

Corso di Biologia cellulare

Tecniche di studio della cellula

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI: REIDRATAZIONE

- I coloranti sono soluzioni acquose: il campione deve essere idrofilo, mentre le sezioni incluse in paraffina sono idrofobe: La paraffina deve essere allontanata (sparaffinatura):

REIDRATAZIONE

Xilolo

Xilolo/Etanolo (50%-50%)

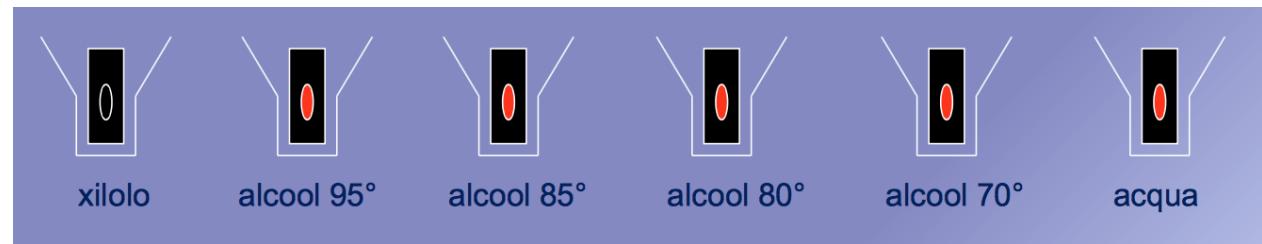
Etanolo 100%

Etanolo 95%

Etanolo 70%

Etanolo 50%

Acqua distillata

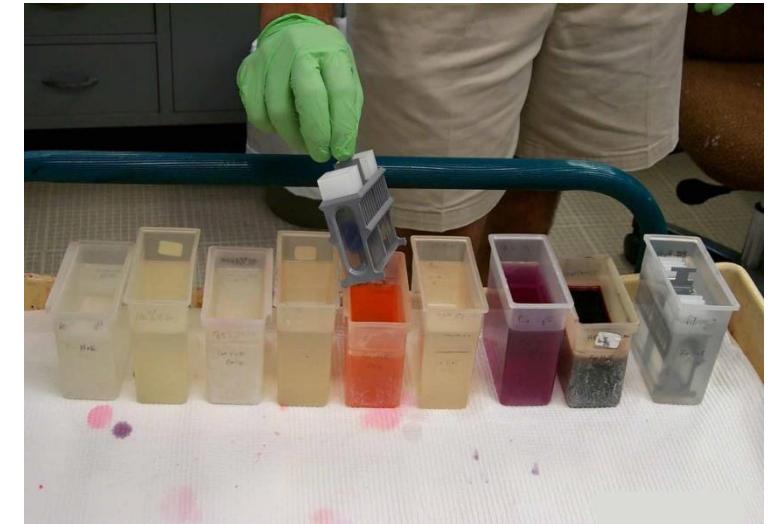


- Il vetrino è pronto per essere immerso nel colorante.



PREPARAZIONE DEI CAMPIONI: COLORAZIONI

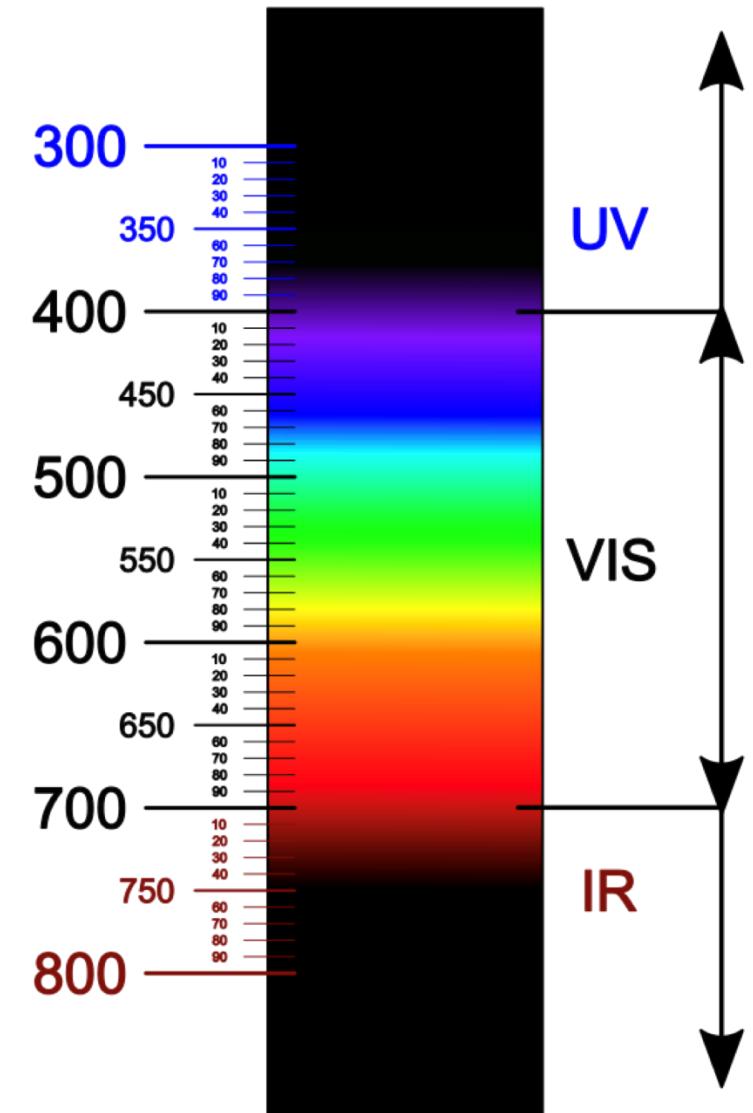
- **COLORAZIONE** = trattamento delle sezioni con **sostanze coloranti** allo scopo di aumentare il contrasto dei componenti della cellula e dei tessuti e facilitarne così l'identificazione al microscopio.
- **COLORANTE** = sostanza chimica che si lega a componenti cellulari aumentandone il contrasto.
- **Nella microscopia ottica** l'effetto di risalto è dato da una caratteristica colorazione delle strutture che rivelano affinità al colorante utilizzato.
- **Nella microscopia elettronica** il termine “colorazione” è usato impropriamente - per indicare i procedimenti con cui si rendono elettronopache le strutture; anche nel campo della **microscopia a fluorescenza** il termine è utilizzato impropriamente per indicare la procedura con cui le molecole fluorescenti si legano alle strutture cellulari.



PREPARAZIONE DEI CAMPIONI: COLORAZIONI

- Il colore è la percezione visiva generata dai segnali nervosi che i fotorecettori della retina inviano al cervello quando assorbono le radiazioni elettromagnetiche di determinate lunghezze d'onda e intensità nel cosiddetto **spettro visibile** o luce. (Wikipedia)

- In fisica lo **spettro visibile** è quella parte dello spettro elettromagnetico che cade tra il rosso e il violetto includendo tutti i colori percepibili dall'occhio umano;
- coloranti biologici sono quelle sostanze che hanno la proprietà di rendere visibili le strutture biologiche nei preparati microscopici.**



PREPARAZIONE DEI CAMPIONI: COLORAZIONI

- I coloranti sono in genere composti organici della serie aromatica e constano di 2 componenti:

1) CROMOFORO: gruppo di atomi che assorbono la luce e sono capaci di conferire colore a una sostanza.

2) AUXOCROMO: gruppo chimico che, legandosi alla struttura cellulare, permette alla sostanza di essere in grado di colorare.

- Le due componenti insieme formano il colorante completo.**
- Nel caso di “fluorocoloranti”, si parla rispettivamente di fluoroforo e di auxofluoroforo.**

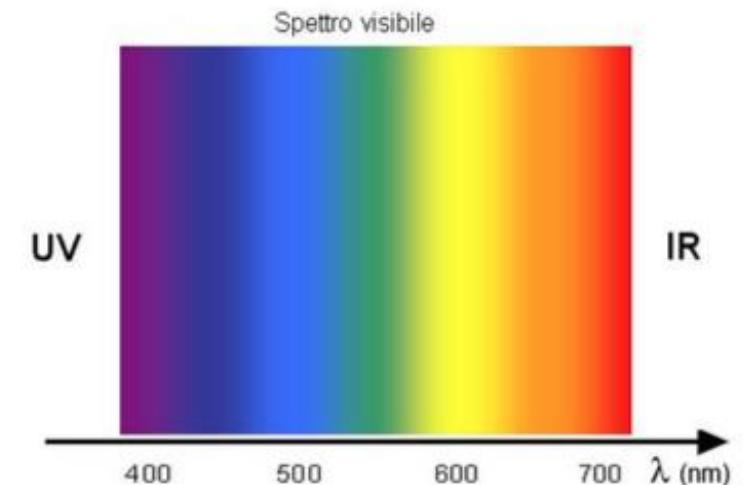
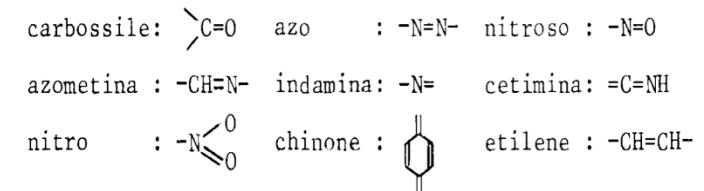


1) CROMOFORO

- **Gruppo di atomi che assorbono la luce e sono capaci di conferire colore a una sostanza**
- E' 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: es/ una sostanza che assorbe nel blu-violetto, appare giallo-arancione; una sostanza che assorbe nel rosso, appare verde.
- Quindi il colore è dovuto all'assorbimento selettivo di alcune lunghezze d'onda della luce
- La luce trasmessa o riflessa da una data sostanza, privata delle lunghezze d'onda che ha assorbito, appare colorata

Nel cromoforo, si trovano sempre raggruppamenti atomici dai quali dipende il colore

TABELLA 3. Gruppi cromofori elementari, secondo Singer, 1952.



2) AUXOCROMO

- il cromoforo, pur essendo colorato, non ha proprietà coloranti: è soltanto un cromogeno =generatore di colore
- perché il colorante acquisti la proprietà di colorare deve contenere anche un gruppo noto come **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 con le proteine o con altri componenti dei tessuti
- A seconda della carica assunta in soluzione, l'auxocromo può essere – acido(quando ionizza come anione) – basico(quando ionizza come catione). Questa caratteristica genera la fondamentale distinzione dei **coloranti istologici in acidi e basici**.

I COLORANTI vengono in genere posti in commercio sotto forma di sali:

- **Acidi:** come sali di sodio, talvolta di potassio, di calcio o di ammonio
- **Basici:** come cloruri, talvolta come acetati o solfati

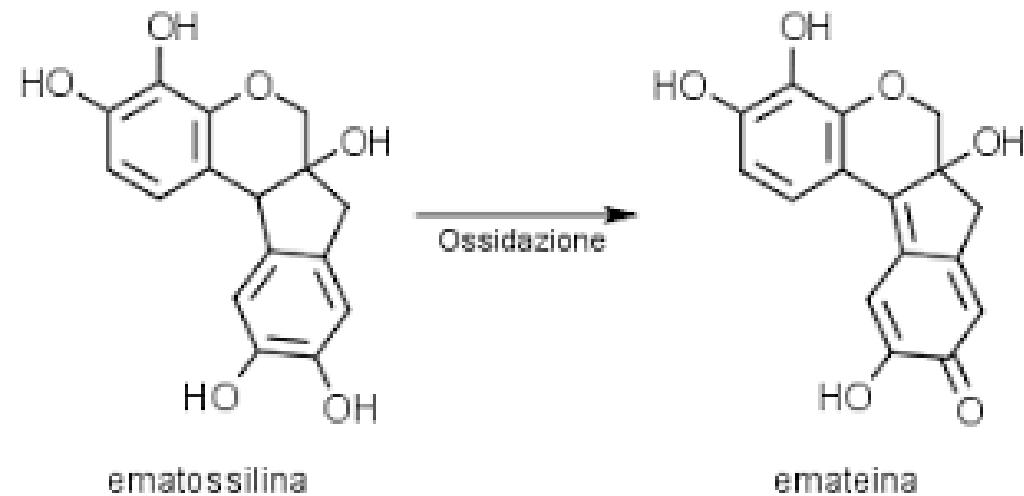
2) AUXOCROMO

- A seconda della carica assunta in soluzione, 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 i gruppi:
 - **solfonico (-SO₃H il più frequente)**
 - **carbossilico (-COOH)**
 - **idrossilico (-OH)**
- **Gli auxocromi basici sono:**
 - **il gruppo aminico (-NH₂) ed i suoi derivati**
 - **i metalli (nelle cosiddette LACCHE)**

- 
- Le **LACCHE** costituiscono una classe particolare di coloranti basici
 - Hanno largo impiego per l'intensità e la stabilità del colore
 - I metalli più usati nelle lacche per uso istologico sono **alluminio, ferro e cromo**
 - **Gli allumi (di potassio, di ferro ammoniacale) formano lacche con alcuni coloranti, come l'emateina, dando luogo a complessi fortemente colorati**

COLORAZIONE EMATOSSILINA/EOSINA (EE)

- L'ematossilina è un colorante basico che colora il nucleo.
- Il vero colorante non è l'ematossilina, ma il suo prodotto di ossidazione: **l'emateina**
 - **quindi aggiungiamo sostanze ossidanti** (il permanganato di potassio, l'idrato di potassio, iodato di sodio, ecc....).



