

CORSO DI LAUREA IN
BIOTECNOLOGIE N.O.

MODULO
LABORATORIO DI ANALISI MORFOLOGICA DI
CELLULE E TESSUTI

4 CFU

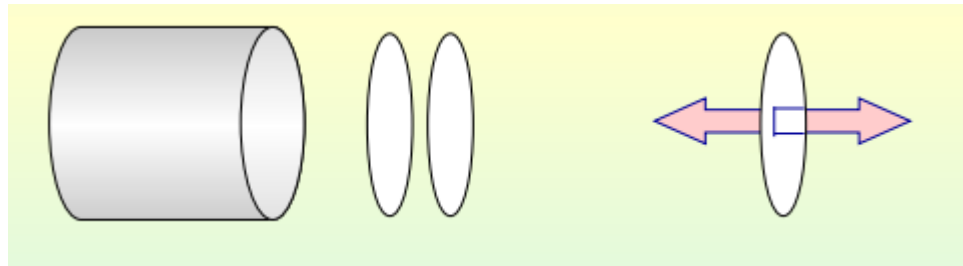
Prof.ssa A. MAURO

Osservazione Morfologica

MICROSCOPIA

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



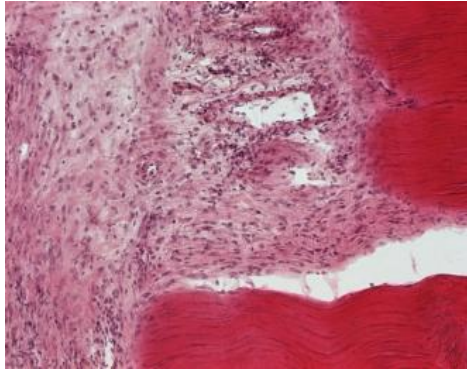
Il campione è trasparente, quindi deve essere trattato con sostanze coloranti che contrastino le strutture cellulari

Metodi di preparazione per l'Osservazione Microscopia

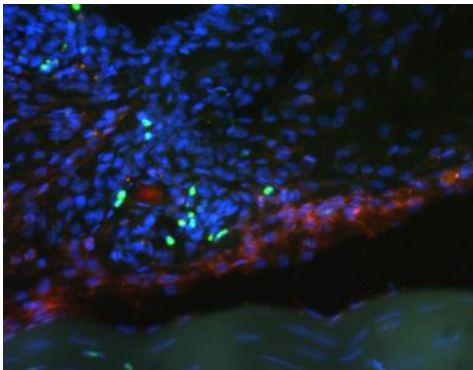
Osservazione Microscopica



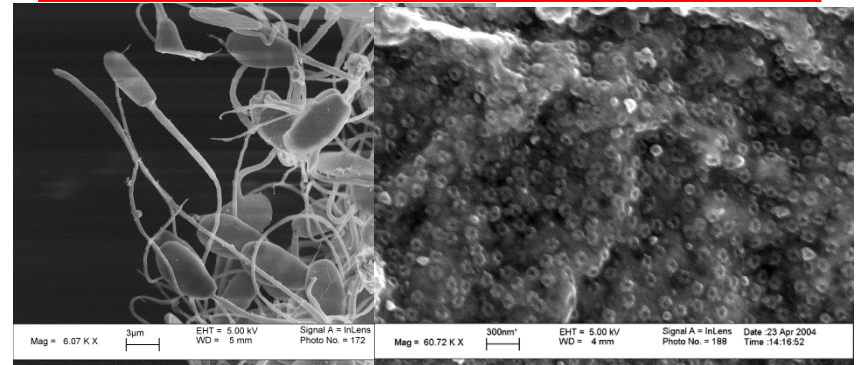
M.OTTICO A LUCE TRASMESSA



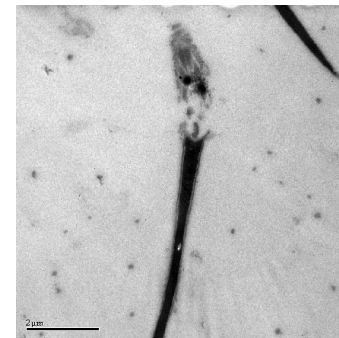
M. OTTICO A FLUORESCENZA



MICROSCOPIO ELETTRONICO A SCANSIONE (SEM)

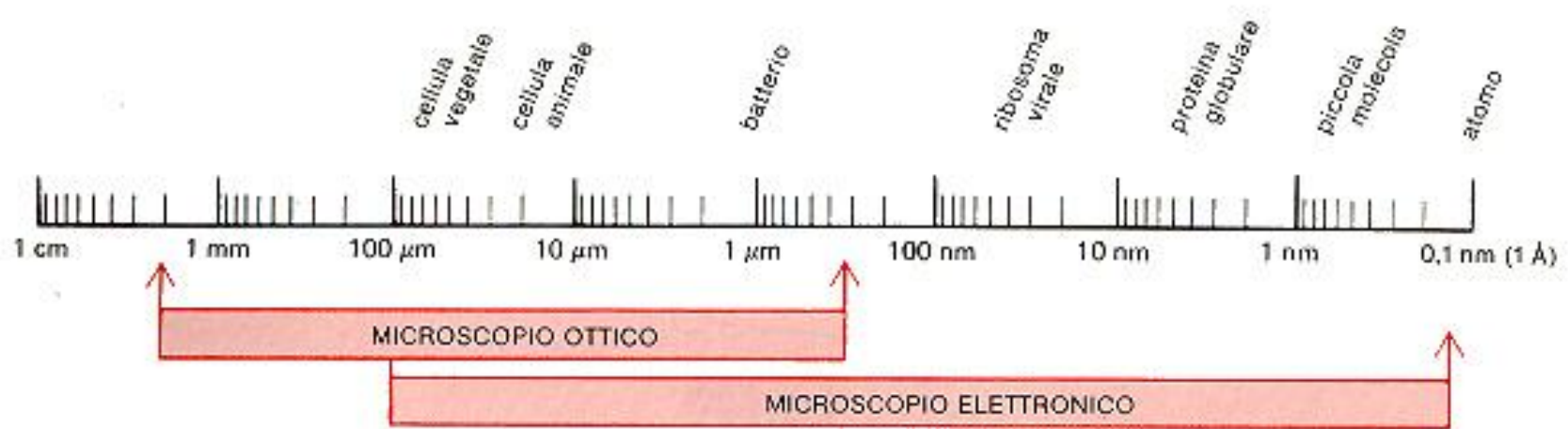


MICROSCOPIO ELETTRONICO A TRASMISSIONE (TEM)



