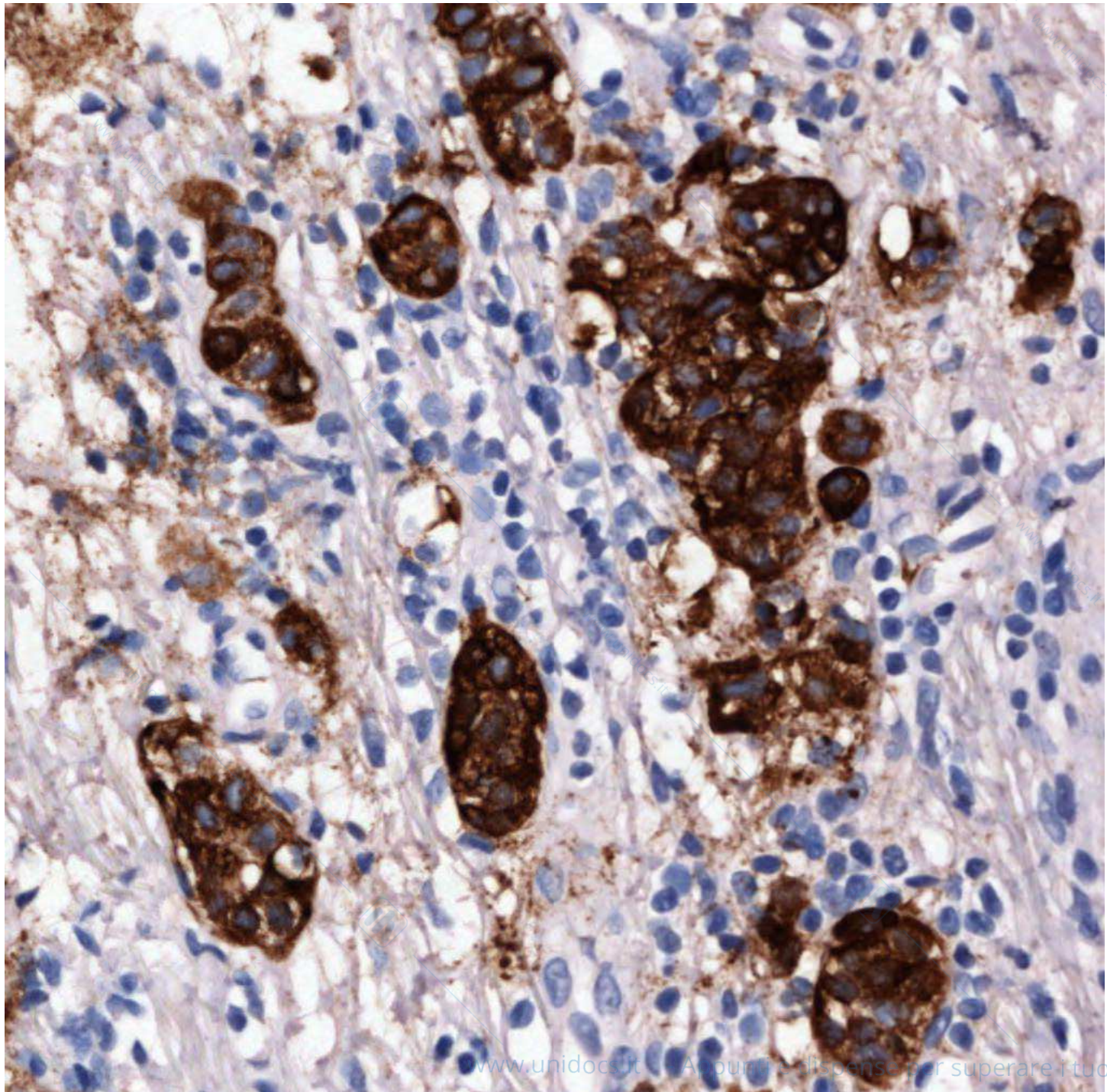


# IMMUNOISTOCHEMICA

Anno 2020-2021



## Immunoistochimica

Comprende tecniche che utilizzano anticorpi per identificare costituenti cellulari e tissutali come antigeni in situ.

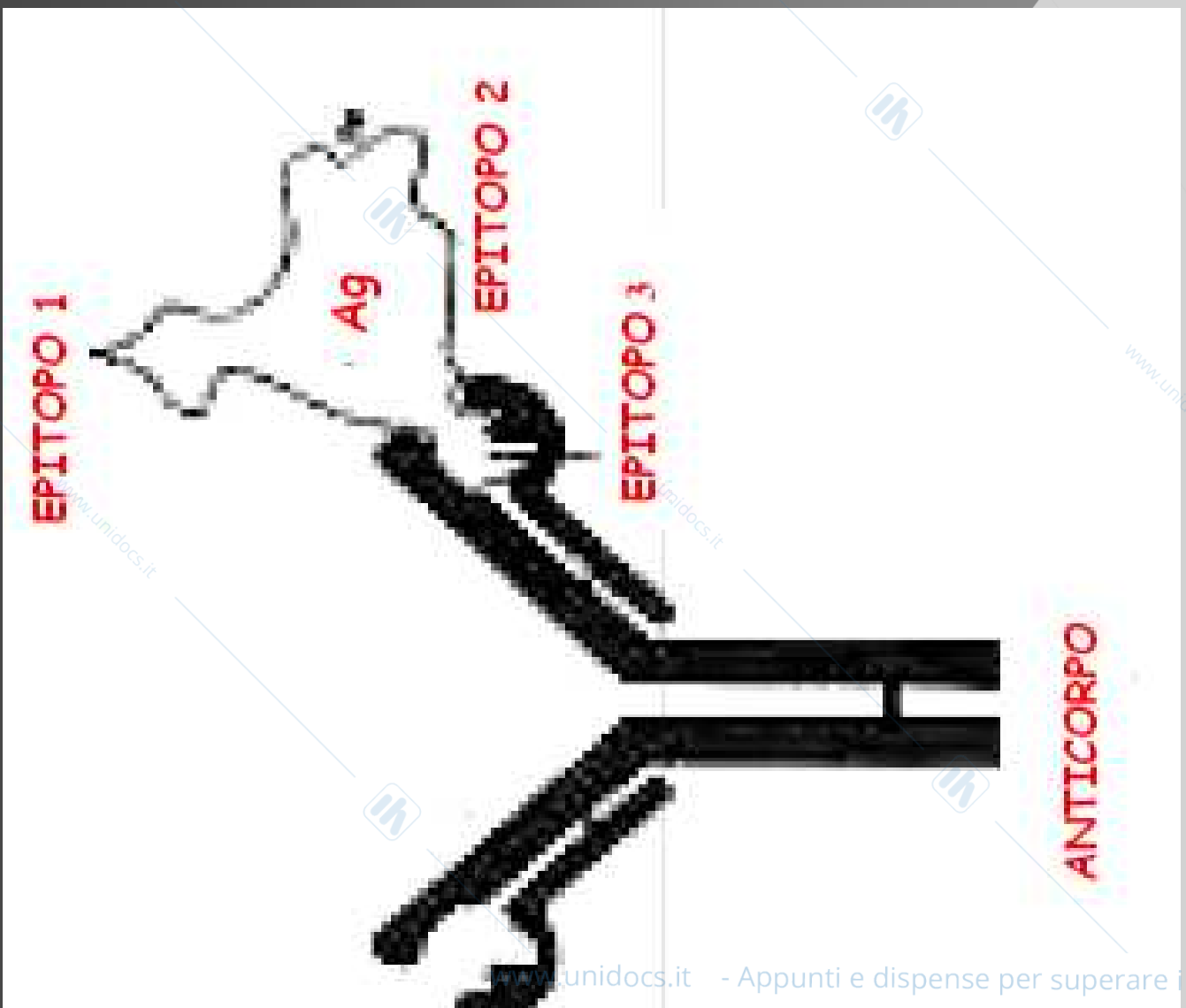
Le tecniche di immunoistochimica possono essere applicate su tutte le tipologie di campione cellule isolate su preparati istologici e citologici.

Queste reazioni sono più specifiche di quelle utilizzate nelle tecniche di istochimica ma risultano più difficili da attuarsi.

**L'antigene** è una molecola proteica, glicoproteica o lipoproteica capace di evocare una risposta immune da parte del sistema immunitario.

Disponendo dell'anticorpo specifico qualunque antigene può essere evidenziato mediante reazioni di immunoistochimica.

Ogni antigene è costituito da una o più porzioni chiamati determinanti antigenici o epitopi differenti tra di loro.



Gli **anticorpi** sono molecole specifiche sintetizzate dalle plasmacellule. Detti immunoglobuline se ne distinguono 5 classi IgA, IgD, IgG, IgE e IgM.

Gli anticorpi usati in laboratorio sono generalmente le immunoglobuline IgG e IgM.

La struttura generale di un anticorpo è a forma a Y, caratterizzata da una parte basale comune che poi si ramifica in due braccia.

Le due estremità sono i siti deputati al legame con l'antigene.

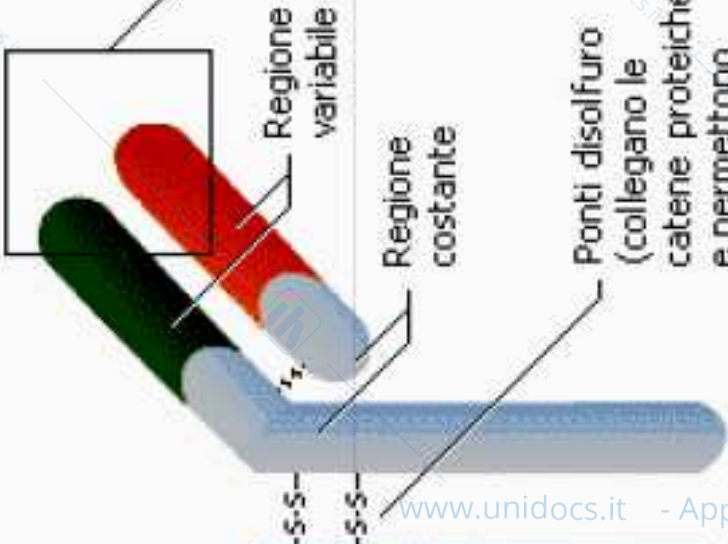
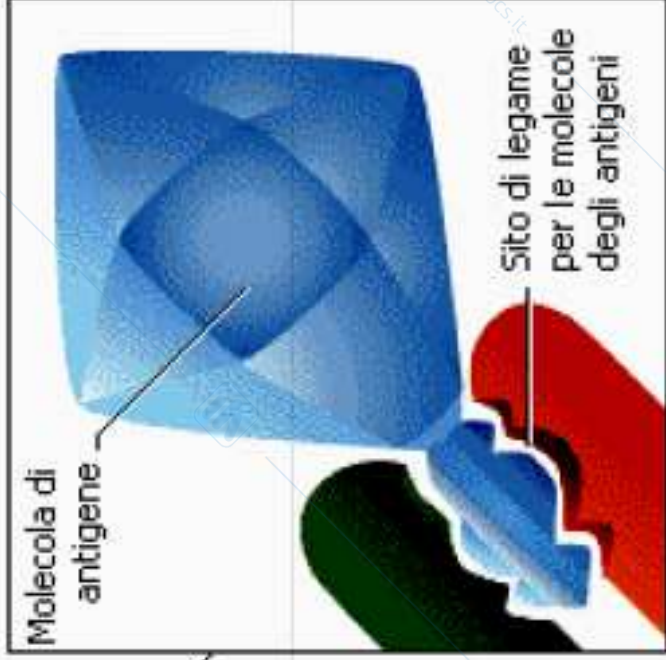
Con l'utilizzo di enzimi proteolitici (es. papaina) si possono dividere le molecole anticorpali in frammenti specifici due frammenti **Fab** (Fragment Antigen Binding) ciascuno contenente un sito di legame per l'antigene e un **Fc** (Frammento Cristallizzabile).

Ogni anticorpo è formato da 4 catene polipeptidiche 2 catene leggere e due catene pesanti uguali tra loro. Queste catene sono unite tra di loro da legami covalenti e non covalenti (ponti disolfuro) e sono tutte coinvolte nel legame con la molecola antigenica.

Le catene leggere e pesanti sono costituite da segmenti ripetuti che si ripiegano in **domini funzionali**. Ogni catena leggera è formata da un dominio variabile e da un dominio costante mentre le catene pesanti sono costituite da un dominio variabile e tre o quattro domini costanti. I domini variabili si trovano all'estremità ammino-terminale e sono responsabili del legame con l'antigene. I domini costanti delle catene pesanti formano la parte basale della molecola anticorpale.

Le braccia delle molecole anticorpali sono molto variabili nella parte estrema e possiedono regioni specifiche dette **regioni ipervariabili** che sono quelle elettivamente deputate al riconoscimento della molecola antigenica da legare.

### Dettaglio della regione variabile



### corpi



Gli anticorpi necessari per le tecniche di immunoistochimica sono prodotti negli animali. Si producono anticorpi in laboratorio iniettando in un animale (topo, coniglio, pecora, capra) un antigene detto “antigene A”. Iniezioni ripetute provocano nell’animale una stimolazione dei linfociti B specifici per quell’antigene a produrre quantità sempre maggiori di anticorpi “anti-A”. Poiché ogni antigene “A” ha più epitopi stimolerà diversi linfociti B e quindi nel sangue troveremo vari anticorpi “anti-A” ciascuno dei quali legherà l’antigene in un sito diverso ottenendo un antisiero eterogeneo. Con questa metodica vengono prodotti **anticorpi policlonali**.

E' stata quindi sviluppata una tecnica che consente di propagare un unico clone di cellule da un singolo linfocita B in modo da ottenere una grande quantità di anticorpi omogenei chiamati **anticorpi monoclonali**.

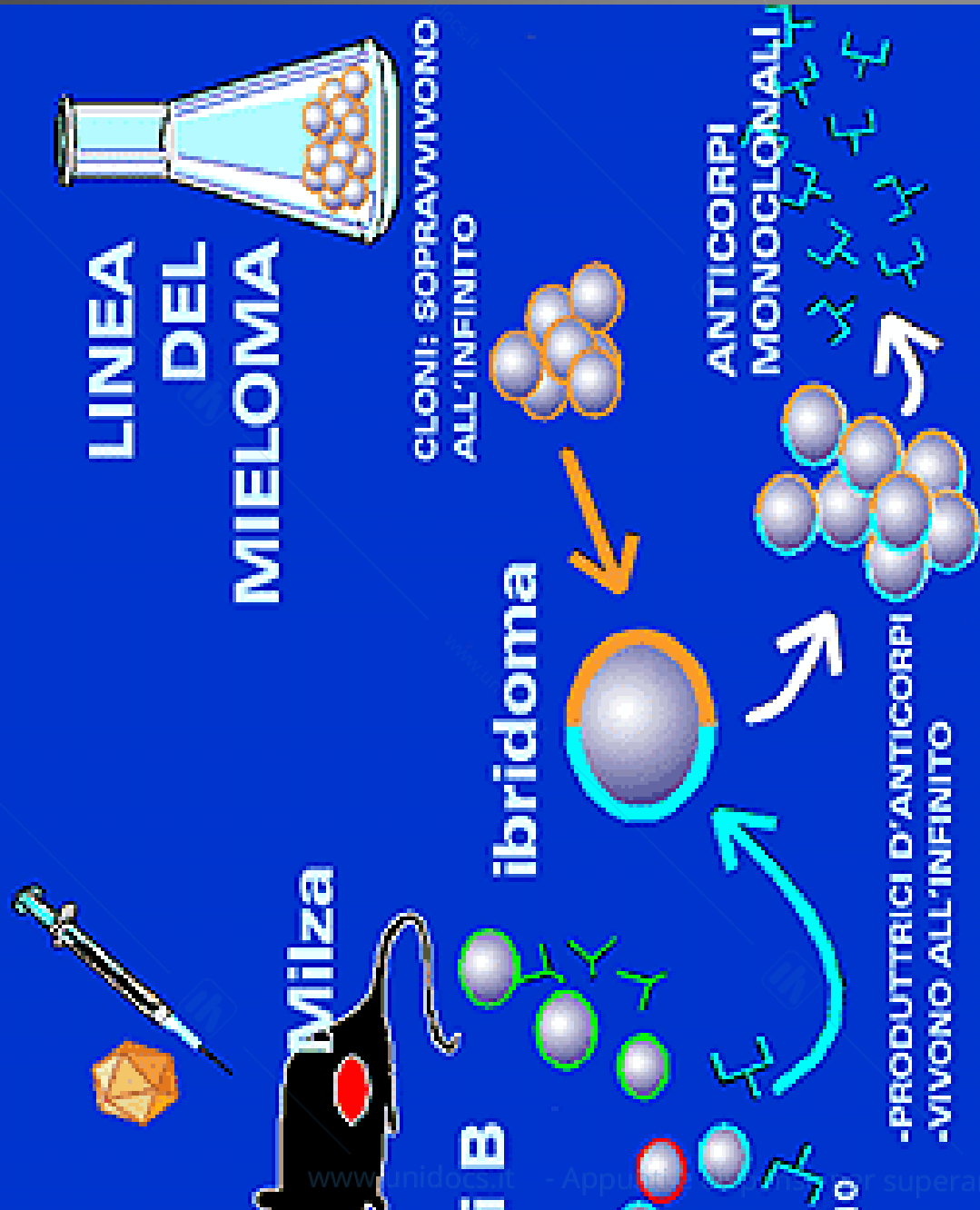
I linfociti in coltura hanno una vita limitata e quindi per ovviare a questo problema singoli linfociti B presi dall'animale immunizzato vengono fusi con cellule derivate da un tumore di cellule B immortali.

Dalla miscela di ibridi che si forma si selezionano solo le cellule che si moltiplicano indefinitamente e in grado di formare un anticorpo specifico. Queste cellule sono chiamate **ibridomi** e vengono propagate come cloni individuali e ciascuna di esse produce stabilmente un singolo tipo di anticorpo monoclonale che quindi riconoscerà uno specifico determinante antigenico.

La fusione tra i linfociti B (provenienti dalla milza di un animale immunizzato) e il mieloma di topo, viene ottenuta per l'intervento di un promotore di fusione di membrana, come il polietilenglicole.

Il terreno su cui sono allevati gli ibridi è di tipo selettivo con il nome di HAT (Hypoxantine-Aminopterin-Thyamidine), che proprio per la sua composizione inibisce la crescita sia dei mielomi che delle cellule ottenute dalla milza non fuse, ma non dell'ibridoma ottenuto dalla fusione.

# SI RICAVANO GLI ANTICORPI MONOCLONALI



# POLICLONALI VS MONOCLONALI

Il complesso tra l'antigene e l'anticorpo che si forma nella reazione immune non è di per sé visibile. E' necessario quindi servirsi di marcatori che direttamente o indirettamente possano evidenziarne la formazione.

Le tecniche che permettono di visualizzare tale reazione sono essenzialmente di due tipi:

- Tecniche immunoenzimatiche
- Tecniche immunofluorescenti

## Immunoenzimatiche

- ◆ Permettono l'osservazione del prodotto finale perché risulta colorato nella reazione tra l'enzima ed il substrato
- ◆ I preparati vanno osservati con un microscopio ottico
- ◆ I preparati si conservano a lungo

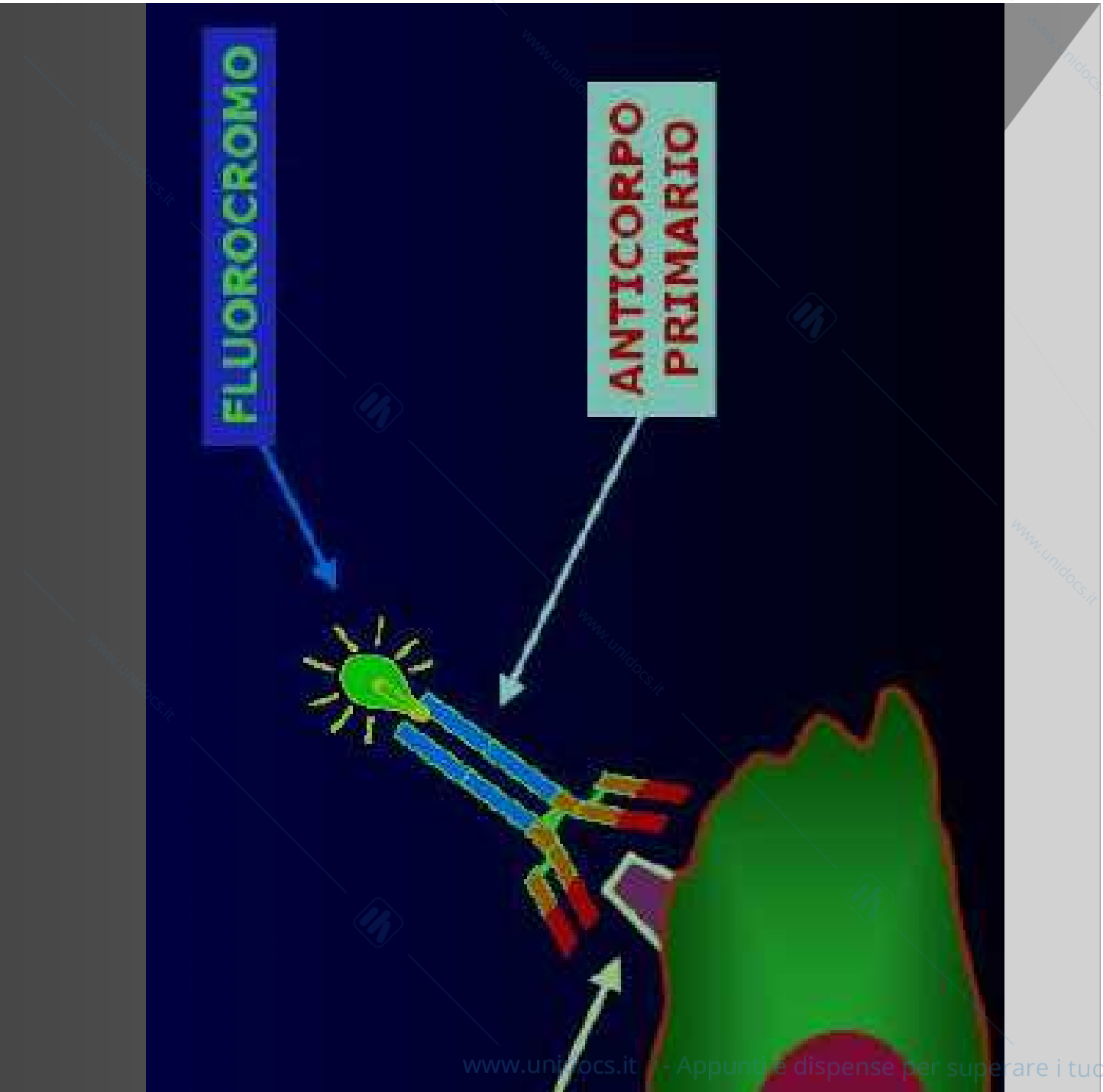
## Immunofluorescenti

- ◆ Permettono l'osservazione del prodotto finale perché risulta colorato in modo fluorescente (fluorocromi)
- ◆ I preparati vanno osservati con un microscopio a fluorescenza
- ◆ I preparati non si conservano a lungo (decadimento della fluorescenza)

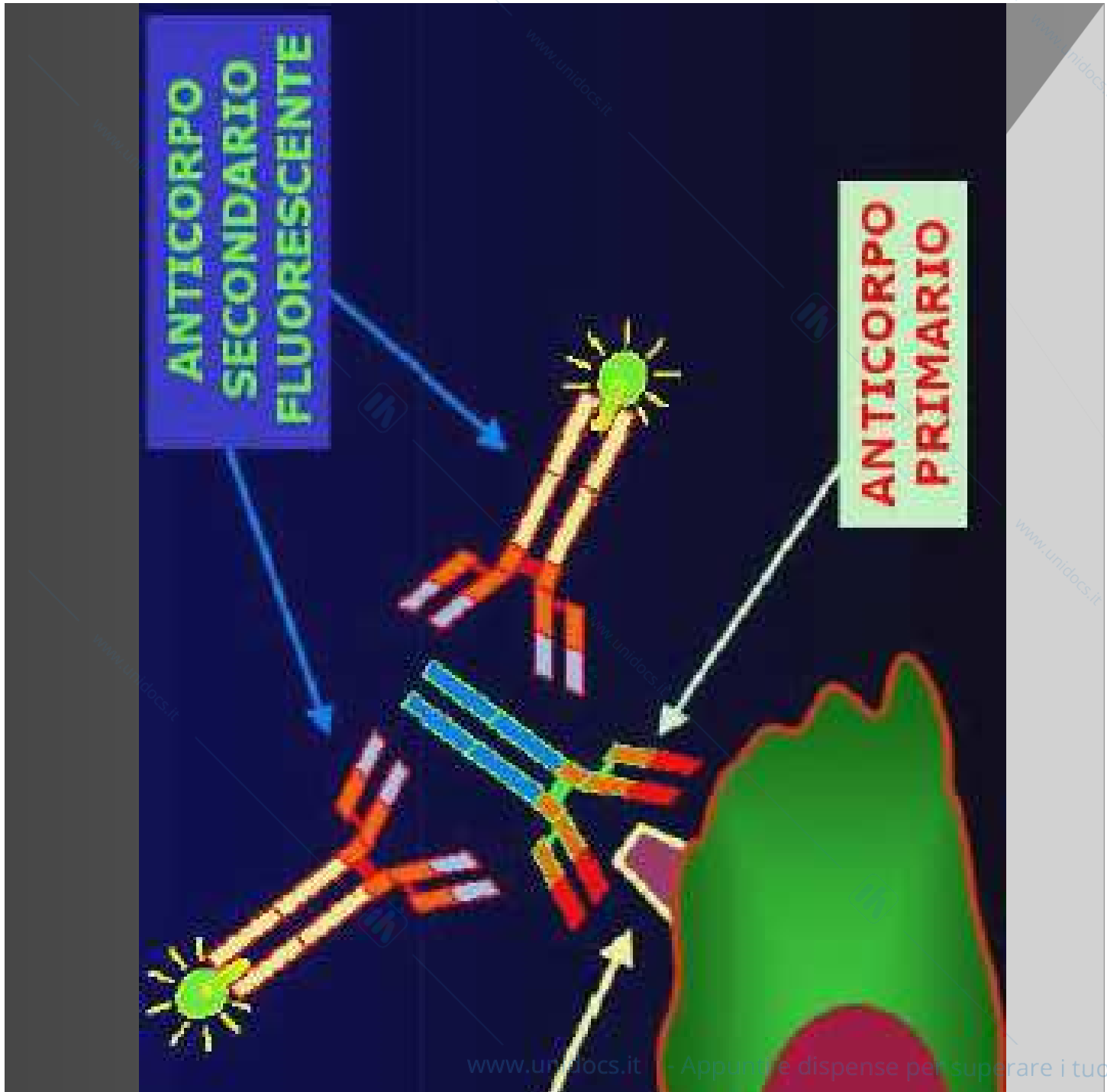
Sia per le tecniche immunoenzimatiche che per quelle immunofluorescenti si possono distinguere **metodi diretti** ed **indiretti**. Nei metodi diretti c'è un minor numero di passaggi da effettuare e si ottengono risultati con minor sensibilità mentre nei metodi indiretti si effettuano un maggior numero di passaggi, ottenendo segnali più forti, ma si possono avere problemi di false positività.

