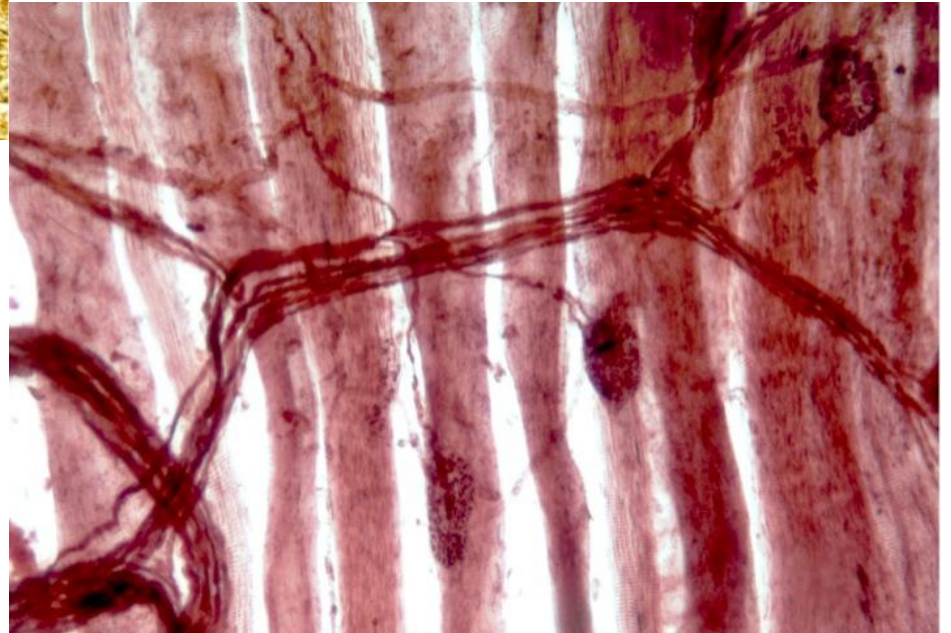
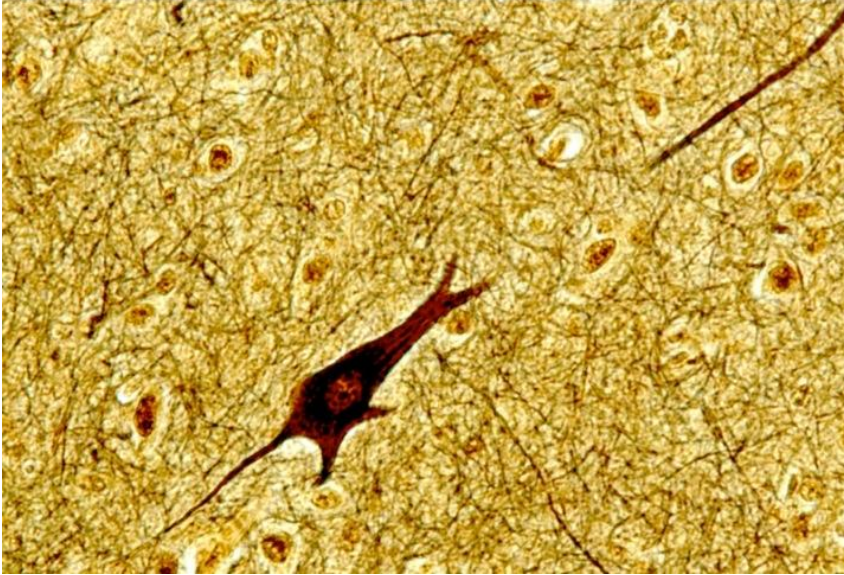


COLORAZIONI ELETTIVE PER IL TESSUTO NERVOSO



COLORAZIONI ELETTIVE PER IL TESSUTO NERVOSO

Le caratteristiche del Tessuto Nervoso, associate alla sua delicatezza, fanno sì che sia estremamente difficile ottenere preparati di buona qualità e durevoli nel tempo.

Si possono ottenere preparati da pezzi colorati in toto e poi inclusi in paraffina e tagliati, oppure ottenuti dopo colorazione per schiacciamento fra due vetrini o, infine, con metodi tradizionali.

Molto dipende dall'esperienza, dalla qualità dei prelievi e dalla risoluzione di una serie di problematiche che possono emergere durante l'allestimento del preparato

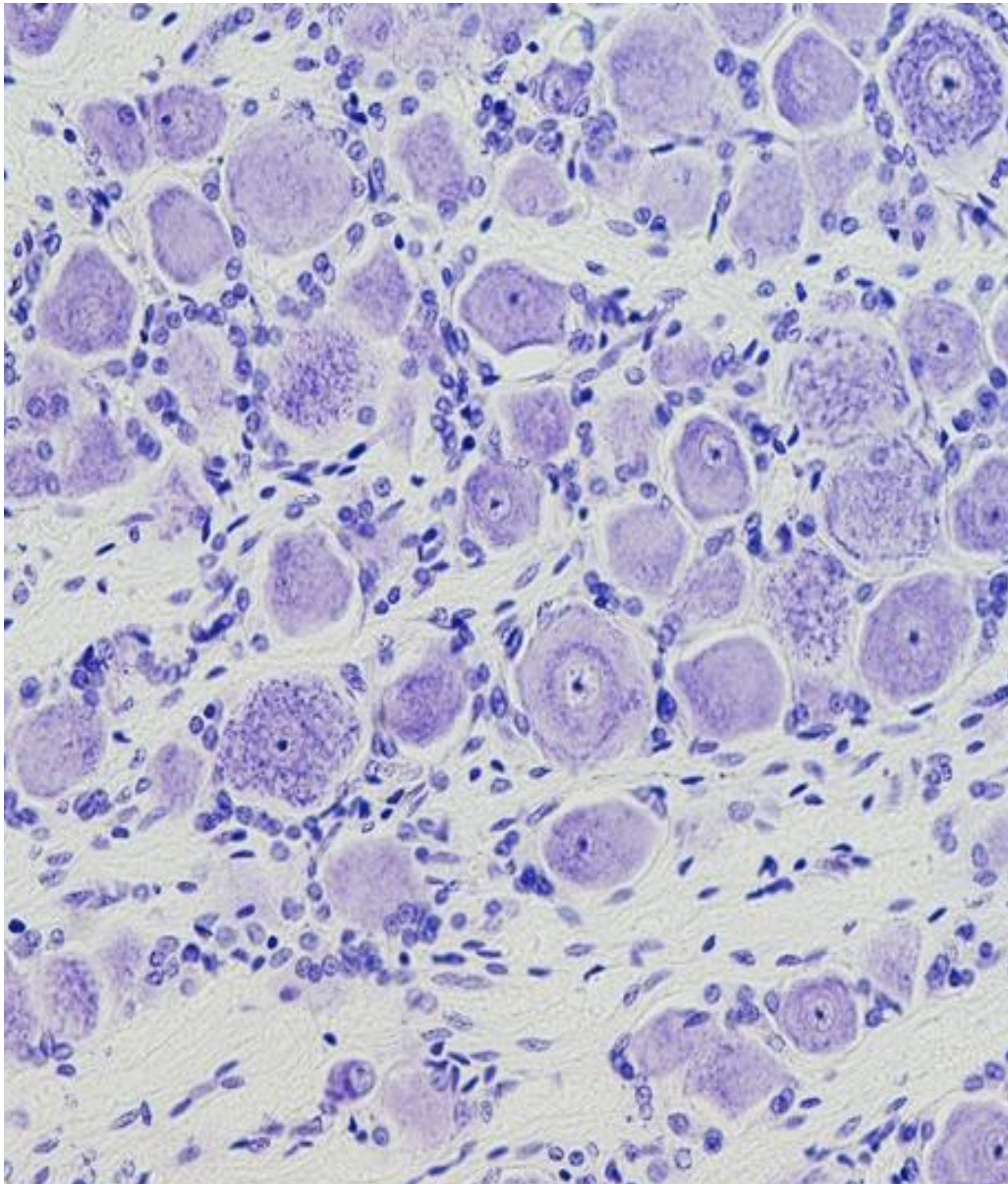
COLORAZIONI ELETTIVE PER IL TESSUTO NERVOSO

