

# Metodi di preparazione per l'osservazione

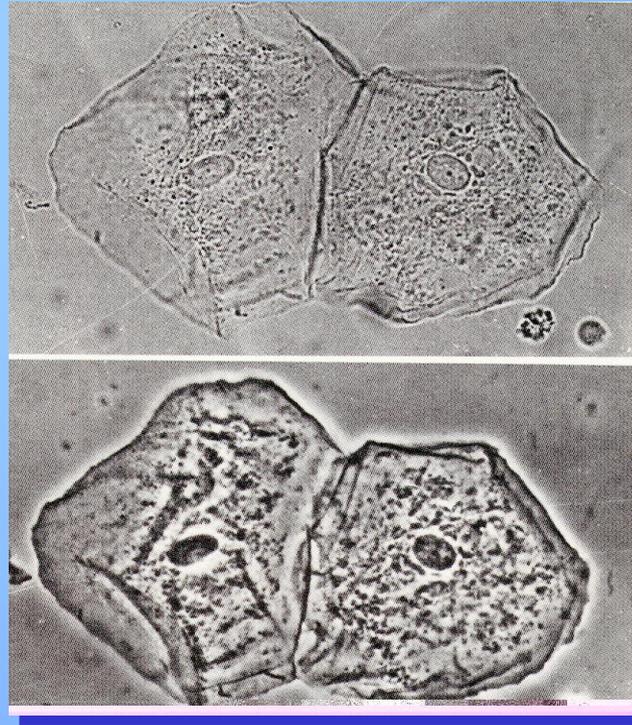
1. Preparazione a fresco
2. Preparazione di espianti di organi  
o tessuti in vivo
3. Colorazioni vitali
4. Preparazione mediante fissazione  
e colorazione

# Metodi di preparazione per l'osservazione

5. Tecniche citochimiche ed istochimiche
6. Tecniche citologiche ed istologiche
7. Tecniche di immunoistochimica
8. Tecniche immunocitochimiche
9. Tecniche di microiniezione cellulare

# Metodi di preparazione per l'osservazione microscopica:

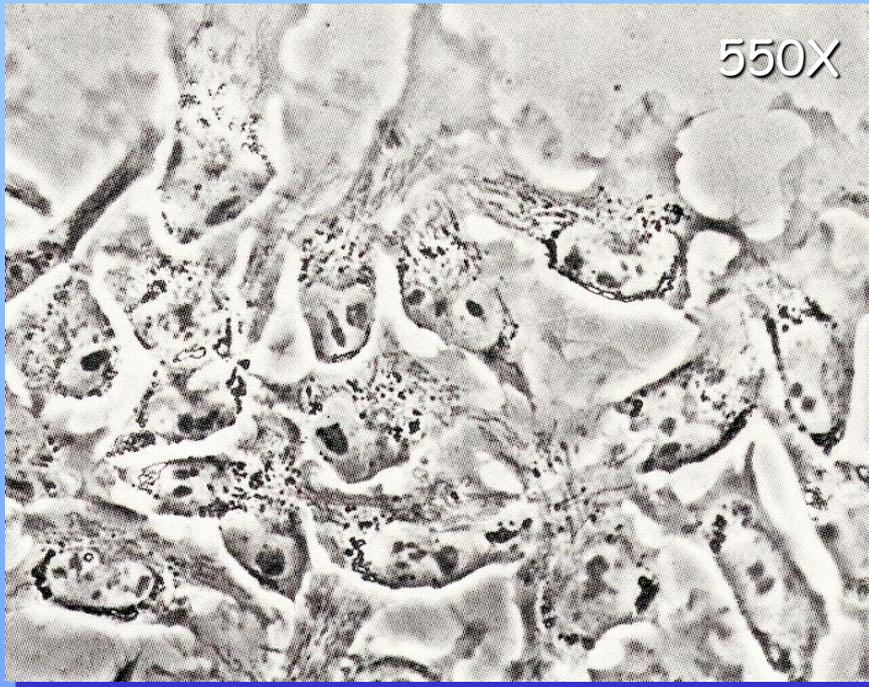
## Preparazione a fresco



Lo studio morfologico ed in parte strutturale di cellule isolate o di frammenti di tessuto è possibile per tempi brevi ponendo il materiale in soluzioni isotoniche ed osservandolo con un microscopio in **campo chiaro** o meglio **in contrasto di fase**.