I **metodi diretti** sono metodi più semplici e prevedono il legame diretto dell'anticorpo marcato all'antigene. Quindi si deve disporre di un anticorpo specifico per l'antigene che vogliamo cercare ottenendo un complesso antigene-anticorpo.

L'anticorpo può essere marcato con un enzima oppure con una sostanza fluorescente (il fluorocromo).



Nel caso di metodi indiretti oltre all'anticorpo primario, che in questo caso non è coniugato, esiste un altro anticorpo, detto anticorpo secondario, che è costruito per riconoscere il primo anticorpo.  
In questo caso è l'anticorpo secondario a essere marcato con un fluoroforo o un enzima.



# IMMUNOENZIMATICA

Le tecniche di immunoenzimatica prevedono la presenza di un'enzima legato direttamente o indirettamente all'anticorpo primario per evidenziare la formazione del complesso immune.

L'enzima catalizza la formazione di un precipitato colorato insolubile visibile al microscopio nel sito dove è avvenuta la reazione antigene-anticorpo.

Gli enzimi più usati sono la perossidasi, la fosfatasi alcalina, la glucosio ossidasi e la  $\beta$ -galattosidasi.

Le tecniche immunoenzimatiche dirette vengono scarsamente utilizzate nei laboratori a causa la bassa sensibilità del metodo

La **perossidasi** è un enzima ottenuto dal rafano ma è presente anche nei tessuti umani.

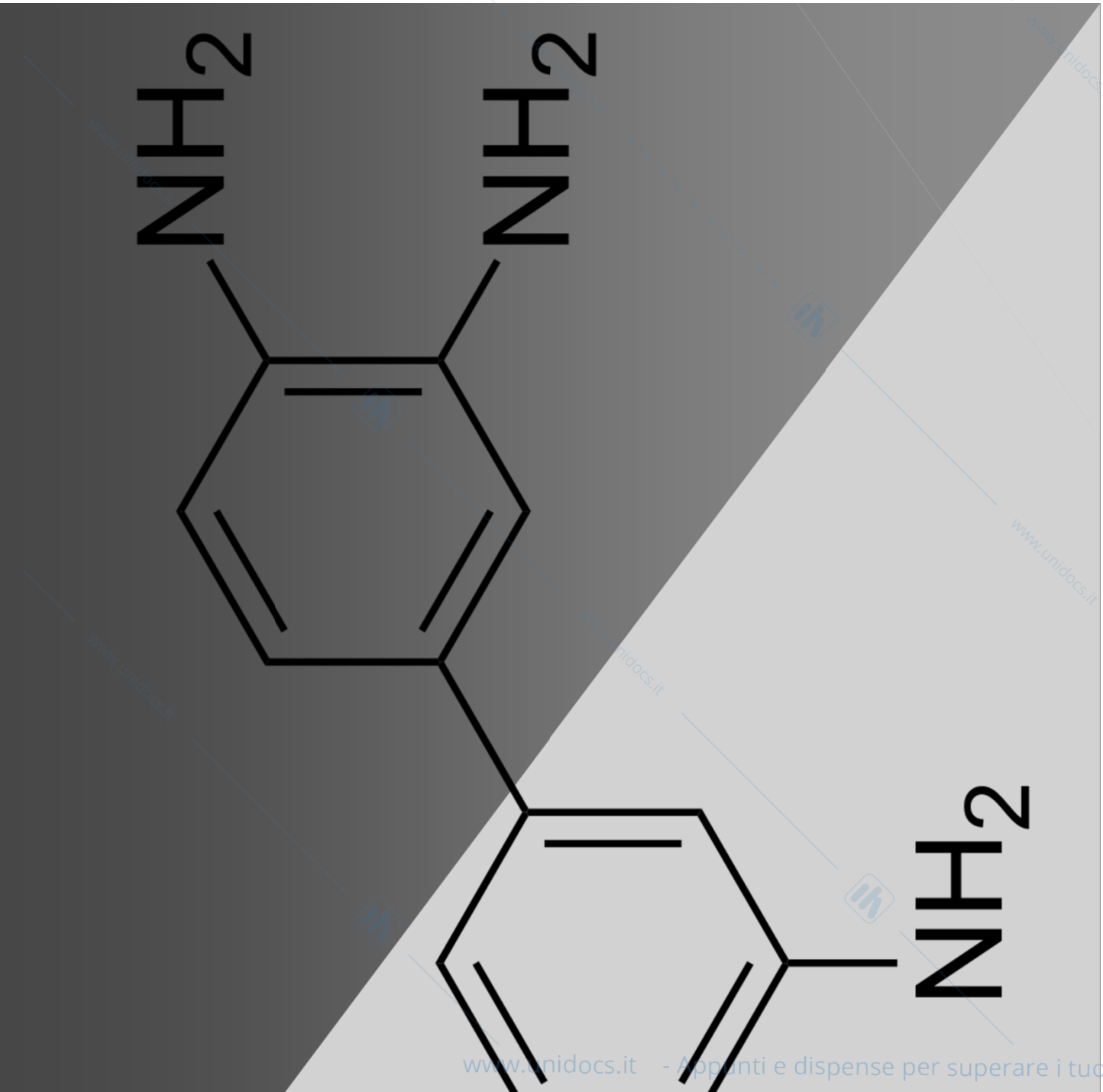
Può formare legami covalenti con le immunoglobuline

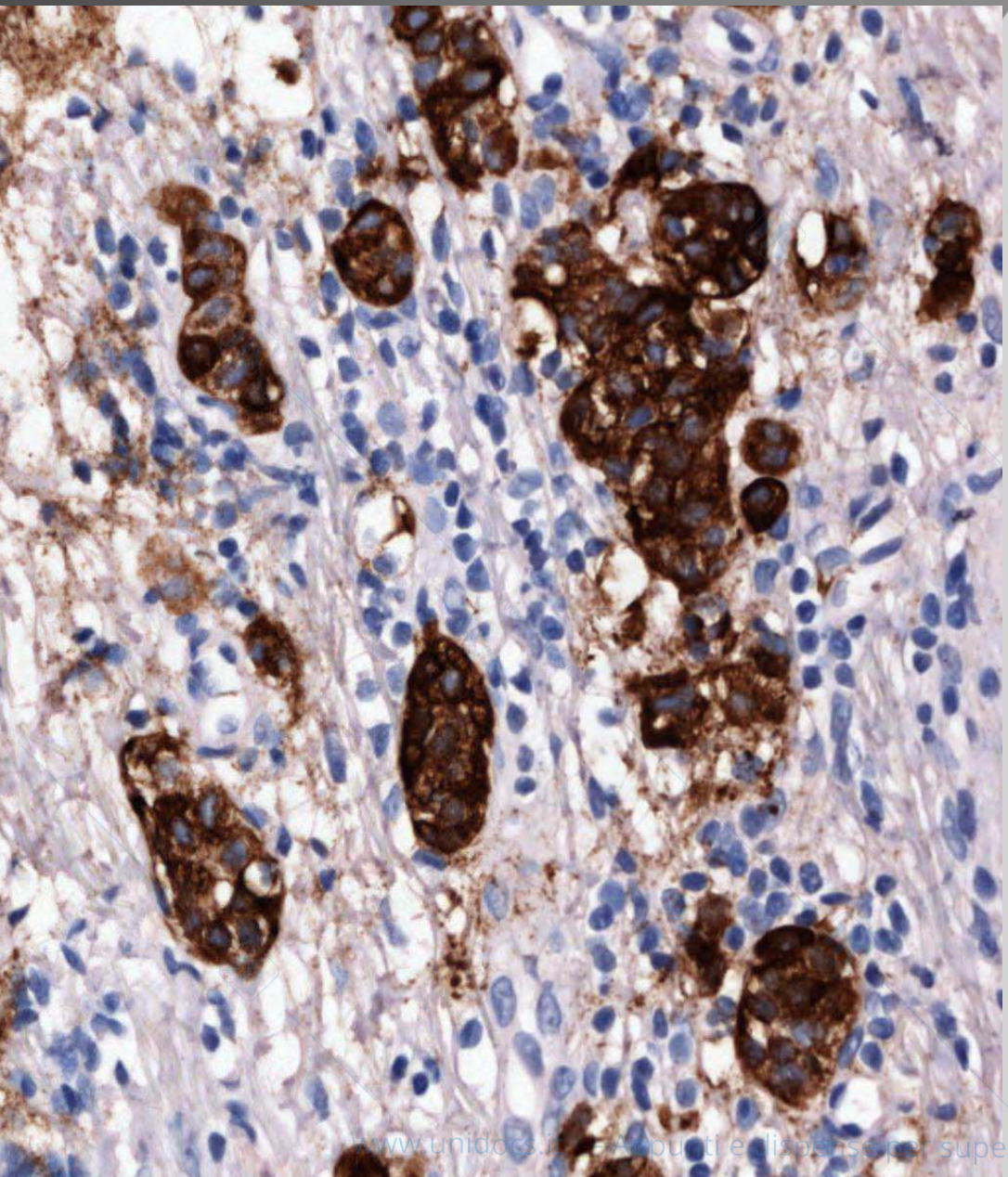
La perossidasi è un enzima riducente che ha come substrato è il perossido di idrogeno.

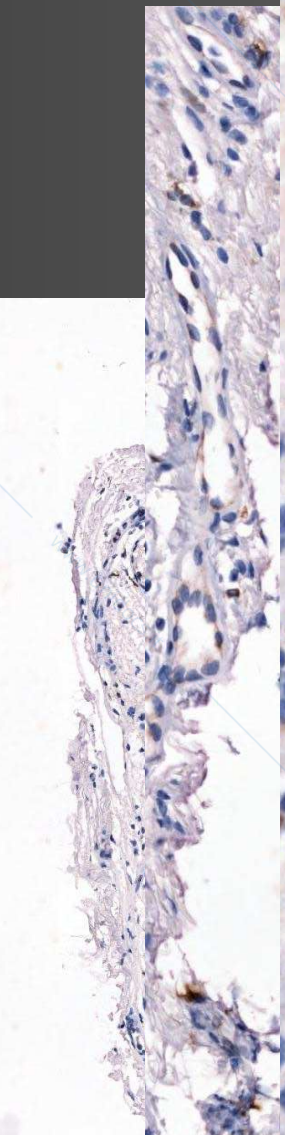
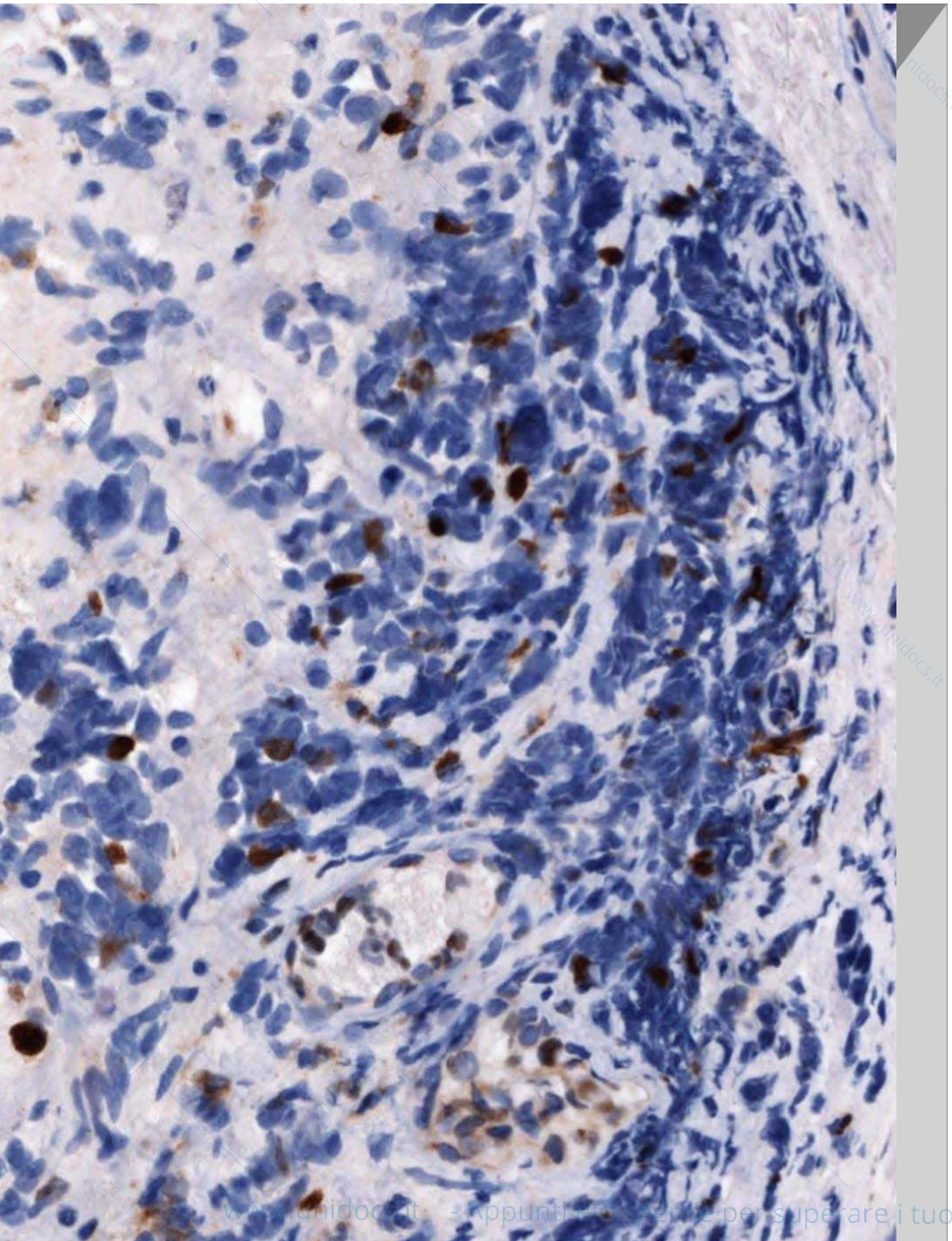
La sostanza cromogena è la diamminobenzidina (DAB) che in presenza di perossidasi e acqua ossigenata si ossida.

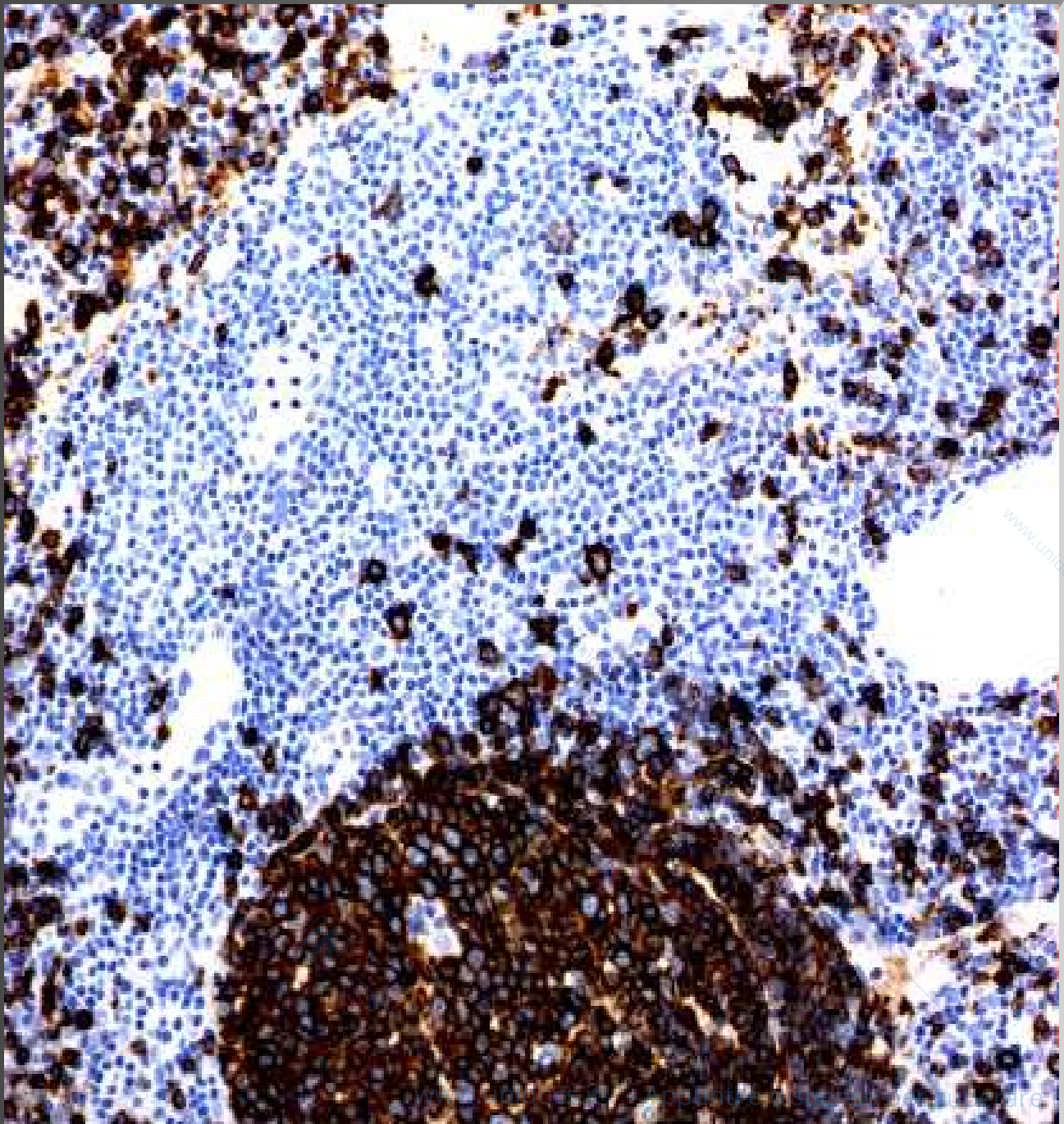
La DAB ossidata polimerizza e forma un precipitato insolubile di color marrone.

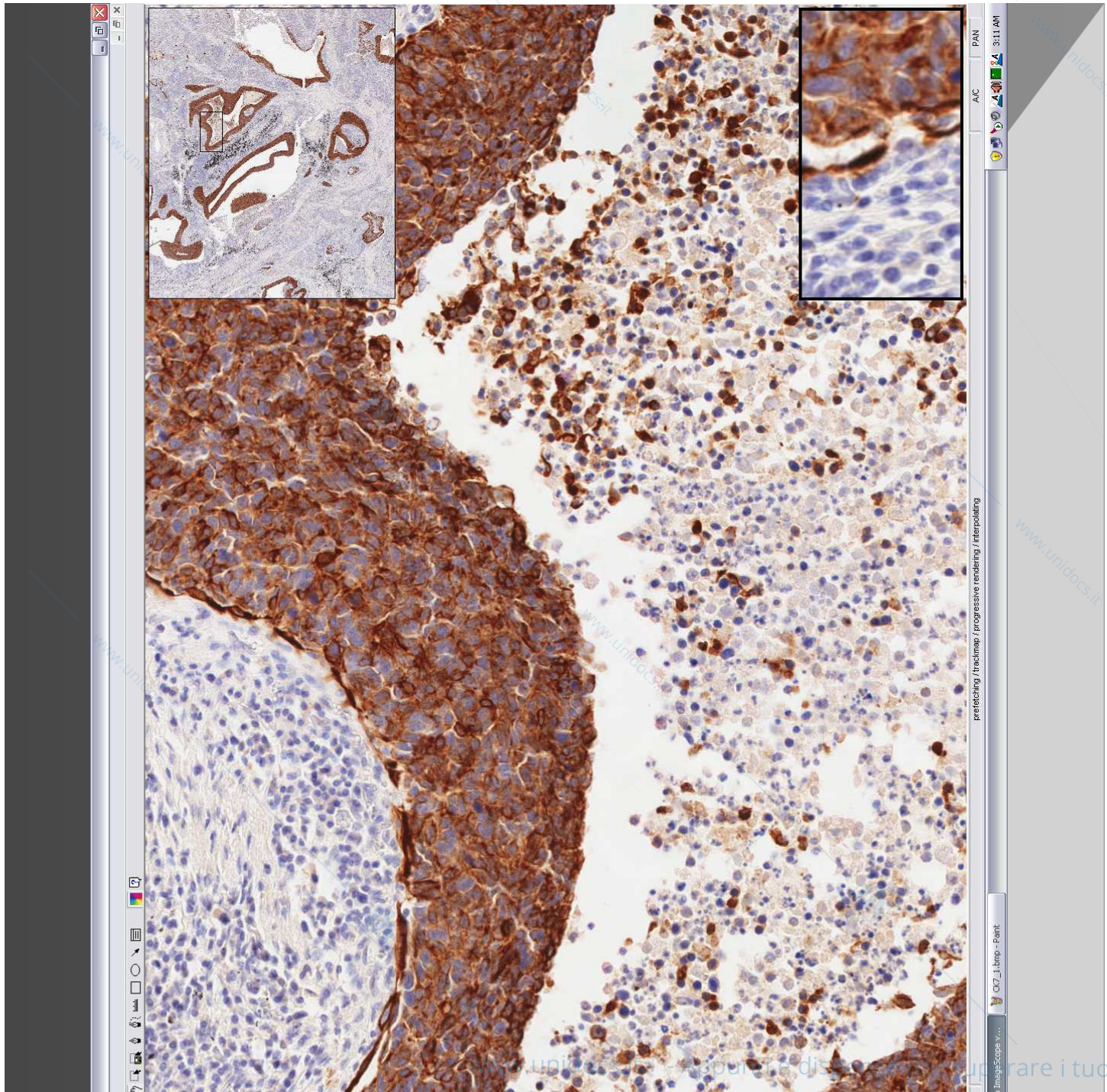
In questo caso la colorazione sarà dovuta dalla formazione di un precipitato colorato oppure avere altre proprietà come la chemiluminescenza o la fluorescenza.

