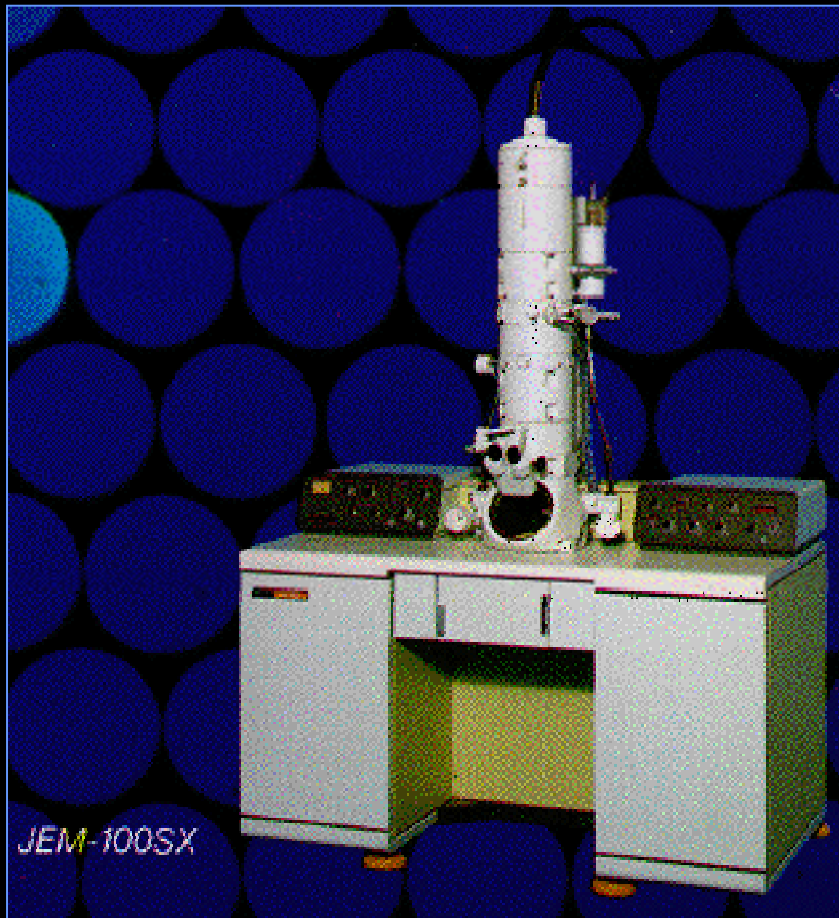
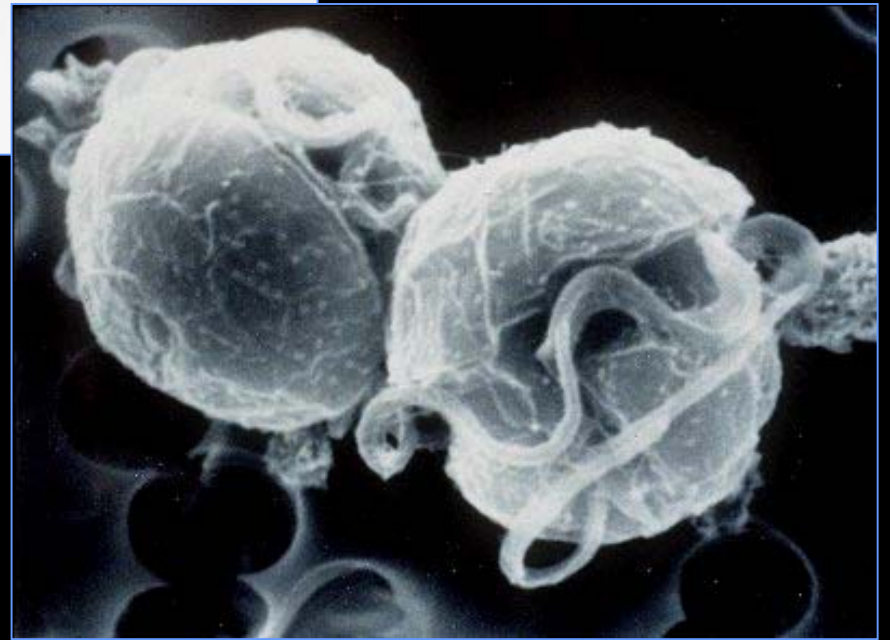
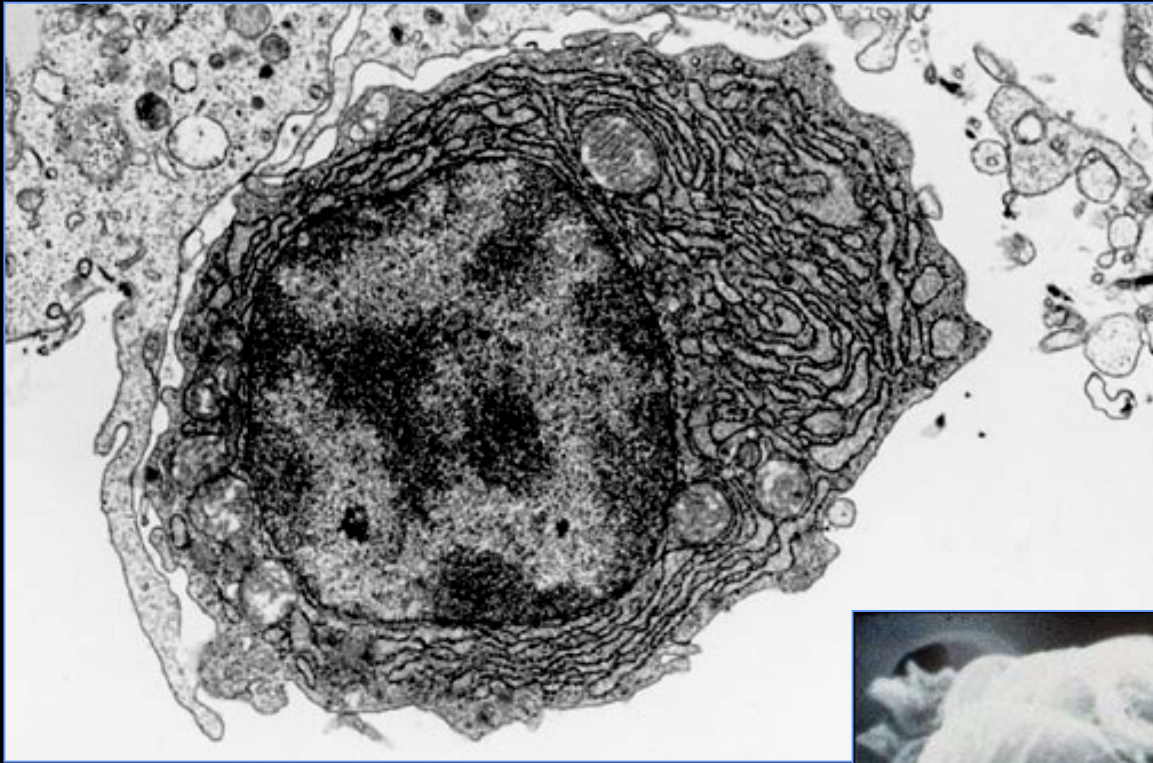


IMMUNOMICROSCOPIA  
ELETTRONICA

Tecnica per l'evidenziazione, a maggior  
risoluzione, di sostanze e/o strutture intra ed  
extracellulari in tessuti normali e patologici,  
attraverso l'utilizzo di Abs coniugati e del  
microscopio elettronico





## ***POSSIBILITÀ DI APPLICAZIONE DELL'IMMUNOCITOCHIMICA ALLA M.E.:***

- ✓ Ab coniugato con particelle di metalli pesanti ed elettrondense (*oro colloidale*)
- ✓ Ab coniugato con un enzima visualizzato successivamente dalla reazione istochimica catalizzata (*perossidasi, fosfatasi*)
- ✓ Ab reso elettrondenso tramite reazione diretta con un metallo pesante (*uranio*)