# Metodi di preparazione per l'osservazione microscopica:

## preparazione a fresco

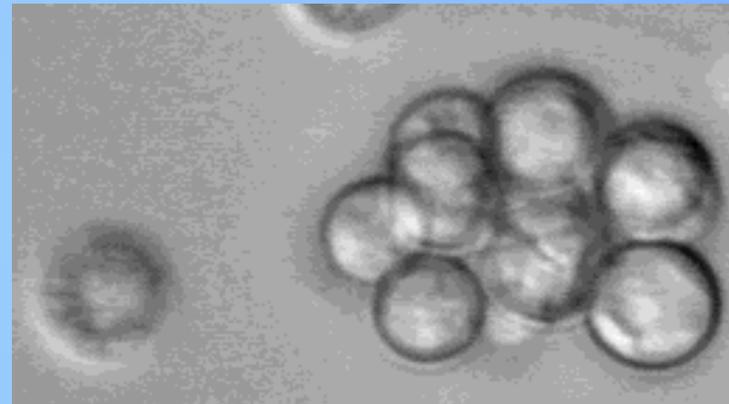
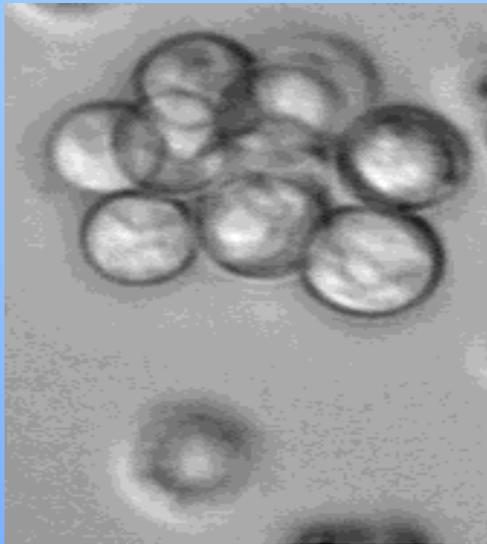


Periferia della zona di migrazione di una coltura di cuore di embrione di pollo di 5 gg. Fotografia a contrasto di fase di cellule viventi.

L'osservazione a fresco è utile per osservare strisci di sangue, cellule epiteliali delle mucose o tessuti facilmente dissociabili.

# Metodi di preparazione per l'osservazione microscopica:

preparazione di espianti di organi in vivo



Cellule isolate, frammenti di tessuti ed abbozzi di organi possono essere mantenuti in vita in un ambiente diverso dall'organismo di origine e mantenere tutte le loro prerogative.

Si rimanda al corso di cellulocultura.

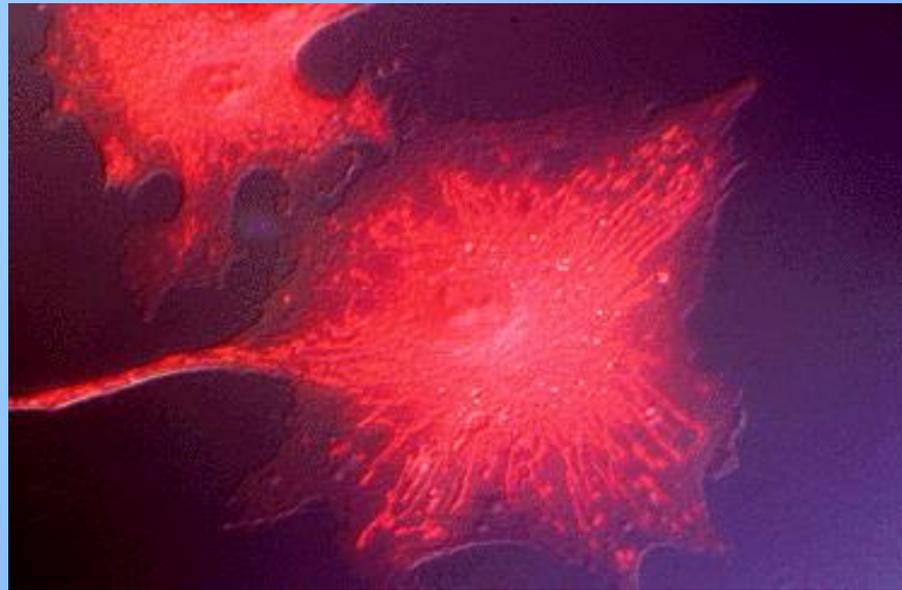
# Metodi di preparazione per l'osservazione microscopica: Colorazioni vitali



