

COLORAZIONI ISTOCHIMICHE

Colorazioni istochimiche

Queste sono le osservazioni di base di tipo istochimico e sono le tecniche di routine. Servono per la localizzazione delle molecole, ed hanno target abbastanza ampio.

Lo scopo dell'istochimica è quello di mettere in evidenza, con dei coloranti specifici, determinate sostanze normali o patologiche presenti nelle cellule e nei tessuti, individuando le zone (citoplasma, nucleo, sostanza intercellulare) dove sono localizzate; in questo caso si parla di istotopochimica.

Colorazioni istochimiche

Queste sono le osservazioni di base di tipo istochimico e sono le tecniche di routine. Servono per la localizzazione delle molecole, ed hanno target abbastanza ampio.

Lo scopo dell'istochimica è quello di mettere in evidenza, con dei coloranti specifici, determinate sostanze normali o patologiche presenti nelle cellule e nei tessuti, individuando le zone (citoplasma, nucleo, sostanza intercellulare) dove sono localizzate; in questo caso si parla di istotopochimica.

Nella maggior parte dei casi non esiste un colorante specifico per ogni singola sostanza, quindi si ricorre di volta in volta ad una serie di metodiche complementari.

Reazioni intermedie: si tratta di dotare la sostanza che si vuole rivelare, mediante reazioni chimiche ed enzimatiche, di gruppi tipici attivi che si leghino selettivamente ad un determinato colorante

Reazioni di bloccaggio: si usano quando un colorante ha la proprietà di legarsi con più gruppi chimici appartenenti a sostanze diverse. Si bloccano pertanto i gruppi delle sostanze che non interessano

Colorazioni per le proteine

Le proteine possono essere classificate come proteine semplici o coniugate. Sono semplici se dopo idrolisi danno luogo solo ad amminoacidi, mentre sono coniugate se in seguito a idrolisi si ottengono amminoacidi e gruppi non proteici.

Le colorazioni per le proteine sono utili soprattutto in patologia quando si vuole determinare la natura proteica dei materiali amorfi intra-extracellulari.

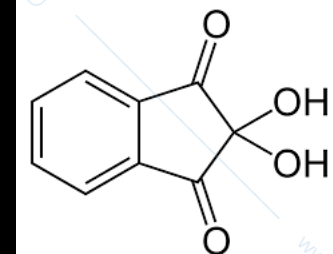
Le proteine si colorano facilmente sia con coloranti acidi che basici grazie alla loro natura anfotera.

Tutti i metodi si basano sulla dimostrazione di un particolare gruppo reattivo presente negli amminoacidi costituenti le proteine.

Per l'analisi istochimica delle proteine il pezzo può essere incluso in paraffina e si possono usare come sostanze fissative quelle che non reagiscono con i gruppi attivi ad es. formalina, etanolo.

La colorazione generale delle proteine è il metodo della Ninidrina o all'Allossana-Schiff che mette in evidenza i radicali α -amminoacidici presenti nelle parti terminali o laterali delle catene proteiche (presenza di gruppi aminici liberi).

Le proteine in questa colorazione appaiono in rosso-magenta.

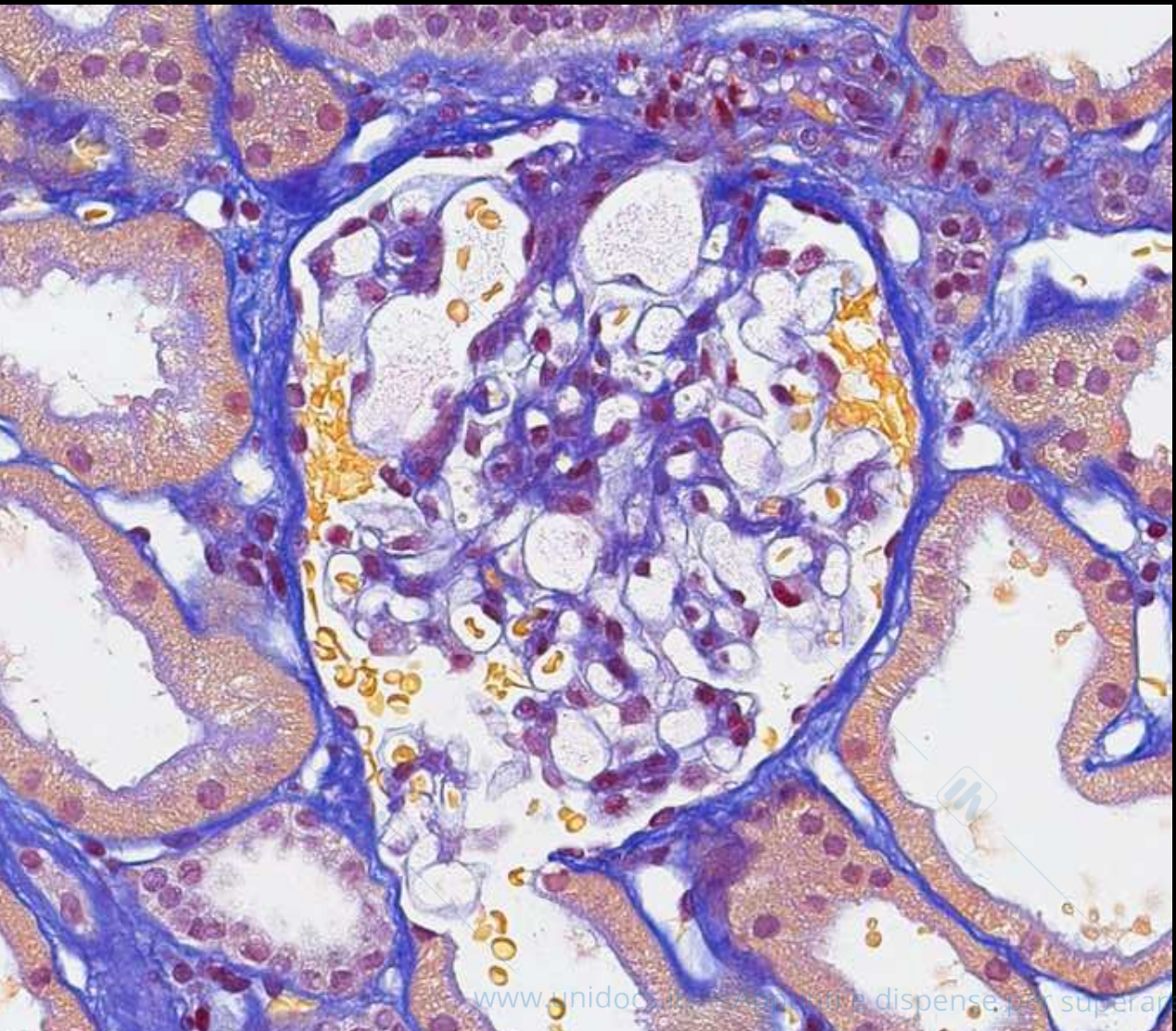


Colorazione per le scleroproteine

Le scleroproteine più importanti nell'uomo sono il collagene, l'elastina, la cheratina.

Per la cheratina il metodo alla **floxidina B – Orange G – Alcian Blu** è il più usato e come risultato si ottiene la cheratina in rosso-arancio; i proteoglicani acidi in blu.

Per quanto riguarda sia il collagene che l'elastina che sono i componenti fondamentali delle fibre di collagene e delle fibre elastiche esistono delle tecniche che sfruttano la collagenasi e l'elastasi degradando queste proteine che non si colorano



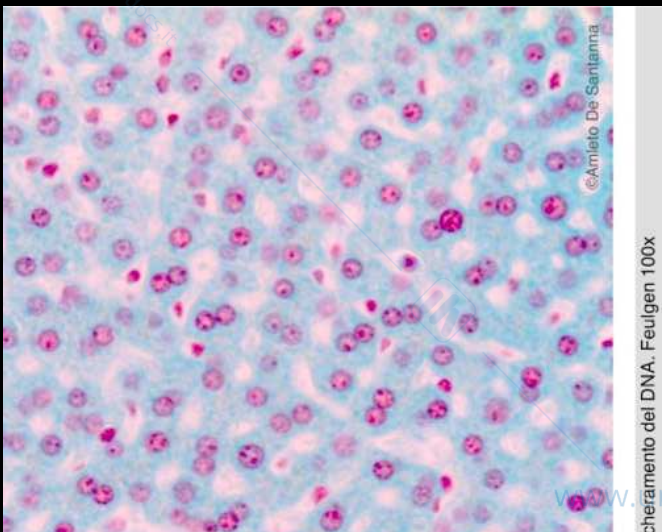
Colorazione delle nucleoproteine

Le nucleoproteine sono delle eteroproteine dove il gruppo prostetico è un acido nucleico. Un metodo per osservare queste proteine è la colorazione di Feulgen.

Questo metodo si basa sul fatto che il reattivo di Schiff (fucsina solforosa), legandosi a due gruppi aldeidici a una distanza di almeno 10\AA forma un composto di colore rosso-magenta.

I nucleotidi di DNA sono posti tra loro a $10-11\text{\AA}$ e da tali nucleotidi, per idrolisi acida, viene eliminata la base purinica o pirimidinica, per cui il desossiribosio assume la forma tautomerica aldeidica.

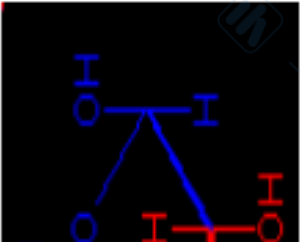
Come risultato si ottiene un colore rosso magenta per il DNA.



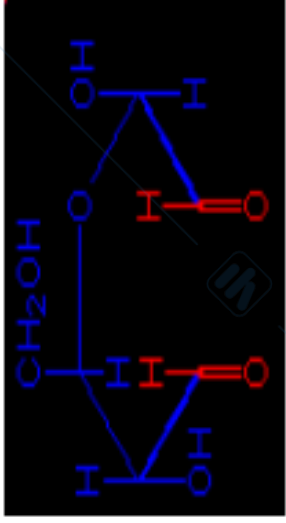
cheramento del DNA. Feulgen 100x

©Amiello De Santanna

R **O** **C** **H**

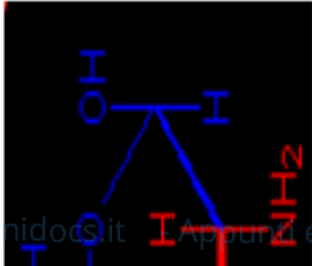


+ HIO₄ =

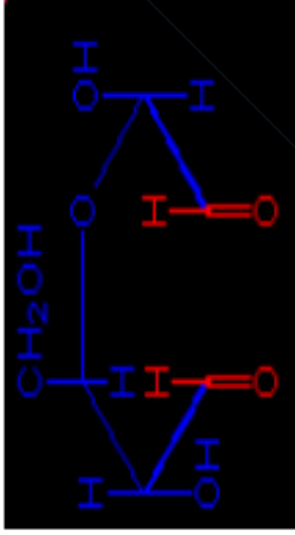


alcohol

Aldehyde



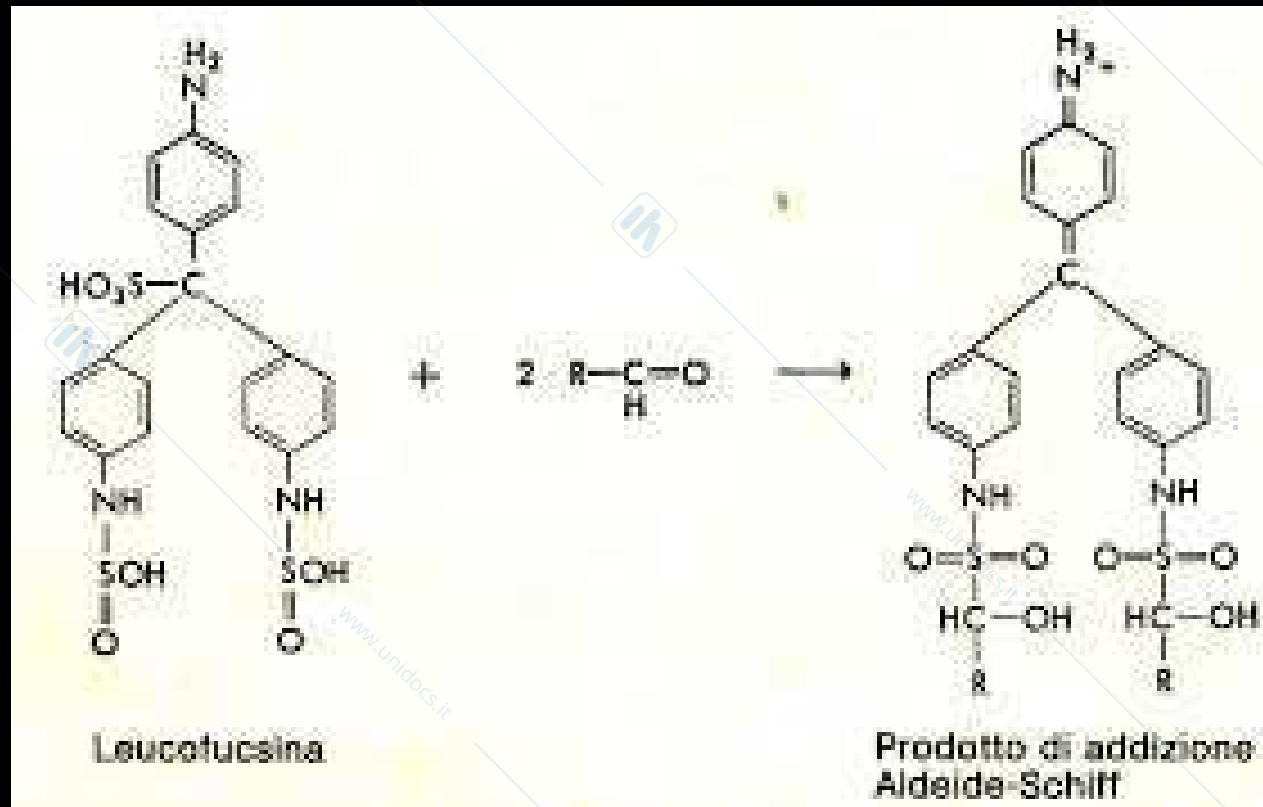
+ HIO₄ =



hydroxy

Aldehyde

Leucofucsina + acido solforoso = reattivo di Schiff (incolore)



Colorazione per mucopolisaccaridi e per il glicogeno

Metodo al PAS (acido periodico – reattivo di Schiff)

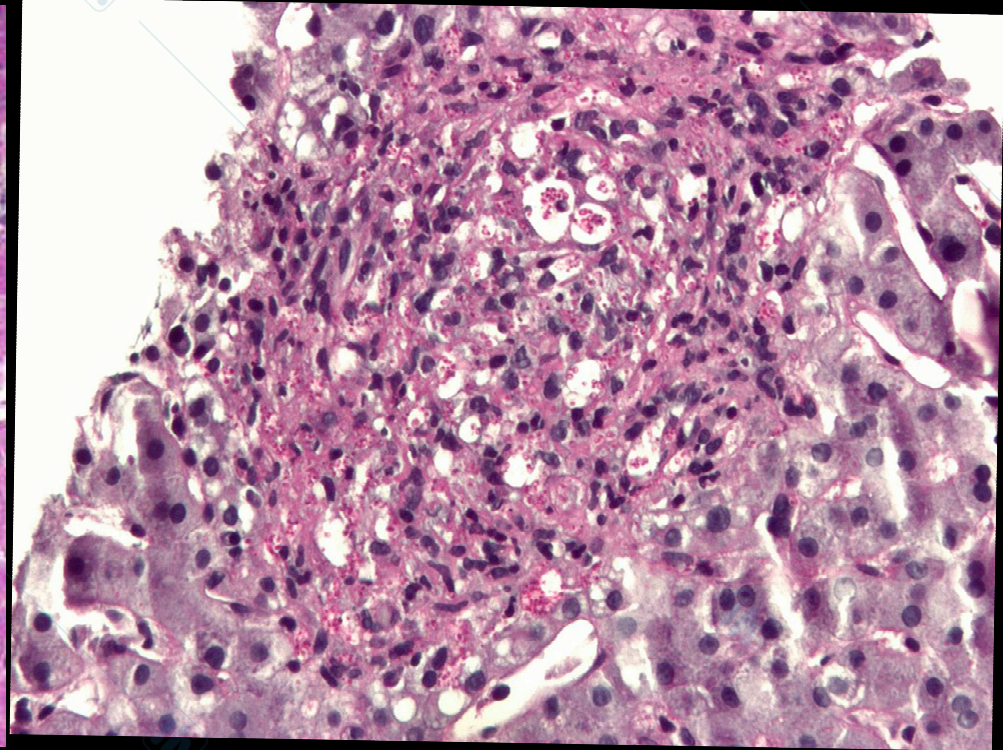
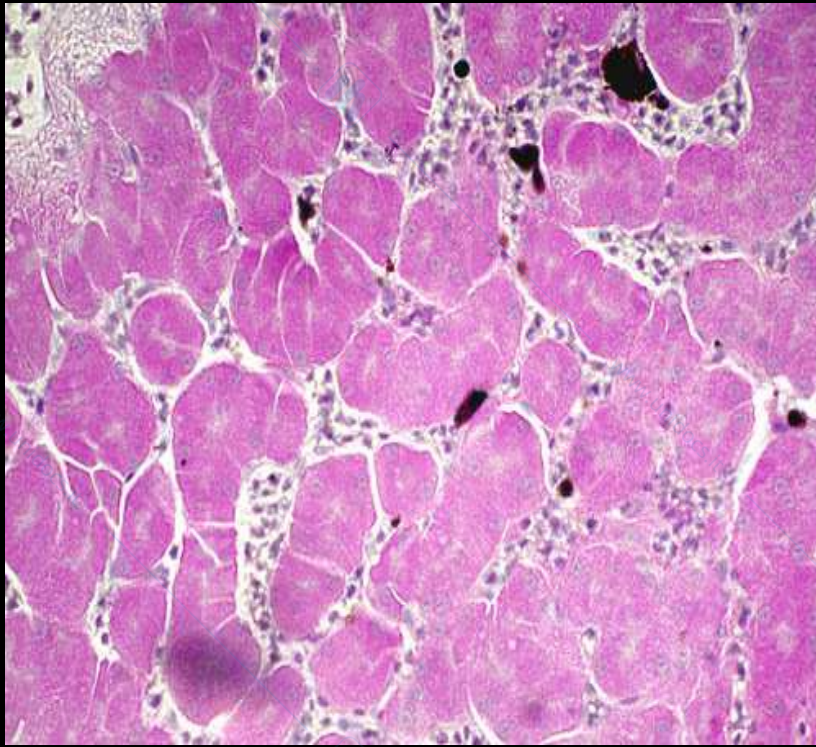
Il metodo si basa sull'ossidazione con acido periodico di due gruppi glicosidici vicini in due gruppi aldeidici.