## *Markers*

Primo marker utilizzato (1961): **FERRITINA**

Svantaggi:

- formazione di aggregati (difficile penetrazione nei tessuti)
- Legame aspecifico con la resina
- Riduzione dell'attività anticorpale dopo coniugazione con antisieri

## *Perossidasi*

(anni '60)

Dimensioni piccole (4.4 nm): accettabile penetrazione nei compartimenti intracellulari

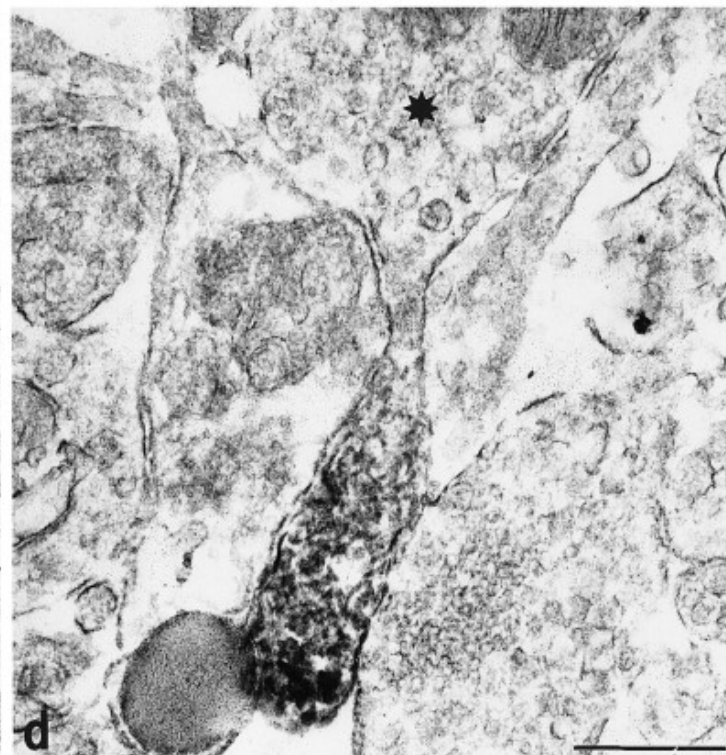
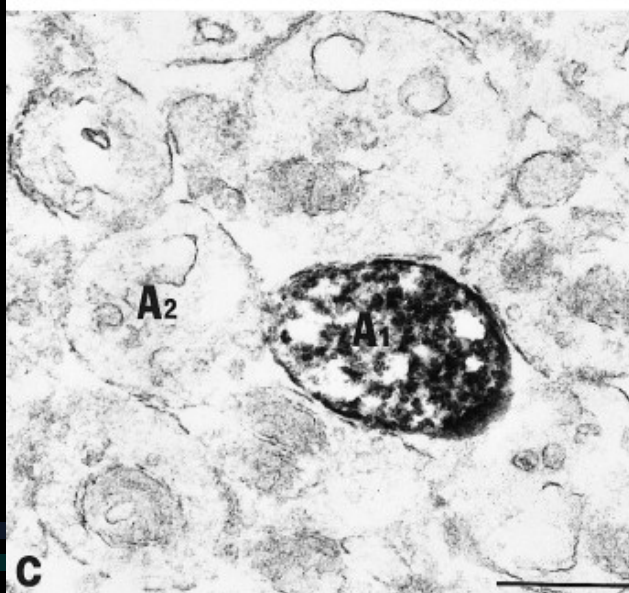
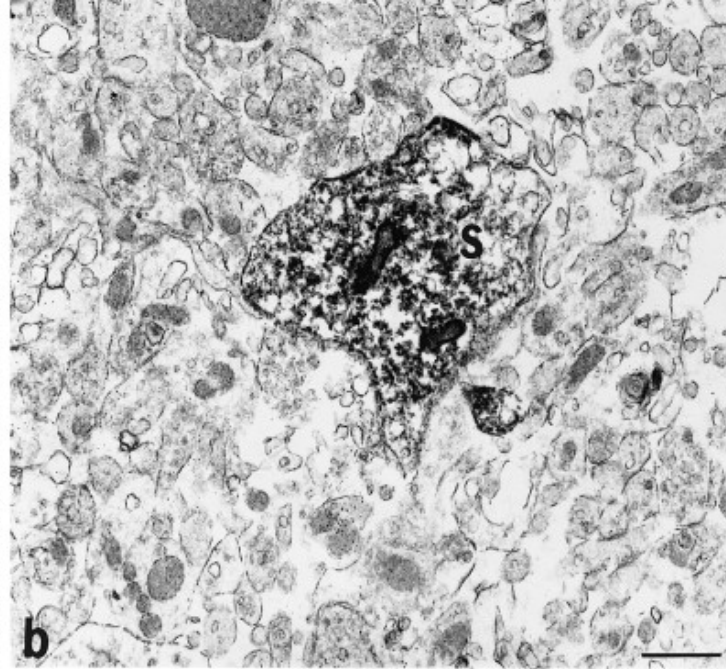
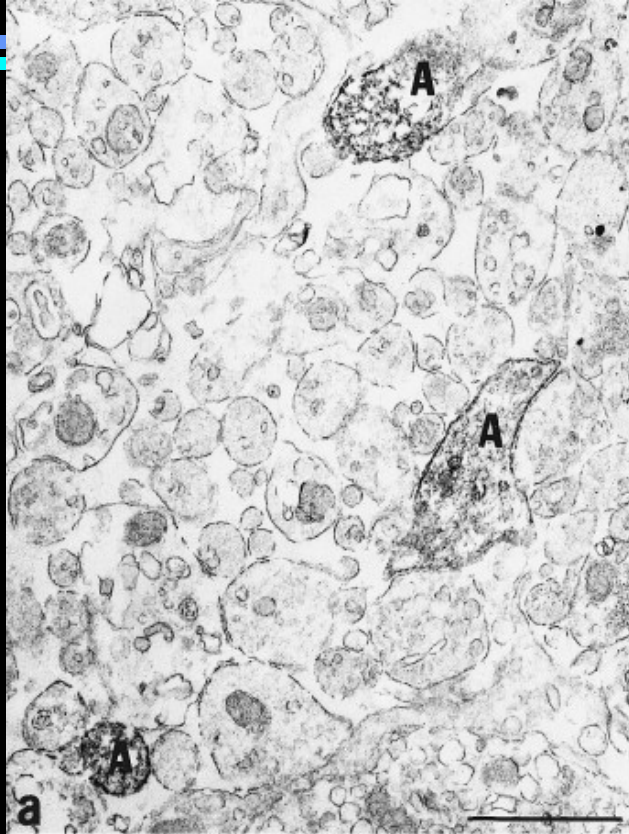
Determina ossidazione della DAB che precipita nel sito della reazione sotto forma di un polimero insolubile

Questo polimero reagisce con il tetrossido di osmio formando un chelato insolubile, fortemente opaco agli elettroni

## *Svantaggi*

- Aspetto amorfo: non esatta localizzazione dei siti antigenici
- Necessità di allontanare ogni sostanza che può interferire con l'interpretazione

