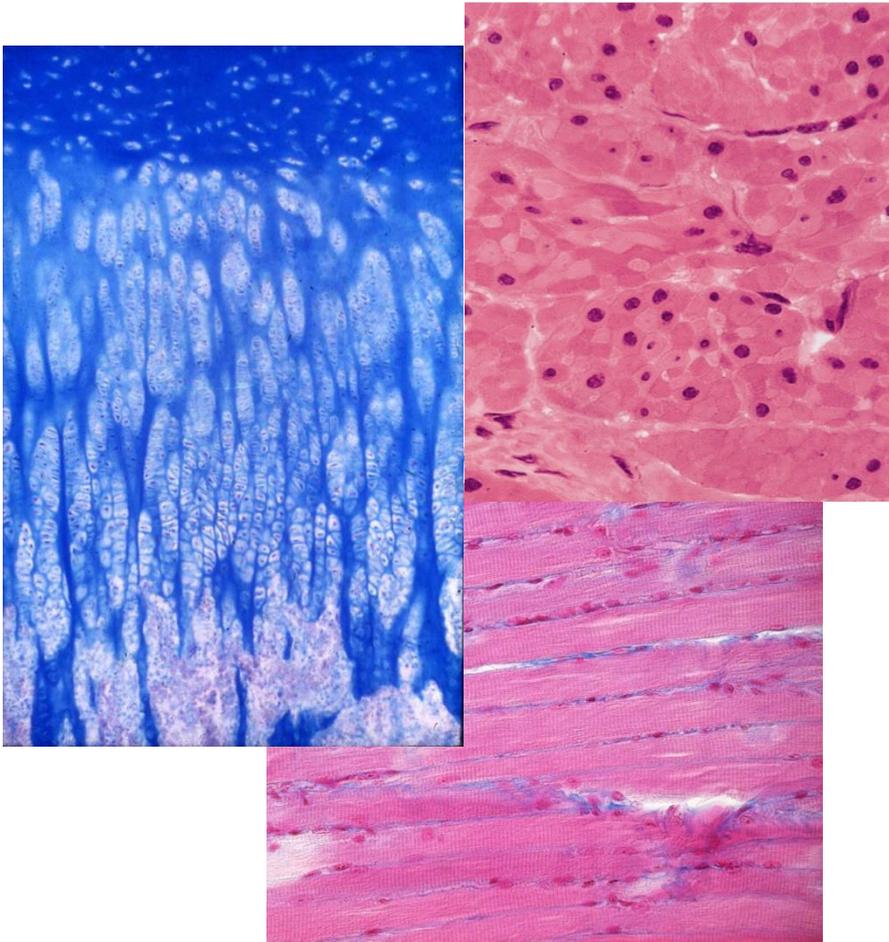
# Tecniche per l'osservazione dei tessuti

Paola Brun



# L' OSSERVAZIONE DEI TESSUTI

Le piccole dimensioni delle cellule impongono che per la loro osservazione ci si debba avvalere dell'uso del **microscopio ottico** (a luce) e **microscopio elettronico**

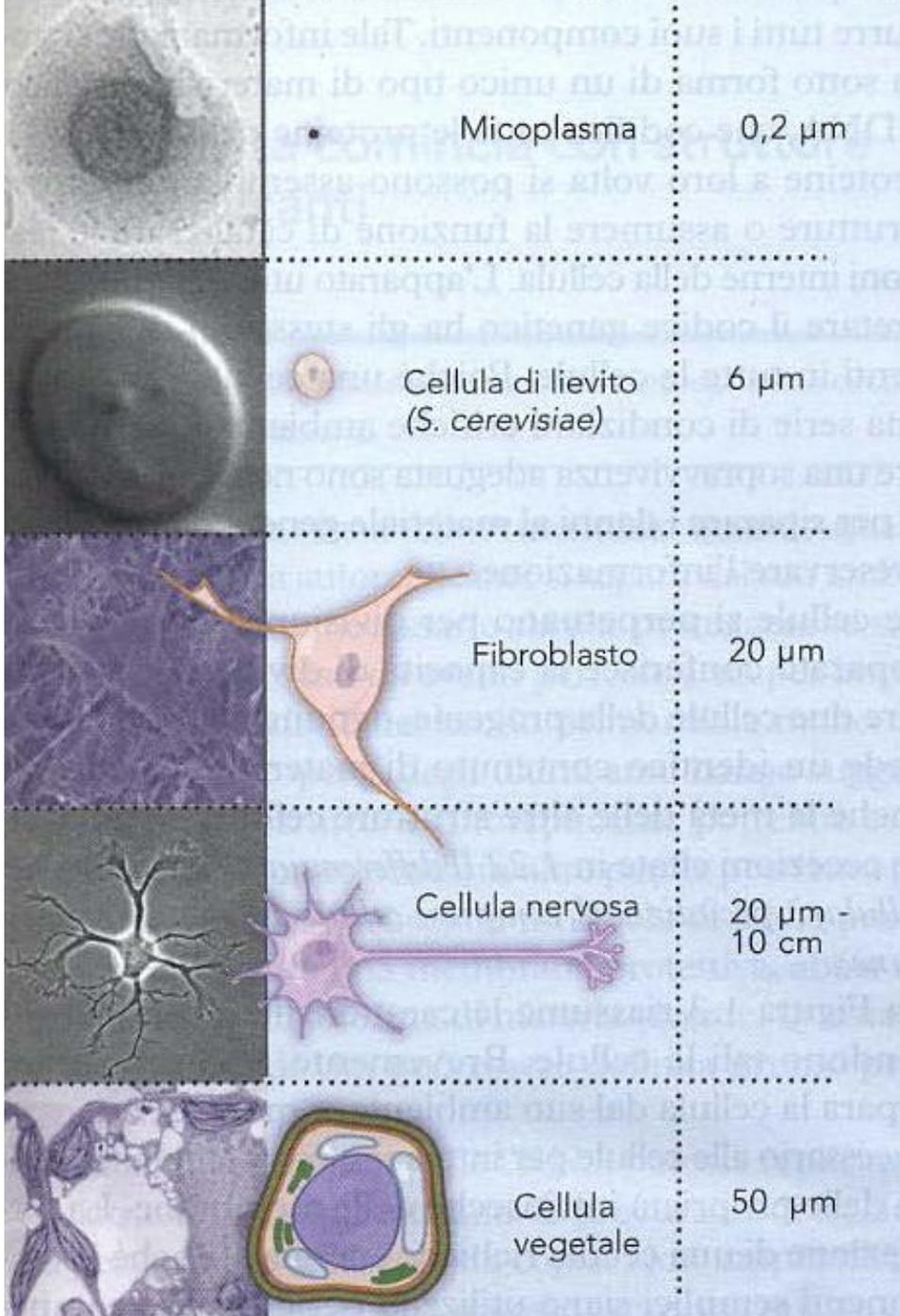


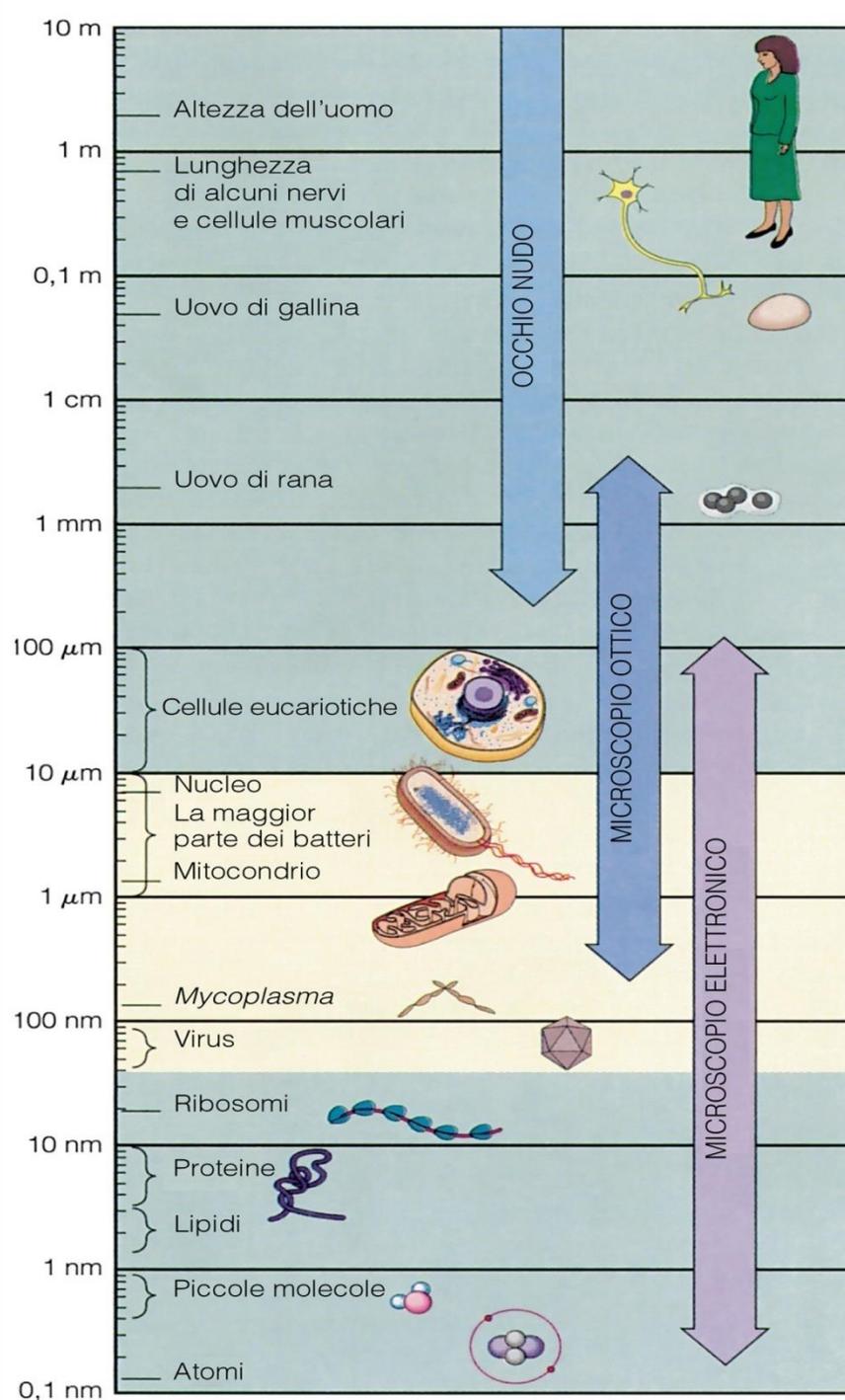
# *Le cellule hanno forme e dimensioni diverse*

***Dimensioni delle cellule:*** da 0,2 - 0,3  $\mu\text{m}$  (piccoli batteri) ad alcuni centimetri e anche metri (uova d'uccello, piante).

1 $\mu\text{m}$  = 1 millesimo di mm

1nm = 1 milionesimo di mm

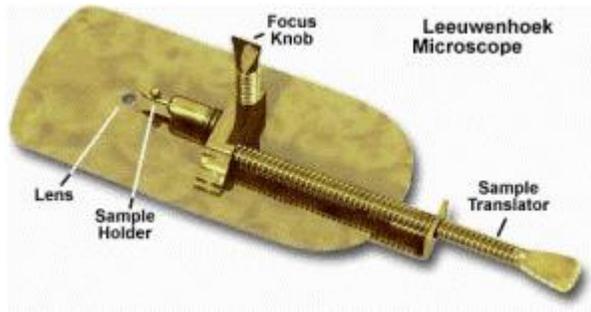




La maggior parte delle cellule umane ha un diametro tra i 10 e i 50  $\mu\text{m}$

L'identificazione delle cellule risale al XVII secolo (Robert Hooke), con l'avvento dei primi microscopi (*a bassa risoluzione e fattore di ingrandimento limitato*)





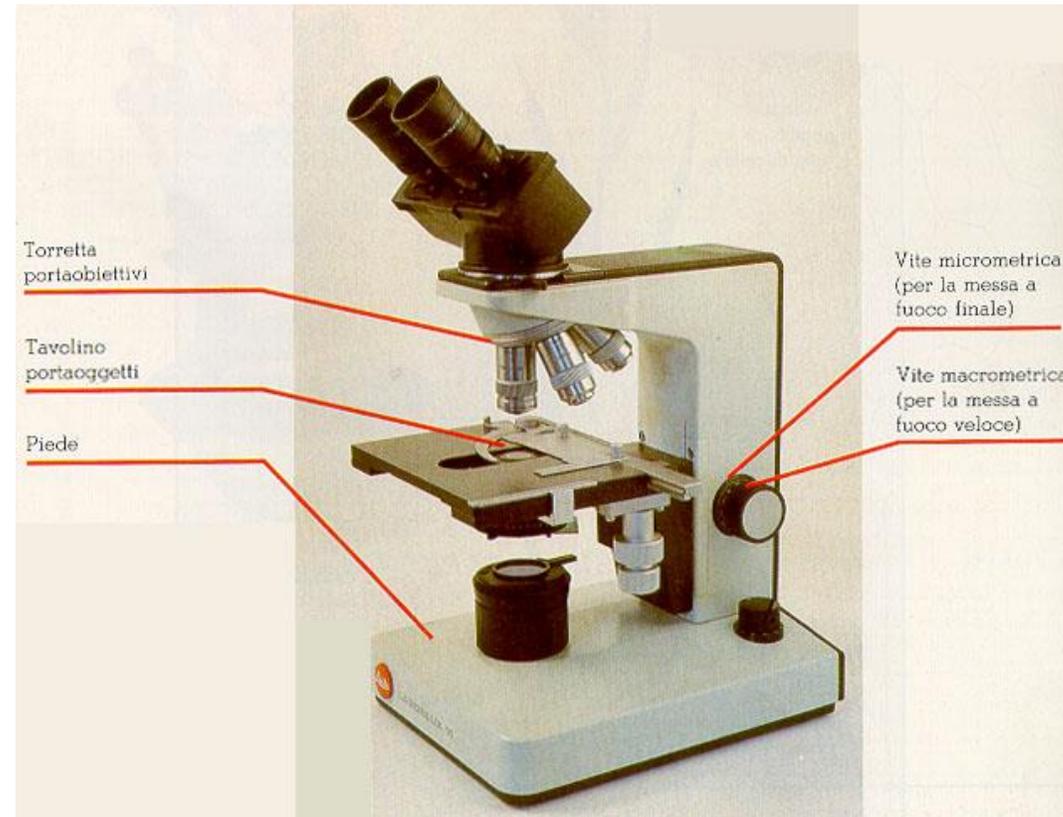
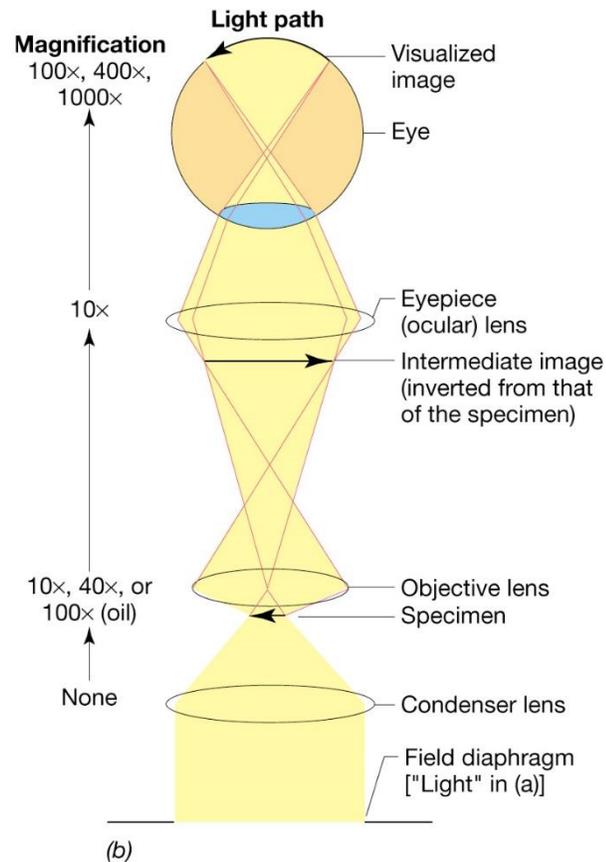
Robert Hooke (1664,  
definizione di cellula)