Nissle (o Blue di Toluidina)

Golgi (secondo Cajal)

Bielchowsky

Ruffini

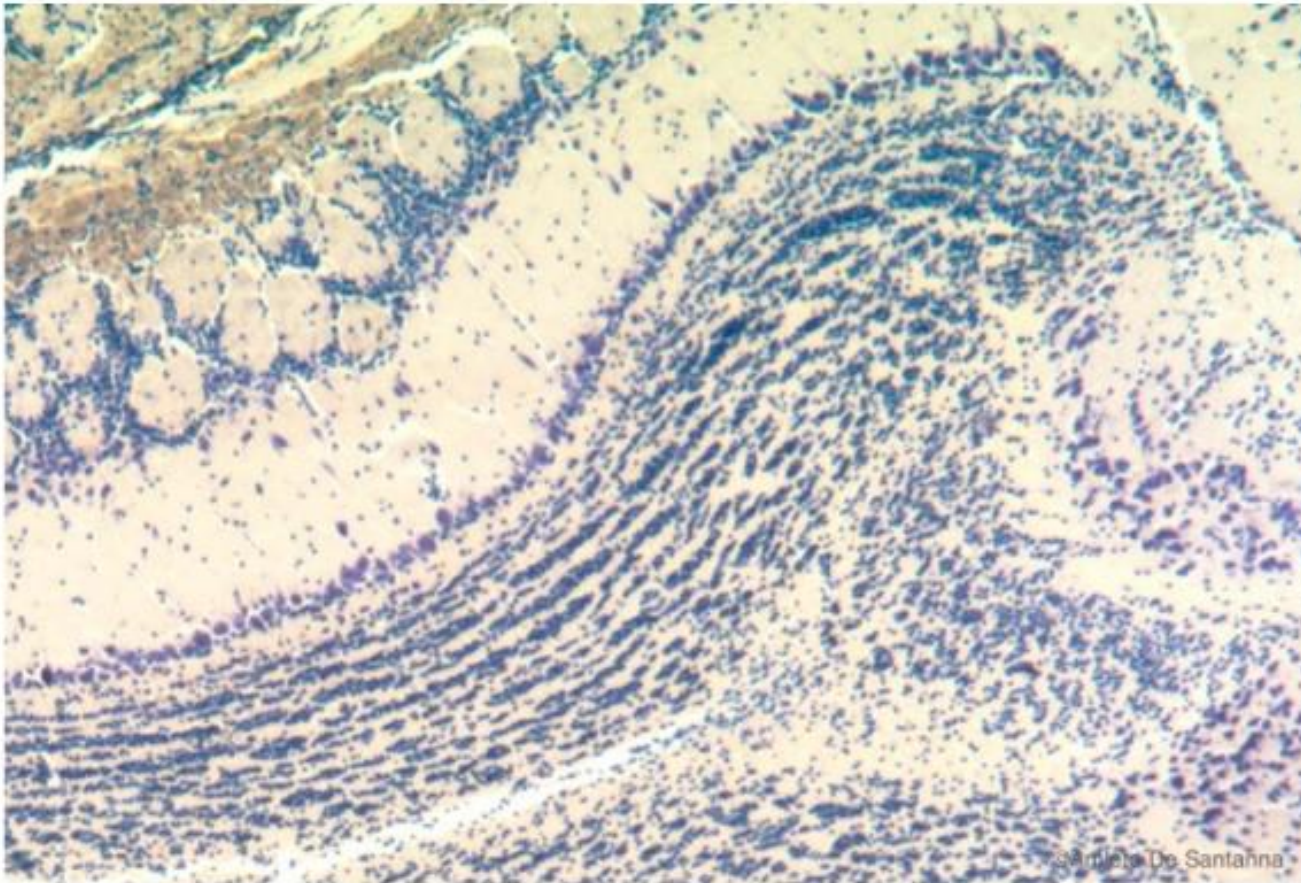


La colorazione secondo il metodo di Nissl prevede l'uso di coloranti basici (**blu di toluidina, blu di tionina o cresil violetto**) e pertanto mette in evidenza nel neurone quelle parti che contengono strutture basofile (zolle di tigroide o corpi di Nissl nel citoplasma, cromatina e nucleolo nel nucleo). Nei neuroni pseudounipolari il pirenoforo è rotondeggiante, il nucleo, posto al centro del corpo cellulare, è voluminoso e appare debolmente colorato perché l'eterocromatina è scarsa, mentre il nucleolo è ben evidente. Nel citoplasma le zolle di Nissl si evidenziano sotto forma di piccoli granuli uniformemente distribuiti. Si notino le cellule gliali (cellule satelliti) attorno ai pirenofori dei neuroni.

