



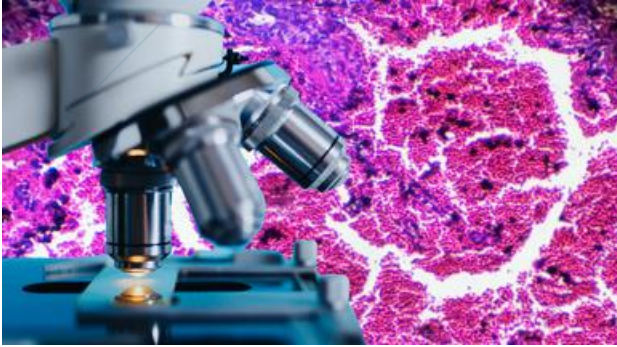
Anatomia Patologica - 1. Fondamenti della Disciplina
2. Metodologie Diagnostiche e Branche
3. Classificazione

Biotechnologie per la salute (Università degli Studi di Napoli Federico II)



messages.pdf_cover_qr_code_label

APPUNTI DI ANATOMIA PATOLOGICA



L'**anatomia patologica** è una branca specialistica della medicina che studia le alterazioni indotte dalle malattie a livello di organi, tessuti e cellule. Le sue funzioni principali si articolano in diversi ambiti essenziali per la medicina moderna:

- **Basi patologiche del ragionamento clinico:** consiste nel riconoscimento e nella descrizione accurata degli elementi morfologici (le forme e le strutture alterate). Queste informazioni vengono fornite al clinico per supportare il percorso logico che conduce alla diagnosi.
- **Patologia diagnostica:** riguarda la formulazione di una diagnosi specifica attraverso metodologie citologiche, istologiche, ultrastrutturali e di biologia molecolare. Il cuore di questa attività è il **metodo morfologico**, che analizza le interazioni e le modificazioni di cellule e tessuti per identificare la patologia.
- Ha una funzione di “servizio” per gli studenti, poiché permette di:
 - ❖ visionare organi e lesioni;
 - ❖ sviluppare una metodologia di osservazione e descrizione (tentativo continuo di avvicinarsi alla realtà);
 - ❖ permette di imparare il lessico;
 - ❖ permette di entrare in contatto con le proprie emozioni ed essere empatici, poiché dietro ogni vetrino di cellula/tessuto, dietro ogni organo c'è un paziente, una persona con la propria storia.

Il Valore della Disciplina

L'anatomia patologica è una materia fondamentale per chi studia Medicina o Biotecnologie, poiché permette di osservare concretamente come cambiano gli organi in seguito a uno stato patologico. Non si limita alla catalogazione dei nomi delle malattie, ma insegna un metodo rigoroso basato sull'**osservazione attenta**, sulla **precisione descrittiva** e sull'uso di un **linguaggio scientifico condiviso**.

Studiare questa disciplina è cruciale per la scelta della terapia corretta. È importante ricordare che dietro ogni campione o vetrino vi è una persona in attesa di una risposta; ciò richiede al patologo una profonda sensibilità ed empatia.

Le Sfide dell'Anatomia Patologica

La materia affronta oggi due grandi sfide:

1. **Interpretazione del quadro clinico:** utilizzare tecniche avanzate per svelare le cause profonde di un'anomalia.
2. **Integrazione dei livelli di osservazione:** superare il semplice esame a occhio nudo per collegare l'aspetto **macroscopico** a quello **microscopico** e **molecolare**.

Per giungere a una diagnosi corretta, oltre alla logica, sono necessarie l'esperienza e l'intuizione dell'operatore, capaci di distinguere il confine tra normalità e patologia, mantenendo sempre al centro il benessere del paziente.

I Pilastri della Patologia

Secondo la definizione di **Rudolf Virchow**, la patologia è lo studio delle modificazioni strutturali e funzionali di cellule, tessuti e organi che sottendono alla malattia. I quattro aspetti fondamentali analizzati sono:

1. **Eziologia:** lo studio delle cause della malattia (ove identificabili).
2. **Patogenesi:** l'analisi dei meccanismi biologici che portano all'insorgenza e all'evoluzione della patologia.
3. **Morfogenesi:** lo studio delle alterazioni della forma e della struttura indotte dalla malattia.
4. **Alterazioni funzionali e impatto clinico:** l'analisi di come le modificazioni morfologiche influenzino negativamente le normali funzioni dell'organismo e si manifestino clinicamente nel paziente.

L'Autopsia (Riscontro Diagnostico)

Consiste nell'analisi del soggetto deceduto per accertarne le cause della morte. Non può essere richiesta/vietata dalla famiglia perché viene vista come un vilipendio. In Italia, può essere eseguita da due figure professionali:

- **Anatomopatologo:** interviene in caso di **morte naturale** (su richiesta del medico curante) per confermare la diagnosi o chiarire dubbi clinici.
- **Medico Legale:** interviene in caso di **morte indotta** o violenta. Il suo compito è stabilire le con-cause e i fattori che hanno determinato il decesso, con finalità spesso giuridiche o assicurative (es. incidenti stradali).