Malpighi  
(1628-1694)



# OSSERVAZIONE DEI TESSUTI AL MICROSCOPIO OTTICO

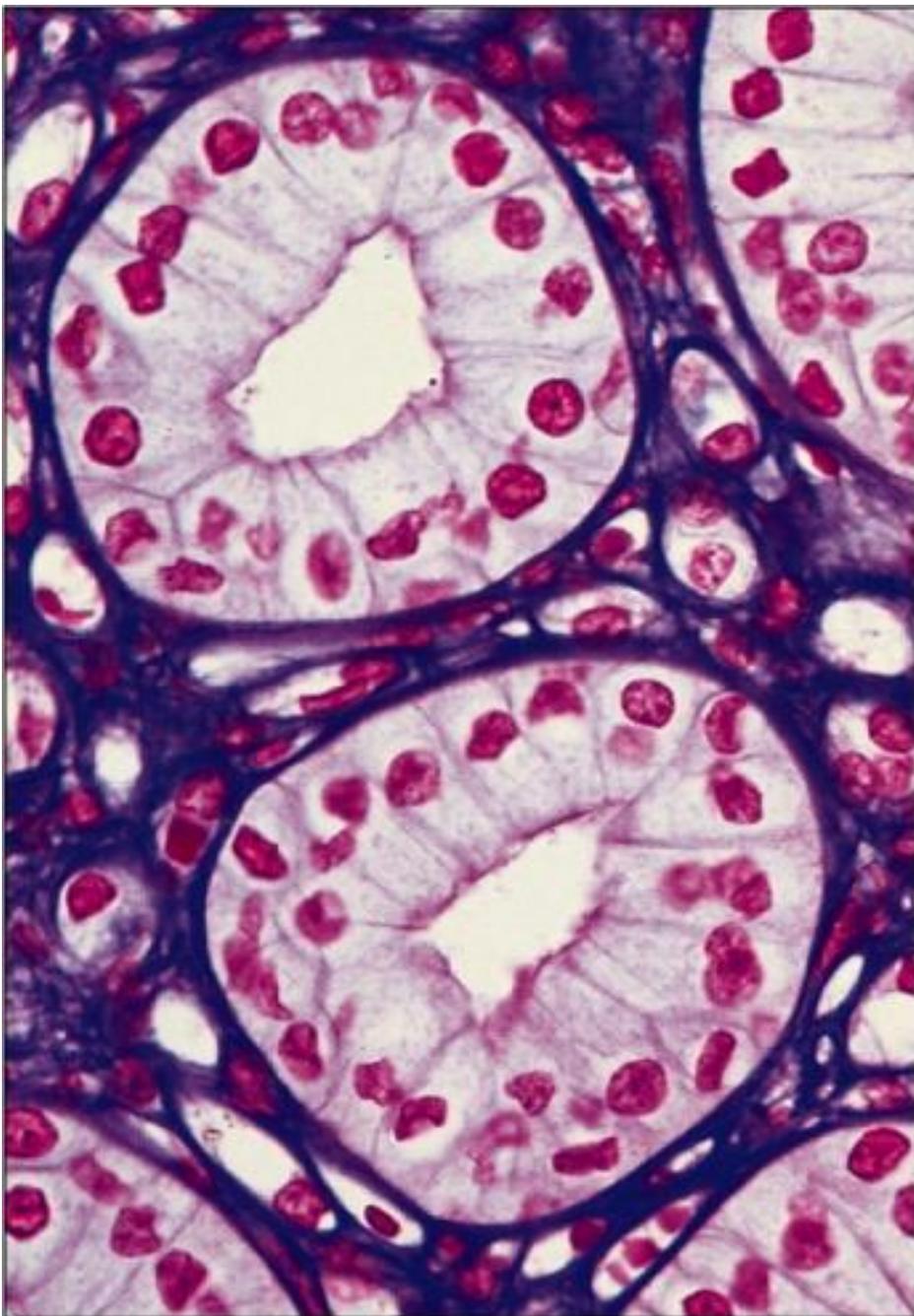
Il procedimento più comune per lo studio dei tessuti è **l'osservazione di sezioni al microscopio ottico** (per transilluminazione), preparate in maniera da preservare al meglio la struttura e la composizione molecolare del tessuto originale



# Due metodi principali per l'osservazione al microscopio ottico dei preparati:

- 1) **Osservazione diretta**, a fresco, di cellule e di tessuti viventi: non introduce artefatti ma da scarso contrasto e ridotta visualizzazione delle strutture per alto spessore, durata limitata dei preparati per autolisi. Per aumentare il contrasto le strutture possono essere colorate con *coloranti vitali*, assorbiti dalle cellule
- 2) **Osservazione di cellule e di tessuti sottoposti a “trattamenti”** quali *fissazione, inclusione, taglio e colorazione* di sezioni sottili, finalizzati sia a stabilizzare e conservare le strutture, sia a contrastarle per migliorarne la visualizzazione.





Un tessuto trattato in questo modo prende il nome di **preparato istologico**



# FISSAZIONE

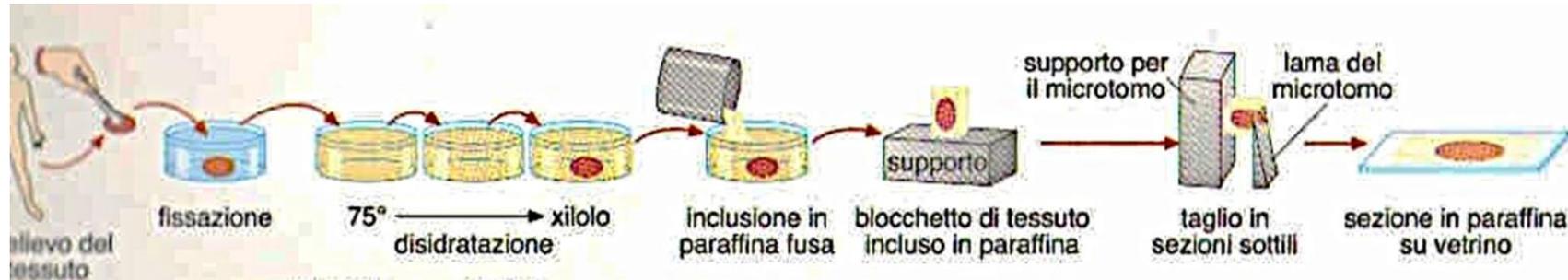
- È un *trattamento chimico (più raramente fisico) che ha come scopo quello di preservare le componenti del tessuto*

*Si possono usare fissativi diversi a seconda della risoluzione che si vuole ottenere e della tecnica di osservazione (microscopia ottica, microscopia elettronica).*

- *Formalina (4% formaldeide in soluzione acquosa)*



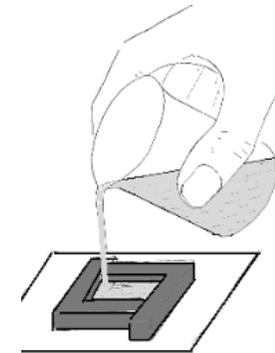
# INCLUSIONE E TAGLIO DELLE SEZIONI AL MICROTOMO



Per ottenere sezioni sufficientemente sottili e allo stesso tempo preservare **la struttura del tessuto, il tessuto si include con una sostanza che dia consistenza al tessuto** (es: paraffina, resine plastiche) oppure **congelato rapidamente in azoto liquido**.

La paraffina è immiscibile con l'acqua e quindi il tessuto fissato deve venire disidratato prima dell'inclusione in paraffina.

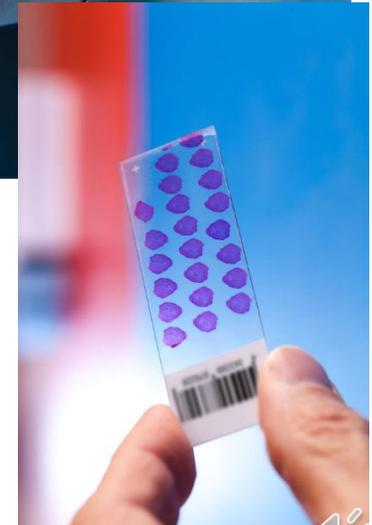
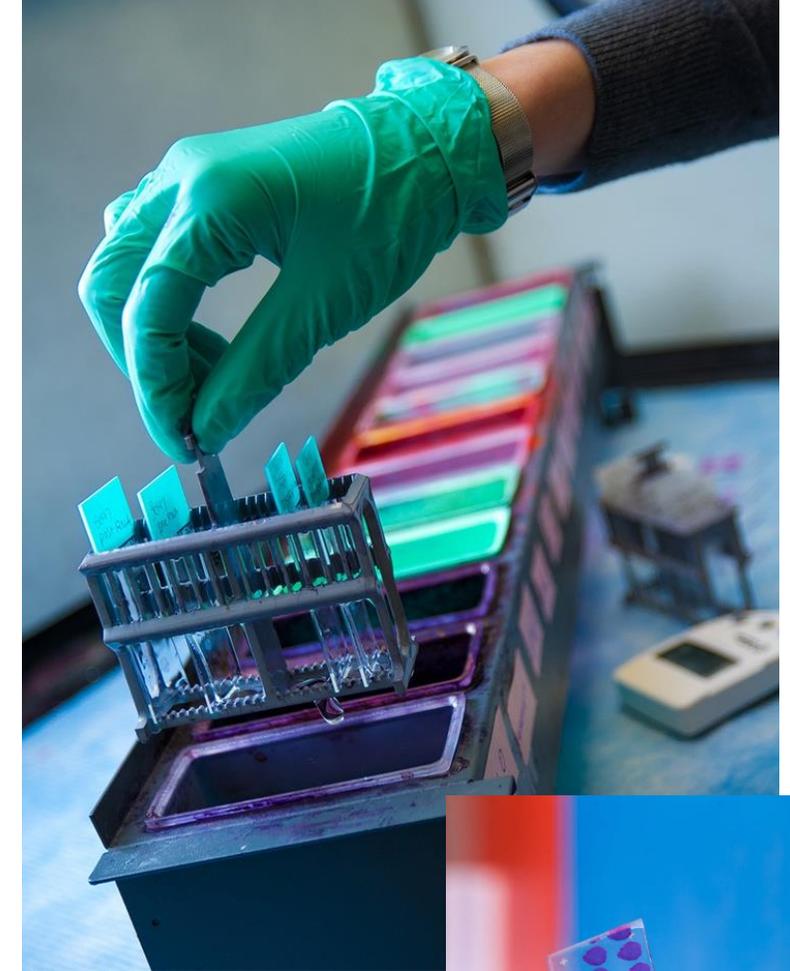
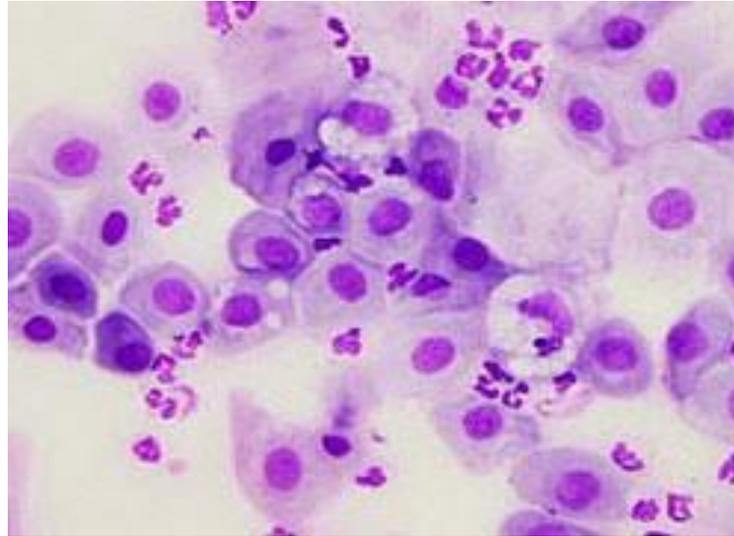
**Il tessuto incluso ("blocchetto") in paraffina viene tagliato al microtomo e quello congelato al criostato in sezioni di 5-10  $\mu\text{m}$  che vengono adagiate e fatte aderire su vetrini portaoggetto.**



# COLORAZIONE

La maggior parte dei tessuti sono incolori e le sezioni sottili sono trasparenti.

E' necessario quindi utilizzare delle *colorazioni per rendere osservabili le strutture*.



A questo scopo si usano **miscele di coloranti** che hanno affinità differenti per le diverse componenti molecolari del tessuto, in modo da **riconoscere e distinguere le componenti del tessuto**.



# COLORAZIONI ISTOLOGICHE

Sono **misture di coloranti solubili in solventi diversi** (acquosi o organici) che hanno una specificità definita empiricamente per alcune strutture del preparato

L'osservatore sceglie il tipo di colorazione a seconda delle strutture / cellule / tessuti che vuole mettere in evidenza

## COLORANTI "BASICI"

Ematossilina  
Blu di Toluidina  
Blu di Metilene  
Rosso Carminio

## COLORANTI "ACIDI"

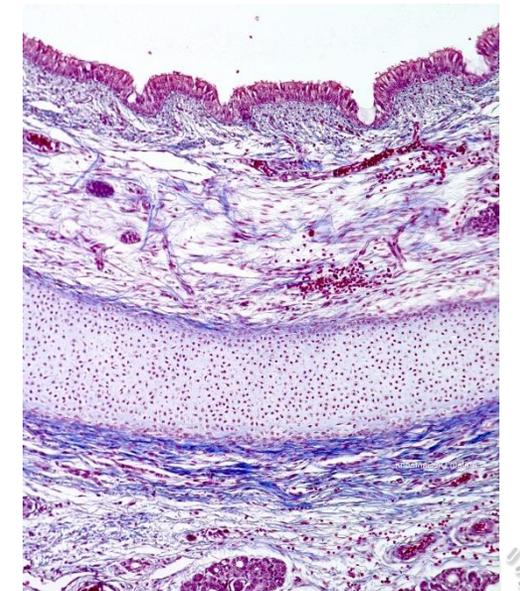
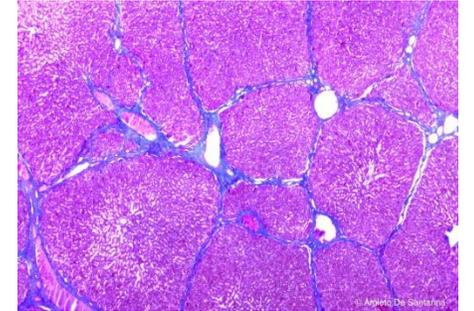
Eosina  
Orange G  
Blu di Anilina  
Verde Luce