Specimen : spirochetes ultra-thin section
Image Name : P1000
Resolution : 1024 x 1024 pixels
Acquisition Date : 14/07/2005
Acquisition Time : 16:11:59
Exposure Number : 2655
Exposure Time : 0.106449 s
Image Notes :

UNITÀ DI MISURA BIOLOGICHE E POTERE DI RISOLUZIONE



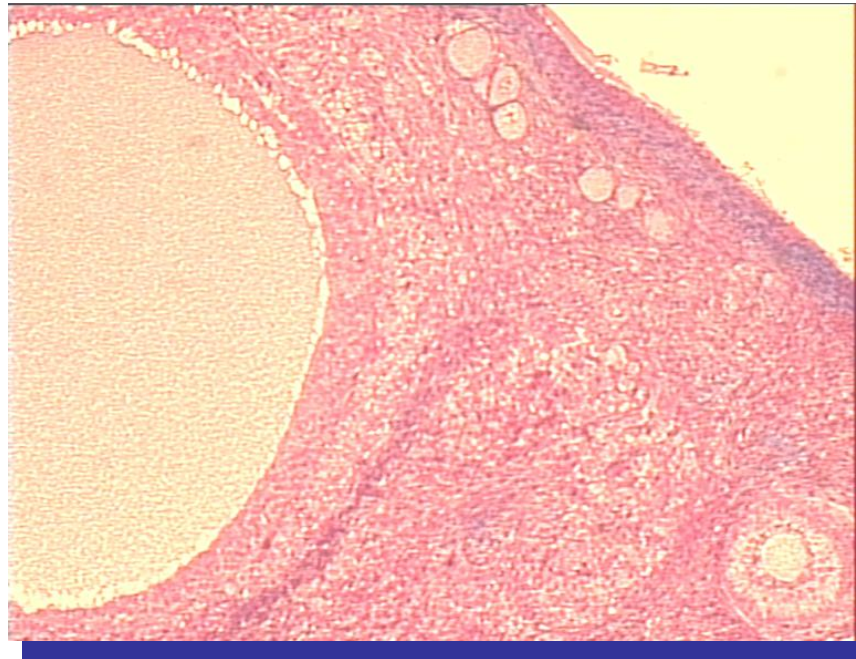
Il potere di risoluzione dell'**occhio umano** è 0.2 mm (200 μm)

Il potere di risoluzione del **microscopio ottico** arriva circa a 0.2 μm (200 nm)

Il limite di risoluzione del **microscopio elettronico** è 0.2 nm

Metodi di preparazione per l'osservazione Microscopia

Per un esame morfologico è necessario allestire preparati di cellule o tessuti mediante l'applicazione di procedure specifiche che portano il pezzo biotico alla riduzione in sezioni di minimo spessore e le cui selettive colorazioni permettono l'aumento del contrasto delle diverse strutture cellulari.

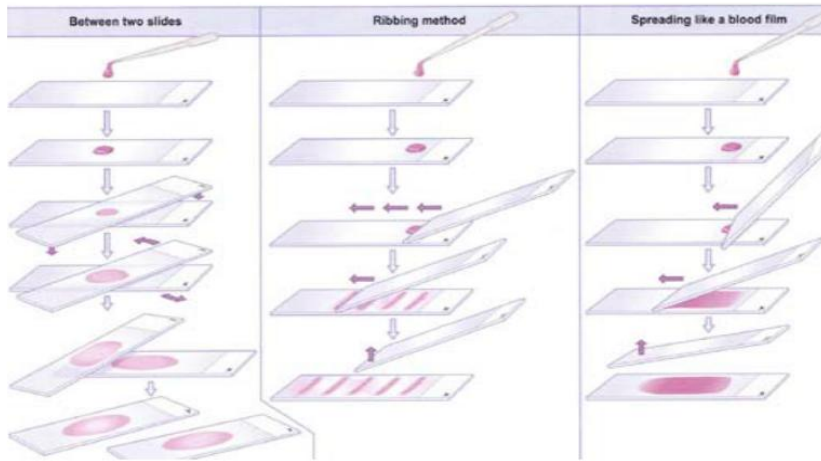


CAMPIONI Biologici

Cellule

Il materiale ottenuto con le diverse tecniche di prelievo può essere strisciato direttamente sui vetrini portaoggetto

- Agoaspirato
- Spazzolato
- Espettorato
- Pap-test



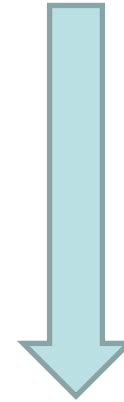
Assenza “la geografia spaziale” del tessuto di provenienza del campione

- Caratteristiche morfologiche dei nuclei e dei citoplasmi

Forma,
Colore
dimensione

Tessuto

Il materiale prelevato deve essere processato per il taglio in sezioni sottili



Conservata “la geografia spaziale” del tessuto

Esame istologico

Fase post-analitica



Fase pre-analitica



Fase Analitica



ALLESTIMENTO DI UN PREPARATO ISTOLOGICO

Per un esame morfologico dei tessuti è necessario allestire preparati istologici mediante:

PRELIEVO

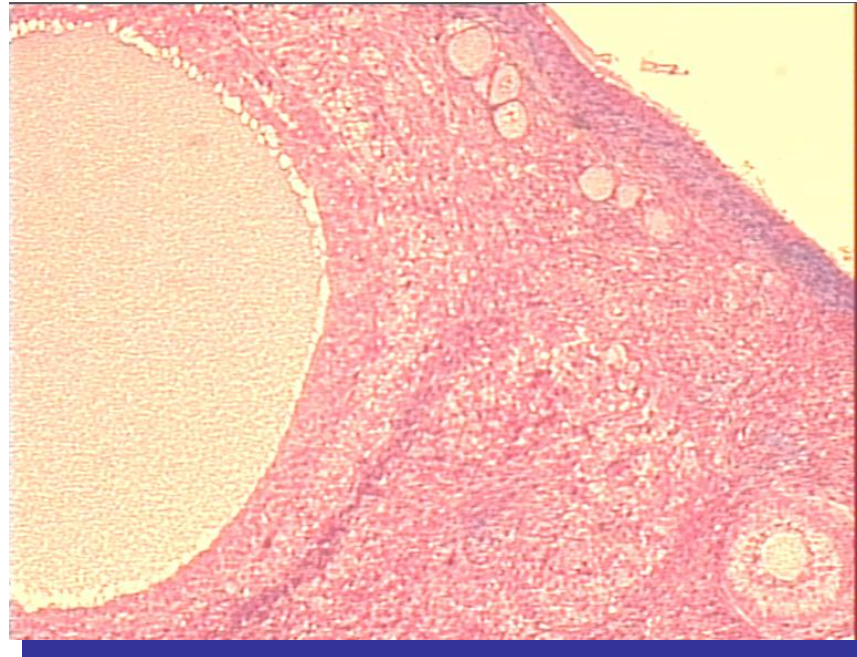
FISSAZIONE

SEZIONAMENTO in fettine di minimo spessore per i tessuti

COLORAZIONE selettiva che permette un aumento di contrasto delle diverse strutture cellulari.

...OSSERVAZIONE

Metodi di preparazione per l'osservazione Microscopia Ottica: preparazione mediante fissazione e colorazione



Per un esame morfologico è necessario allestire preparati di cellule o tessuti mediante il **PRELIEVO**, la **FISSAZIONE**, il **SEZIONAMENTO** in sezioni di minimo spessore e la **COLORAZIONE** selettiva che permette un aumento di contrasto delle diverse strutture cellulari.

Il **prelievo** e la **fissazione** rappresentano le fasi più critiche della preparazione perché debbono assicurare il blocco delle strutture cellulari nelle condizioni più prossime a quelle dello stato vitale. Non si devono produrre artefatti nella organizzazione tessutale pur determinando il blocco di ogni attività funzionale.

In particolare:

Prelievo dei tessuti

- Per ottenere buoni preparati, è necessario che il prelievo avvenga rapidamente, che il materiale sia molto fresco e che i pezzi non superino 1 cm di diametro, e che siano refrigerati prima di procedere ai trattamenti successivi.



Riduzione a circa 1 cm



Fissazione

- Essa consiste nel sottoporre il tessuto ad agenti chimici e talvolta ad agenti fisici che denaturano rapidamente le proteine, legandosi ai numerosissimi gruppi funzionali e che rendono insolubili gli altri costituenti per le successive fasi di disidratazione, inclusione e colorazione. I migliori fissativi sono quelli che precipitano le proteine nella forma più fine, possibilmente in allegati ultra microscopici, così che la morfologia non sia modificata.

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

Fissazione

SCOPO DELLA FISSAZIONE

- Immobilizzare i costituenti cellulari del campione in uno stato più possibile simile a quello dei tessuti in vivo
- Conservare i tessuti evitando l'attacco di batteri e muffe, che distruggerebbero le strutture cellulari
- Consentire al preparato di sopportare gli stress fisici e chimici delle fasi successive
- Mantenere il più possibile la reattività enzimatica della cellula (possibile solo in parte)

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 CHIMICA

FISSAZIONE CHIMICA

(soluzioni liquide)



La fissazione chimica prevede l'utilizzo di:

A) Fissativi Primari Semplici

B) Miscele fissative

FISSAZIONE CHIMICA

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 CHIMICA

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 CHIMICA

CLASSIFICAZIONE DEI FISSATIVI CHIMICI

- **Fissativi semplici**
- **Miscele fissative**

A seconda del meccanismo d'azione sulle proteine:

- **Fissativi coagulanti**
- **Fissativi non coagulanti**

Possono contrarre o meno rapporti chimici con i costituenti del tessuto

- **Additivi** reagiscono con le sostanze che costituiscono i tessuti
- **Non additivi** non reagiscono con le sostanze che costituiscono i tessuti

FISSAZIONE CHIMICA

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 CHIMICA

CLASSIFICAZIONE FUNZIONALE DEI FISSATIVI

➤ FISSATIVI PRIMARI COAGULANTI

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

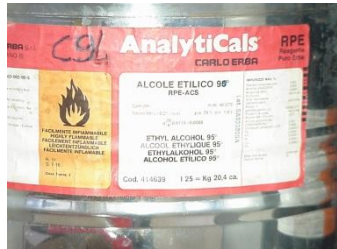
➤ FISSATIVI PRIMARI NON COAGULANTI

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

FISSAZIONE CHIMICA

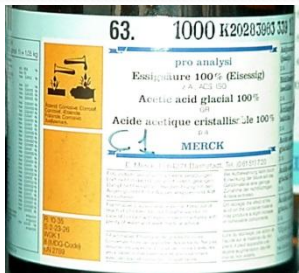
• Fissativi Primari

l'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

l'acido acetico



- 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.

la formaldeide



o Aldeide Formica che allo stato naturale è gassosa, sono utilizzate in istologia allo stato liquido. Prende così il nome di formalina. Dalle soluzioni commerciali di formaldeide al 37% si ricavano miscele di fissazione con valori compresi dallo 0,2% al 10%.