I gruppi aldeidici vengono rivelati in seguito con il reattivo di Schiff.

Le condizioni necessarie poichè queste reazioni possano avvenire sono che i gruppi idrossilici siano liberi, che i composti che si formano dopo l'ossidazione non siano diffusibili nel tessuto e che i gruppi aldeidici siano in quantità sufficiente per poter essere rivelati.

Naturalmente si colorano anche gli acidi nucleici e gli acetal fosfatidi. Per distinguere i mucopolisaccaridi neutri dal glicogeno si effettua una digestione enzimatica con ptialina.

I mucopolisaccaridi neutri risultano rosso magenta. Se si tratta il glicogeno le sezioni risulteranno incolori. I nuclei appariranno blu neri causa controcolorazione con ematossilina.



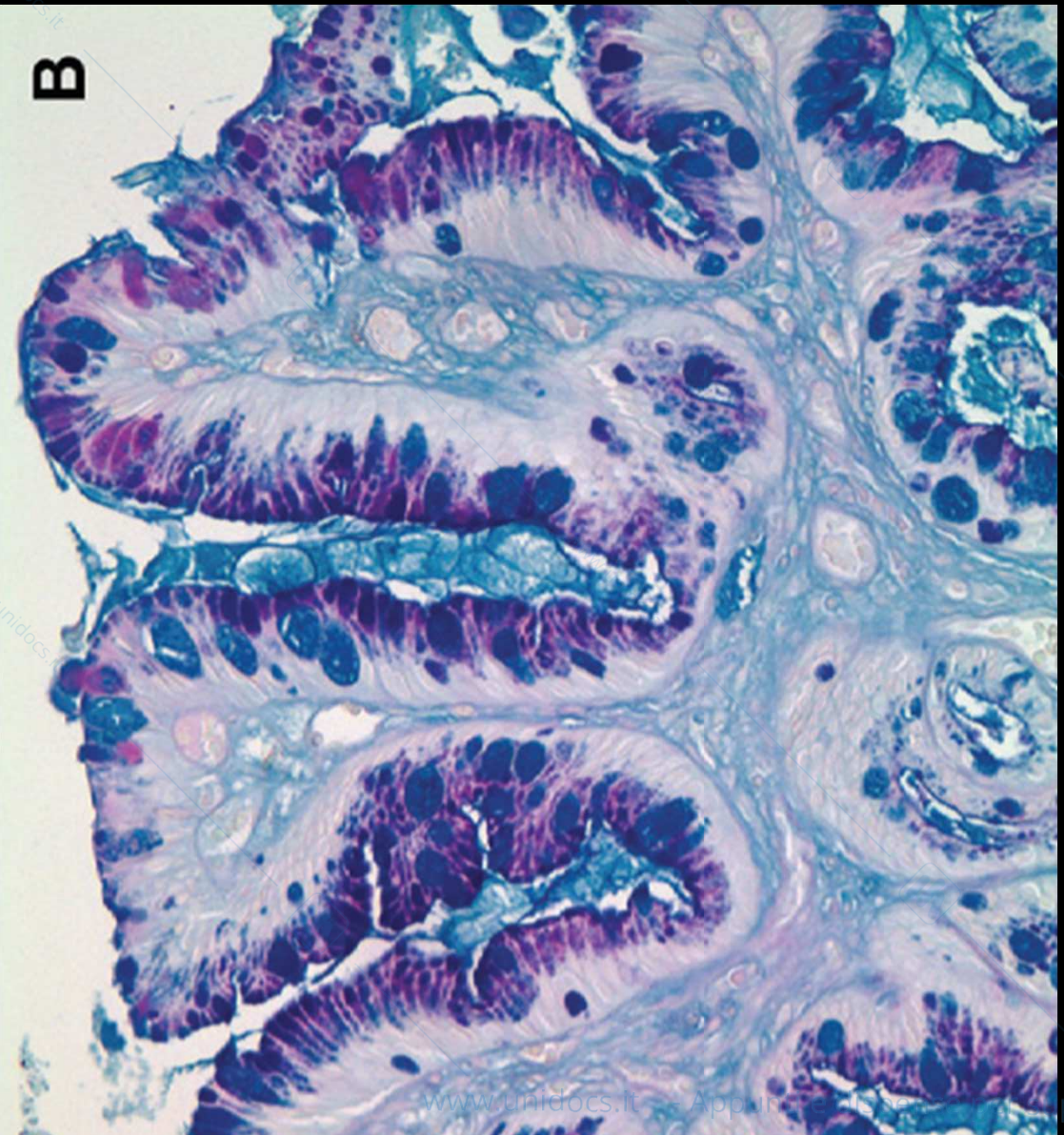
Colorazione per i mucopolisaccaridi acidi (MPSA)

I MPSA sono polimeri composti da una molecola di esosamina e di acido uronico, sialico, o solforico quest'ultimo legato come estere ai gruppi ossidrilici che essendo bloccati non si trasformano in gruppi aldeidici (PAS negativa). Costituiscono parte essenziale del metaplasma dei tessuti connettivi e delle secrezione delle cellule mucipare. I metodi colorativi sono basati sulla presenza delle numerose valenze acide contenute in tali sostanze.

Metodo all'Alcian blu

Non è una vera colorazione istochimica poichè si basa unicamente sul fatto che le cuproftalocianine (Alcian blu, Alcian giallo), fortemente basiche, contraggono legami elettropolari con le valenze acide del MPSA in ambiente nettamente acido. Il pH deve essere mantenuto a 2 poiche a 1 si colorerebbero anche i nuclei.

Questa metodica ci permette di rivelare i MPSA che risultano di colore blu-verde. Dopo il lavaggio e prima della controcolorazione dei nuclei (con ematossilina) può essere eseguito un PAS che colora i mucopolisaccaridi neutri se presenti. (Alcian Pas)



Colorazione per le amine biogene

Le amine biogene sono amine aromatiche che possono derivare dalla decarbossilazione di alcuni aminoacidi. Le più importanti sono le catecolamine (adrenalina, noradrenalina e dopamina), la serotonina l'istamina e la melanina .

Le catecolamine la serotonina e la melanina sono sostanze argentoaffini (proprietà di un substrato organico di fissare i sali d'argento e di ridurli in argento metallico) mentre l'istamina è argentofila (capacità del substrato di legare l'argento ma senza la capacità di ridurlo) e pertanto tutte sono colorabili con metodi di impregnazione argenticca.

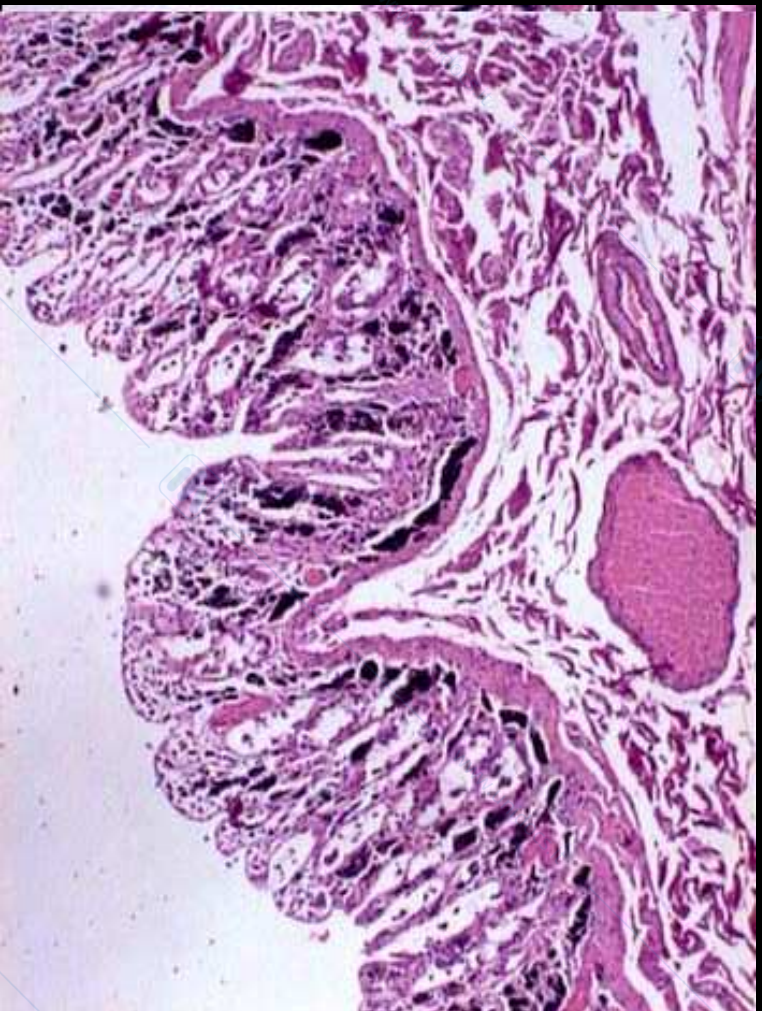
Metodo di Fontana-Masson per le sostanze argentoaffini

Le sezioni vengono colorate con una soluzione di argento ammoniacale (nitrato d'argento 10% in soluzione con acqua bidistillata e ammoniaca) e controcolorazione dei nuclei con safranina

Come risultato i nuclei appaiono in rosso i granuli argentoaffini in nero.

Per le cellule argentofile il metodo di **Grimelius** è tra i più utilizzati.

Il questo caso la sezione viene immersa in una soluzione di nitrato d'argento in soluzione acquosa e in seguito il vetrino viene immerso in una soluzione riducente che farà precipitare l'argento metallico. Nuclei controcolorati in rosso neutro. Granuli argentofili da nero a marrone scuro



Colorazione per l'amiloide

L'amiloide è una particolare sostanza di aspetto amorfo, omogeneo, traslucido e vitreo che in alcune condizioni patologiche (malattie infettive croniche, mieloma multiplo ecc) si accumula in sede extracellulare. L'amiloide può essere identificata come costituita in gran parte da proteine e in modesta quantità da proteoglicani acidi.

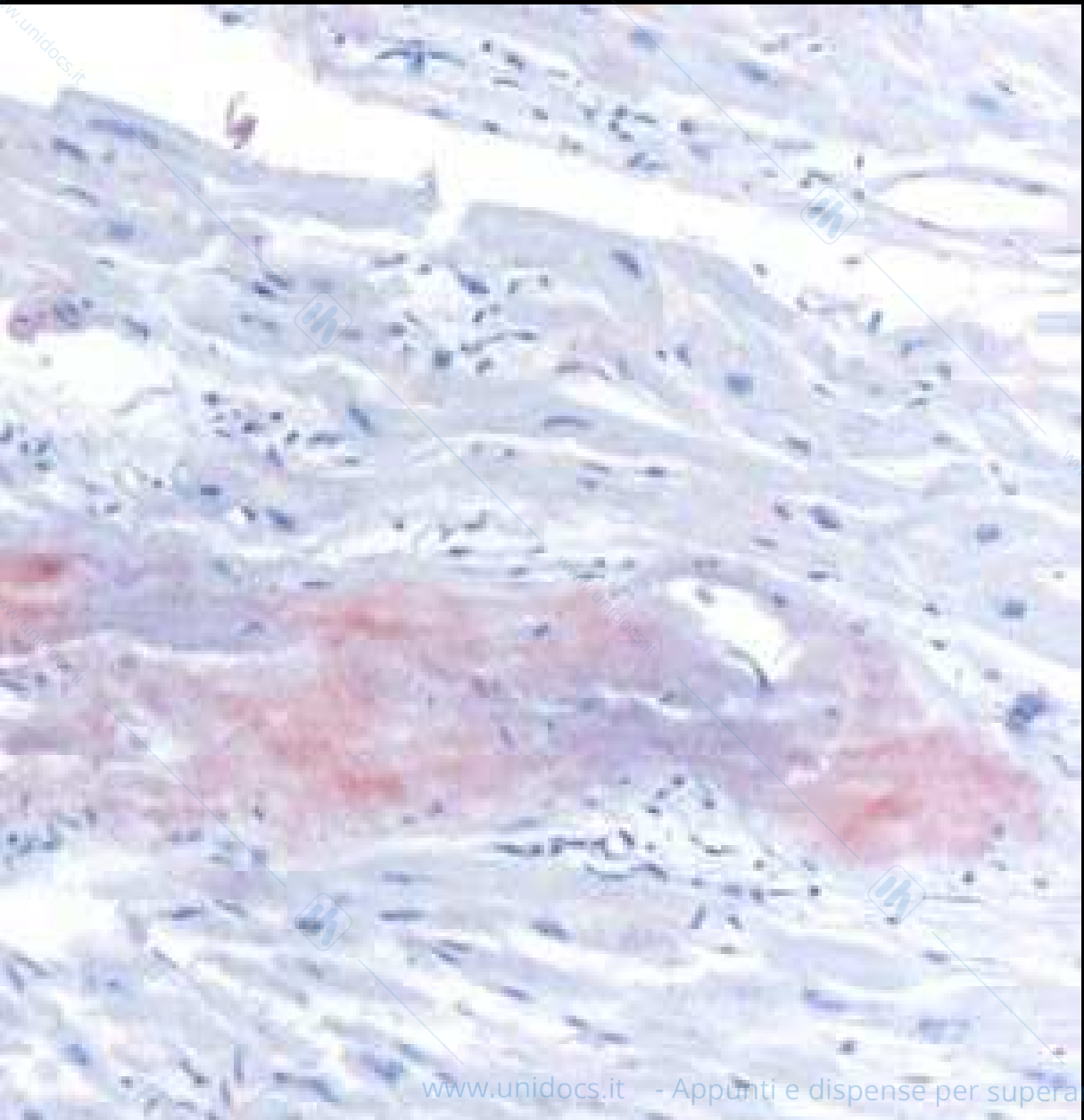
Nella quota proteica sono presenti essenzialmente globuline ed in alcuni tipi di amiloide sono presenti immunoglobuline a catene leggere.