**NUCLEO**

**CITOPLASMA  
(cellule basofile)**

**CITOPLASMA  
(cellule acidofile)**

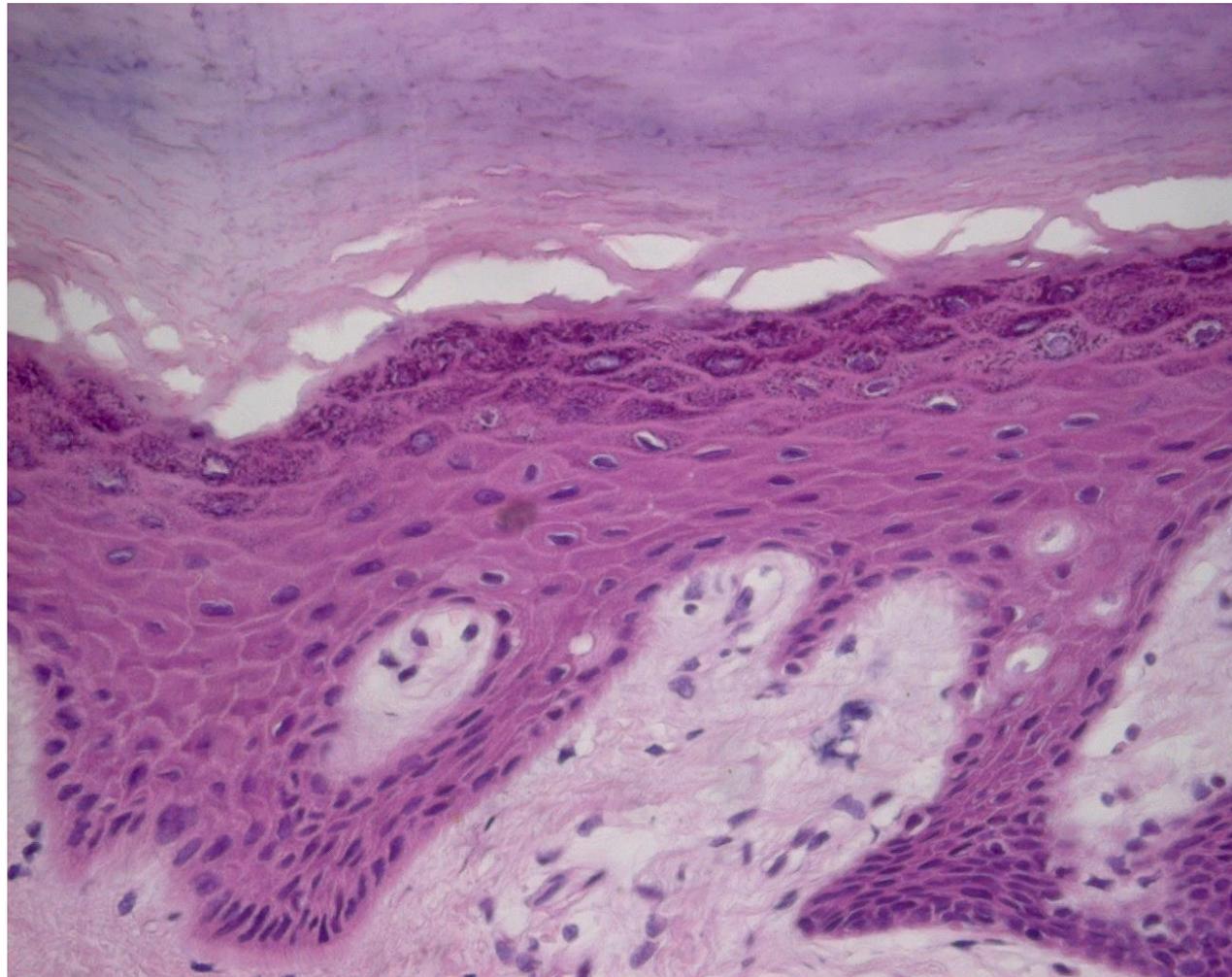
**Matrice Extracellulare**



# Ematossilina - Eosina

Nucleo

Citoplasma, matrice

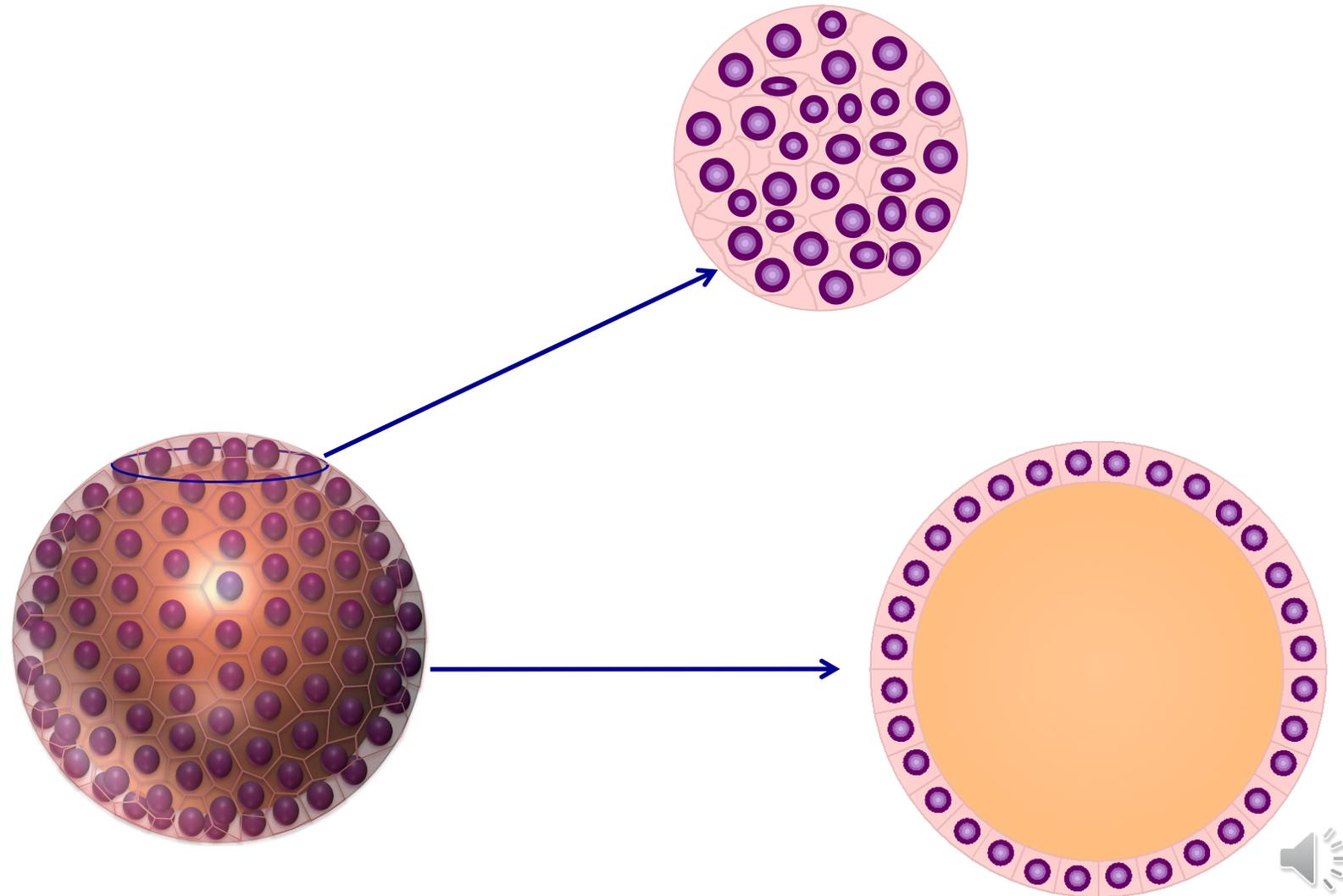
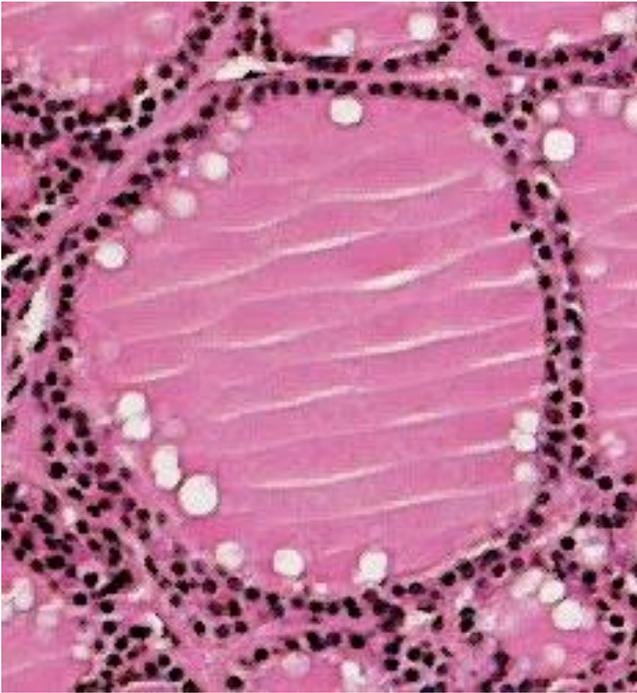


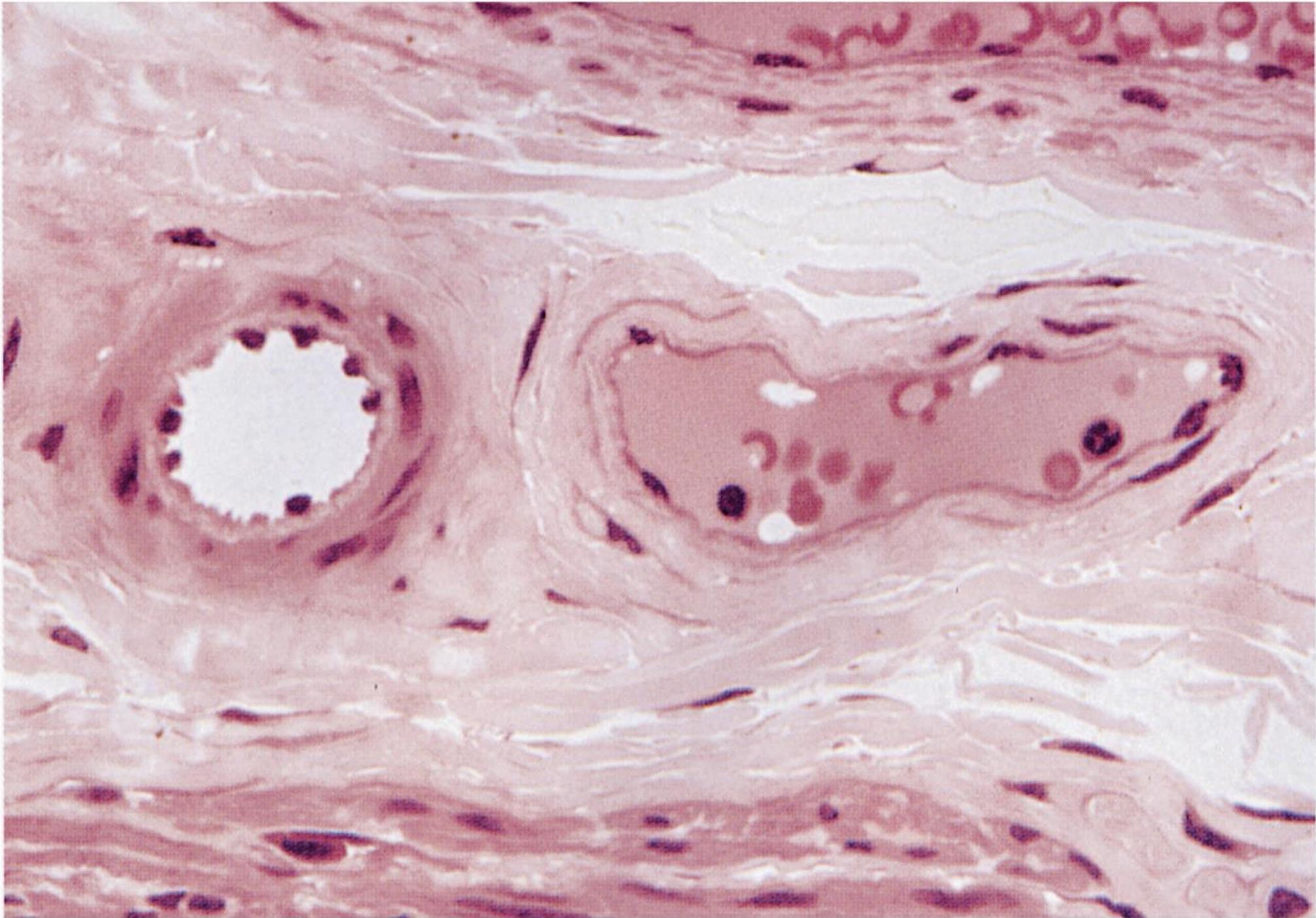
Citoplasma  
basofilo  
(proteine)