Ha un elevato grado di penetrazione nei tessuti, non dissolve i lipidi e non provoca indurimento eccessivo dei tessuti

FISSAZIONE CHIMICA

La Formalina:

E' il più diffuso ed usato fissativo in istopatologia, ad un valore di pH prossimo a 7.0. La formalina diviene monomerica ed idratata, una molecola di basso peso molecolare capace di penetrare rapidamente nei tessuti, con la formazione di gruppi idrossi-metile con le proteine, e con la formazione di legami di tipo metilenico tra catene polipeptidiche (*cross-linking*)

- **Formalina al 10%:** formaldeide polimerizzata in soluzione acquosa satura al 40% e successivamente diluita 1:10 (detta anche formaldeide 4%)
- **Formalina salata:** 100 ml di formaldeide al 40% + 9 g di NaCl + 900 ml di H₂O; è una soluzione isotonica che impedisce la coartazione ed il rigonfiamento cellulare
- **Formalina nel tamponata:** 100 ml di formaldeide 40% + 900 ml di H₂O + 4 g di fosfato acido di sodio + 6.5 g di fosfato disodico anidro; impedisce l'acidificazione dei tessuti (fenomeno dovuto alla trasformazione della formaldeide in acido formico), mantenendo il pH a 7.0.

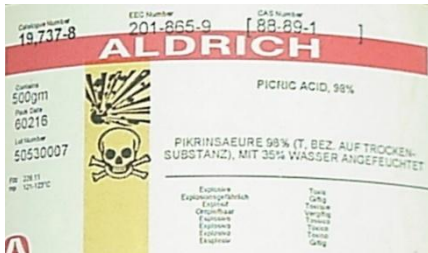
FISSAZIONE CHIMICA

Glutaraldeide



Fra le aldeidi la **glutaraldeide** ha una minore capacità di penetrazione ma reticola meglio le proteine formando così legami più stabili. Da dei cross legami resistenti. Necessita di campioni di piccole dimensioni e di un uso combinato con la formaldeide. Usata specialmente per la Microscopia Elettronica

Acido picrico



- 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

FISSAZIONE CHIMICA

MISCELE FISSATIVE

- Miscele Fissative costituite da due o più fissativi primari mescolati in precise proporzioni. Il fissativo più usato è il liquido di Bouin, molto penetrante, si usa per fissare anche pezzi voluminosi e permette l'uso di quasi tutti i metodi di colorazione.



Il **Liquido di Bouin** viene preparato al momento dell'uso unendo:

- 15 ml di soluzione satura di acido picrico
- 5 ml di formalina
- 1 ml di acido acetico

Non sovrafissa e si applica per 12-24 ore passando poi i campioni in etanolo 50%.

Liquido di Carnoy

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

....sintesi

PRELIEVO



FISSAZIONE CHIMICA



LAVAGGIO

Scopo:

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



**Le successive Fasi dipendono dalla natura del campione:
Cellule o Tessuto**

FISSAZIONE FISICA

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

METODI FISICI DI FISSAZIONE

- I metodi fisici di fissazione sono rappresentati da:
 - Calore/essiccamento
 - Raffreddamento/congelamento
- Il **calore e l'essiccamento** sono impiegati in strisci di sangue ed in apposizioni di midollo osseo
 - di regola sono seguiti da un ulteriore trattamento con metodi chimici.
- Il **freddo** non è un agente fissativo in senso stretto,
 - non garantisce una stabile conservazione delle strutture biologiche:
 - quando i tessuti vengono riportati a temperatura ambiente possono aver luogo tutte quelle modificazioni degenerative che intervengono dopo la morte del tessuto.
 - Il freddo è un agente conservante piuttosto che un vero e proprio fissativo.
 - molto usato in istochimica, perchè permette:
 - Conservazione del tessuto,
 - Indurimento del tessuto per la sezione

FISSAZIONE FISICA

ALLESTIMENTO DI UN PREPARATO ISTOLOGICO

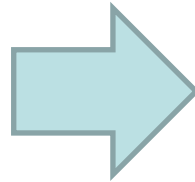
PRELIEVO

PRELIEVO DEI TESSUTI	OCCORRENTE	TEMPO
Su animali anestetizzati o sacrificati in modo indolore, o su materiale proveniente da macello, si procede alla dissezione per prelevare gli organi o i tessuti da studiare. Salvo eccezioni il campione deve avere dimensioni inferiori al cm ³ .	Forbici, pinze, bisturi, lame, piano o in materiale plastico, Guanti	L'operazione va eseguita nel più breve tempo possibile riducendo al minimo i traumi mediante l'uso di lame affilatissime.

FISSAZIONE FISICA

...una Fissazione Fisica per RAFFREDDAMENTO o CONGELAMENTO

Riduzione a circa 1 cm³



FISSAZIONE FISICA (congelamento)



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

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

L'obiettivo è congelare rapidamente, utilizzando *accorgimenti particolari* tali che l'acqua nelle cellule e tessuti non ha il tempo di formare macrocristalli e rimane in una forma vetrosa che non si espande quando solidificata.

FISSAZIONE FISICA

...è necessario infatti l'uso di **CRIOPROTETTORI**

CRIOPROTETTORI

I crioprotettori sono sostanze a diversa composizione chimica che hanno in comune un'elevata solubilità in acqua associata ad una tossicità dipendente dalla concentrazione di utilizzo.