COLORAZIONE EMATOSSILINA/EOSINA (EE)

Colorazione Ematossilina/Eosina:

- L'ematossilina è un colorante basico che colora il nucleo.
- Il vero colorante non è l'ematossilina, ma il suo prodotto di ossidazione: **l'emateina**
- **L'emateina è colorata e costituisce il cromoforo**, è anionica e non ha particolari affinità con gli acidi nucleici.
 - ***quindi 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**.

EMATEINA → ossidazione di Ematossilina

Compl. con Al → EMALLUME

* *Mordente: composto di collegamento*

COLORAZIONE EMATOSSILINA/EOSINA (EE)

EMATEINA



ossidazione di ematossilina

Compl. con Al



EMALLUME (Mayer, Harris)

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

* *Mordente: composto di collegamento*

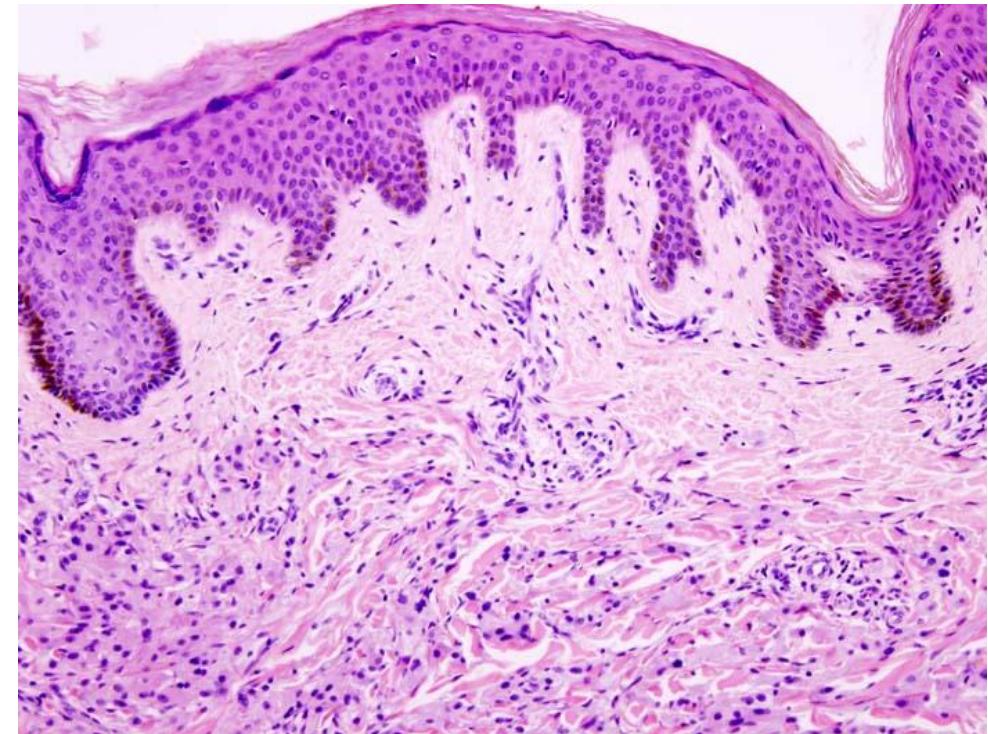
COLORAZIONE EMATOSSILINA/EOSINA (EE)

L'eosina è un colorante artificiale acido, colora in **rosso/rosa** le componenti cariche positivamente (acidofile); colora i citoplasmi, il tessuto connettivo e la sostanza intercellulare in varie tonalità di rosa.

La colorazione EE può essere descritta come una colorazione bicromica che si utilizza per lo studio topografico e generale per tessuti e organi:

Risultati di colorazione EE:

- Nucleo -> **Blu - viola**
- Citoplasma -> **Rosa - rosso**



Tessuto epiteliale pavimentoso pluristratificato cheratinizzato. In alto, al di sotto dello strato di cheratina superficiale, i nuclei, in viola; in basso, in rosa, la matrice connettivale.

CLASSIFICAZIONE COLORANTI

Per “colorante” si intende una molecola solubile e fornita di colore proprio, capace di legarsi stabilmente a substrati cellulari e tissutali.

**ACIDI, BASICI
e NEUTRI**

**NATURALI ED
ARTIFICIALI**

**VITALI e
NON VITALI**

CLASSIFICAZIONE: COLORANTI ACIDI BASICI e NEUTRI

COLORANTI ACIDI:

Con gruppo auxocromo anionico (-) che si legano a componenti basici (+) del tessuto -che sono per questo definiti acidofili per la loro affinità nei confronti dei coloranti acidi (ad es. trypan blue; eosina)

COLORANTI BASICI:

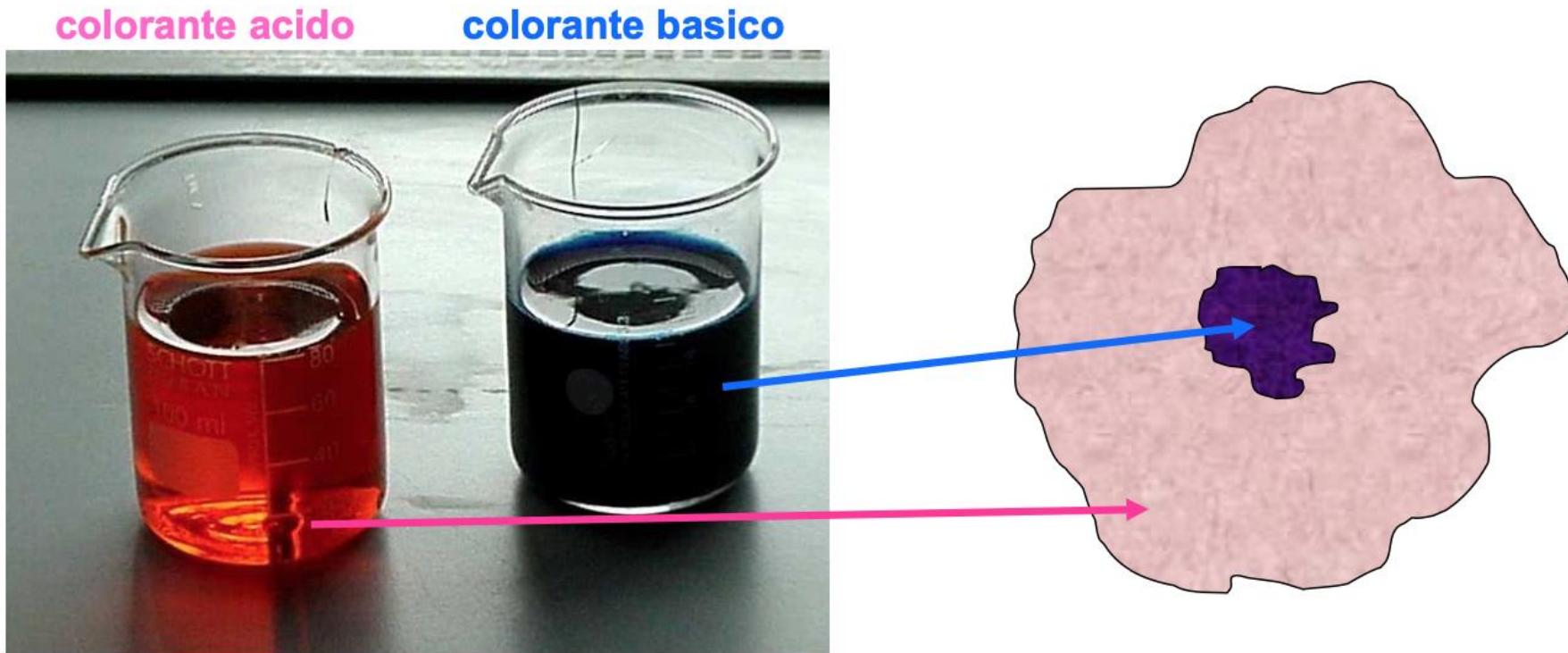
Con gruppo auxocromo cationico (+), si legano a componenti acidi (-) del tessuto e che per questo che sono definiti basofili per la loro affinità nei confronti dei coloranti basici (ad es. blu di toluidina, blu di metilene, ematossilina)

COLORANTI NEUTRI

non presentano dissociazione né come basi né come acidi perché sono privi di gruppi auxocromi. Interagiscono con substrati altrettanto privi di carica elettrica, come i lipidi, "sciogliendosi" in essi.
(ad es. verde janus)

MORDENZANTI: agiscono da intermediari tra il colorante e il tessuto. La maggior parte dei mordenzanti impiegati nelle tecniche istologiche sono ioni metallici (ferro o tungsteno) e/o ossidanti (acido cromico).

CLASSIFICAZIONE: COLORANTI ACIDI e BASICI



- I coloranti **BASICI** si legano ed evidenziano selettivamente le componenti acide o basofile delle cellule (cromatina nucleare e ribosomi)
- I coloranti **acidi** viceversa svelano le componenti basiche o acidofile delle cellule (matrice citoplasmatica)

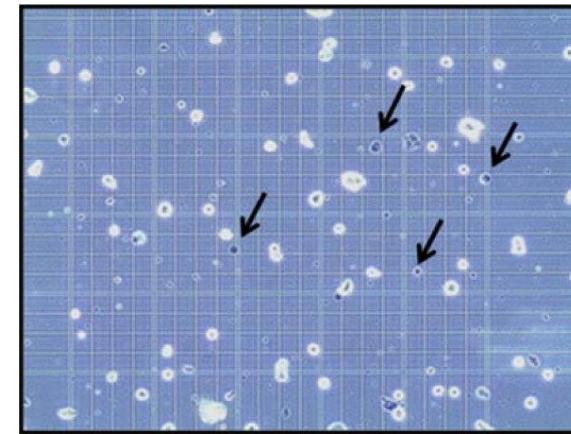
CLASSIFICAZIONE: COLORANTI VITALI E NON VITALI

Alcuni coloranti, detti coloranti vitali, 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.

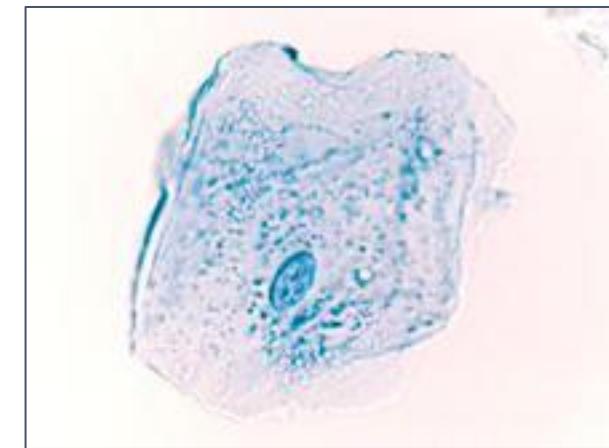
I coloranti vitali sono incorporati direttamente dalle cellule e si vanno a localizzare nelle strutture verso cui sono preposti.

Esempi di coloranti vitali:

- Trypan Blue (macrofagi, fagocitosi)
- Verde Janus (mitocondri)
- Blu di Metilene (fibre nervose).