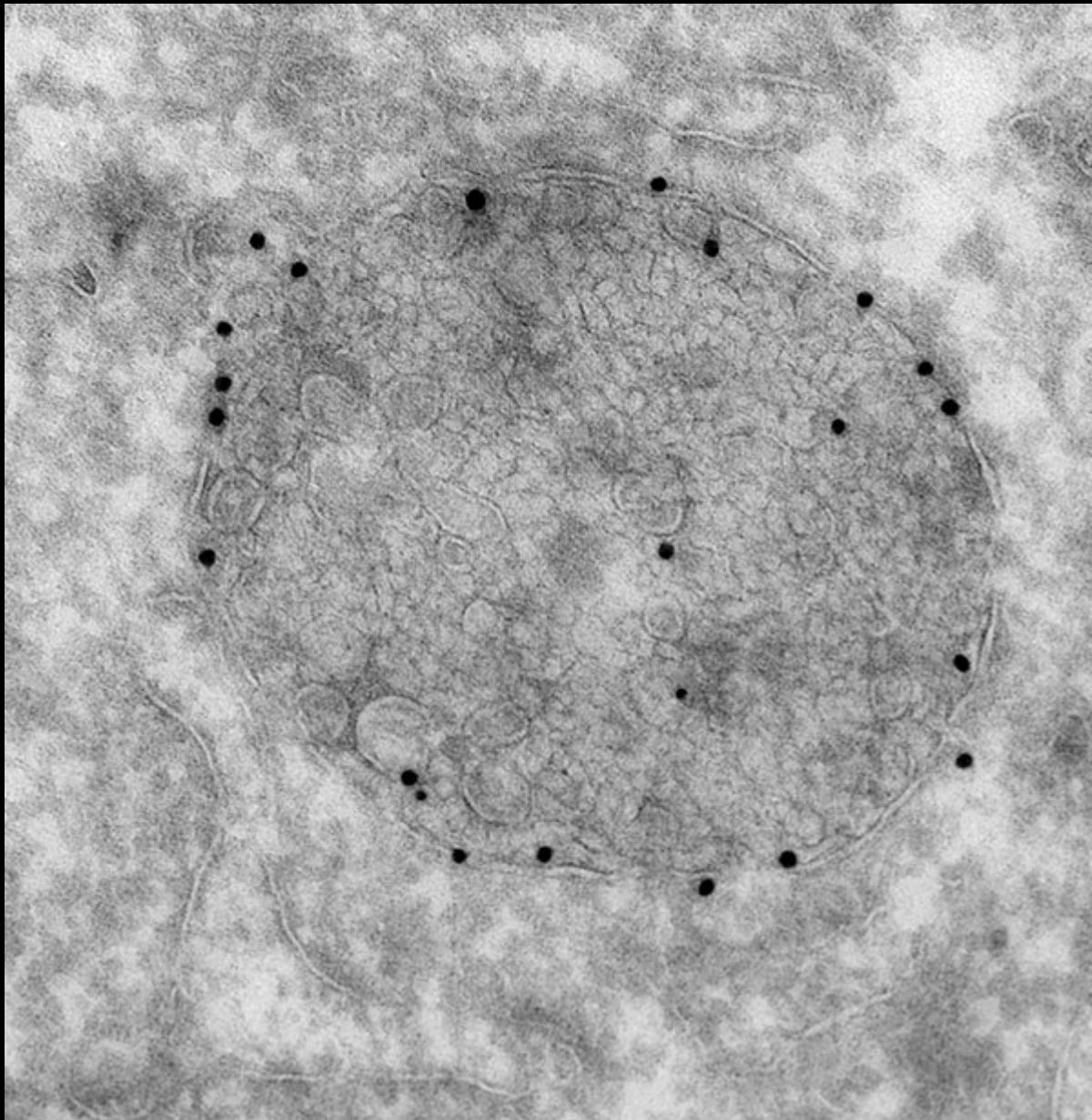


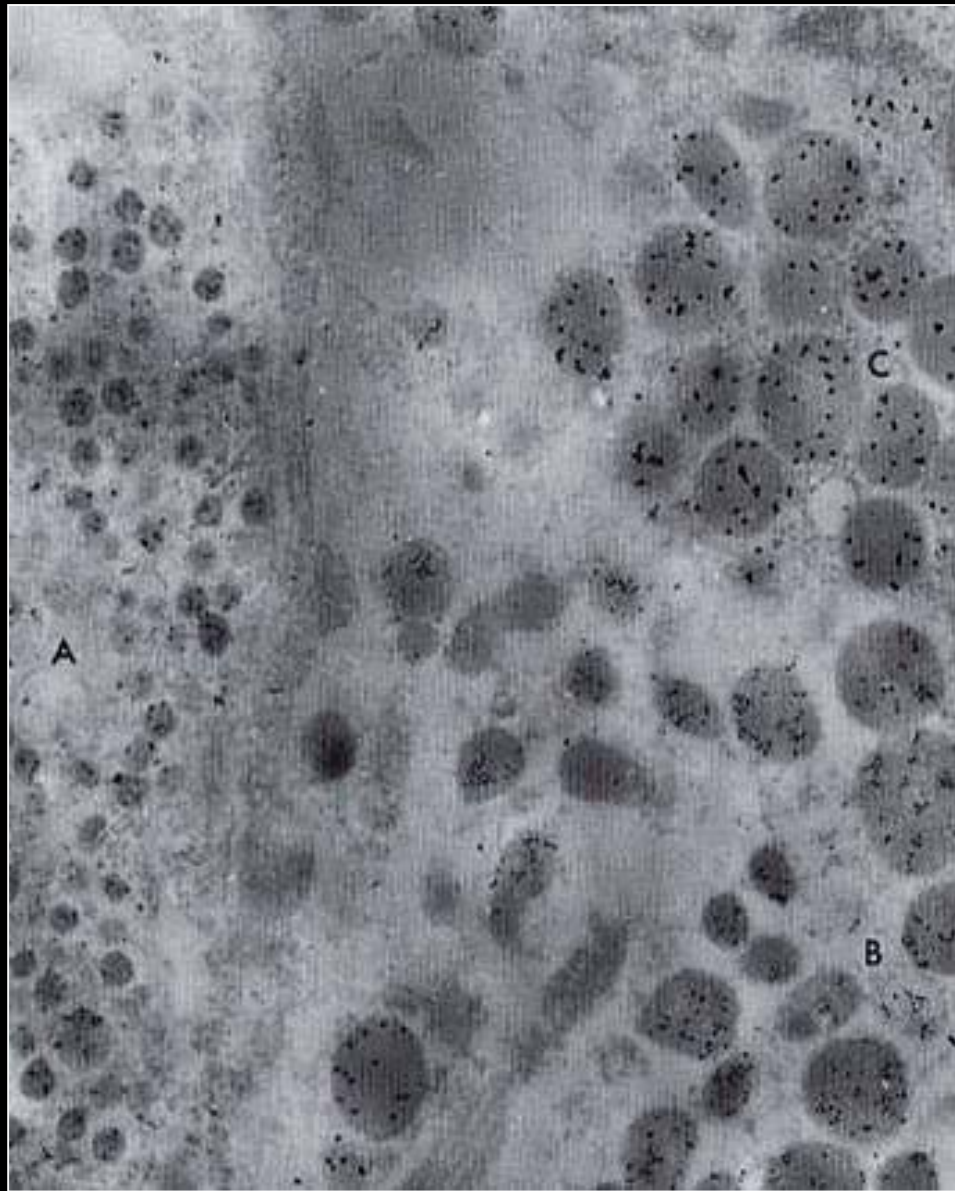


## *Oro colloidale (Au)*

(1971)

- ❖ Forma sferoidale ben definita
- ❖ Elevato peso atomico (spiccata densità elettronica)
- ❖ Assenza di citotossicità
- ❖ Stabilità chimica
- ❖ Facilità con cui si possono ottenere particelle di diametro diverso ma omogenee
- ❖ Coniugazione con molecole proteiche e macromolecole (es.: proteina A)
- ❖ Possibilità di prepararlo artigianalmente





## Preparazione “artigianale”

Riduzione controllata di una soluzione acquosa di acido tetracloroaurico

Agenti riducenti:

- citrato di sodio (15-150 nm)
- Ascorbato di sodio (8-13 nm)
- Fosforo “bianco” (3-12 nm): molto velenoso e infiammabile.