La loro azione protettiva si esplica in vari modi:

- con un'azione diretta sulla membrana cellulare
- modificano l'ambiente intra ed extra cell. sostituendosi all'acqua e diminuendo la formazione di cristalli di ghiaccio
- abbassano il punto di congelamento della soluzione e permettono una maggiore disidratazione delle cell. durante il cong. lento.

L'interazione tra crioprotettore e cellula è mediata da:

- tempo di esposizione all'agente chimico
- Temperatura a cui avviene l'esposizione

FISSAZIONE FISICA

CRIOPROTETTORI

SOSTANZE PIU' UTILIZZATE

- Si dividono in due categorie :
- Crioprotettori in grado di penetrare attraverso le membrane cellulari
- Crioprotettori non in grado di penetrare attraverso le membrane cellulari



unlike most liquids, water expands when it freezes

most liquids condense when they freeze because closer bonds are stronger

but water expands because it has to in order to maximize how many bonds each water can form

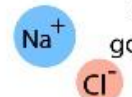
We don't want this to happen in our pipes or our protein, so we add

CRYOPROTECTANTS

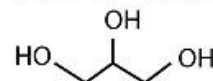
the more particles you can stuff in, the lower the freezing point.

SODIUM CHLORIDE

small and effective -
good for roads - but will
corrode your pipes



GLYCEROL



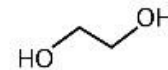
the biochemist's "go to" antifreeze

downsides: viscous (syrupy) &
bacteria like it too...

ETHYLENE GLYCOL

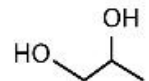
the "classic" antifreeze

TOXIC (but sweet-tasting)
making it dangerous



PROPYLENE GLYCOL

less effective but
much less toxic!



Cryoprotectant Agents

- CPAs protect cells by reducing intracellular ice formation
- CPAs alter the kinetics of the cells
 - Ice formation
 - Membrane mass transport
- CPAs may be harmful to cells
 - Toxicity
 - Volume changes

Cryoprotectants

Permeable	Non permeable
Methanol CH_3OH	Polyethyleneglycol
Ethanol $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$	Polyvinyl pyrrolidone
Ethylenglycol $\text{C}_2\text{H}_4(\text{OH})_2$	Ficoll
1-2 Isopropanol $\text{C}_3\text{H}_6(\text{OH})_2$	Sucrose
Glycerol $\text{C}_3\text{H}_5(\text{OH})_2$	
DMSO $(\text{CH}_3)\text{SO}$	

FISSAZIONE FISICA

Fissazione per Congelamento

Metodi di congelamento

- Blocchi di metallo
- Produzione di "Neve CO₂"
- Ghiaccio secco
- Appar. Termo-elettrici
- Gas liquidi (N²)

METODO IDEALE

FREON

ISOPENTANO

**Conservazione di
tessuti e cellule**

FISSAZIONE FISICA

METODI RAPIDI

	Metodo	T (°C)	Efficienza
Tessuti in liquidi refrigerati	Fluido organico ^a In gas liquido (N ₂)	- 196	Il più veloce
	Fluido organico ^a In ghiaccio secco Liquido organico ^b	- 79	Ottimale per la maggior parte delle applicazioni in M.O
Tessuti in contatto di metalli refrigerati	Raffreddamento Termo-elettrico	- 40	scarsa
	Supporto metallico Raffreddato per conduzione	- 30	scarsa

a: N-esano, isopentano, miscele di butano e pentano

b: ghiaccio secco in miscela con etanolo, metanolo o acetone

FISSAZIONE FISICA

...SCOPO DELL'ALLESTIMENTO

DI UN PREPARATO ISTOLOGICO CONGELATO

TAGLIO

Il suo scopo è quello di sezionare il pezzo allo spessore voluto (12-18 μm di norma) in modo da poter essere osservato al microscopio dopo opportuna colorazione.

OCCORRENTE

Colla termosensibile OCT. Blocchetti di legno. Criostato. Lama diritta. Crioprotettori. Azoto liquido. Vetrini trattati o meno con adesivi.

FISSAZIONE FISICA

Organizzazione e allestimento:

Scegliere il metodo di congelamento appropriato e, a seconda del metodo, si prepara azoto liquido, isopentano, ghiaccio secco.

-

Etichetta in anticipo: stampi per contenitori criogenici, fogli di alluminio, supporti per campioni a temperatura ambiente.

-

Prepara dispositivo di raffreddamento Dewar coperto per trattenere temporaneamente campioni congelati mentre si lavora.

-

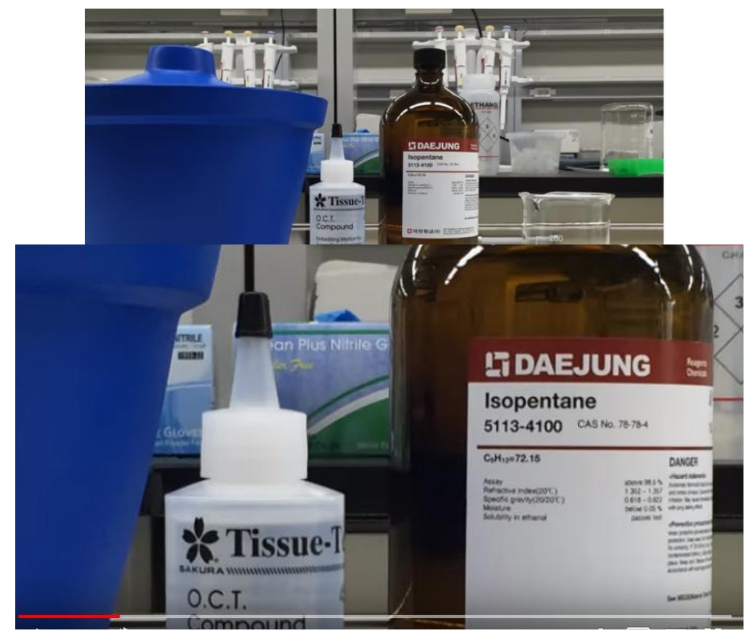
Prepara strumenti e altri materiali di consumo, pinze, etichetta piccola o piastre di Petri

FISSAZIONE FISICA

..Come si procede in termini tecnico- operativi...