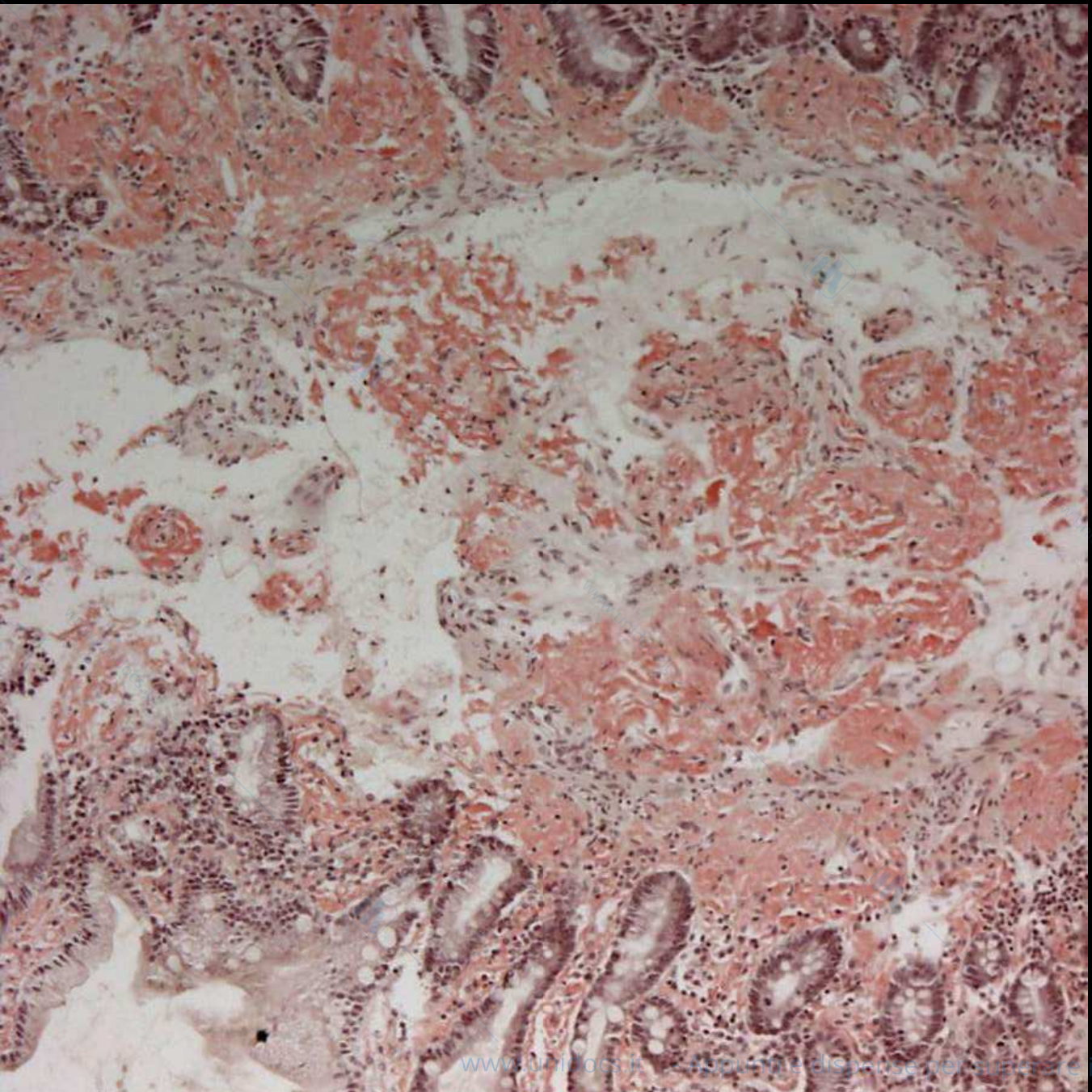
Tra le colorazioni principali troviamo il metodo al violetto di genziana, la jodo reazione ma la colorazione in assoluto più usata è il **ROSSO CONGO** insieme al microscopio a luce polarizzata.

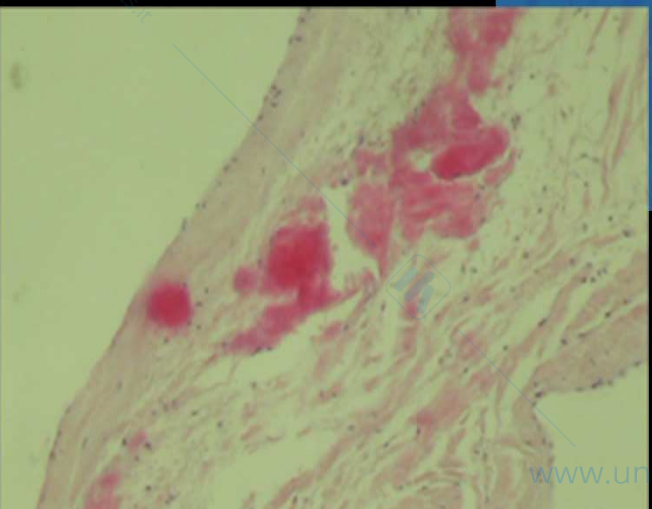
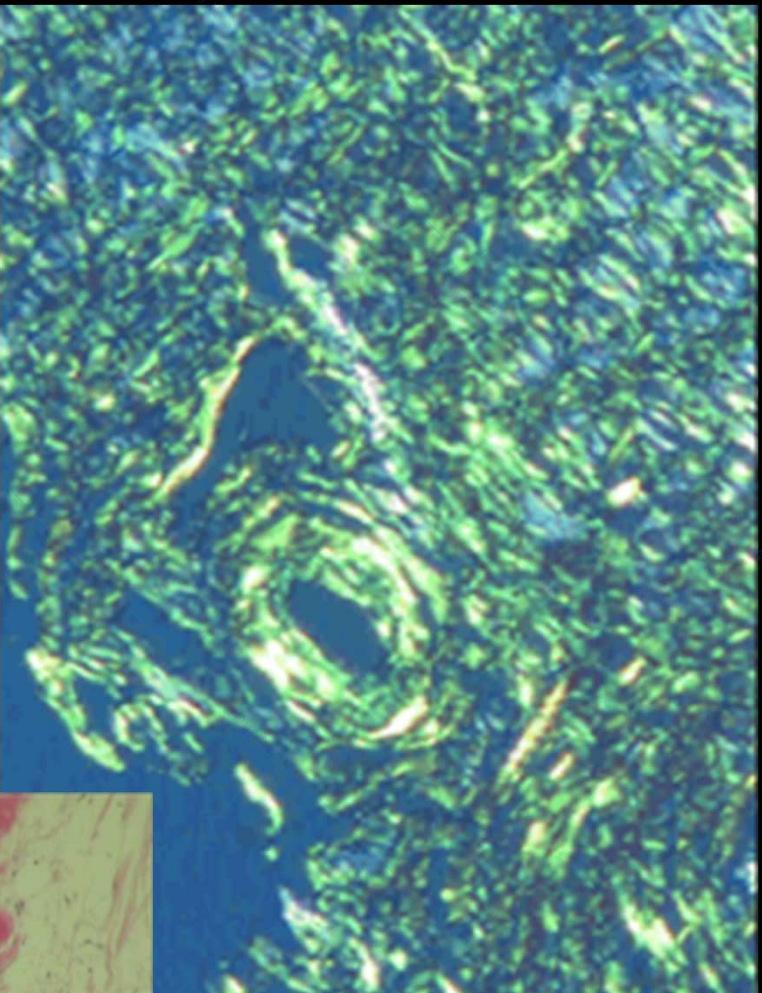
Il rosso congo è un colorante la cui affinità per l'amiloide veniva utilizzata anche in vivo mediante la prova di Bennhold.

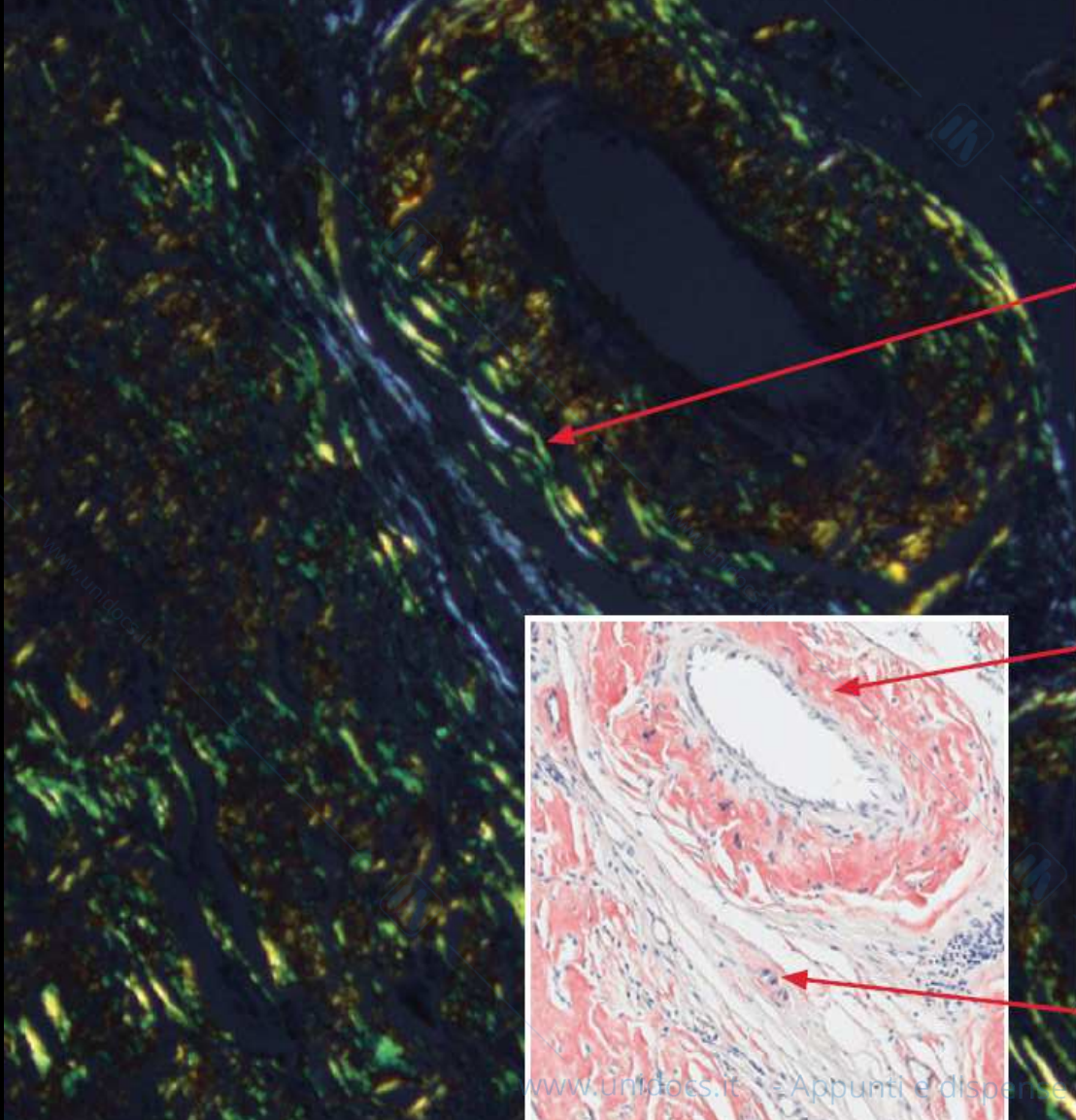
Le sezioni sparaffinate vengono poste in una soluzione acquosa di rosso Congo per 15-20 minuti e poi lavate e montate in balsamo.

L'amiloide apparirà in colore rosso.









Amyloid:
Apple Green

Amyloid, collagen, other fibrous materials:
Pale Pink/ Salmon

Nuclei:
Blue

Colorazioni per i grassi neutri

Questi metodi sono colorazioni istofisiche in quanto si basano sulla proprietà fisica che hanno i coloranti cosiddetti *lisocromi* (Sudan III e IV, Oil Red O, Sudan Nero B) di essere più solubili nei lipidi che nell'alcool a bassa concentrazione in cui tali coloranti vengono disciolti.

Metodo dell'**Oil Red O** i lipidi neutri appaiono rossi mentre i nuclei nero-blu (ematossilina)

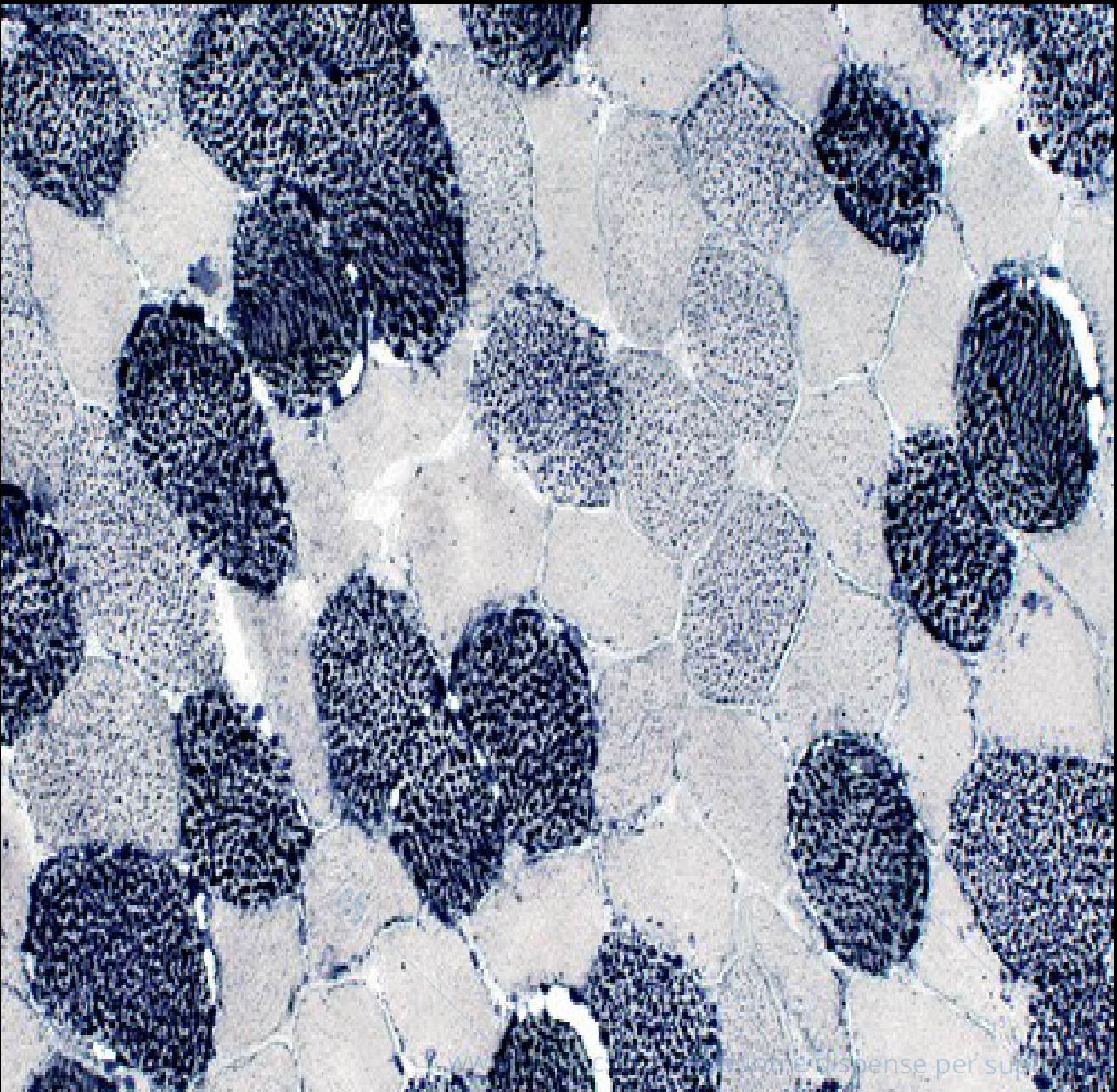
Metodo al **Sudan Nero B** i lipidi neutri sono colorati in blu-nero. Con tale metodica sono colorati anche gli acidi grassi, i fosfolipidi ed i glicolipidi. I nuclei e i proteoglicani acidi assumono un colore bruno ben differenziato dal colore dei lipidi