Citoplasma  
acidofilo



# Piani di taglio





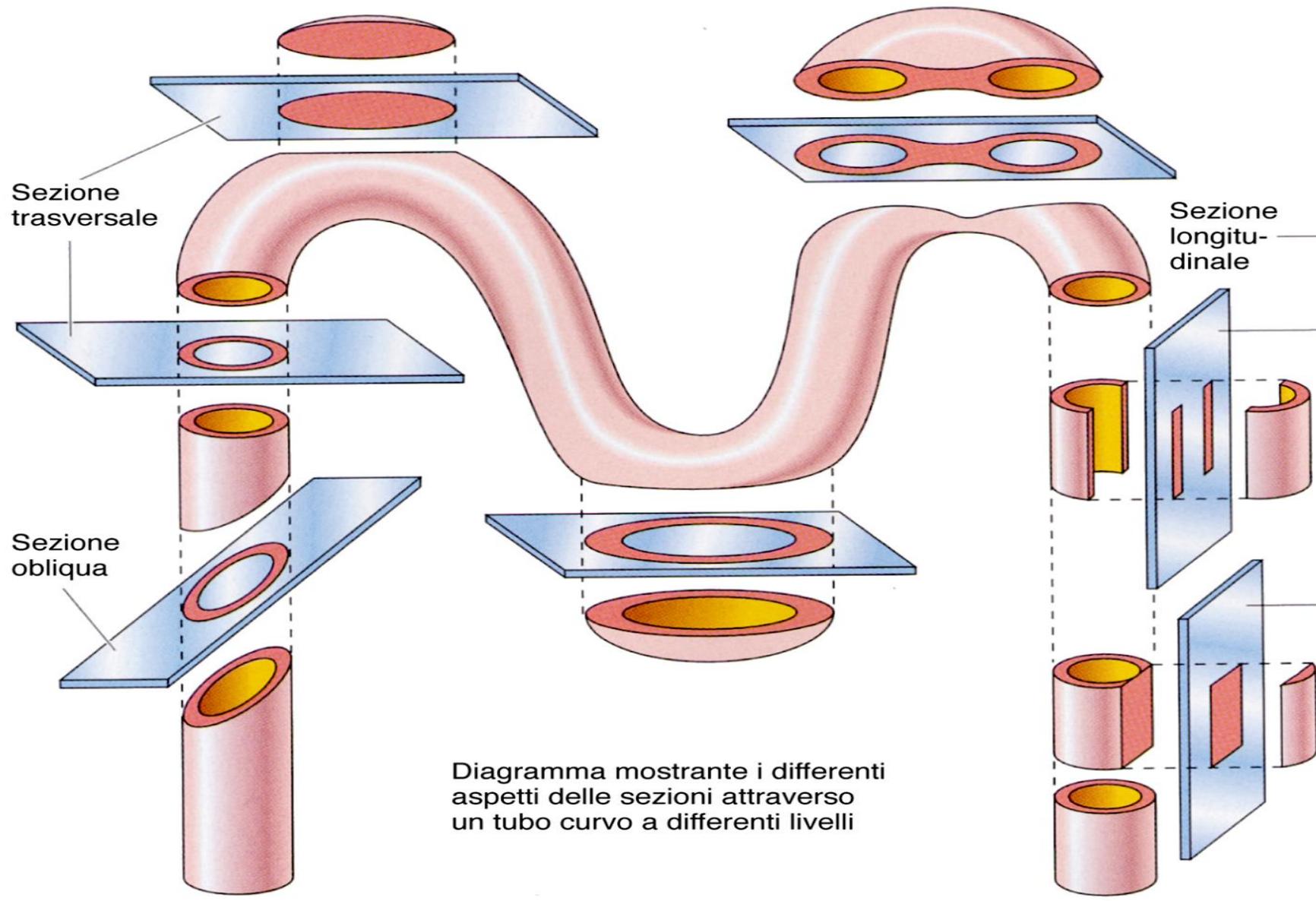
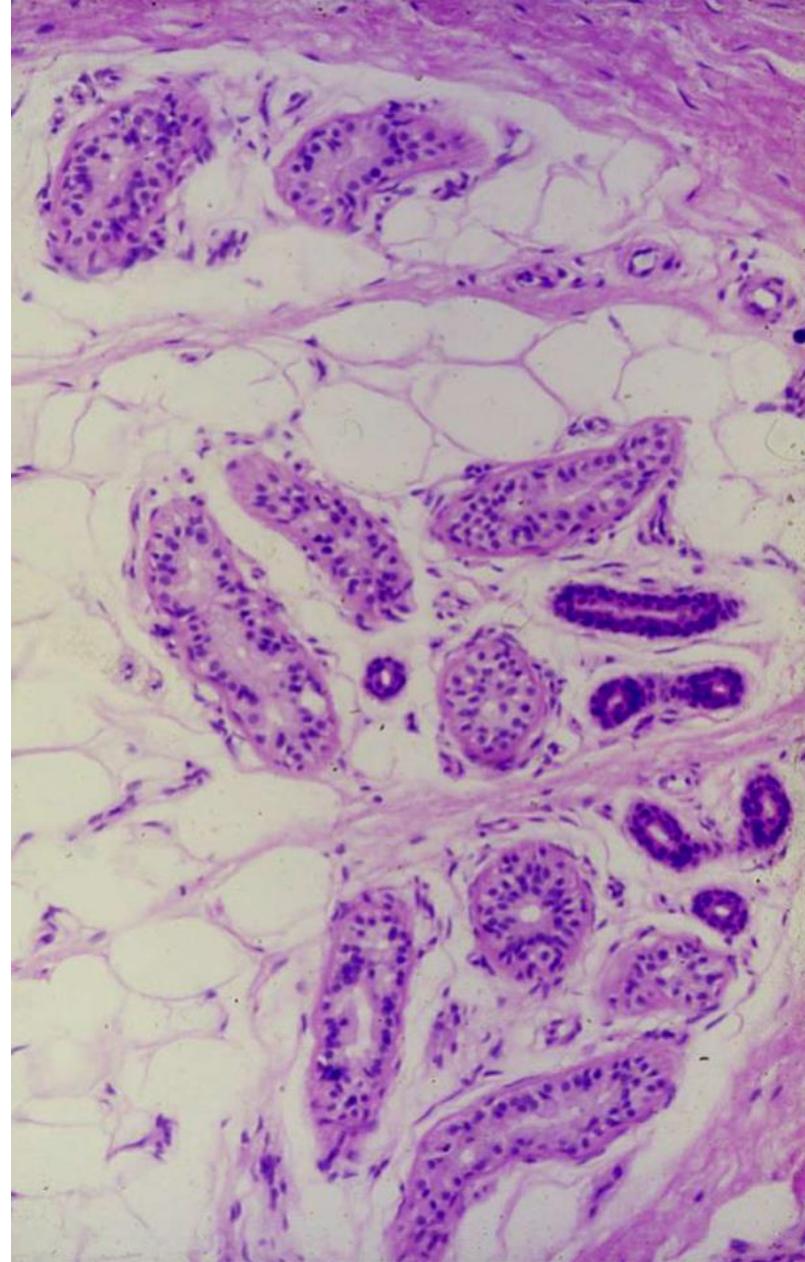
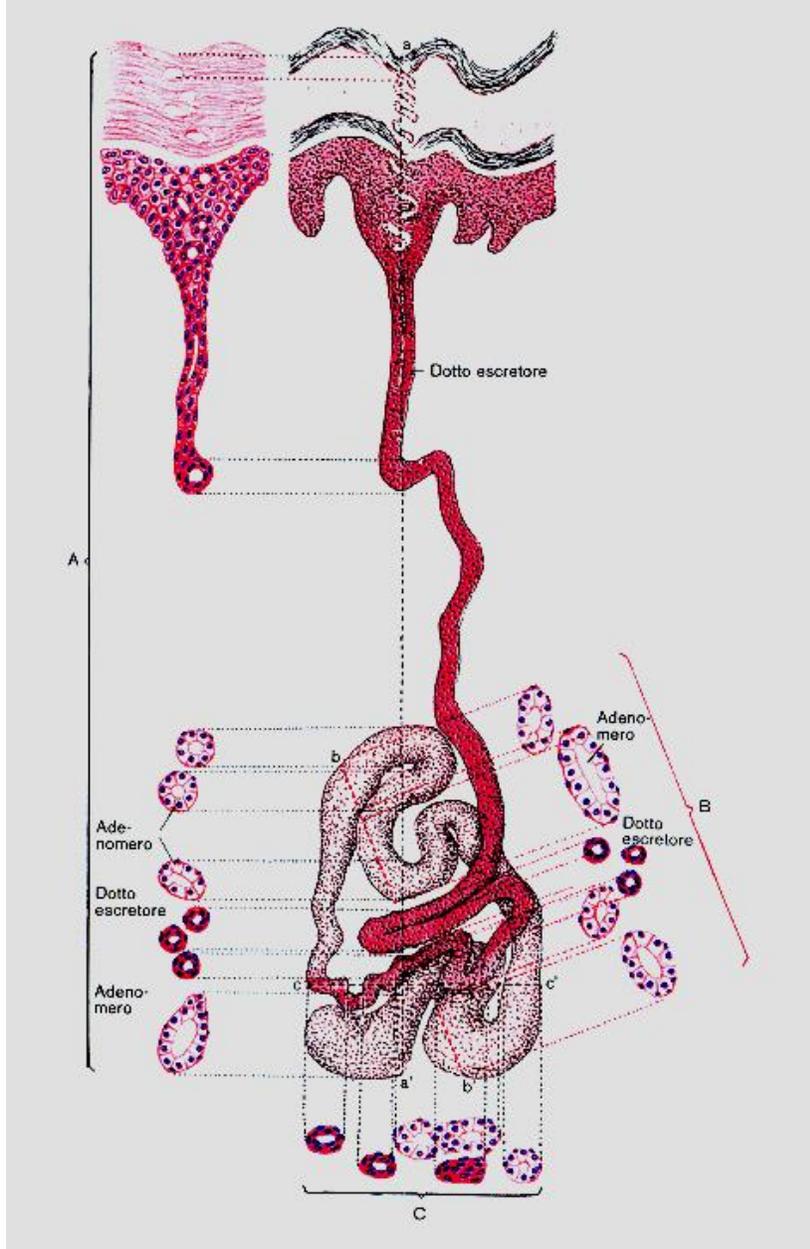
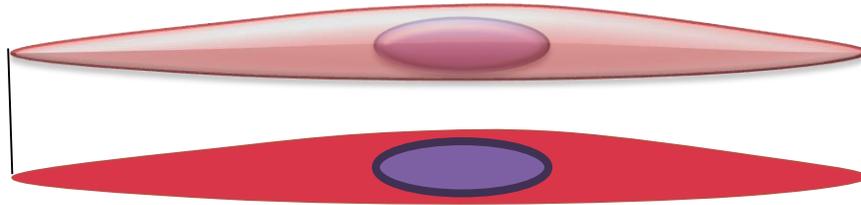


Diagramma mostrante i differenti aspetti delle sezioni attraverso un tubo curvo a differenti livelli

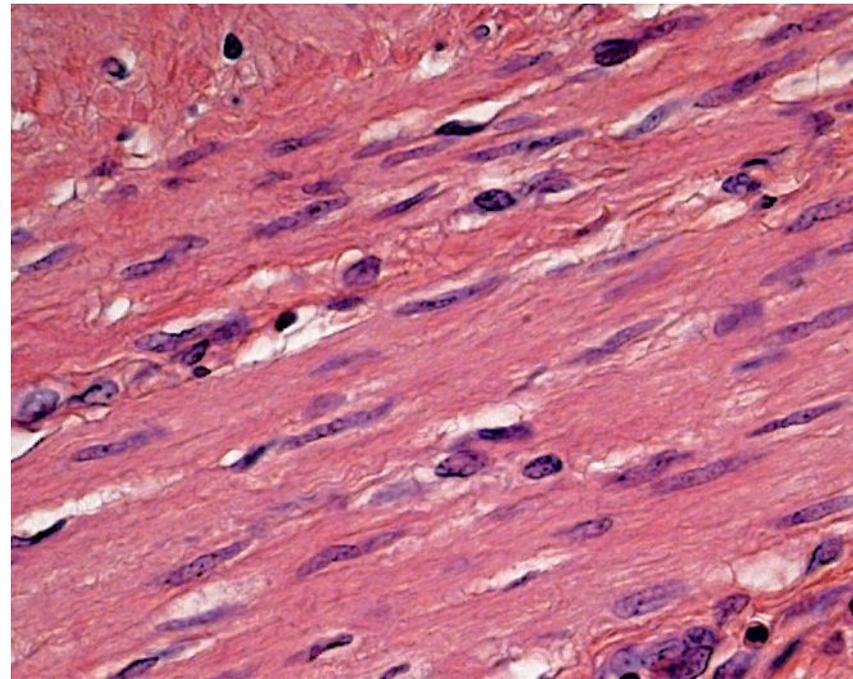




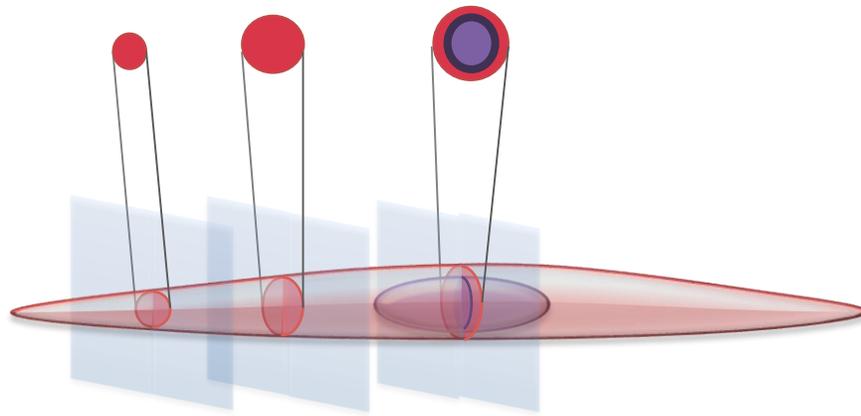
**Cellula muscolare liscia**



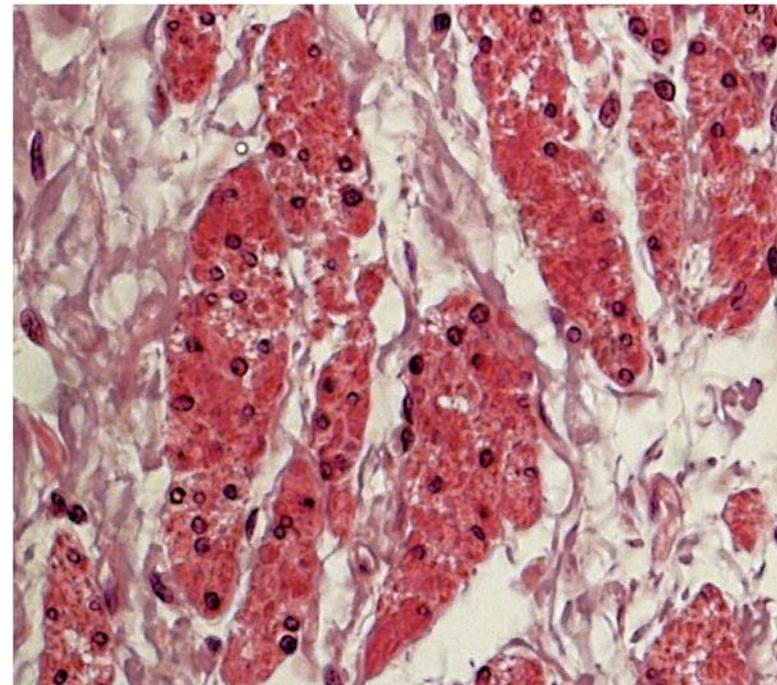
**Sezione longitudinale**



**Sezioni trasversali**



**Cellula muscolare liscia**

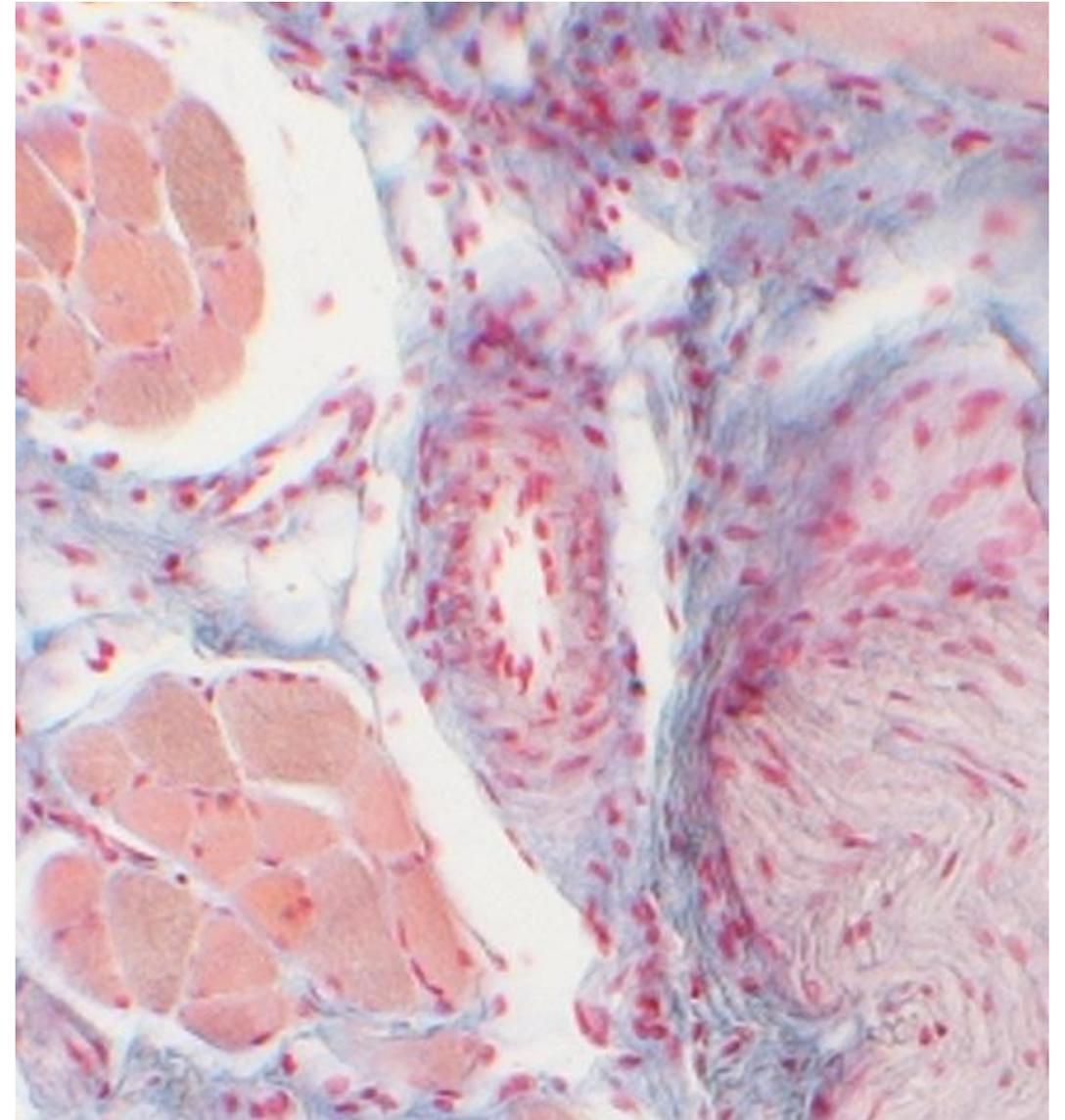
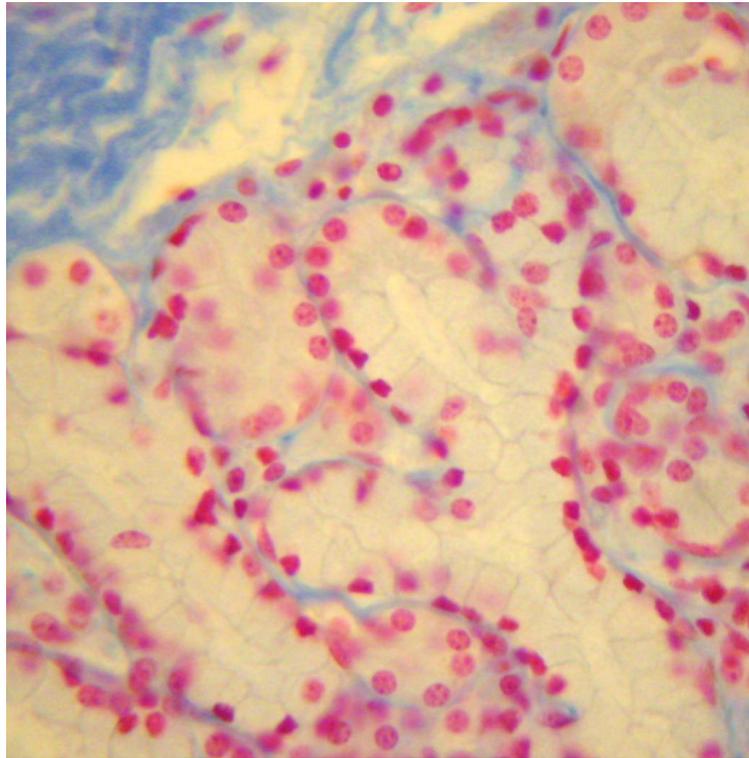