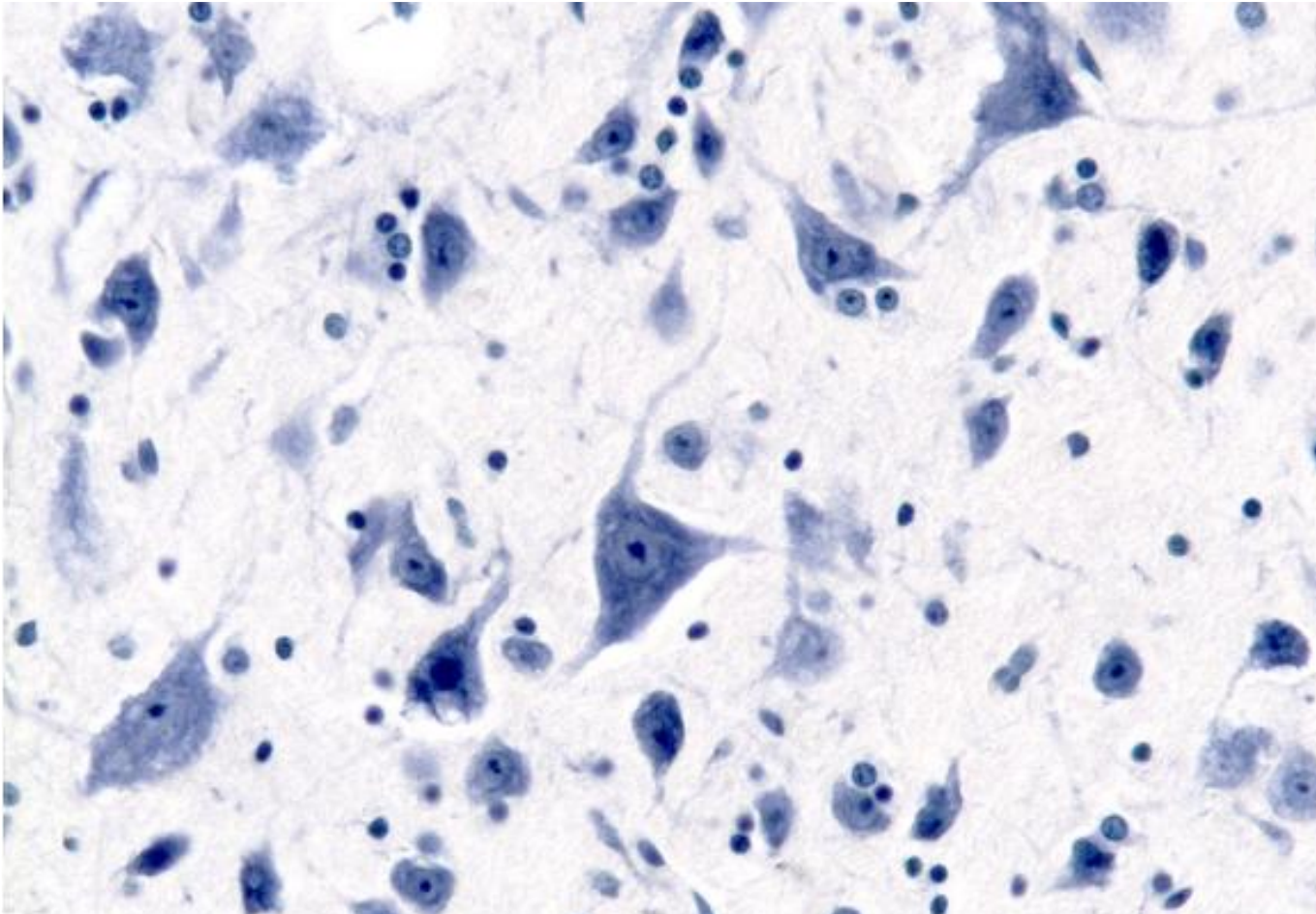
Ganglio spinale di cane.
Colorazione: Metodo di Nissl.

Nissle (o Blue di Toluidina)

Per il sistema nervoso centrale e si usa su sezioni in paraffina di 10 μm di spessore. E' relativamente semplice, mette in evidenza la zona tigroide del Nissle, caratteristica del citoplasma dei neuroni, colorandola con il blu-azzurro tipico del blu di toluidina. Vengono colorati in azzurro tenue anche i sepimenti connettivali.



Encefalo di topo
Nissle 63X



Tronco encefalico umano. Neuroni multipolari nel midollo allungato. Nel citoplasma dei pironofori dei neuroni è ben visibile la zona tigroide del Nissle. Nei nuclei, quando il piano di taglio è favorevole e passa esattamente per il centro, si notano chiaramente, con qualunque colorazione, i nucleoli. I nuclei più piccoli e rotondi sono delle cellule della neuroglia. *Nissle*
200x

Golgi (secondo Cajal)

Piccoli pezzi molto freschi di sistema nervoso centrale vengono trattati da 1 a 5-6 giorni (a seconda dell'animale, delle dimensioni del pezzo e delle sue caratteristiche) in soluzione osmio-bicromica, in termostato a 25°C.

Successivamente, il pezzo viene colorato con nitrato d'argento all'1%-2% in acqua. La reazione può durare fino a 3 giorni.

A colorazione avvenuta si includono i pezzi in paraffina o, se richiesto, in celloidina e si tagliano sezioni molto spesse, intorno a 40-50 µm, per avere una visione il più completa possibile del tessuto e dei vari costituenti cellulari.

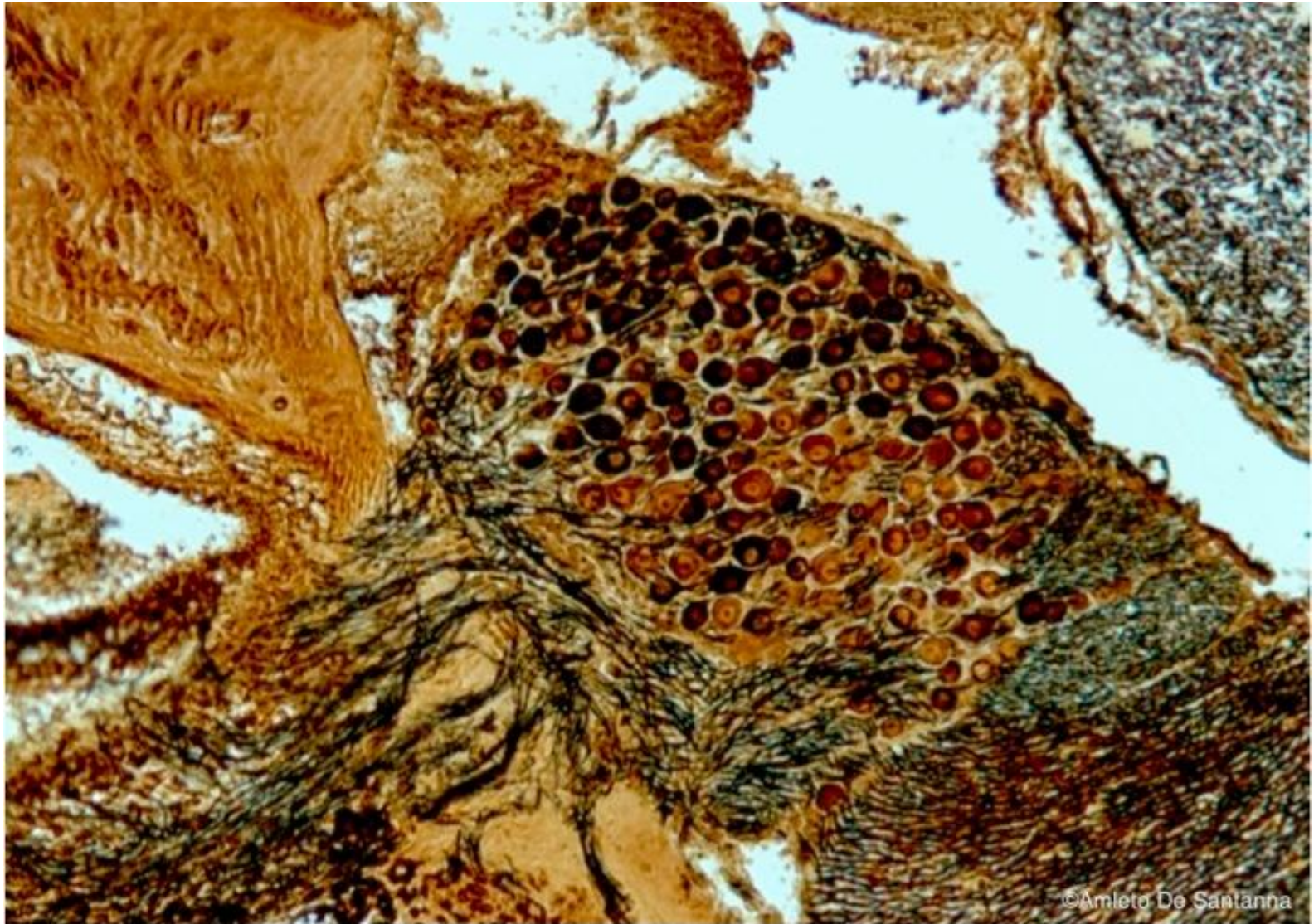
Questa è una colorazione di difficile riuscita che, molte volte, presenta problematiche praticamente irrisolvibili. In ogni caso, si ha una buona colorazione quando le cellule nervose spiccano in nero intenso su un fondo color tabacco. Proprio perchè di difficile e incostante riuscita sono state proposte, da vari autori, diverse varianti (Golgi-Bubenaite, Golgi-Cox, ecc.) ma le difficoltà di riuscita sono pressochè identiche.