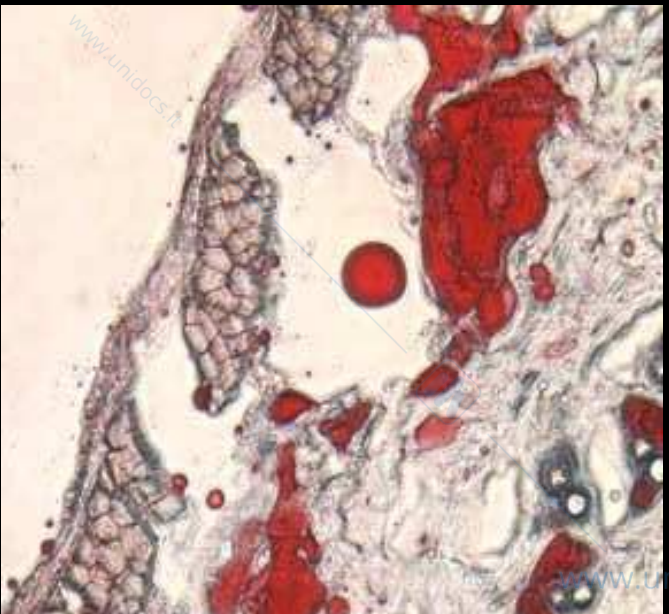
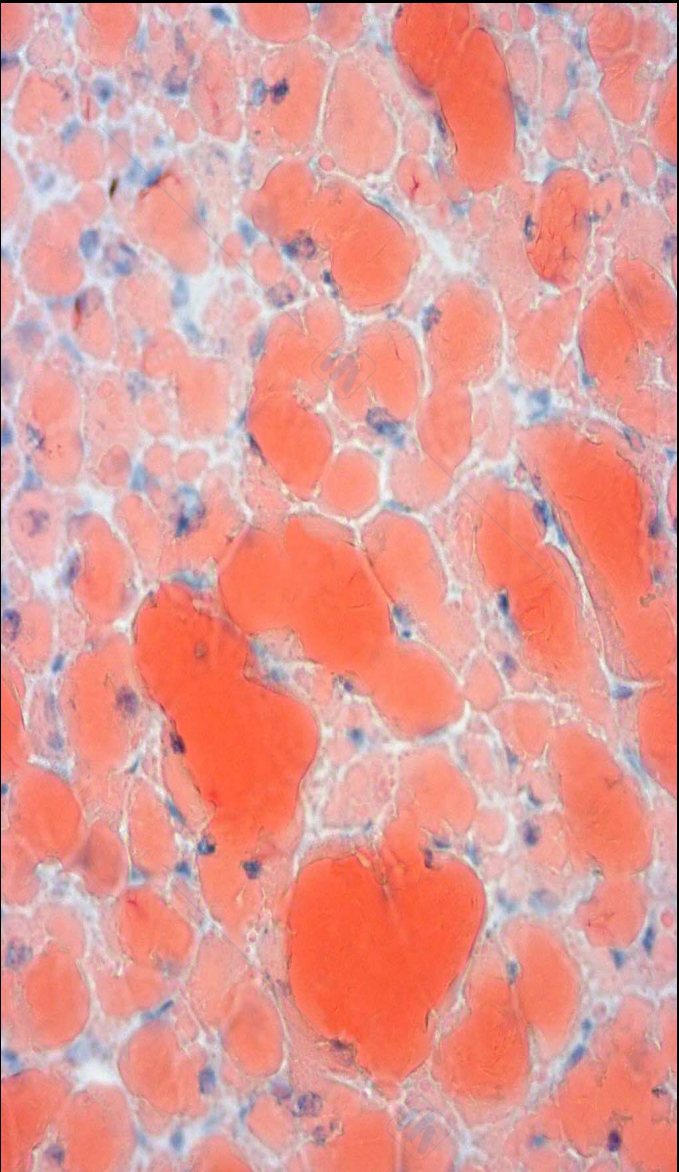
Metodo del Solfato blu di Nilo (Cain)

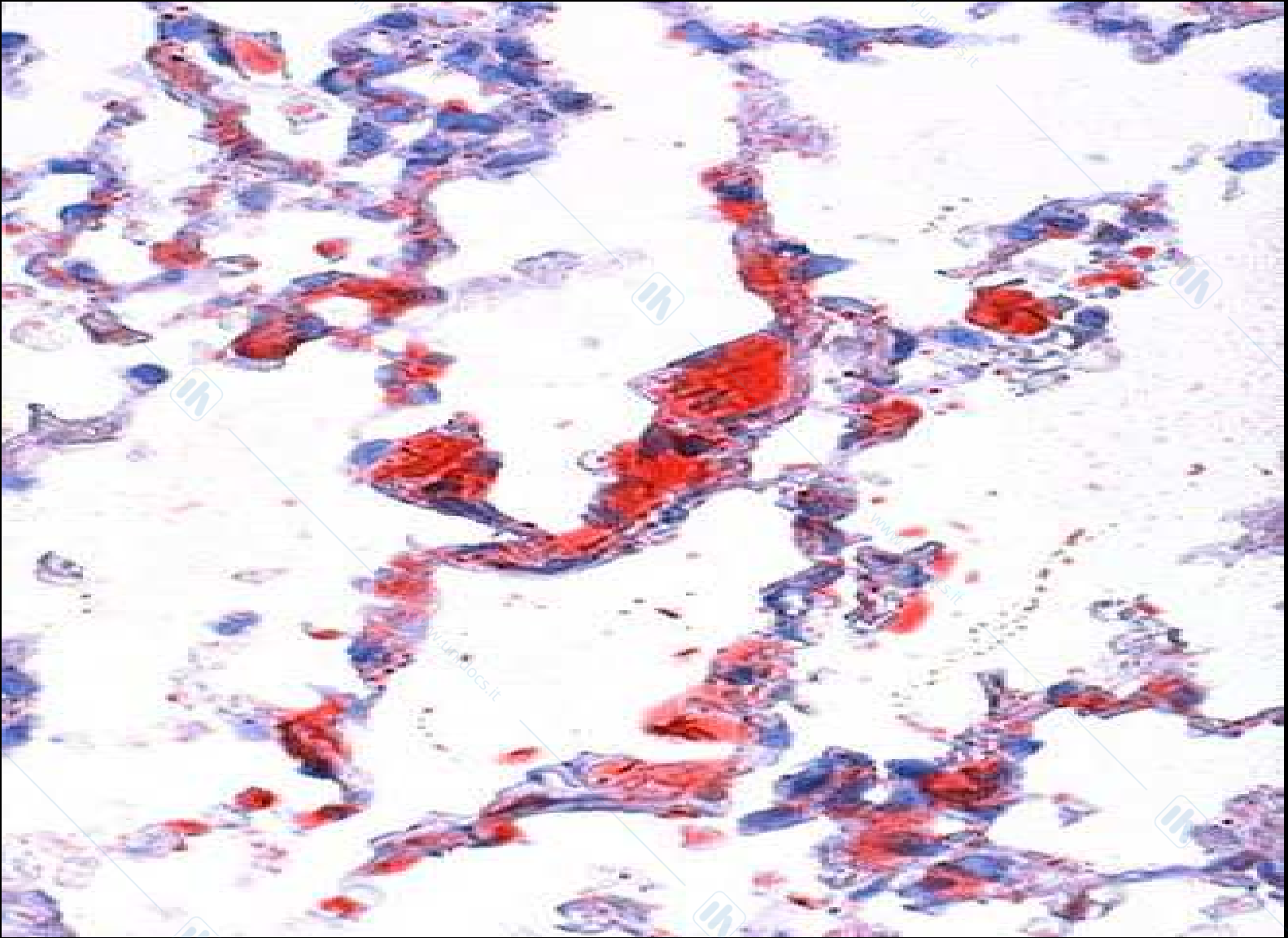
Tale colorazione permette di differenziare i lipidi neutri da quelli acidi, in quanto il blu Nilo è composto da due coloranti:

il rosso Nilo, un colorante lisocromo che colora in rosa i grassi neutri; il blu Nilo, un colorante basico che si lega ai grassi con carattere acido. Il blu Nilo inoltre, per la sua basicità, colora anche gli acidi nucleici ed i proteoglicani acidi.

Per i fosfolipidi la colorazione usata è il Luxol Fast Blue metodo già riportato per le guaine mieliniche colora altrettanto bene i fosfolipidi.







Colorazione per le sostanze inorganiche nei tessuti

Con i comuni metodi per la maggior parte dei componenti inorganici diffusibili (es. sali di sodio, potassio) non ci sono tecniche adatte perché queste sostanze si trovano a una concentrazione inferiore ai limiti di sensibilità.

Sono però rivelabili i sali di calcio e di ferro infatti questi elementi si possono legare ai coloranti in vari modi.

Si possono legare elettrostaticamente (lacca), possono essere chelati tramite legame covalente, l'elemento può essere sostituito o rimpiazzato dal colorante o l'elemento può interagire con un reattivo formando un sale colorato.

Un'altra tecnica per la valutazione delle sostanze inorganiche è la **microincenerizione**.

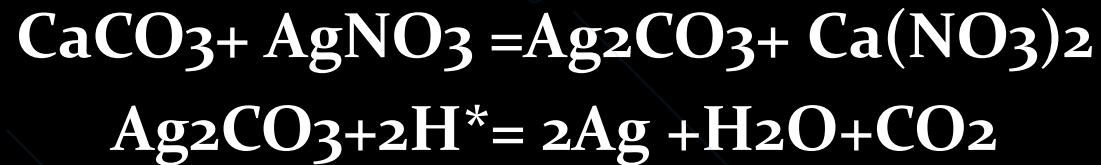
Calcio

Il calcio è presente nella cartilagine calcificata, nel tessuto osseo sotto forma di sale solubile (cloruro, solfato) nel siero del sangue in forma ionizzata o ionizzabile e combinato con il siero o con altre proteine in forma mascherata. La presenza di calcio insolubile, sotto forma di depositi insolubili di fosfati e carbonati, nei tessuti molli è un evenienza patologica.

Per rivelare il sale calcico lo si trasforma in un sale di un metallo pesante più o meno intensamente colorato (reazione di conversione)

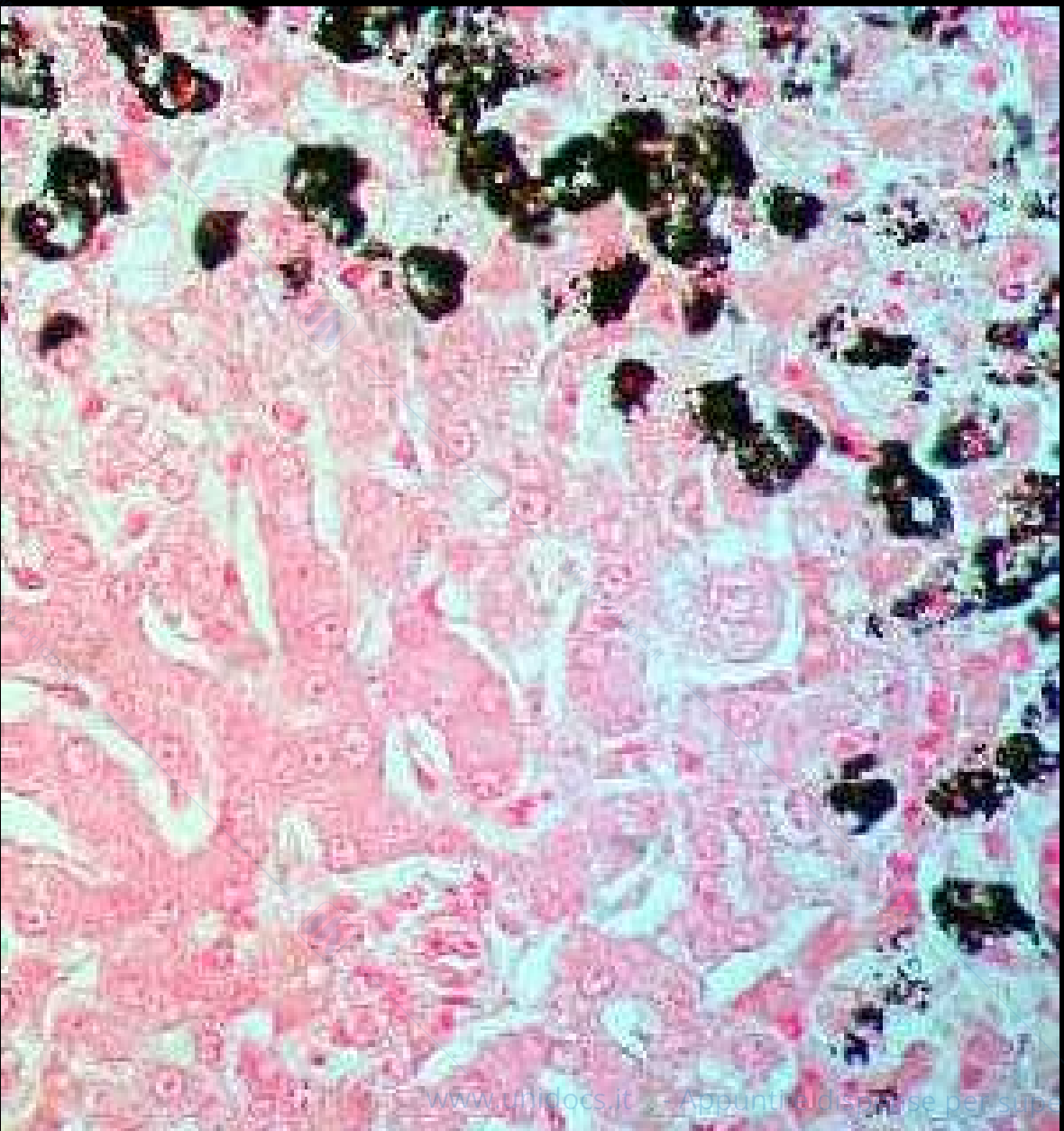
Metodo Von Kossa

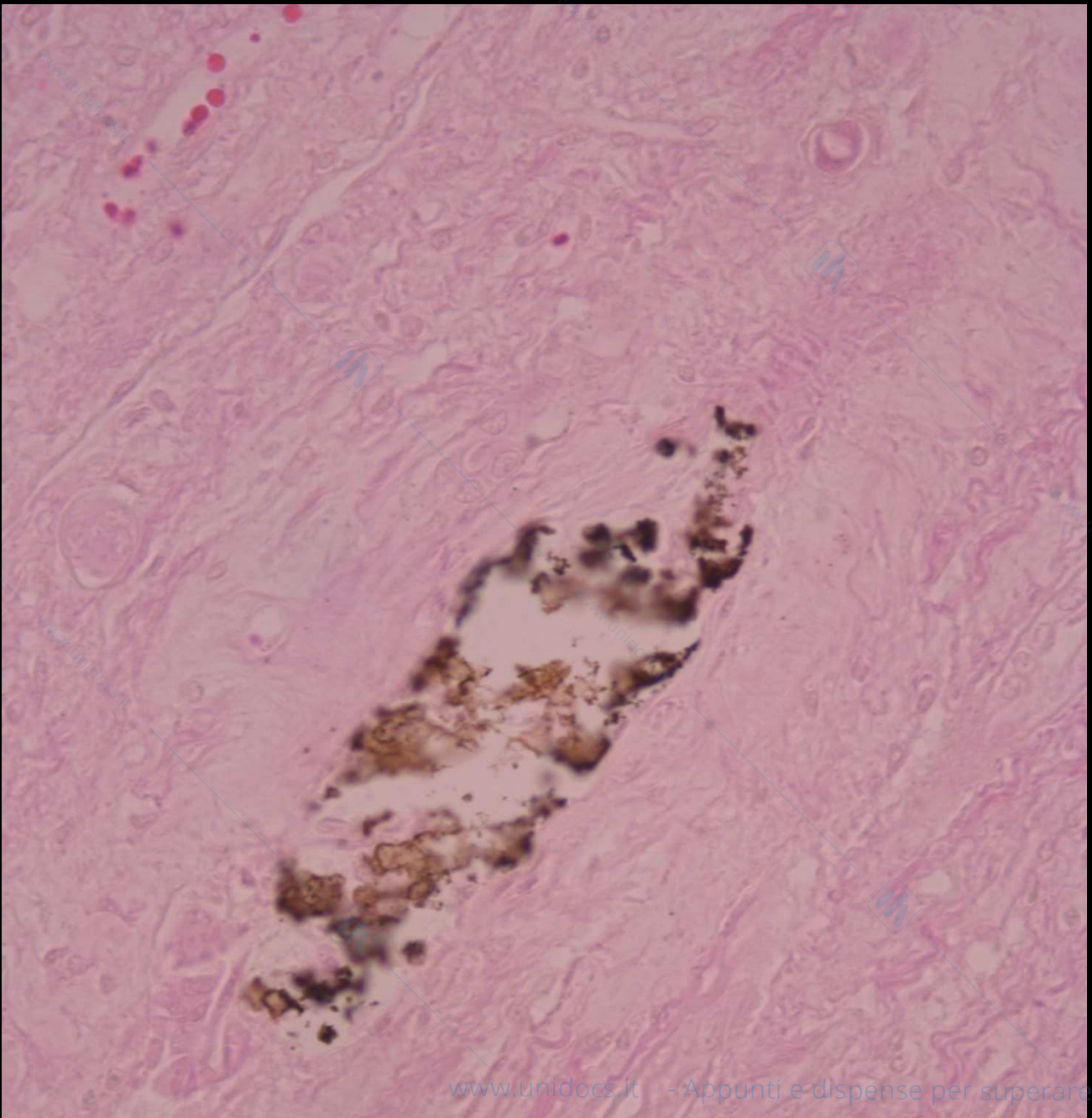
Il principio si basa sulla conversione di uno dei sali di calcio (carbonato o solfato) nell'equivalente d'argento con successiva riduzione ad argento metallico nero



In presenza di basse concentrazioni di calcio, l'argento può essere catturato dalle proteine provocando un annerimento diffuso in tutto il tessuto può essere causa di false localizzazioni





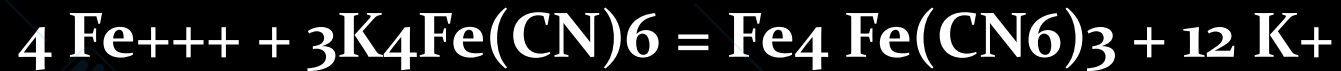


Ferro

Solo le forme di riserva e di accumulo ionizzate o facilmente ionizzabili possono essere dimostrate istochimicamente (ferritina, emosiderina), mentre non è dimostrabile il ferro che fa parte di composti organici in cui è strettamente legato alle proteine (emoglobina) se non vengono distrutte le parti organiche della molecola al quale il ferro è legato (tecnica che porta alla distruzione di tutto il tessuto in esame). Il ferro è conservato nei tessuti sotto forma di emosiderina e di ferritina, un complesso tra la proteina apoferritina e ferro ferroso.