# Tricromica **Azan** - **Mallory**

Matrice - blu di anilina

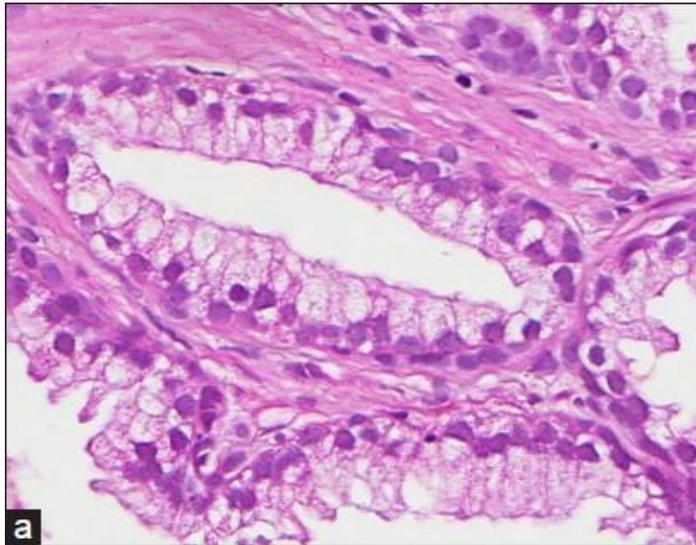
Nucleo - azocarminio

Citoplasma - orange G

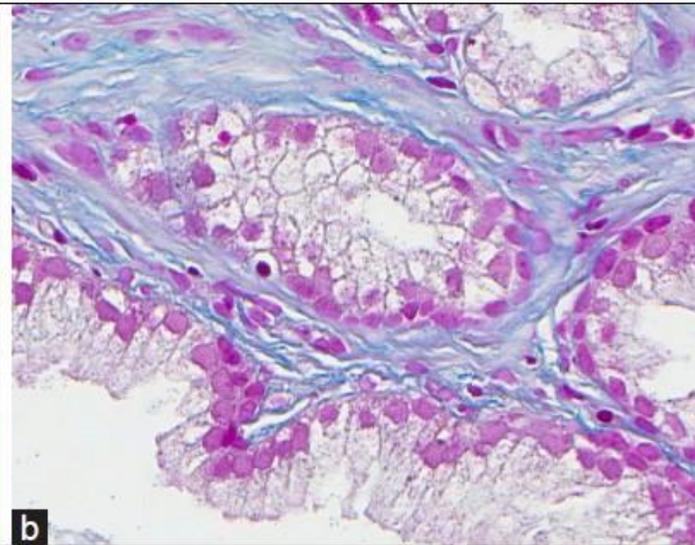


# Confronto tra colorazioni

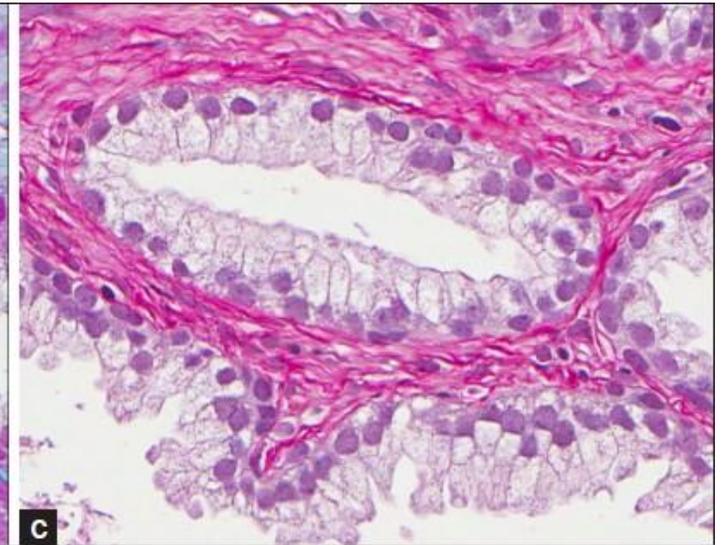
Ematossilina e **Eosina**



Ematossilina e **Blu di anilina**

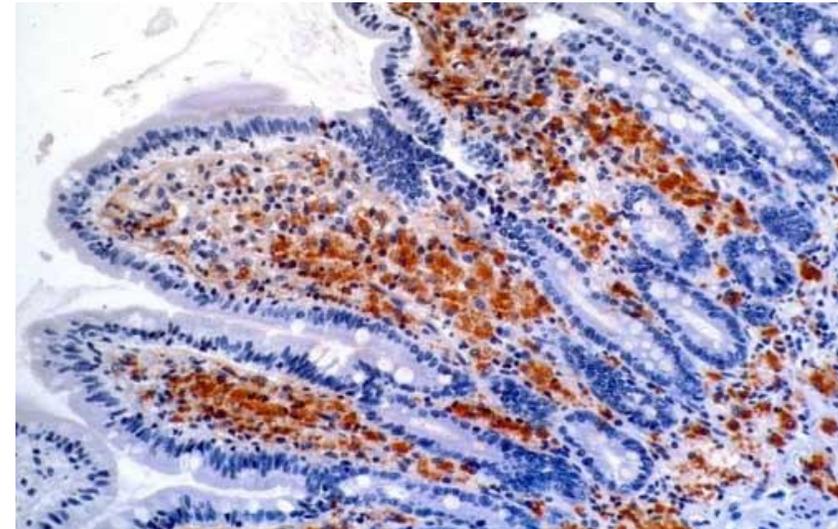
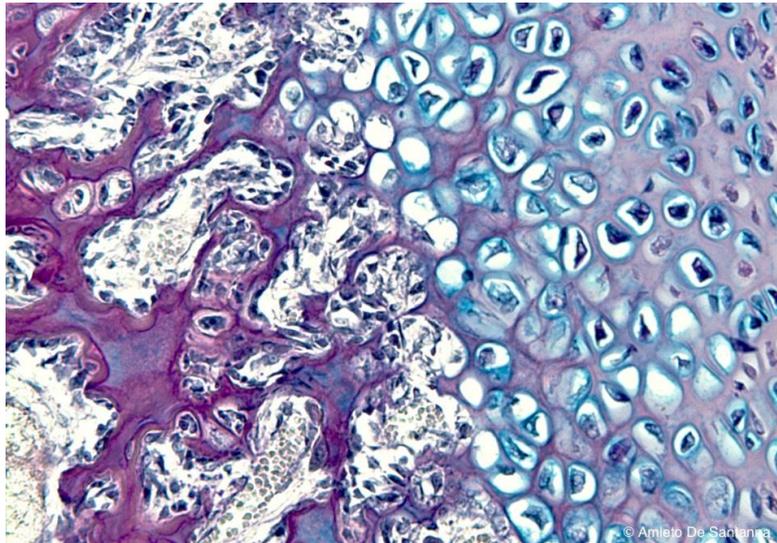


Ematossilina e **Picrosirius**



# COLORAZIONI

## *ISTOCHIMICHE ED IMMUNOISTOCHIMICHE*

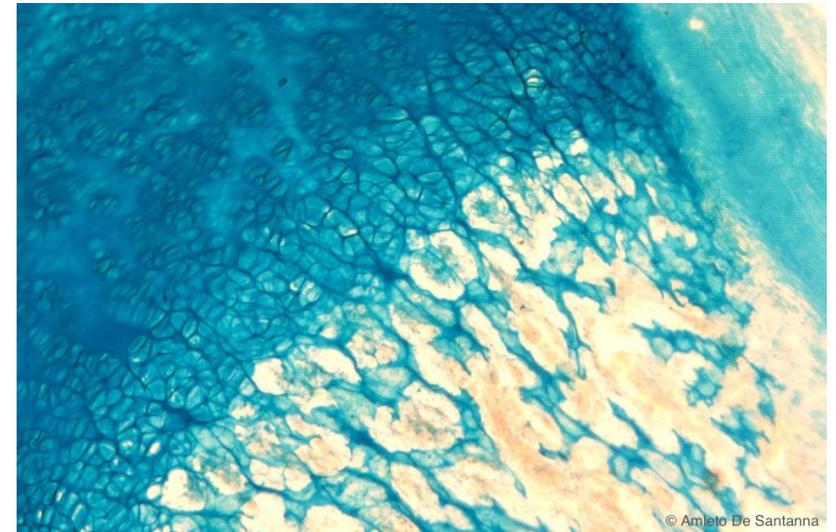


# COLORAZIONI ISTOCHIMICHE

I metodi di colorazione istochimica permettono di ottenere informazioni sulla localizzazione di macro-molecole nei tessuti. Tali dettagli si ottengono sottoponendo le sezioni a vere e proprie reazioni chimiche che, senza arrecare danno alle strutture cellulari, portano alla formazione di prodotti colorati.

Le reazioni istochimiche sono specifiche e sensibili

Esempi: *Picrosirius*, *reazione di PAS*, *Alcian Blu*



# Dimostrazione dei carboidrati - Reazione di PAS

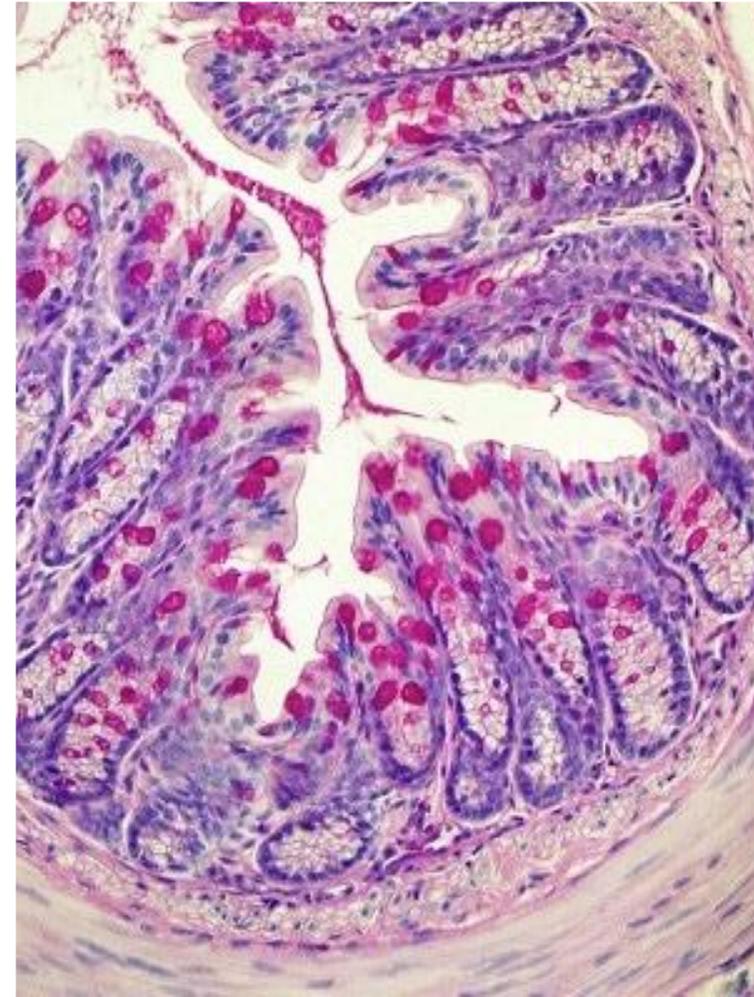
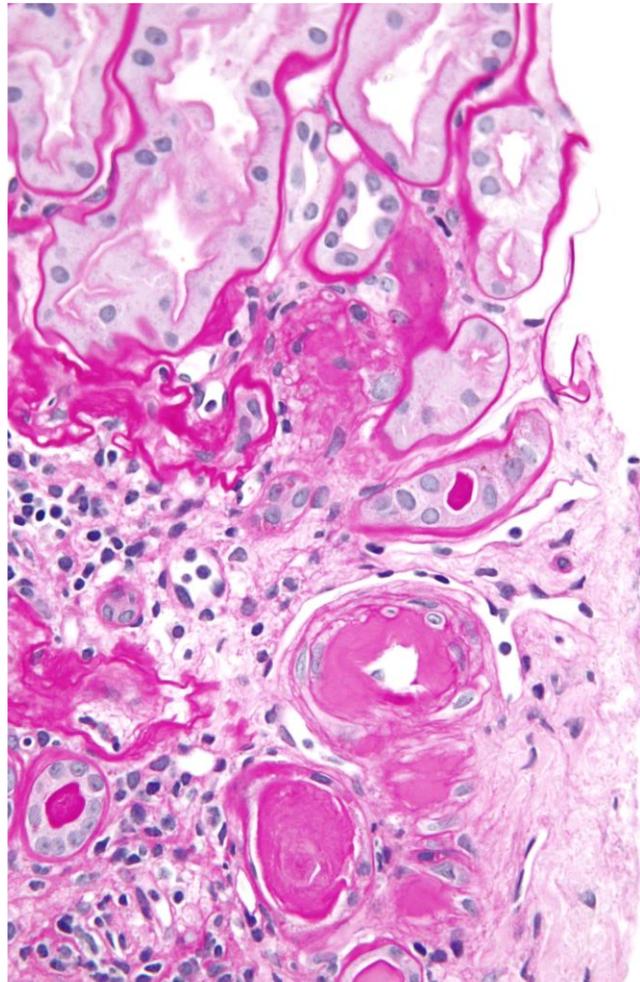
(acido periodico – reattivo di Schiff)

Mette in evidenza glucidi, polisaccaridi, glicoproteine

Sostanze PAS-positive **rosso magenta**

Nuclei **blu**

Membrana basale



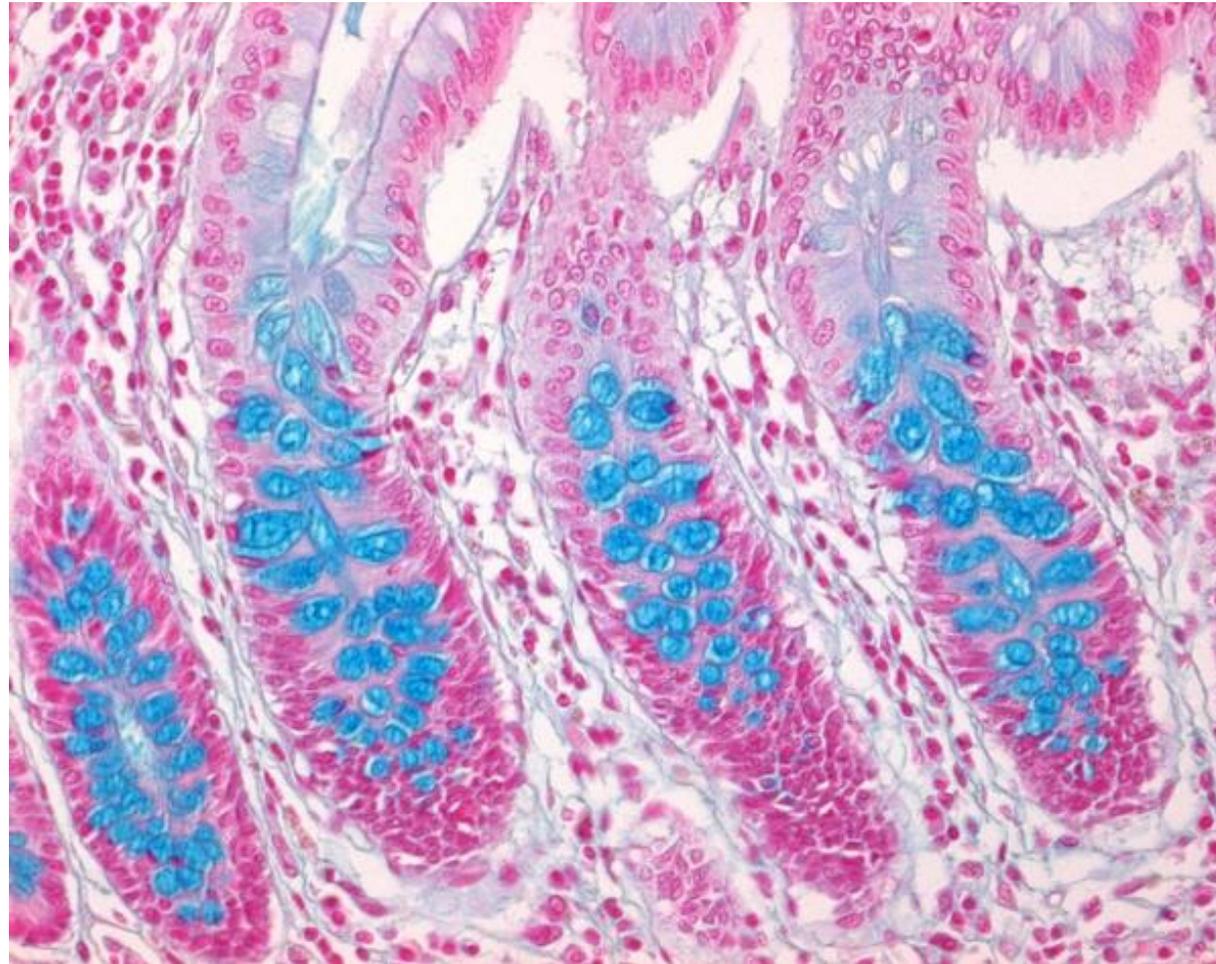
Mucina neutre  
in epitelii  
secernenti