La capacità delle cellule viventi di assumere attivamente composti dall'ambiente extracellulare si estende ad una svariata serie di molecole fra cui i **coloranti vitali**. Essi possono essere iniettati per via parenterale nell'animale vivente oppure possono essere assunti dalle cellule direttamente dal medium di coltura.

# Metodi di preparazione per l'osservazione microscopica:

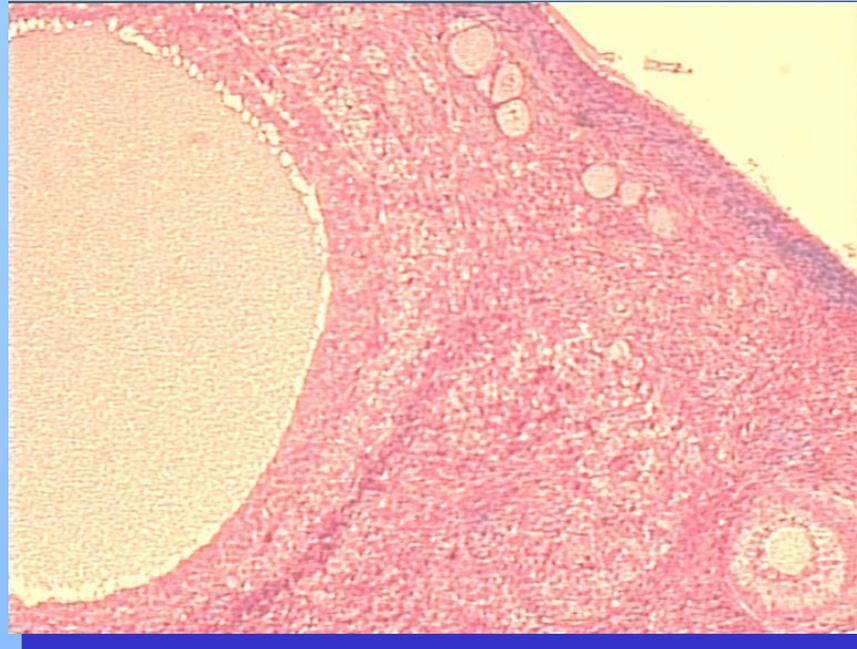
## Colorazioni vitali



*Mitochondria of bovine pulmonary artery endothelial cells (BPAEC) labeled with MitoTracker Red CMXRos (M-7512), aldehyde-fixed and observed using differential interference contrast (DIC) and Texas Red epifluorescence optical filters sequentially in a Nikon Eclipse E800 microscope.*