...ma...disponibilità in commercio di  
particelle di oro di dimensioni diverse già  
coniugate con anticorpi, proteina A, avidina,  
streptavidina....

# *IMMUNOMICROSCOPIA ELETTRONICA A TRASMISSIONE*

*Pre-embedding:*  
la reazione Ag-Ab  
avviene  
prima che il materiale  
sia incluso

*Post-embedding:*  
reazione  
immunologica direttamente  
su sezioni fini e/o semifini

# Post-embedding

## Fissazione

- NON usare gluteraldeide pura: riduzione potere antigenico, stabilizzazione proteine citoplasmatiche con legami crociati (no penetrazione intracellulare degli Abs)
- Paraformaldeide: preservazione antigeni più labili
- Miscele di gluteraldeide a basse concentrazioni (0.1-1 %) e paraformaldeide (2-4%)



## Inclusione

Non utilizzare le resine impiegate in ME!!!

Resine epossidiche (Epon, Araldite, resina di Spurr)

- Idrofobiche (necessaria completa disidratazione del tessuto con alterazioni dell'antigenicità)
- Reattività verso l'Ag e impedimento sterico
- Necessità di etching



### Vantaggi:

- 1) Semplicità
- 2) Facilità di sezionamento
- 3) Stabilità sotto il fascio elettronico
- 4) Morfologia ottimale

## ETCHING

Acido periodico, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,  
Permanganato di K, NaOH in alcool

*Ossidazione della superficie da  
immunomarcare mediante agenti  
ossidanti*

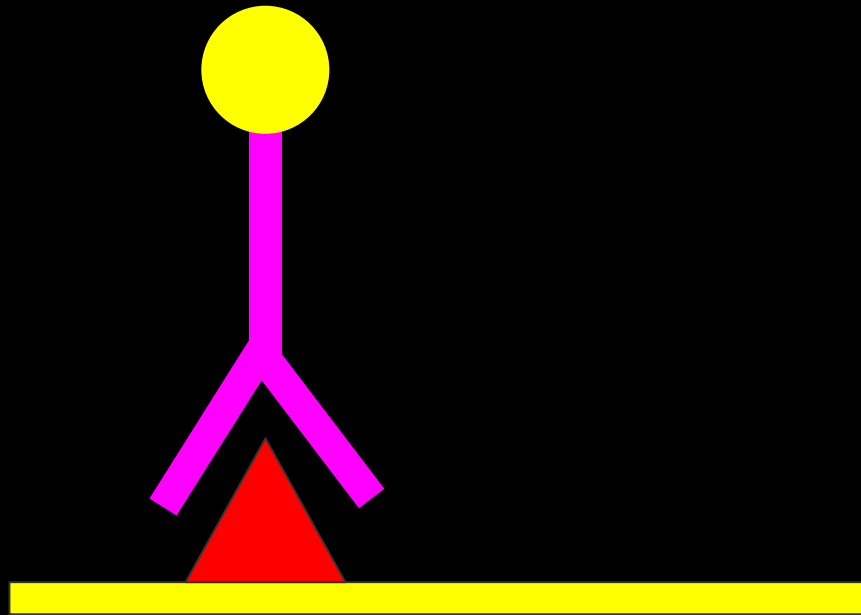
*Superficie tissutale più penetrabile agli  
immunoreagenti e relativamente  
idrofilica...MA... alterazione morfologia  
tissutale!*

Utilizzo di resine acriliche (Lowicryl, Bioacryl, LR White):

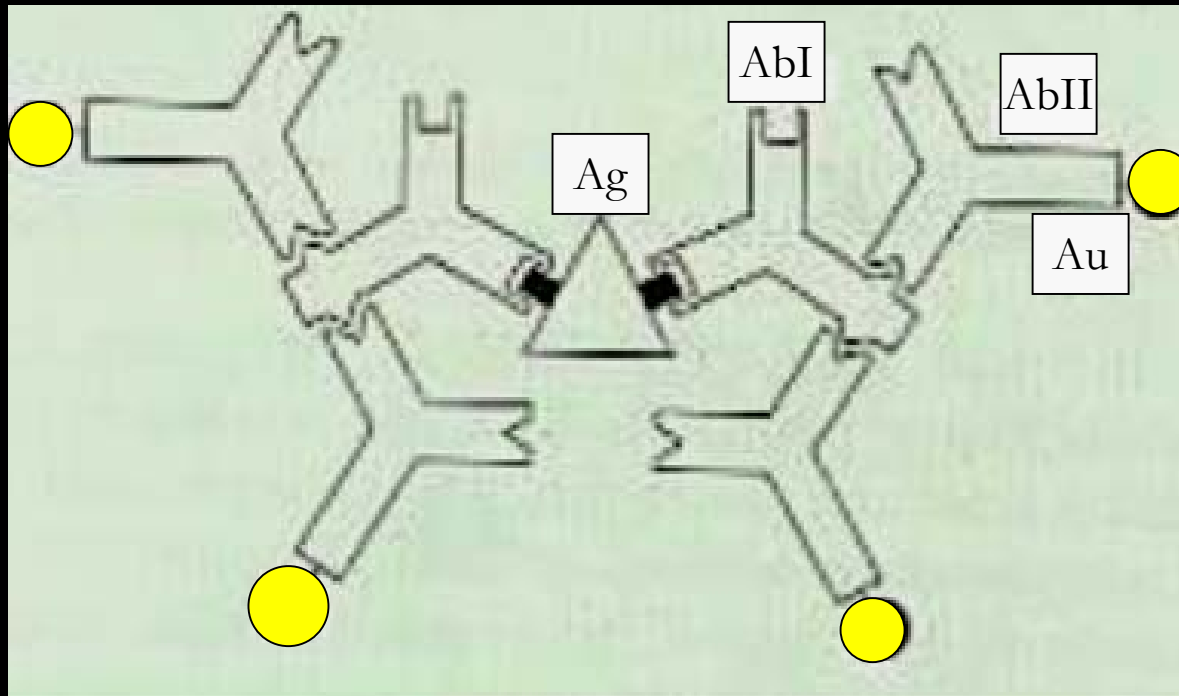
- *Svantaggi*: processazione artificiosa del materiale, accorgimenti al sezionamento, non offrono condizioni di stabilità all'azione del fascio elettronico (< nitidezza dell'immagine)
- *Vantaggi*: idrofiliche, infiltrazione e polimerizzazione a basse T°, non richiedono un pretrattamento delle sezioni

## Metodi di esecuzione dell'indagine immunocitochimica

- 1) Metodo diretto: applicazione dell'Ab coniugato con oro colloidale



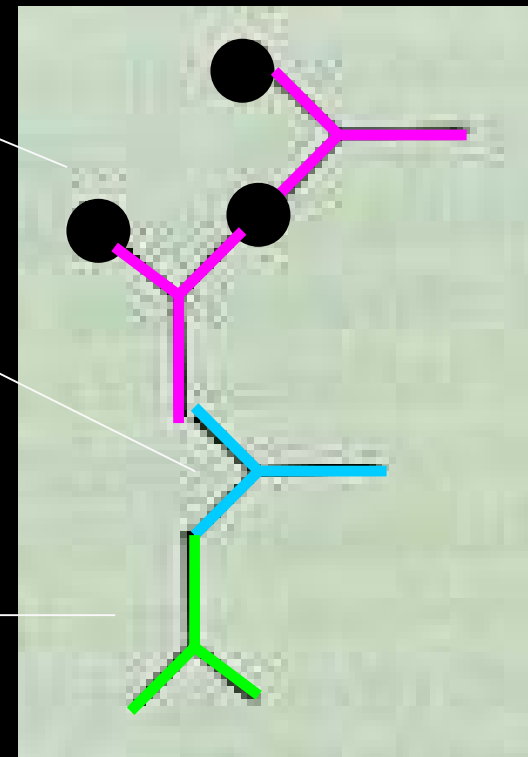
2) Metodo indiretto: anticorpo primario, antisiero secondario coniugato con oro