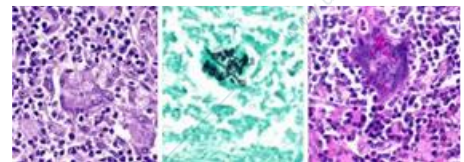
Oggi il numero di autopsie sugli adulti è diminuito, poiché le moderne tecniche diagnostiche, tra cui la diagnostica strumentale, permettono spesso di conoscere la causa del decesso (come tumori o infarti) prima che questo avvenga. Al contrario, restano molto frequenti le **autopsie neonatali** (su bambini deceduti poco dopo la nascita): queste sono fondamentali per individuare cause genético-ambientali e fornire ai genitori informazioni preziose in vista di future gravidanze.



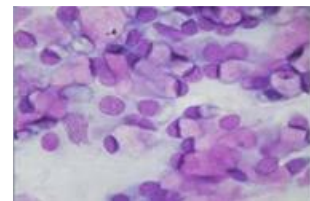
Culture cellulari: usate solo per lo studio farmacologico degli agenti chemioterapici, sono quindi molto utilizzate per la sperimentazione in vivo di farmaci.



Istopatologia: Si occupa di studiare le alterazioni morfologiche a livello dei **tessuti** e, di conseguenza, degli organi.



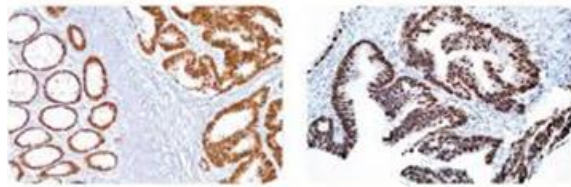
Citopatologia: Si focalizza sulle alterazioni che avvengono all'interno delle **single cellule**.



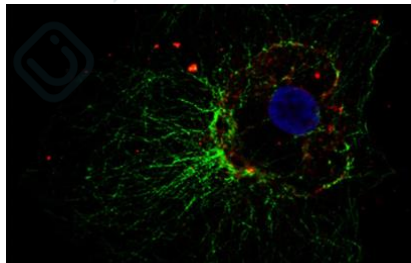
Rami della Patologia e Ambiti di Studio

Immunistoichimica e Immunofluorescenza: Metodi sofisticati basati sull'interazione tra antigene e anticorpo. Si collocano a metà strada tra lo studio delle alterazioni morfologiche e la biologia molecolare, servendo a identificare e spiegare caratteristiche cellulari specifiche che non sarebbero visibili con le colorazioni classiche.

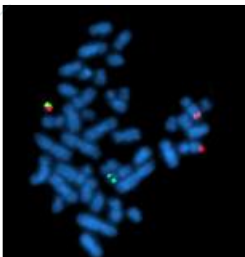
L'immunoistoichimica (IHC) è una tecnica di laboratorio fondamentale che utilizza anticorpi specifici per individuare antigeni (proteine, marker) in sezioni di tessuto, visualizzandoli al microscopio.



L'immunofluorescenza è una tecnica di diagnostica per immagini che utilizza anticorpi marcati con molecole fluorescenti (fluorofori) per individuare antigeni o anticorpi specifici in tessuti o cellule.



Ibridazione in situ: Utilizzata per localizzare specifiche sequenze di acidi grassi all'interno del tessuto.



Tecniche di Biologia Molecolare

Comprendono metodiche come la **PCR** (Reazione a Catena della Polimerasi) e l'**ibridazione molecolare**.

Nota bene: Con queste tecniche si perde la visione morfologica (l'aspetto visivo del tessuto). Ad esempio, durante la PCR, il tessuto viene necessariamente frammentato e distrutto per poterne estrarre e sequenziare il DNA.

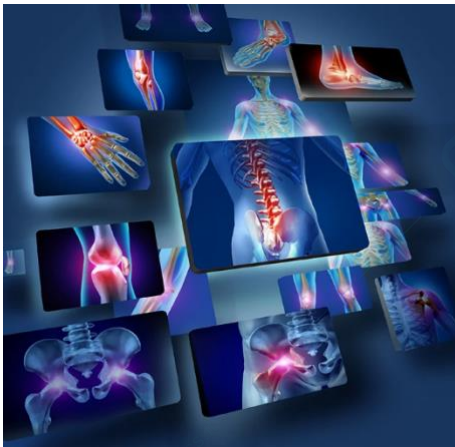
Il ruolo della Biologia Molecolare

Questa disciplina ha rivoluzionato l'anatomia patologica, specialmente in ambito oncologico. Integrando i dati morfologici (l'aspetto visivo) con quelli molecolari (le mutazioni del DNA), è possibile fornire una **diagnosi integrale** e precisa sull'insorgenza delle neoplasie. Trattandosi di un campo in continua evoluzione, la ricerca medico-clinica è destinata a fornire strumenti diagnostici sempre nuovi nel prossimo futuro.