Trypan blue – conta cellule vitali



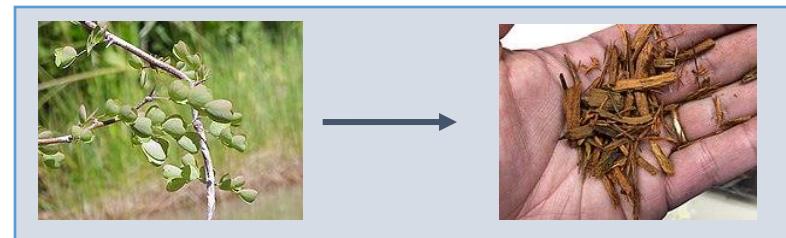
Janus Green B

CLASSIFICAZIONE: COLORANTI NATURALI ED ARTIFICIALI

- 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 DIVISI 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)

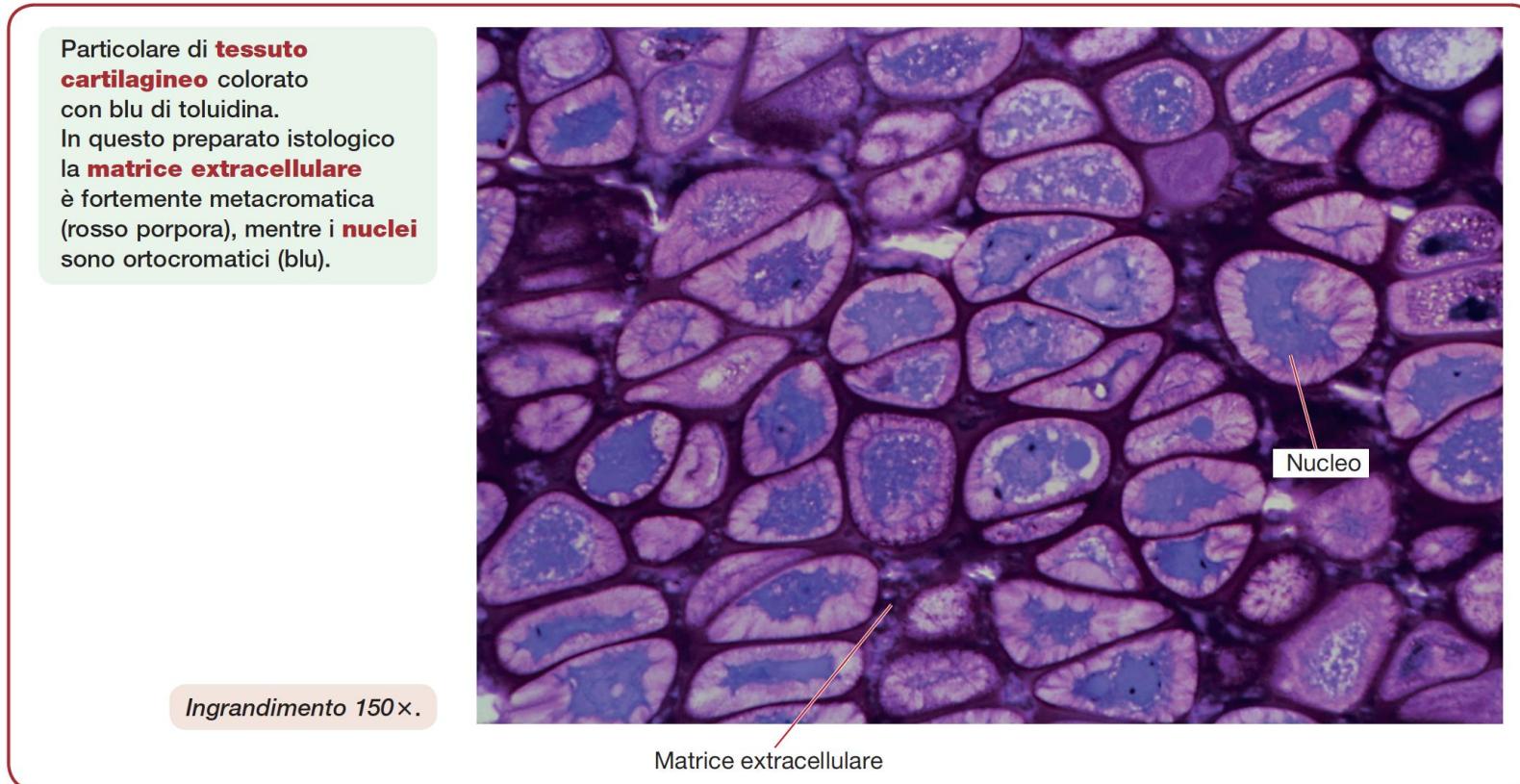
COLORANTI DI USO COMUNE IN CITOLOGIA E ISTOLOGIA

NOME	TIPO	AFFINITA' PER....
EOSINA	acido (artificiale)	Citoplasma e collagene (rosa-fucsia)
EMATOSSILINA*	basico (naturale)	Nucleo (viola-blu)
BLU DI TOLUIDINA	basico, metacromatico	Nucleo (blu), alcuni polisaccaridi (rosso)
ALCIAN BLUE	basico	Alcune mucosostanze (blu)
VERDE LUCE	acido	Fibre collagene (verde)
FUCSINA ACIDA	acido	Eritrociti (arancione)
ROSSO CONGO	anfotero	Nucleo (blu), connettivo (rosso)

* in realtà il vero colorante è l'emateina cioè il prodotto di ossidazione della ematossilina

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI: METACROMASIA

- La **metacromasia** (= cambiamento di colore) è una proprietà di molecole a elevato peso molecolare che se trattate con alcuni coloranti basici assumono una colorazione diversa da quella del colorante.



▲ Figura 2.2 Colorazione istologica con blu di toluidina.

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI: COLORAZIONI

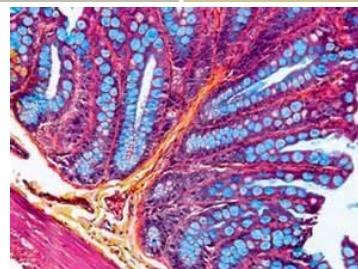
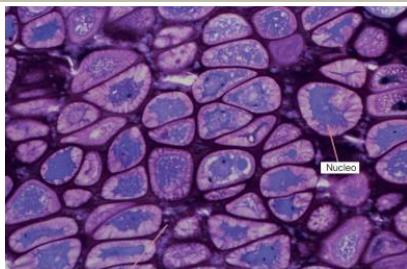
- DIRETTE
- INDIRETTE (tramite mordenzanti)

- PROGRESSIVE
- REGRESSIVE

TIPI DI COLORAZIONI

- SEMPLICI
(orto- o metacromatiche)
- COMBINATE
(successive o simultanee)

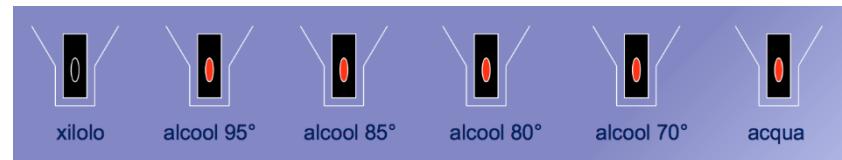
- ISTOMORFOLOGICHE
- ISTOCHIMICHE



PREPARAZIONE DEI CAMPIONI: COLORAZIONI

Passaggi tipici di una colorazione istologica:

1. **Sparaffinatura** in xilolo
2. **Idratazione** tramite serie decrescente degli alcol fino all'acqua distillata
3. **Immersione nel/i colorante/i** (a volte preceduta da trattamenti preparatori)
4. **Disidratazione** tramite serie crescente degli alcol
5. **Immersione in xilolo**
6. **Montaggio**: resina trasparente e un vetrino coprioggetto. La resina usata garantisce la perfetta adesione dei due vetrini (portaoggetto e coprioggetto) fra loro e, seccando, rende il preparato stabile ed inalterabile.



Metodo manuale e automatico

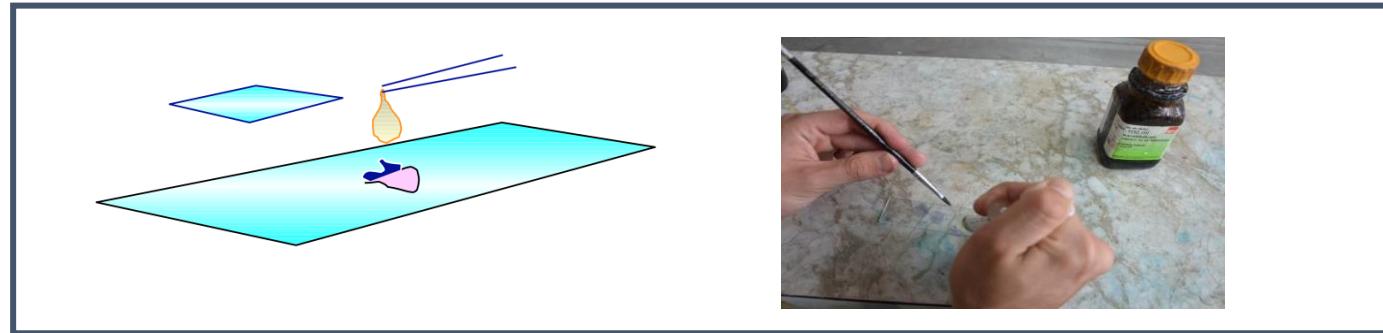


PREPARAZIONE DEI CAMPIONI: MONTAGGIO

- 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: resine naturali o sintetiche che garantiscono la perfetta adesione dei due vetrini fra loro e che, seccando, rendono il preparato stabile ed inalterabile (**Balsamo del Canadà**).
- Queste sostanze, non sono miscibili con l'acqua, ma sono ben miscibili con lo xilolo. Per questo motivo, si devono disidratizzare le sezioni ancora una volta e riportarle allo xilolo:

disidratazione

- acqua distillata
- etanolo 70%
- etanolo 90%
- etanolo 95%
- etanolo 100% (x2)
- **xilolo**



Montaggio vetrino copri-oggetto con Balsamo del Canadà

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI: COLORAZIONI ISTOLOGICHE E *ISTOCHIMICHE*

ISTOLOGICHE

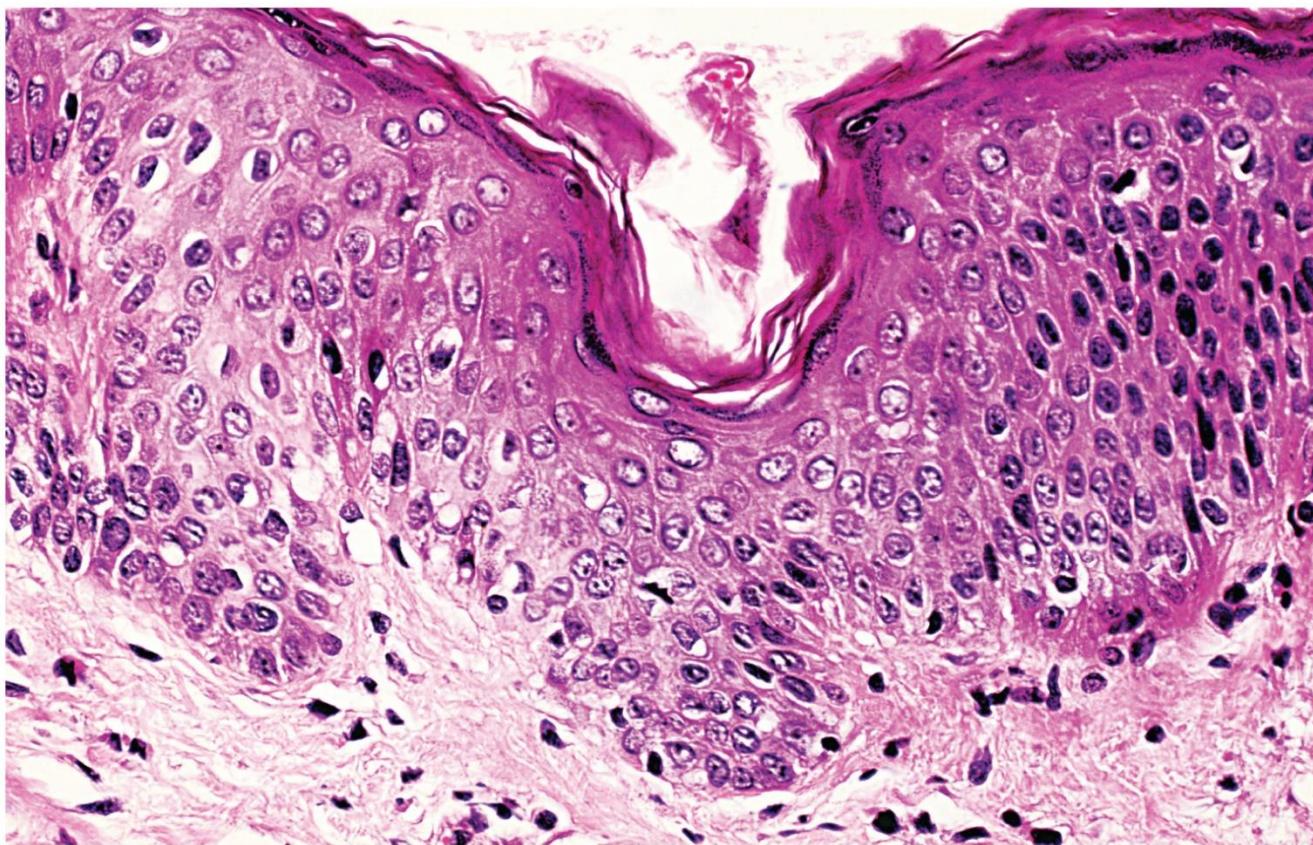
- **Ematossilina-Eosina:** utile per qualsiasi tessuto.
- **Tricromica di Masson:** per il tessuto connettivo.
- **Giemsa e varianti:** per gli strisci di sangue.
- **Impregnazione argentica:** per le cellule nervose e le fibre reticolari.

ISTOCHIMICHE

- **Reazione di PAS:** per i carboidrati.
- **Reazione di Feulgen:** per il DNA.
- **Alcian Blu:** per alcune mucine e componenti della matrice extracellulare (MEC).

Colorazione citologica di Papanicolaou (PAP Test): consente di valutare cellule isolate, ottenute per esfoliazione spontanea o per asportazione meccanica, esaminandone le caratteristiche del nucleo e del citoplasma ed individuando eventuali alterazioni neoplastiche.

