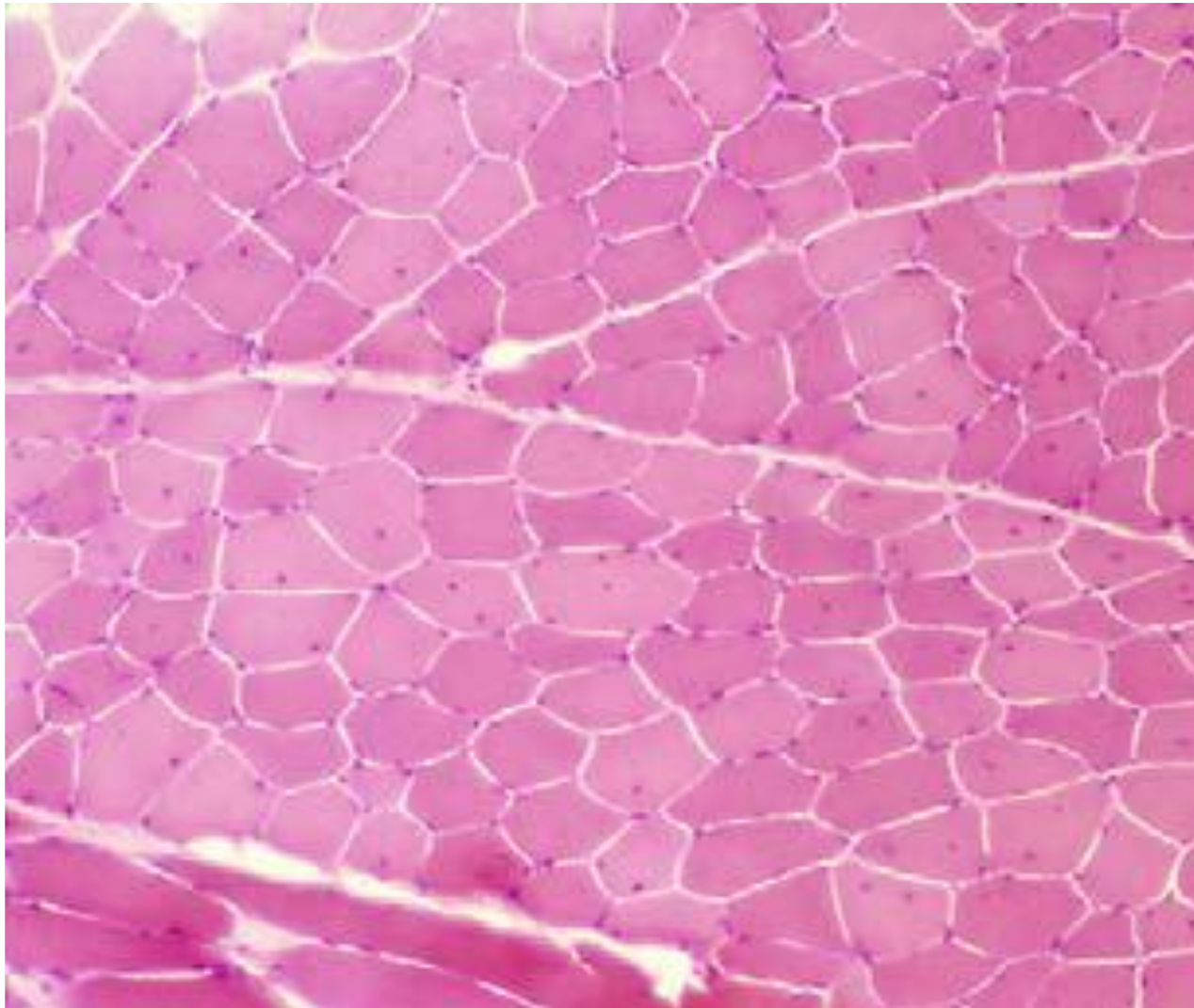


Studio Morfologico del Tessuto Muscolare

Principi metodologici e aspetto morfologico del muscolo scheletrico normale



Utilizzazione della biopsia muscolare per un approfondimento diagnostico di tipo morfologico della situazione normale e patologica.

Con questa metodica è possibile valutare direttamente numerosi parametri morfologici relativi all'architettura muscolare, alle singole fibre, ai tessuti interstiziali ed ai vasi sanguigni.

ALLESTIMENTO DEL PREPARATO ISTOLOGICO

Per un esame del tessuto muscolare è necessario allestire preparati istologici mediante:

PRELIEVO

FISSAZIONE

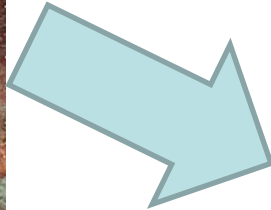
SEZIONAMENTO in fettine di minimo spessore e

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

...OSSERVAZIONE

ALLESTIMENTO DI UN PREPARATO ISTOLOGICO

PRELIEVO



Riduzione a circa 1 cm³



Metodi per la fissazione del tessuto muscolare

FISSAZIONE CHIMICA (soluzioni liquide)



-formalina:

per lo studio istologico in microscopia ottica
(morfologia ottica su sezioni semifini)

-liquido di Karnovsky:

per lo studio in microscopia elettronica
(morfologia ultrastrutturale su sezioni
ultrafini)

FISSAZIONE FISICA (congelamento)



-azoto liquido :

si utilizza per lo studio di tipo

- istochimico,
- enzimo-istochimico
- immuno-istochimico

STRUTTURA DEL MUSCOLO SCHELETRICO

studio istologico in MICROSCOPIA OTTICA



sezioni semifini

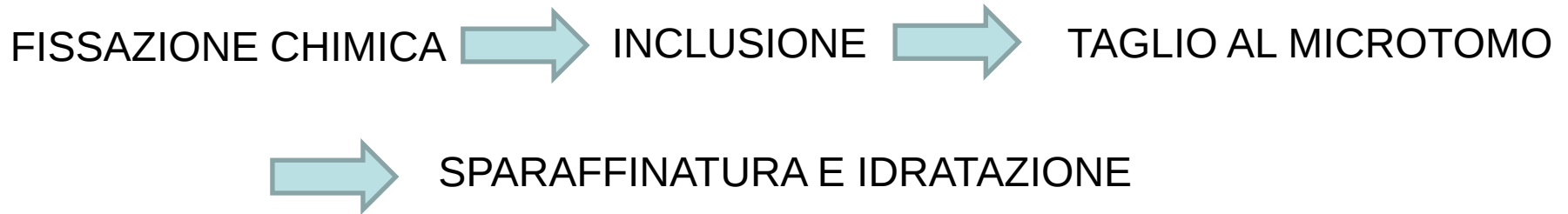
Lo studio morfologico del tessuto muscolare scheletrico si effettua in microscopia ottica su **sezioni istologiche trasversali rispetto all'asse della fibra**, ottenendo così un'immagine rotondeggiante o poligonale della fibra stessa.

La sezione trasversale permette una valutazione comparativa del diametro delle fibre, tra di loro o rispetto a fibre normali di controllo.

Diametro medio delle fibre muscolari in relazione all'età.