Le Discipline Diagnostiche

Il panorama della diagnostica si suddivide in tre pilastri principali:

Diagnostica per immagini: formula diagnosi basate sull'osservazione dell'anatomia interna, ottenuta mediante mezzi fisici (come raggi X, raggi gamma, ultrasuoni o campi magnetici).

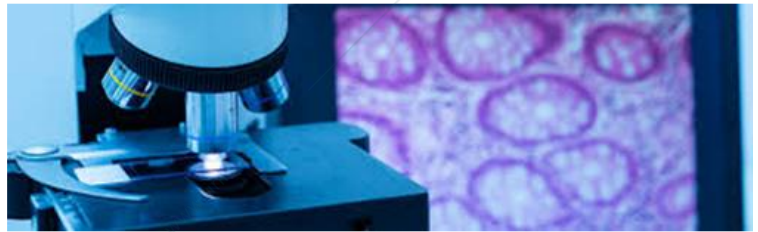


Medicina di laboratorio: giunge alla diagnosi analizzando i prodotti biologici derivanti dalle cellule (sangue, urine, feci, ecc.) attraverso metodologie fisiche, chimiche e biologiche.



Anatomia Patologica: studia le alterazioni morfologiche dei tessuti e delle cellule indotte dalle malattie, avvalendosi di analisi istopatologiche (sui tessuti) e citopatologiche (sulle singole cellule).

Nota Fondamentale: L'anatomia patologica rappresenta l'unica disciplina con piena **valenza medico-legale**. Essendo estremamente accurata rispetto alle altre due (che hanno spesso un valore orientativo), è l'unica in grado di autorizzare ufficialmente l'inizio di iter clinici invasivi, come interventi chirurgici o terapie specifiche.



L'Iter Metodologico in Anatomia Patologica

Il processo diagnostico segue passaggi rigorosi per garantire la massima precisione:

1. **Identificazione del processo patologico:** si riconosce la natura della malattia e, laddove possibile, se ne individua la causa (eziologia).
2. **Stadiazione** (valutazione entità del danno): si valuta l'estensione della patologia, verificando se è circoscritta a un organo, se ha coinvolto i tessuti limitrofi o se si è diffusa a distanza (metastasi).
3. **Valutazione prognostica:** si fornisce una previsione sulla possibile evoluzione della malattia nel tempo.
4. **Medicina di precisione:** si identificano le alterazioni molecolari specifiche. Questo passaggio è cruciale per definire una terapia "su misura" per il paziente, migliorando l'efficacia delle cure.

In sintesi, l'anatomia patologica risponde a tre domande chiave:

- **Diagnosi:** "Che cos'è?" (Dare un nome alla patologia).
- **Prognosi:** "Come evolverà?" (L'andamento previsto della malattia).

→ **Predittività:** "Come risponderà il paziente?" (La probabilità di successo di una specifica terapia).

Classificazione dei Campioni Biologici

In anatomia patologica, i campioni vengono suddivisi principalmente in due grandi categorie:

- **Campioni citologici:** per lo studio delle singole cellule.
- **Campioni istologici:** per lo studio dei tessuti e degli organi (includono anche esami intraoperatori e autoptici).

Tipologie di campioni istologici

I campioni istologici sono generalmente di piccole dimensioni e si distinguono in:

1. **Biopsie:** possono essere effettuate tramite endoscopia, chirurgia o agobiopsia.
2. **Campioni operatori o chirurgici:** si parla di questi quando viene inviato in laboratorio un intero organo o una porzione significativa di esso.

Focus sulle procedure delle biopsie

→ **L'esame intraoperatorio (o estemporaneo)**

È un'analisi d'urgenza che avviene **durante** l'intervento chirurgico. Mentre l'iter normale richiede giorni, questo esame si svolge in circa 10 minuti per fornire al chirurgo una diagnosi orientativa (seppur meno precisa di quella definitiva).

Serve a decidere immediatamente come procedere: ad esempio, per valutare l'aggressività di un tumore o per distinguere, in tempo reale, il tessuto sano da quello malato (fondamentale in neurochirurgia).

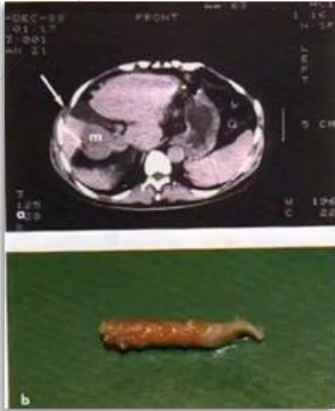


Figura 1.1a: agobiopsia TAC-guidata; la freccia indica l'immagine radiopaca dell'ago che va ad effettuare un prelievo di una massa (m) ipointensa.
Figura 1.1b: frustolo agobiopsico di 2cm.