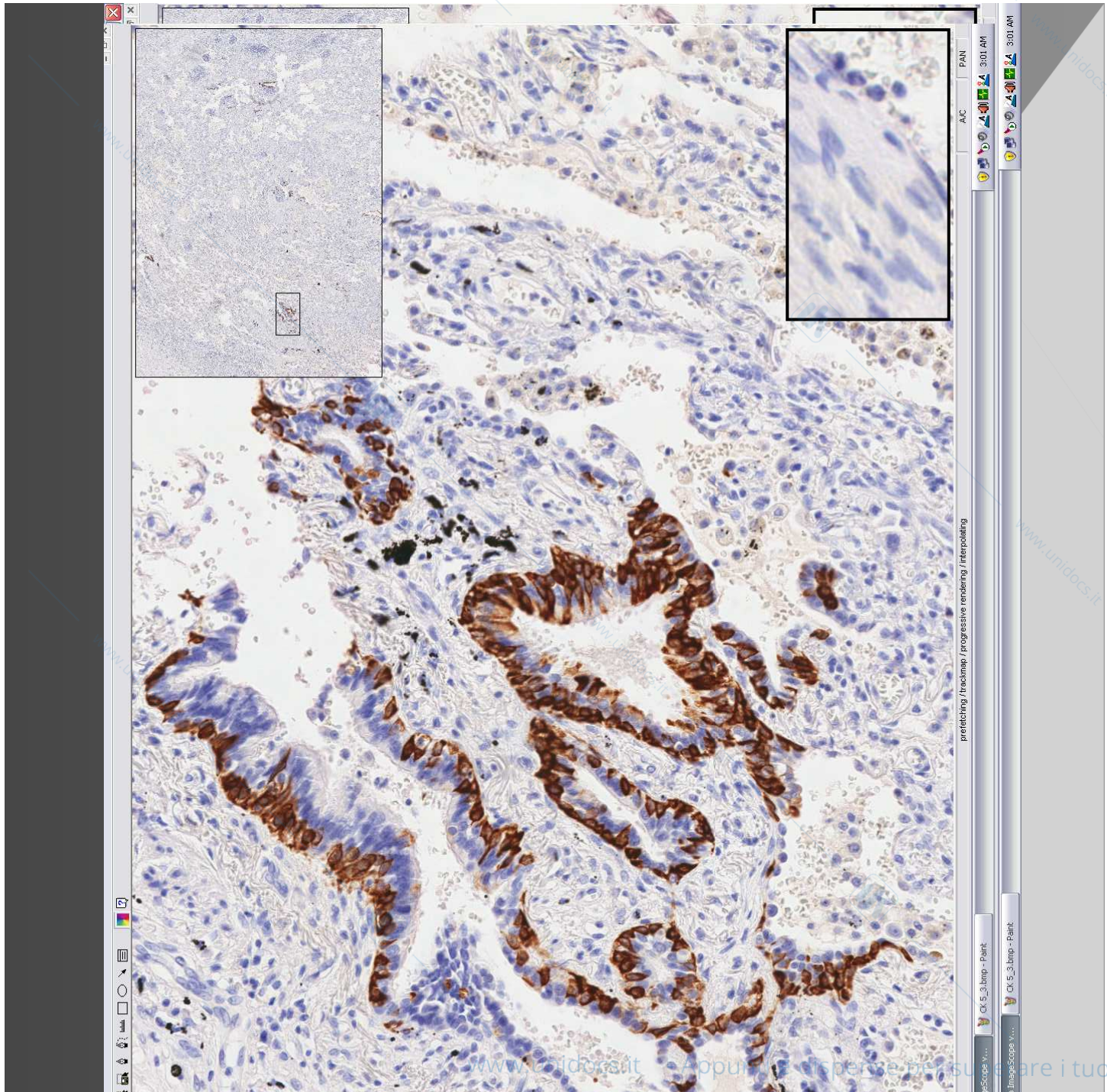


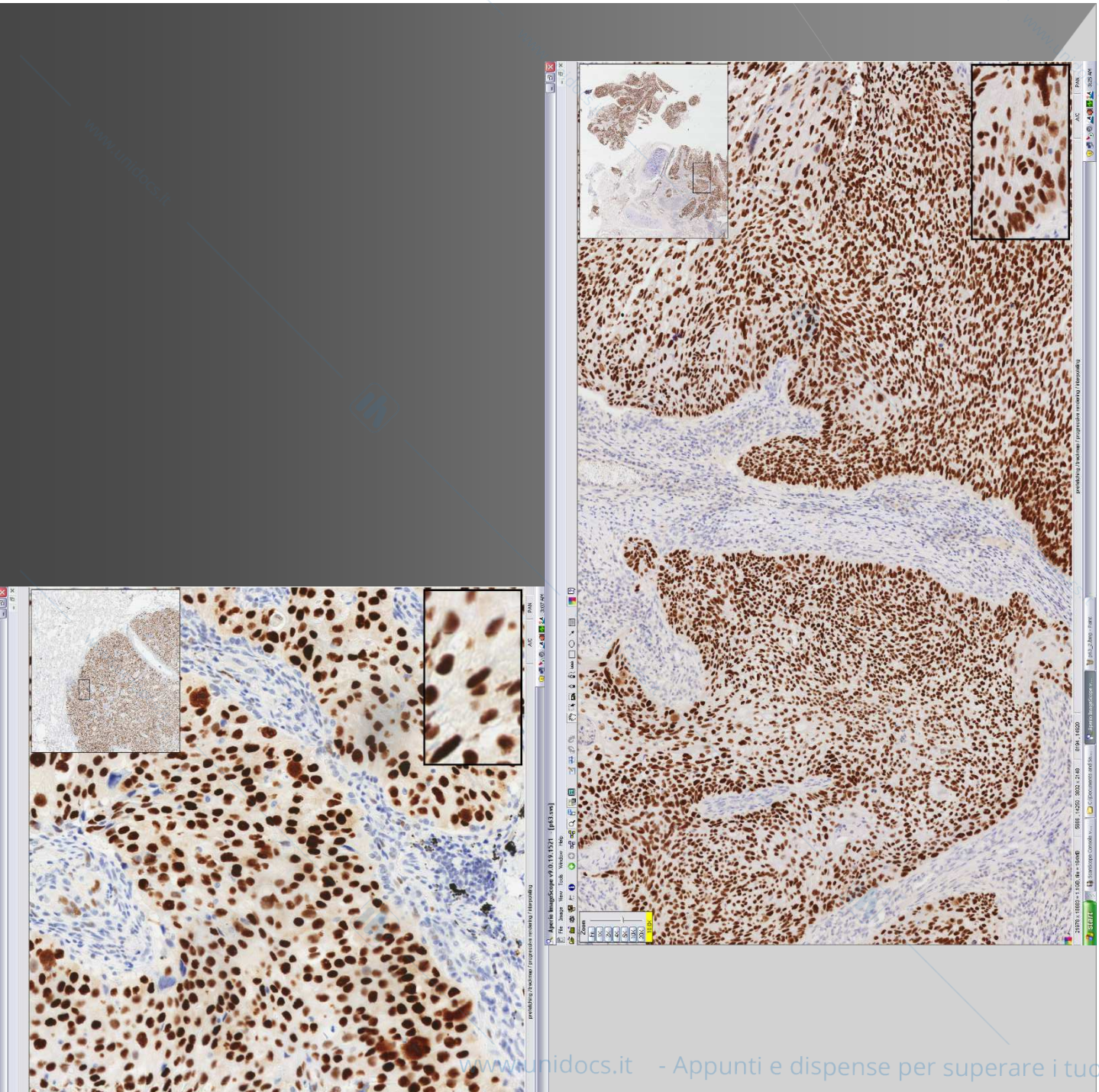


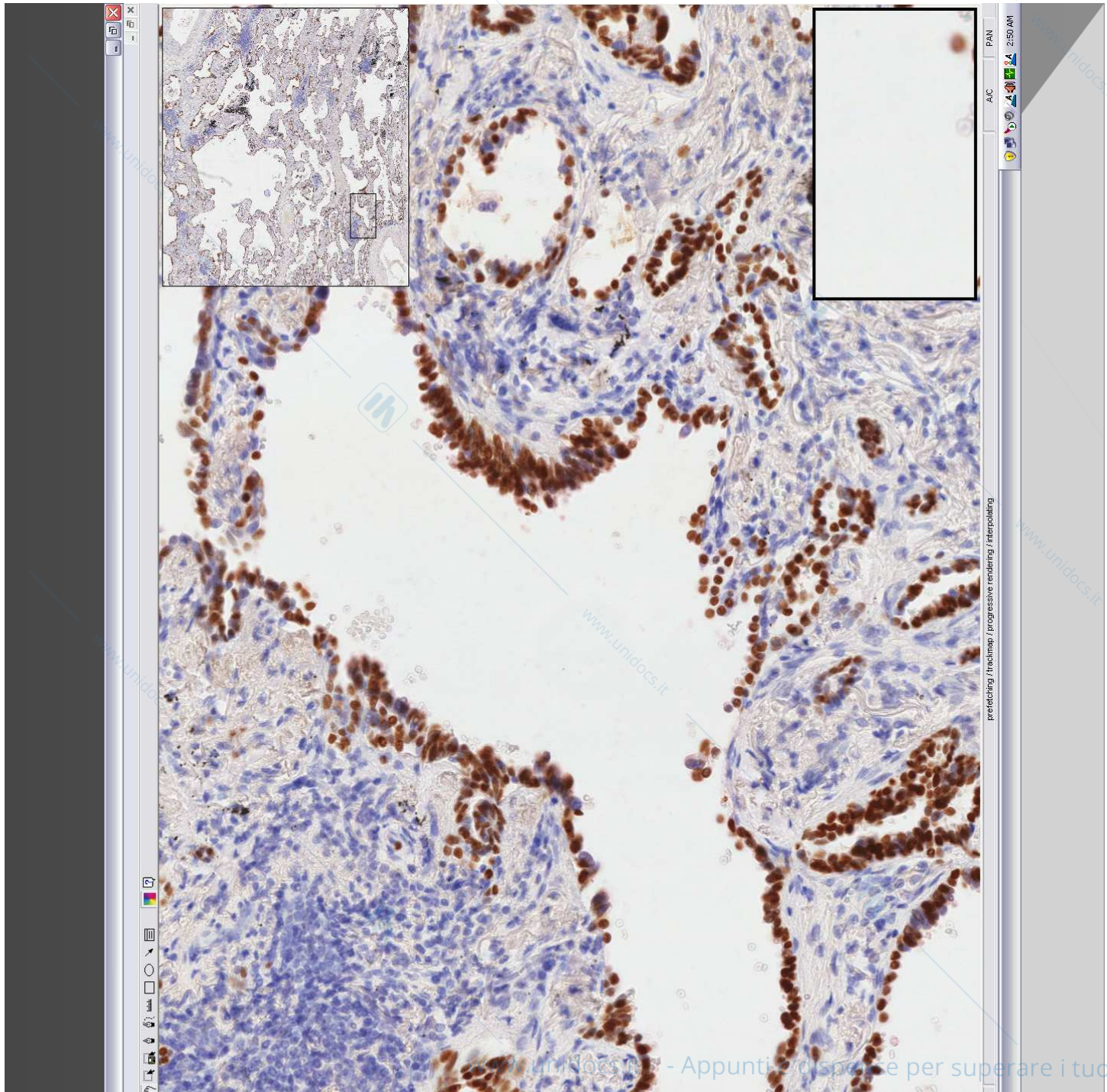














*La fosfatasi alcalina* che in presenza di determinati substrati produce fosfato inorganico e porta la formazione di un precipitato colorato.

Nello specifico il suo substrato è il naftol fosfato, che in presenza di sali di diazonio (cromogeno) forma un precipitato, l'azodye, di colore rosso.

Questo precipitato colorato rivela la posizione dell'anticorpo secondario e di conseguenza la posizione del complesso antigene-anticorpo.

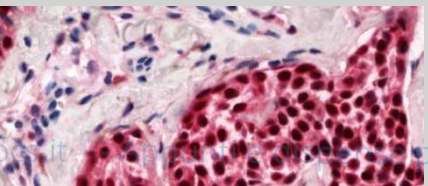
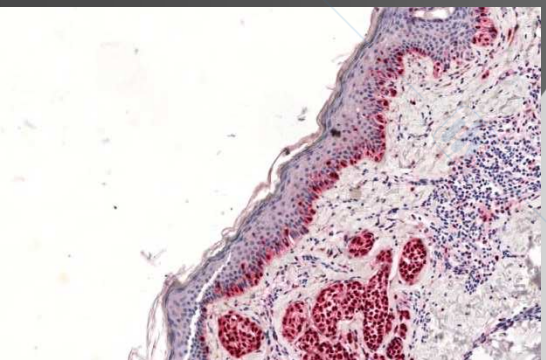
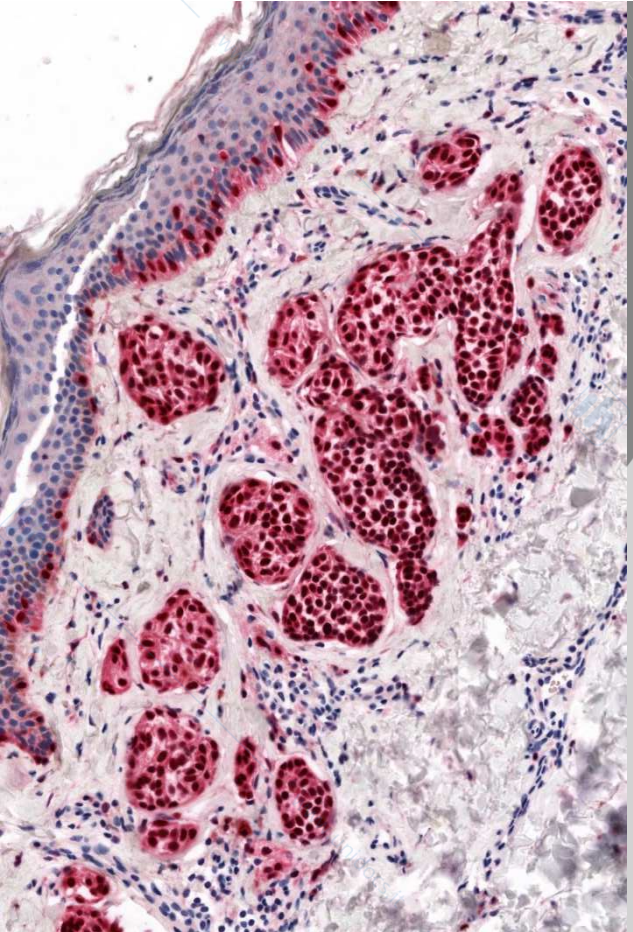
*La fosfatasi alcalina* che in presenza di determinati substrati produce fosfato inorganico e porta la formazione di un precipitato colorato.

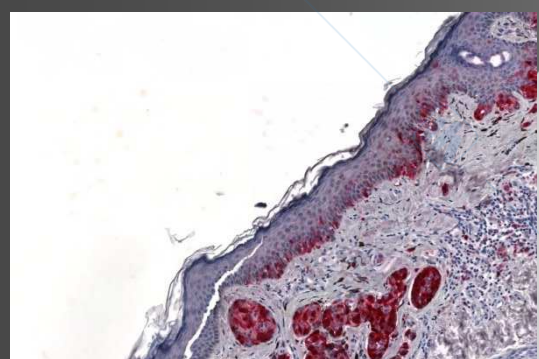
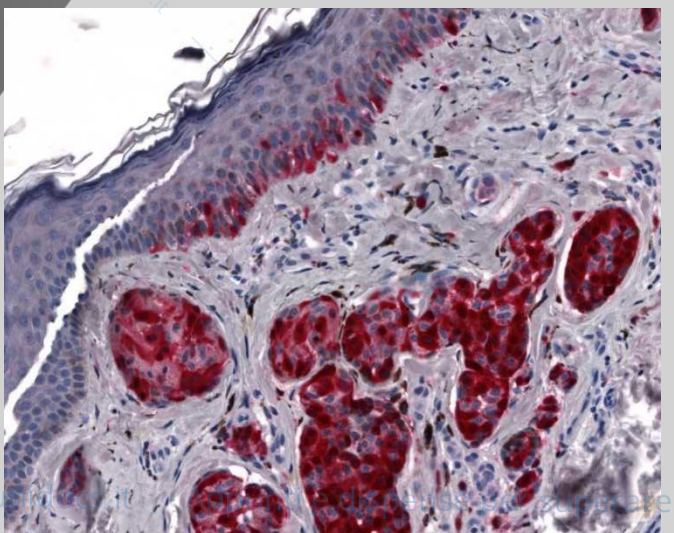
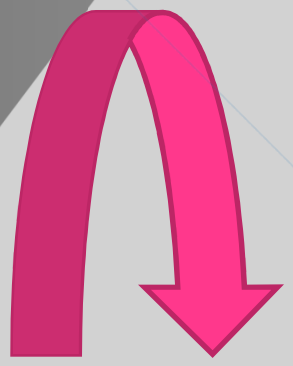
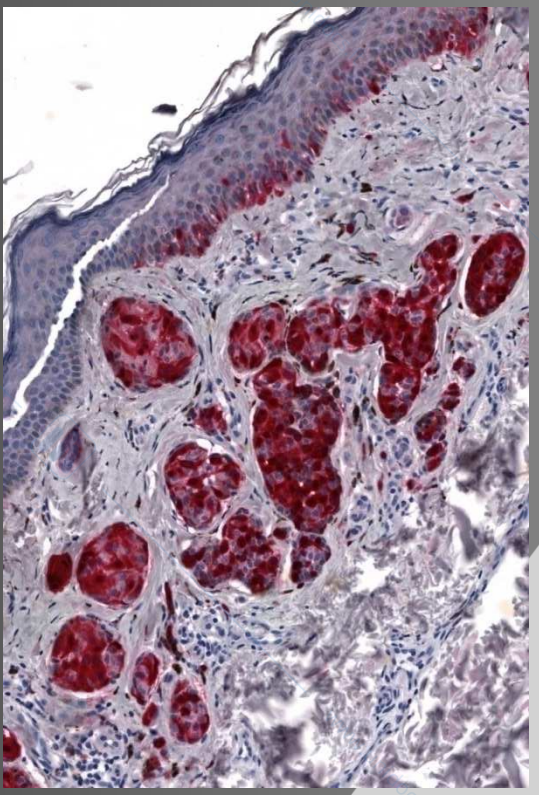
Nello specifico il suo substrato è il naftol fosfato, che in presenza di sali di diazonio (cromogeno) forma un precipitato, l'azodye, di colore rosso.

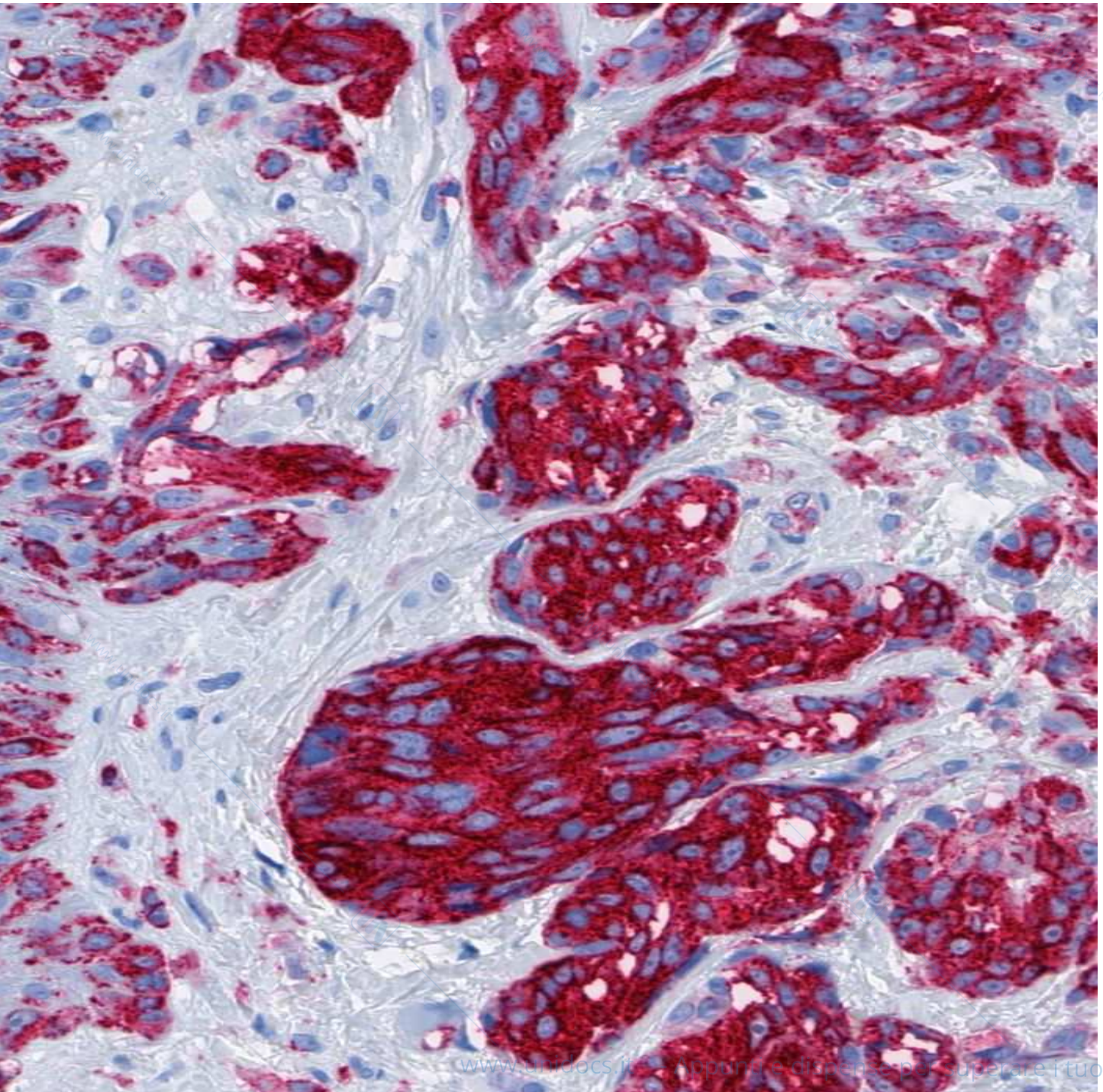
Questo precipitato colorato rivela la posizione dell'anticorpo secondario e di conseguenza la posizione del complesso antigene-anticorpo.

Con il sistema basato sulla fosfatasi alcalina l'enzima può rimuovere un gruppo fosfato da un gruppo cromogeno: il risultante prodotto può avere un proprio colore (formazione di un precipitato colorato) oppure altre proprietà come la chemiluminescenza o fluorescenza. Entrambe le metodologie possono essere rivelate in microscopia.

Il vantaggio di questa reazione consiste nel fatto che si sviluppa meno colorazione di fondo. Questo metodo trova infatti la sua migliore applicazione in tessuti ricchi di perossidasi, come il midollo osseo o ricchi di pigmenti, come la melanina cute, che possono interferire sia con la colorazione sia in fase di lettura da parte del patologo.







Oltre a questi metodi si usano l'enzima  $\beta$ -galattosidasi che forma un precipitato di colore turchese e l'enzima vegetale glucosio-ossidasi che genera un precipitato blu scuro. Questi due metodi non vengono più utilizzati.

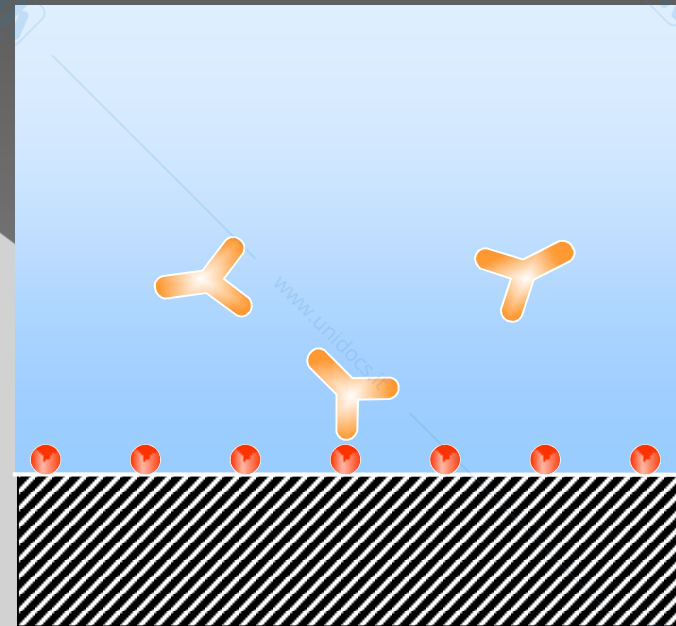
ENZIMA	SISTEMA DI RIVELAZIONE	METODOLOGIA ANALITICA
Perossidasi	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /cromogeno	Spettrofotometria
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /luminolo	Chemiluminescenza
Fosfatasi alcalina	4-nitrofenilfosfato	Spettrofotometria
	4-metilumbelliferone-fosfato	Fluorimetria
	AMPPD	Chemiluminescenza
β-galattosidasi	2-nitrofenolo	Spettrofotometria
	4-metilumbelliferone	Fluorimetria
	2-naphthyl-β-D-galactopyranoside	Chemiluminescenza

## Storia dell'immunoistochimica

- 1941 Coons: Anticorpi marcati con fluoresceina per localizzare antigeni in sezioni di tessuto
- 1966 Nakane: Anticorpi marcati con enzimi
- 1970 Sternberger: Perossidasi-Anti Perossidasi (PAP)
- 1981 Hsu: Avidin Biotin Complex (ABC)
- 1984 Cordell: Alkaline Phosphatase Anti Alkaline Phosphatase (APAAP)
- 1989 Bobrow: Catalysed Reporter Deposition (CARD CSA-TSA)
- 1993 Bisgaard: Polimeri del destrano

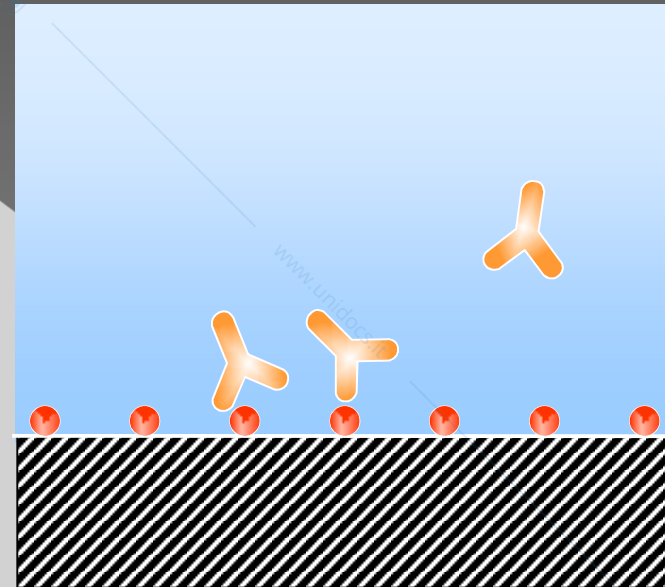
# METODO PER LA DETERMINAZIONE DI ANTICORPI

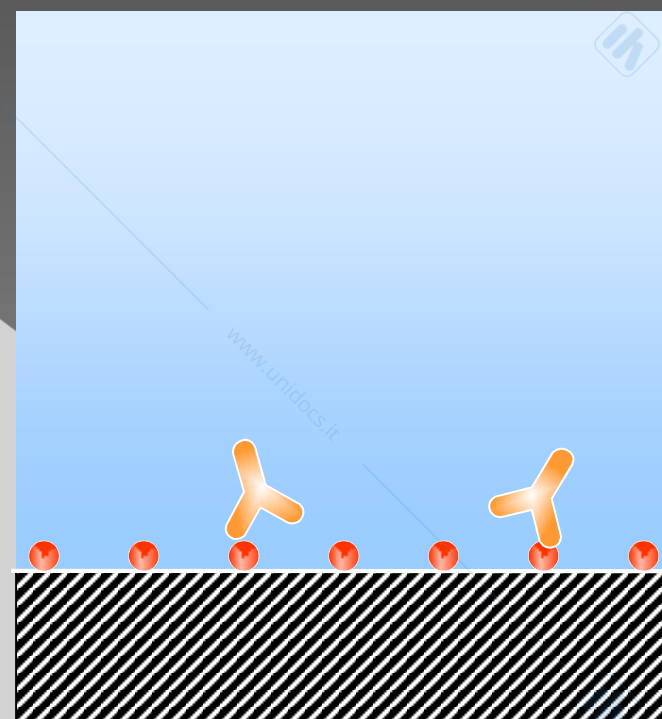
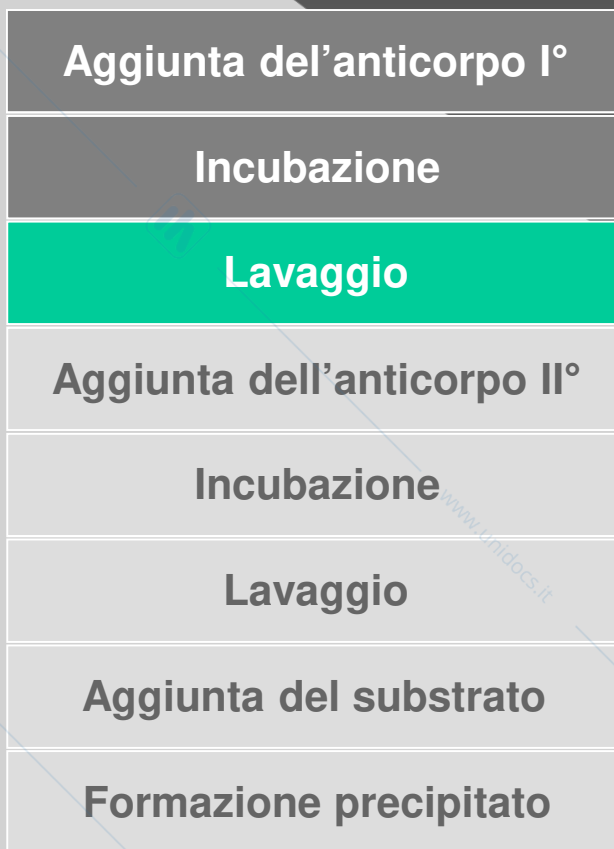
<b>Aggiunta dell'anticorpo I°</b>
Incubazione
Lavaggio
<b>Aggiunta dell'anticorpo II°</b>
Incubazione
Lavaggio
Aggiunta del substrato
Formazione precipitato