Gruppi di età (anni)	0-4	5-10	11-14	15-20	21-40	41-60	61-70	71-80	81-90
Diametro medio (μm)	18	24	36	60	68	62	60	46	42

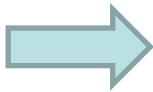
COLORAZIONI PRINCIPALI PER L'OSSERVAZIONE IN MICROSCOPIA OTTICA



Ematossilina ed Eosina

Impregnazione Argentica secondo Gomori per la reticolina

COLORAZIONI PRINCIPALI PER L'OSSERVAZIONE IN MICROSCOPIA OTTICA

FISSAZIONE FISICA  TAGLIO AL CRIOSTATO

Reazione enzimo-stochimica per l'ATPasi a pH 9.6

Reazione enzimo-stochimica per l'ATPasi a pH pH 4.7

Reazione per NADPH-diaforasi

Il muscolo scheletrico è composto da fascicoli costituiti da elementi cellulari specializzati allungati, con numerosi nuclei disposti alla periferia, detti fibre muscolari o miofibre.

Le miofibre sono molto grandi rispetto agli altri elementi cellulari dell'organismo ed hanno un diametro medio di 14 micron nell'infanzia e di 60 micron nel giovane adulto. Nell'anziano esse subiscono una progressiva atrofia, legata alla sedentarietà ed al naturale invecchiamento dei tessuti.

Nel loro insieme i fascicoli muscolari sono circondati da setti fibro-connettivali che costituiscono il perimisio. A sua volta ciascuna fibra muscolare è circondata da un esile strato di tessuto fibroso detto endomisio, nel quale si riconoscono capillari sanguigni. Ciascuna fibra muscolare è rivestita da una membrana cellulare detta sarcolemma e presenta in posizione periferica sub-sarcolemmale numerosi nuclei costituiti da cromatina densa. All'interno del sarcolemma è contenuto il citoplasma cellulare detto sarcoplasma, nel quale sono presenti le strutture contrattili del muscolo rappresentate dalle miofibrille con le caratteristiche striature trasversali, e da altri organuli non visibili in microscopia luce, quali i mitocondri

COLORAZIONI PRINCIPALI PER L'OSSERVAZIONE IN MICROSCOPIA OTTICA

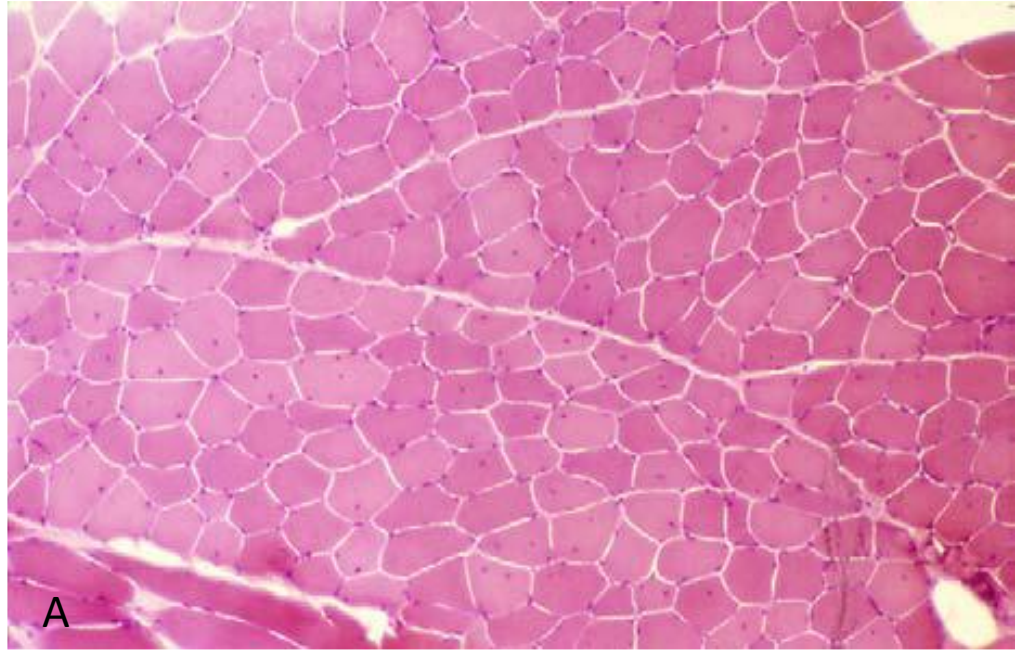
Ematossilina ed Eosina

- sezioni in H₂O distillata
- Emaillume acido di Mayer, filtrato (7')
- Lavare in H₂O corrente (10')
- Eosina [0.25 %], acidificata con qualche goccia di acido acetico (1')
- lavare in H₂O distillata (2')
- disidratare in etanolo 95° (4')
- disidratare in etanolo 100° (4') (3 cambi)
- chiarificare in xilolo (3 cambi)
- montare in mezzo d'inclusione

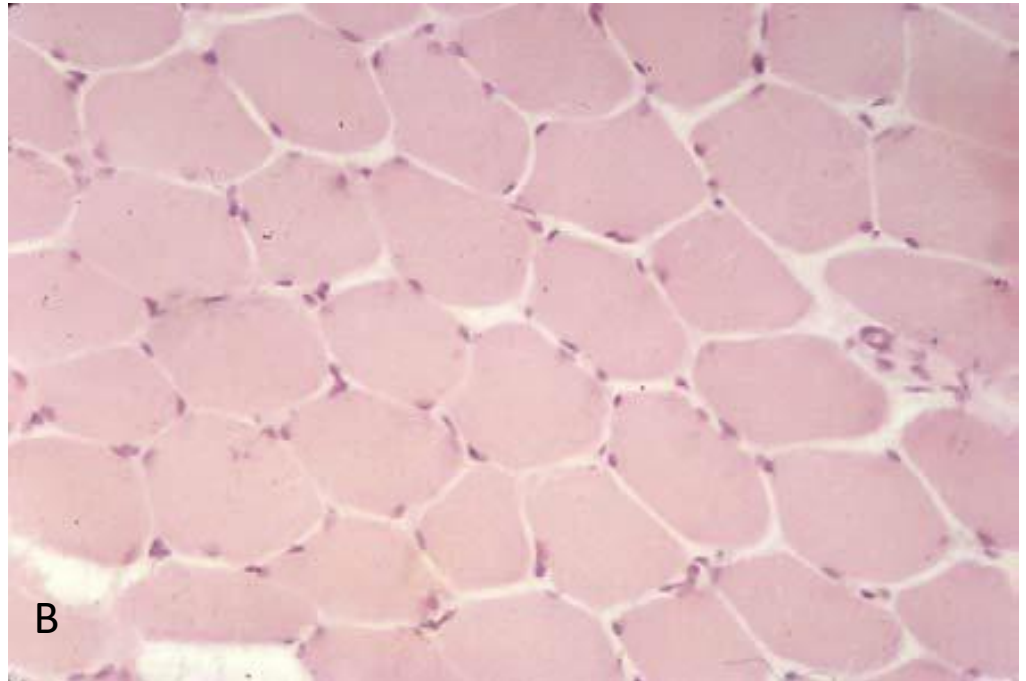
Ematossilina ed Eosina

Sezione trasversale. Colorazione con ematossilina ed eosina.

A, Le fibre muscolari di un soggetto normale presentano dimensioni simili e sono raccolte in fascicoli.
80X;



B, A più forte ingrandimento i nuclei sono ben visibili alla periferia delle miofibre, in posizione sub-sarcolemmale. 150X.