→ **L'agobiopsia** consiste nel prelievo di un **frustolo** (un cilindretto di **tessuto solido**) tramite un **ago specifico**.

Tipologie di approccio

1. Guida Strumentale: l'ago viene guidato tramite **TAC** o **ecografia** per colpire con precisione una **lesione nodulare** o localizzata.

2. A Cielo Coperto: viene effettuata **senza guida ecografica** quando la patologia non è un singolo nodo, ma è **diffusa** a tutto il **parenchima** (il tessuto dell'organo).



Figura 1.2: agobiopsia epatica eco-guidata

Ambiti di applicazione principali

- 1. BOM (Biopsia Osteo-Midollare):** prelievo di **midollo osseo** per la diagnosi di **malattie ematologiche (leucemie, linfomi)** e per valutarne il **coinvolgimento sistemico**.
- 2. Fegato e Rene:** utilizzata per valutare lo **stato funzionale** delle cellule e l'**integrità del tessuto** in presenza di patologie diffuse.
- 3. Prostata:** viene eseguita una **mappatura** dell'organo, effettuando **numerosi prelievi simultanei** (solitamente **12**) per coprire l'intera ghiandola.

Si differenzia dall'**agoaspirato**, che preleva solo **liquidi e cellule (citologia)** e non tessuto solido. L'agoaspirato è una procedura diagnostica **mininvasiva**, solitamente guidata dall'ecografia, utilizzata per prelevare cellule da **noduli (tiroide, seno, linfonodi)** mediante un **ago sottile**. È un **esame ambulatoriale** rapido, **poco doloroso** e non richiede preparazione, utile a determinare la **natura benigna o maligna** di una lesione.

→ Biopsia endoscopica



Figura 1.3: immagine endoscopica di un tumore del grosso intestino

Viene eseguita tramite l'**endoscopio**, uno strumento a fibre ottiche che permette di visualizzare l'interno degli organi cavi (lume). A seconda dell'organo esplorato, la procedura prende nomi diversi:

- ❖ **Gastroscopia:** mucosa gastrica.
- ❖ **Colonscopia:** intestino.
- ❖ **Cistoscopia:** vescica e vie urinarie.
- ❖ **Isteroscopia:** utero.
- ❖ **Broncoscopia:** vie respiratorie.
- ❖ **Biopsia chirurgica**

Si divide in due approcci principali:

- ❖ **Incisionale:** si effettua una piccola incisione sulla lesione (prelevando sia parte malata che sana) con scopo puramente **diagnostico**, per decidere la terapia futura.

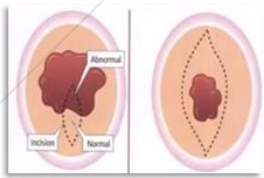


Figura 1.5a: biopsia escissionale.

- ❖ **Escissionale:** la lesione viene rimossa completamente insieme a un margine di tessuto sano. Ha quindi una duplice valenza: **diagnostica e terapeutica** (poiché asporta il problema). Si usa spesso per i nei (nevi), melanomi o linfonodi ingrossati, anche per evitare che eventuali cellule maligne si diffondano.

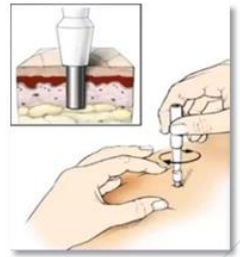
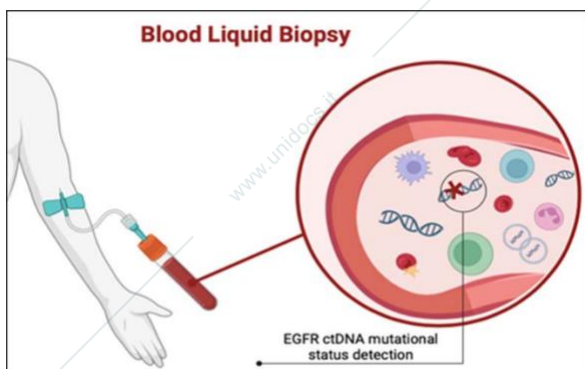


Figura 1.5b: biopsia incisionale

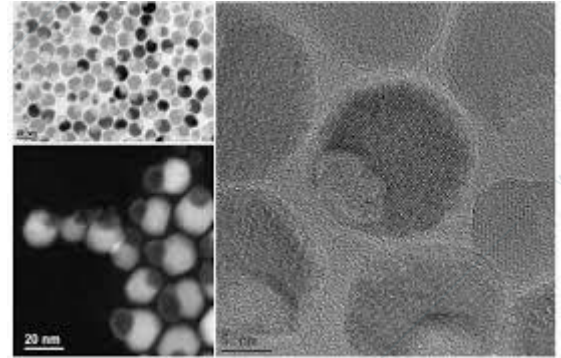
Tecniche avanzate



- **Biopsia liquida:** un esame innovativo che ricerca tracce di DNA tumorale o cellule tumorali circolanti nel **sangue**. Permette di individuare recidive molto prima che siano visibili con una radiografia. È un ambito di confine tra citologia e biologia molecolare.