3) Metodi ad Abs non coniugati:  
metodo PAP, sistema avidina-biotina,  
tecnica proteina A-oro colloidale

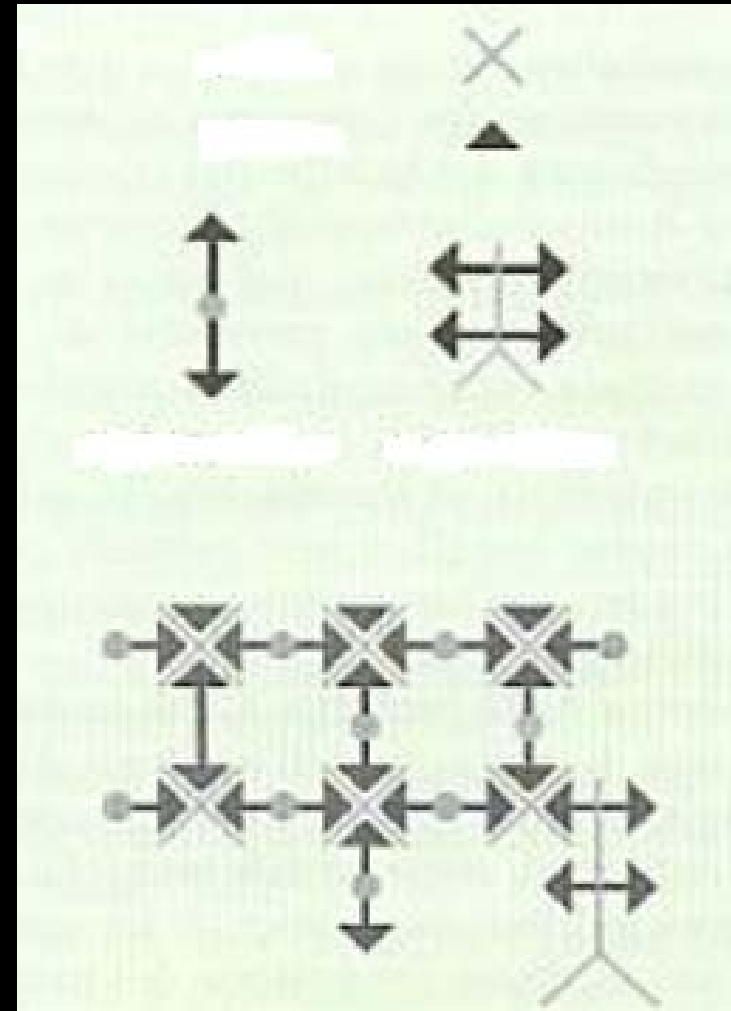
## Metodo PAP

- Complesso immune perossidasi anti-perossidasi (3 HRP + 2 IgG anti-HRP)
- Anticorpo ponte
- Anticorpo primario



## Sistema avidina-biotina

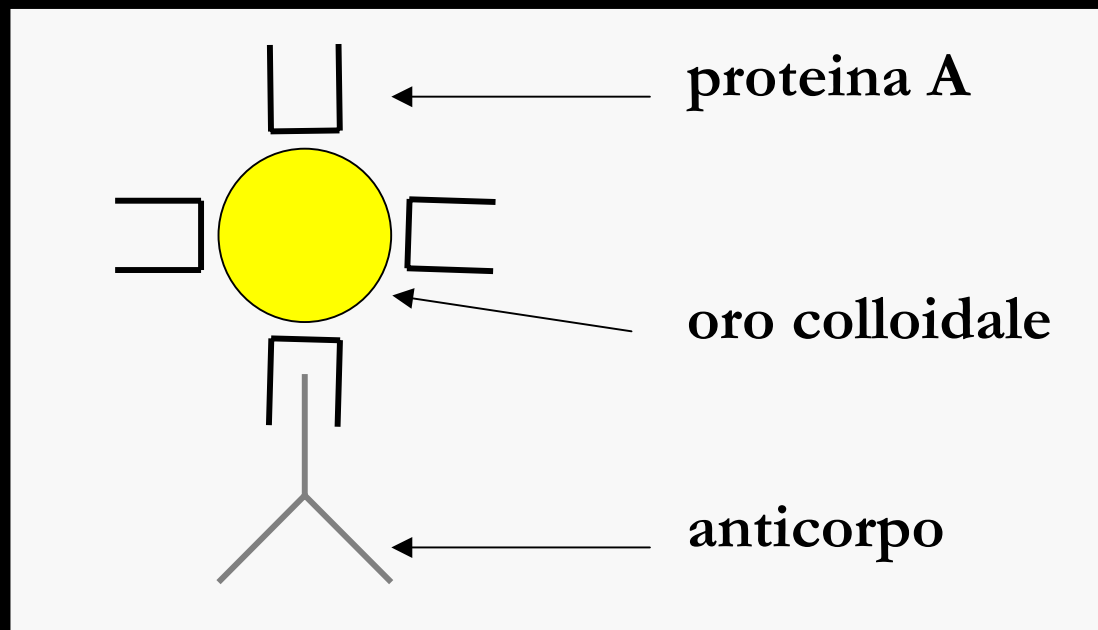
- Incubazione con antisiero specifico
- Incubazione con antisiero secondario biotinilato
- Incubazione con complessi avidina-biotina-perossidasi, poi evidenziati mediante DAB





## Proteina A-oro colloidale

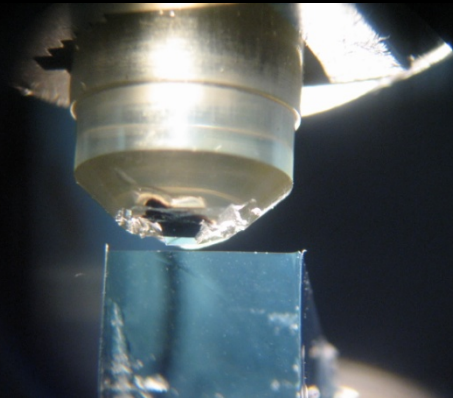
- Interazione proteina A con frammento Fc di IgG (uomo, coniglio, cane, suino; < topo, cavallo; NO pecora, ratto, capra, pollo)