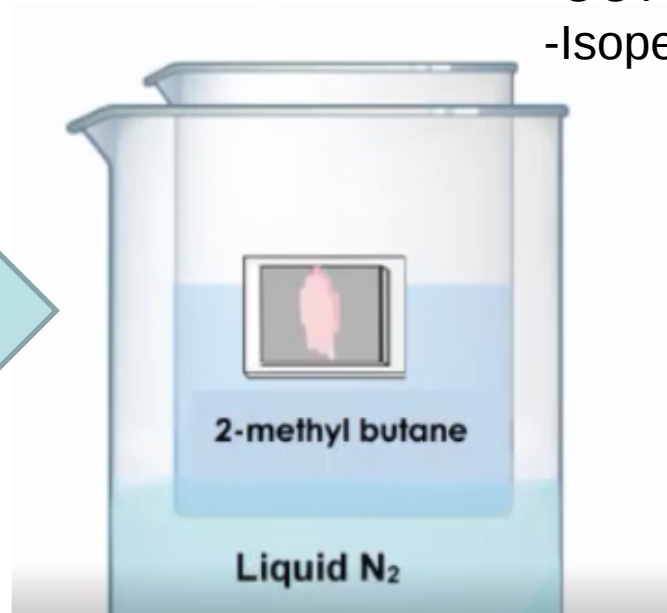
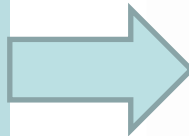
Allestimento della postazione: Guanti di protezione, Azoto liquido, Dewar, Pinze lunghe, becker



Crioprotettori:

- OCT (termosensibile)
- Isopentano

Viene creata una «camicia di congelamento» versando in un becker il *Crioprotettore*. Verrà poi immerso il tutto in Azoto Liquido (**Temp: -196 C°**) all'interno di un dispositivo di raffreddamento.





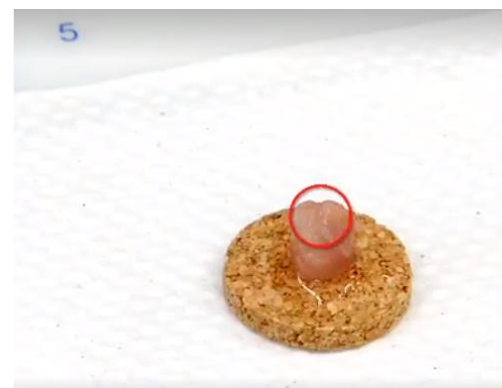
Riduzione del campione
a dimensioni di circa 1 cm^3