→ **Microscopia elettronica:** Fa ricorso al microscopio elettrico, uno strumento ad altissima risoluzione fondamentale per lo studio di patologie rare o malattie metaboliche da accumulo, in quanto permette di visualizzare i singoli organelli all'interno delle cellule. Vi sono due tipologie:

- ❖ **TEM (Trasmissione):** arriva a un milione di ingrandimenti; utile per studiare l'interno delle cellule (es. sindrome delle ciglia immobili).
- ❖ **SEM (Scansione):** ingrandisce meno del TEM ma offre immagini **tridimensionali**, utili per studiare materiali protesici e implantologia.



Iter del Campione: Dalla Biopsia al Referto Istologico

Il percorso che trasforma un frammento di tessuto in una diagnosi microscopica segue queste fasi rigorose:

1. **Prelievo ed Etichettatura:** Il campione viene eseguito dal medico in sala operatoria o ambulatorio. È fondamentale la compilazione dei **dati del paziente** e della richiesta d'esame, indicando con precisione la **sede del prelievo** e i **precedenti clinici** per un confronto storico essenziale.
2. **Fissazione:** Passaggio fondamentale per preservare il tessuto e impedirne la **decomposizione** e la **necrosi**. Il campione viene immerso in un liquido fissativo (solitamente **formalina**).
3. **Accettazione:** Ricezione dei tessuti biologici (cute, mucose, organi). Il tecnico verifica la corrispondenza tra il campione e la scheda, assegnando un **numero di protocollo anonimo** per garantire l'imparzialità dell'analisi.
4. **Esame Macroscopico e Campionamento:** L'anatomopatologo osserva il pezzo a occhio nudo, lo misura e lo "riduce" selezionando le **porzioni più significative** (es. i bordi di un tumore). Questi frammenti vengono inseriti in apposite **cassette biologiche**.
5. **Processazione e Inclusione:** Il tessuto viene trattato e inserito in blocchetti di **paraffina** (cera) per poter essere tagliato sottilmente.
6. **Allestimento dei Vetrini:** Creazione delle **sezioni sottili** dei blocchetti di paraffina, che vengono poi **colorate** per permettere la visione delle strutture cellulari.

7. Osservazione Microscopica e Diagnosi: L'analisi finale condotta dal patologo che studia il vetrino, stila e firma il **referto (documento finale)**.

Il campione tissutale è quasi sempre **irripetibile**. Ogni errore in queste fasi può compromettere una diagnosi unica. Tutte le operazioni di laboratorio avvengono sotto **cappe aspiranti** per proteggere gli operatori dai vapori della **formalina**, sostanza **tossica e cancerogena** usata come fissativo.

Che succede quando, invece, il campione è di tipo chirurgico, ovvero il campione è molto grande?

Innanzitutto, si fa una descrizione del campione, ovvero di che **tipologia**, il suo **peso**, le sue **dimensioni**, le **variazioni** rispetto all'organo normale e poi bisogna descrivere sia la **superficie esterna** che quella **di taglio**. Si passa poi a vedere le **lesioni**: il numero, le dimensioni, il colorito, la consistenza, i contorni e la distanza minima dal margine di resezione chirurgica.

La Descrizione Del Reperto E Macroscopica



Figura 1.6: campione operatorio, epatectomia parziale. Nell'area T è presente un tumore rotondeggiante giallastro.

L'anatomopatologo descrive il campione partendo dalla sua natura. Se si tratta di un organo (ad esempio un'isterectomia, ovvero l'utero), ne analizza dimensioni, variazioni rispetto alla norma, aspetto della superficie e del taglio. Per le lesioni, si annotano con estrema precisione: numero, colore, dimensioni, consistenza, forma e, soprattutto, la **distanza minima dal margine di resezione**. Questo è un passaggio fondamentale per capire se il chirurgo è riuscito a togliere tutto il tessuto malato o se questo ha infiltrato i bordi.

Riduzione del campione: Il patologo deve ridurre il campione; questa riduzione consiste nel compiere più prelievi nelle aree di interesse del campione. Il numero di prelievi varia in base al tipo di lesione e alle dimensioni del campione. Questi prelievi, come detto precedentemente, devono essere di circa **1 cm²** per poter essere inseriti nelle **biocassette**. Le biocassette, chiuse ed identificate dal numero di protocollo, sono avviate alla processazione; questo è un passaggio critico per evitare scambi di persona e garantire la tracciabilità del paziente.