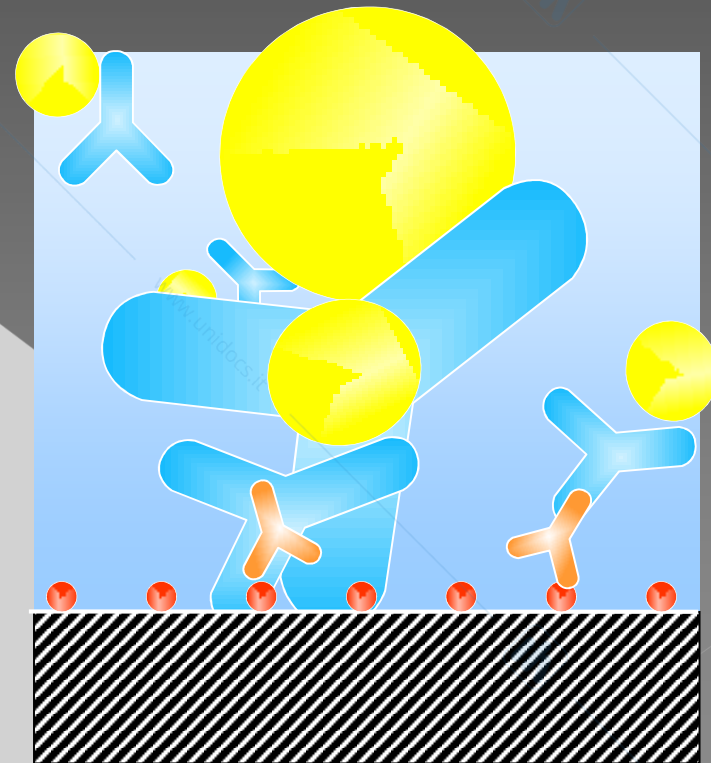
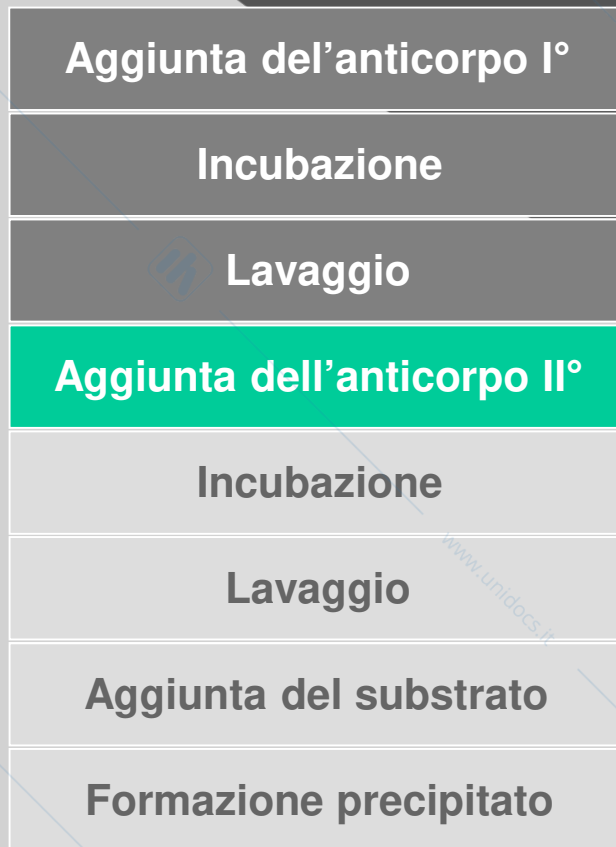


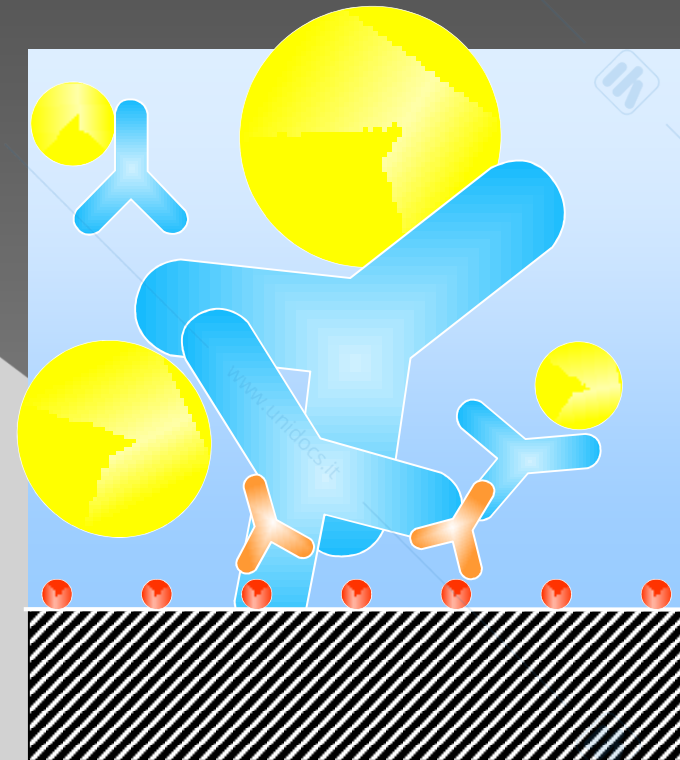
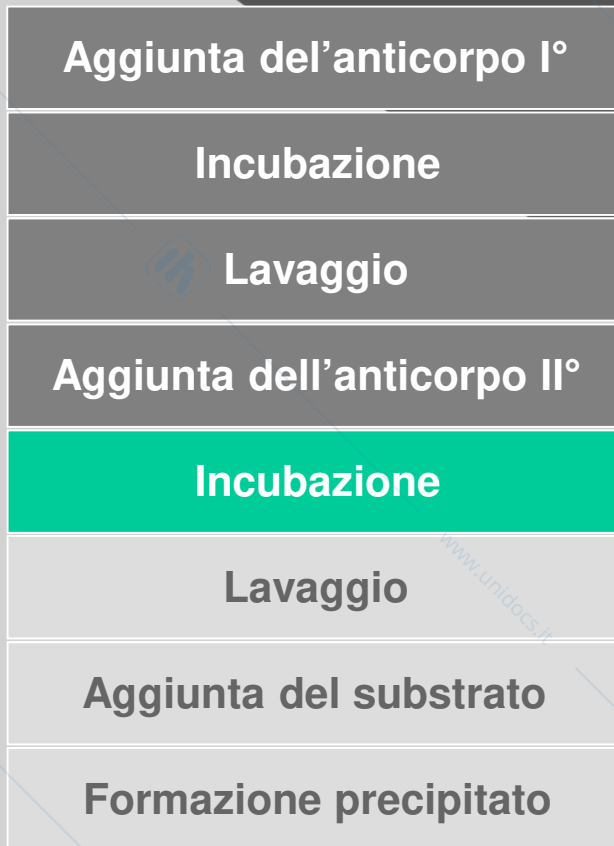
# METODO PER LA DETERMINAZIONE DI ANTICORPI

<b>Aggiunta dell'anticorpo I°</b>
<b>Incubazione</b>
<b>Lavaggio</b>
<b>Aggiunta dell'anticorpo II°</b>
<b>Incubazione</b>
<b>Lavaggio</b>
<b>Aggiunta del substrato</b>
<b>Formazione precipitato</b>

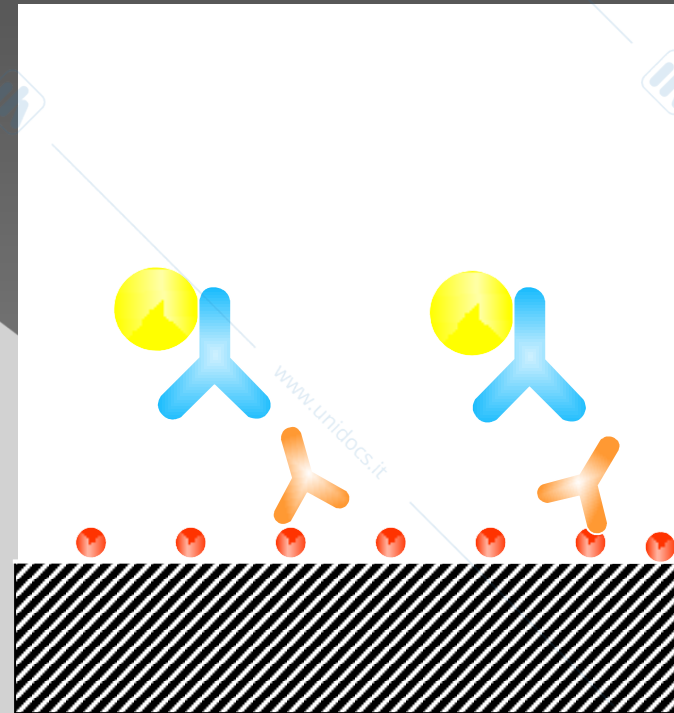
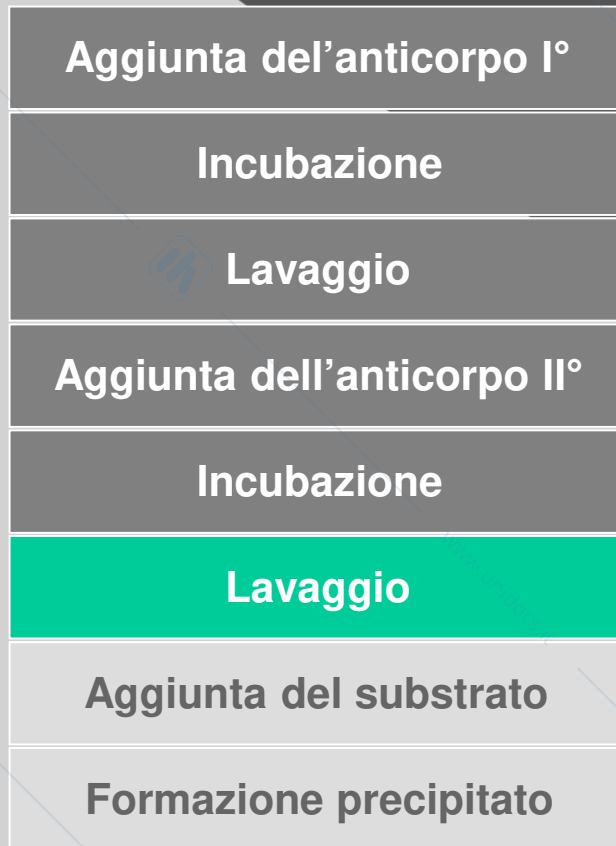






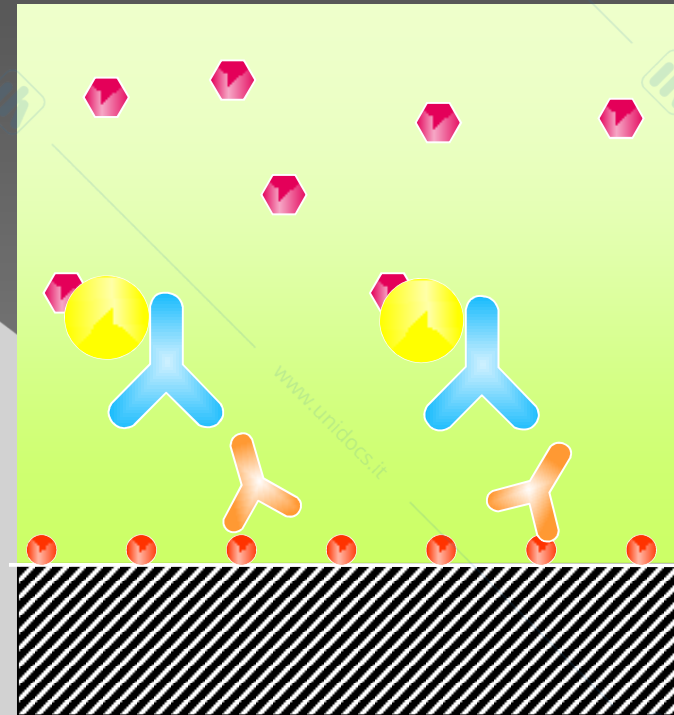


## METODO PER LA DETERMINAZIONE DI ANTICORPI

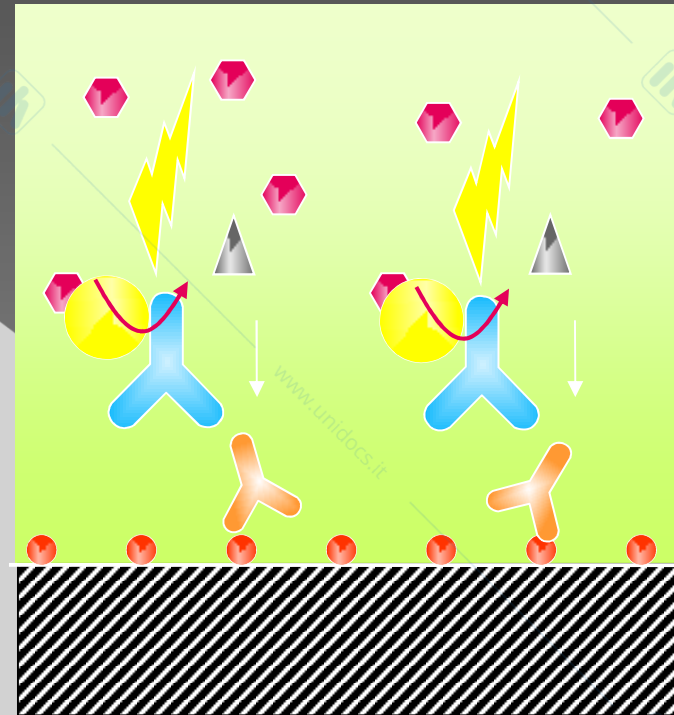
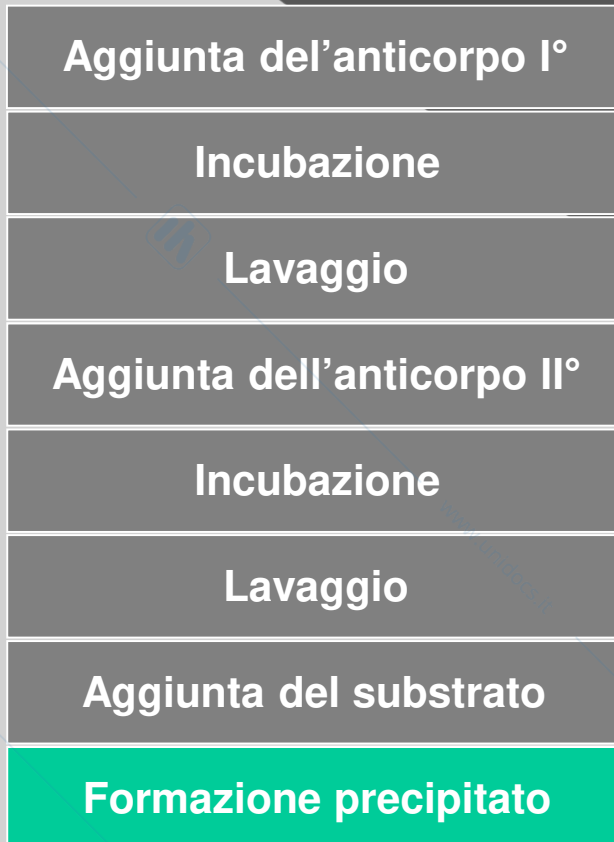


## METODO PER LA DETERMINAZIONE DI ANTICORPI

<b>Aggiunta dell'anticorpo I°</b>
<b>Incubazione</b>
<b>Lavaggio</b>
<b>Aggiunta dell'anticorpo II°</b>
<b>Incubazione</b>
<b>Lavaggio</b>
<b>Aggiunta del substrato</b>
<b>Formazione precipitato</b>



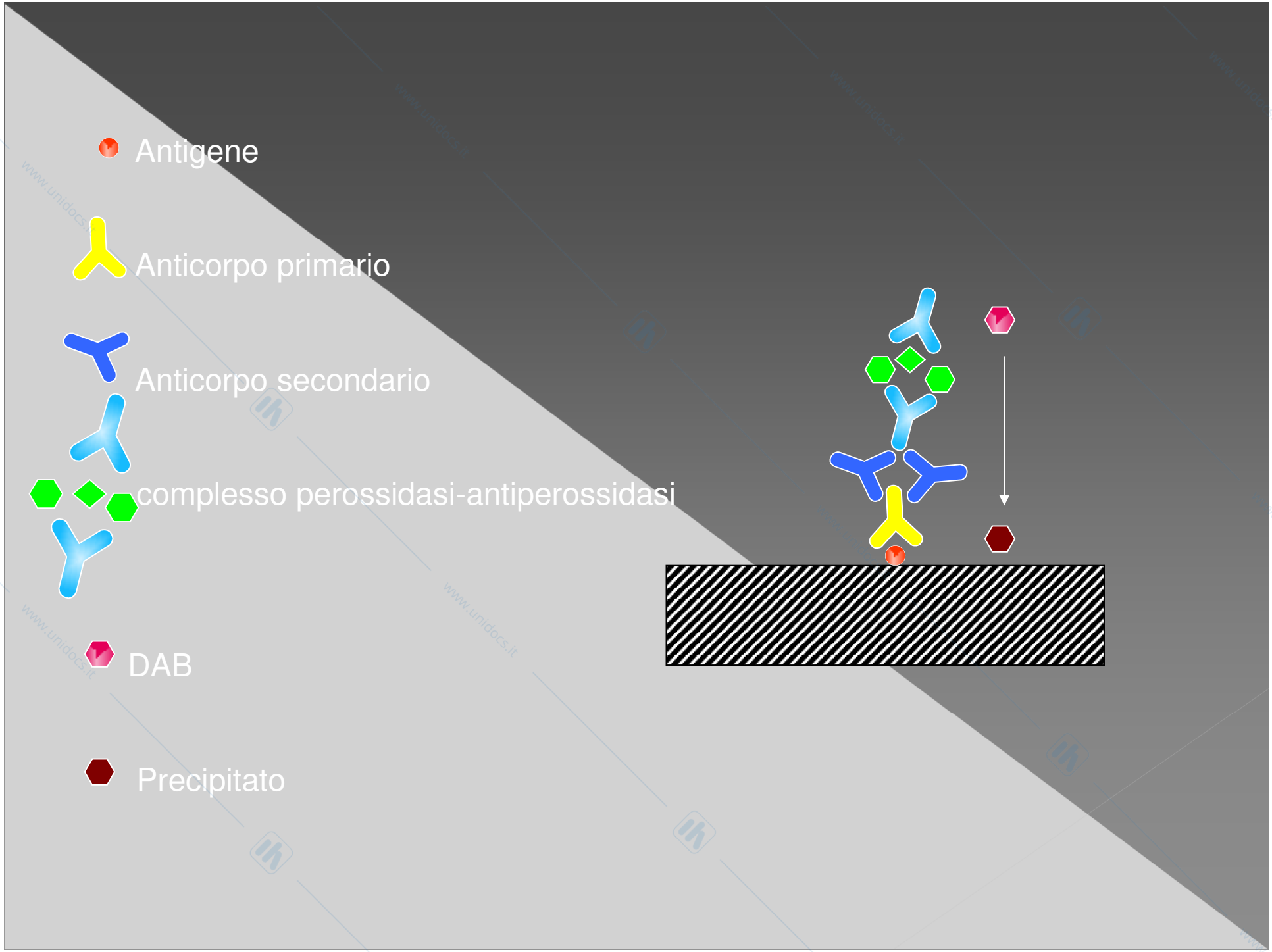
## METODO PER LA DETERMINAZIONE DI ANTICORPI



Un metodo usato è la tecnica perossidasi-antiperossidasi (PAP), in questo caso esiste un anticorpo primario specifico per l'antigene in esame, a cui si lega un anticorpo secondario specifico.

All'anticorpo secondario è legato un complesso perossidasi-antiperossidasi (PAP) formato da due anticorpi antiperossidasi e tre molecole di perossidasi; l'anticorpo antiperossidasi è in grado di legarsi all'anticorpo secondario e quindi ad ogni molecola antigenica si legheranno molte molecole di cromogeno rappresentato dalla perossidasi che verrà poi messo in evidenza con la DAB.

In questo modo si aumenta e si amplifica l'insieme delle reazioni e si può mettere in evidenza anche piccolissime quantità di antigene.



Un'altra tecnica di grande applicazione è il metodo **ABC** o **Avidina Biotina Complex** che si basa sul complesso avidina-biotina.

L'alta affinità di legame tra l'avidina e la biotina è largamente sfruttata nelle tecniche di immunoenzimatica.

L'avidina è una glicoproteina estratta dall'albume dell'uovo e il legame con la biotina risulta estremamente forte.

La molecola di avidina è molto grande e costituita da 4 subunità ed è in grado di legare fino a 4 molecole di biotina.

Si usa un anticorpo primario specifico per l'antigene ed un anticorpo secondario coniugato con la biotina. Si aggiunge un complesso avidina-biotina dove l'avidina è legata a 3 molecole di biotina a loro volta coniugate con un enzima (fosfatasi alcalina) o un fluoroforo.