COLORAZIONI: EMATOSSILINA-EOSINA



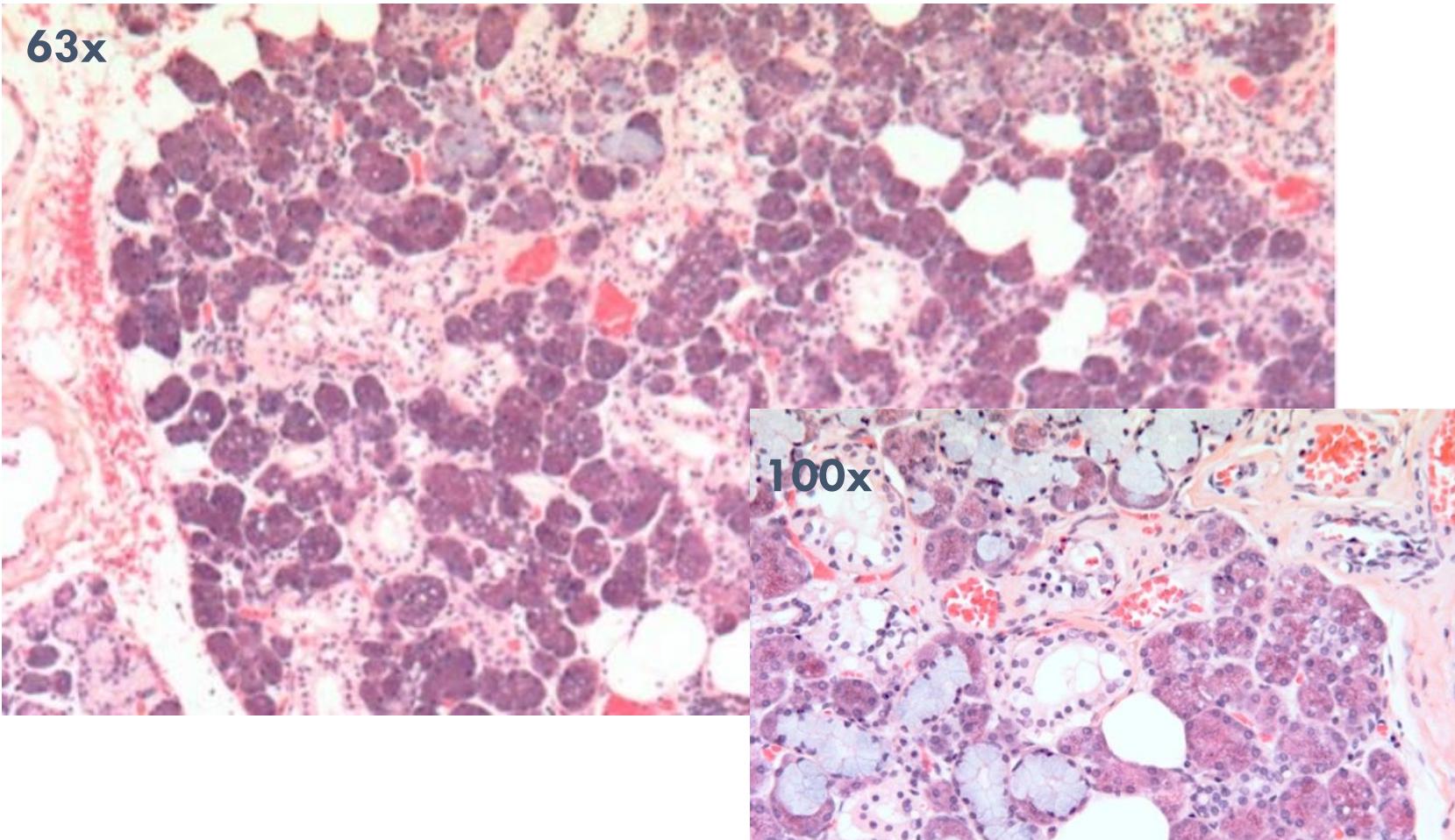
Particolare di **epidermide umana**. I **nuclei** delle cellule appaiono colorati in blu scuro dall'ematossilina, mentre il **citoplasma** è colorato in rosa dall'eosina.

Ingrandimento 150x.

▲ Figura 2.1 Colorazione istologica con ematossilina-eosina.

- E' una metodica di colorazione semplice, veloce e generica.
- Ampiamente utilizzata per osservare la struttura generale dei tessuti e degli organi.

COLORAZIONI: EMATOSSILINA-EOSINA

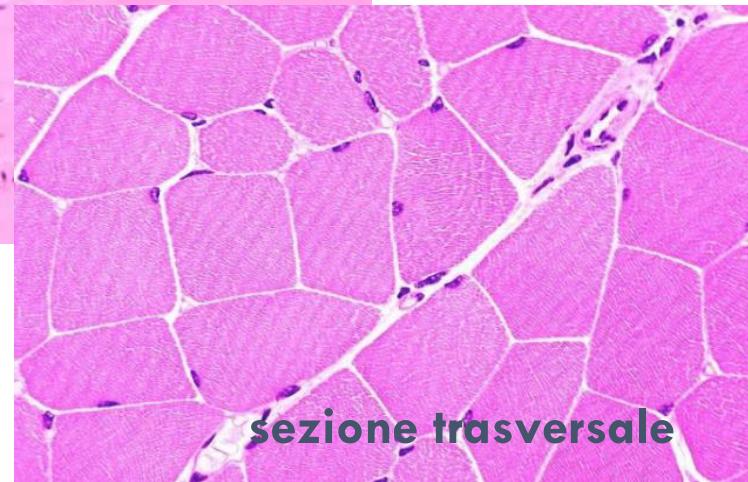
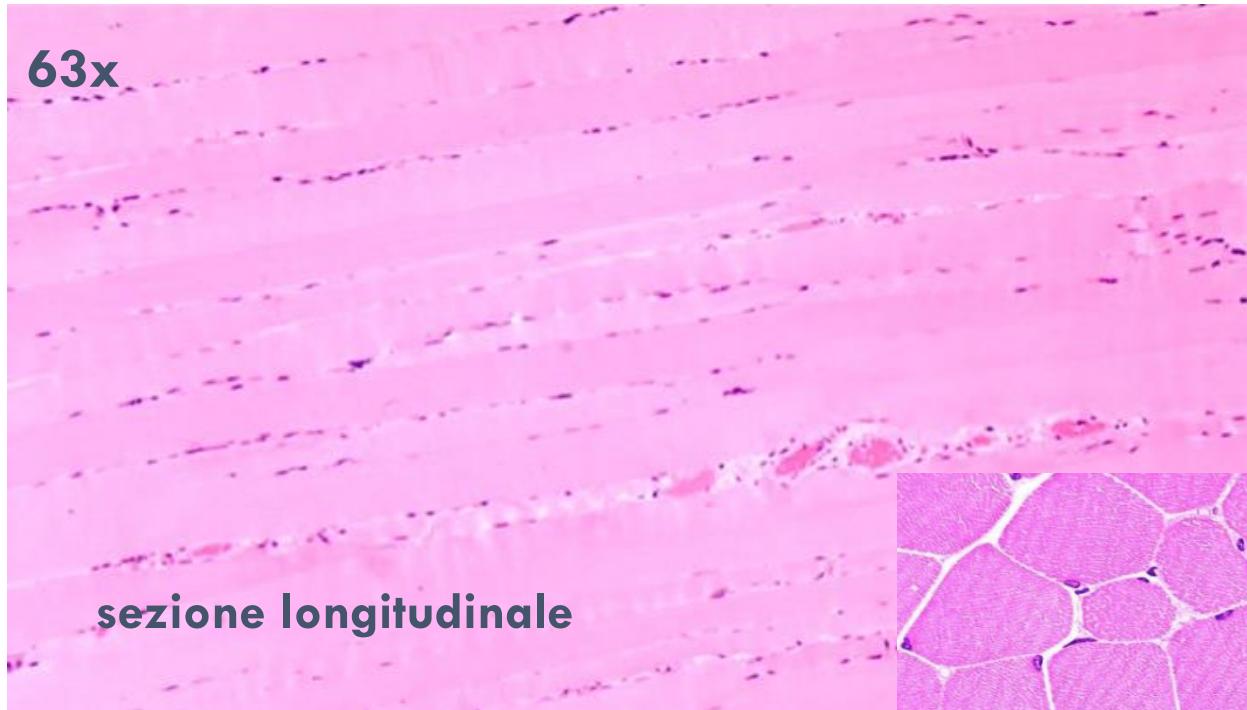


- **Ghiandola sottomandibolare (EE)**

- Il nucleo e i vari componenti acidi del citoplasma (ribosomi, secreti acidi) vengono colorati in viola dall'ematosilina, che è un colorante basico.

- Il citoplasma e i vari tessuti basici (muscolare, connettivo, osseo) vengono colorati in rosa, più o meno intenso, da eosina.

COLORAZIONI: EMATOSSILINA-EOSINA

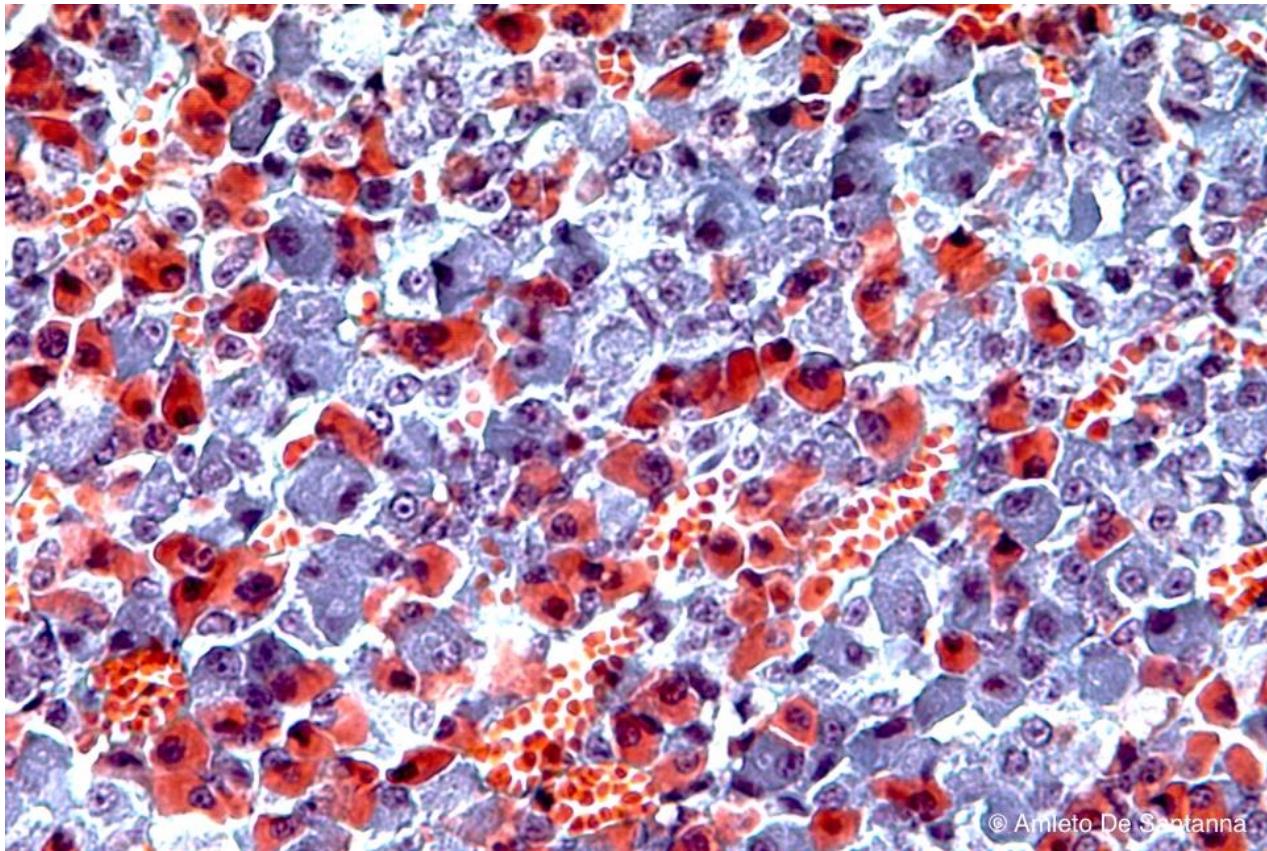


- **Muscolo scheletrico umano (EE)**

- Il nucleo e i vari componenti acidi del citoplasma (ribosomi, secreti acidi) vengono colorati in viola dall'ematoossilina, che è un colorante basico.
- Il citoplasma e i vari tessuti basici (muscolare, connettivo, osseo) vengono colorati in rosa, più o meno intenso, da eosina.

COLORAZIONI: TRICROMICA DI MASSON

- Colora i nuclei in viola con **l'emallume**; il citoplasma in rosso più o meno vivo con la **fucsina acida**, il connettivo e le strutture fortemente basiche in blu con **il blu di anilina**.