Supporti di sughero



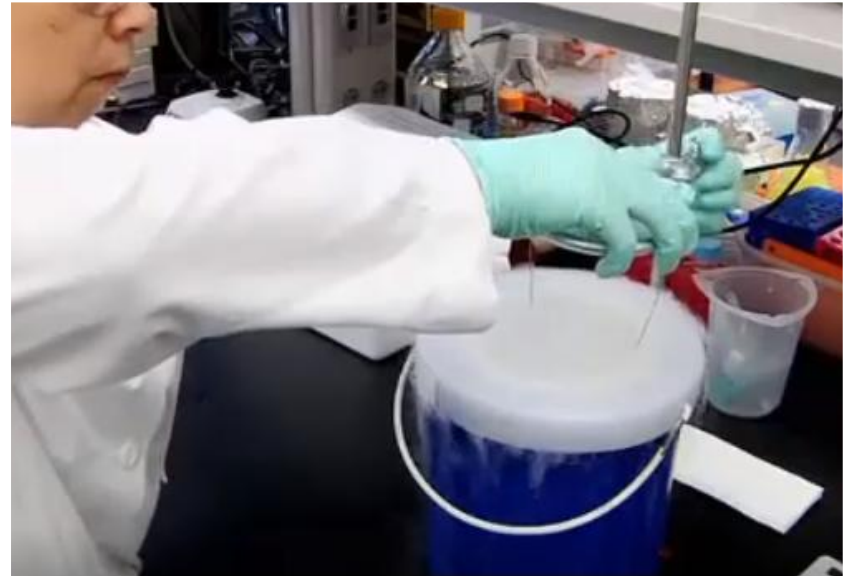
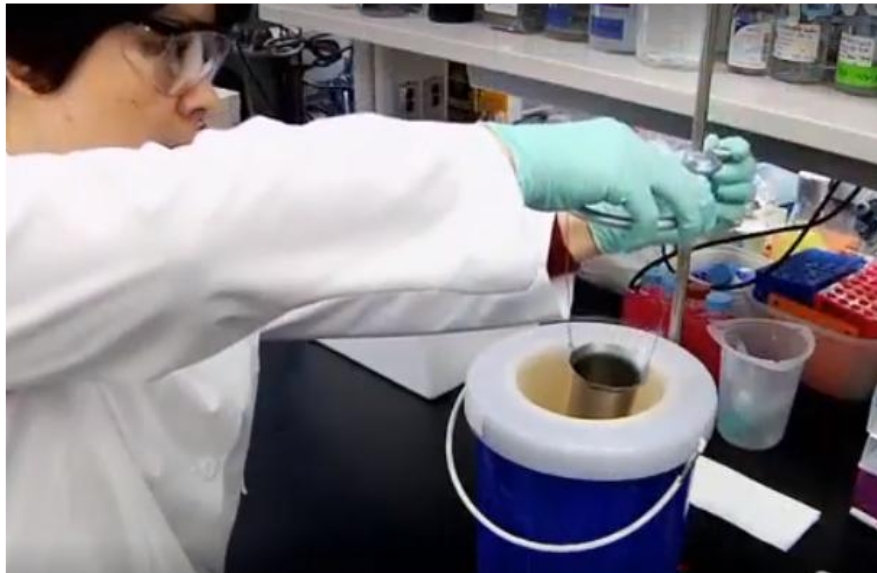
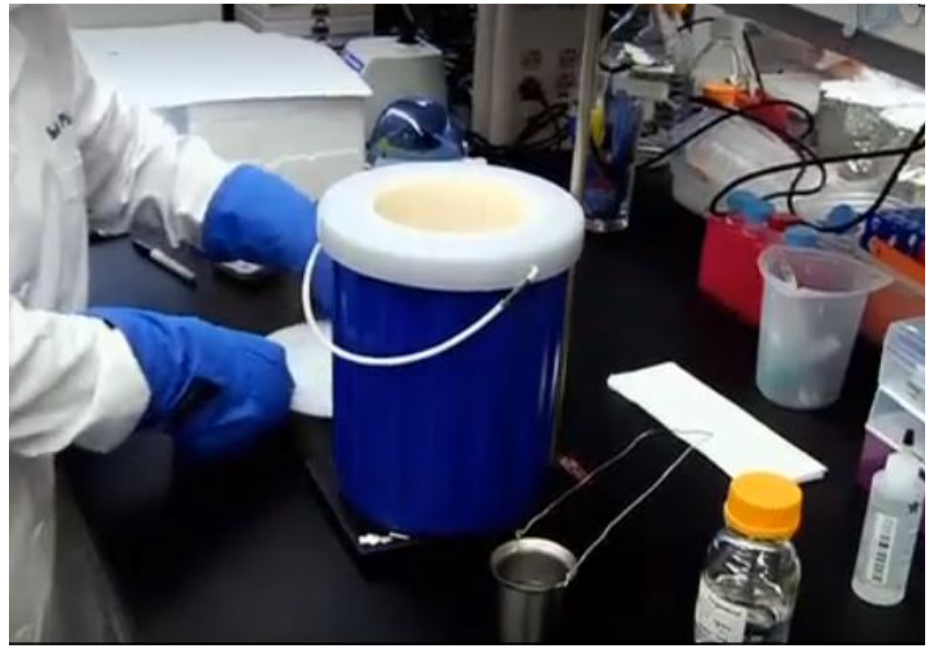
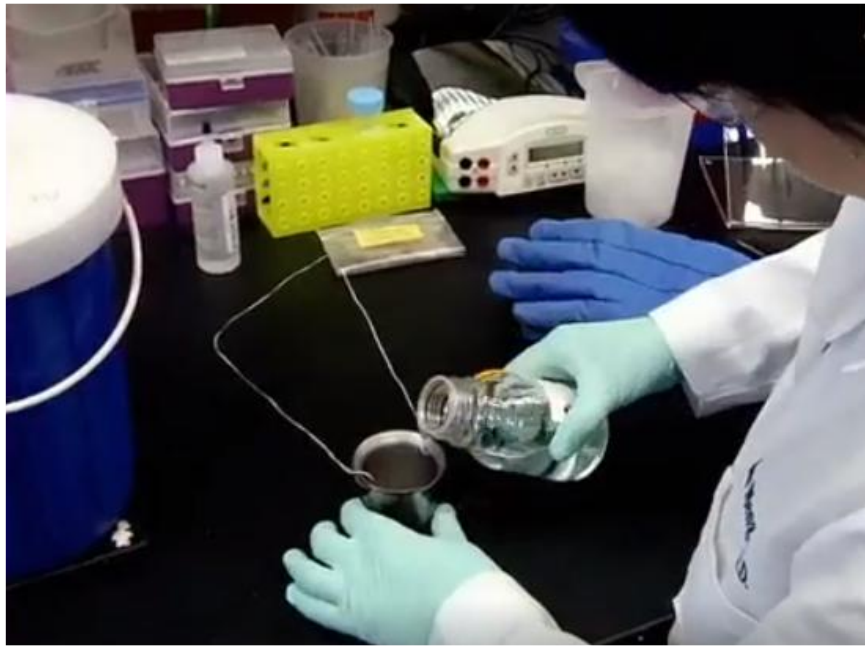
Piccole quantità di OCT versate sui supporti
e posizionamento del pezzo di tessuto

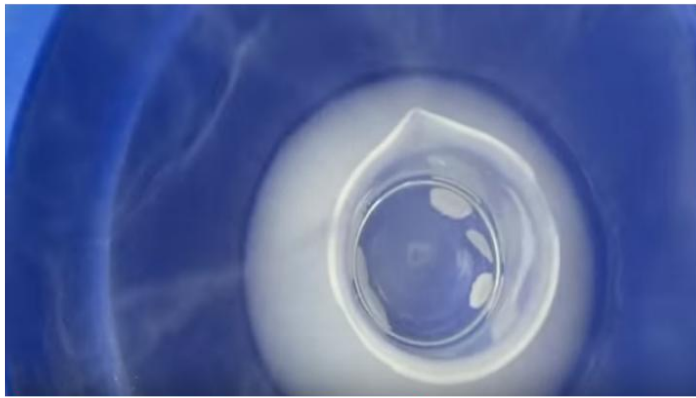


FISSAZIONE FISICA

quindi...per la Procedura di congelamento dei tessuti freschi:

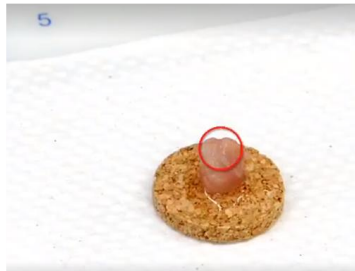
- Un becher di metallo viene riempito per $\frac{2}{3}$ di isopentano e collocato in un Dewar di azoto liquido abbastanza da raggiungere fino a circa $\frac{1}{3}$ del becher di metallo. Preparare almeno 10 minuti prima di congelare il campione.
- Con una pinza da 12 pollici congelare il campione preparato con lo stampo crio nella porzione trasparente di isopentano - immergere completamente.
- Evitare il crack cracking (frattura del campione) - quando c'è ancora una piccola goccia di campione di trasferimento OCT non congelato sul dispositivo di raffreddamento con schiuma di ghiaccio secco coperto mentre si continua su altri campioni.