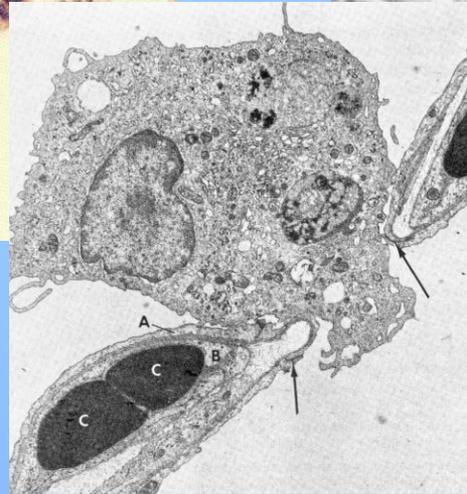
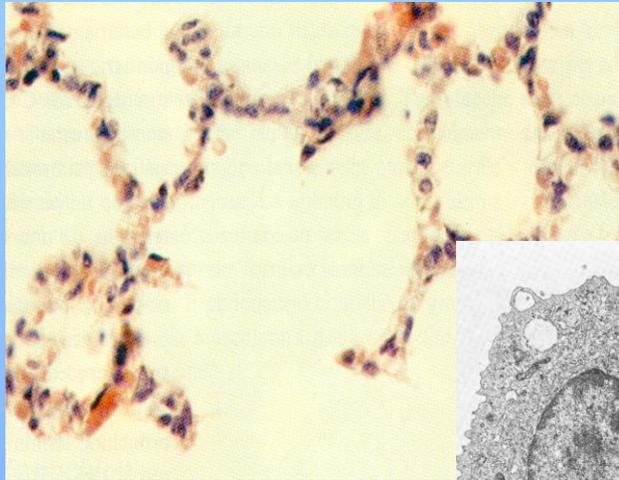
L'accumulo del colorante permetterà il riconoscimento delle strutture che lo hanno legato selettivamente.

# Metodi di preparazione per l'osservazione microscopica: preparazione mediante fissazione e colorazione



Per un esame dei tessuti è necessario allestire preparati di cellule o tessuti mediante il **prelievo**, la **fissazione**, il **sezionamento** in fettine di minimo spessore e la **colorazione** selettiva che permette un aumento di contrasto delle diverse strutture cellulari.

# Metodi di preparazione per l'osservazione microscopica: preparazione mediante fissazione e colorazione



Le singole cellule o sezioni istologiche possono essere osservate al termine della preparazione al microscopio ottico oppure, se preparate con diverse manualità ma sostanzialmente sovrapponibili, al microscopio elettronico.

# PREPARATI INCLUSI: il prelievo bioptico o autoptico o di campioni vegetali



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.

# PREPARATI INCLUSI: la fissazione

## La fissazione deve:

- 1) Garantire il blocco istantaneo delle attività vitali e dei sistemi enzimatici e litici della cellula
- 2) Rendere insolubili la massima parte delle componenti cellulari evitandone l'asportazione con solventi nelle tappe successive di preparazione
- 3) Essere più rapida possibile

# PREPARATI INCLUSI: la fissazione

## La fissazione non deve:

- 1) Avere una durata tale da estrarre componenti citoplasmatiche.
- 2) Essere eseguita con composti a concentrazioni tali da estrarre componenti citoplasmatiche
- 3) Interferire con l'assunzione di coloranti da parte del tessuto.

# PREPARATI INCLUSI: la scelta del fissativo

Dipende da diversi fattori fra cui:

1. Dimensioni del campione
2. Caratteristiche di risoluzione dello strumento di osservazione
3. Tipi di indagine da condurre (istologica, immunocitochimica)

# PREPARATI INCLUSI: la fissazione

- Fisica

- Chimica

Si preserva il protoplasma dalle alterazioni  
conseguenti la morte cellulare

# Fissazione fisica



È rappresentata dal congelamento rapido per immersione in azoto liquido ( $-196^{\circ}$ ) oppure in miscele che determinando la rapida sottrazione di calore impediscono la formazione di cristalli di ghiaccio da parte dei liquidi intracellulari. È opportuno trattare il campione con opportuni **crioprotettori** prima del congelamento.

# Fissazione fisica



In alcuni casi si può operare la fissazione riscaldando alcuni preparati come gli strisci.