Metodo di Perls

La reazione più specifica e sensibile per il ferro ionizzato trivalente (composti ferrici) è la reazione con il ferrocianuro di potassio, che con i composti ferrici si trasforma in blu di prussia, fortemente colorato in soluzioni acide.

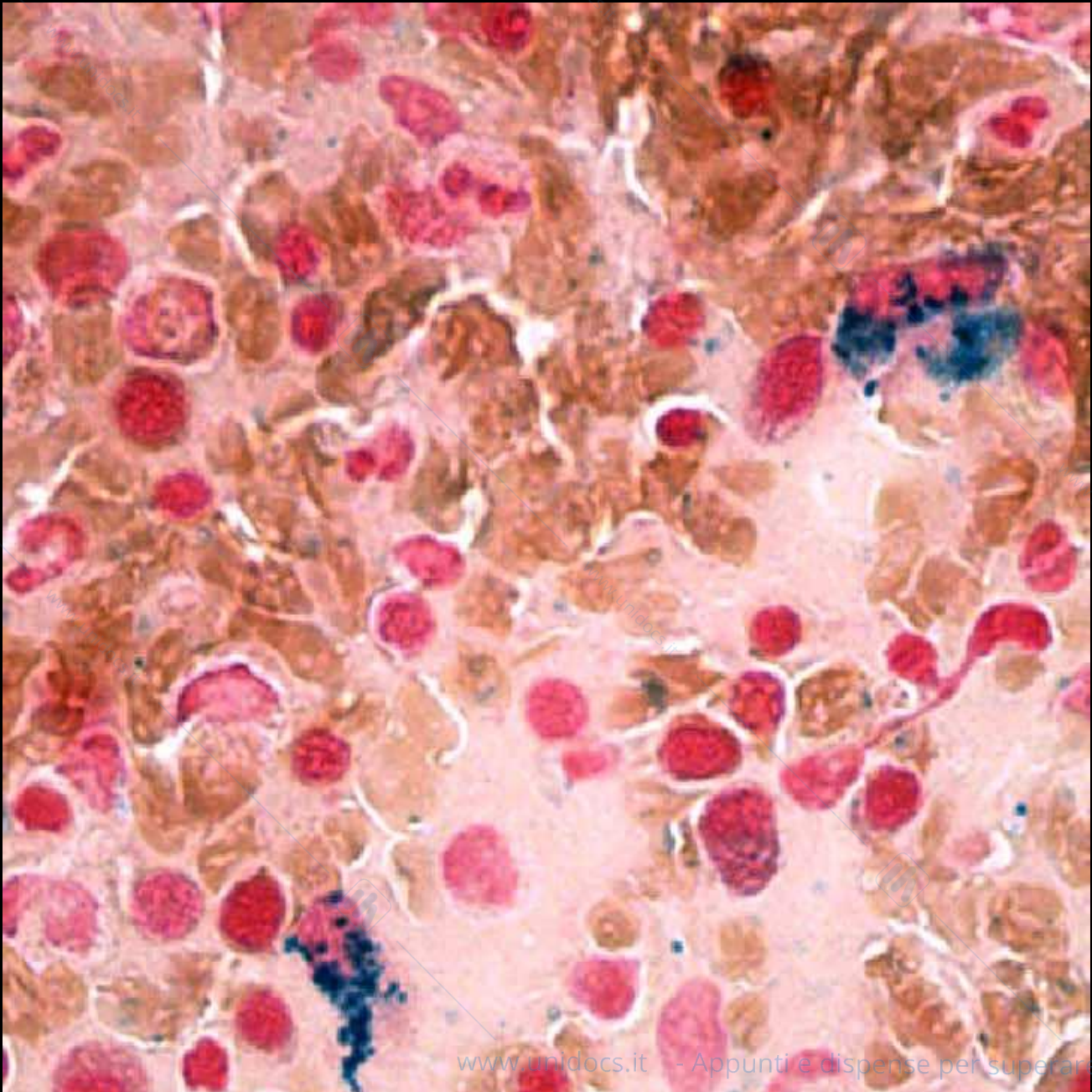


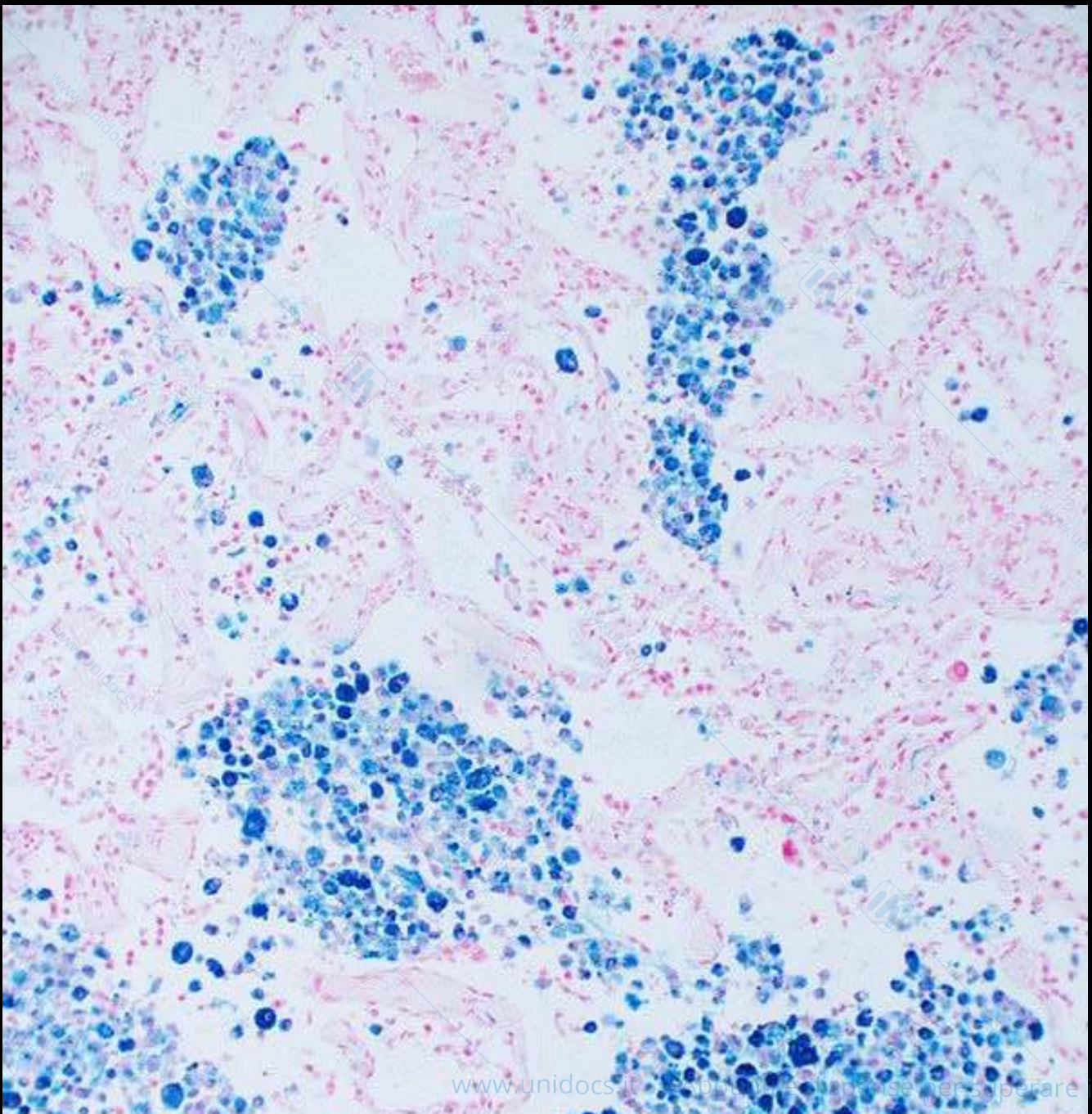
Blu di Prussia

In questo metodo è indispensabile l'uso dell'acido diluito, per liberare lo ione ferrico dalle proteine.

Si esegue infine una colorazione di contrasto nucleare con rosso neutro

Si ottiene una colorazione blu per il ferro e rossa per i nuclei.







Metodi e colorazione per batteri, miceti ed inclusioni virali nei tessuti

Queste colorazioni sono indispensabili per individuare la presenza dei più comuni batteri e dei miceti nelle sezioni di tessuto.

Colorazione di Gram

Si basa sul principio che alcuni coloranti, quali violetto di genziana, cristalvioletto, quando vengono mordenzati con una soluzione iodo-iodurata, formano un composto colorante che viene assunto in maniera diversa nei vari batteri, infatti alcuni lo assorbono in maniera permanente e nella decolorazione successiva con alcool non la perdono (Gram positivi); altri assumono la colorazione in maniera labile e vengono decolorati con alcool (Gram negativi)

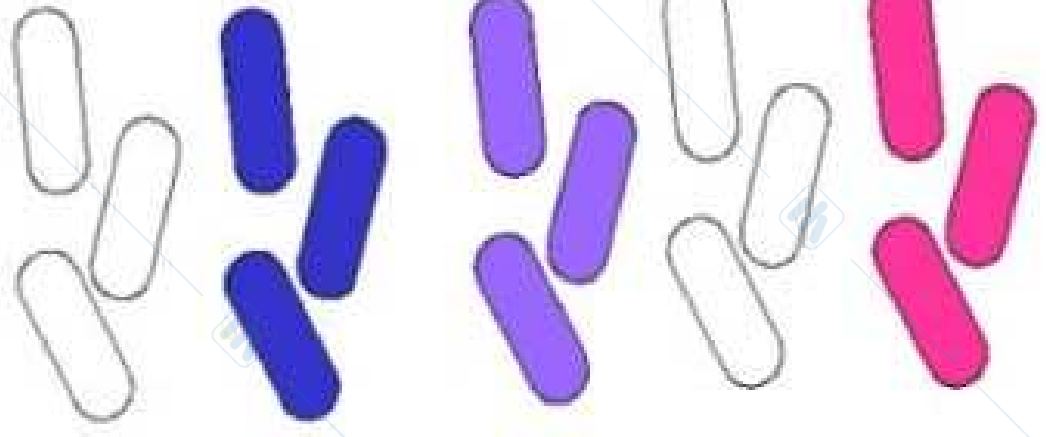
Con questa colorazione i batteri Gram-positivi si colorano in viola scuro (Violetto di Genziana, Violetto di Metile) mentre i Gram-negativi in rosso (Safranina, Fucsina Basica, Rosso neutro).

Colorazione di Ziehl

E' una colorazione differenziale che serve ad evidenziare la caratteristica alcool-acido-resistenza alla decolorazione del bacillo della tubercolosi. La colorazione con Fucsina basica viene decolorata con una soluzione di acido solforico 20% e con una soluzione di alcool 95°. Controcolorazione con blu di metilene.

I batteri alcool-acido-resistenti si colorano in rosso mentre gli altri batteri in azzurro.