Protocollo semplificato per la colorazione di Golgi:

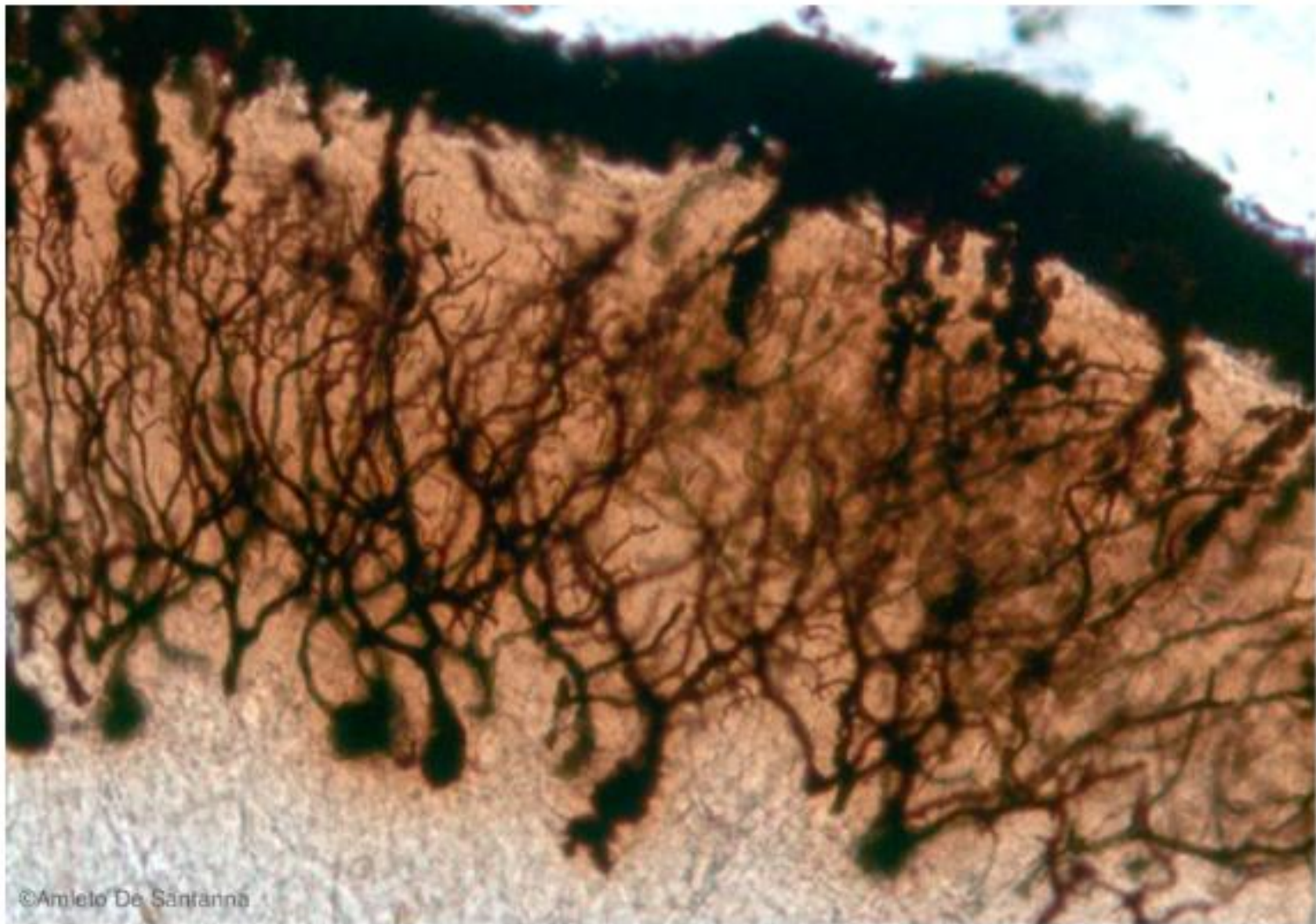
- Immergere per due giorni un blocco (approx. 10x5 mm) di tessuto nervoso fissato con la [formaldeide](#) (o perfuso con [paraformaldeide-glutaraldeide](#)) dentro una soluzione acquosa al 2% di [bicromato di potassio](#).
- Asciugare brevemente il blocco con [carta da filtro](#).
- Immergere il blocco in una soluzione acquosa al 2% di [nitrato d'argento](#) per altri 2 giorni.
- Tagliare sezioni di 40-50 µm di spessore.
- 1.Disidratare rapidamente in [etanolo](#) (ad esempio, in [Depex](#) o [Enthalan](#)).