# Fissazione chimica



La fissazione chimica prevede l'utilizzo di:

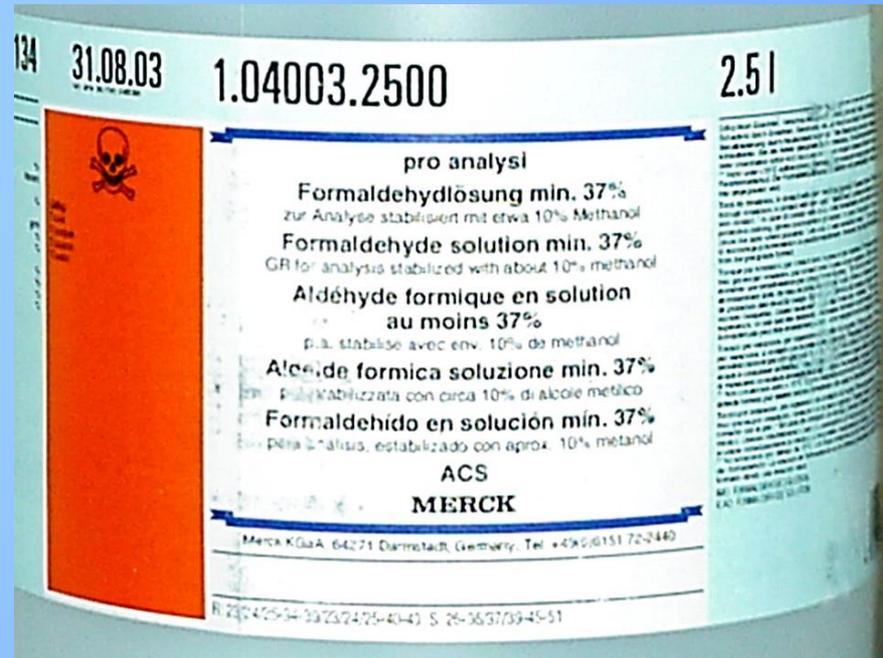
- A) fissativi semplici
- B) Miscele fissative

# Fissazione chimica



Fra i fissativi semplici il più impiegato è l'etanolo, utilizzato principalmente come disidratante; poiché porta ad una precipitazione di proteine che in qualche modo denatura può compromettere la reattività immunoistochimica.

# Fissazione chimica



Le aldeidi, fra cui 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%.

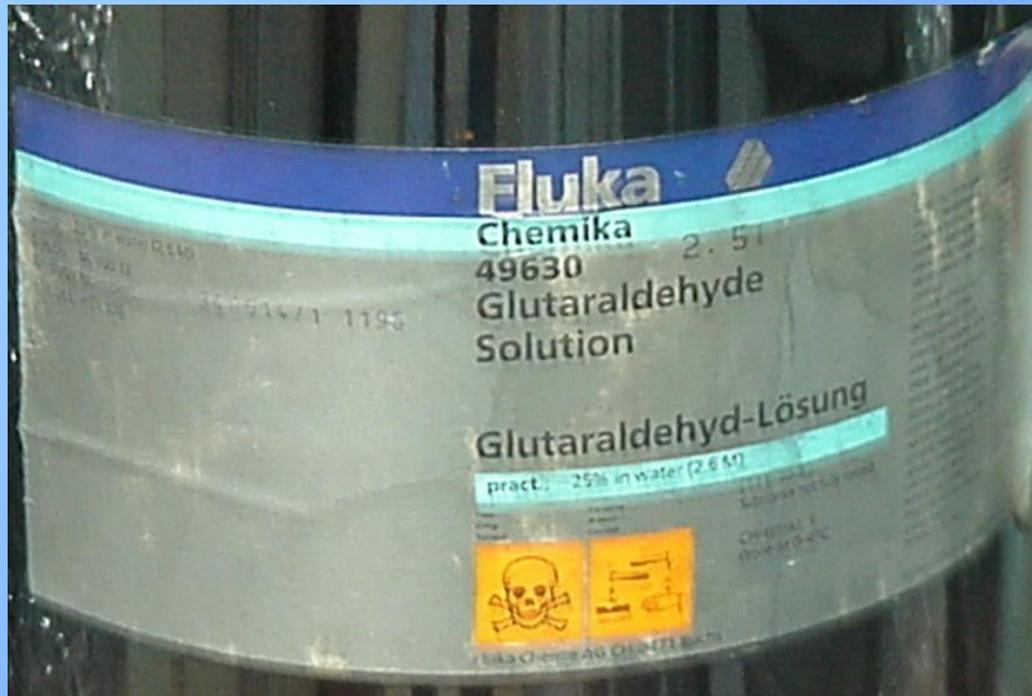
Ha un elevato grado di penetrazione nei tessuti, non dissolve i lipidi e non provoca indurimento eccessivo dei tessuti

# Fissazione chimica



La **formalina salata** è ottenuta tamponando alla neutralità formalina 10% con NaCl 1%. Ha un elevato grado di penetrazione nei tessuti, non dissolve i lipidi e non provoca indurimento eccessivo dei tessuti.