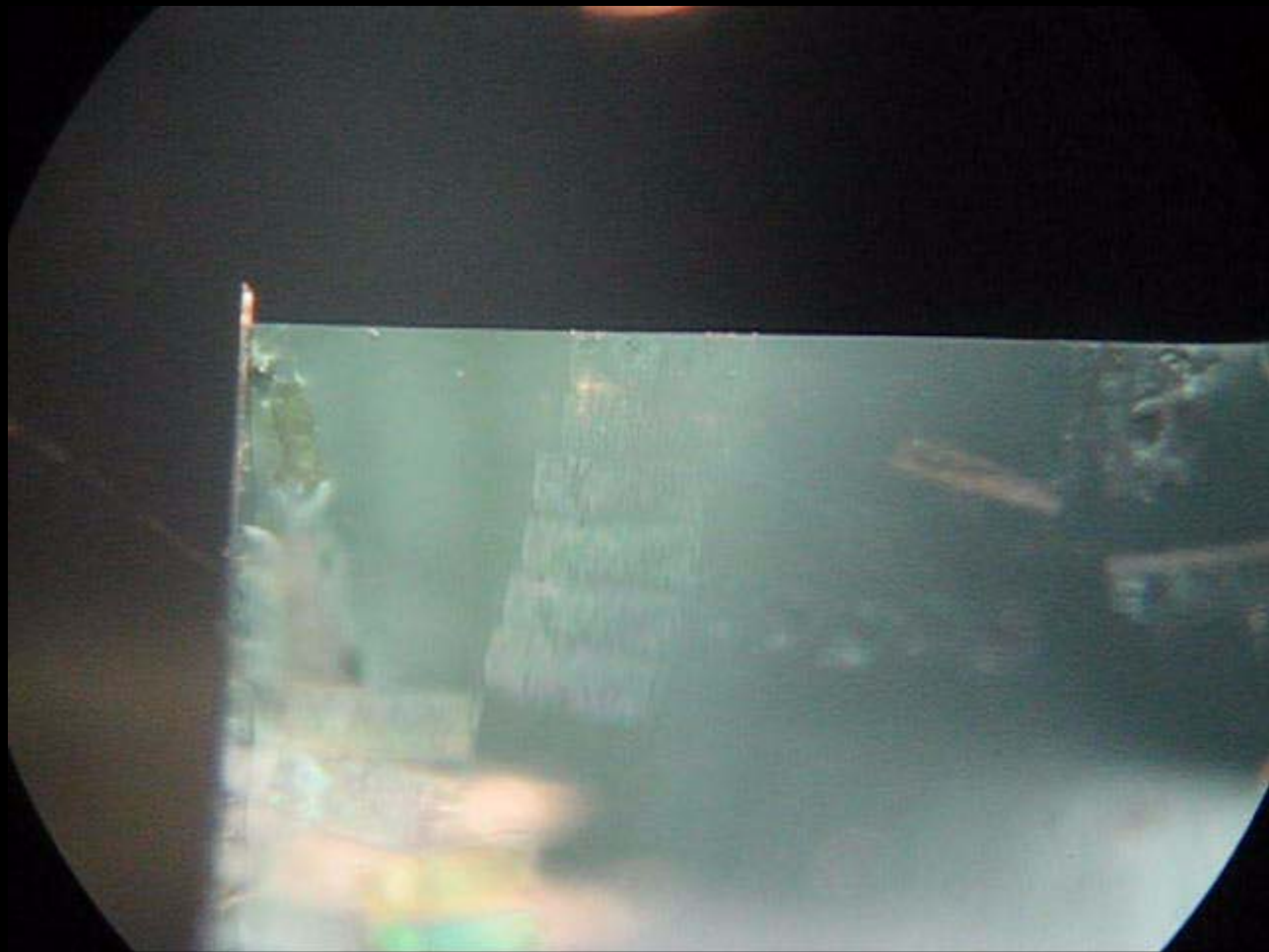
## Esempio di protocollo di post-embedding: metodo indiretto (*immunogold labeling*)

- Ridurre i preparati e immergerli in soluzione di paraformaldeide 2%, gluteraldeide 0.1% in tampone cacodilato 0.1 M per 3 h a 4°C
- Lavaggi in tampone cacodilato (2x15 min)
- Disidratazione in etanolo 70%, 95%, 100% (ognuno di 3x10min)
- Infiltrare con resina Byoacril (2x60 min)
- Overnight in frigo in Byoacril

- Polimerizzare i preparati, dopo averli posti in eppendorf a 4°C mediante UV per 72 h
- Sezioni ultrafini con ultramicrotomo
- Sezioni su retini in nichel ricoperti di formvar







-Allestire una camera umida

-Mettere una goccia di PBS contenente 20% di siero normale e 1% di BSA sul parafilm della camera umida e porvi sopra i retini con le sezioni rivolte verso il tampone; lasciare flottare i retini per 5 minuti a temperatura ambiente

-Incubare con Ab diluito per 60 min a t.a. o overnight a 4°

-Lavare le sezioni con PBS/BSA

- Incubare col secondo antisiero coniugato con oro per 1 ora
- Lavare in tris
- Acqua distillata
- Contrastare con acetato di uranile
- Lavare in acqua distillata e asciugare le griglie
- Contrastare con citrato di piombo
- Lavare in acqua distillata ed asciugare
- Osservare al ME



**TEMPO TOTALE:**

**4-5 giorni**

***Importante:***

**allestire sempre dei controlli!!!!**





*Elastina*

# *COLORAZIONE ASPECIFICA DI FONDO*

## **Cause:**

- Presenza di Abs contaminanti nel siero specifico
- Legami non immunologici tra siero e tessuto

## Accorgimenti:

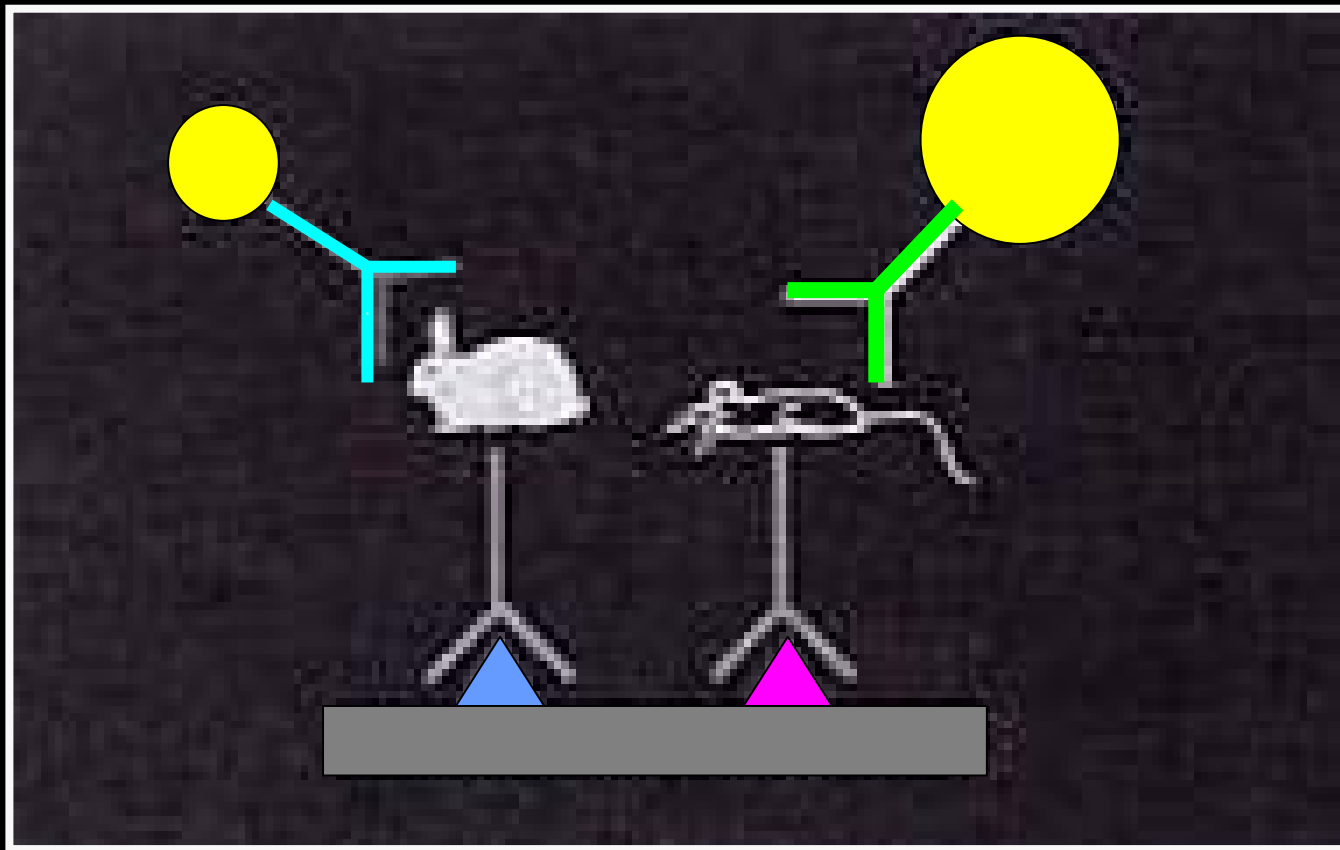
- Le sezioni non devono mai asciugare
- Far flottare le griglie su goccia

A grayscale micrograph showing a highly textured, granular surface. The texture consists of numerous small, irregular particles and clusters, creating a rough, porous appearance. The lighting is somewhat uneven, with brighter areas in the upper left and darker areas in the lower right. A scale bar is located in the bottom left corner, consisting of a horizontal line and the text '0.5 μm'.