# Dimostrazione dei mucopolisaccaridi - Alcian Blu

Alcian blu - muco

Azocarminio - nuclei

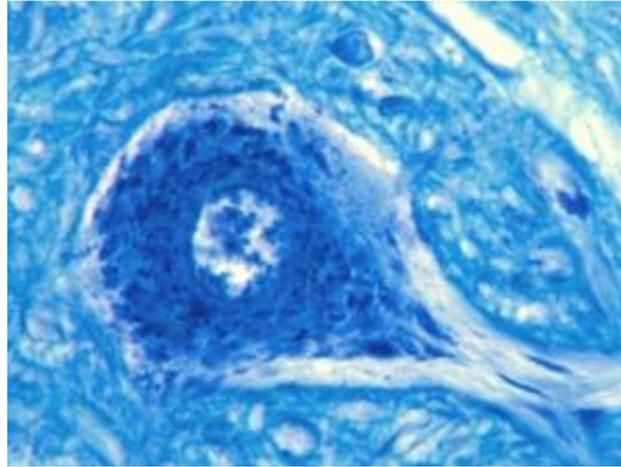


## **Alcune molecole poli-anioniche sono metacromatiche**

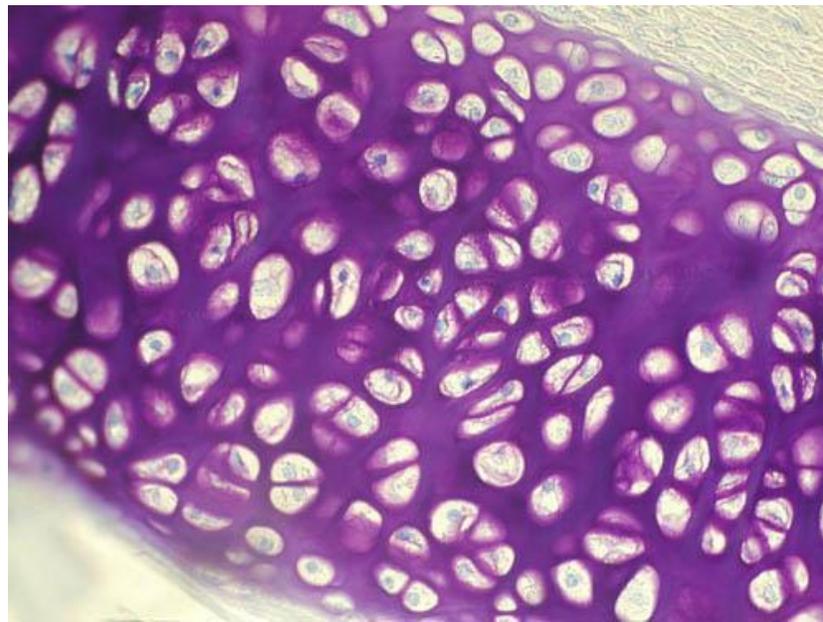
**La metacromasia è una proprietà di alcuni coloranti basici consiste nel mutamento di colore (viraggio) del colore originario, quando si legano a determinati gruppi chimici:** poiché il viraggio è specifico, la colorazione metacromatica si considera di tipo istochimico e non morfologico.



**BLU di Toluidina:** è un colorante basico. 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.



**Cromatina e i corpi di Nissl**



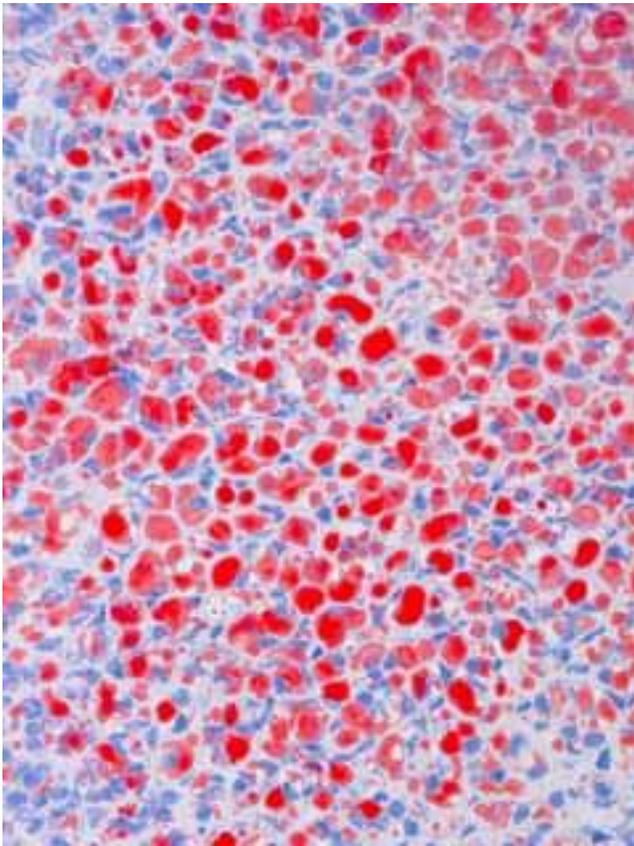
**Cartilagine (proteoglicani)**



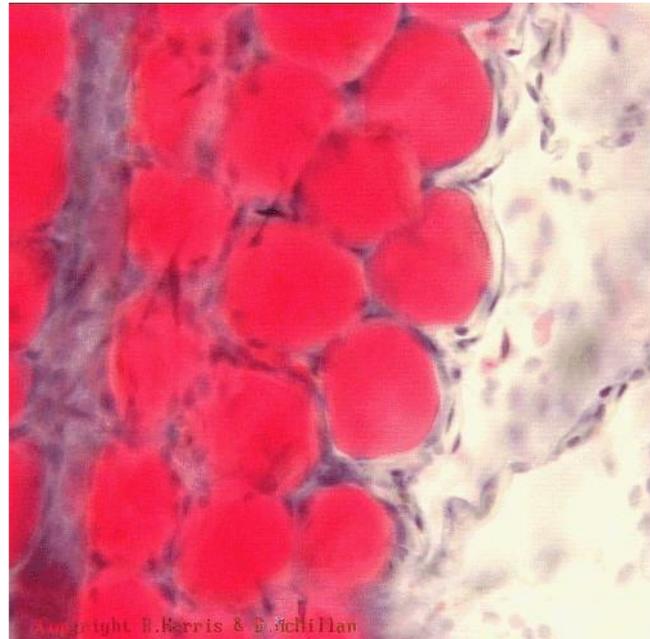
# Dimostrazione dei LIPIDI - Lisocromi

La colorazione dei lipidi mediante coloranti liposolubili (lisocromi) si basa sulla ripartizione di colore tra il solvente e il lipide. I coloranti lisocromi più usati sono rappresentati da **Oil red O** e **Sudan rossi**. Il **Sudan nero** è usato invece per i fosfolipidi.

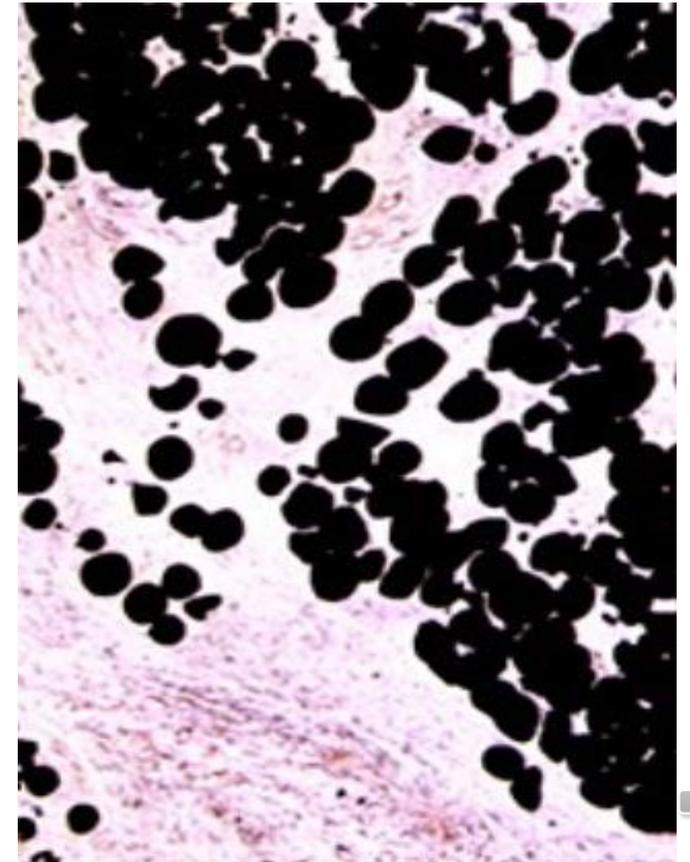
## Oil red ed ematossilina



## Sudan rosso



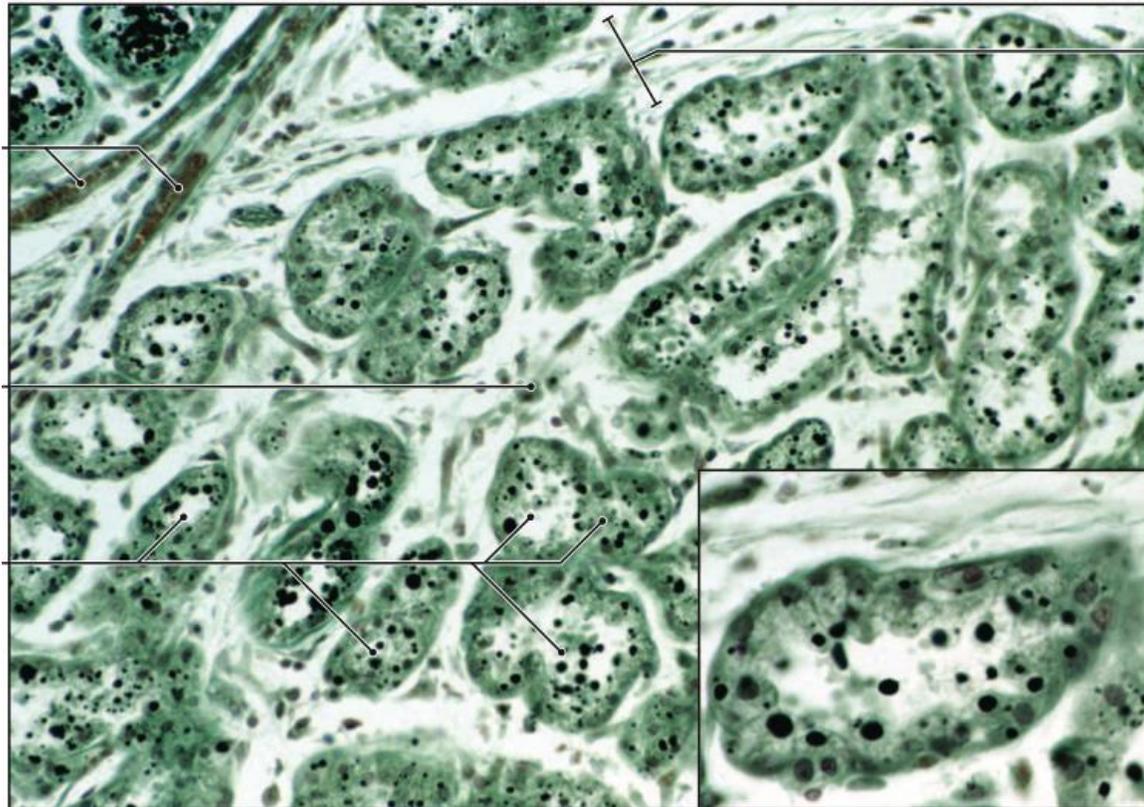
## Sudan nero



# Dimostrazione degli acidi nucleici - Verde metile (colorante basico)

Colora la cromatina nucleare e i comparti citoplasmatici basofili  
L'Osmio colora le inclusioni lipidiche

Ghiandola mammaria durante l'allattamento



Colorazioni specifiche per il DNA sono:

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



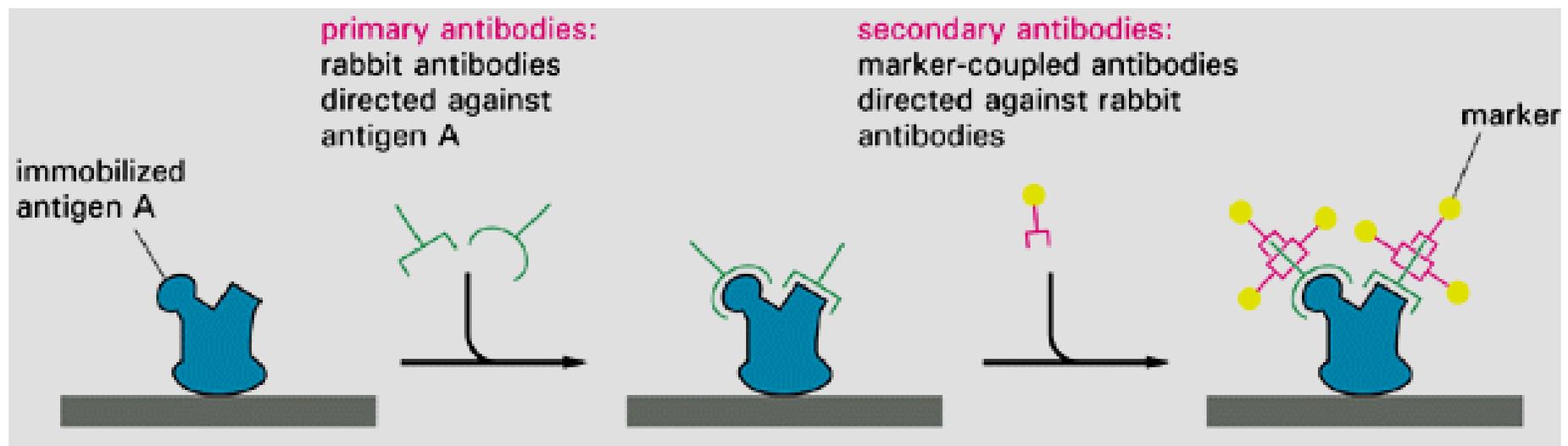
# Immunoistochimica / Immunocitochimica

## Immunofluorescenza

Colorazioni **estremamente specifiche** basate su reazioni immunologiche

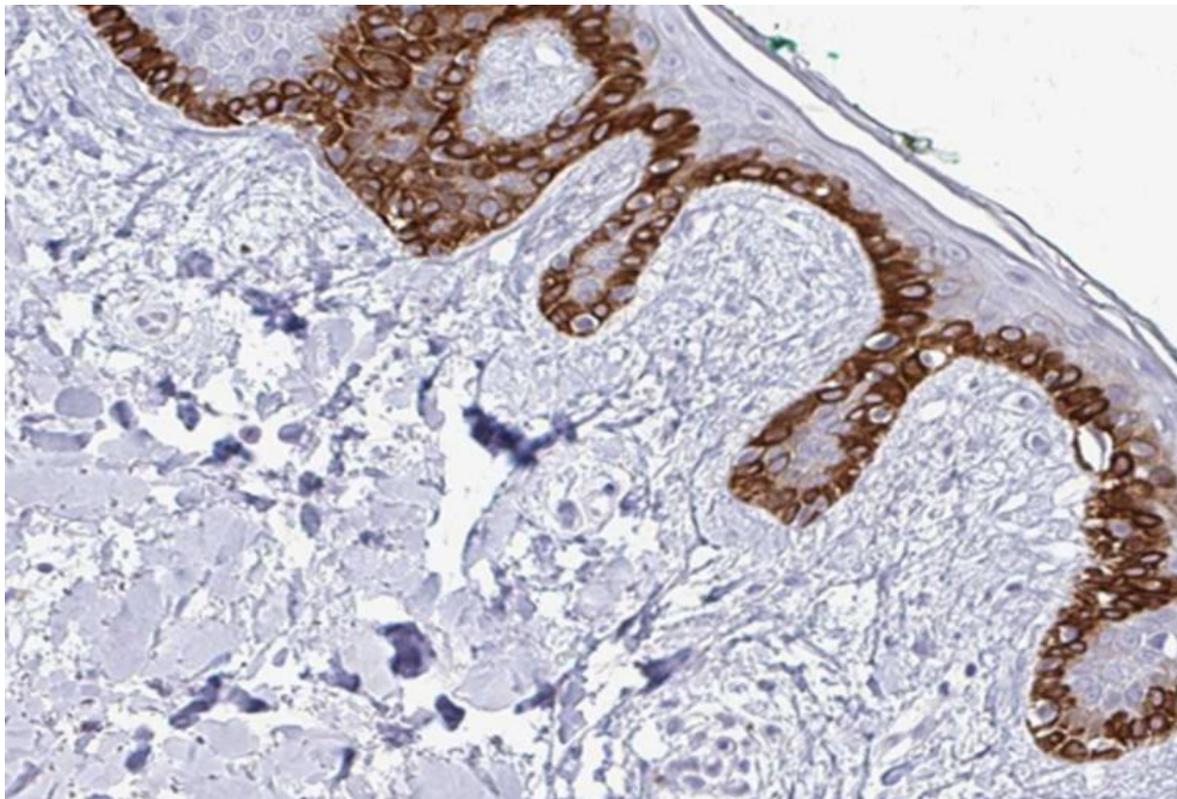
Il “colorante” è un anticorpo (*primario*) in grado di riconoscere una sola proteina

Per rivelare dove si accumula l’anticorpo si usa un anticorpo *secondario* a cui è stato legato covalentemente un enzima (perossidasi) oppure un fluoroforo

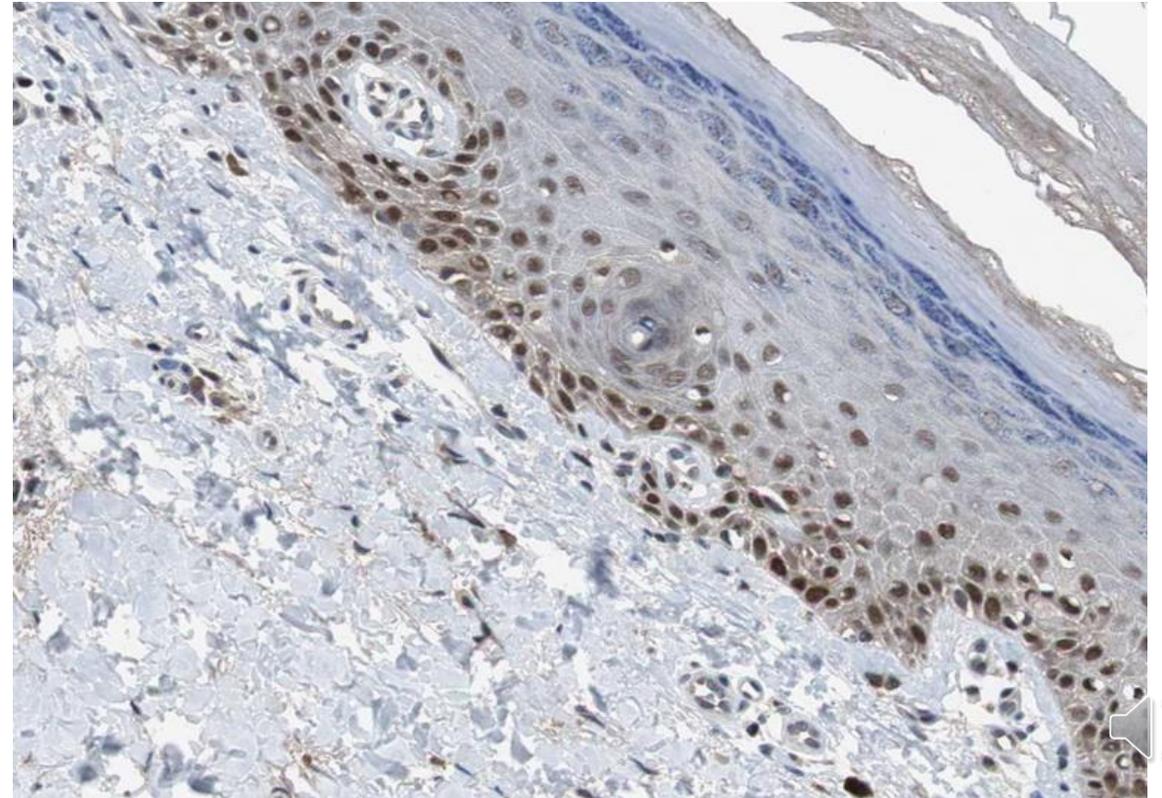


**Stesso tessuto – cellule e compartimenti  
cellulari differenti**

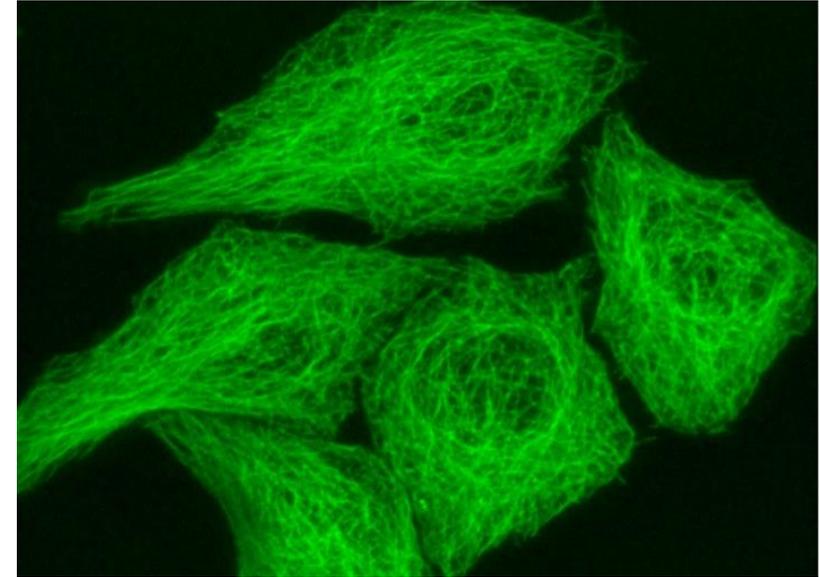
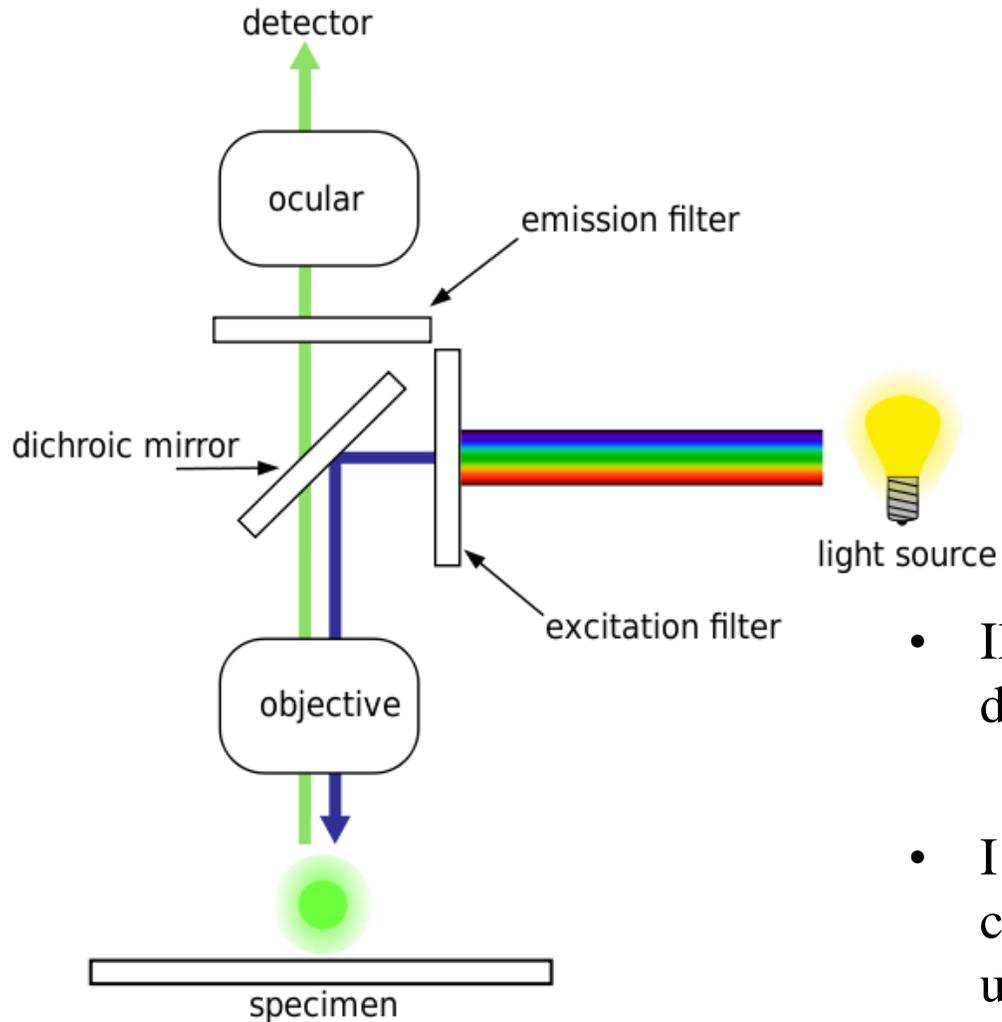
KRT5 – citoplasma c. basali dell'epidermide



KRT2 – citoplasma c. soprabasali dell'epidermide

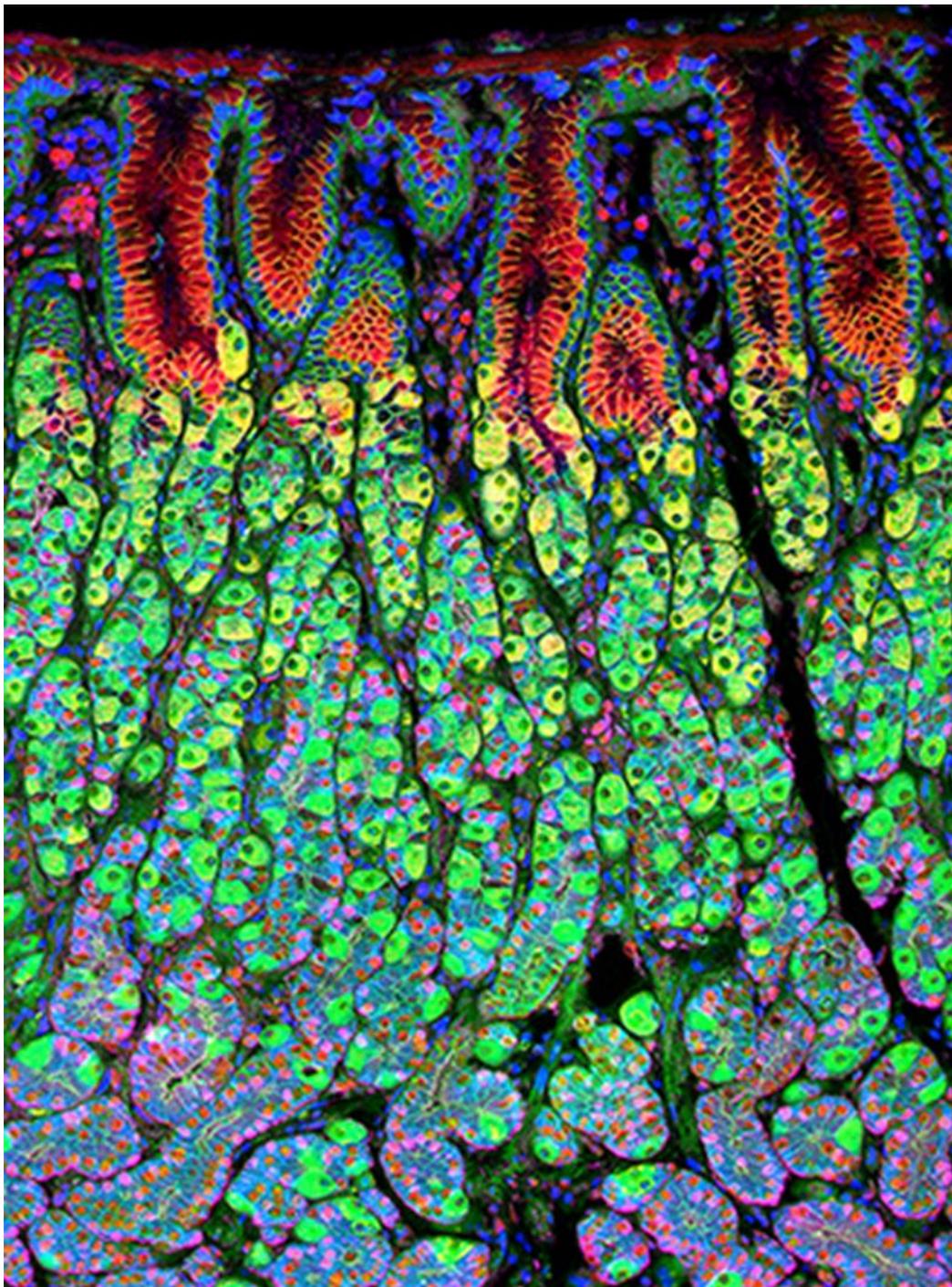


# Microscopio a fluorescenza e fluorofori



- Il campione viene marcato con una molecola fluorescente detta **fluoroforo** (fluoresceina, DAPI)
- I filtri e gli specchi dicroici sono scelti in base alle caratteristiche di eccitazione ed emissione del fluoroforo utilizzato