# Fissazione chimica



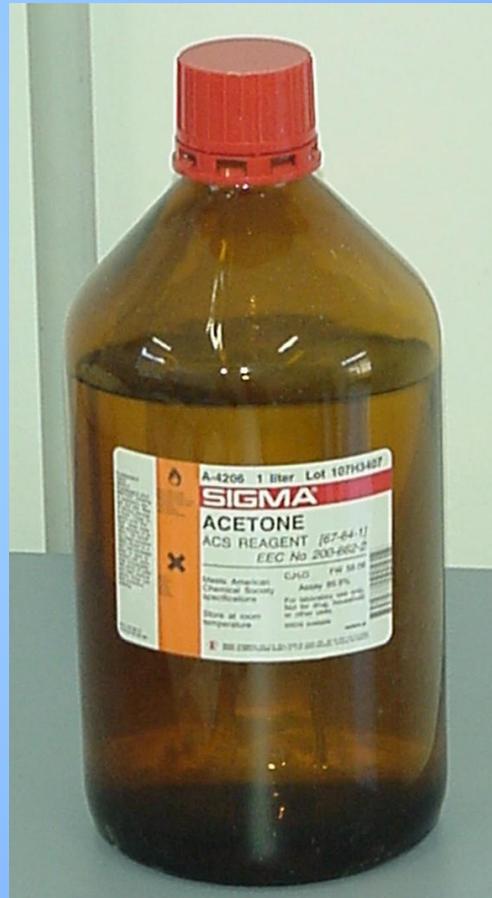
Fra le aldeidi la **glutaraldeide** ha una minore capacità di penetrazione ma reticola meglio le proteine formando così legami più stabili. Da dei cross legami resistenti. Necessita di campioni di piccole dimensioni e di un uso combinato con la formaldeide.

# Fissazione chimica



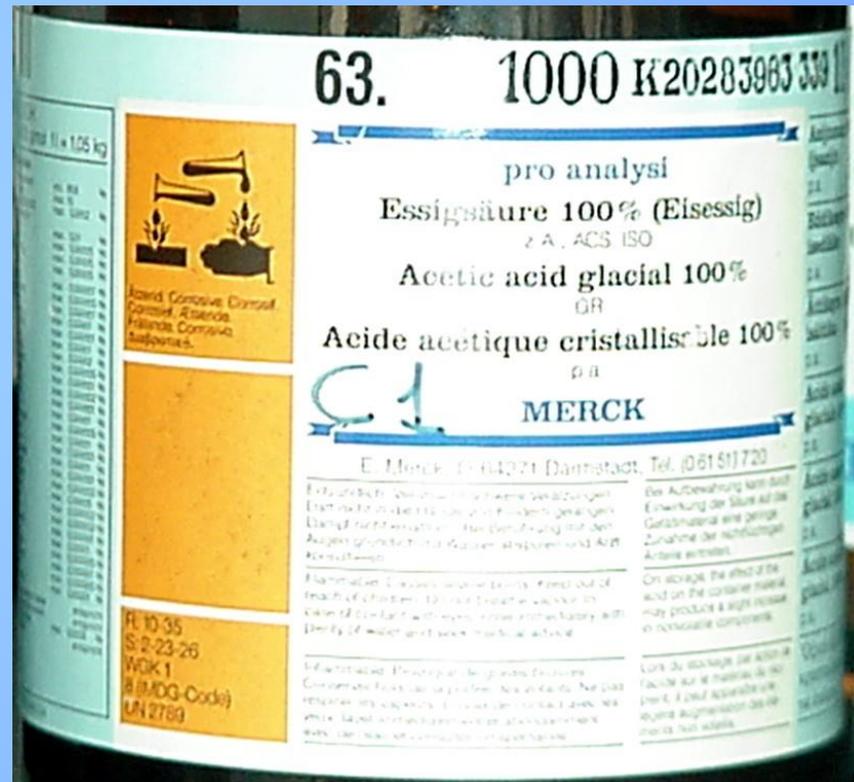
Il **tetrossido di osmio**, impropriamente detto acido osmico, è un ottimo fissativo per i lipidi mentre non reagisce con gli acidi nucleici e con i glucidi. Ha costi elevati ma è il miglior fissativo per indagini ultrastrutturali. È volatile.