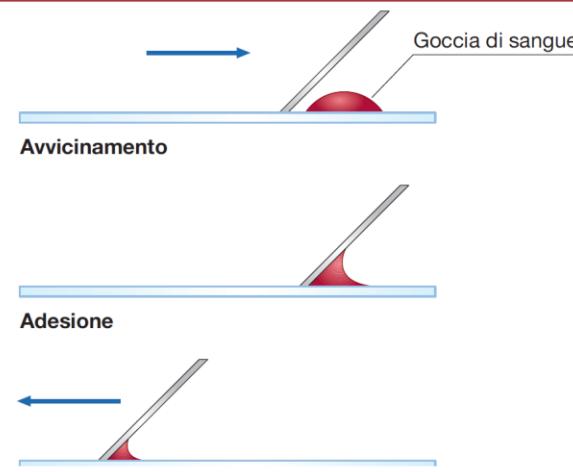
© Amleto De Santanna

- **Adenoipofisi umana (200x)**

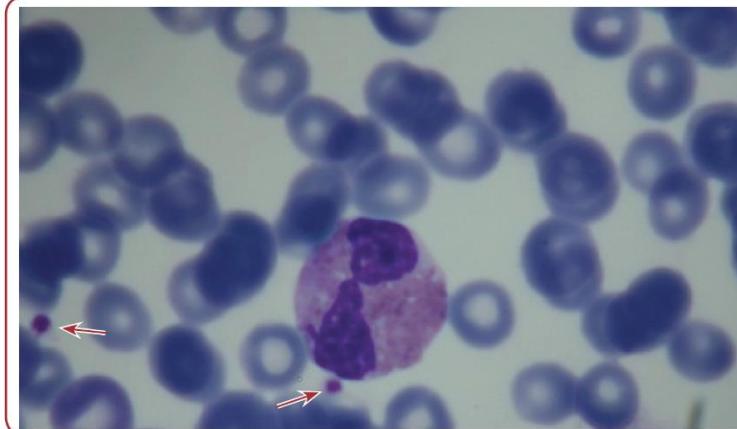
COLORAZIONI: MAY-GRUNWALD GIEMSA e GIEMSA & WRIGHT

La colorazione dello striscio ottenuto viene fatta con la **tecnica May-Grünwald-Giemsa**. Tale metodo di colorazione si realizza a mezzo di due miscele di coloranti: quella di May-Grünwald costituita da una soluzione di blu di metilene e di eosina in alcol metilico, che funge da fissatore, e quella di Giemsa, corrispondente a una soluzione in glicerina ed alcol metilico, di eosina e di blu di metilene o azur II.

La miscela di May-Grünwald colora soprattutto le strutture acidofile e le granulazioni neutrofile dei leucociti, mentre la miscela di Giemsa colora i nuclei e le strutture azzurrofile.



▲ Figura 15.4 Procedura per l'allestimento di uno striscio di sangue periferico per la lettura al microscopio ottico.

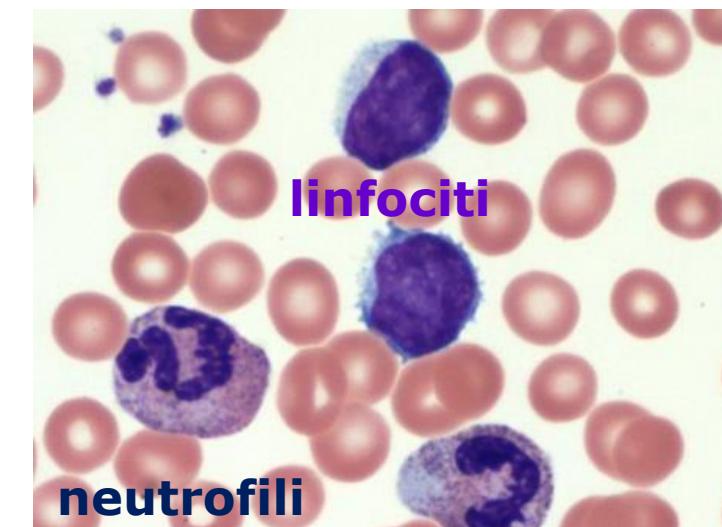


Un **eosinofilo**, come quello presente in questo preparato istologico, ha le stesse dimensioni del neutrofilo e appare caratterizzato da grosse granulazioni di colore arancione che riempiono totalmente il citoplasma cellulare sovrastandone il color tenue rosaceo. Il **nucleo** è in genere bilobato (almeno nell'80% delle cellule) ed è a cromatina a zolle raccolta sulla membrana nucleare. Dove indicate dalle frecce, sono presenti due piastrine.

Striscio di **sangue periferico** colorato in May-Grünwald-Giemsa.
Ingrandimento 13 000×.

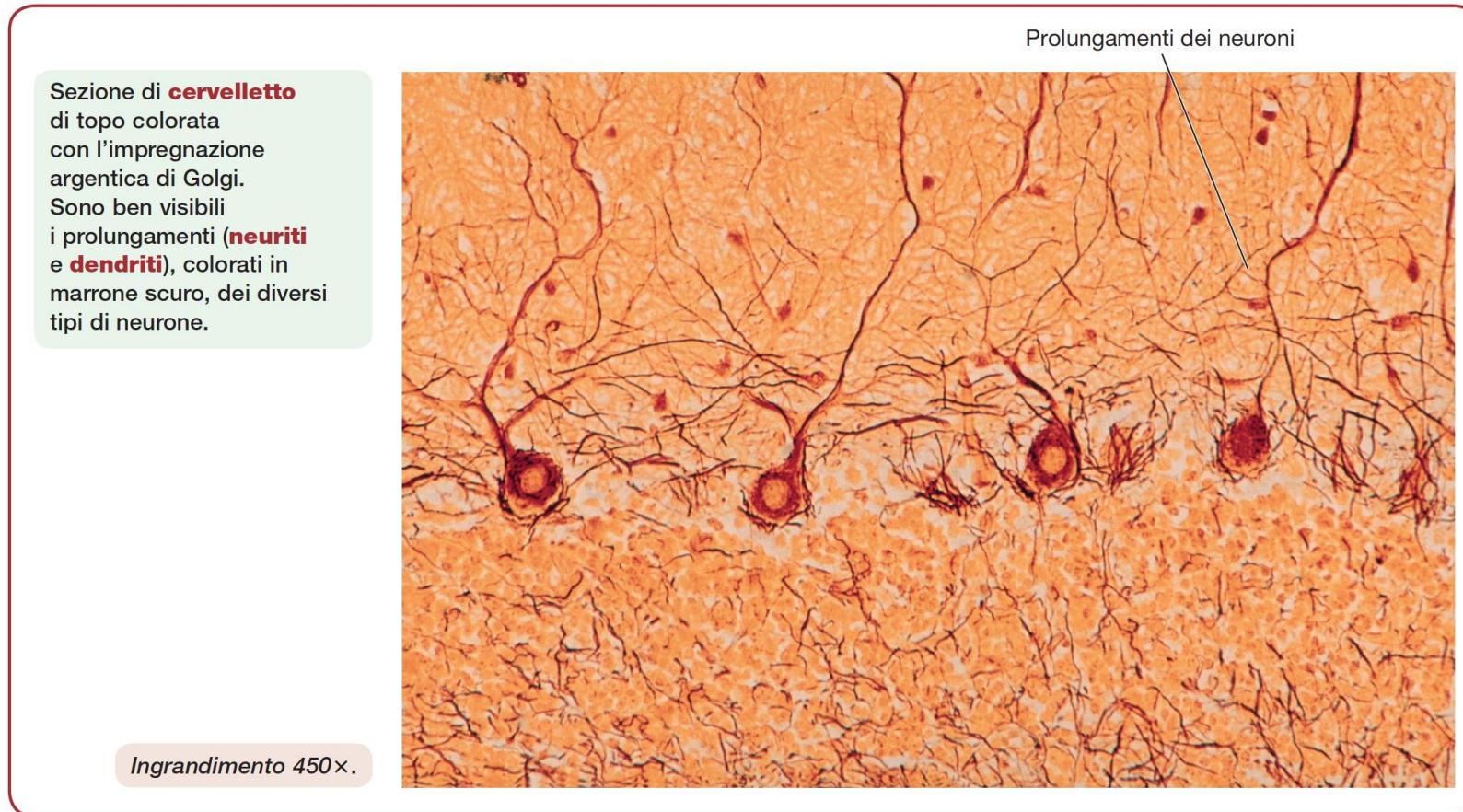
▲ Figura 15.12 Eosinofilo.

Striscio colorato con MGG



Striscio colorato con GW

COLORAZIONI: IMPREGNAZIONE ARGENTICA



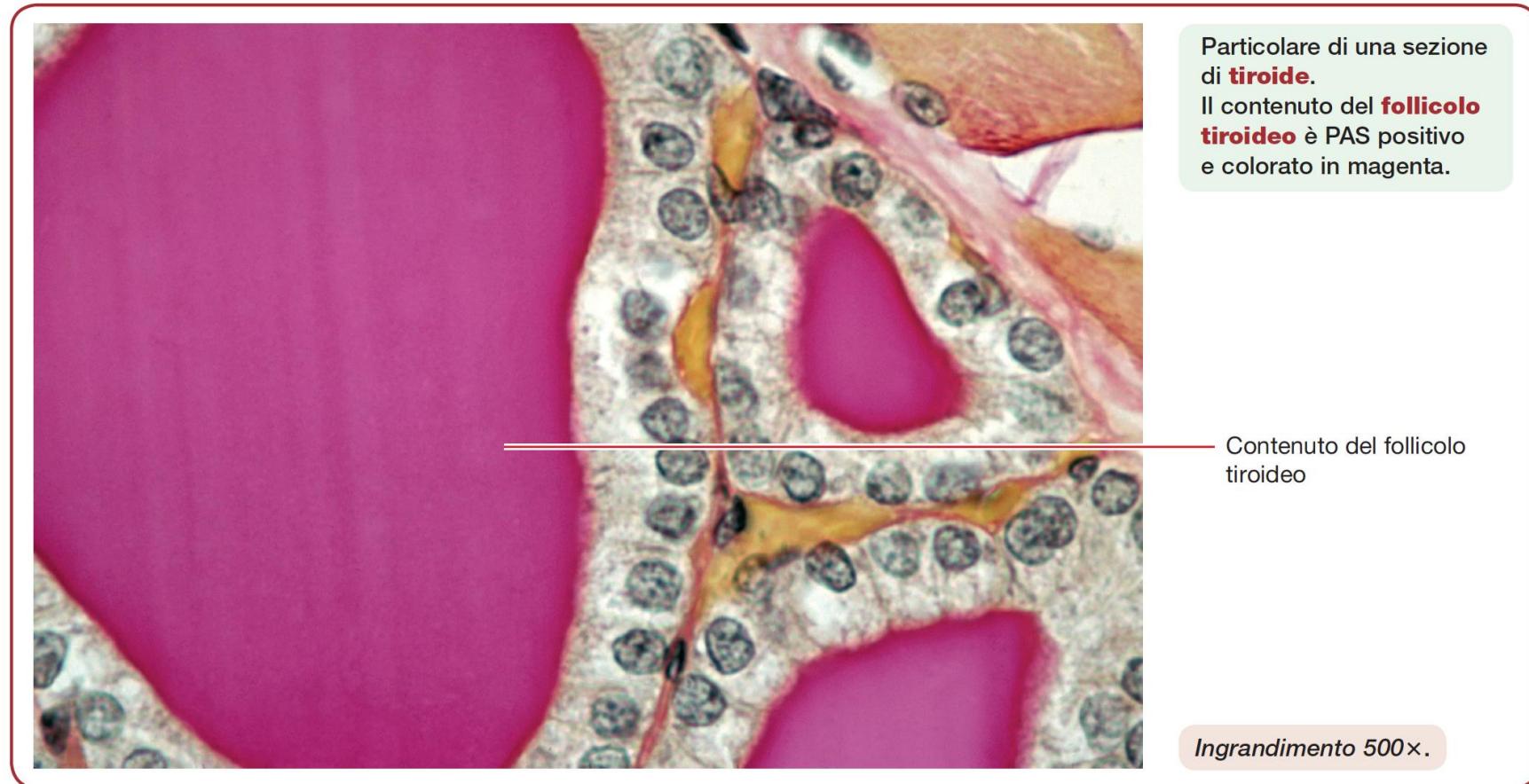
- **Questo metodo utilizza la precipitazione elettiva di cromato di argento sulle cellule nervose preventivamente fissate con tetrossido di osmio e bicromato di potassio.**

▲ Figura 2.3 La tecnica dell'impregnazione argentica di Golgi.