 Antigene

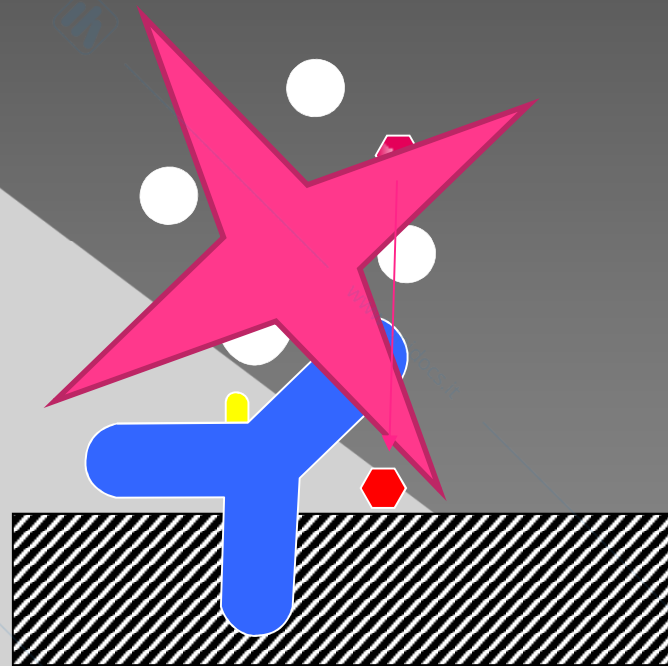
 Anticorpo primario

 Anticorpo secondario biotinilato

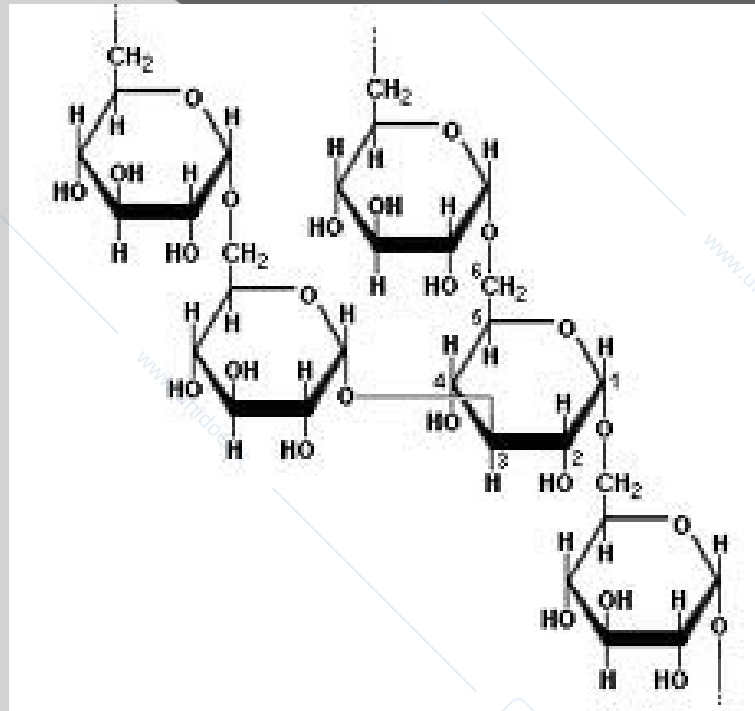
 Complesso avidina-biotina

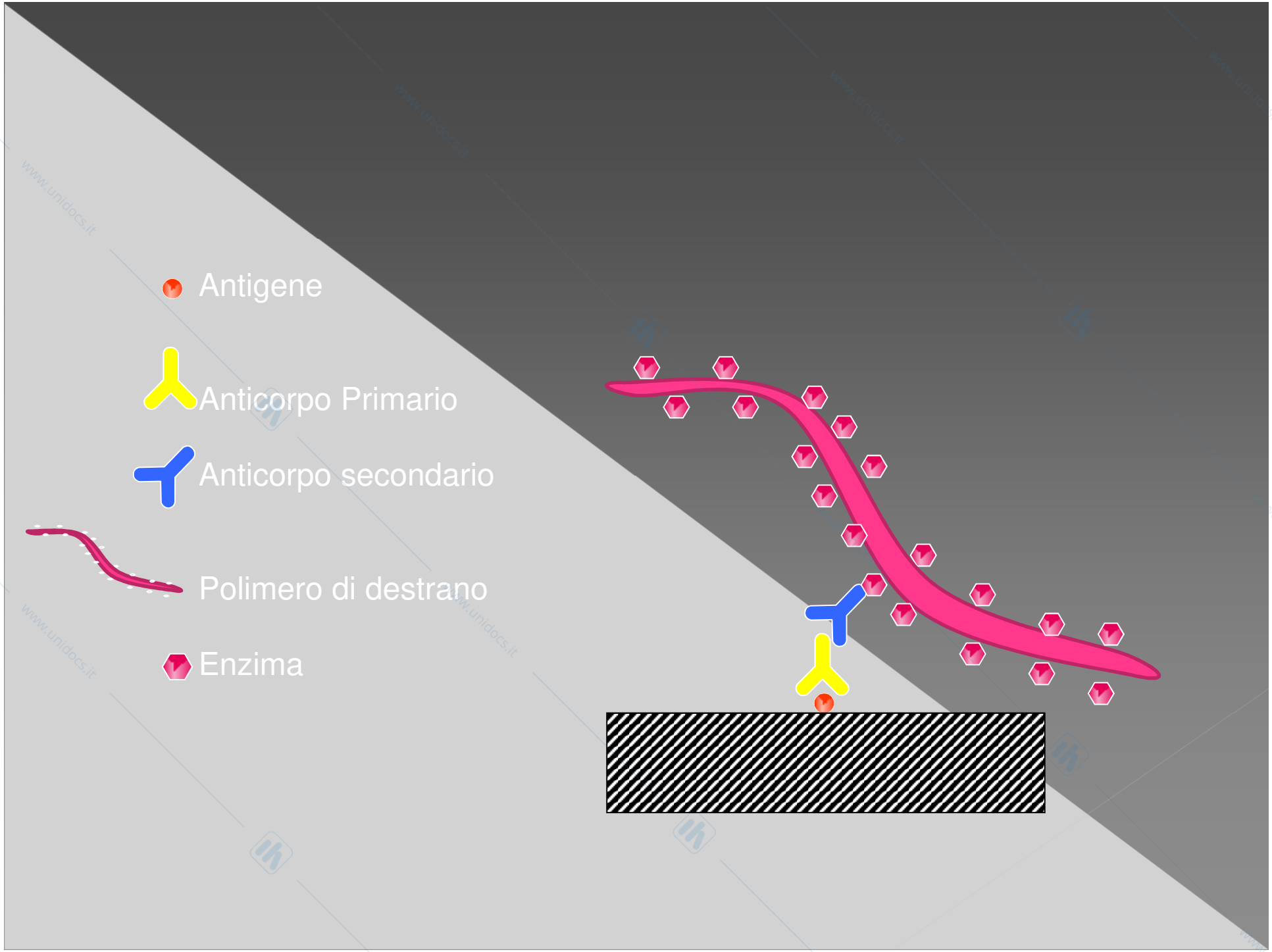
 Cromogeno

 Precipitato



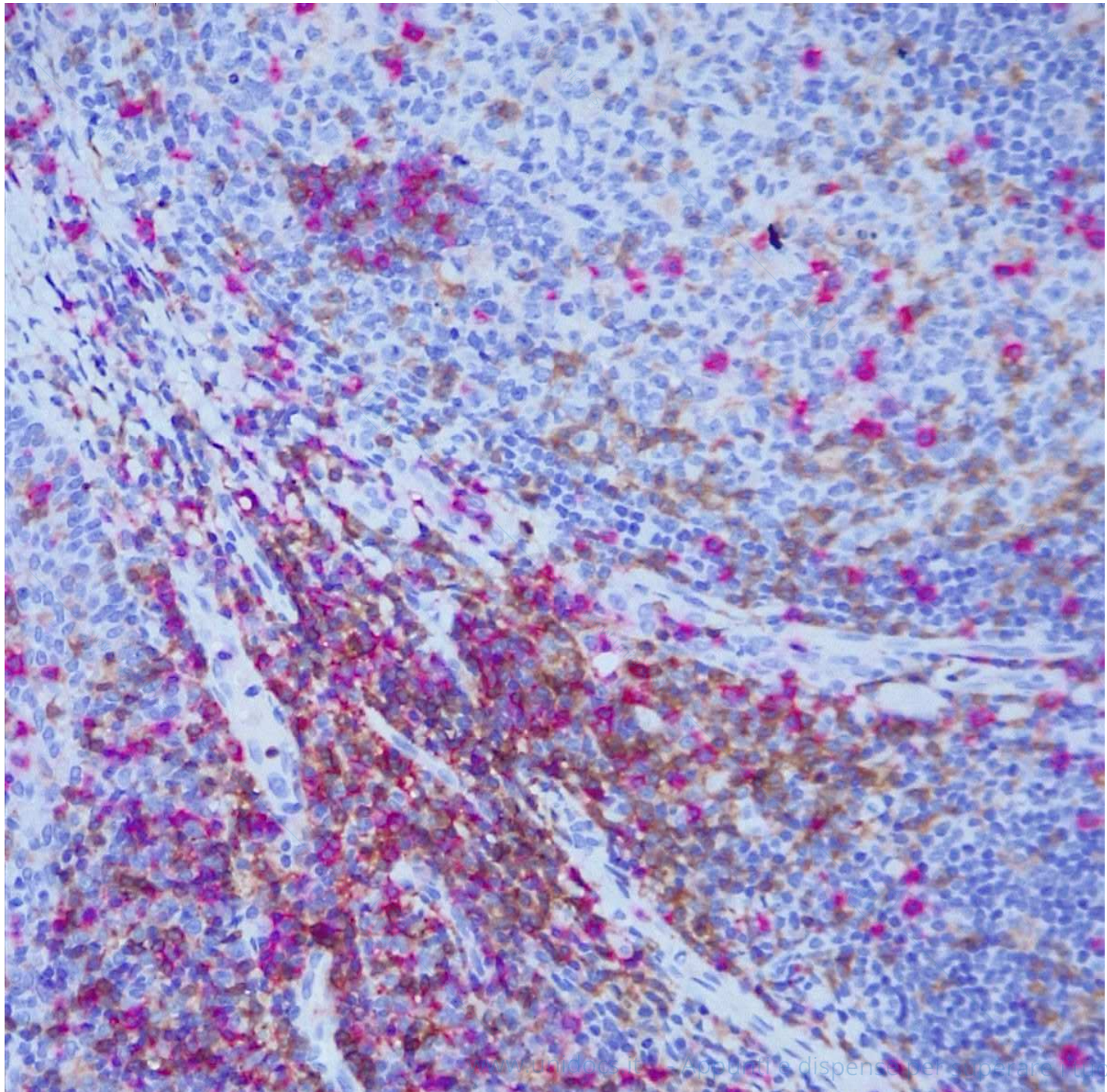
Un'ulteriore tecnica per visualizzare piccole unità antigeniche si basa sul fatto che molecole complesse (DESTRANO) possono legare contemporaneamente molecole anticorpali e molecole enzimatiche.

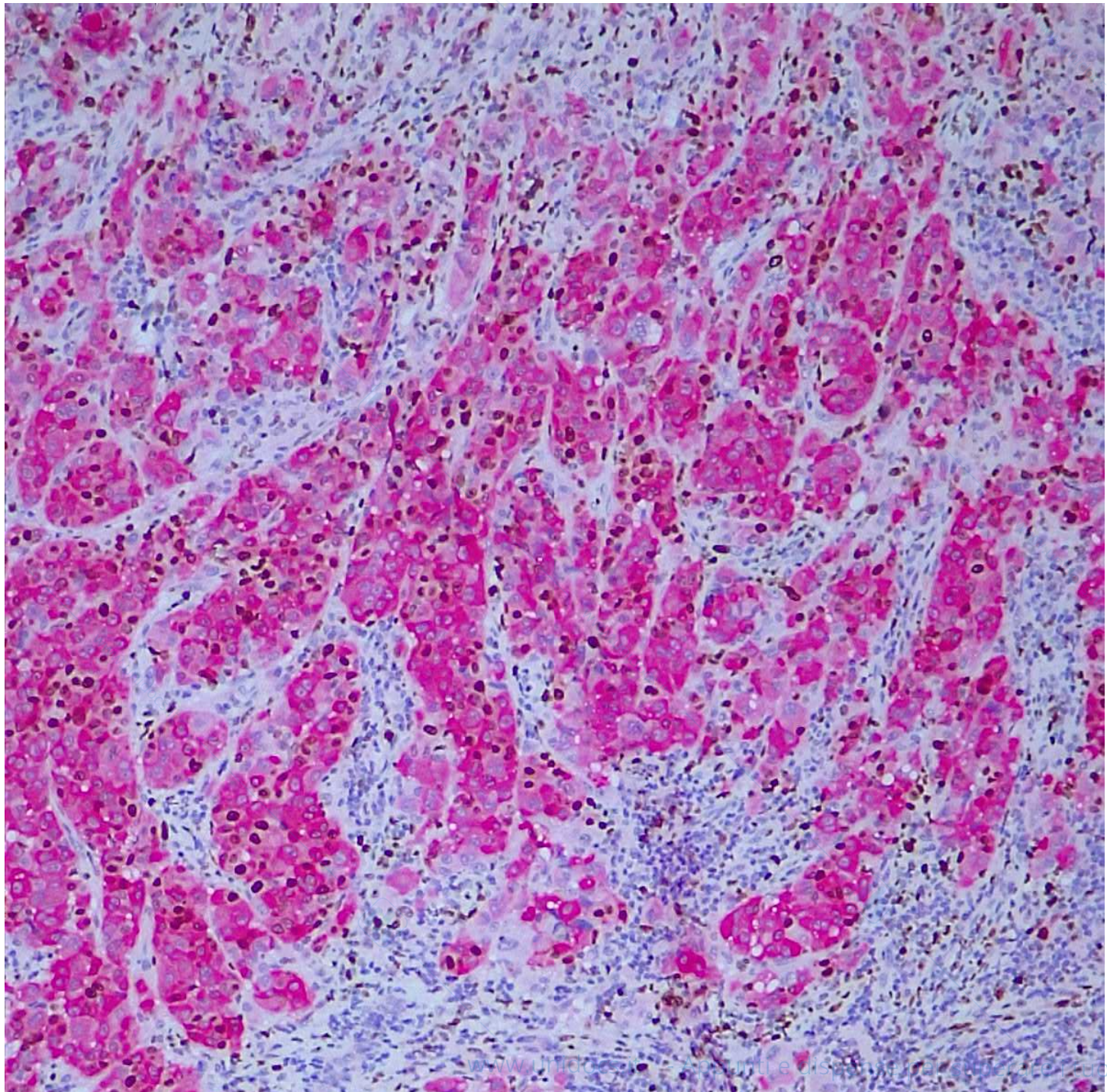


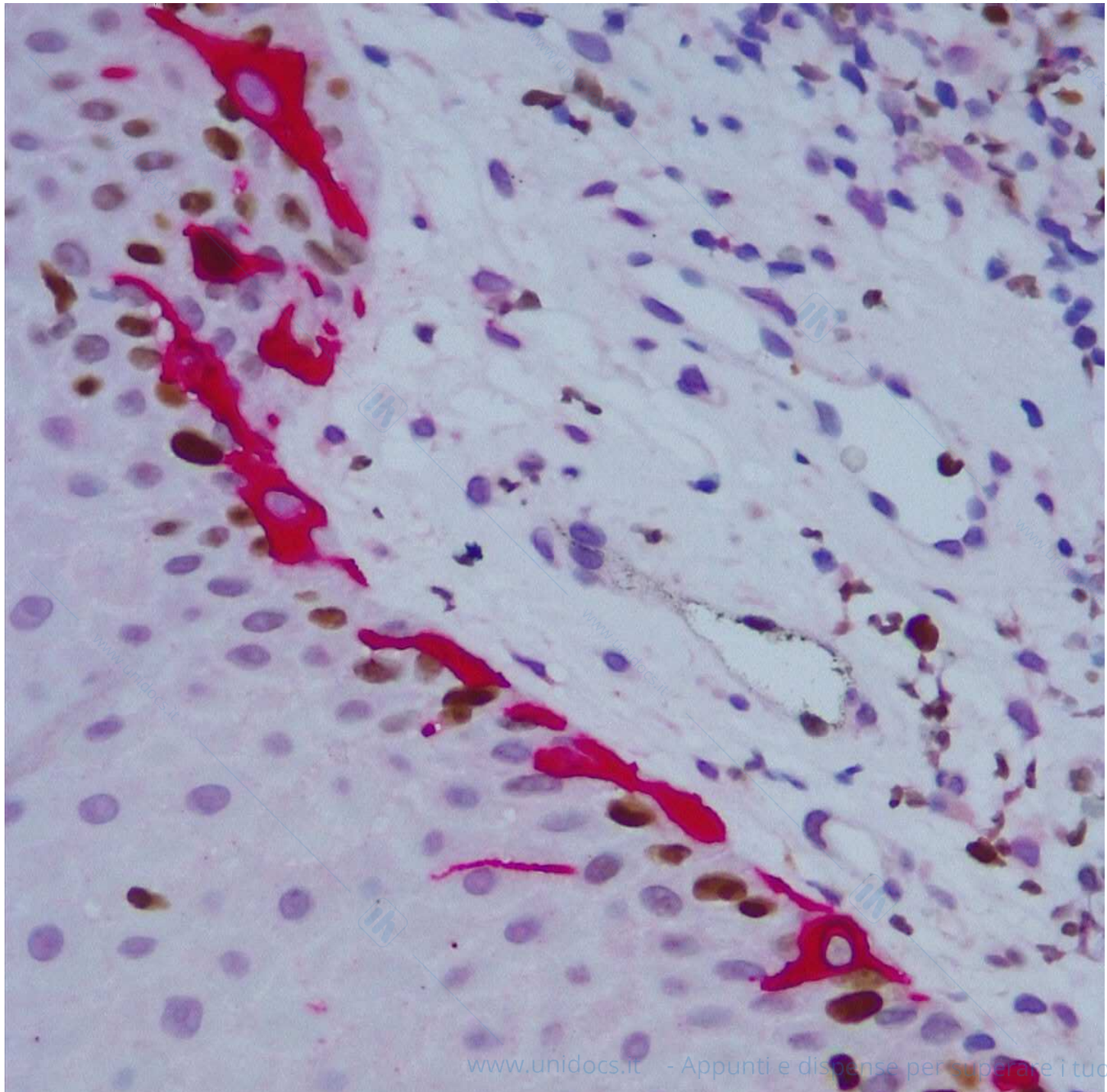


Questa tecnica porta ad una forte amplificazione del segnale poichè ogni molecola antigenica viene identificata dal maggior numero di molecole di fluorocromo o di enzima. Una possibile problematica è che può generare un ingombro sterico, quindi è necessario fare una valutazione su quale metodo sia più affidabile e accurato per l'analisi del preparato.

Altra metodica di immunoenzimatica è l'utilizzo di due colorazioni contemporaneamente che permette di visualizzare due antigeni diversi nella stessa cellula visualizzandoli ovviamente con due substrati cromogeni differenti.