Biocassette

La Fissazione: Preservare La Realtà Biologica



La fissazione di un campione istologico consiste nell'arresto dei processi vitali a cui non segue la degenerazione delle cellule. Essa consente di avere un **“fermo immagine”** del tessuto in quel dato momento, fornendo un'immagine il più possibile fedele alla realtà delle strutture istologiche; una fissazione eseguita in modo errato può infatti compromettere gravemente la diagnosi finale. La fissazione

è un atto importantissimo nella tecnica istologica: essa deve essere rapida, altrimenti subentrano fenomeni autolitici irreversibili causati dagli enzimi che portano all'autodistruzione delle cellule.

Tempi e Resistenze dei Tessuti

Il tempo utile per una buona fissazione varia a seconda di tre componenti del tessuto:

1. **La struttura:** i tessuti più densi richiedono tempi più lunghi.
2. **La ricchezza di enzimi (Contenuto enzimatico):** organi come il pancreas o la mucosa gastrointestinale sono molto delicati e vanno fissati rapidamente.
3. **Quantità di sangue (Vascolarizzazione):** la quantità di sangue presente influenza la velocità di penetrazione.

Classificazione della resistenza:

- **Tessuti con massima resistenza:** cute, osso e tessuti fibrosi.
- **Tessuti con minima resistenza:** tessuto nervoso, tessuto gastro-intestinale e tessuto pancreatico.

Rapidità e Agenti Fissativi

La rapidità della fissazione dipende da vari fattori: la velocità di penetrazione del fissativo, lo spessore del tessuto da fissare e la temperatura (il calore accelera l'operazione).

1. Metodi Chimici:

- **Formalina:** Il fissativo per eccellenza dei preparati istologici. È un gas incolore solubile in acqua. La soluzione acquosa in commercio ne contiene il 40% su 1 L di soluzione. Di solito le soluzioni in commercio sono ulteriormente diluite (1 volume

di formalina su 9 volumi d'acqua), così che le soluzioni di formalina al 10% contengano solo il **4% di formaldeide**. Agisce creando "ponti" tra le proteine (reticolazione) per bloccarle nella loro posizione originaria. Dal 2022 è classificata come cancerogena. **Sicurezza:** Oggi vengono utilizzati contenitori che presentano formalina all'interno del tappo, in modo tale che, una volta chiuso il contenitore, questa vada a fissare il tessuto evitando che il tecnico entri in contatto con la sostanza (richiede protocolli con cappe aspiranti e maschere a filtro).

- **Glutaraldeide:** È una dialdeide, reperibile in commercio tra il 25-50%. Deve essere conservata intorno ai 4 °C e al riparo dalla luce. È usata per la microscopia elettronica, solitamente in concentrazione tra il 2-6%.
- **Tetrossido di Osmio:** Usato principalmente per la microscopia elettronica; ha una bassa velocità di penetrazione.
- **Alcol:** Utilizzato spesso in citologia (dove le cellule sono isolate) poiché i fissativi possono essere più lenti. Ha bassa velocità di penetrazione.
- **Liquidi rari:** Liquido di Bouin, liquido di Carnoy e liquido di Zenker (usati molto raramente o mai per scopi diagnostici).

2. Metodi Fisici:

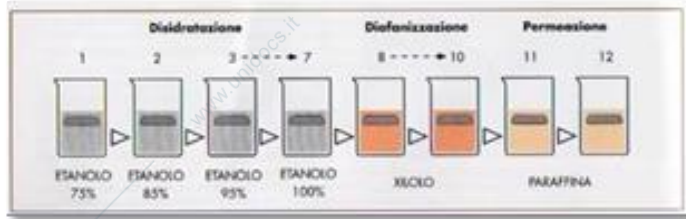
- **Calore:** Usato ad esempio per gli strisci di midollo osseo.
- **Congelamento:** Fondamentale nelle diagnosi intraoperatorie (mentre il paziente è ancora sotto i ferri). È un metodo rapido ma non definitivo, poiché la formazione di cristalli di ghiaccio può alterare leggermente la struttura del tessuto.

Nota tecnica: Per una fissazione ottimale, l'esatto rapporto volumetrico tra tessuto e liquido deve essere di **1:20**. Questo sia perché alcuni fissativi vengono consumati durante il processo, sia perché la fuoriuscita di liquidi dal tessuto (sangue e/o acqua) porta a una diluizione del fissativo. È preferibile preparare il contenitore con il fissativo e poi immergere il campione. **Il pH ottimale deve essere 7,3-7,4.**

Processazione: Dalla Macroscopica Al Blocchetto

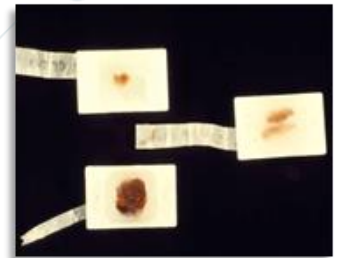
Una volta fissato, l'organo passa in sala macroscopica per la selezione delle sezioni. La processazione prevede una serie di passaggi:

1. **Lavaggio:** Dipende dal fissativo usato; può essere usata l'acqua, una soluzione tampone o un fosfato per eliminare il fissativo in eccesso.