COLORAZIONI ISTOCHIMICHE

- Le colorazioni istochimiche danno informazioni, più che sull'aspetto morfologico del preparato, sul **contenuto e sulla natura delle sostanze chimiche contenute nei tessuti biologici esaminati**.
- Si eseguono quindi una o più reazioni chimiche, stecchiometricamente esatte e specifiche, che mettono in evidenza un determinato gruppo funzionale o un particolare ione, presenti nei vari tessuti e nelle cellule che li compongono.
- I precipitati colorati così ottenuti saranno evidenti al microscopio ottico o, nel caso si tratti di fluorocromi, al microscopio a fluorescenza.
 - Esempi sono:
 - a) **PAS, acido periodico - reattivo di Schiff (glicoproteine, polissacaridi);**
 - b) **reazione di Feulgen (DNA);**
 - c) **Alcian blu (AB)**

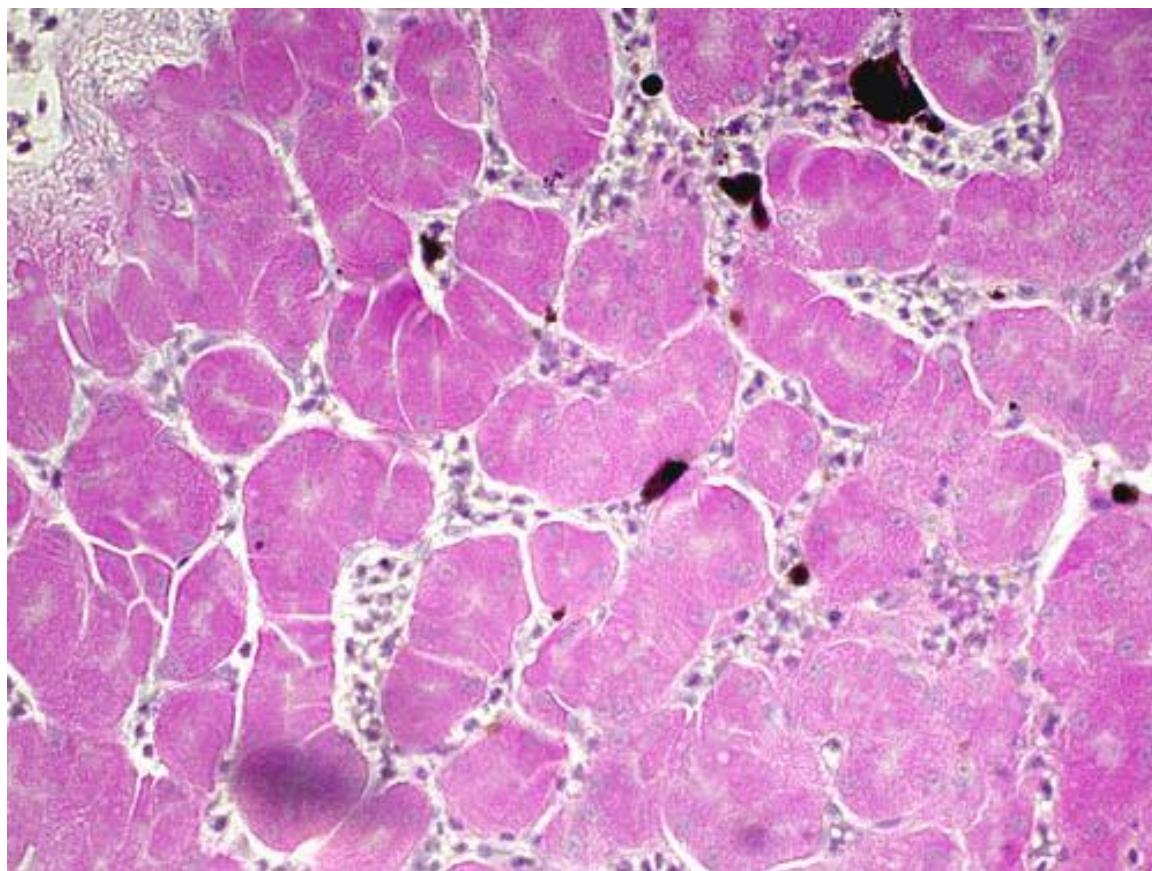
COLORAZIONI: REAZIONE DI PAS (PERIODIC ACID SCHIFF)



▲ Figura 2.4 La reazione PAS.

- Il trattamento delle sezioni con acido periodico ossida i gruppi alcoolici degli zuccheri in gruppi aldeidici e il reattivo di Schiff (un tipo di fucsina) reagisce con questi gruppi aldeidici dando una colorazione fucsia/rossa.
- Questa metodica è utile per evidenziare glicogeno, amido, cellulosa e altri polisaccaridi, glicoproteine.

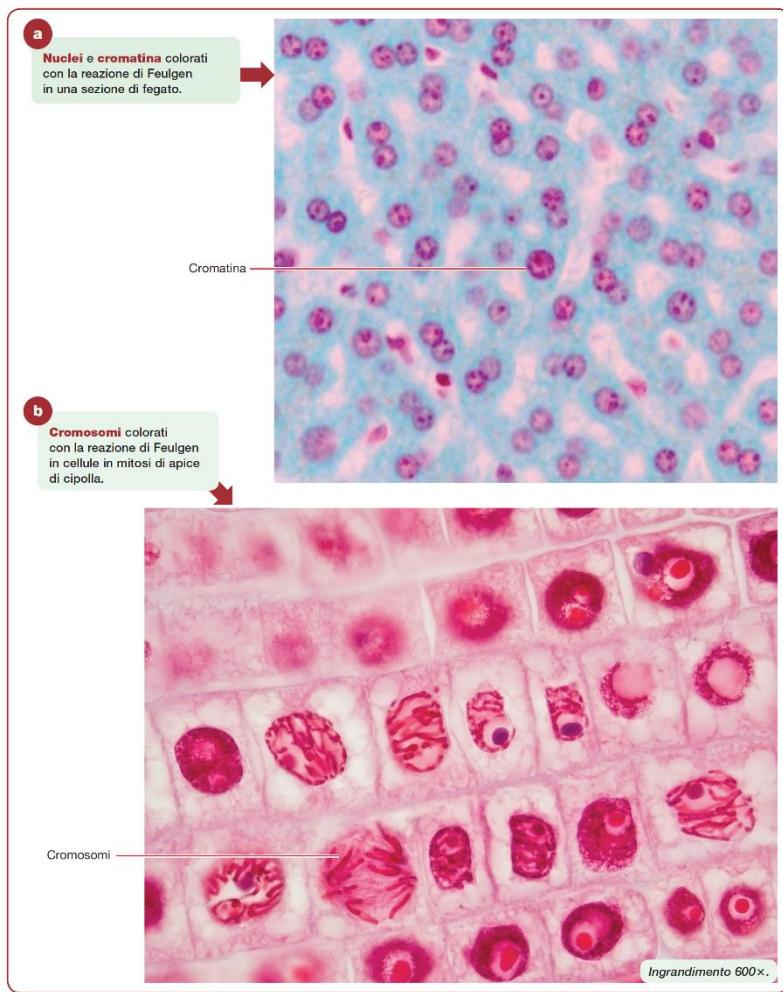
COLORAZIONI: REAZIONE DI PAS (PERIODIC ACID SCHIFF)



- **Sezione di fegato colorato con PAS**

- Il trattamento delle sezioni con acido periodico ossida i gruppi alcoolici degli zuccheri in gruppi aldeidici e il reattivo di Schiff (un tipo di fucsina) reagisce con questi gruppi aldeidici dando una colorazione fucsia/rossa.
- Questa metodica è utile per evidenziare glicogeno, amido, cellulosa e altri polisaccaridi, glicoproteine.

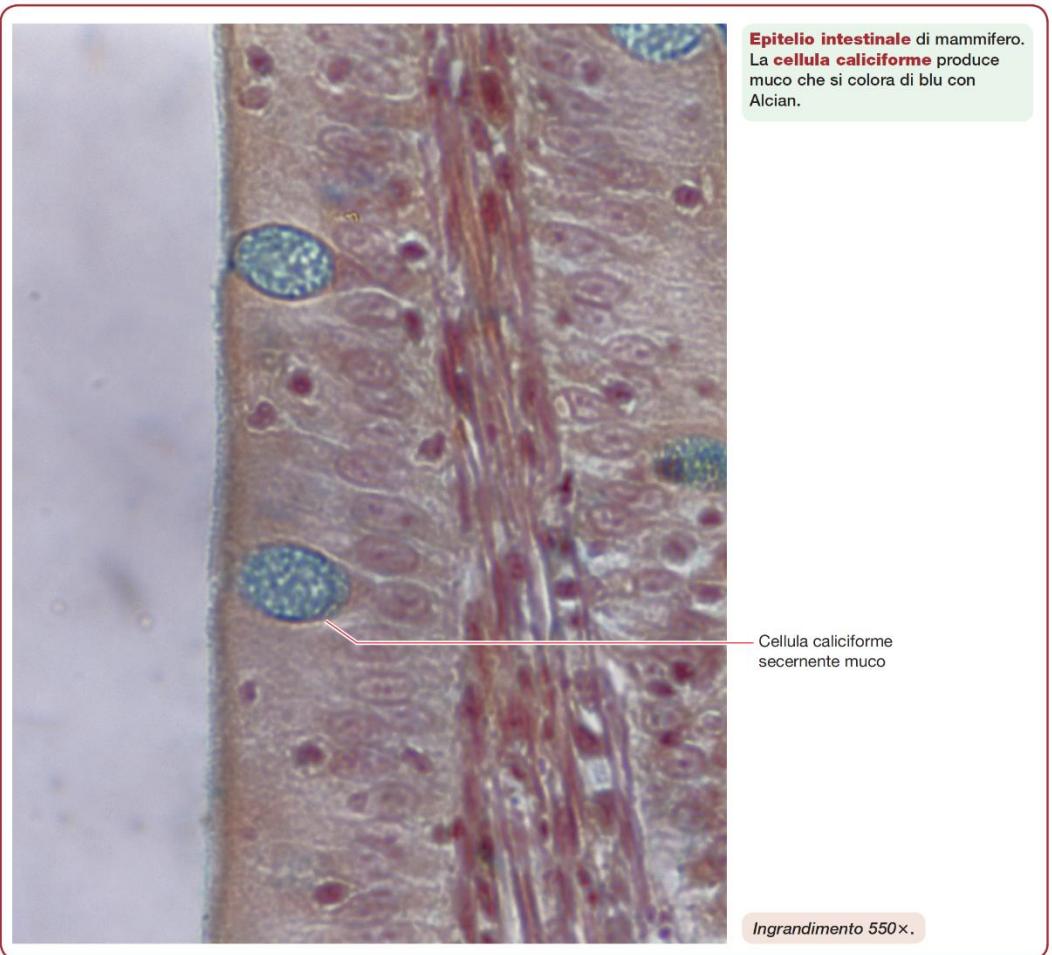
COLORAZIONI: REAZIONE DI FEULGEN



▲ Figura 2.5 La reazione di Feulgen.

- Questa tecnica colora selettivamente il DNA (cromatina e cromosomi) con un colore magenta mentre nucleolo e citoplasma rimangono incolori.
- Le sezioni sono trattate con acido cloridrico che libera il gruppo aldeidico del desossiribosio il quale reagisce con il reattivo di Schiff dando un prodotto colorato ben visibile.

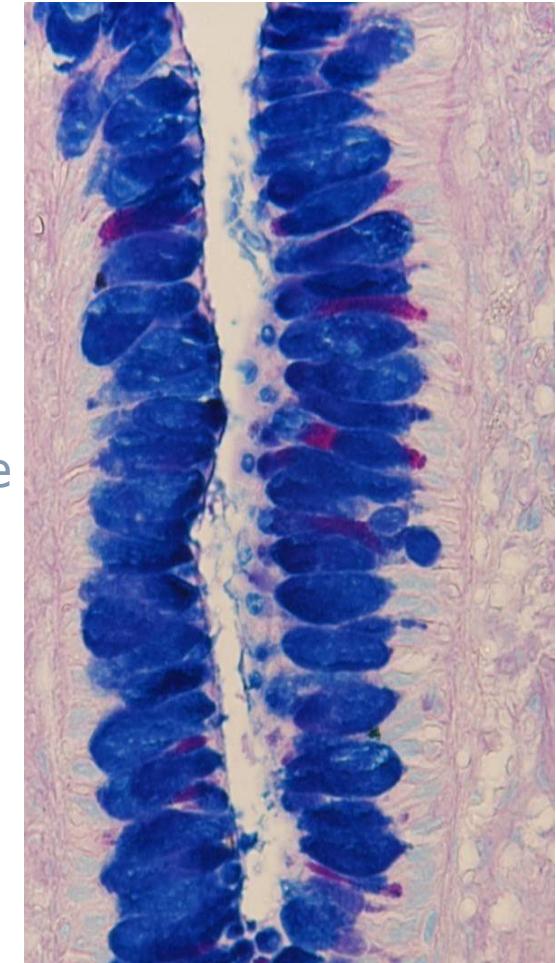
COLORAZIONI: ALCIAN BLU (AB)



▲ Figura 2.6 La colorazione istochimica con Alcian-blu.

L'AB mette in evidenza

- i GAG acidi
- i proteoglicani acidi
- le mucine acide prodotte dalle cellule mucipare dell'epitelio intestinale e respiratorio.