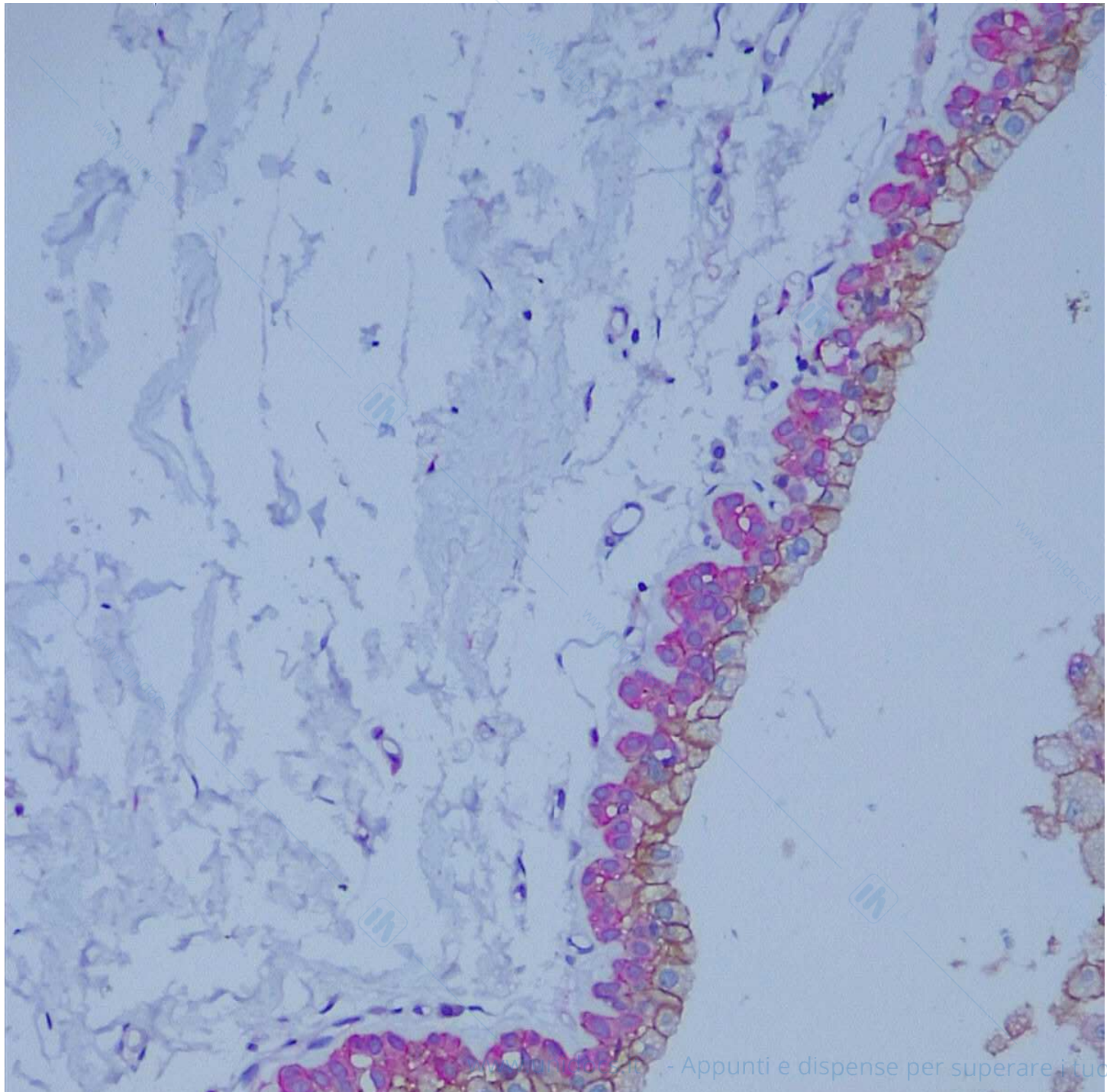


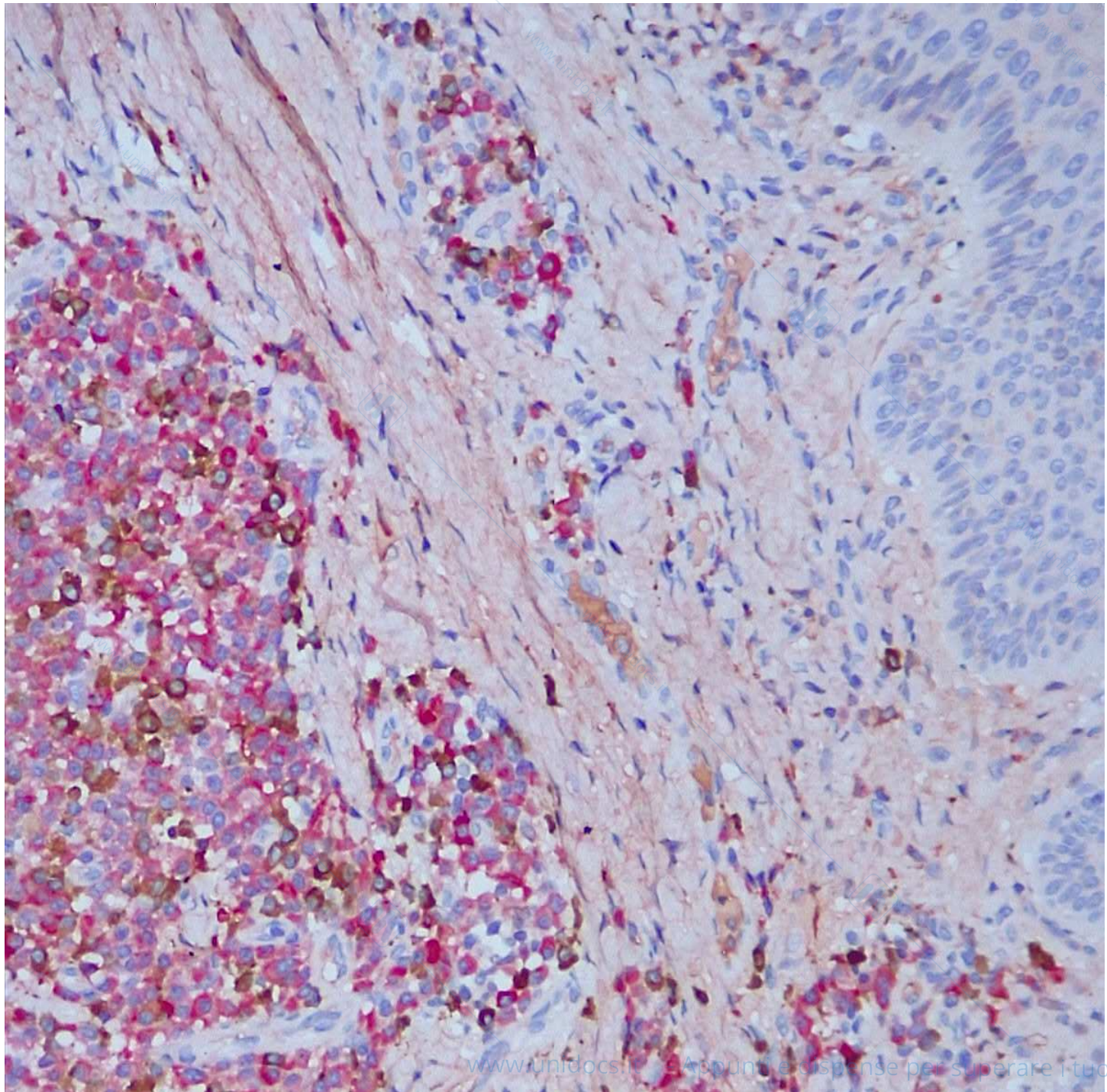


www.unidocs.it

www.unidocs.it

www.u

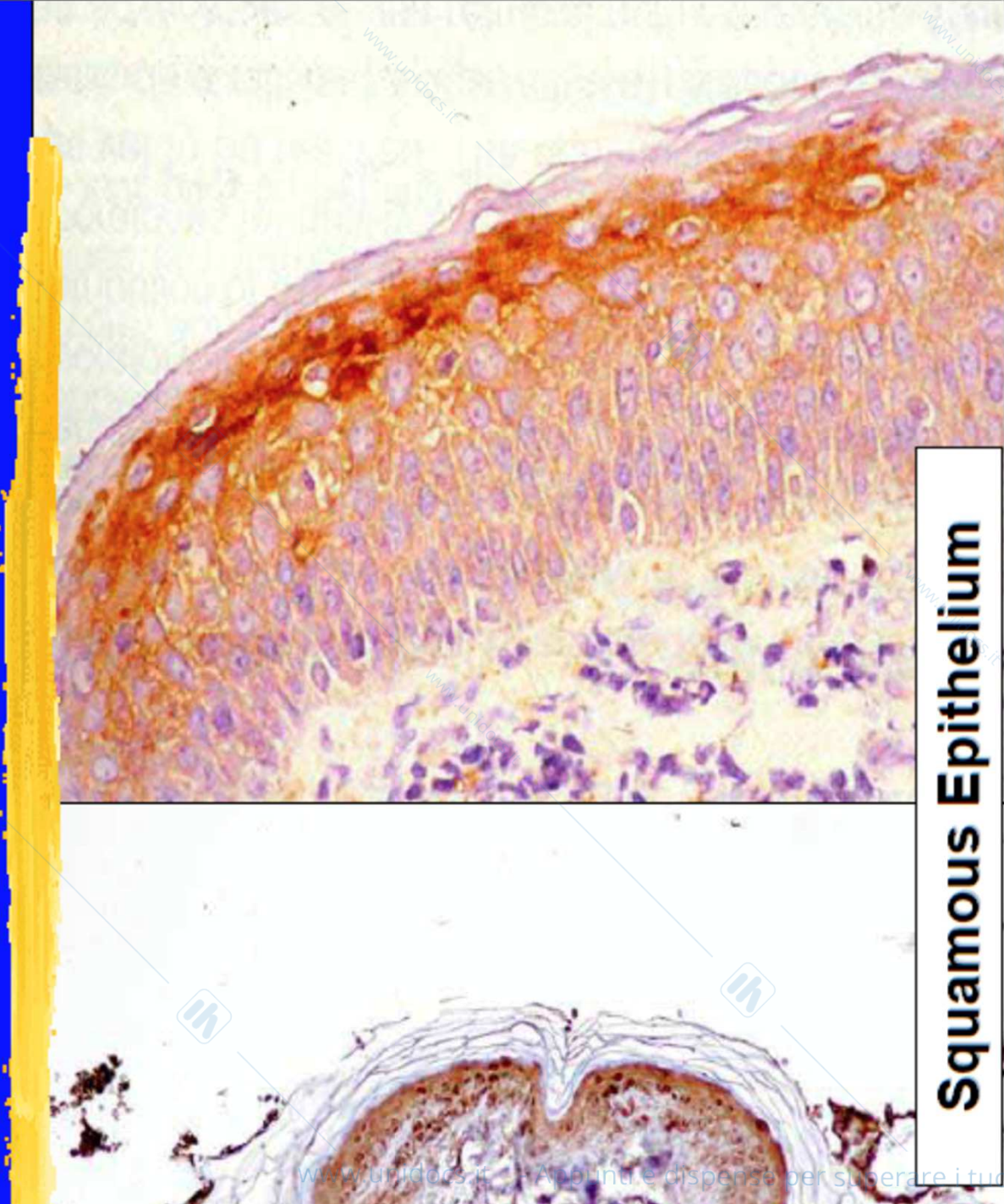




# Difficoltà delle tecniche in immunochimica:

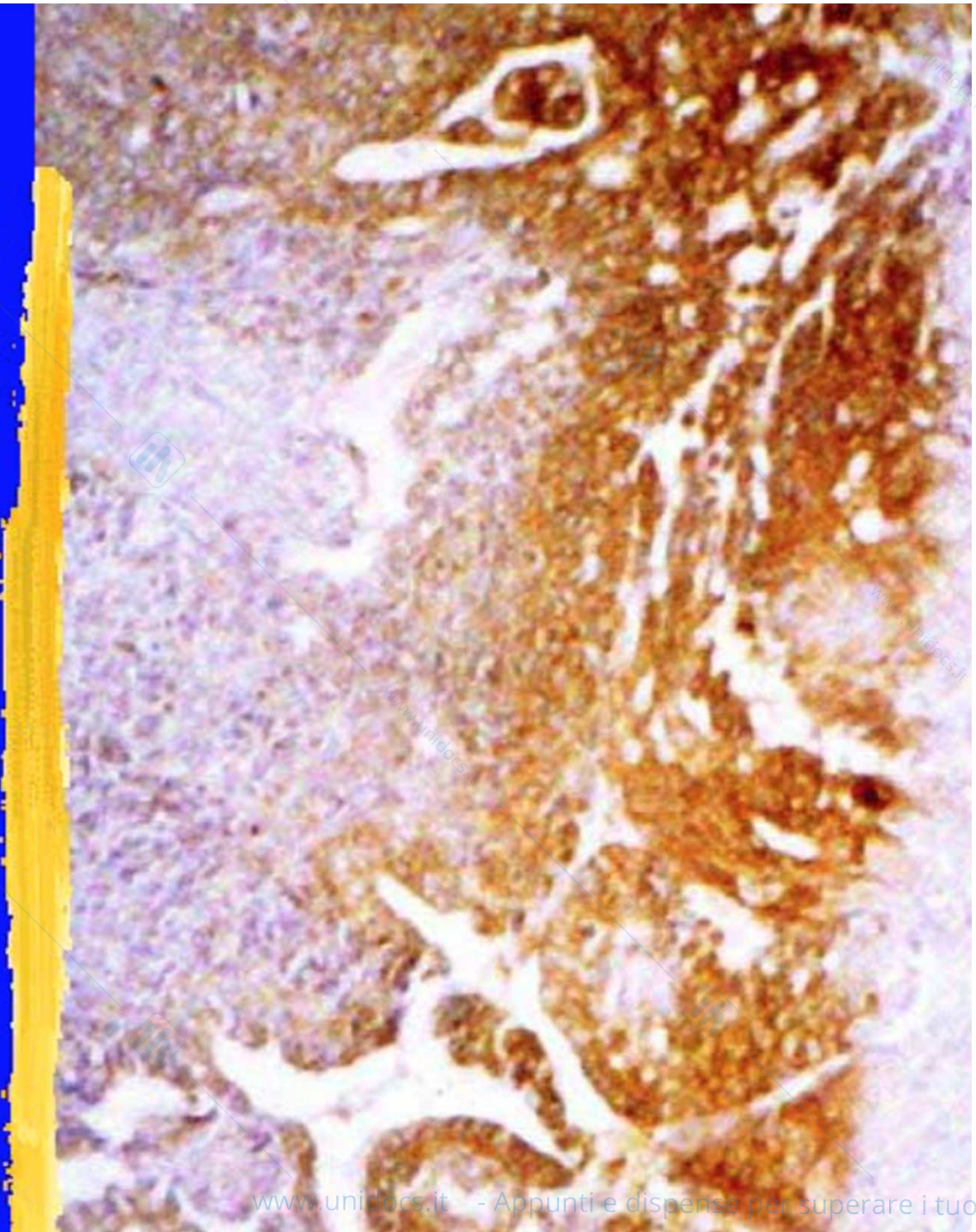
- Pre-analitica del campione in esame;
- Temperatura di conservazione dell'ab (-20°C/4°C);
- Evitare l'asciugatura delle sezioni;
- Recupero dell'antigenicità (Antigen Retrieval);
- Inibizione perossidasi endogena;
- Testare nuovo anticorpo:
  - Diluizione corretta dell'anticorpo
  - Tempo di incubazione dell'anticorpo
- Utilizzo di vetrini polisinati o carichi;
- Inserimento controllo di qualità interno o esterno;
- VEQ;
- Interpretazione dei risultati

# Epithelial Interaction

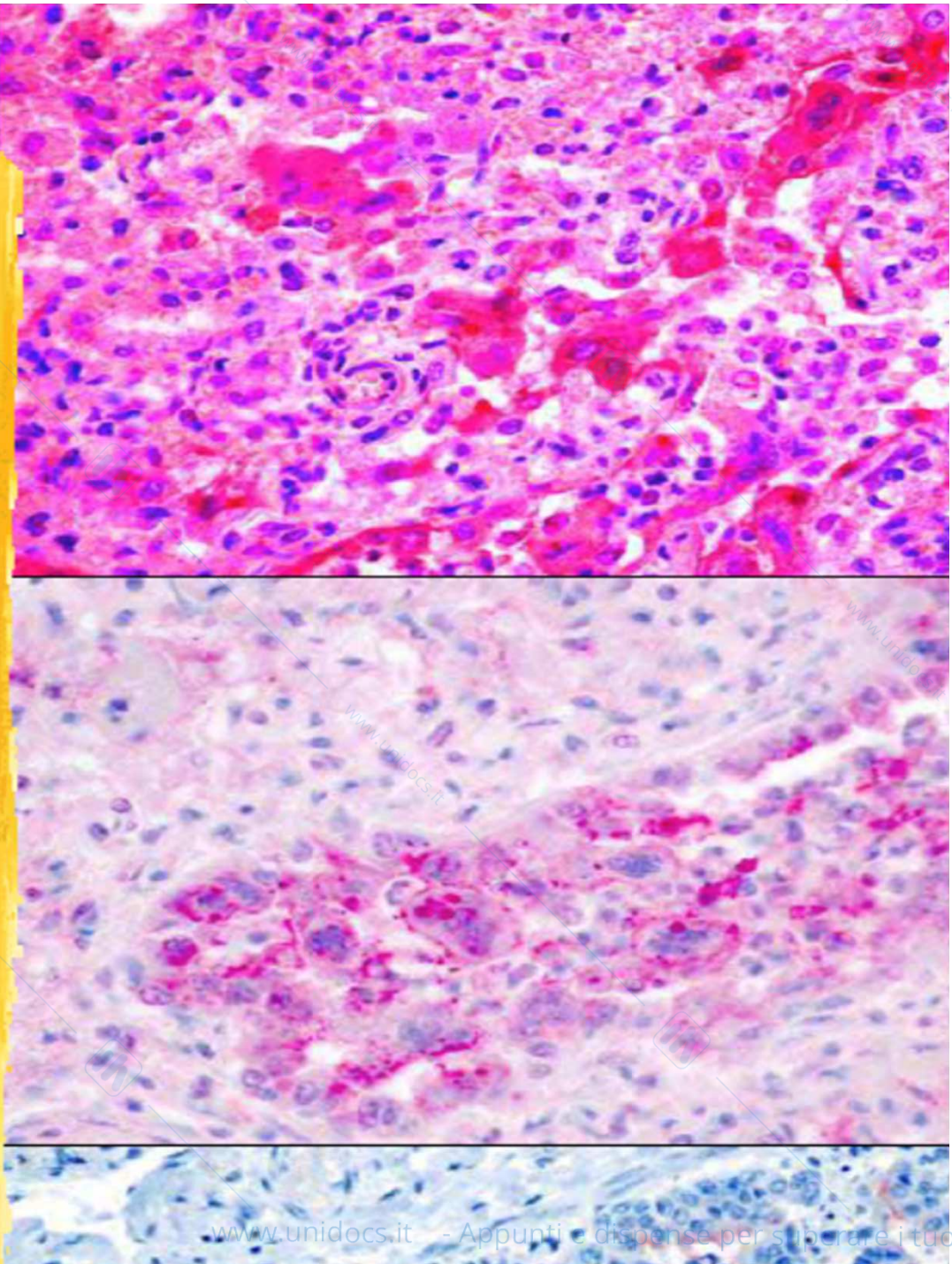


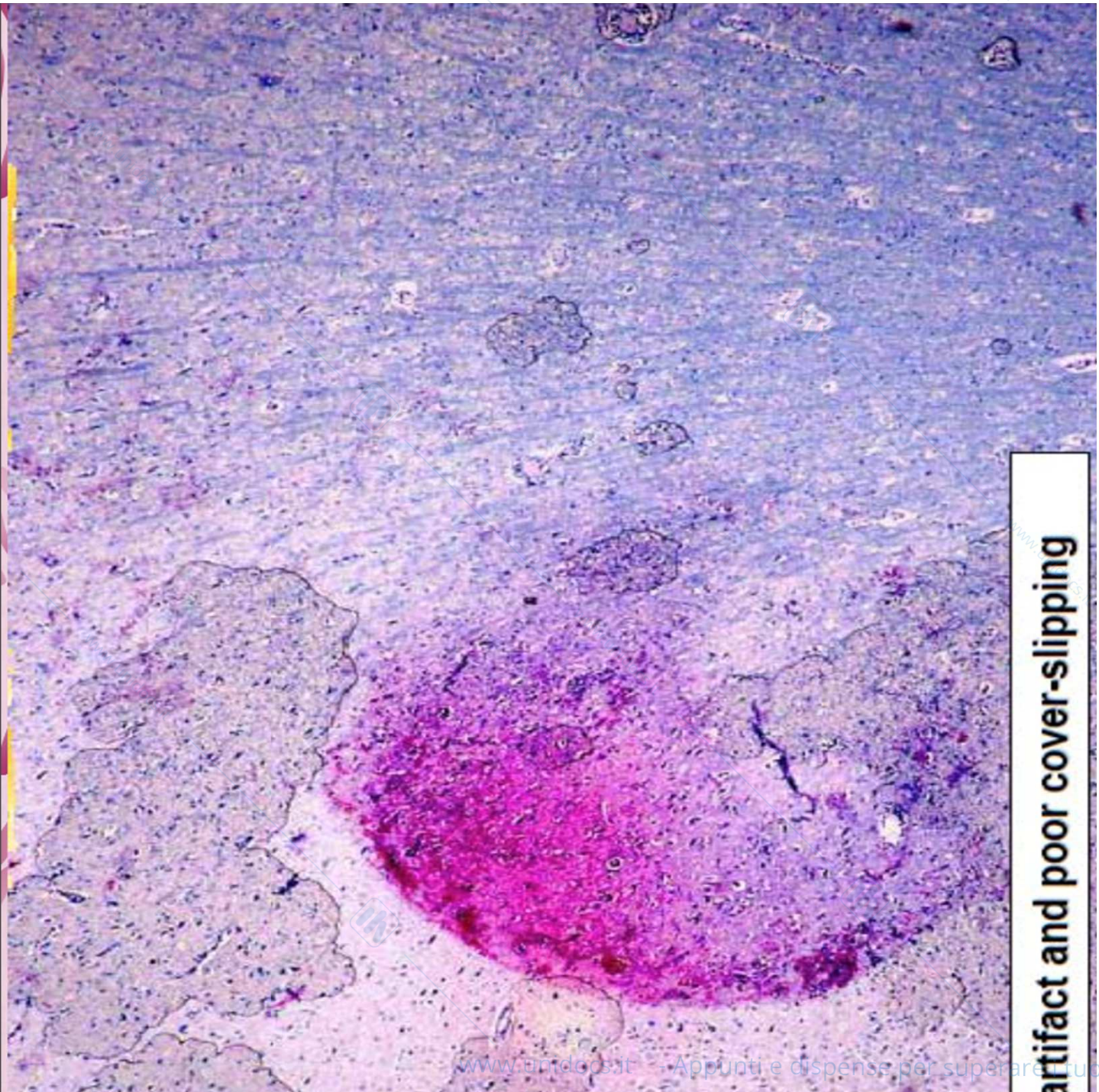
**Squamous Epithelium**

# complete Fixation

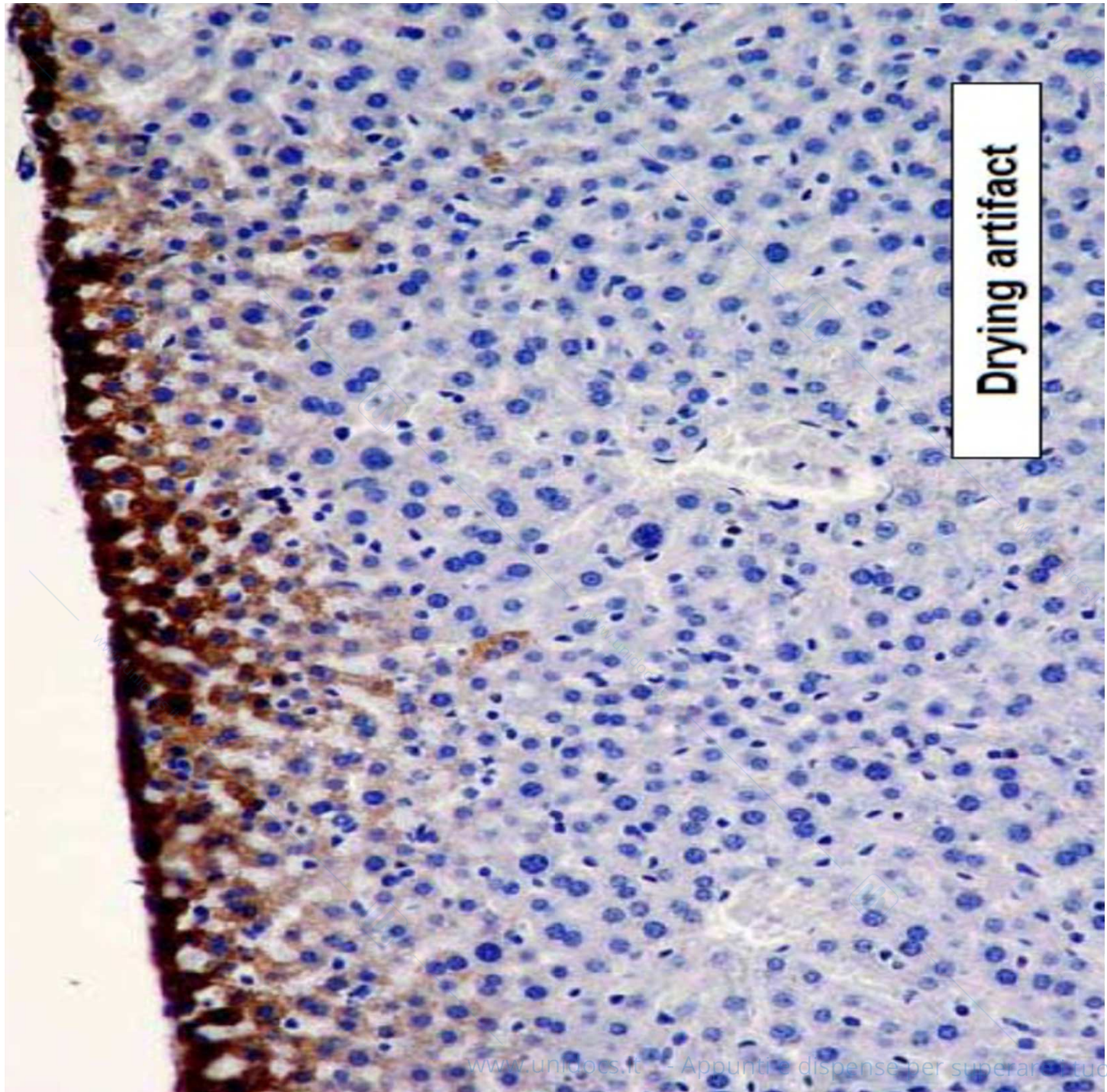


# uate Antibody Titration

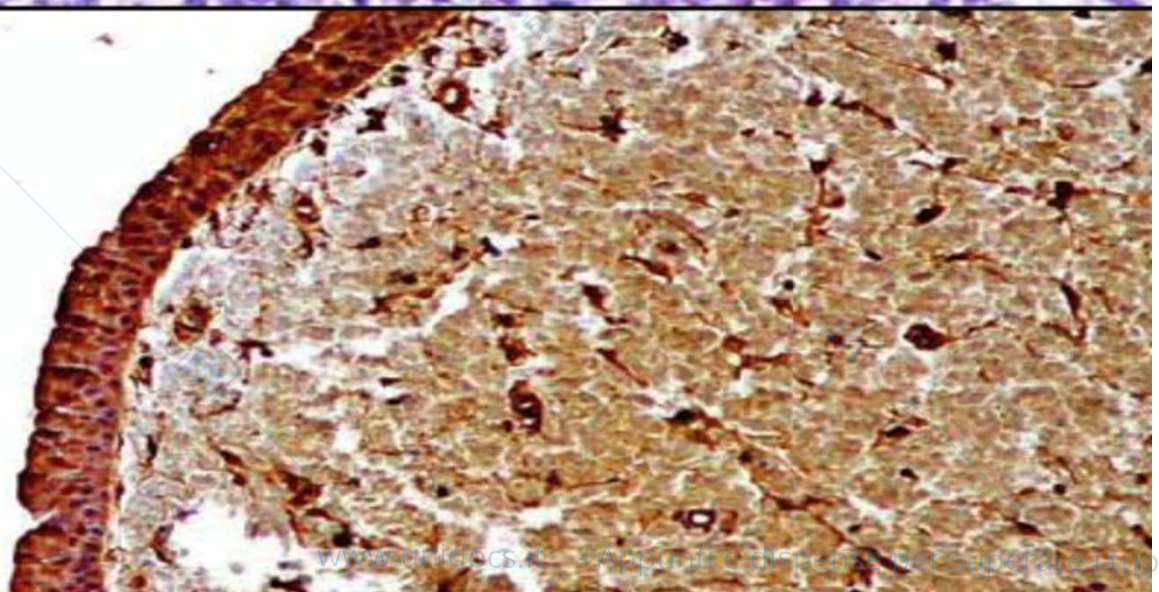
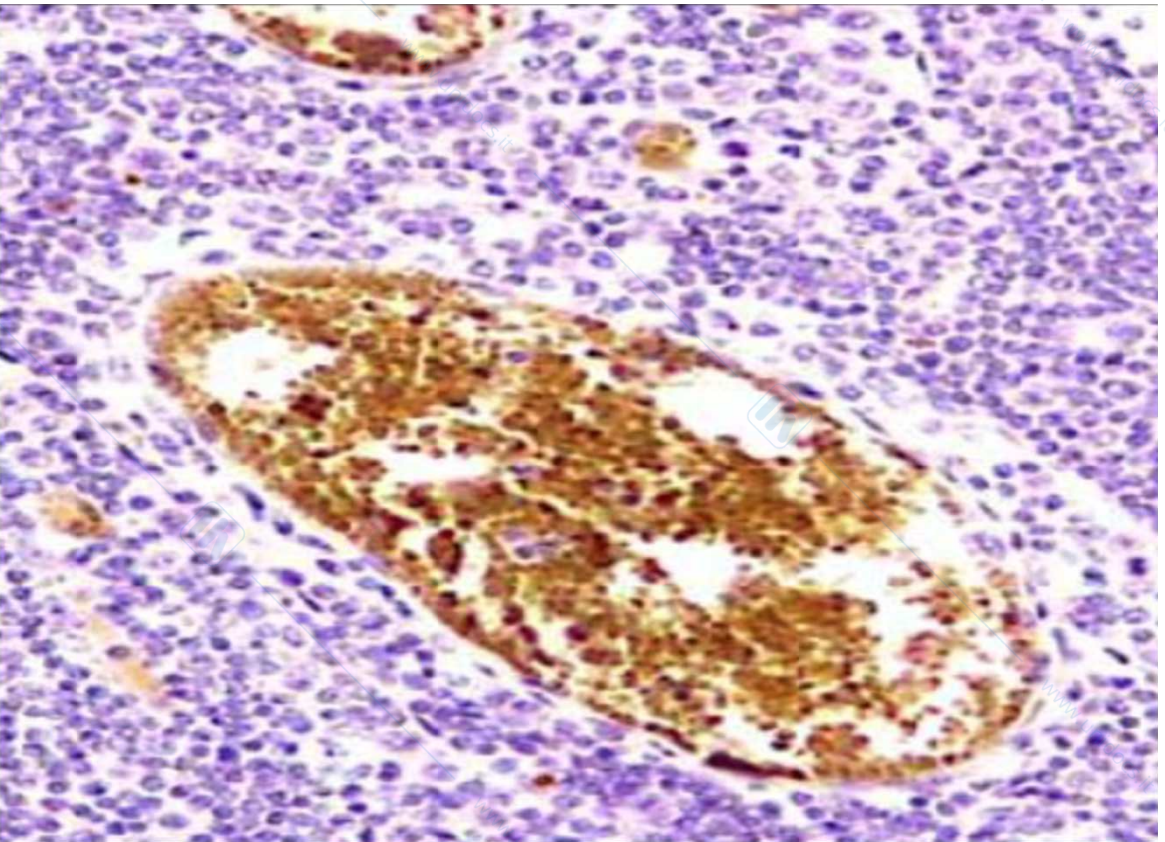




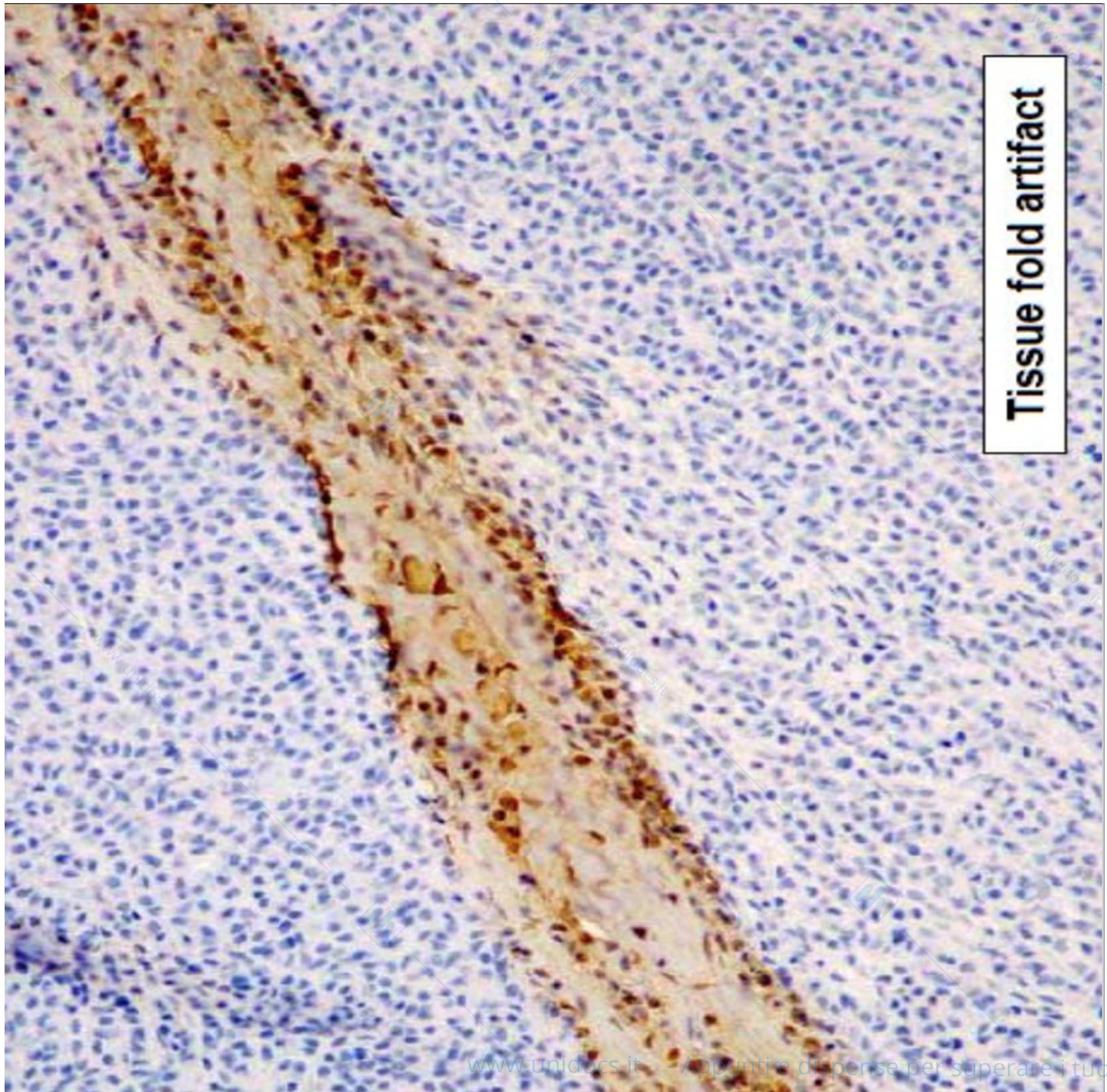
**Artifact and poor cover-slipping**



**Drying artifact**



## PEROSSIDASI ENDOGENA



**Tissue fold artifact**

# Smascheramento al calore:

◆ F. A MICROONDE (800 watt)



◆ PENTOLA A PRESSIONE (120°C)



◆ BAGNO MARIA (95-97°C)



◆ AUTOCLAVE



# CONTROLLI DI QUALITÀ

- Due tipologie interni ed esterni.
- Utili per valutare la qualità e l'avvenuta reazione in un vetrino, oppure la qualità e la variabilità interlaboratorio.
- Quando farli? Ogniqualvolta si abbia un dubbio di una reazione, quando non sono presenti dei controlli interni in una sezione, in caso di ICH legata a marcatori o a strumentazioni particolari, per una valutazione di confronto e migliorare.
- Generalmente o vengono posti sullo stesso vetrino oppure su una sezione a parte.