(75%, 85%, 95% e alla fine etanolo assoluto). L'etanolo assoluto comporta la disidratazione completa.

3. **Diafanizzazione:** Passaggio in solventi (come lo xilolo o xilene) che rendono il tessuto trasparente e pronto a ricevere la paraffina.
4. **Inclusione:** Il campione disidratato viene immerso in paraffina calda (56 °C), che poi solidifica a temperatura ambiente creando un "blocchetto" solido (inclusione). La paraffina dà il sostegno giusto al tessuto per tagliare fettine sottili. Questi blocchetti sono conservabili per un tempo illimitato (decenni).



Taglio E Microtocoloma



I blocchetti vengono tagliati con uno strumento chiamato **microtomo**, dotato di lame estremamente affilate. Si ottengono fettine ultrasottili spesse circa **4-6 um** (millesimi di millimetro).

Esistono due tipi di microtomi:

- **Microtomo Rotativo:** Dispone di una manopola che, ruotando, consente alla lama di salire e scendere progressivamente per ottenere le sezioni.
- **Microtomo a Slitta:** La lama è azionata da una slitta che il tecnico usa per ottenere le fettine.

Le sezioni vengono distese in un bagnetto d'acqua tiepida e raccolte su vetrini portaoggetto. In questa fase le sezioni sono ancora bianche perché contengono paraffina e non sono colorate.

Esiste poi un microtomo speciale per le urgenze durante gli interventi: il **criostato**. Questo congela il pezzetto a -50 gradi in soli due minuti e permette di tagliarlo subito. Il problema è che il freddo improvviso crea dei cristalli di ghiaccio che rompono la struttura del tessuto. Per questo motivo, l'anatomopatologo potrebbe confondersi: la diagnosi fatta in questo modo serve solo come indicazione per il chirurgo ma non ha valore legale. È una fissazione fisica, ma quando il pezzo si scongela inizia a rovinarsi, quindi bisogna poi rifissarlo bene

con i prodotti chimici. Di solito non si congela mai tutto il pezzo per non rovinarlo troppo e per non distruggere le "impronte" (siti antigenici) delle cellule. Se si rovinassero quelle, non potremmo più fare altre analisi speciali e la diagnosi sarebbe ancora più difficile.

Sparaffinatura, Colorazione E Montaggio

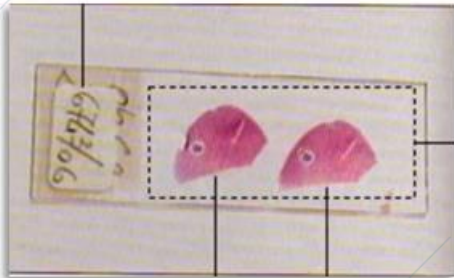


Figura 2.5: sezioni colorate

Poiché i tessuti naturali sono quasi trasparenti, è necessaria la colorazione. Per permettere al colorante di permeare, bisogna però prima allontanare la paraffina.

1. Sparaffinatura: Si sottopone il tessuto a una serie **decrescente** di alcol (dall'alcol 100% fino al 75%) per permettere di idratare nuovamente il tessuto.

2. Colorazione Ematossilina-Eosina (Routine):

- **Ematossilina:** Colorante basico naturale che tinge il **nucleo** (acido, contenente acidi nucleici) di blu-violetto.
- **Eosina:** Colorante acido che ha affinità per le sostanze basiche e tinge il **citoplasma** in rosa.