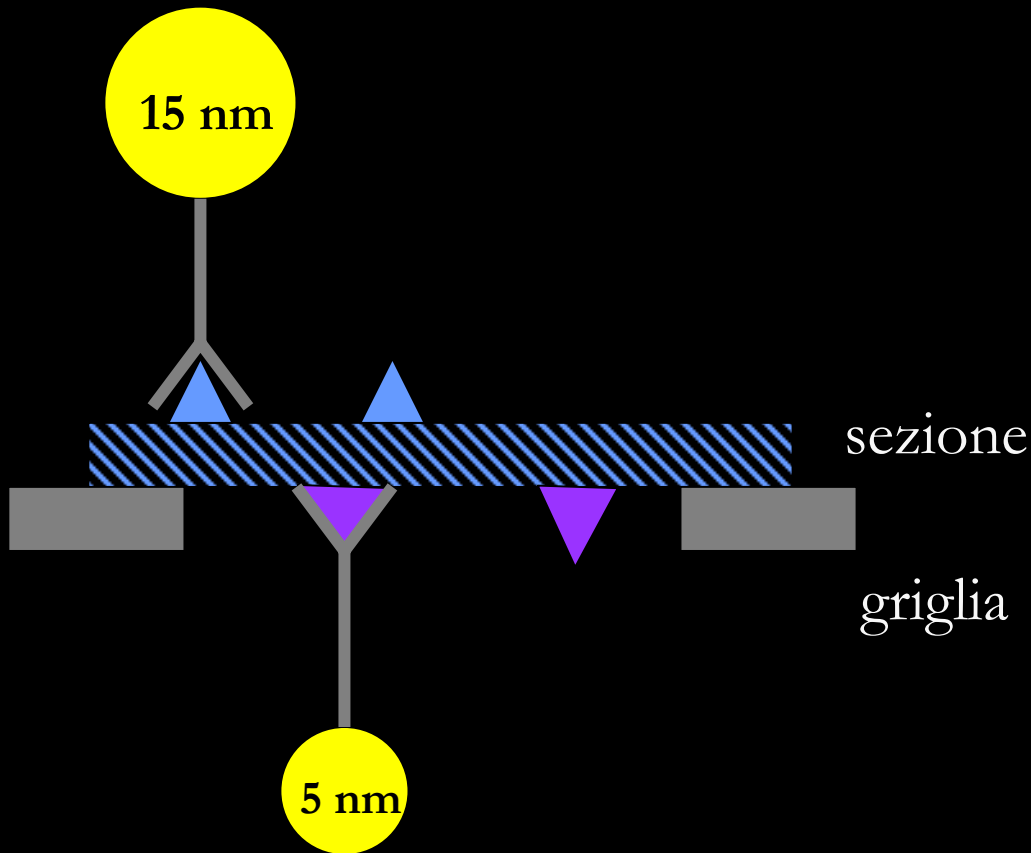
0.5  $\mu\text{m}$

# DOPPIE MARCATURE

Uso di particelle di oro  
colloidale di dimensioni  
diverse: evidenziazione di  
due o più Ags tissutali  
sulla stessa sezione

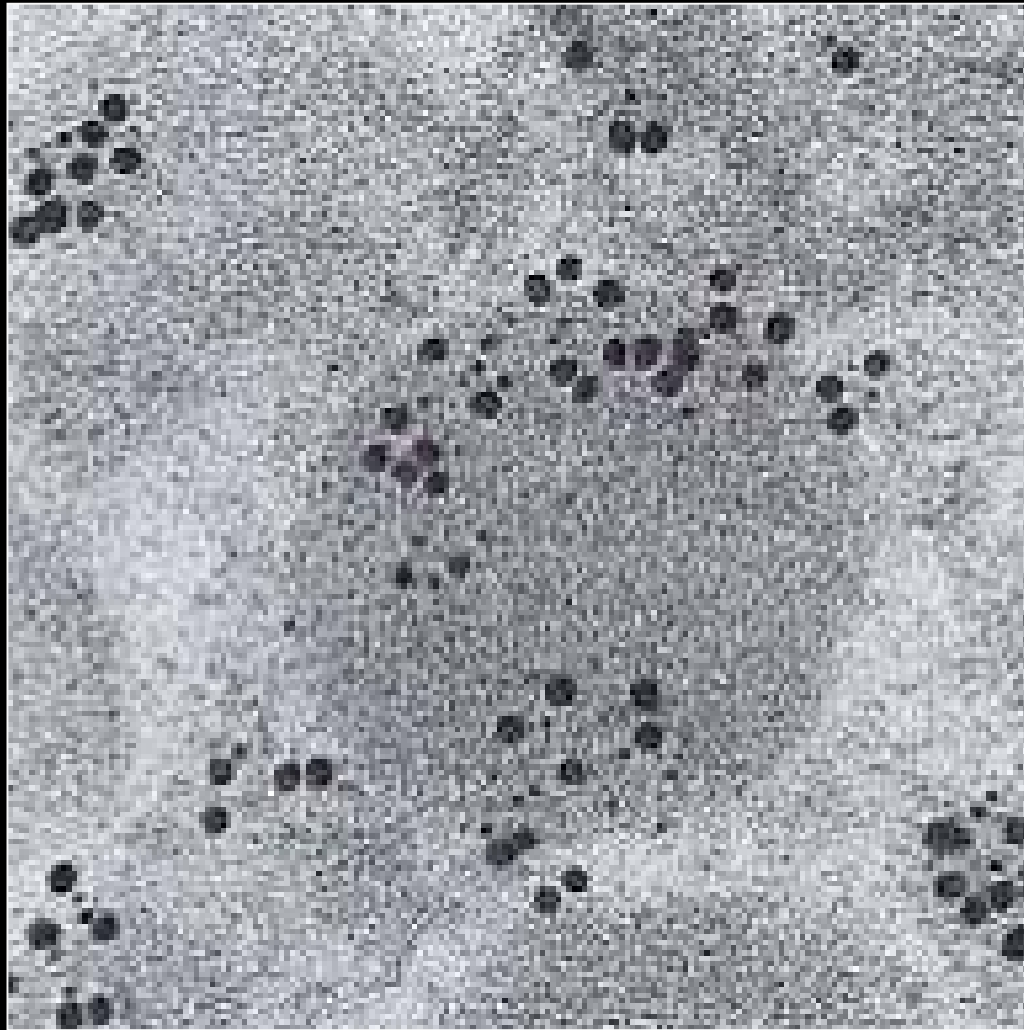


1) Doppia marcatura mediante antisieri diversi su un'unica superficie della sezione



Prima immunomarcatura,  
asciugatura e  
ricopertura con carbone.  
Seconda immunomarcatura  
su sezione opposta

2) Doppia marcatura eseguita su superfici diverse della sezione



*Sinaptofisina (5 nm),  
cromogranina A (15 nm)*

## Pre-embedding

Esecuzione della reazione immunologica prima che il tessuto sia sottoposto alla fase di inclusione

Applicata per:

- Localizzazione di Ags di superficie su cellule isolate (+++)
- Localizzazione di Ags tissutali (MA...limitata penetrazione di Abs e marker, necessaria la permeabilizzazione con triton X 100 o saponina)