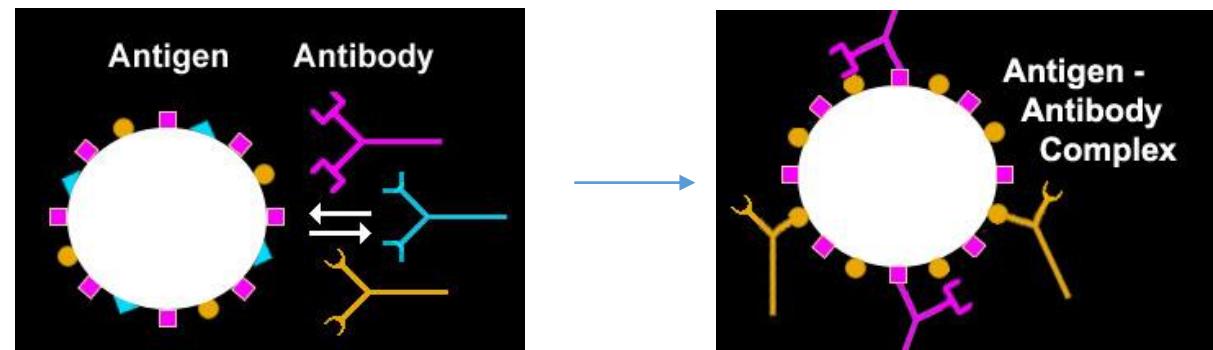
Epitelio intestinale di trota.
Zona ricca di cellule
mucose AB positive

IMMUNOISTOCHIMICA E IMMUNOFLUORESCENZA

- Si tratta di tecniche ampiamente utilizzate per l'identificazione e la localizzazione di costituenti cellulari e tessutali *in situ*.
- *Si basano sull'impiego di anticorpi diretti contro l'antigene di interesse.*
 - **ANTIGENE:** ogni molecola che ha la capacità di generare una risposta antincorpale (proteine, carboidrati, ma anche gruppi post-traduzionali aggiunti alle proteine,.....)
 - **DETERMINANTE ANTIGENICO o EPITOPO:** ogni singola parte di una molecola che genera una risposta antincorpale.
 - **ANTIGENICITA':** capacità di reagire con un anticorpo specifico.

IMMUNOISTOCHIMICA E IMMUNOFLUORESCENZA

- Si tratta di tecniche ampiamente utilizzate per l'identificazione e la localizzazione di costituenti cellulari e tessutali *in situ*.
- Si basano sull'impiego di anticorpi diretti contro l'antigene di interesse.
- **ANTICORPI** sono proteine con funzione difensiva, prodotta nei tessuti del sistema immunitario dei Vertebrati in risposta all'ingresso nell'organismo di sostanze particolari, dette antigeni (chiamata anche immunoglobulina).
- **AFFINITA'**: la forza con cui un anticorpo si lega al suo specifico antigene.



IMMUNOISTOCHIMICA E IMMUNOFLUORESCENZA

- **Applicazioni:** sono metodiche fondamentali per capire l'origine e la funzione di vari tipi cellulari, per la diagnosi di malattie (usando anticorpi diretti contro markers specifici) e la tipizzazione delle neoplasie, per l'identificazione di recettori cellulari, citochine e fattori di crescita.
- **Il legame dell'anticorpo (Ab) con l'antigene (Ag) è rivelato da marcatori legati all'anticorpo:**
 - nel caso dell'**immunofluorescenza** i marcatori sono **fluorocromi** (es: fluoresceina e rodamina) e vengono visualizzati con microscopi a fluorescenza;
 - nel caso della **immunoistochimica** i marcatori sono **enzimi** (es: perossidasi, fosfatasi alcalina) che in presenza di un opportuno substrato danno un precipitato colorato visibile al microscopio ottico;
 - nel caso dell'**immunogold** i marcatori sono **particelle d'oro elettronopache** che possono essere osservate al microscopio elettronico.

IMMUNOISTOCHIMICA E IMMUNOFLUORESCENZA

- **MARCATORI (label – reporter):** per evidenziare la localizzazione degli antigeni che si sono legati all'anticorpo specifico è necessario un sistema di rilevazione colorato o fluorescente.
 - nel caso dell'**immunofluorescenza** i marcatori sono **fluorocromi** (es: fluoresceina e rodamina) e vengono visualizzati con microscopi a fluorescenza;
- **COMPOSTI FLUORESCENTI:**

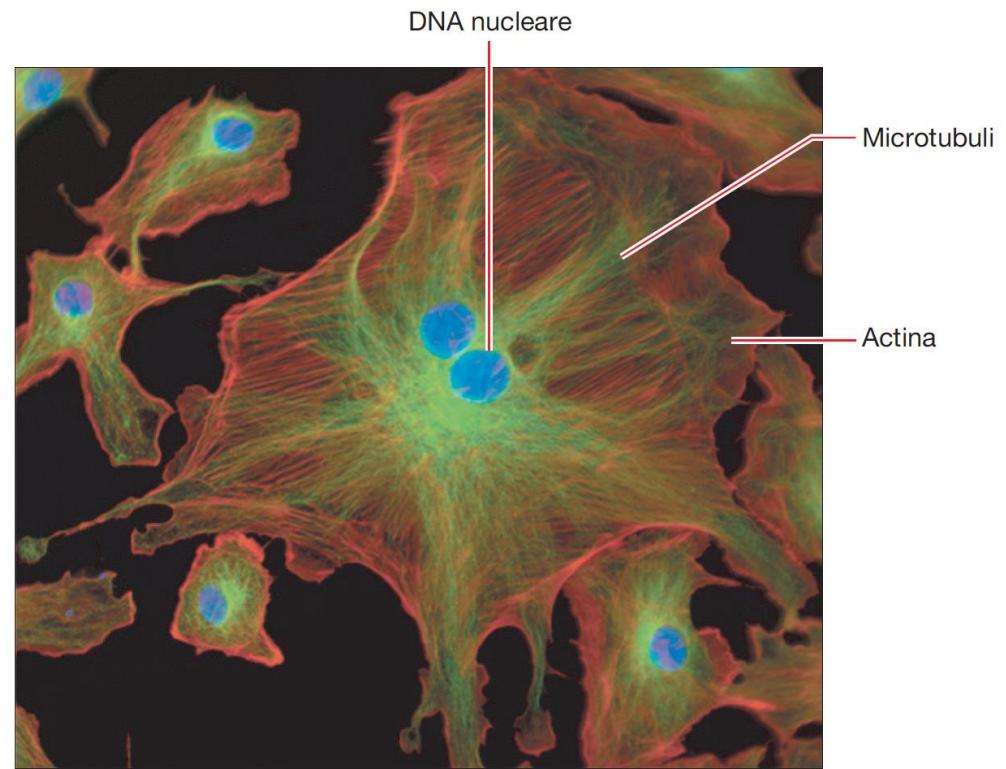
	Eccit	Emiss
Isotiocianato di fluoresceina	490 nm	525 nm
Isotiocianato di tetrametilrodamina	530 nm	580 nm

I preparati non sono permanenti, non possono essere disidratati.

IMMUNOISTOCHIMICA E IMMUNOFLUORESCENZA

- **Microtubuli (in verde) evidenziati tramite immunofluorescenza:** risultano marcati dopo il trattamento con un anticorpo anti-tubulina.

La **microscopia a fluorescenza** permette di evidenziare all'interno di una cellula diverse componenti utilizzando diversi marcatori. Il **DNA nucleare** è marcato di blu con DAPI. I **microtubuli**, riconosciuti dopo trattamento con un anticorpo primario anti- β -tubulina, sono di colore verde, mentre i filamenti di **actina** appaiono rossi dopo trattamento con Texas Red falloidina.



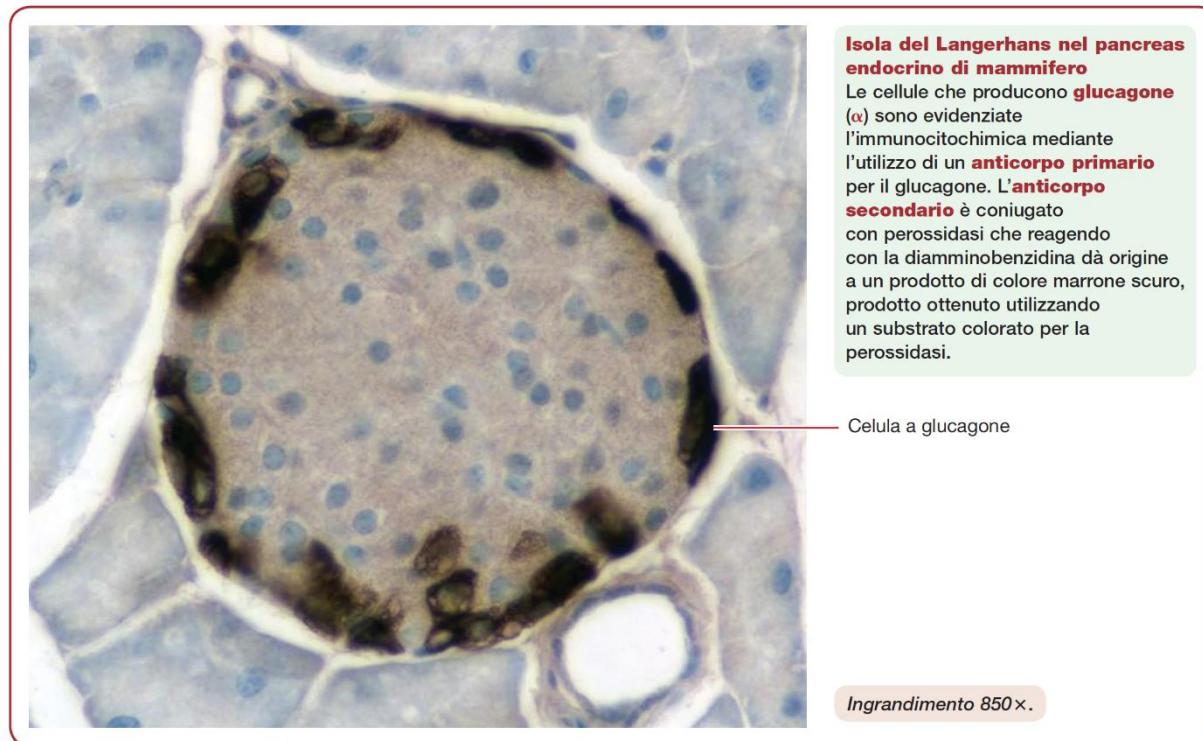
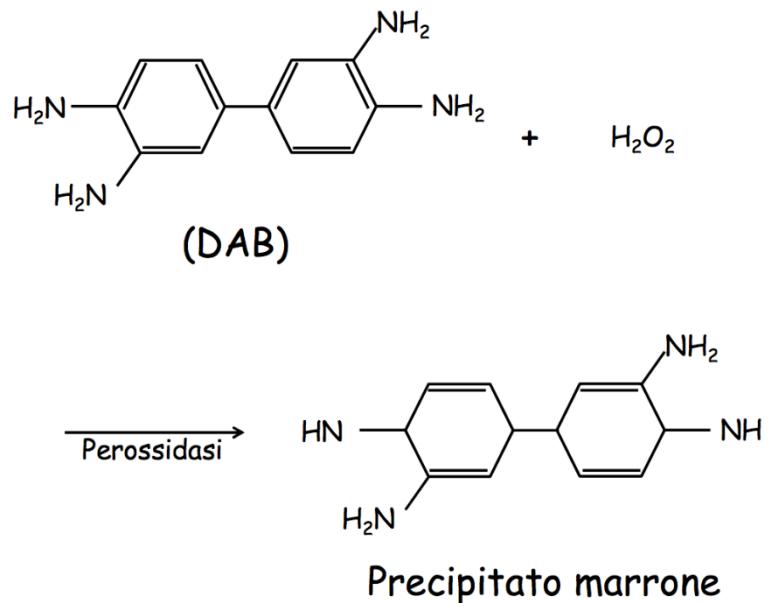
▲ Figura 2.8 Microscopia a fluorescenza.

IMMUNOISTOCHIMICA E IMMUNOFLUORESCENZA

- **MARCATORI (label – reporter):** per evidenziare la localizzazione degli antigeni che si sono legati all'anticorpo specifico è necessario un sistema di rilevazione colorato o fluorescente.
 - nel caso della ***immunoistochimica*** i marcatori sono **enzimi** che in presenza di un opportuno substrato danno un precipitato colorato visibile al microscopio ottico;
- **COMPOSTI COLORATI:**
Perossidasi: glicoproteina di 40 Kd con un gruppo eme. Forma precipitati insolubili di color bruno scuro in presenza di diaminobenzidina –DAB (cromogeno) ed H₂O₂.
- **Fosfatasi alcalina:** usa come substrato il naftolo e come cromogeno il fast red

IMMUNOISTOCHIMICA E IMMUNOFLUORESCENZA

- Le **cellule che producono glucagone** sono evidenziate mediante **immunocitochimica** mediante l'utilizzo di un **anticorpo primario per il glucagone**.
- Il **secondario è coniugato con perossidasi**, che reagendo con la diamminobenzidina dà origine a un prodotto di **colore marrone scuro**.