Questa tecnica è stata successivamente perfezionata sostituendo il precipitato d'argento con oro, tramite l'immersione del campione in cloruro d'oro e poi in [acido ossalico](#) e la successiva rimozione dell'argento con [tiosolfato di sodio](#). Ciò conserva un maggior grado di struttura fine, con i dettagli ultrastrutturali segnati da piccole particelle di oro

Golgi (secondo Cajal)

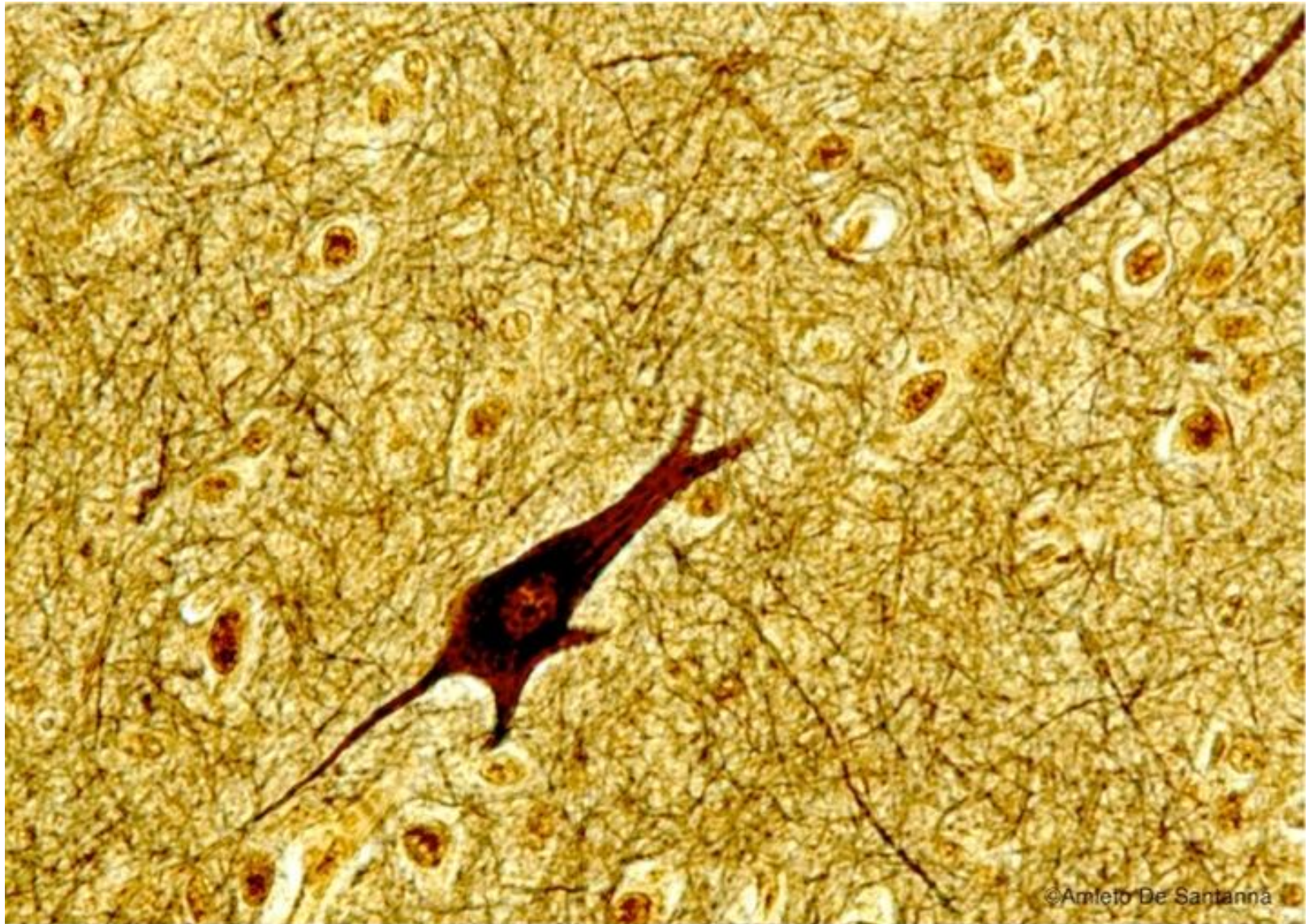


Embrione umano. Ganglio spinale in situ con colorazione elettiva per le cellule del sistema nervoso centrale. Golgi-Cox 100x