## Vantaggi:

- Mantenimento dell'antigenicità
- Possibilità di utilizzare il tetrossido di osmio (preservazione componente lipidica delle membrane e mantenimento contrasto)

Tecnica di elezione per lo studio di antigeni presenti sulle membrane cellulari di un tessuto

Marker più usato: *Perossidasi (Oro colloidale: elevate dimensioni e limitata penetrazione)*

Fasi:

- 1) Fissazione (gluteraldeide e paraformaldeide a diverse concentrazioni)
- 2) Sezionamento spesso
- 3) Immunomarcatura (metodo PAP + DAB)
- 4) Postfissazione in tetrossido di osmio
- 5) Inclusione in resina
- 6) Osservazione al ME

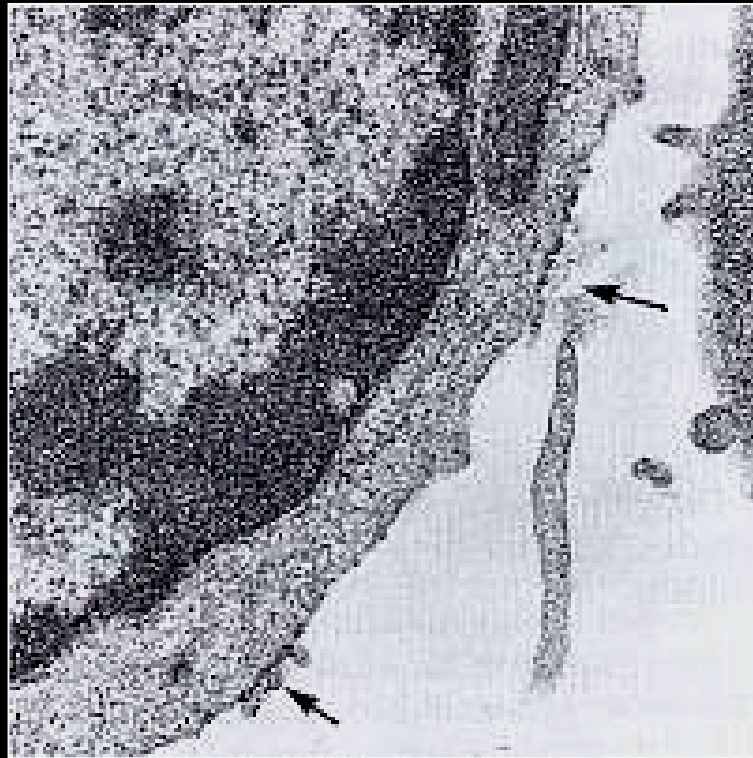
## Esempio di protocollo di pre-embedding

- Fissazione per 3 ore
- *Trasferire i preparati ridotti in saccarosio 30%*
- *Congelare i preparati in azoto liquido e scongelarli (aumento penetrazione immunoreagenti)*
- *Trasferirli in tampone e tagliarli in sezioni di 40 micron*
- Incubare le sezioni in siero normale
- Trasferire le sezioni nell'anticorpo primario e incubare overnight

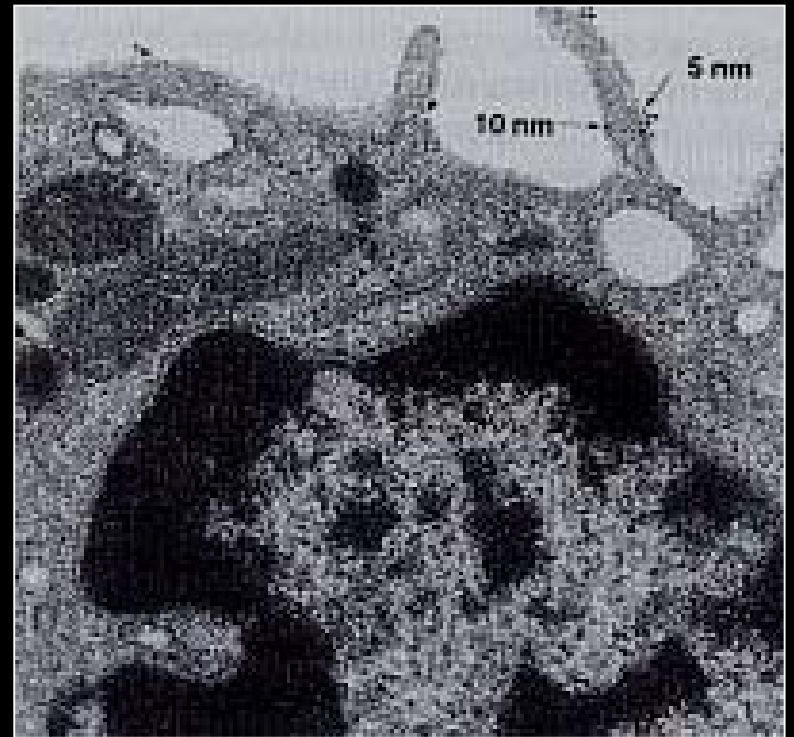
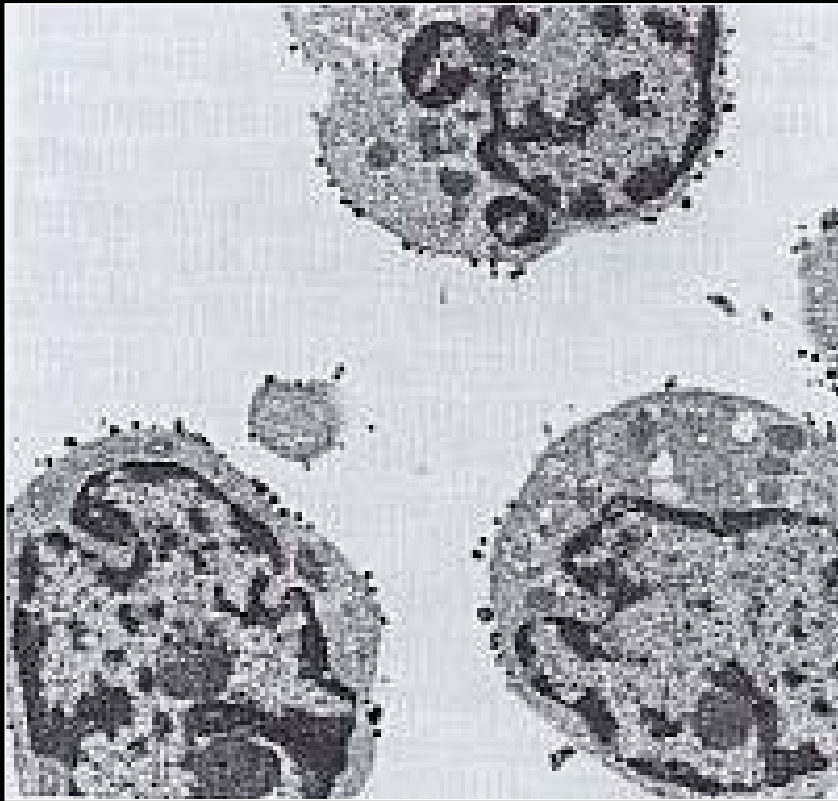
- Lavare nel tampone e incubare nell'Ab secondario
- Lavare e incubare nel complesso PAP
- Colorare le sezioni con DAB
- Lavare e colorare con tetrossido
- Disidratare e includere in resina

Passaggi in continua agitazione

Ulteriore metodo prevede l'uso come marker elettronico di particelle di oro colloidale di dimensioni molto ridotte che riescono a penetrare nel tessuto crioprotetto e criosezionato



*CD25*



# IMMUNO-SEM

Visualizzazione di reazioni di immunomarcatura eseguite a livello di superfici biologiche e non, quali cellule, farmaci, alimenti....

NO studio di antigeni intracellulari!!!!

Marker: *oro colloidale*