## Interpretazione dei risultati

Una delle maggiori difficoltà dell'immunoistochimica sta nell'interpretazione dei risultati. La presenza di deposizione di substrato cromogeno in corrispondenza di una cellula o di un tessuto, spesso, dovrebbe significare che in quella sede è avvenuta una reazione tra l'anticorpo e l'antigene tissutale.

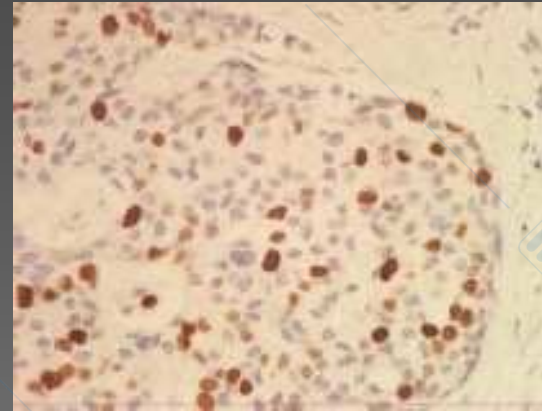
Questo è vero nella maggior parte dei casi, tuttavia altri eventi definiti artefatti, possono essere responsabili della colorazione

## Le cause più comuni di colorazioni dovute ad artefatti sono:

- Presenza di perossidasi o fosfatasi (già presenti nel tessuto ) non adeguatamente inibite.
- Cross-reattività dell'anticorpo I° con un antigene diverso da quello in studio.
- Legame aspecifico dell'anticorpo alla cellula o tessuto (attraverso il frammento Fc o per carica elettrica)
- Inadeguata fissazione del tessuto. Scarsa fissazione provoca un eccesso di "fondo", eccesso di fissazione provoca una ridotta sensibilità

A livello cellulare troviamo le tre principali sedi di colorazione:

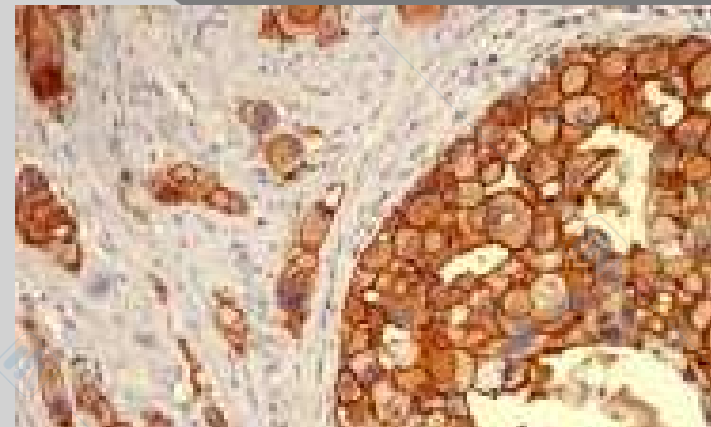
**Nucleare**



**Citoplasmatica**



**Di membrana**



# Carcinoma della mammella

Il carcinoma della mammella, viene caratterizzato con lo studio di:

- Parametri morfologici: grandezza del tumore, istotipo, infiltrazione, grado di differenziazione, presenza o meno di linfonodi metastatici
- Parametri biologici (non puramente morfologici): attività proliferativa (Ki 67), assetto ormonale (ER,PR), prodotti di oncogeni (HER2)

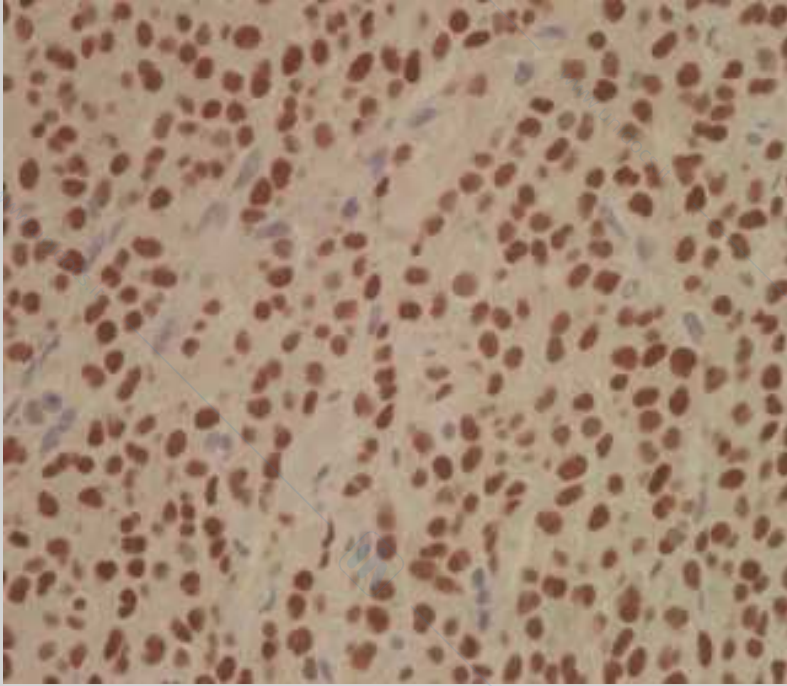
L'analisi immunoistochimica di Ki-67, recettore estrogeni, progesterone e HER2 viene fatta su tutti i tumori della mammella perchè sono importanti sia per dare un'interpretazione istopatologica ma è importantissimo anche per le relative implicazioni terapeutiche.

## Recettore degli estrogeni

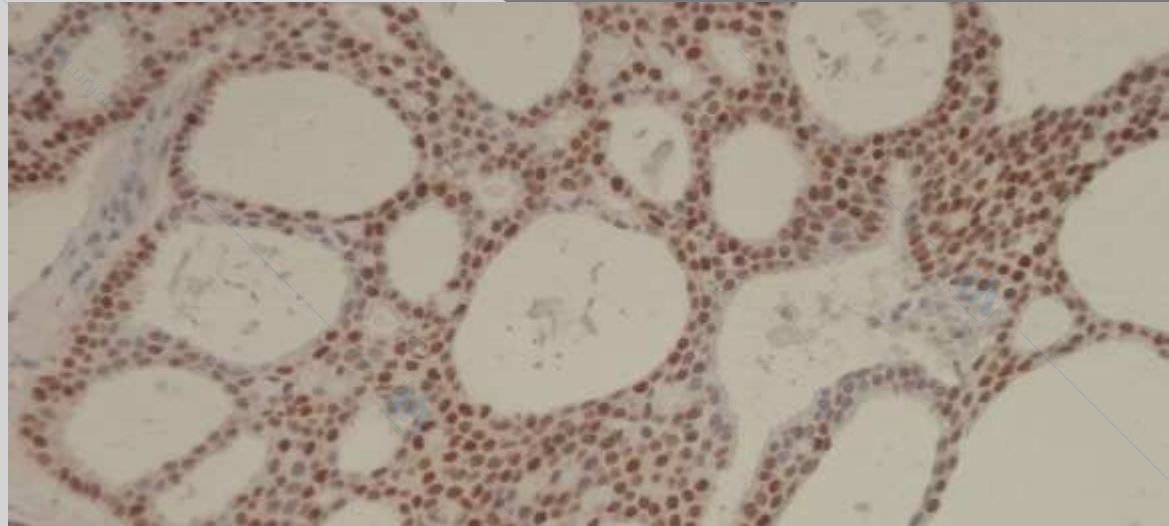
Gli estrogeni, stimolando la crescita delle cellule cancerogene ormono-dipendenti presenti nel tumore, giocando un ruolo determinante soprattutto nella crescita dei tumori al seno “ormono-sensibili”.

La presenza di “recettori per gli estrogeni”, molecole presenti sulla cellula tumorale e che legano gli estrogeni, fa sì che il tumore cresca stimolato dagli estrogeni circolanti. Il tamoxifene, farmaco antitumorale, compete con gli estrogeni circolanti per legare il recettore. Il farmaco inibisce gli effetti degli estrogeni, deacetilando gli istoni, e quindi annullando l'effetto del legame estrogeno-recettore al DNA

## Estrogeno



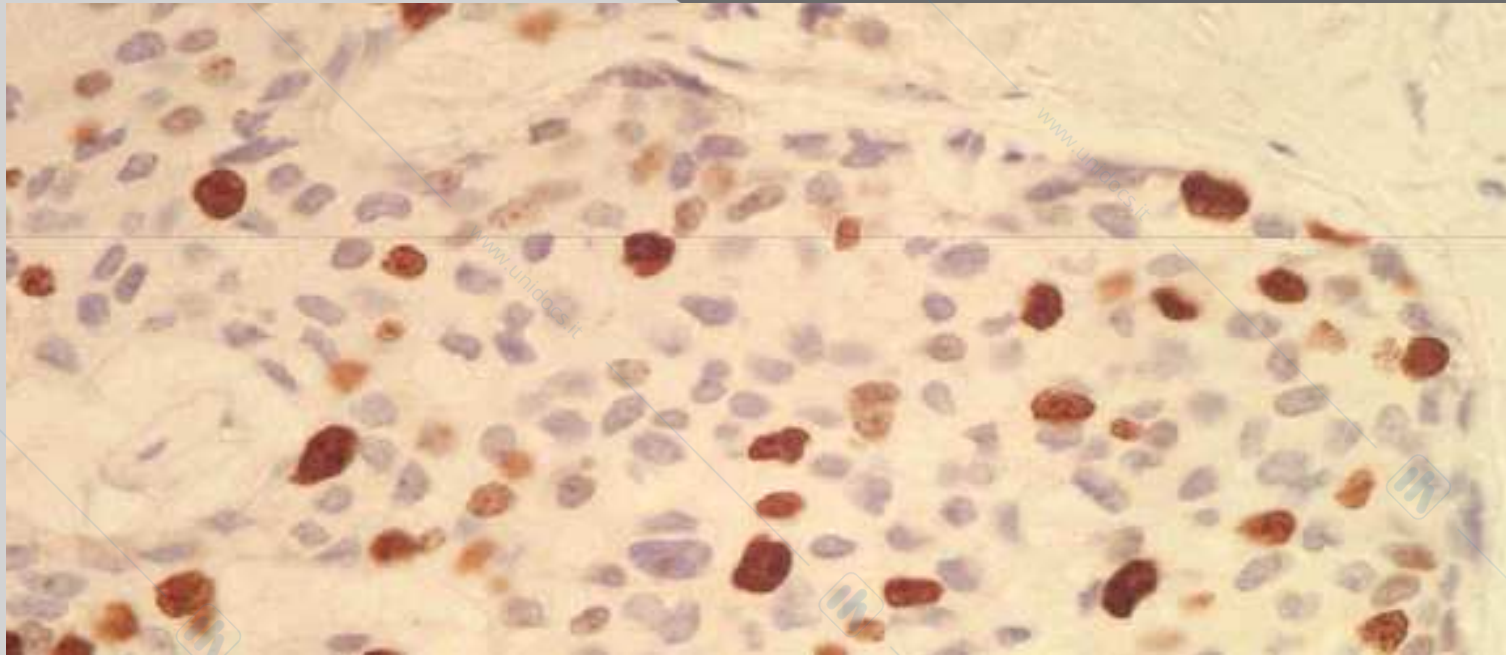
## Progesterone



## Ki 67 (Mib 1)

Anticorpo nucleare che va a valutare l'attività proliferativa delle cellule normali e neoplastiche.

Si utilizza un anticorpo monoclonale che riconosce un antigene nucleare presente nelle fasi attive del ciclo cellulare.



## Her2/Neu

Her 2/neu/c-erbB-2 appartiene alla famiglia dei recettori per i fattori di crescita.

E' un componente della via di trasduzione del segnale coinvolto nella crescita cellulare.

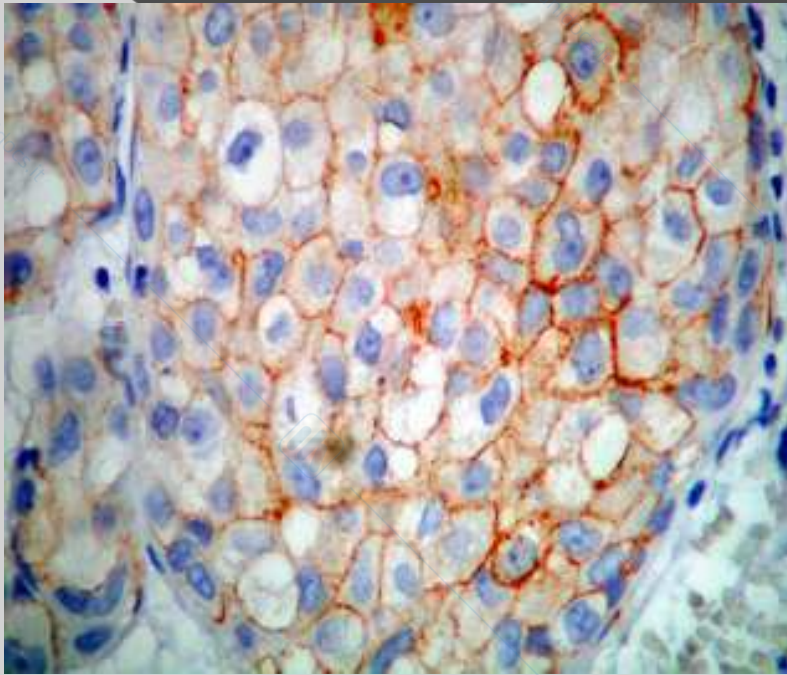
La sua localizzazione extra-cellulare lo rende un possibile bersaglio farmacologico.

I campioni sono inizialmente testati mediante ICH

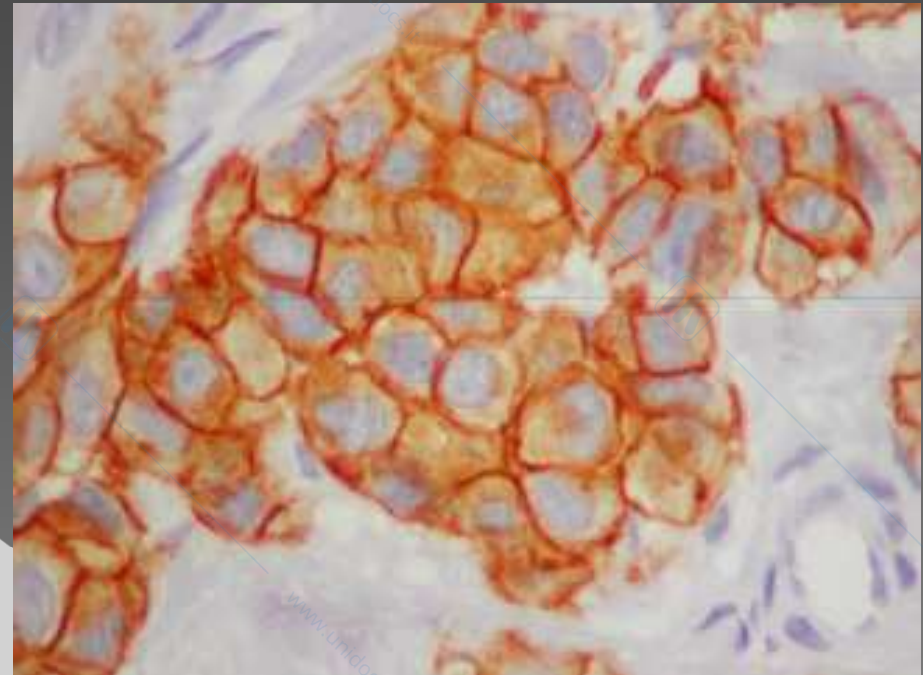
I campioni con intensa positività per Her-2 (ICH 3+) sono eleggibili per la terapia con Herceptin.

I campioni IHC 2+ devono essere ritestati con altro metodo, preferibilmente con indagine FISH.

2+



3+



FISH

Terapia con Herceptin

In anatomia patologica vista la grande quantità di lavoro in routine non è possibile fare tutto il lavoro a mano per questo motivo sono in commercio delle strumentazioni automatiche che eseguono quasi tutte le tecniche immunenzimatiche.



# IMMUNOFLUORESCENZA

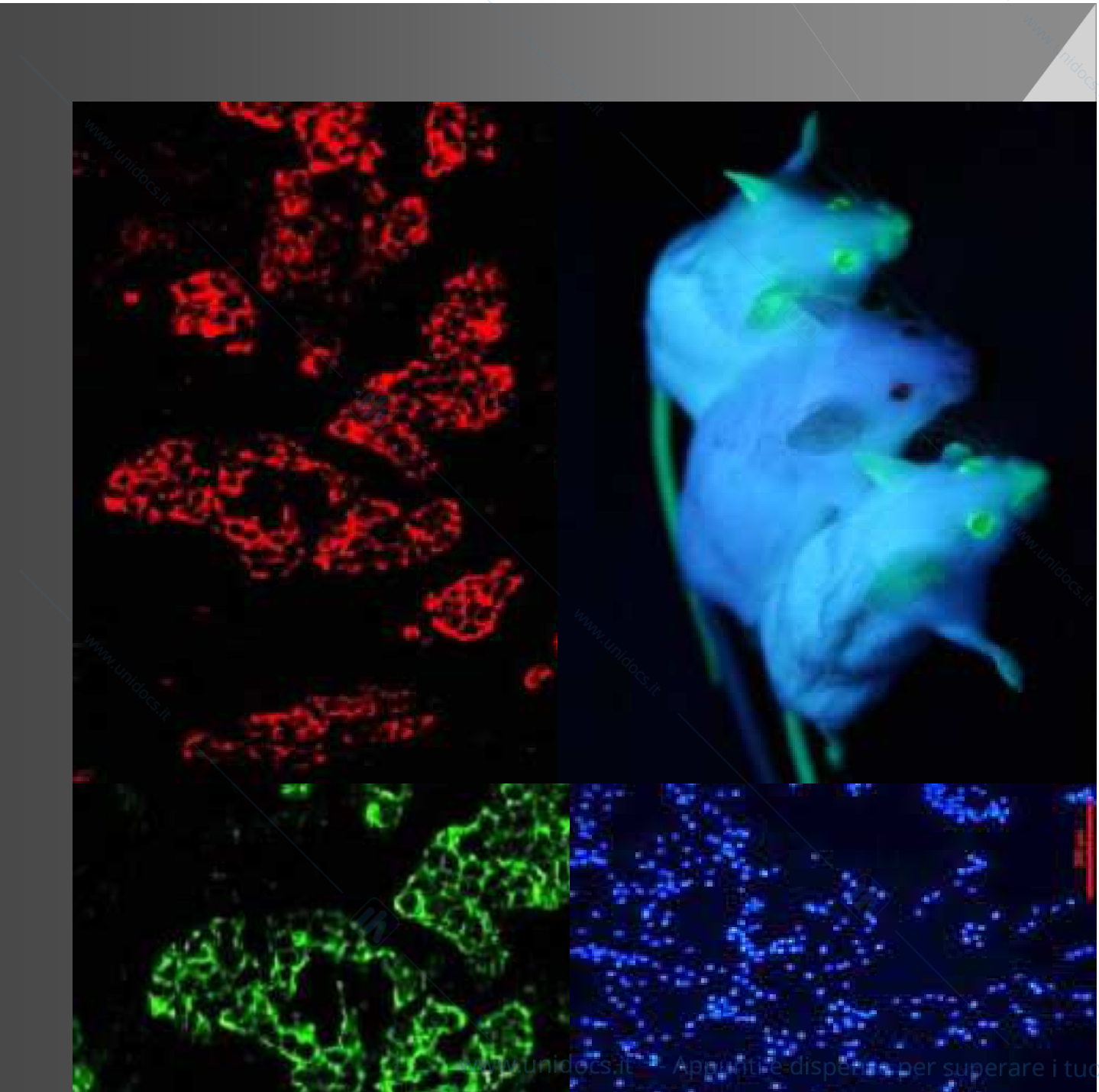
Per le tecniche di immunochimica gli anticorpi possono essere coniugati con fluorocromi, cioè sostanze in grado di emettere fluorescenza. Questi ultimi presentano il vantaggio di dare reazioni molto chiare e brillanti, ma si mantengono solo per brevi periodi di tempo.

Per l'osservazione si usa un microscopio a fluorescenza in questo caso il preparato viene eccitato dall'alto.

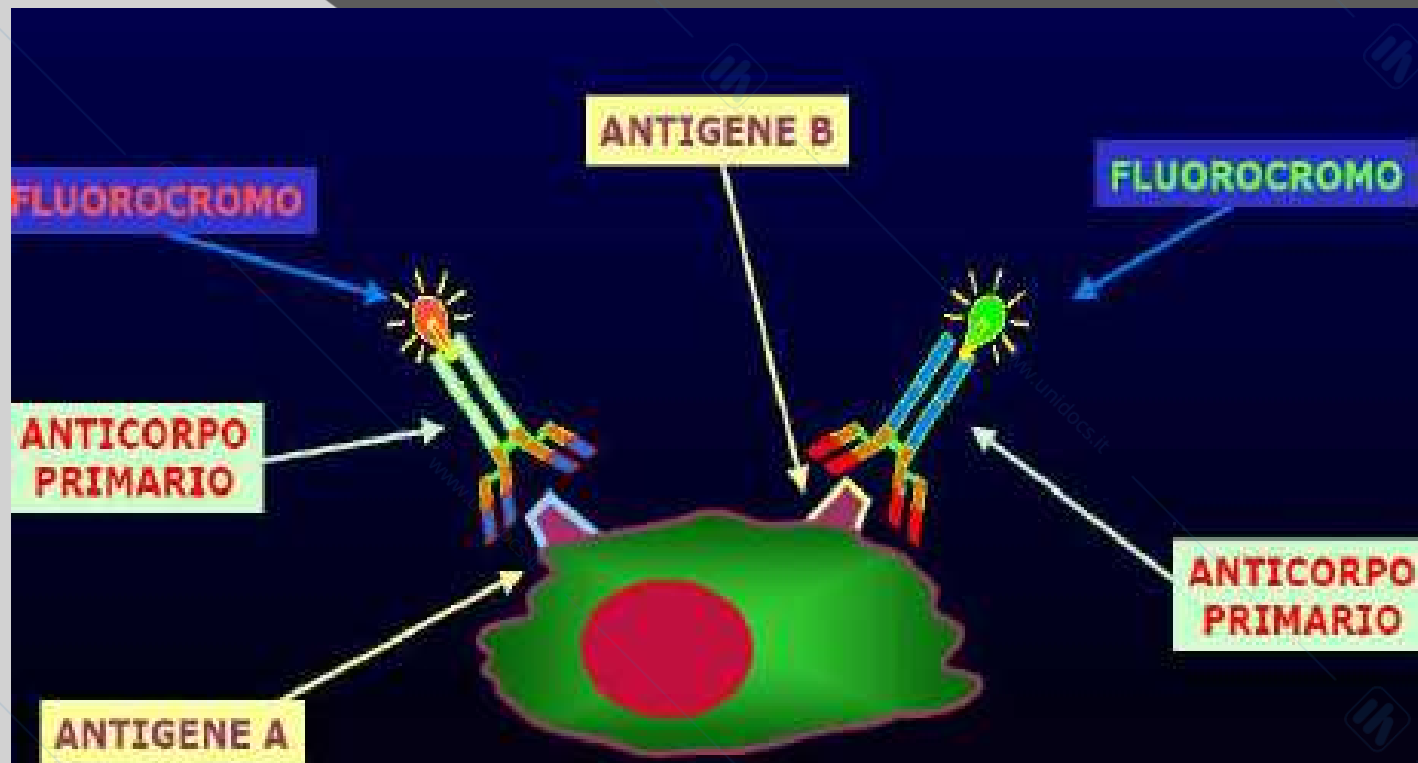
Le sostanze fluorescenti dopo essere state colpite da radiazioni con determinate lunghezze d'onda, emettono delle radiazioni con un'energia inferiore e quindi con una lunghezza d'onda maggiore. La luce emessa viene detta fluorescente

## Le sostanze fluorescenti più utilizzate sono:

- L'isotiocianato di fluorescina (FITC) che viene eccitato da una luce blu ed emette una fluorescenza verde.
- Il tetrametil di rodamina che emette una fluorescenza nel rosso
- La ficoeritrina con emissione di fluorescenza arancione
- DAPI che emette nel blu
- Texas Red che emette una fluorescenza nel rosso scuro



Come per l'immunoenzimatica anche nell'immunofluorescenza oltre alla tecnica diretta e alla tecnica indiretta troviamo anche la colorazione doppia.