# Fissazione chimica



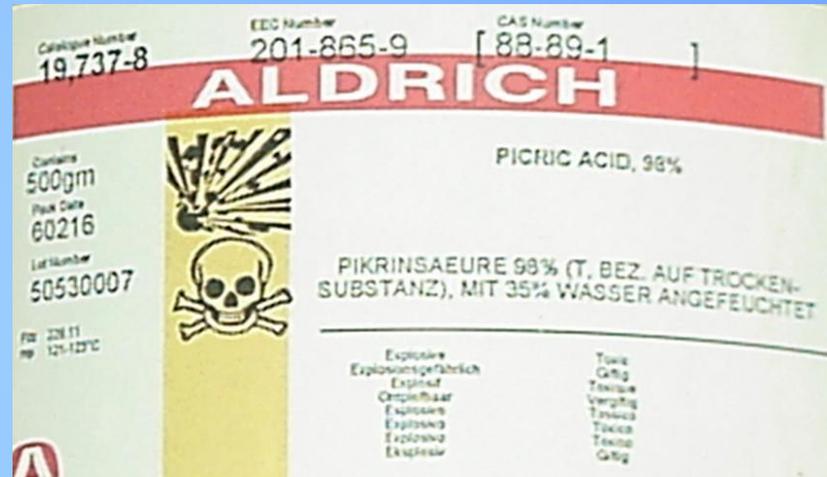
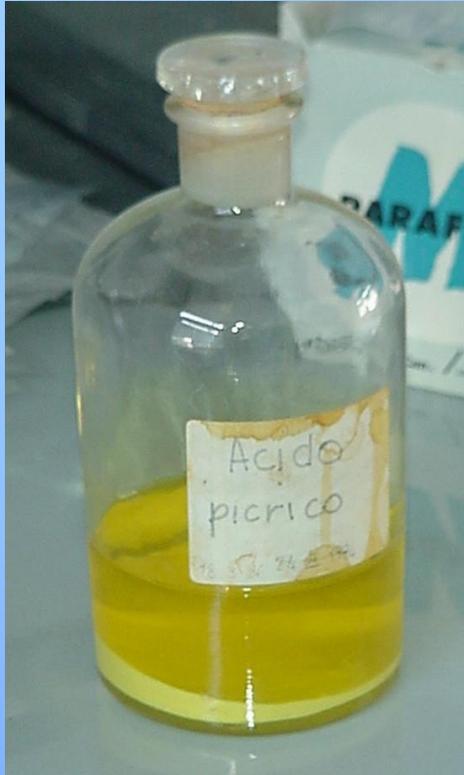
L'**acetone** è un ottimo fissativo la cui blanda alterazione dei campioni ne consiglia l'impiego nella fissazione di cellule in sospensione, come i gameti.

# Fissazione chimica



L'acido acetico utilizzato in diluizioni 0,3%-5% ha una buona penetrazione, non solubilizza i lipidi e determina la precipitazione delle nucleoproteine; altera un poco i mitocondri. Un altro acido, il tricloroacetico, in soluzioni acquose al 3% 10% è simile all'acetico ma ha forti capacità decalcificanti.

# Fissazione chimica



L'acido picrico in forma cristallina giallo oro ha un effetto di stabilizzazione delle proteine con cui forma dei picrati che parzialmente idrosolubili diventano solubili in presenza di etanolo.