Figura 2.7: biopsia intestinale colorata all'ematossilina-eosina

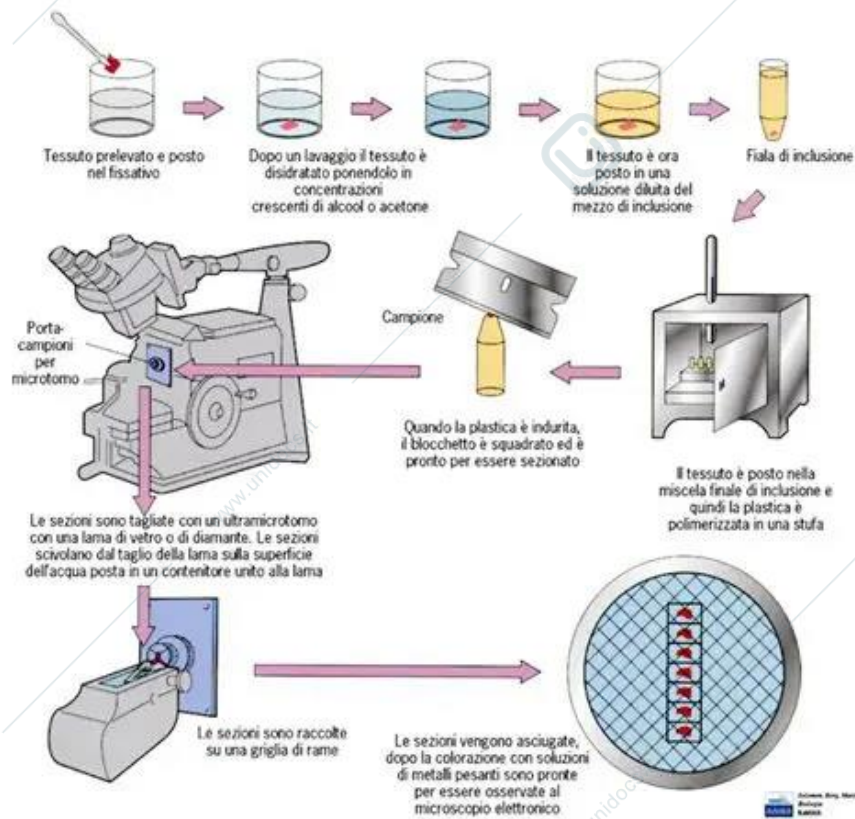
3. Colorazioni Speciali (Metodiche di Istochimica):

- **Sirius Red e Van Gieson:** Per le fibre collagene.
- **PAS:** Per i glucidi (zuccheri).
- **Perls:** Per il ferro.
- **Von Kossa:** Per il calcio.
- **Lipidi:** Colorazioni specifiche per i grassi.



Figura 2.4: sezioni di tessuto su vetrino

4. Montaggio: Si poggia un vetrino coprioggetto sopra il portaoggetto (spesso si montano due sezioni dello stesso tessuto sullo stesso vetrino). Si inserisce un collante (come l'**Eukitt®**) che ha un indice di rifrazione simile al vetro per consentire l'osservazione al microscopio ottico senza distorsioni. È fondamentale l'etichettatura con il numero di protocollo per l'associazione tessuto-paziente.



La **diagnosi istologica**, dunque, comprende diverse fasi: il **campione chirurgico**, (l'utero, in questo caso) viene **fissato, descritto** e i patologi in sala accettazione campioni microscopici **riducono** questi campioni, cioè tagliano fettine sottili delle zone della lesione che ritengono più significative (ai fini della formulazione della diagnosi) e vengono poi poste nelle biocassette; il campione viene poi **processato** e successivamente **incluso** in paraffina. Da questo blocchetto si ottengono delle sezioni molto sottili, che, dopo essere state **sparaffinate e colorate**, vengono **osservate** per la diagnosi al microscopio ottico. Fino a questo punto, la **diagnosi** è esclusivamente **morfologica**, perché è una diagnosi basata sull'osservazione delle alterazioni morfologiche indotte dalla malattia in quel tessuto; quindi, noi possiamo osservare quelle alterazioni, quelle atipie che sono state indotte in un determinato tessuto dalla presenza dell'evento patologico.

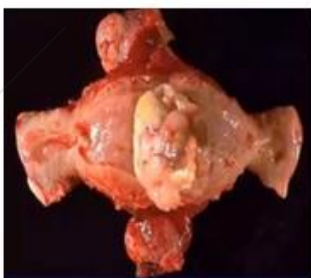


Figura 2.8a: campione chirurgico, isterectomia (utero)



Figura 2.8b: campione ridotto ed inserito in biocassetta



Figura 2.8c: campione incluso in paraffina

L'evoluzione: Morfologia E Biologia Molecolare

La diagnosi istologica tradizionale è **morfologica**, basata sull'osservazione delle alterazioni morfologiche e delle atipie indotte dalla malattia nel tessuto. Oggi questa diagnosi da sola non basta più e richiede l'integrazione del dato molecolare.

- **Biologia Molecolare Classica:** Prevede la disgregazione del tessuto per ottenere acidi nucleici e proteine (purificazione). Si ottengono schemi dettagliati ma si perde il dato morfologico.
- **Morfologia Molecolare (Immunoistochimica o FISH):** Metodiche che permettono di vedere le alterazioni genetiche o proteiche direttamente dentro la cellula, senza perdere il dettaglio della forma. Distinguono con precisione il tessuto malato dal sano.

Il ruolo del Patologo e del Biotecnologo

L'approccio è multidisciplinare. Il patologo è indispensabile perché deve effettuare la **selezione del campo** e la **micro-dissezione**. Deve indicare al biologo molecolare esattamente su quale area effettuare l'indagine (tumore vs tessuto normale); se il biologo facesse la valutazione sul tessuto normale, questa non avrebbe valenza. La micro-dissezione permette il confronto del tumore rispetto al tessuto sano di controllo. Tutto ciò è fondamentale per capire la malattia, prevederne l'evoluzione (**prognosi**) e scegliere i farmaci mirati (**terapia**).