COLORAZIONI PRINCIPALI PER L'OSSERVAZIONE IN MICROSCOPIA OTTICA

Impregnazione Argentica sec. Gomori

E' una colorazione elettiva per le fibre connettivali reticolari, che appaiono in nero intenso su un fondo aspecifico che va dal grigio al giallino pallido. Si basa sull'affinità dell'argento per le proteine costituenti queste fibre. La reazione è attivata dalla luce che ha funzione di catalizzatore.

METODO COLORIMETRICO OTTIMALE PER LA VISUALIZZAZIONE
DELLE FIBRE RETICOLARI ARGIROFILE SU SEZIONI ISTOLOGICHE

COMPOSIZIONE REATTIVO:

- *PERMANGANATO*
- *ACIDO OSSALICO*
- *ALLUME FERRICO*
- *SOLUZIONE ARGENTICA*
- *SOLUZIONE RIDUCENTE*
- *TIOSOLFATO DI SODIO*

Impregnazione Argentica secondo Gomori per la reticolina

Protocollo colorazione Gomori. La durata della colorazione è di 51 minuti e 30 secondi

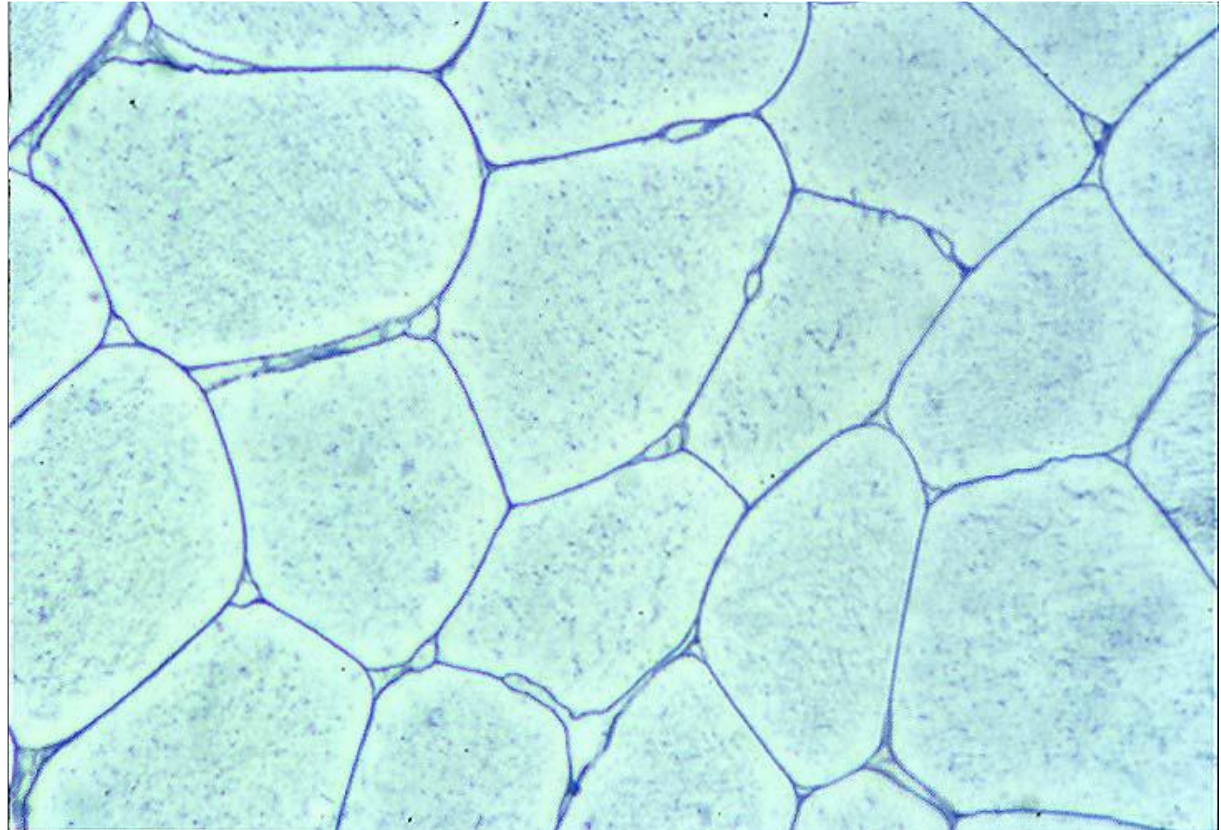
N° passaggio	Bagno	Tempo (minuti)
1	xilolo	1:00
2	alcol 100%	1:00
3	alcol 95%	1:00
4	alcol 75%	1:00
5	acqua corrente	1:00
6	permanganato di potassio 1%	10:00
7	acqua corrente	1:00
8	metabisolfito di potassio 3%	1:00
9	acqua corrente	1:00
10	alume di ferro 2%	1:00
11	acqua demineralizzata	1:00
12	nitrato d'argento: soluzione di lavoro	3:00
13	acqua demineralizzata	1:00
14	ridurre in formalina 4% non tamponata	3 :00
15	acqua corrente	1 :00
16	cloruro d'oro: soluzione di lavoro	10 :00
17	acqua corrente	1:00
18	tiosolfato di sodio 3%	1:00
19	acqua corrente	1:00
20	rosso per nuclei	5:00
21	acqua corrente	1:00
22	alcol 70%	1:00
23	alcol 95%	1:00
24	alcol 100%	2:00
25	xilolo	0:30

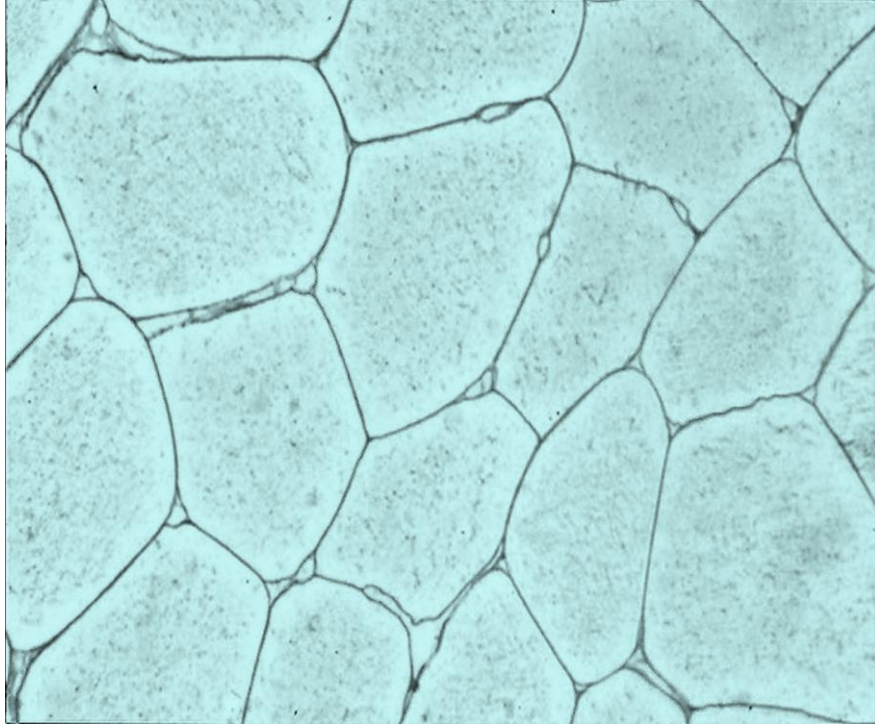
Impregnazione Argentica secondo Gomori per la reticolina

Sezione trasversale.
Colorazione con impregnazione
argentica sec.Gomori per la
reticolina.