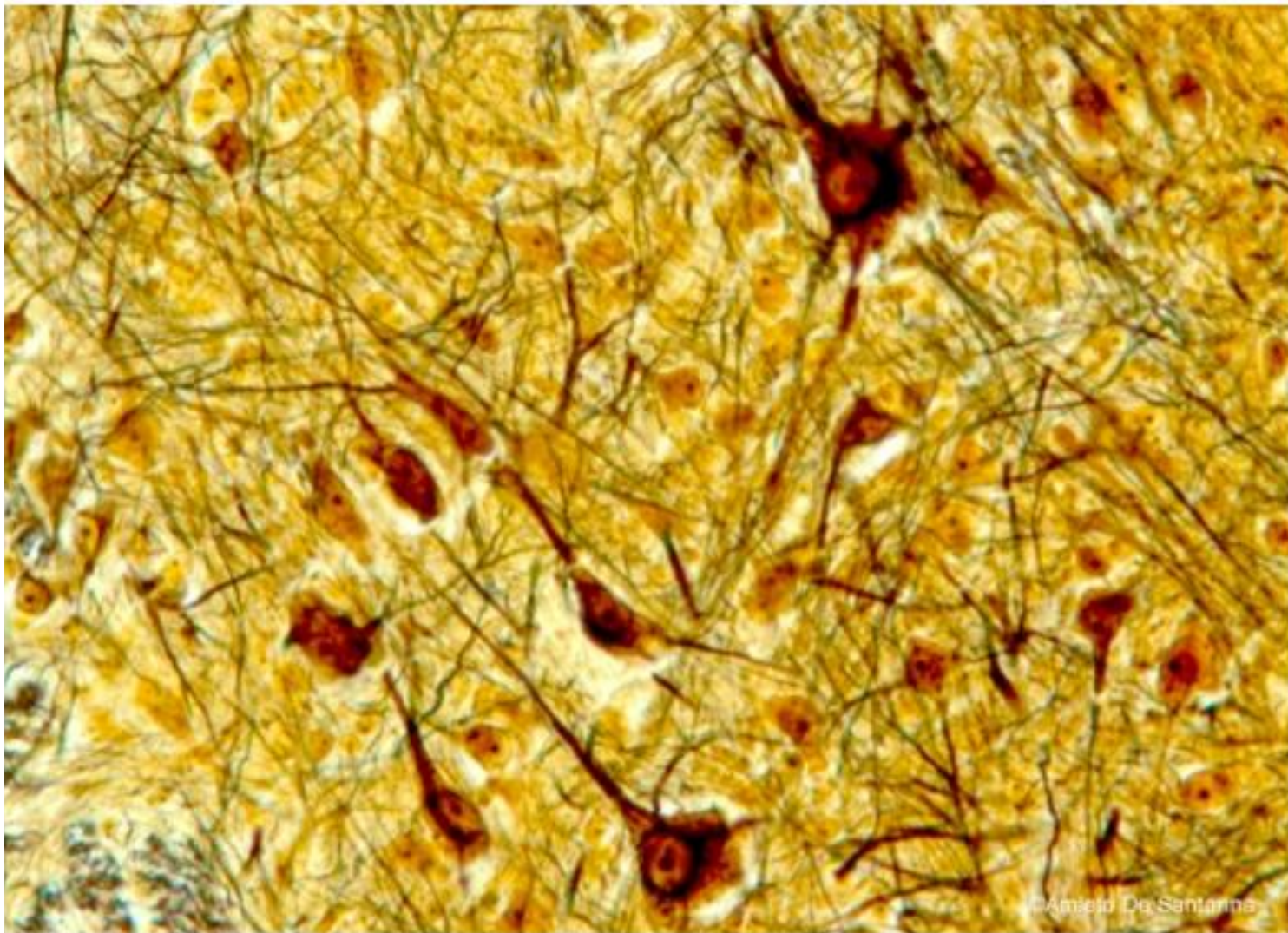


Cervelletto di topo a più forte ingrandimento. Visione in toto delle cellule del Purkinje. Golgi-Cox 100x

Golgi (secondo Cajal)



Tenecefalo umano. Neurone multipolare colorato secondo il metodo di Cajal. Cajal 200x



Midollo spinale di gatto. Si notano i motoneuroni multipolari .200x

Bielchowsky

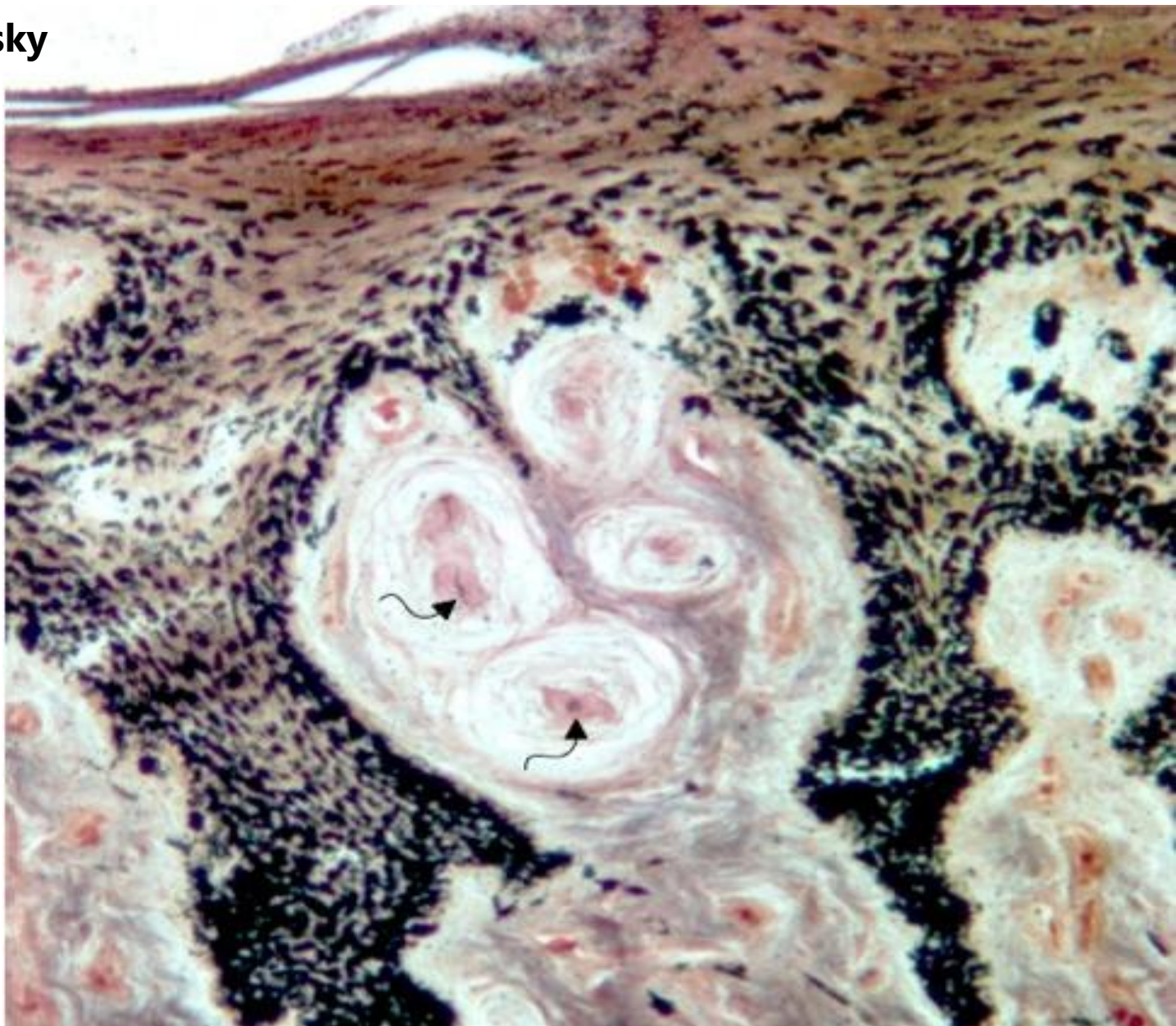
Anche questo è un metodo complicato e di difficile riuscita, molto usato per il sistema nervoso periferico.

Si basa sull'affinità che l'argento ammoniacale ha per le fibre nervose quando viene ridotto dalla formaldeide ad argento metallico. Fattori variabili come la fissazione, il pH e la temperatura possono influenzare l'intensità e la precisione di questa impregnazione.

A colorazione avvenuta si vedranno le fibre nervose colorate intensamente in nero su un fondo grigio più o meno intenso.

Per consentire di seguire adeguatamente l'andamento non rettilineo delle fibre le sezioni devono essere spesse almeno 12-14 μm . Con questo metodo si colorano anche le terminazioni nervose.

Bielchowsky



Cute di balena. Nel sottocutaneo, e precisamente in una papilla dermica che si incunea fra le creste epiteliali, si nota un gruppo di terminazioni nervose (Corpuscoli di Pacini) che presentano una terminazione nervosa libera centrale colorata in nero intenso (frecche) circondate da lamelle concentriche connettivali atte ad amplificare lo stimolo tattile. Bielschowsky 100x

Ruffini

Colorazione in toto di pezzi, anche voluminosi, adatta soprattutto alla ricerca di terminazioni nervose e di grosse fibre periferiche.