Gram negativi



processo di fissazione chimica

Fissazione al calore

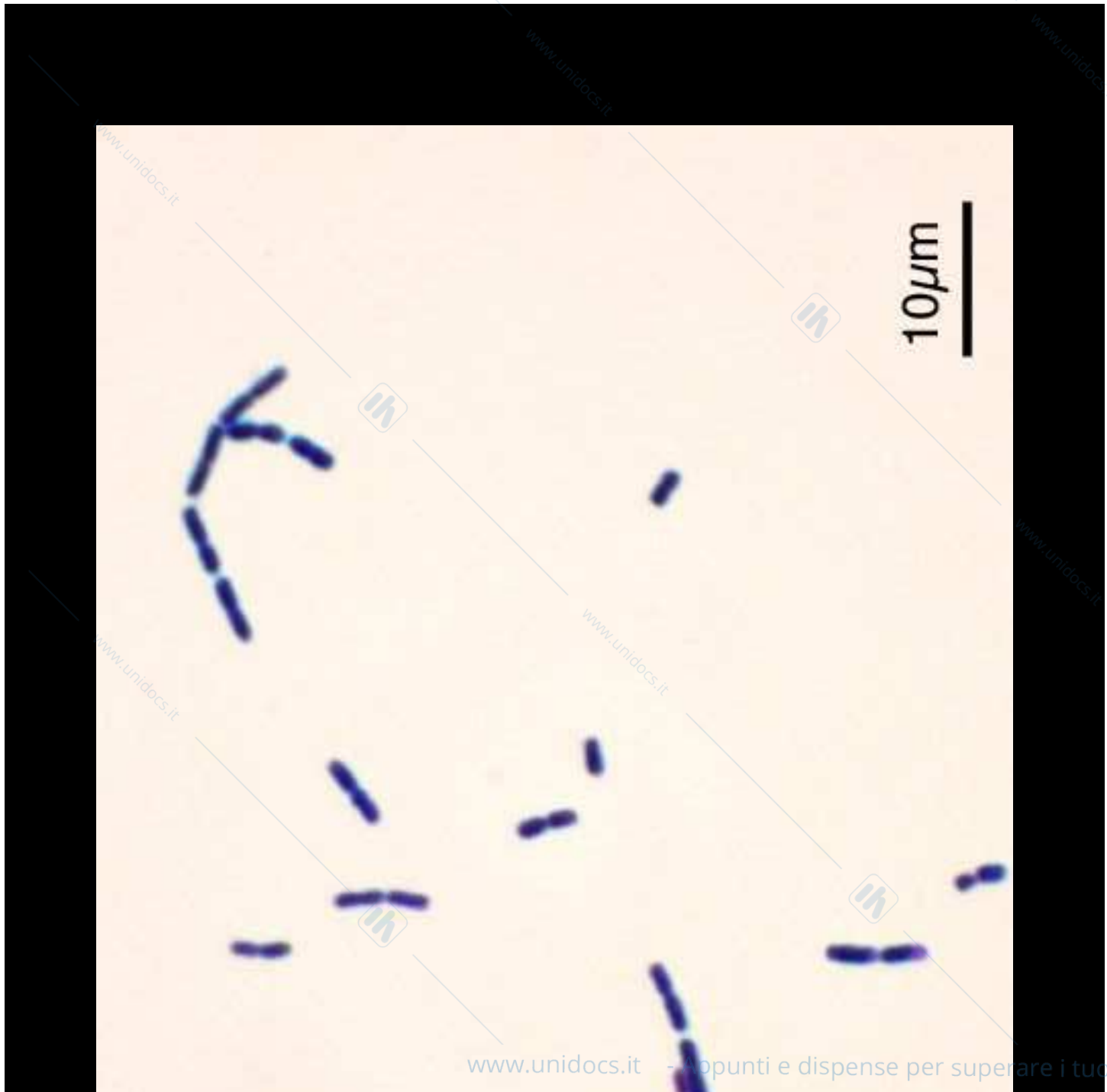
Cristal violetto

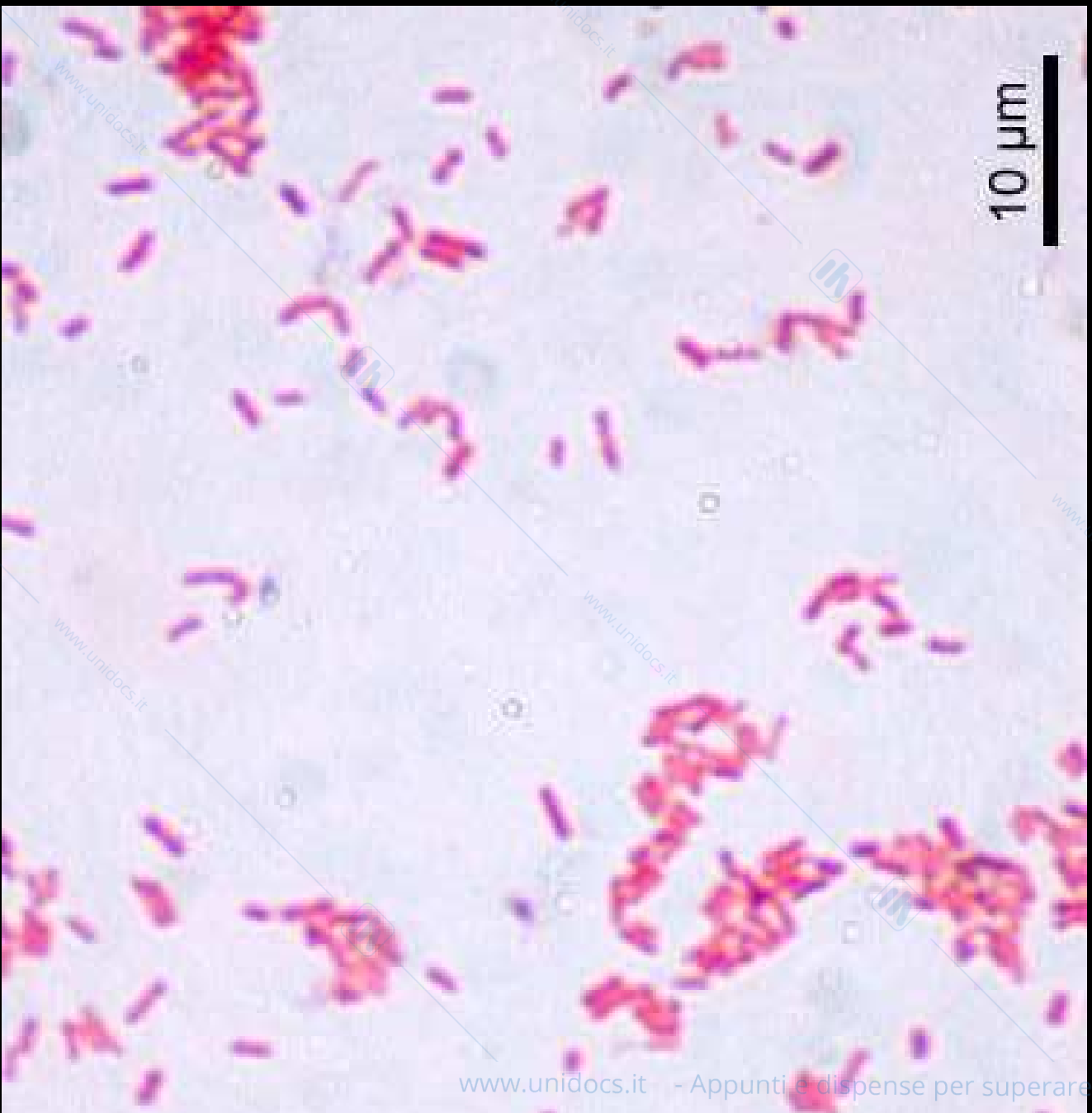
Trattamento con iodio

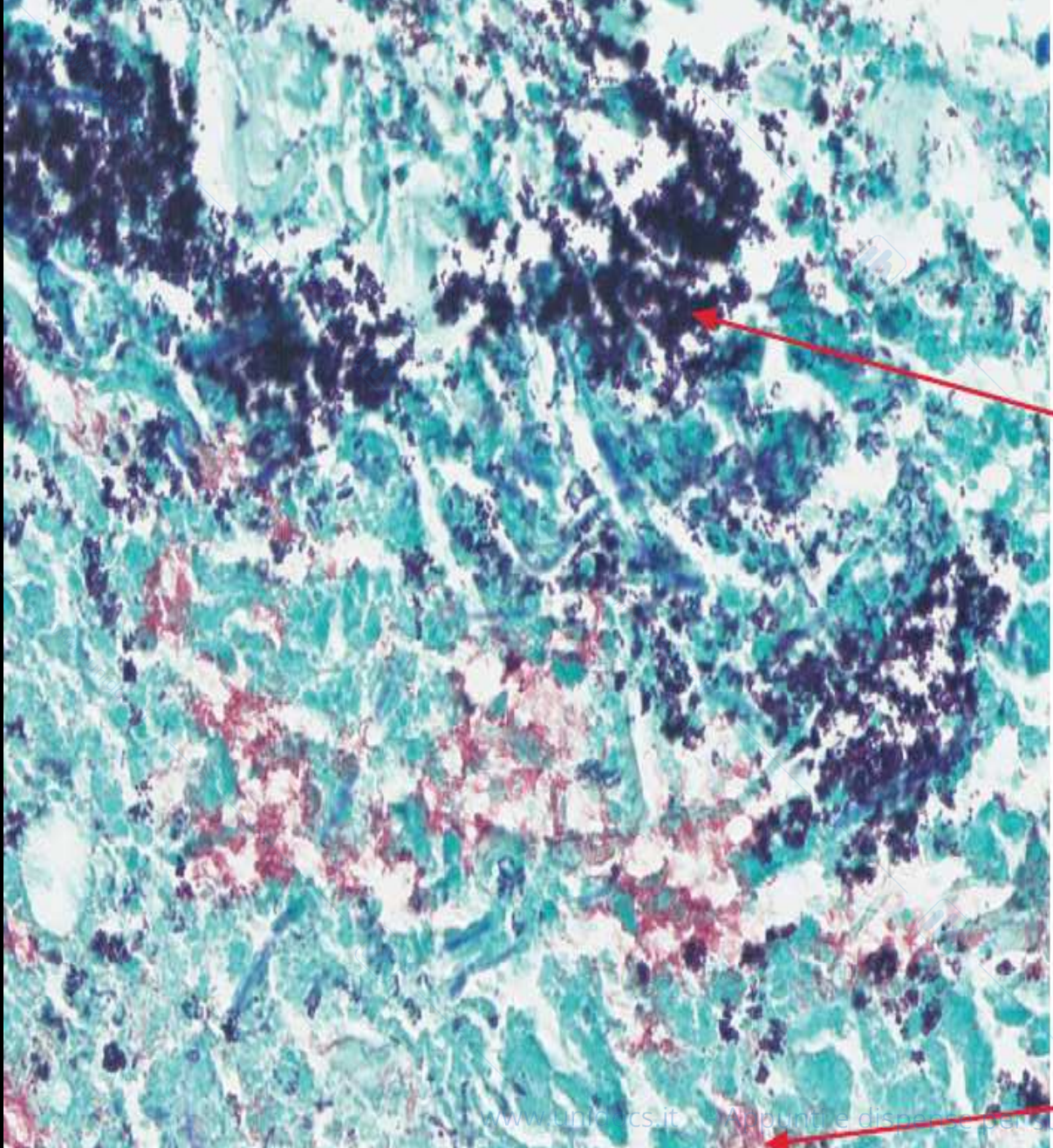
Decolorazione

Colorante di contrasto (safranina)







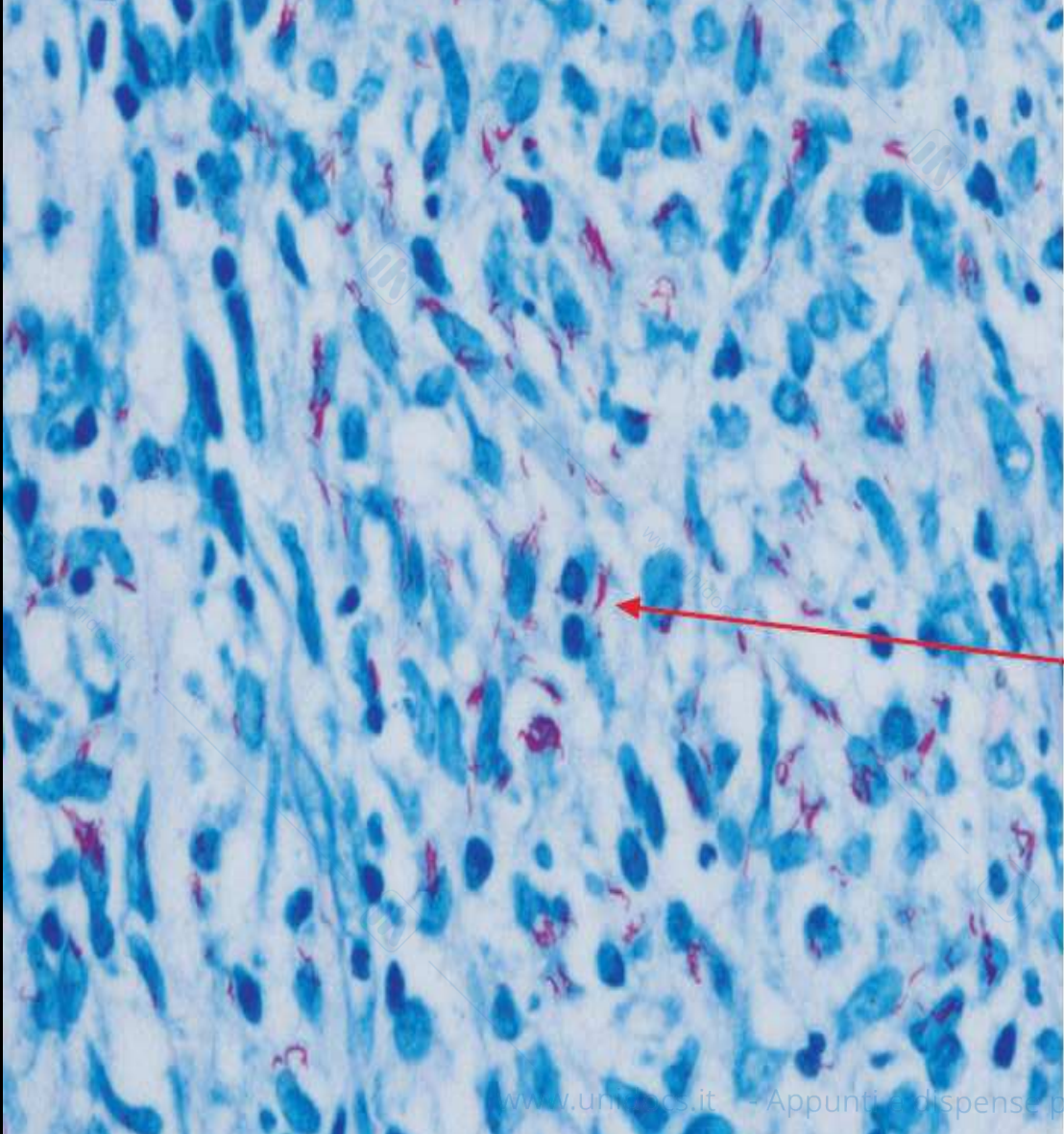


Gram-positive Bacteria:

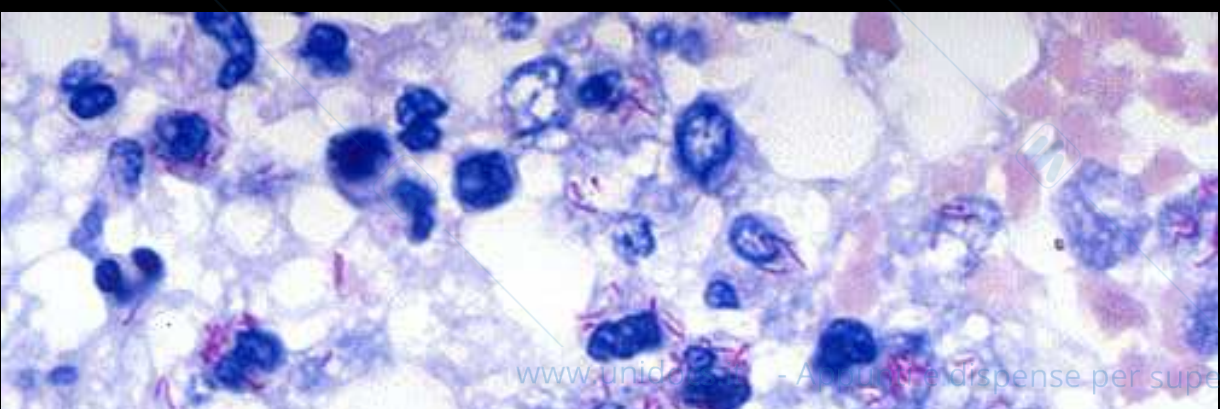
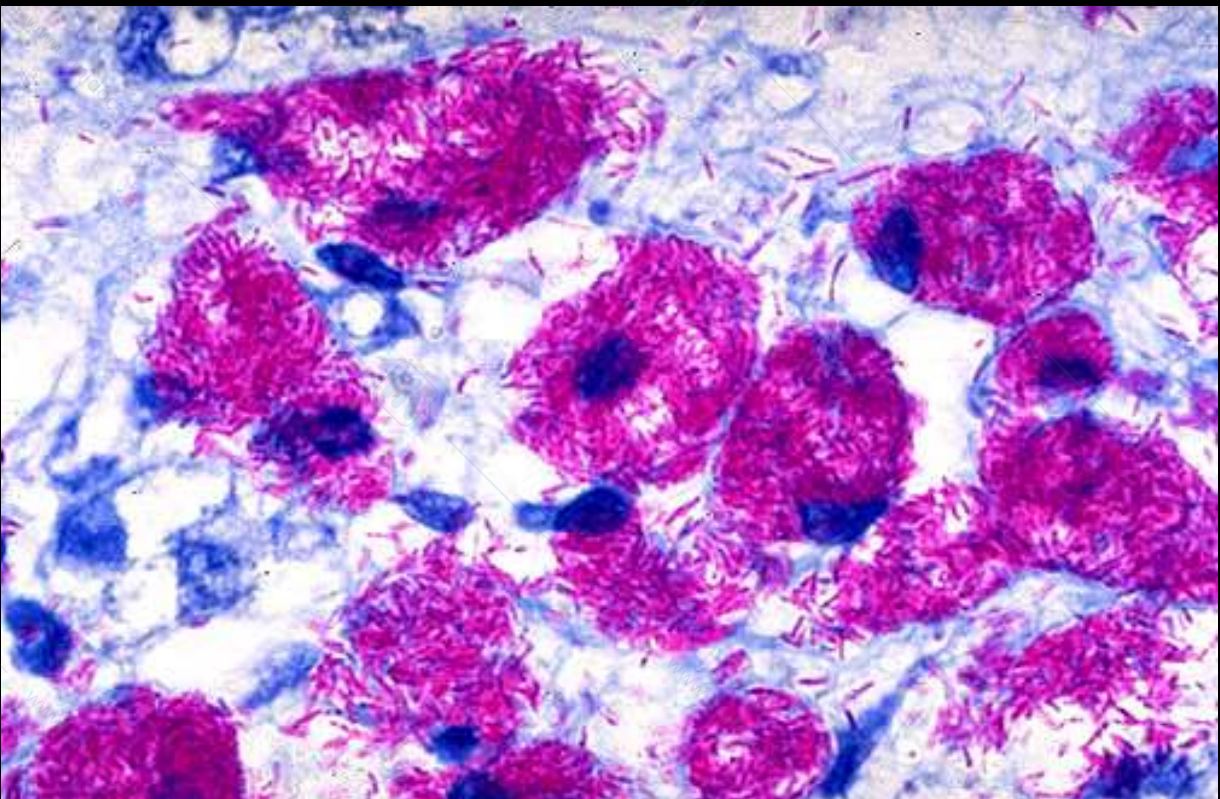
Blue

Gram-negative Bacteria:

Red



Acid-Fast Bacteria:
Varying shades of red



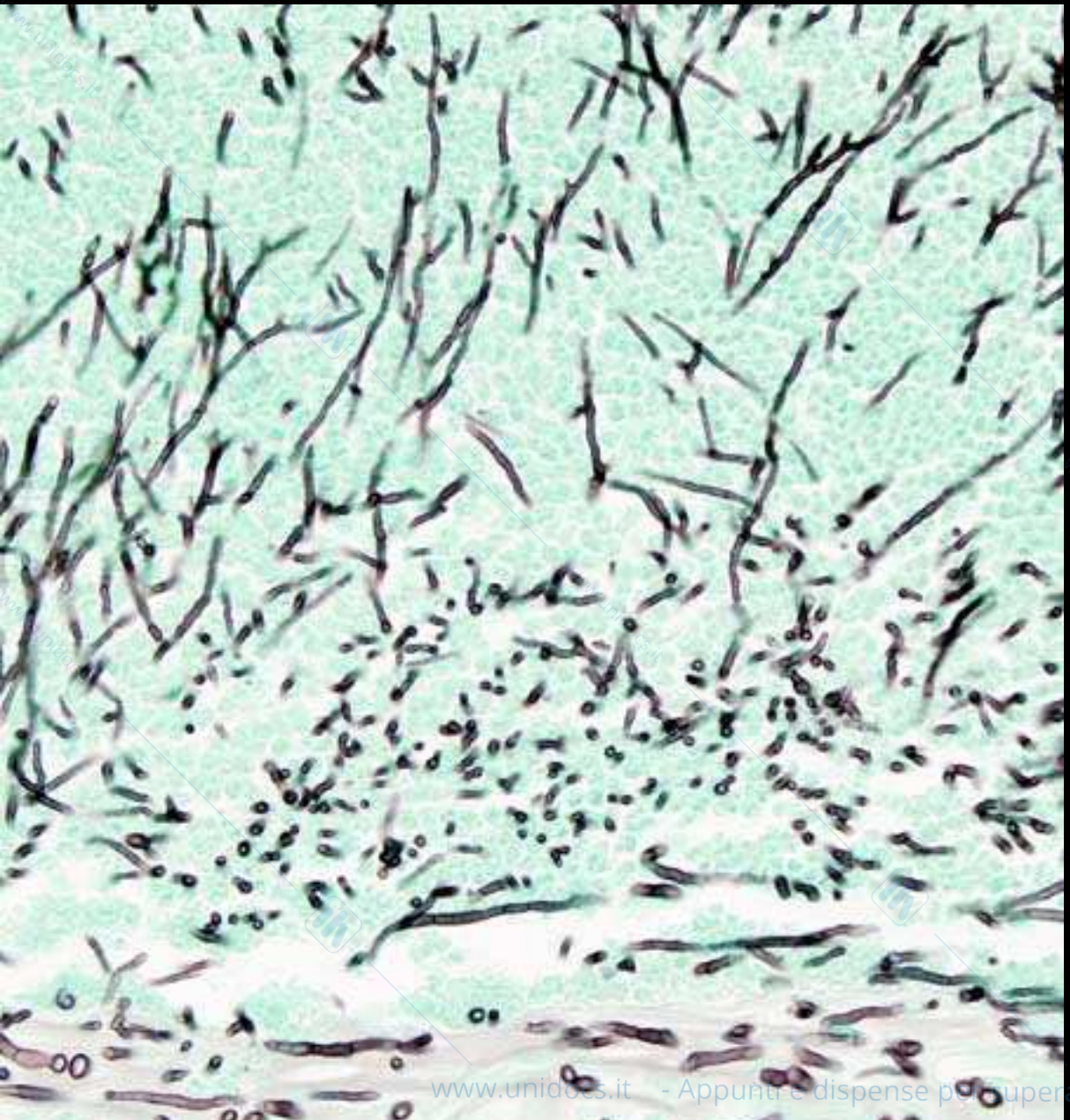
Grocott per i funghi

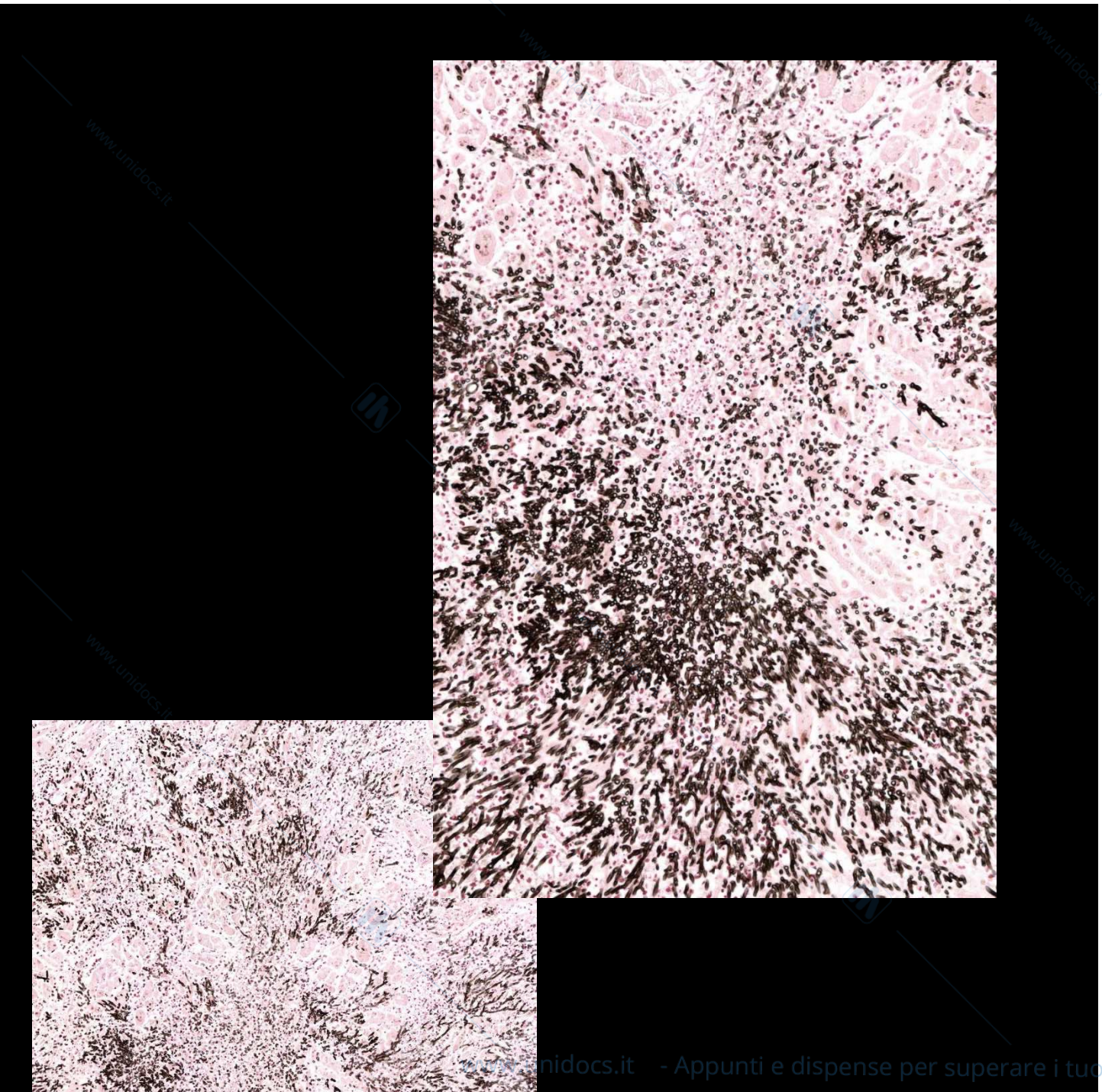
Nella maggior parte dei miceti la parete cellulare è costituita da chitina, polimero della N-acetilglucosamina, cui possono essere associati polimeri del D-glucosio, del D-mannoso, proteine e lipidi.

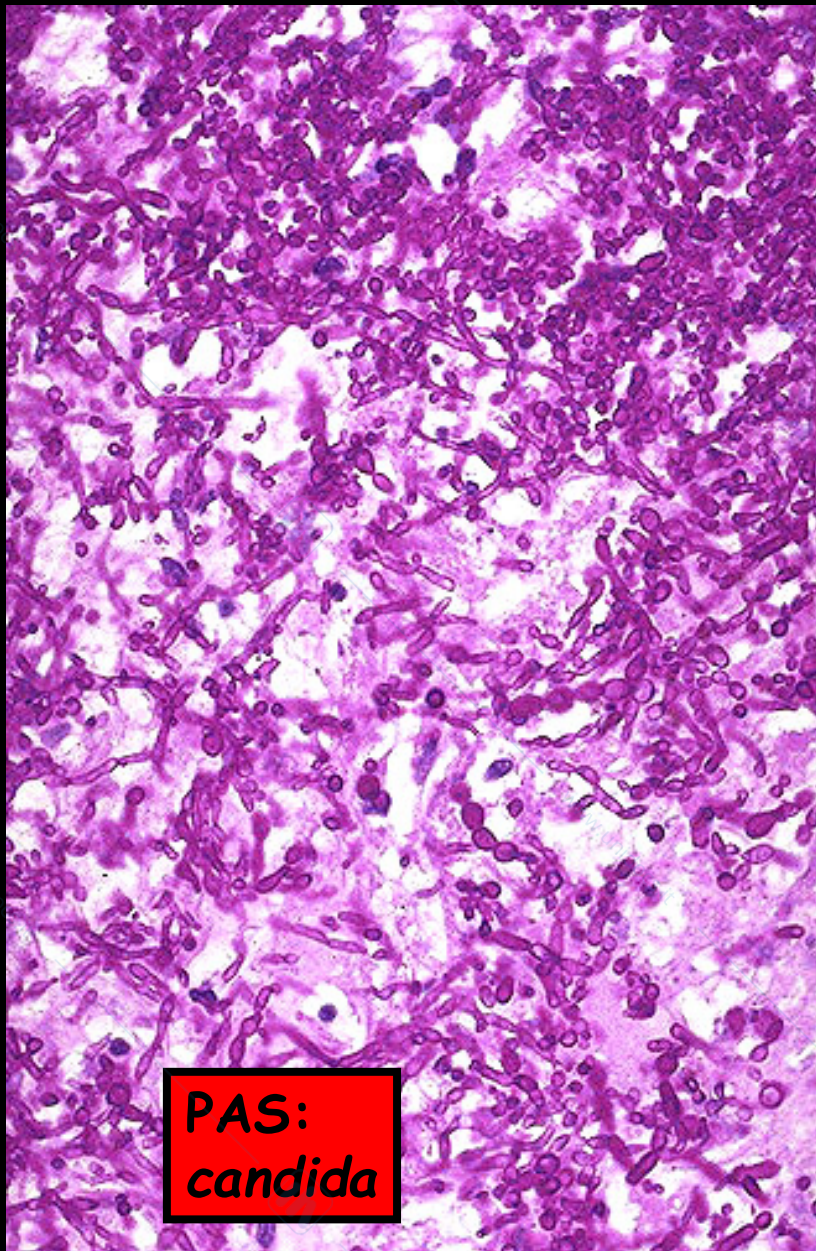
L'acido cromico agisce sui gruppi glicolici e glicoaminici presenti nella catena polisaccaridica ossidandoli a gruppi aldeidici con conseguente rottura della catena.

L'argento cloruro, facente parte del complesso argento-metenamina è quindi ridotto ad argento metallico da questi nuovi gruppi aldeidici diventando così visibile.

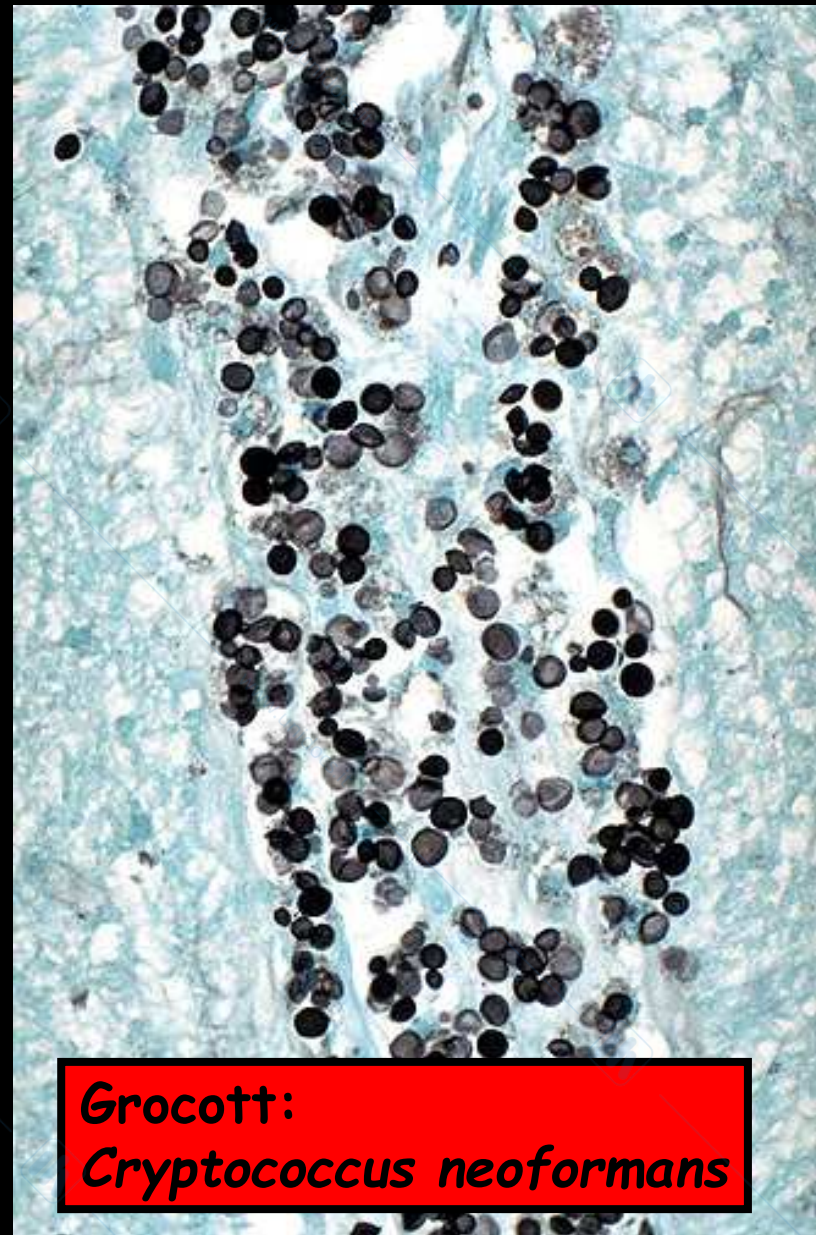
Controcolorazione con Verde luce.