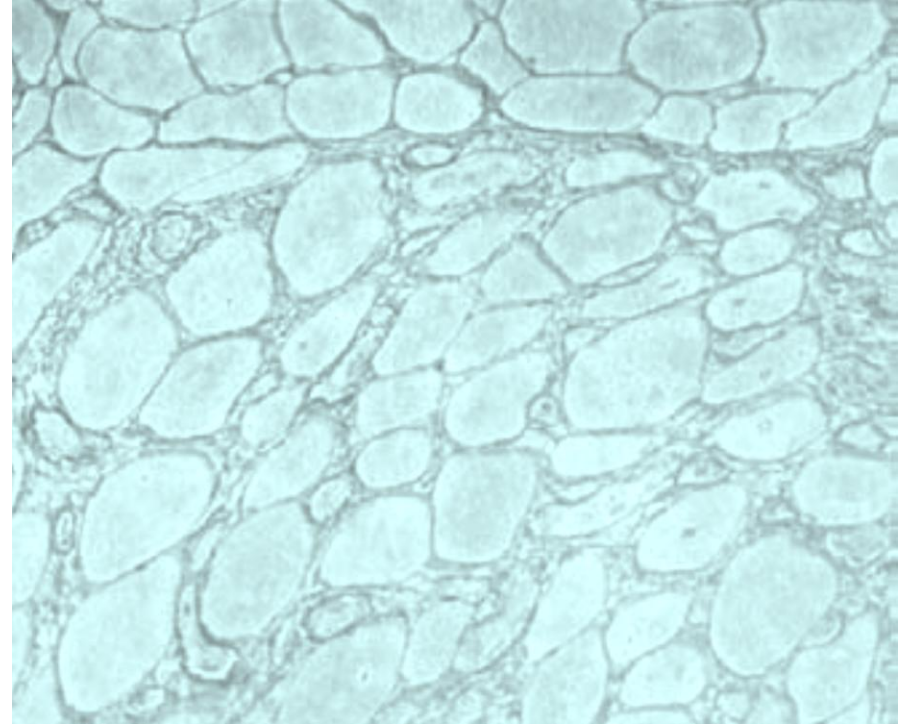
L'endomisio viene evidenziato con
colorazioni specifiche sotto forma
di sottili tralci di connettivo
reticolare inglobanti i capillari
sanguigni.

Le fibre muscolari non appaiono
colorate. 180X .





Impregnazione argantica sec.Gomori. Muscolo normale. 80X



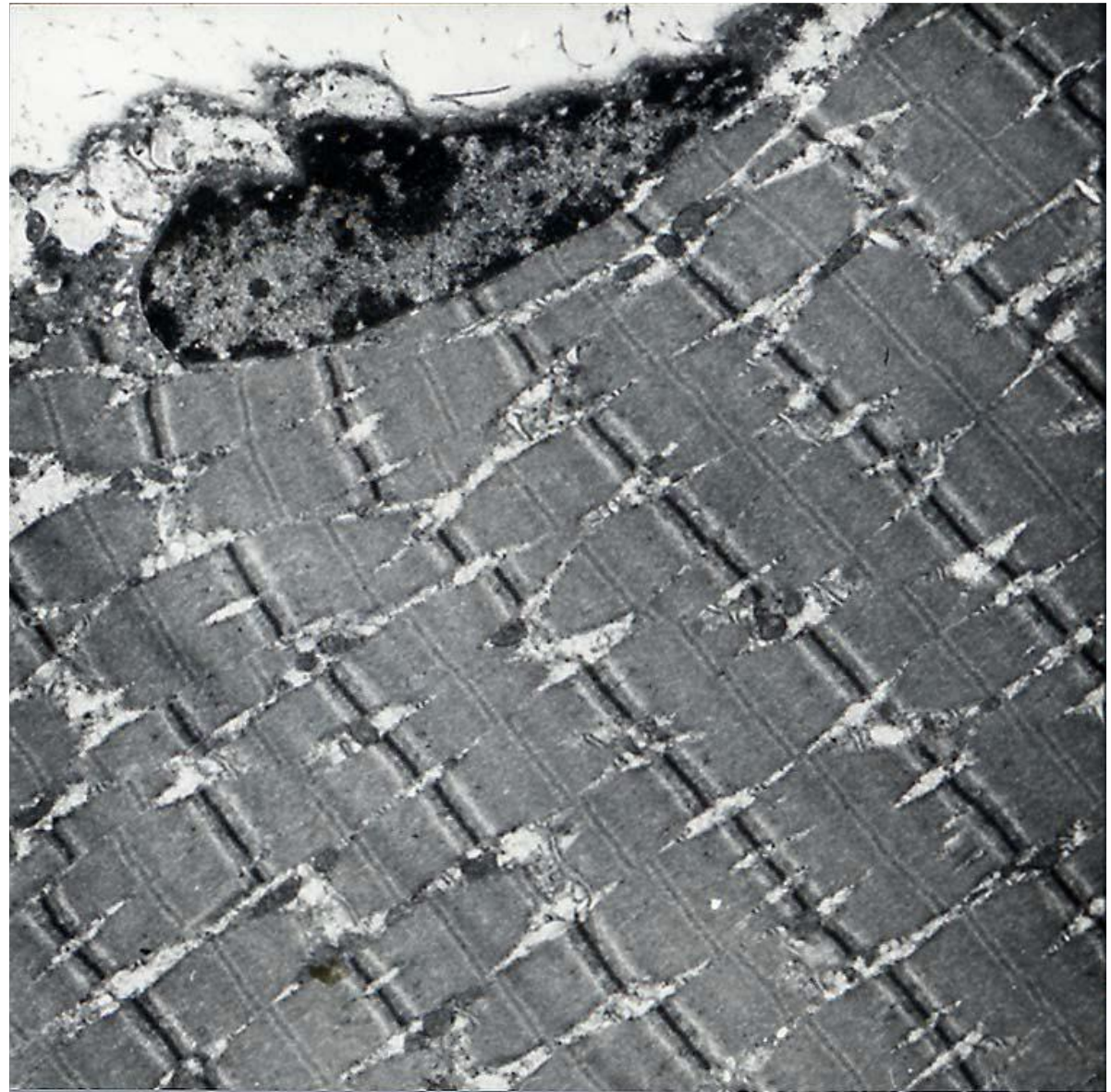
Impregnazione argantica sec.Gomori. Muscolo patologico con Atrofia muscolare con diffusa fibrosi interstiziale. 80X

Nel muscolo sono inoltre osservabili, marcandole con anticorpi specifici, piccole cellule mononucleate specializzate disposte in aree sub-sarcolemmali, dette **cellule satelliti**. Esse si attivano e diventano più numerose nei processi di ipertrofia e di rigenerazione muscolare, mentre diminuiscono in caso di inattività.

Nell'interstizio muscolare sono inoltre presenti fascicoli nervosi periferici e particolari strutture dette fusi neuromuscolari che contengono fibre muscolari specializzate nel mantenimento del tono e della coordinazione dell'attività muscolare.