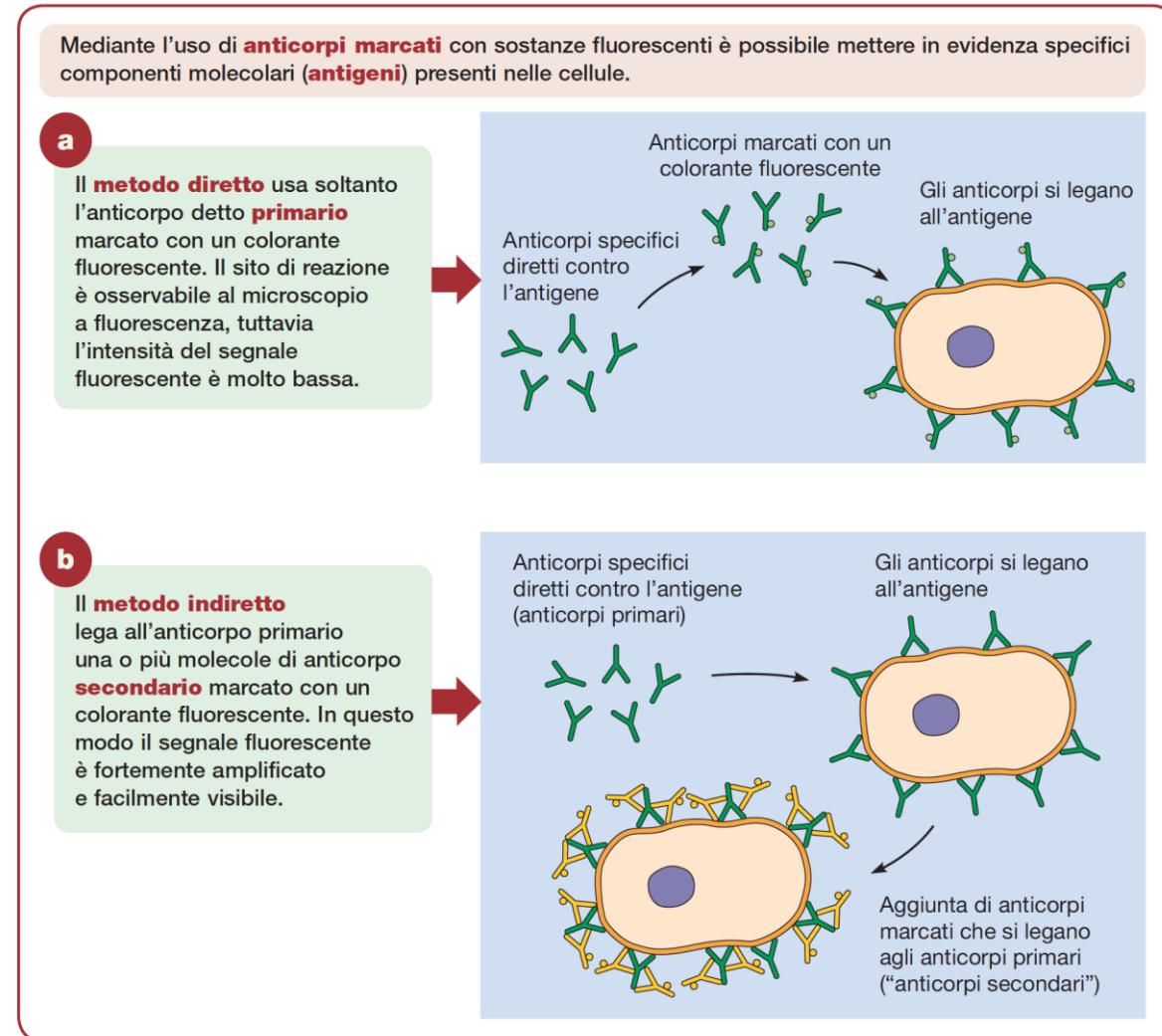


▲ Figura 2.9 Immunocitochimica con l'anticorpo secondario legato a un enzima.

IMMUNOISTOCHIMICA E IMMUNOFLUORESCENZA

► Figura 2.7

Immunofluorescenza.



- Il metodo per localizzare l'antigene può essere:
 - **DIRETTO:** uso un anticorpo primario coniugato con un marcitore (fluorescente o enzimatico).
 - **INDIRETTO:** uso un anticorpo primario non coniugato e un anticorpo secondario diretto contro il primario e coniugato con un marcitore.

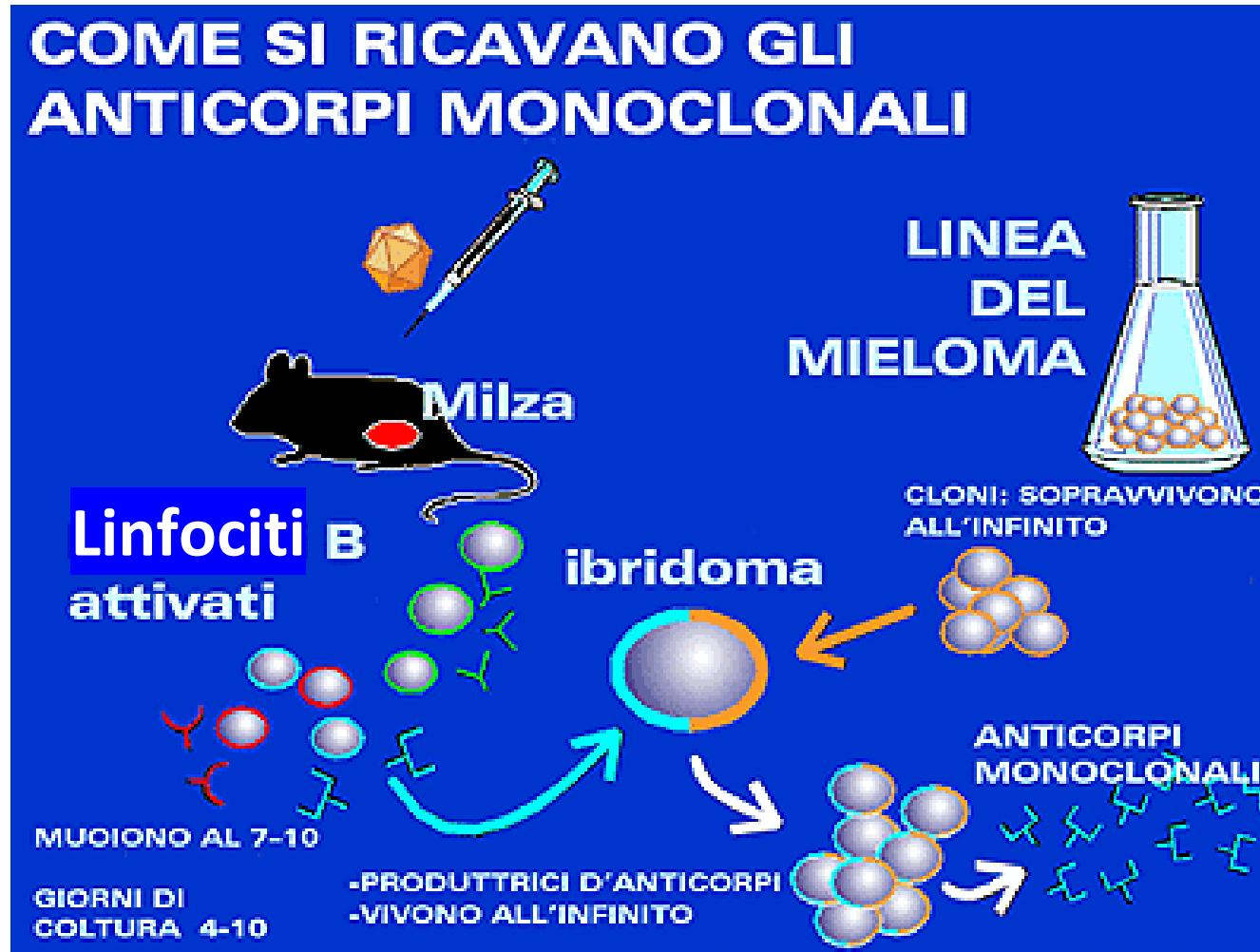
IMMUNOISTOCHIMICA E IMMUNOFLUORESCENZA

- Gli anticorpi specifici per l'antigene di interesse possono essere acquistati, se presenti in commercio, oppure essere purificati dal plasma di conigli o altri animali iniettati con l'antigene stesso.
- **Una singola molecola antigenica possiede numerosi determinanti antigenici o epitopi e ogni clone di linfocita B produce anticorpi contro un solo epitopo.**
- **Sulla base di ciò gli anticorpi vengono distinti in:**

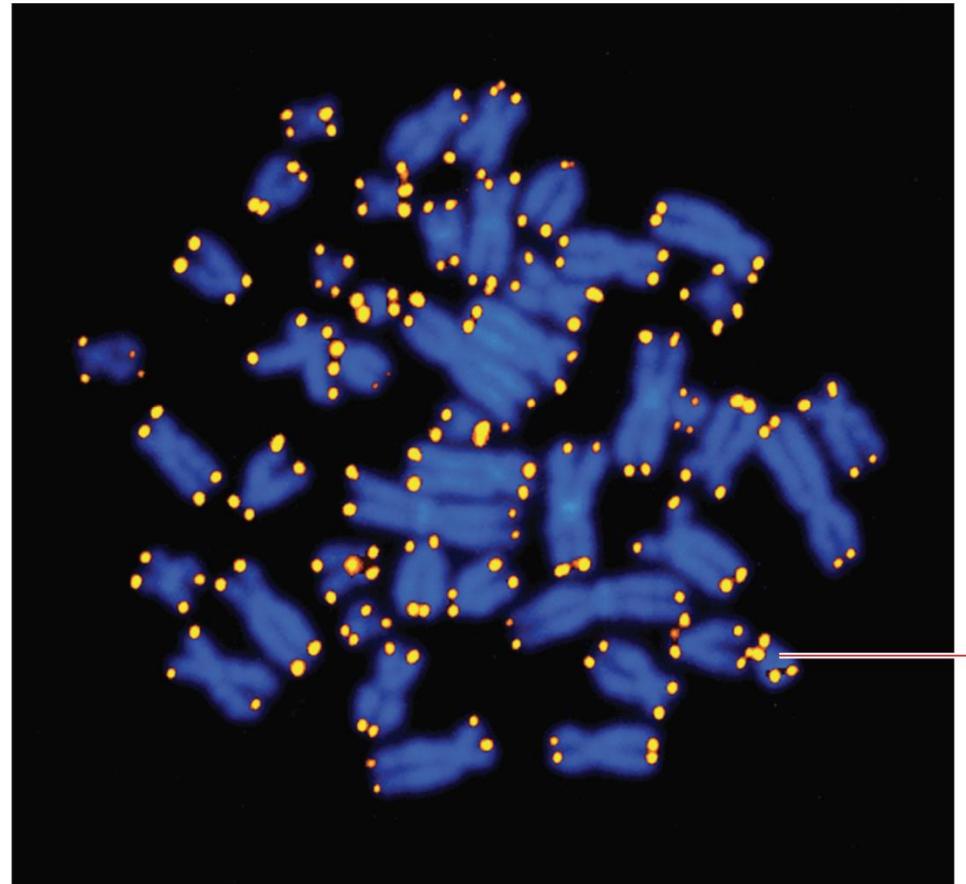
A. POLICLONALI = miscela di anticorpi prodotti dai diversi cloni di linfociti B in risposta all'inoculazione in un animale di un antigene proveniente da un altro organismo. Data la loro eterogeneità (anticorpi diretti verso più epitopi) possono dare risultati aspecifici.

B. MONOCLONALI = anticorpi specifici per un unico epitopo di un antigene, prodotti da un singolo clone di linfociti B. Hanno un'elevata specificità.

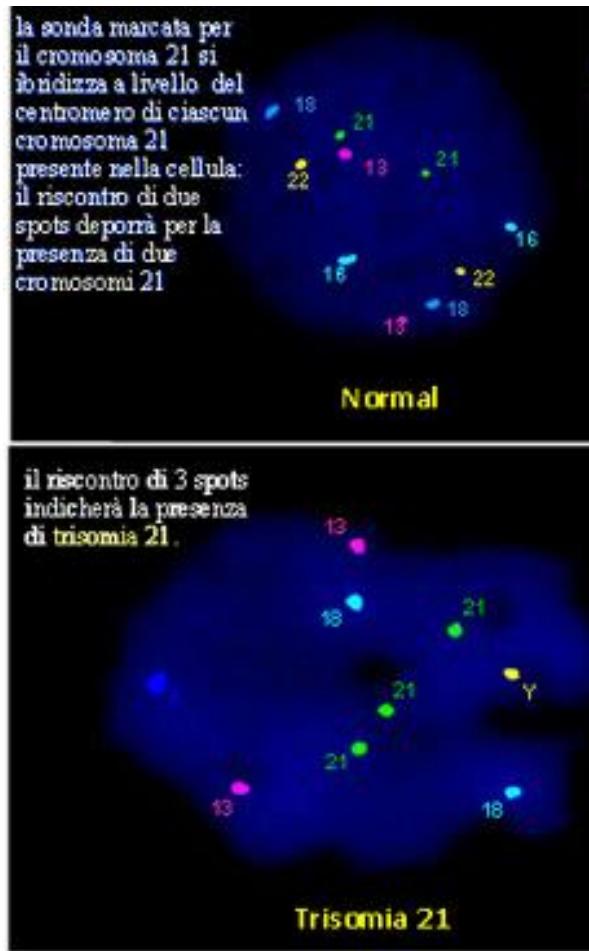
IMMUNOISTOCHIMICA E IMMUNOFLUORESCENZA



IBRIDAZIONE IN SITU



▲ Figura 2.10 La tecnica FISH (*Fluorescent In Situ Hybridization*).



- La FISH è la tecnica più diffusa per la diagnosi di aneuoploidie su nuclei interfasici da singola cellula.