# Fissazione chimica: miscele fissative



Il **liquido di Bouin** è una delle miscele fissative più utilizzate per la sua elevatissima capacità di penetrazione anche in pezzi voluminosi. 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 sovralfissa e si applica per 12-24 ore passando poi i campioni in etanolo 50%.

# PREPARATI INCLUSI: il lavaggio e la disidratazione

1. Lavaggio



2. Disidratazione: **agenti anidri**  $\xrightarrow{\text{sostituiscono}}$   $\text{H}_2\text{O}$

sono sostituiti

solvente del mezzo di inclusione

# PREPARATI INCLUSI: il lavaggio



Dopo la fissazione è utile eliminare attraverso il lavaggio eccessi di fissativi che potrebbero interferire con le successive tecniche di colorazione o di indagini immunohistochimiche..

# PREPARATI INCLUSI: la disidratazione

7/11/2000  
Piccoli Pezzi

ESEMPIO PROGRAMMA DIURNO			
STAZIONE	1	ALCOOL 70°	h 0.30/0.45 ✓
"	2	" 70°	h 0.30/0.45 ✓
"	3	" 90°	h 0.15/0.30 ✓
"	4	" 90°	h 0.15/0.30 ✓
"	5	" 95°	h 0.15/0.30 ✓
"	6	" 95°	h 0.15/0.30 ✓
"	7	" 100°	h 0.15/0.30 ✓
"	8	" 100°	h 0.15/0.30 ✓
"	9	XILOLO	h 0.15/0.30 ✓
"	10	XILOLO	h 0.15/0.30 ✓
"	11	PARAFFINA	h 1.00 ✓
"	12	PARAFFINA	h 1.00 ✓

TEMPO TOTALE D'ESECUZIONE = h 5.00 / 7.30  
Per il PROGRAMMA = h 5.11 / 7.41

OGGETTI TRACCI ALLEGATI  
4 → 16/33/24  
6 → 16/33/25



Con la **disidratazione** si sfruttano **agenti anidri** capaci di sostituire l'acqua presente nei tessuti con gradualità mediante passaggi intermedi cercando di non provocarne eccessiva coartazione.

Si usano gli **alcoli metilico** o **etilico**, o l'**acetone** a concentrazioni via via crescenti sino al solvente puro e al mezzo di inclusione.

# PREPARATI INCLUSI: la chiarificazione



Dopo il lavaggio e la disidratazione (e prima dell'inclusione) è necessario **sostituire i mezzi acquosi della soluzione di disidratazione** presenti nel tessuto con il solvente del mezzo di inclusione che verrà adottato.



# PREPARATI INCLUSI: la chiarificazione

<b>rac-1-Stearoylglycerol</b>			
rac-Glycerol 1-stearate; DL- $\alpha$ -Stearin			
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$ $\text{C}_{21}\text{H}_{42}\text{O}_4$ $M_r$ 358.57			
[22610-63-5] BRN 1728685 EC No 2451211			
<b>85678</b>	<b>puriss., &gt;99.0 % (GC)</b>		
Fluka	mp..... 78–81 °C		
	Merck: 12, 9885 Beil 2, IV, 1225	250 mg	69.80
	CH-Giftkl. free	1 g	243.80
<b>3-Stearoyl-sn-glycerol</b>			
(R)-Glycerol 1-stearate; L- $\alpha$ -Stearin			
$\text{C}_{21}\text{H}_{42}\text{O}_4$ $M_r$ 358.57 [14811-92-8] BRN 1728686			
EC No 2388805			
<b>85676</b>	<b>BioChemika &gt;99.0 % (TLC)</b>		
Fluka	Merck: 12, 9885 Beil 2, III, 1024	250 mg	146.70
	F: 10 St: -18°C CH-Giftkl. free	1 g	476.20



**Stirololo:** il suo uso è previsto quando si usano resine acriliche

**Bio clear:** fa parte di numerosi nuovi chiarificanti di sintesi meno tossiche e Conformi alle norme di sicurezza.

I tempi di chiarificazione sono strettamente correlati ai tipi di inclusione.