Microscopia elettronica

Il dettaglio morfologico delle strutture funzionali della fibra muscolare, che non sono ben visibili in microscopia luce, è evidenziato **all'esame in microscopia elettronica**, che nel nostro caso ingrandisce un particolare fino a 50.000 volte. La sezione longitudinale delle miofibre evidenzia una caratteristica struttura striata delle miofibrille, dovuta alla regolare alternanza dei filamenti delle proteine contrattili: l'**actina** e la **miosina**



Aspetto ultrastrutturale della fibra muscolare caratterizzato da miofibrille composte da miofilamenti, con caratteristiche bande tenuemente colorate e linee Z molto evidenti. Alla periferia della fibra è presente un nucleo, mentre tra le miofibrille sono presenti con caratteristica cadenza gli organuli sarcoplasmatici, tra cui spiccano i mitocondri. 2000X

all'esame in microscopia elettronica si evidenzia:

L'unità funzionale della miofibrilla è il sarcomero. Esso si estende tra due linee Z consecutive, formate da materiale elettron-denso agganciato ai filamenti di actina. I miofilamenti sono costituiti dalle proteine contrattili actina e miosina, che rappresentano il motore della contrazione muscolare. Questa è realizzata dallo scorrimento dei filamenti di actina lungo quelli di miosina, che si avvicinano alla banda A, composta da spessi filamenti di miosina, riducendo la lunghezza del sarcomero con conseguente accorciamento dell'unità di contrazione. **Il sistema che permette il trasporto del segnale elettrico nervoso dalla membrana cellulare alle unità di contrazione (sarcomeri) è costituito dal reticolo sarcoplasmatico e dal sistema dei Tubuli Trasversi (perciò detti tubuli T),** che derivano da invaginazioni e dilatazioni del sarcolemma stesso. In queste strutture il segnale elettrico che si diffonde lungo il sarcolemma viene trasformato in segnale chimico attraverso la mediazione di ioni calcio che vengono rilasciati dal Reticolo Sarcoplasmatico in prossimità dei filamenti contrattili. Altre strutture submicroscopiche fondamentali sono i **mitocondri**, deputati alla respirazione cellulare e allo sviluppo di energia. Il microscopio elettronico evidenzia inoltre le sostanze che forniscono energia alle fibre, il **glicogeno** ed i **lipidi**, rispettivamente sotto forma di granuli e di materiale accumulato in vacuoli sarcoplasmatici. Sono questi i combustibili cellulari bruciati dall'ossigeno, che diffonde dai capillari sanguigni

Istochimica

Le reazioni istochimiche permettono di riconoscere nel sarcoplasma della fibra muscolare due sostanze biochimiche che costituiscono la sorgente energetica utilizzata dal muscolo per il proprio funzionamento: il glicogeno ed i lipidi.

La colorazione all'acido periodico di Schiff (PAS) mostra una positività diffusa nel sarcoplasma delle fibre, legata alla presenza di glicogeno, una sostanza finemente granulosa distribuita lungo le miofibrille.

La colorazione con Oil red-orceina ed altre colorazioni specifiche evidenziano i lipidi neutri, sotto forma di materiale generalmente raccolto in vacuoli sarcoplasmatici.

Entrambe le colorazioni appaiono più intense in alcune fibre rispetto ad altre, suggerendo proprietà biochimiche differenti nell'utilizzazione delle sorgenti energetiche tra le fibre di uno stesso fascicolo muscolare.

COLORAZIONI PRINCIPALI PER L'OSSERVAZIONE IN MICROSCOPIA OTTICA

FISSAZIONE FISICA  TAGLIO AL CRIOSTATO

Reazione enzimo-stochimica per l'ATPasi a pH 9.6

Reazione enzimo-stochimica per l'ATPasi a pH pH 4.7

Reazione per NADPH-diaforasi

enzimoistochimica

Le reazioni istoenzimatiche

la reazione alcalina per la evidenziazione dell'attività adenosintrifosfatasica (ATPasi, pH 9.6) permettono una differenziazione più netta tra i due principali tipi di fibre: le fibre di tipo I (*miofibre a contrazione lenta e resistenti alla fatica*), che si colorano in modo tenue, e le fibre di tipo II (*miofibre a contrazione rapida e poco o pochissimo resistenti alla fatica*), che si colorano intensamente di nero.

Al contrario le reazioni per le attività enzimatiche legate alla funzione dei mitocondri quali la NADH-tetrazolio reduttasi e la succinico deidrogenasi (SDH) colorano di scuro le fibre di tipo I, che contengono un elevato numero di mitocondri, e colorano in modo tenue le fibre di tipo II, che ne contengono un numero ridotto o assai ridotto

Le reazioni istoenzimatiche

ell'attività adenosintrifosfatasica ATPasi pH 9,6 alcalina

differenziazione più netta tra i due principali tipi di fibre: le fibre di tipo I (*miofibre a contrazione lenta e resistenti alla fatica*), che si colorano in modo tenue, e le fibre di tipo II (*miofibre a contrazione rapida e poco o pochissimo resistenti alla fatica*), che si colorano intensamente di nero.

METODO DELL'ATPasi

1) pre-incubazione alcalina (**pH 10.3, 10.4, 10.55**) 20 min.
in tampone CaCl_2 0.1M, Na barbital 0.075M, Na acetato 0.07M

Lavaggio in H_2O distillata 30'' X 2

Lavaggio in tampone Ca/Barb/acet pH 9.4 30'' X 2

Incubazione in tampone Ca/Barb/acet + 1.5 mg ATP/ml pH 9.4 (60 minuti vetrini pre-incubazione acida; 30 minuti vetrini pre-incubazione alcalina)

Lavaggio in CaCl_2 (2%) 3'– 5'

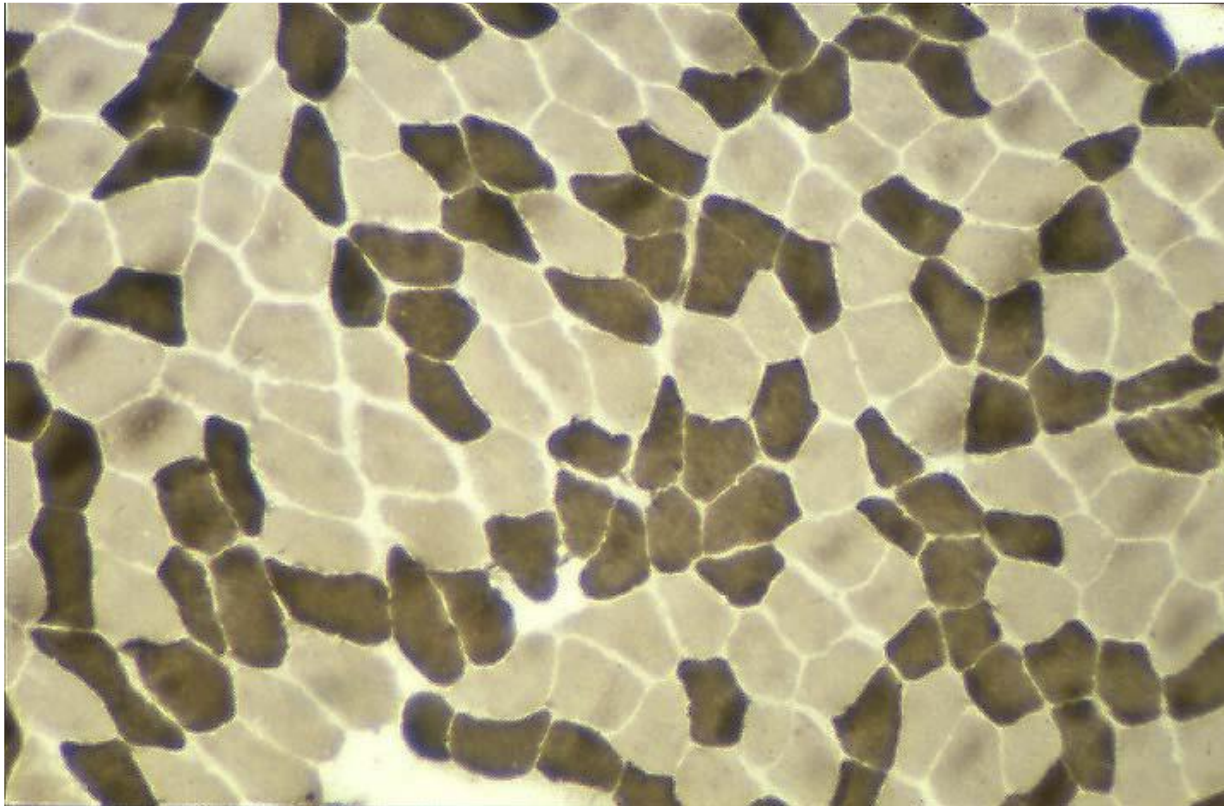
CoCl_2 2% 2'