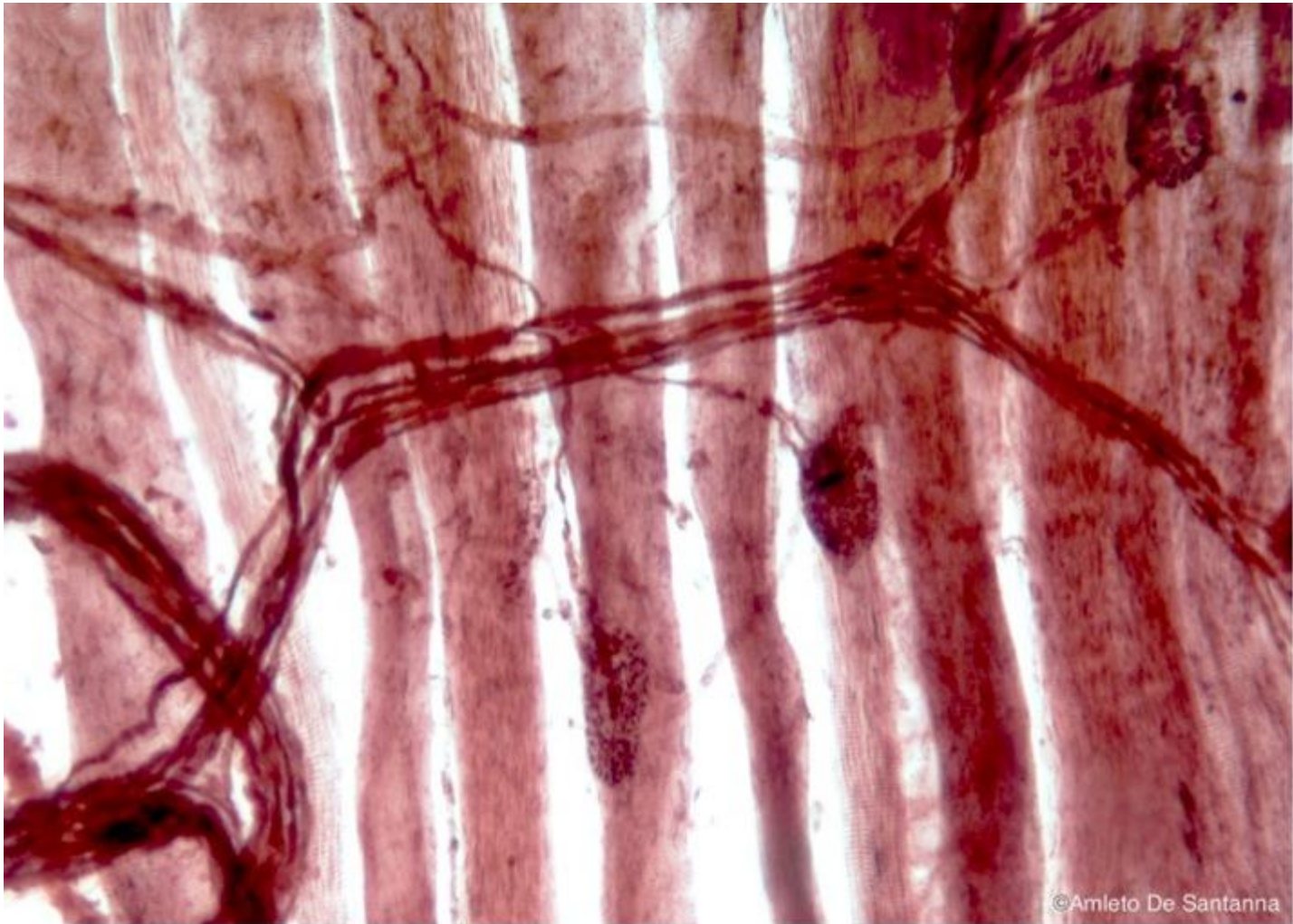
Riesce su tessuto fresco a cui non siano stati fatti trattamenti preventivi, neanche un lavaggio in acqua distillata.

Dopo la colorazione con cloruro d'oro, i pezzi ottenuti si macerano in glicerina per almeno sei mesi prima di prelevare piccoli frammenti e, per delacerazione, ottenere vetrini da osservare al microscopio ottico.

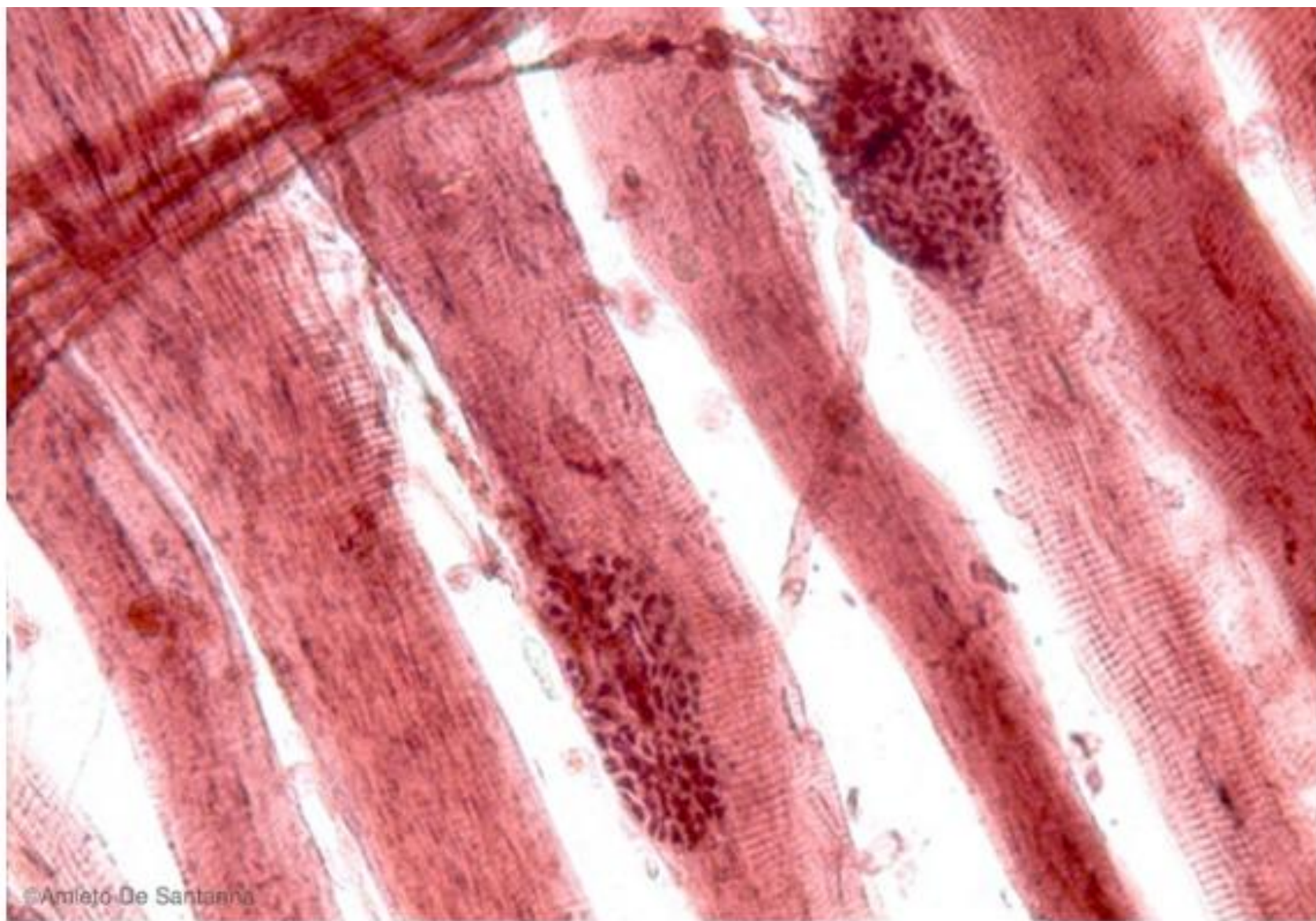
NB: Sei mesi rappresentano il tempo minimo di macerazione e si ottengono ottimi preparati anche dopo molti anni.