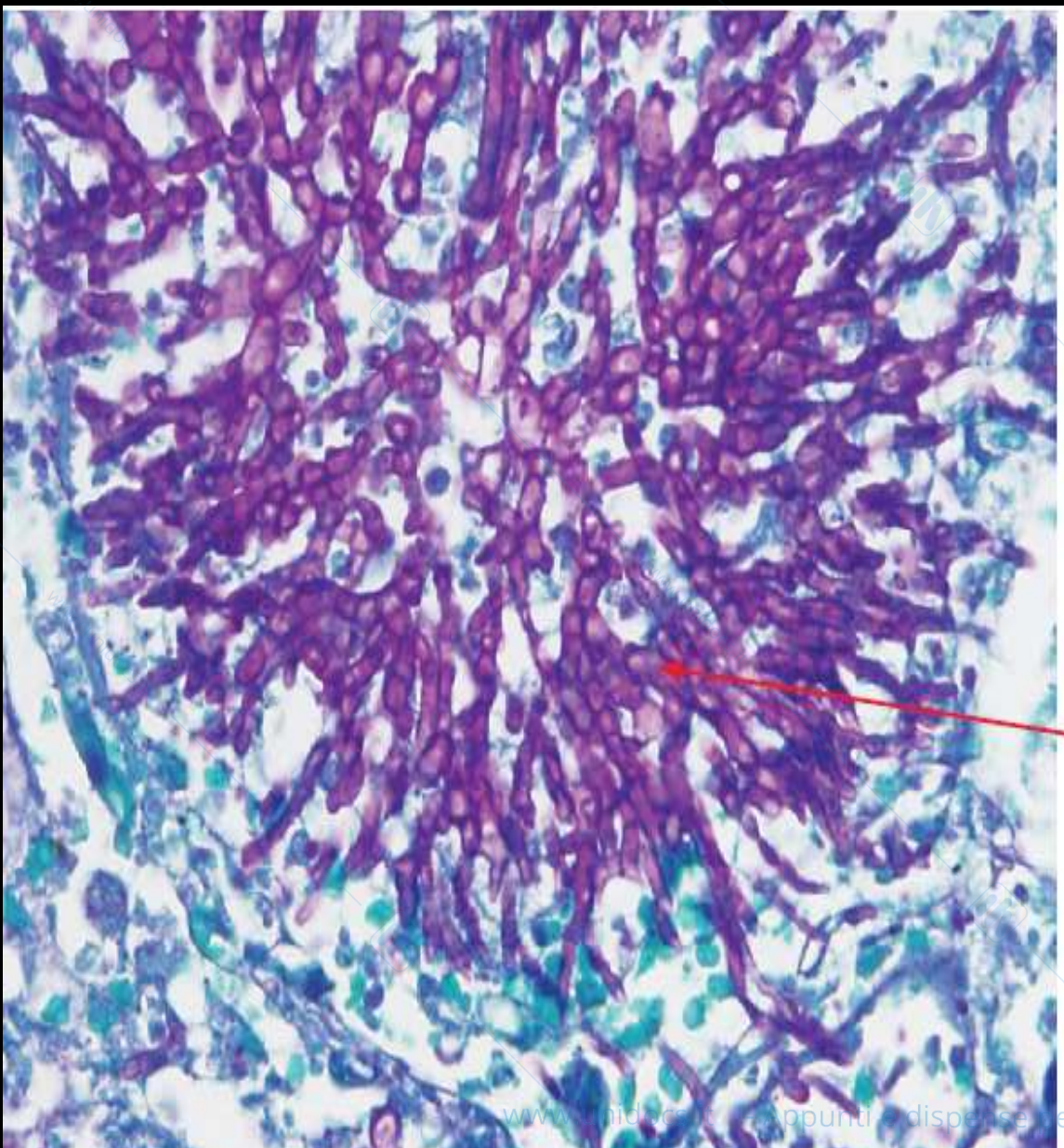




PAS:
candida



Grocott:
Cryptococcus neoformans



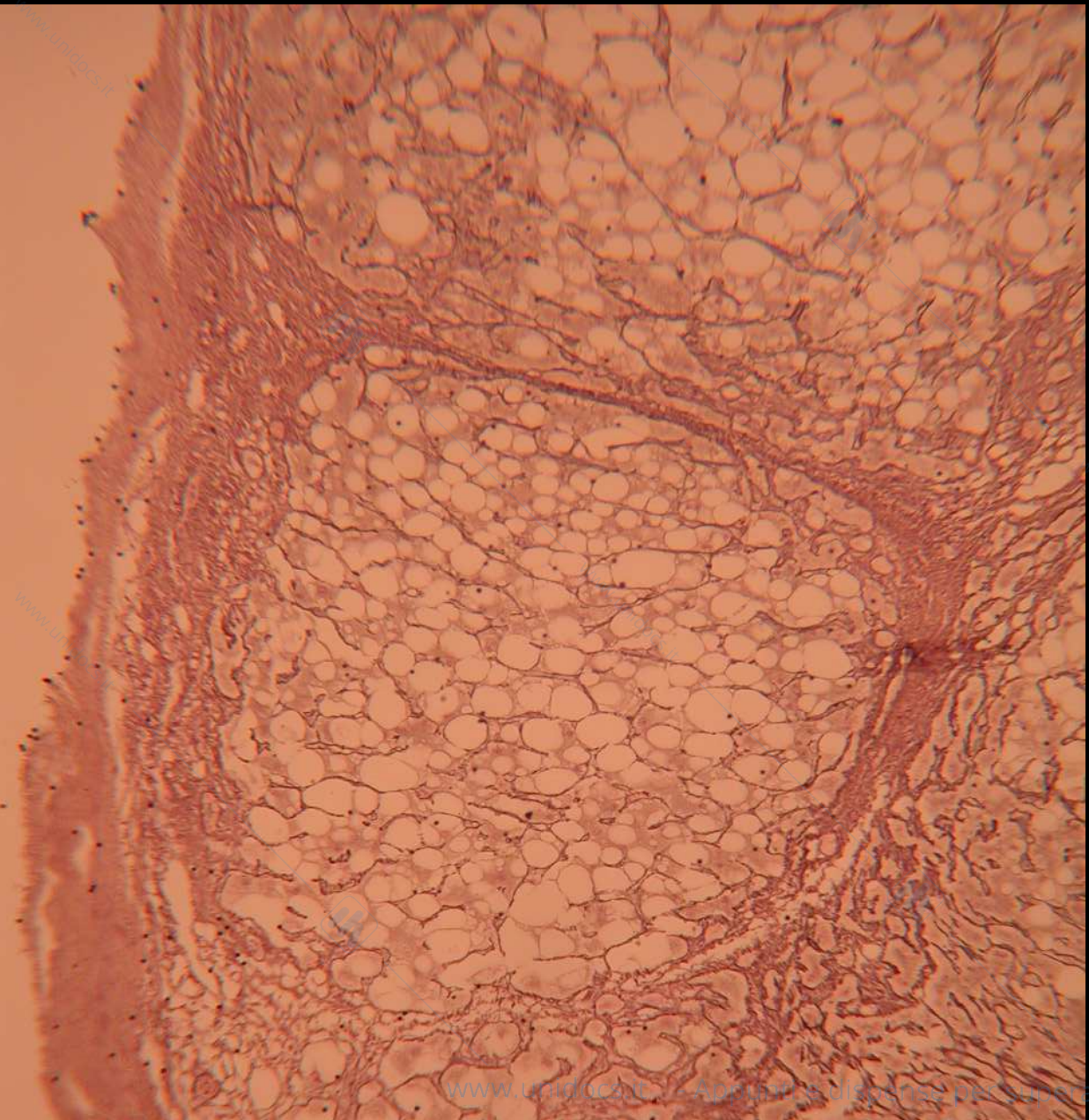
Fungi:
Magenta

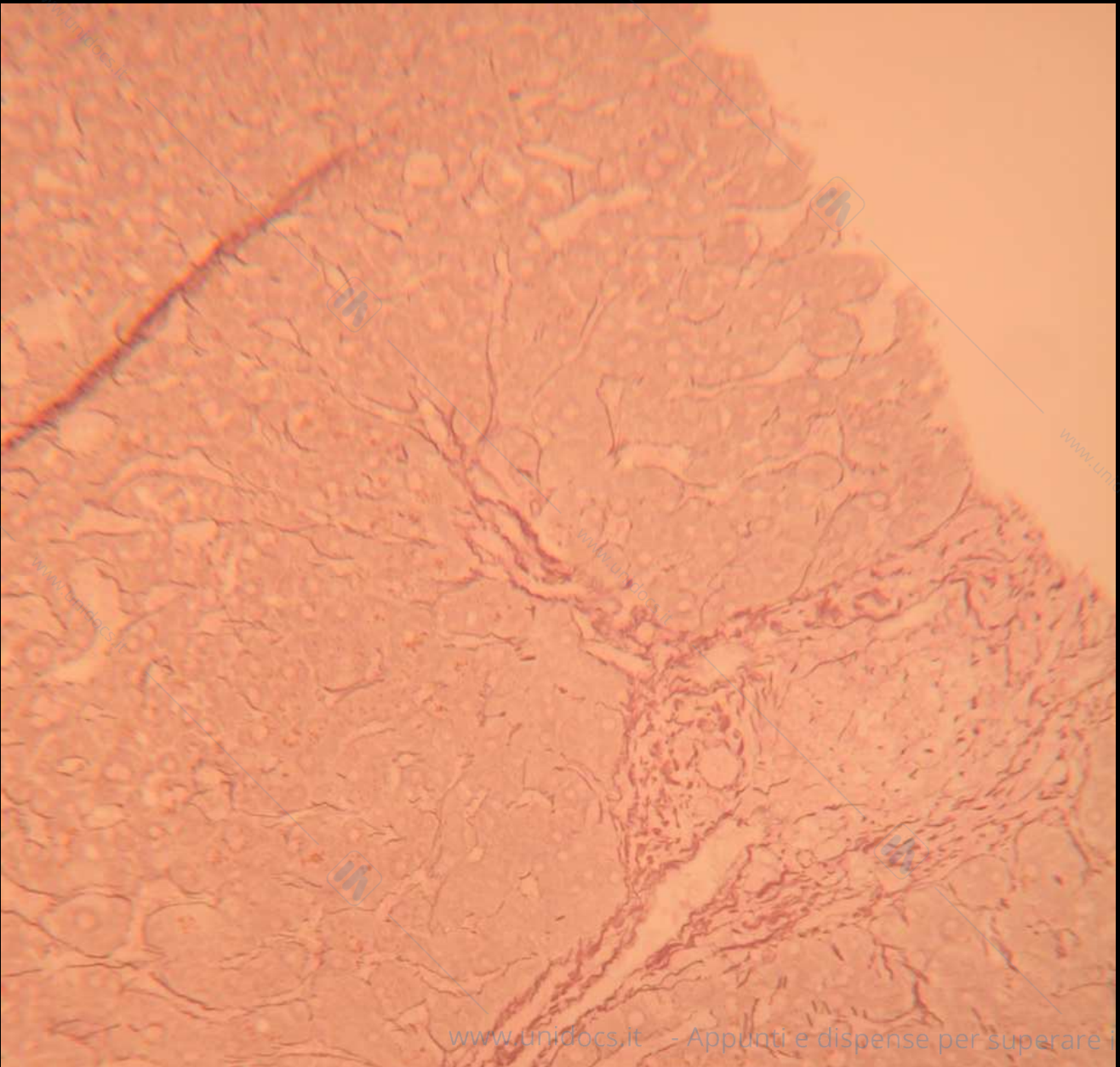
Colorazione Shikata

Questa colorazione risulta molto simile alla colorazione per le fibre elastiche Orceina.

In questo particolare caso si esegue una ossidazione completa del tessuto con una soluzione a base di permanganato di potassio.

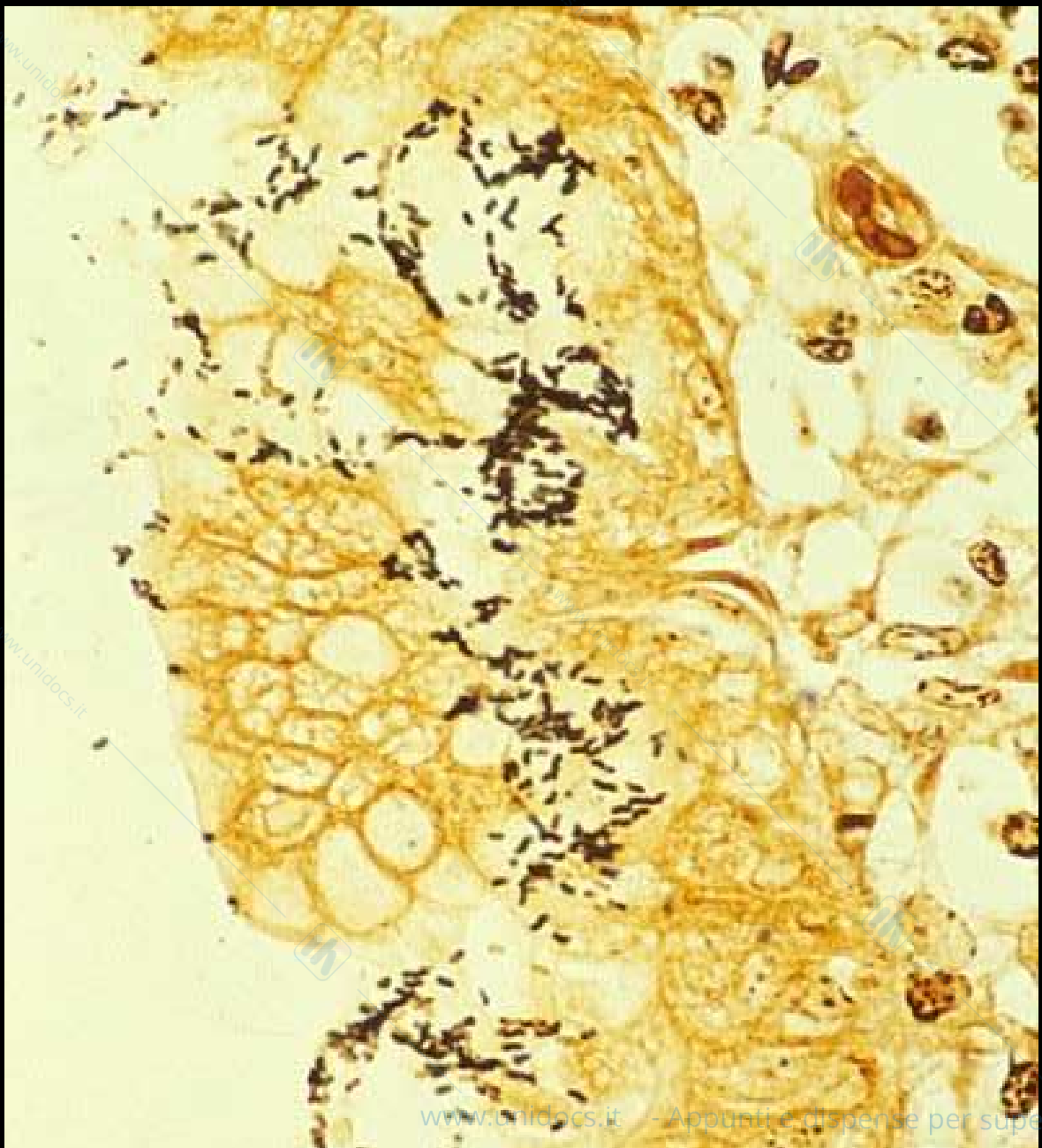
La colorazione viene usata a livello del fegato e oltre a far risultare le fibre elastiche (sinonimo di fibrosi) colora con un pigmento aranciato-bruno anche HBsAg e il pigmento biliare (dovuto a depositi di rame).





Warthin Starry

Di basa su un impregnazione argintica per rivelare la presenza di batteri come l'*Helicobacter Pylori* nello stomaco importante patogeno che può causare importanti patologie come il cancro gastrico o il linfoma MALT dello stomaco





Helicobacter Pylori:
Black

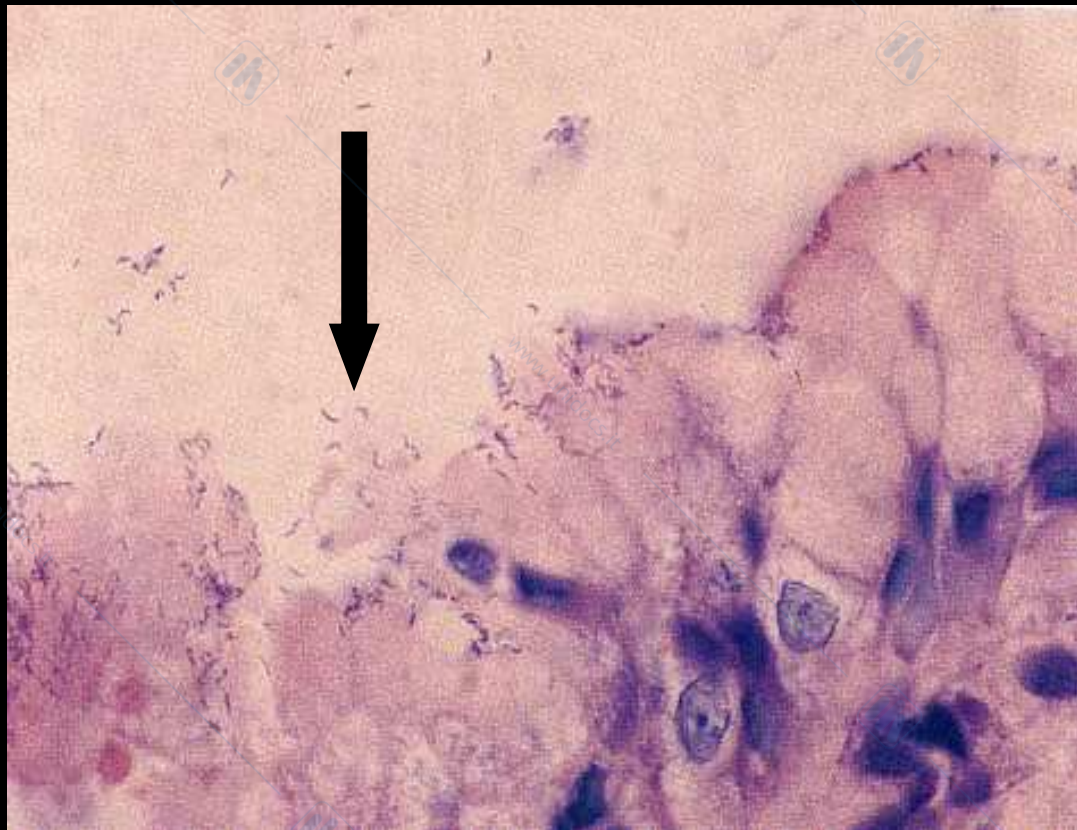
Spirochetes:
Black

Giemsa modificato: ricerca Helicobacter Pylori

Biopsia colorata



Helicobacter Pylori (400X)



Assafrino e inclusione	Sostanze e strutture evidenziate	Note
Formalina, paraffina	Glicogeno, mucine, glicoproteine, membrane basali, vari miceli (<i>Candida albicans</i>)	Viene spesso usata in associazione con Alcian blue
Formalina, paraffina	Mucosostanze solfate	
Formalina, paraffina	Amiloide	Presenta birifrangenza verde alla luce polarizzata
Formalina, paraffina	Emosiderina ed altri sali ed ossidi di ferro	
Formalina, paraffina	<i>Helicobacter pylori</i> , plasmodi, mastcellule	
Formalina, paraffina	Fibre elastiche	
Formalina, paraffina	Funghi	
Formalina, paraffina	Collagene: verde-bleu, muscolo: rosso	
Formalina, paraffina	Muscolo: giallo, collagene: rosso	
Formalina, paraffina	Muscolo: rosso, collagene: verde	
Formalina, paraffina	Bacilli alcool-acido resistenti	
Formalina, paraffina	Granuli argentaffini e melanina	
Formalina, paraffina	Reticolo stromale	
Formalina, paraffina	Depositi di calcio	
Formalina congelata	Lipidi	Si può usare anche materiale fissato in formalina, ma non incluso in paraffina
Formalina, paraffina	Spirochete (<i>Treponema pallidum</i>)	