H_2O distillata

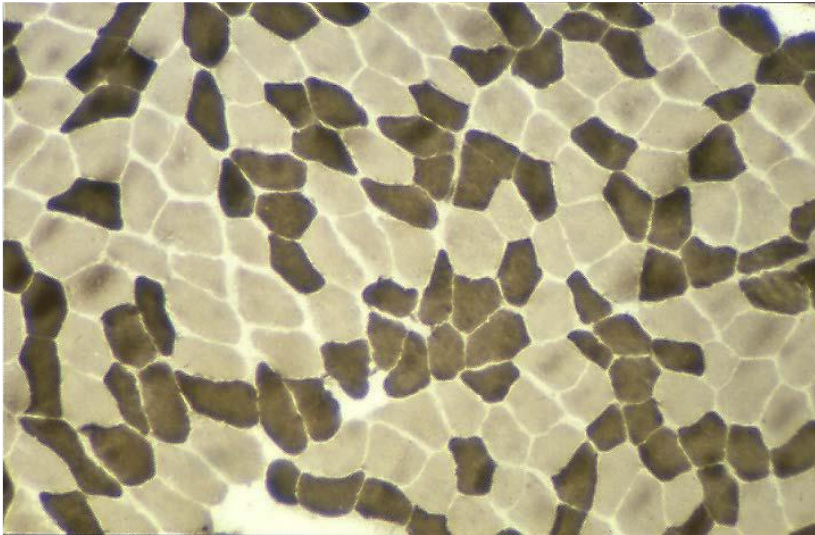
$(\text{NH}_4)_2\text{S}$ 1% 30''

H_2O di fonte

Disidratazione e montaggio

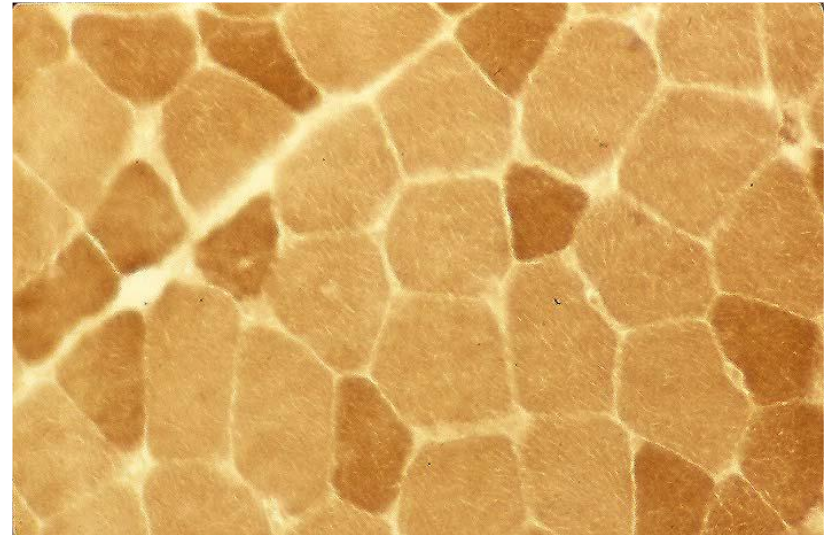


Reazione enzimoistochimica per l'ATPasi a pH 9.6. Le fibre di tipo I appaiono chiare, mentre le fibre di tipo II sono colorate in nero per la elevata quantità di idrolasi presente nel sarcoplasma. 80X.



ATPasi a pH 9.6 di un muscolo normale.

Le fibre di tipo II sono colorate in nero per la elevata quantità di idrolasi presente nel sarcoplasma. 80X.



l'ATPasi a pH 9.6 di un muscolo patologico.

Atrofia delle fibre di tipo II nelle fasi precoci della paraplegia. 150X

Le reazioni istoenzimatiche

ell'attività adenosintrifosfatasica ATPasi pH 4,5 acida

si differenziano tre tipi di fibre:
le fibre di tipo I,
di tipo IIA e di tipo IIB.

*Quest'ultimo sistema di
caratterizzazione tipologica
delle fibre viene utilizzato negli
studi sulla plasticità muscolare
e per evidenziare aspetti di
transizione nei fenomeni di
trasformazione dei tipi di fibra.*

METODO DELL'ATPasi

1) pre-incubazione acida (pH 4.4, 4.55, 4.6) 5 min. in
tampone 0.2M Na acetato.

Lavaggio in H₂O distillata 30'' X 2

Lavaggio in tampone Ca/Barb/acet pH 9.4 30'' X 2

Incubazione in tampone Ca/Barb/acet + 1.5 mg
ATP/ml pH 9.4 (60 minuti vetrini pre-incubazione acida; 30
minuti vetrini pre-incubazione alcalina)

Lavaggio in CaCl₂ (2%) 3'– 5'