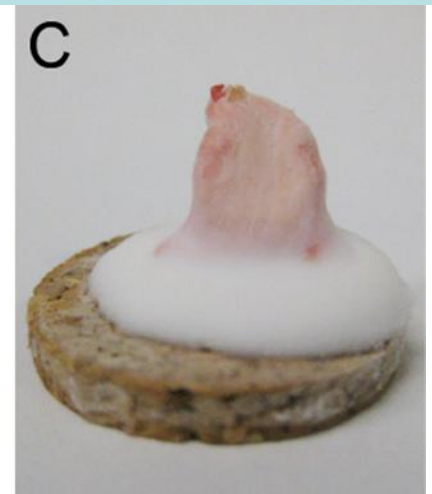


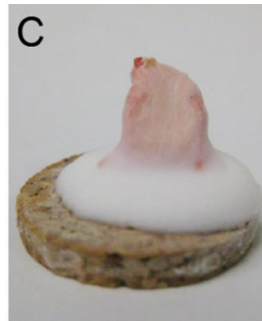
Congelamento
del crioprotettore ai bordi
esterni a contatto con le
pareti del becker

Temp: -80°C



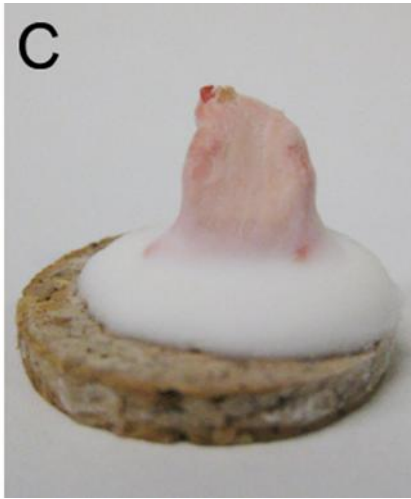
Con ausilio di pinze
lunghe il campione
sul supporto viene
immerso nel becker
per il congelamento
(in figura C)



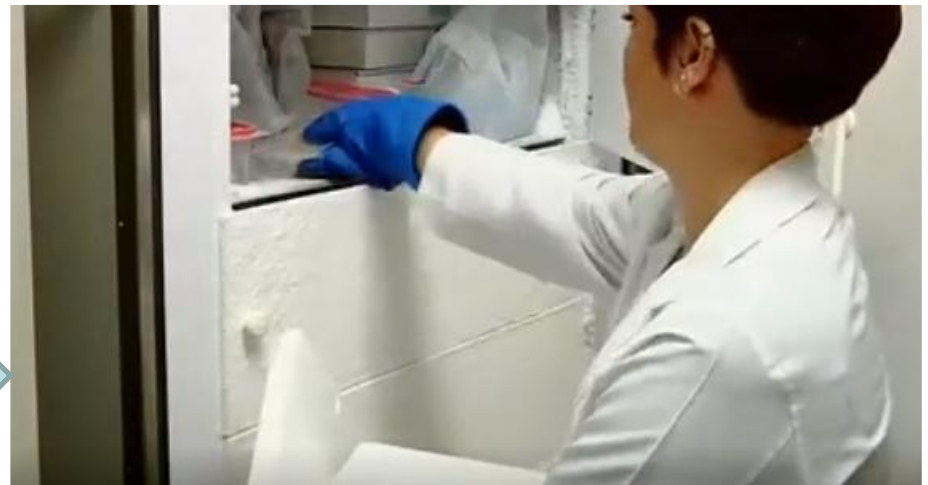
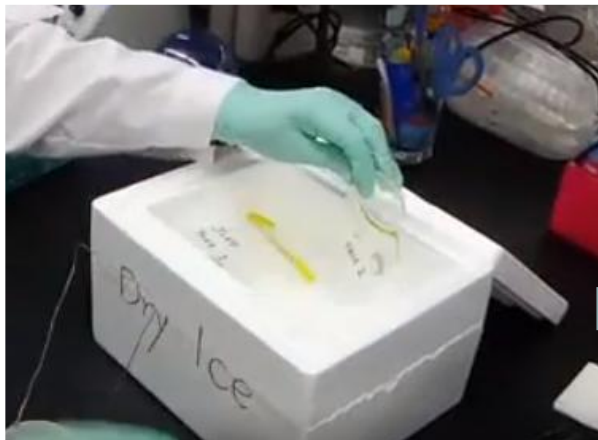


Conservare temporaneamente i campioni congelati in un dispositivo di raffreddamento coperto da ghiaccio secco continuando a congelare altri campioni

Oppure...



Avvolgere i singoli campioni in un foglio di alluminio etichettato, sigillarli in un sacchetto di plastica, metterli in una scatola del congelatore. Conservare a -80°C .



SI PROCEDE CON IL SEZIONAMENTO DELLE SEZIONI CONGELATE
AL CRIOSTATO

CRIOSTATI O
MICROTOMI CONGELATORE



Video Tutorial delle fasi di congelamento

<https://www.jove.com/video/51586/tissue-triage-and-freezing-for-models-of-skeletal-muscle-disease>