A colorazione terminata si osserveranno le terminazioni e il tessuto nervoso in generale colorati in nero intenso su un fondo violetto.

Ruffini

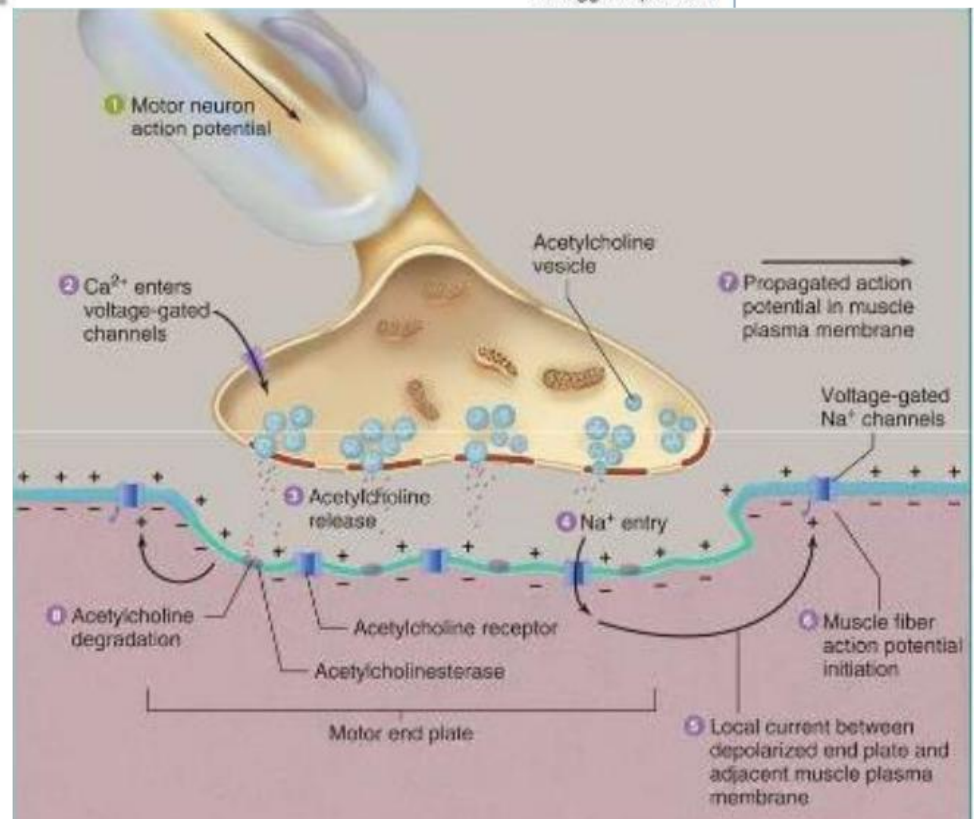
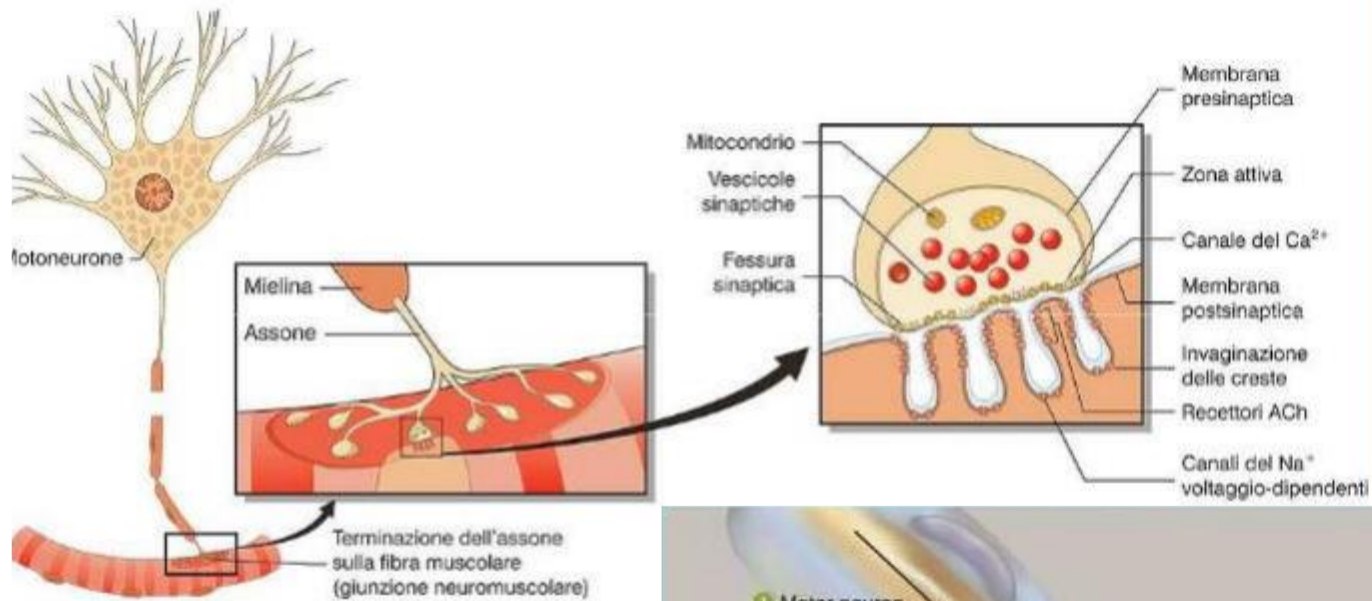


Placche motrici di muscolo striato di rana. Le fibre nervose e le placche motrici sono colorate in viola intenso.
Ruffini 100x



©Amleto De Santanna

Terminazioni neuromuscolari di rana a più forte ingrandimento. Si nota chiaramente l'espansione a forma di bottone della terminazione nervosa (placca motrice) sulle fibre muscolari striate. Ruffini 200x



Placca motrice



Microfotografia al microscopio elettronico. I recettori sono stati marcati con una neurotossina α -bungarotossina marcata con ^{125}I . I recettori appaiono in nero. Bungarotossina è inibitore specifico del recettore nicotinico dell' Ach.

Placca neuromuscolare