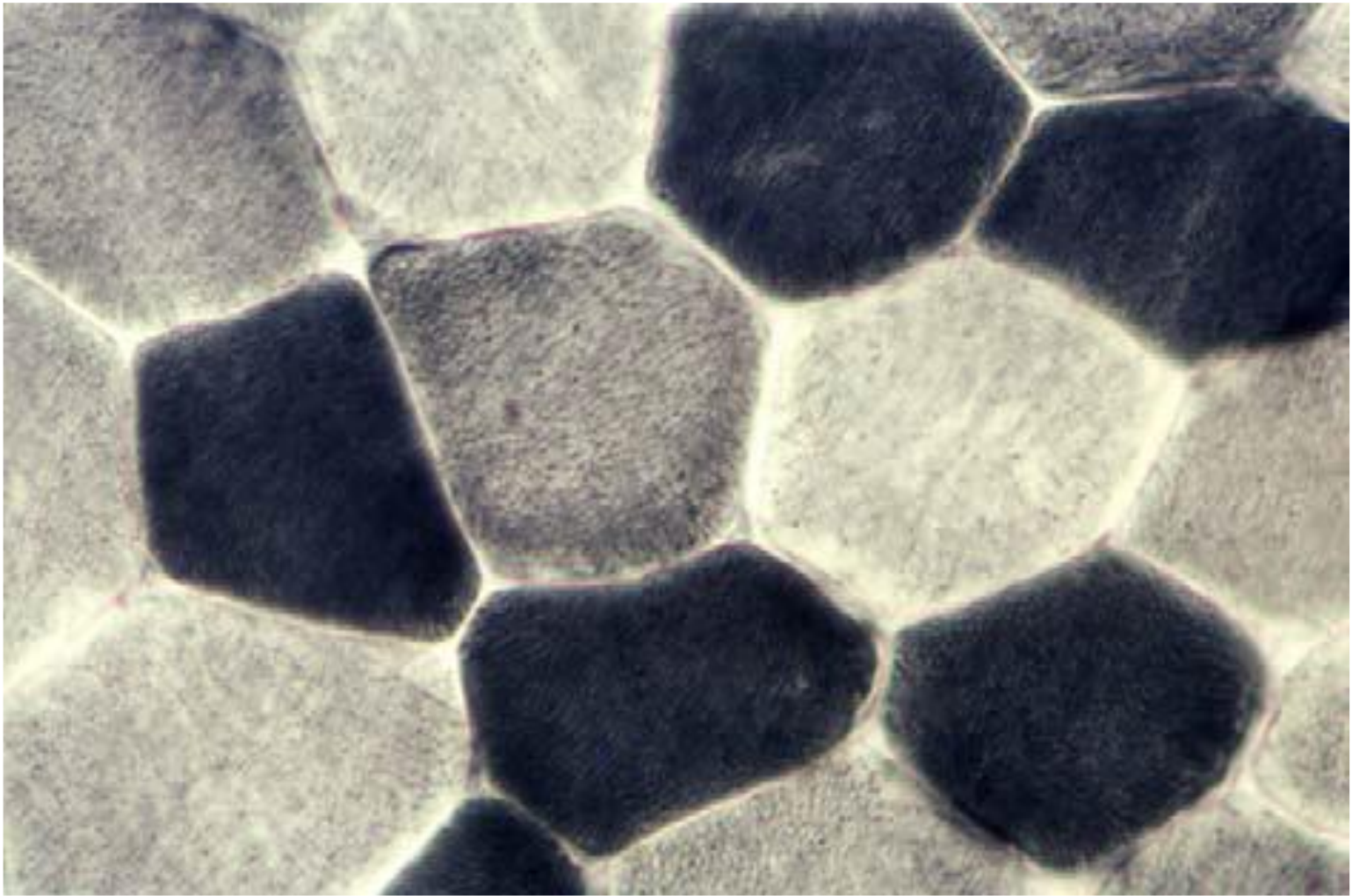
CoCl₂ 2% 2'

H₂O distillata

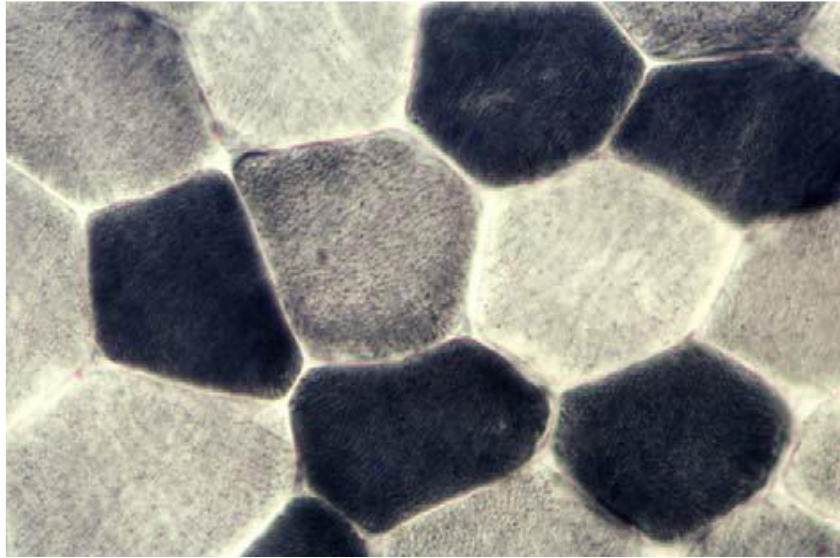
(NH₄)₂S 1% 30''

H₂O di fonte

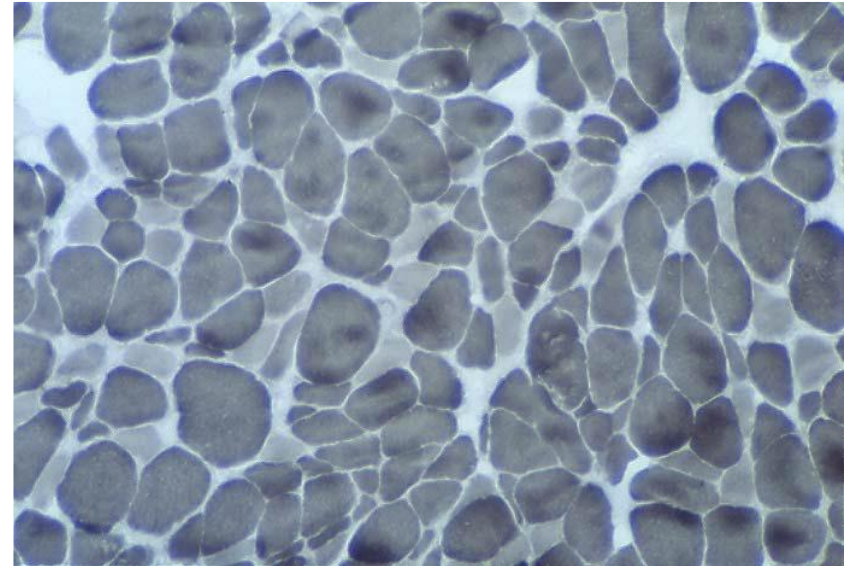
Disidratazione e montaggio



La reazione enzimoistochimica per l'ATPasi acida a pH 4,7 evidenzia tre tipi di fibre. Le fibre di tipo I chiare, le fibre di tipo IIA con colorazione intermedia e le fibre di tipo IIB molto scure. 200X.



l'ATPasi acida a pH 4.7 di un muscolo normale.



ATPasi, acida a pH 4.7 di un muscolo patologico.

Predominanza numerica delle fibre di tipo IIB nelle fasi avanzate della paraplegia. 10X.

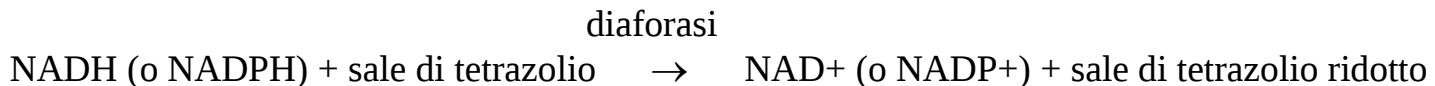
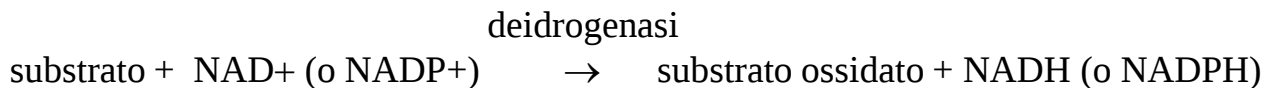
Le reazioni istoenzimatiche

le reazioni per le attività enzimatiche legate alla funzione dei mitocondri quali la NADH-tetrazolio reduttasi

NAD e NADP diaforasi

Sono enzimi che catalizzano il trasporto dell'idrogeno dal NAD e NADP ridotti ad un altro substrato accettore di idrogeno. Le reazioni istochimiche atte ad evidenziare questi enzimi sfruttano questo principio, utilizzando come accettore di idrogeno un ***sale di tetrazolio*** che passando allo stato ridotto diviene colorato ed insolubile.