**Granuli di muco  
nelle C. superficiali**

**Nuclei**

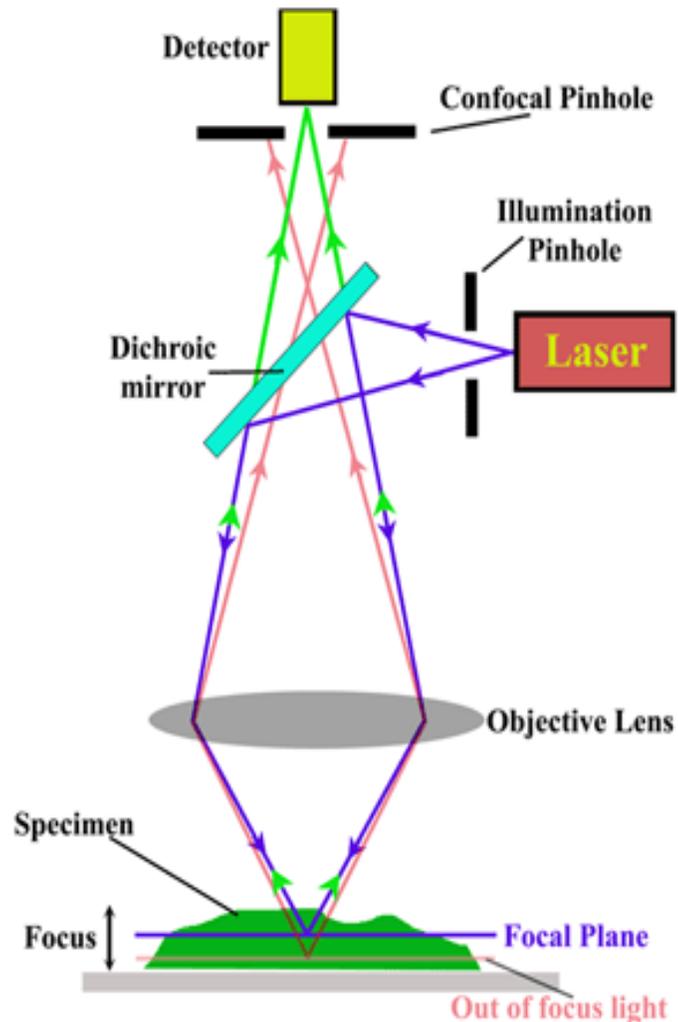
**Proteina citoplasmatica**

**Granuli di muco**

**Proteina nucleare  
Specifica in altre cellule**



# Microscopio confocale



- Vengono osservate sezioni ottiche ad intervalli regolari di preparati immunocolorati
- La luce proveniente dai piani diversi da quello focale non è rilevata
- Visualizzazione di immagini tridimensionali
- Ricostruzione dell'immagine complessiva dell'intero volume di tessuto in cui tutti i piani sono contemporaneamente a fuoco



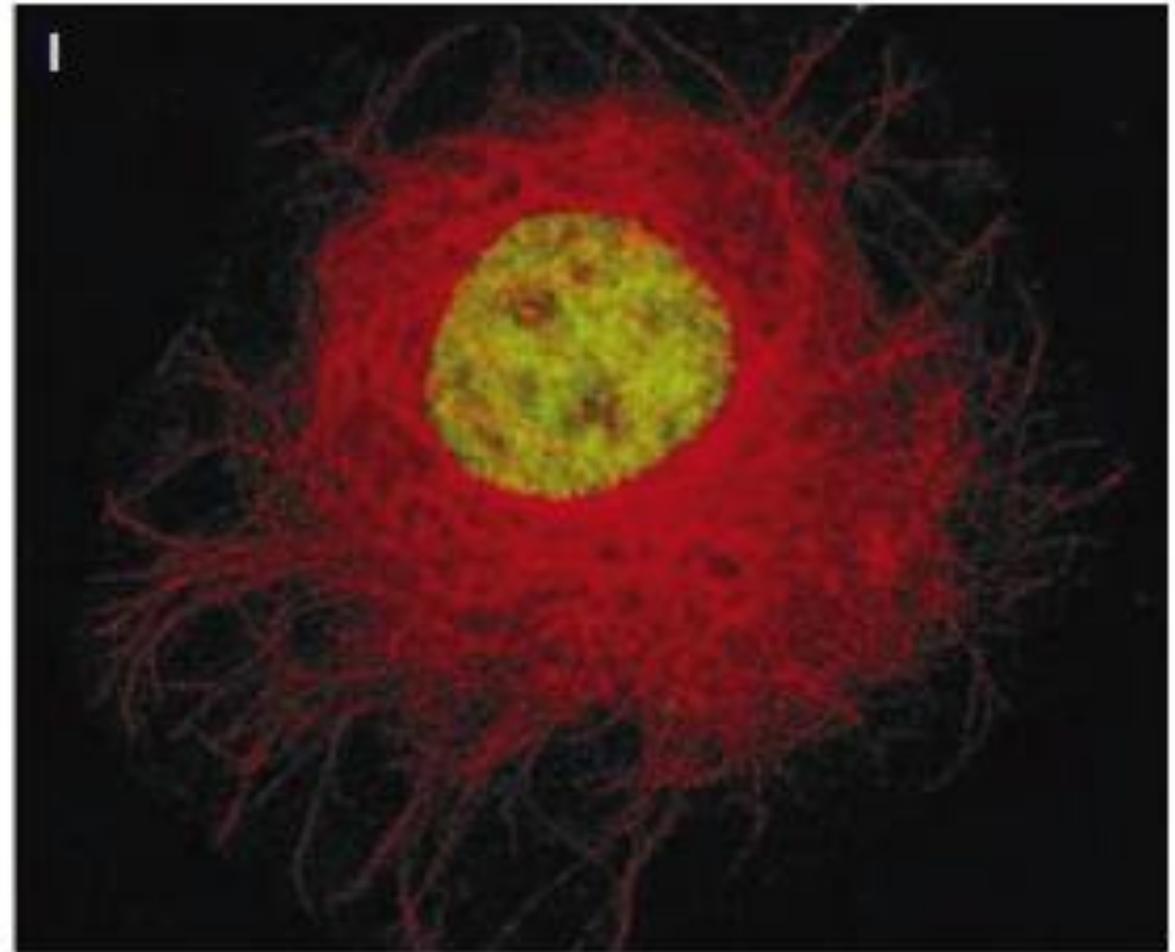
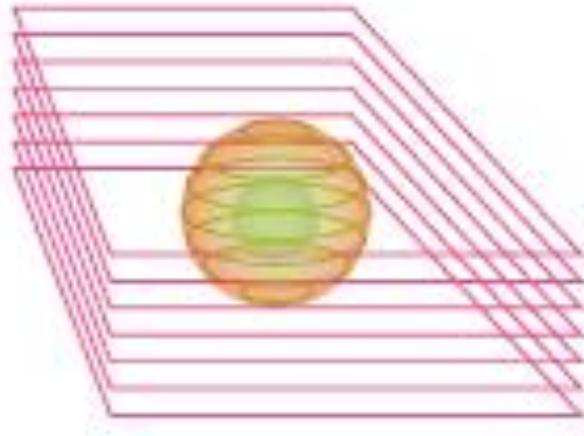
# Immagini ottenute al microscopio confocale

**Rosso:** tubulina

**Verde:** proteina nucleare

**Giallo-verde:** sovrapposizione di rosso e verde

Ricostruzione  
tridimensionale



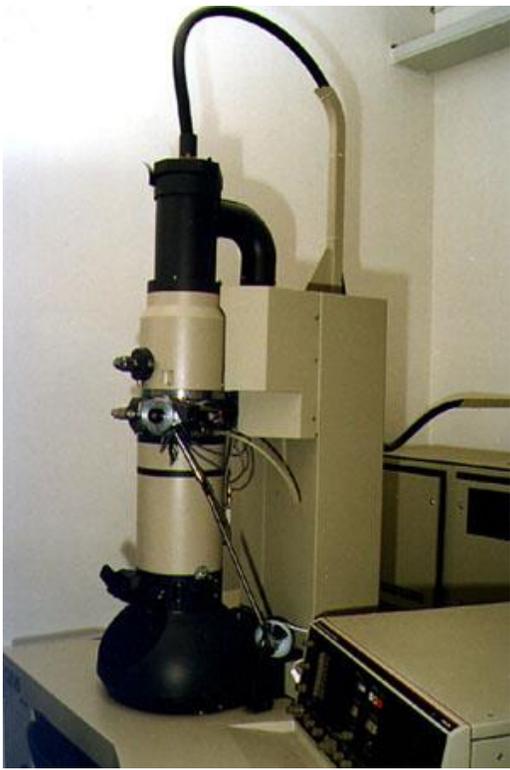
# Microscopio elettronico

Microscopio a trasmissione (TEM): ultrastruttura

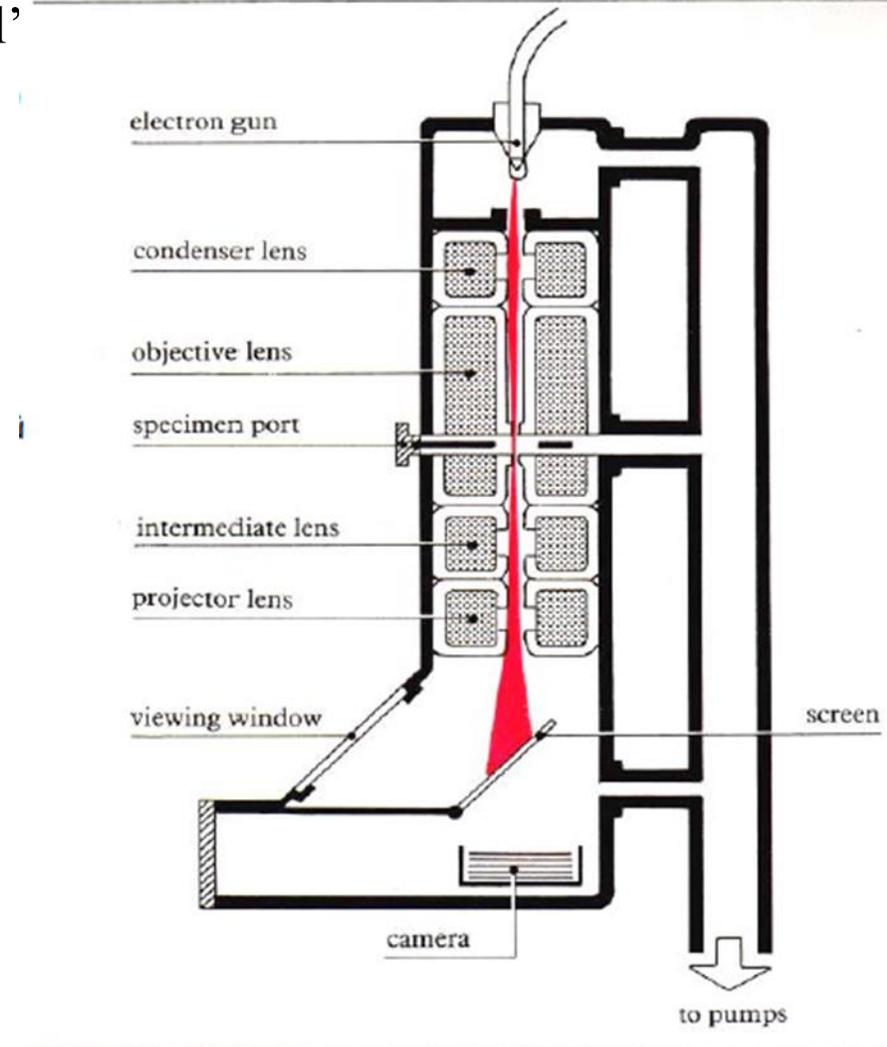
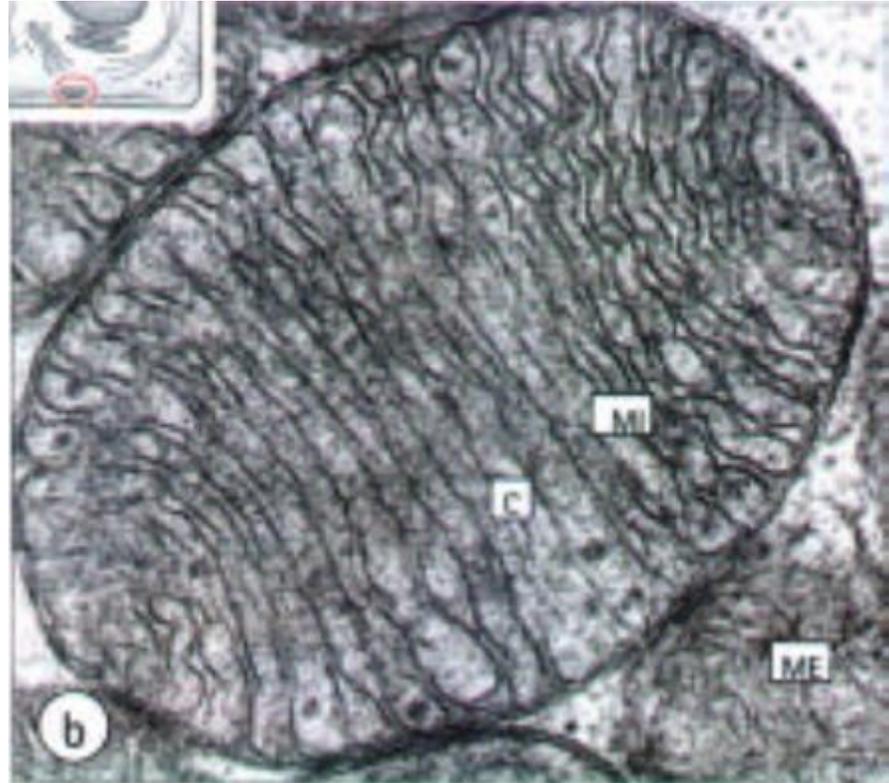
Microscopio a scansione (SEM): forma del campione

Il termine colorazione indica le *procedure con cui si rendono elettronopache determinate strutture* per poter essere osservate

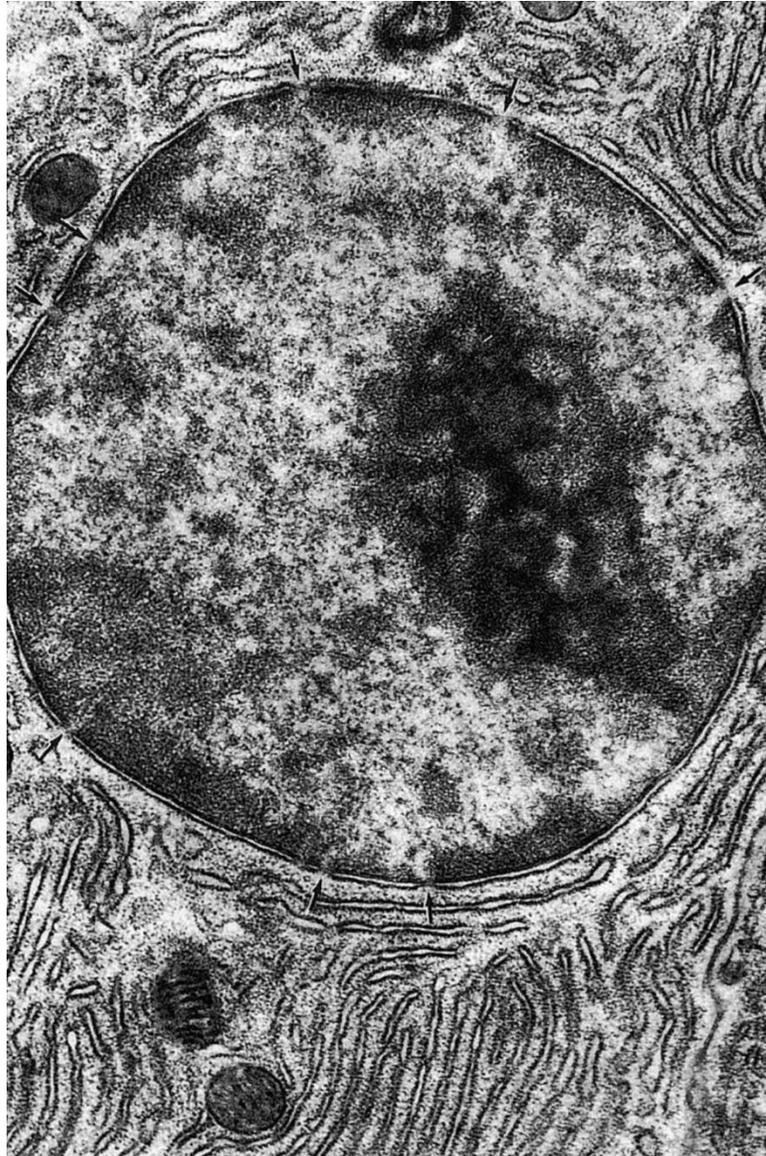




Nella **microscopia elettronica a trasmissione** (TEM) un fascio di elettroni colpisce le strutture del preparato e le lenti sono un campo elettrostatico o un campo elettromagnetico: l' schermo fluorescente.



**L'alto potere risolutivo del TEM consente di distinguere numerose componenti subcellulari**



Le immagini di microscopia elettronica sono “in bianco e nero”. Le parti “scure” si dicono *elettrondense*.



Nella **microscopia elettronica a scansione** un fascio di elettroni viene fatto rimbalzare sulla superficie di un campione ricoperto da una lamina di metallo (es. oro)  
Gli elettroni dispersi dal campione vengono raccolti permettendo di generare un'immagine 3D che sarà la replica metallica del campione su di uno schermo