Schematicamente il processo è il seguente:



METODO AL NITRO BT

Sezioni di 12 μm vengono tagliate al criostato. Dopo aver lavato le sezioni in H_2O distillata si incuberanno per 30 minuti in:

- NADH	28 mg
- H_2O dist.	8,4 cc
- t Na fosfato 0,1 M pH 7,2-7,4	5,6 cc
- NBT 0,1% (1 mg/ml	21 cc

Dopo un lavaggio veloce in H_2O distillata si fisserà per 5-10 minuti in formalina salata al 10%, H_2O di fonte, H_2O distillata, montare in acquamount.

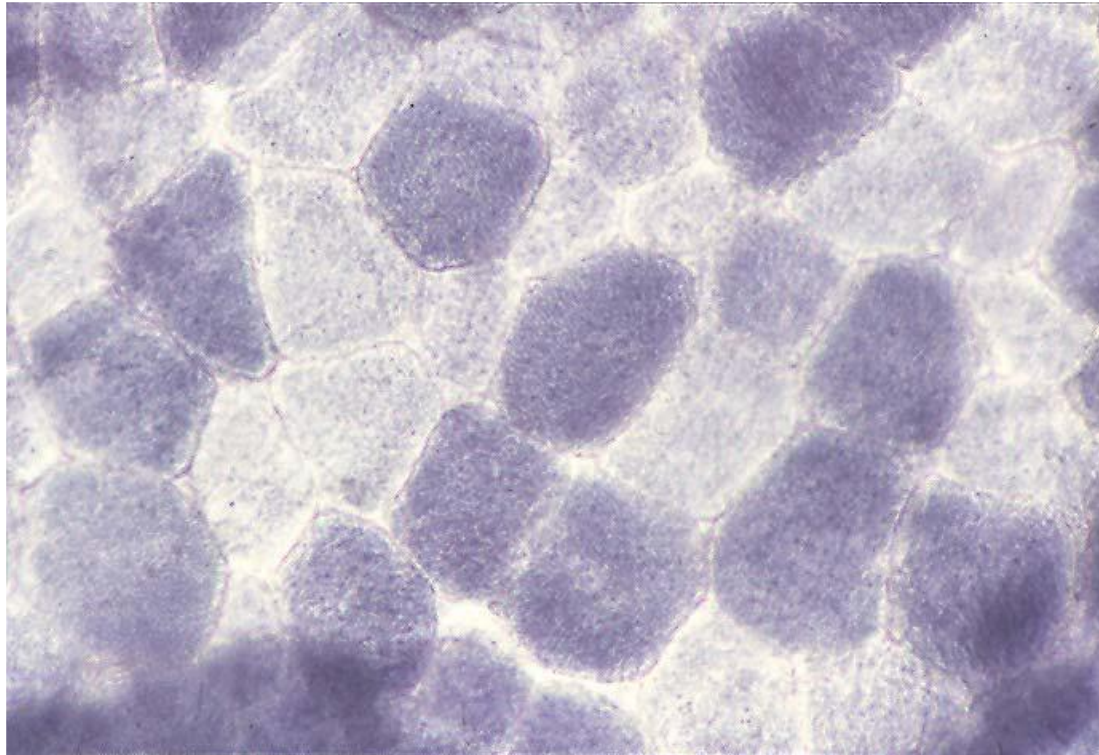
reazioni per le attività enzimatiche legate alla funzione dei mitocondri quali la NADH-tetrazolio reduttasi

colorano di scuro le fibre di tipo I, che contengono un elevato numero di mitocondri, e colorano in modo tenue le fibre di tipo II, che ne contengono un numero ridotto o assai ridotto

Le reazioni istoenzimatiche

reazioni per le attività enzimatiche legate alla funzione dei mitocondri quali la NADH-tetrazolio reduttasi

METODO AL NITRO BT



Reazione per NADP-diaforasi. Le fibre di tipo I appaiono scure per la prevalenza di attività enzimatiche mitocondriali, mentre le fibre di tipo II appaiono chiare per un minor contenuto enzimatico. 150X.

Caratteristiche tipologiche delle fibre muscolari

Tipo	Colore	Contrazione	Resistenza	Metabolismo	Enzimi ossidativi	Enzimi glicolitici
I	Rosso	Lenta	Elevata	Aerobico	Elevati	Scarsi
II	Bianco	Rapida	Scarsa	Anaerobico	Scarsi	Elevati

Fibre di tipo I

Le fibre di tipo I sono anche dette fibre rosse in quanto sono irrorate da un elevato numero di capillari sanguigni. Nel loro insieme costituiscono, specie negli animali, i muscoli che macroscopicamente si presentano rossi, molto ricchi del pigmento detto mioglobina. Queste fibre posseggono numerosi mitocondri ed un quantitativo elevato di glicogeno, da cui i mitocondri attingono l'energia per la contrazione per via prevalentemente aerobica. In queste fibre gli enzimi mitocondriali del ciclo di Krebs e le proteine della catena respiratoria (di trasporto degli elettroni) sono presenti in quantità maggiore rispetto alle fibre di tipo II. Le fibre di tipo I sono inoltre caratterizzate da una contrazione lenta e da una elevata resistenza allo sforzo.

Fibre di tipo II

Le fibre di tipo II sono caratterizzate da una contrazione veloce, assai più breve e potente rispetto alle fibre di tipo I. Esse hanno una scarsa resistenza allo sforzo. Queste fibre producono energia per via anaerobia per l'azione di enzimi quali la glicogeno fosforilasi. Realizzano contrazioni rapide e di breve durata. Reagiscono all'allenamento diventando ipertrofiche. Questo tipo di fibre si è dimostrato particolarmente suscettibile allo scarso utilizzo, andando incontro ad atrofia nell'invecchiamento, ma non necessariamente in seguito a denervazione.

Plasticità del muscolo scheletrico

Una caratteristica essenziale del tessuto muscolare è la sua plasticità, che permette una trasformazione di un tipo di fibra nel tipo opposto, malgrado la stretta dipendenza della fibra dal motoneurone. Questa situazione si realizza in alcune situazioni patologiche ed in seguito a stimoli esterni quali l'allenamento intensivo o la stimolazione elettrica funzionale. I muscoli sottoposti ad allenamento a sforzi progressivi e lunghi nel tempo, ad esempio quelli richiesti da un maratoneta, si modificano nella loro tipologia attraverso una trasformazione delle fibre di tipo II esauribili e veloci, in fibre di tipo I a contrazione lenta e con alta resistenza allo sforzo. Al contrario un allenamento prolungato nel tempo, a sforzi rapidi ma di breve durata, quali quelli richiesti da un velocista, trasforma le fibre di tipo I resistenti e lente, in fibre di tipo II a contrazione veloce ma rapidamente esauribili, o meglio ipertrofizza questi tipi di fibre. Ne consegue una ipertrofia muscolare con evidente predominanza tipologica di un tipo di fibra nei muscoli allenati. L'assetto tipologico del muscolo si ripristina, tornando a quello del muscolo normale, dopo interruzione prolungata dell'allenamento atletico, con il ritorno cioè ad una vita sedentaria.