## Limiti dell'immunofluorescenza

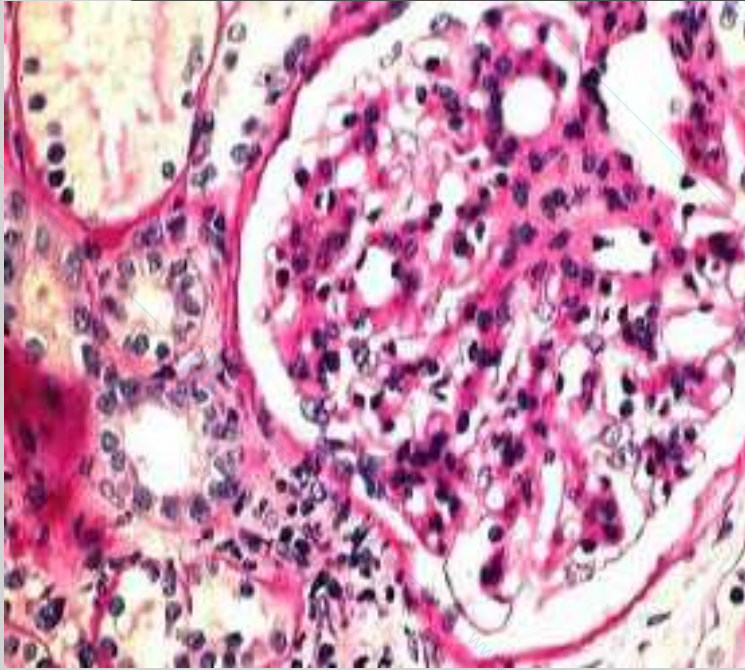
- Scarsa possibilità di diluizione degli anticorpi
- Mancanza di informazioni topografiche
- Naturale estinzione della fluorescenza
- Necessità di osservazione in microscopia particolare
- Non conservabilità dei preparati

Tra i campi di applicazione dell'immunofluorescenza possiamo trovare:

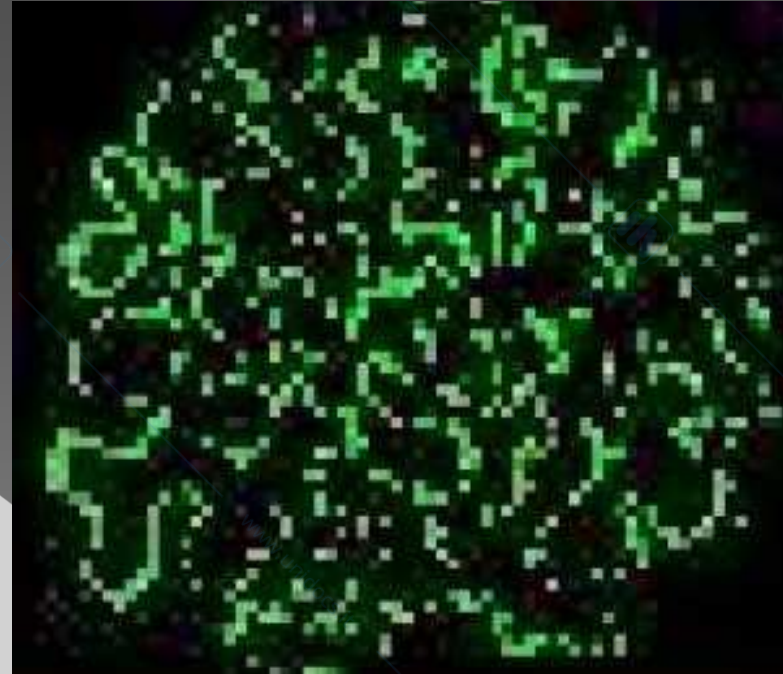
- Diagnostica nefropatologica
- Diagnostica dermatologica (Pemfigoide bolloso)
- Indagini citofluorimetriche

Nella diagnosi delle patologie renali l'immunofluorescenza diretta permette di identificare antigeni e altri fattori presenti nelle strutture glomerulari.

La evidenziazione di depositi di immunocomplessi, di frazioni del complemento, di fibrinogeno e la loro distribuzione a livello glomerulare è un fondamentale supporto nella diagnosi differenziale tra le varie glomerulonefriti.



Glomerulonefrite



Pattern di IgG FITC

Per questo tipo di analisi la biopsia renale viene inclusa in OCT e tagliata al criostato poichè il congelamento stabilizza le strutture cellulari, mantiene inalterate le caratteristiche di antigenicità del tessuto e infine non interferisce nella reazione antigene-anticorpo.

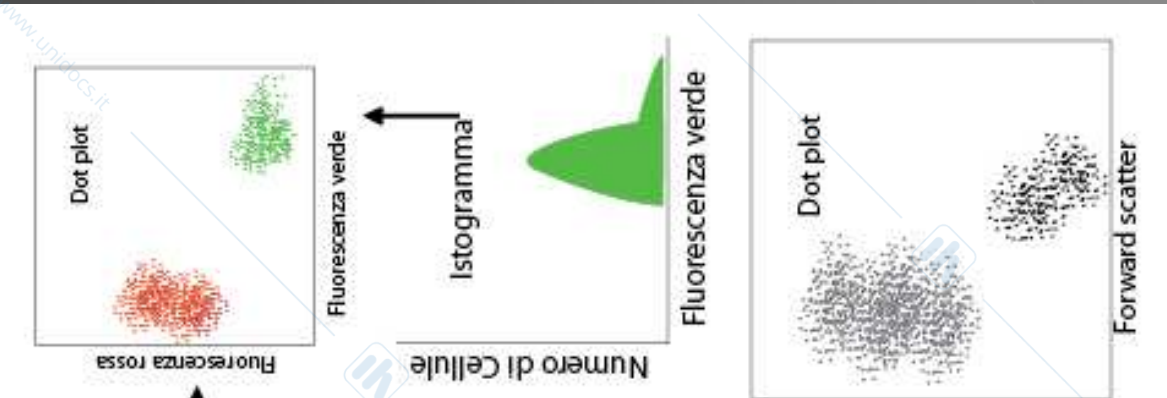
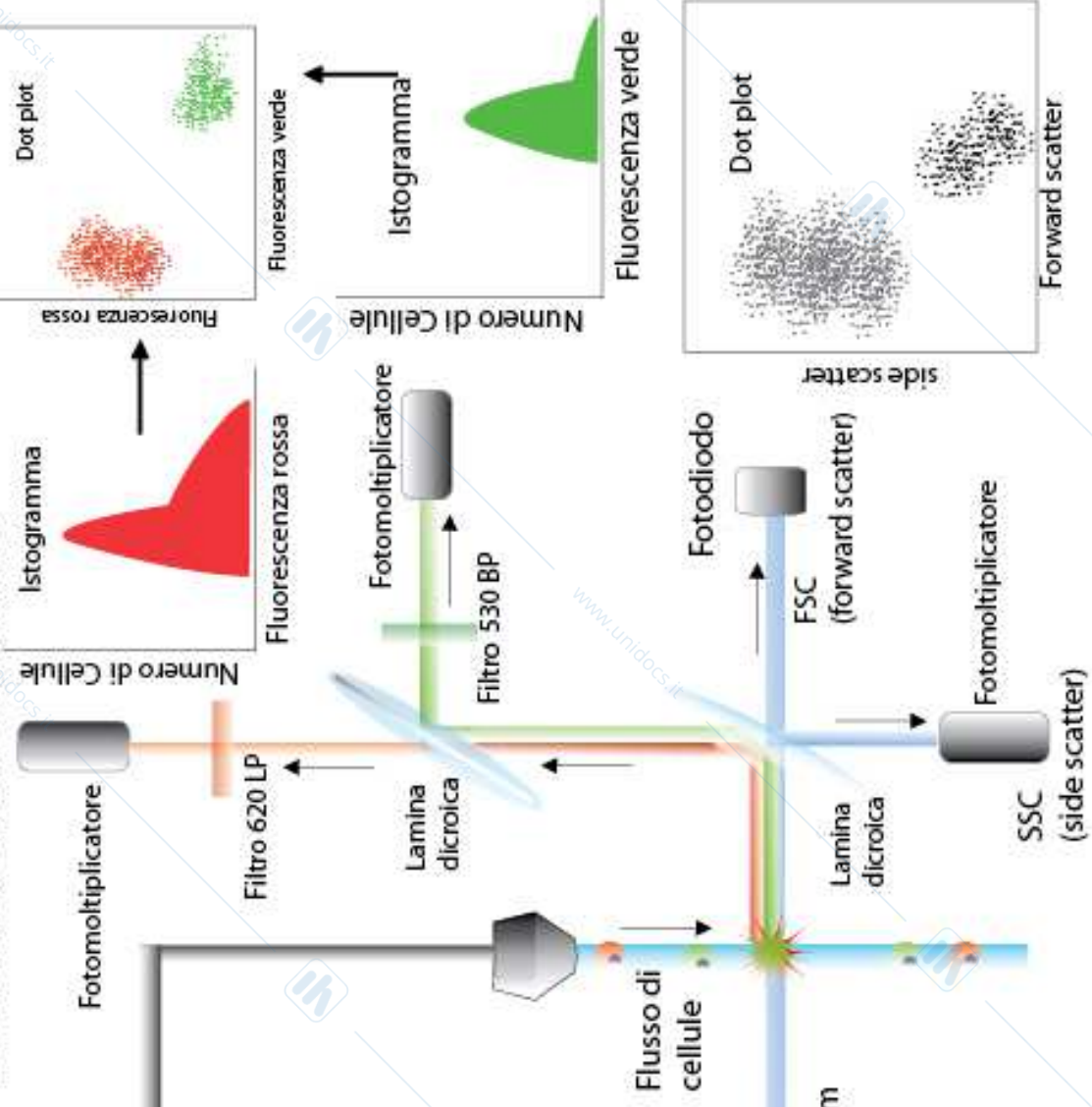
Il campione viene immerso per alcuni secondi in azoto liquido che essendo a una temperatura di  $-196^{\circ}\text{C}$  consente un rapido congelamento senza provocare danni alla struttura antigenica e all'architettura morfologica.

## Procedura per l'immunofluorescenza diretta

- Tessuto fresco
- Campionamento
- Congelamento
- Tagliare al criostato sezioni di 4  $\mu$  su vetrini con adesivo o polarizzati
- Asciugare le sezioni all'aria
- Fissare con acetone a 4°C
- Lavare con tampone
- Incubare con Anticorpo primario fluorescinato 1 ora
- Lavare con tampone
- Montare con un sistema acquoso e conservare al buio
- Osservare al microscopio a fluorescenza



# Schema di citometro a flusso



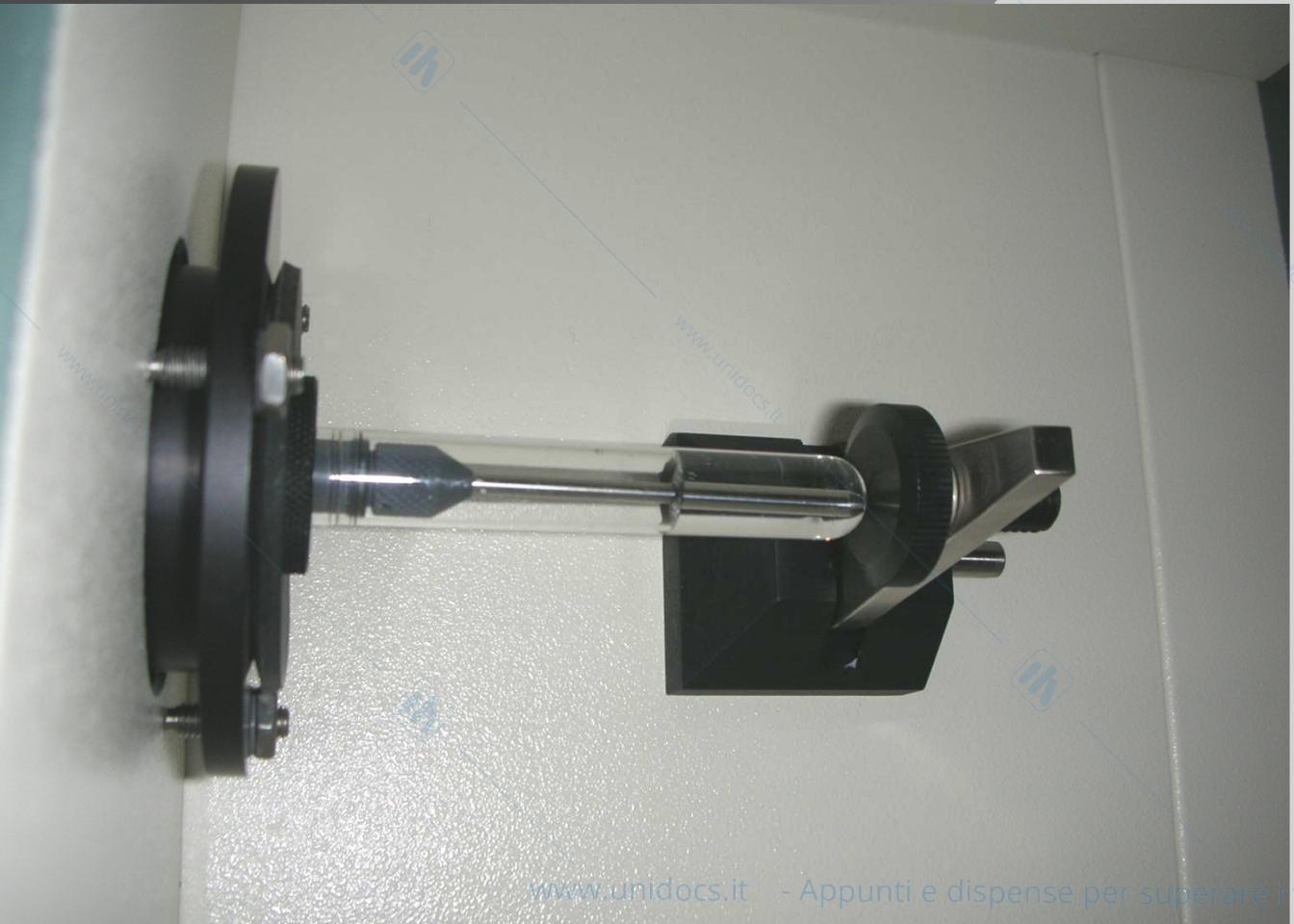
Il citometro a flusso è uno strumento che permette l'analisi di parametri morfologici, molecolari, biofisici e funzionali di singole cellule vitali in sospensione.

Viene utilizzato in varie applicazioni diagnostiche: Immunologia (immunofenotipizzazione cellulare, monitoraggio trapianti d'organo), ematologia (analisi formula leucocitaria, studio midollo osseo), oncologia (analisi DNA tumorale, indice di DNA, misura dell'attività proliferativa tumorale), farmacologia (effetti di farmaci su recettori e antigeni cellulari) altro (identificazione batterica e ricerca di prodotti virali, supporto alla citologia convenzionale etc)

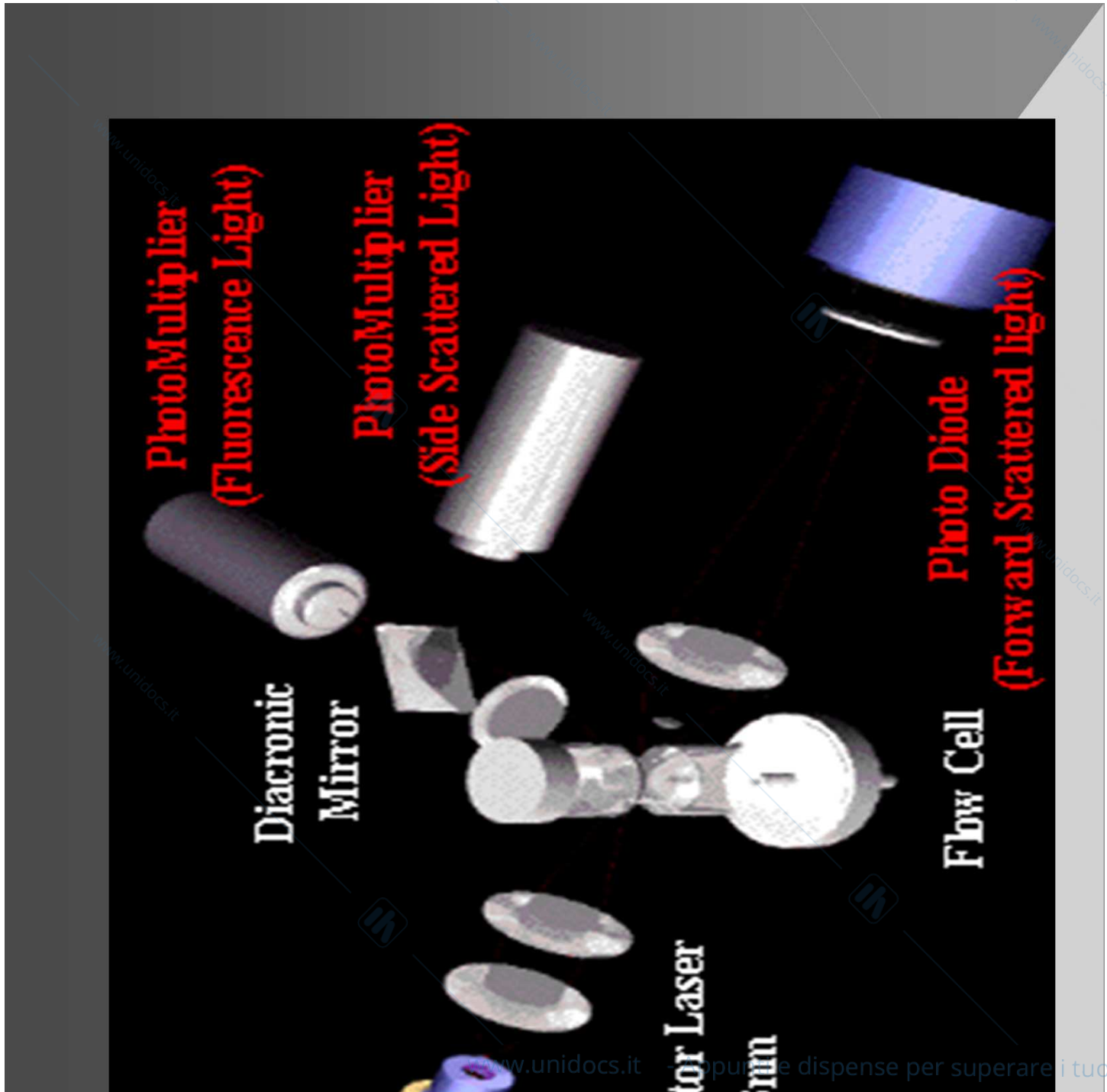
Un citometro a flusso è costituito da:

- sistema fluidico (idro-pneumatico) che provvede al trasporto del campione nella camera di conta e alla focalizzazione delle cellule
- sistema ottico costituito da una sorgente luminosa (laser ad argon) che consente di "intercettare" le particelle e la raccolta de segnali emessi
- sistema elettronico costituito da fotodiodi e fotomoltiplicatori che convertono i segnali elettrici di tipo analogico
- sistema di analisi e memorizzazione di dati





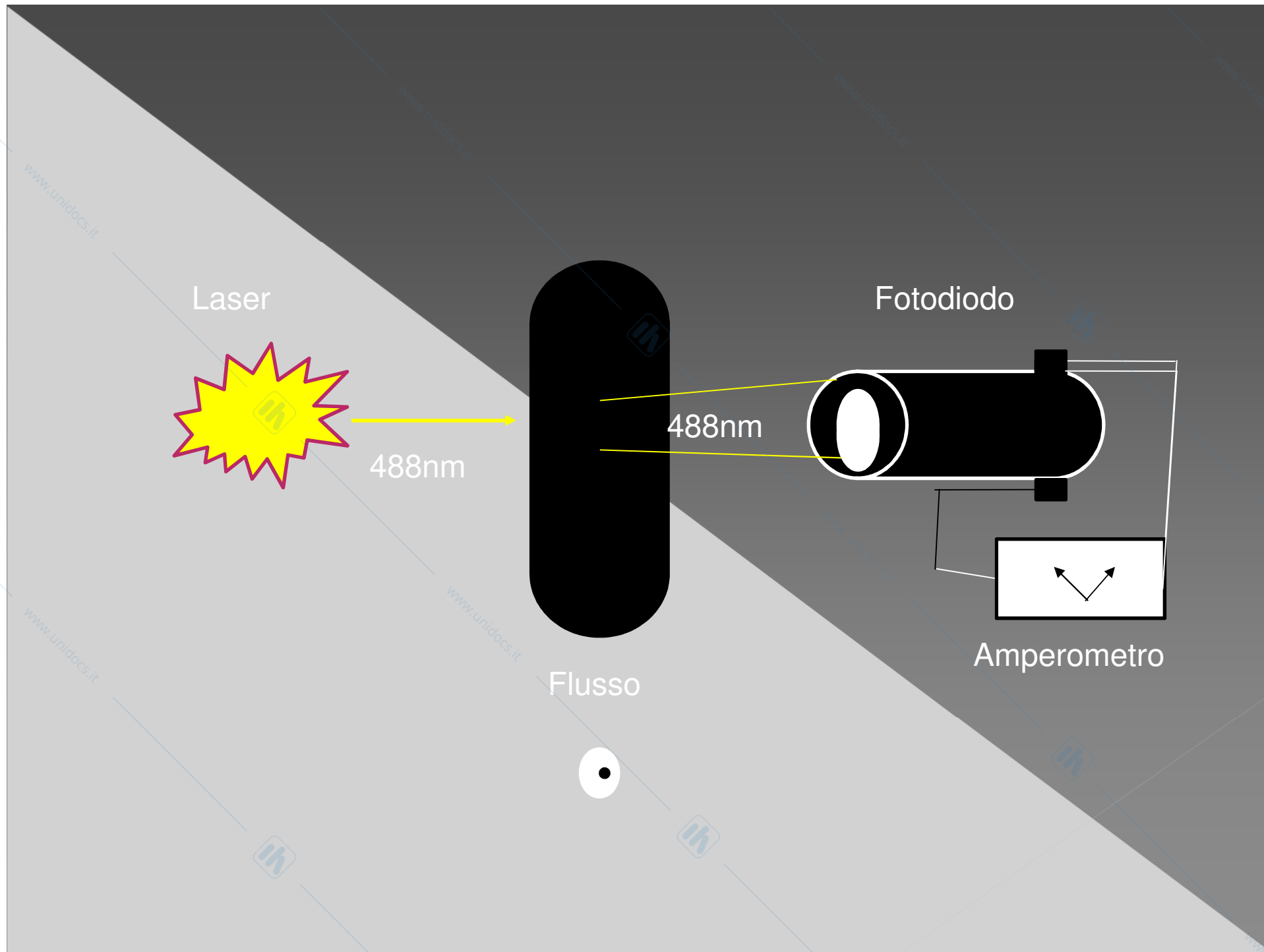




## Rifrazione frontale “forward scatter”

Quando il raggio monocromatico, prodotto dal laser, colpisce una particella, una parte dei suoi raggi viene deviata e con un fotodiodo è possibile osservare la quantità di luce raccolta. La modifica tra la luce incidente e la luce trasmessa al fotodiodo è proporzionale alla dimensione della particella.

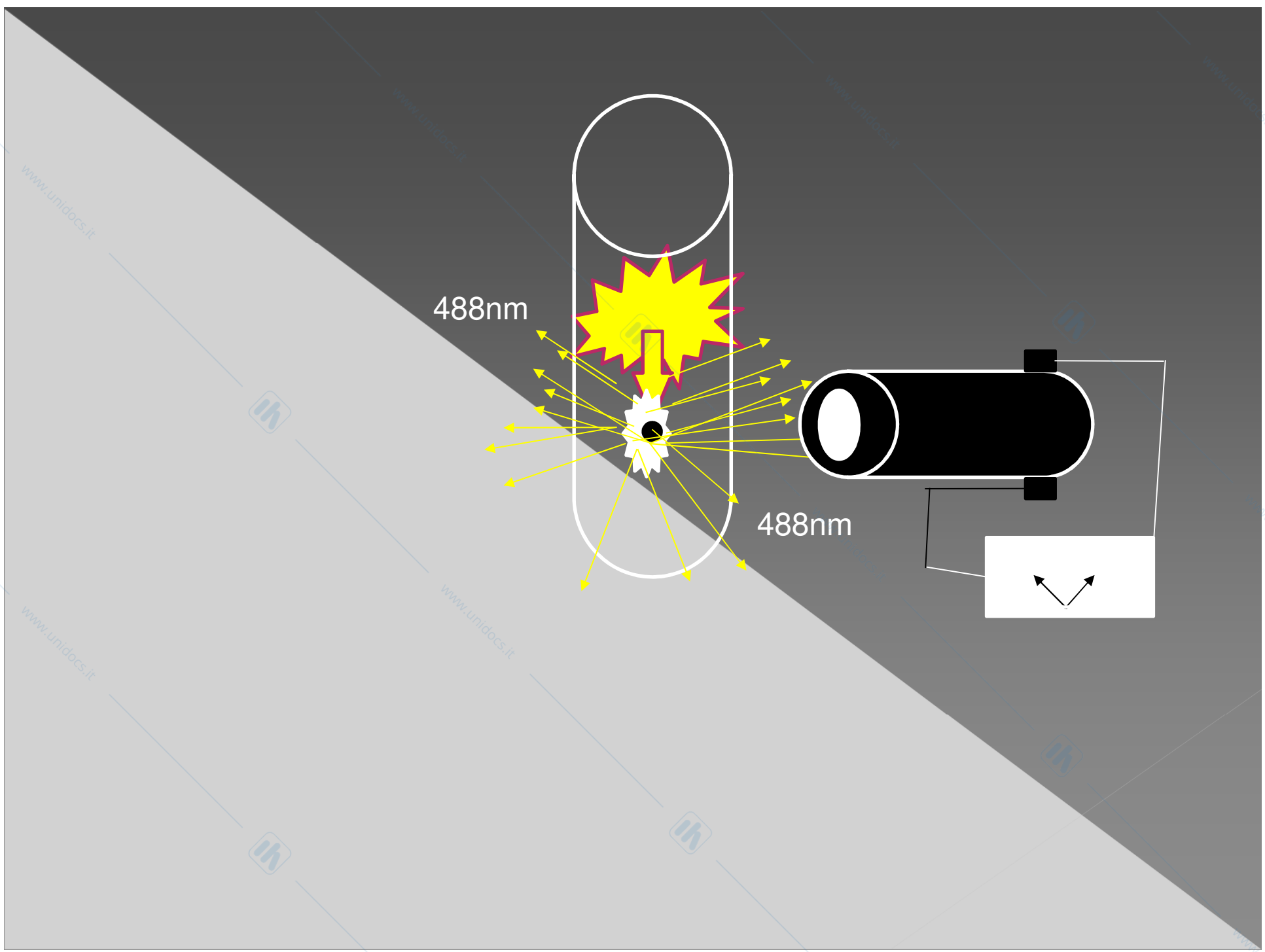
Fotodiodo: apparato elettronico costituito da un cristallo (germanio, silicio) che modifica un flusso di corrente che lo attraversa in seguito all'incidenza di un raggio luminoso. La modifica è proporzionale alla quantità di luce incidente.



## Rifrazione laterale “side scatter”

Se la superficie della particella è regolare (sferica come un linfocita) la luce viene rifratta uniformemente in una direzione opposta alla sorgente luminosa. Se invece la particella ha una superficie irregolare (granulocita) la luce non viene solo rifratta ma anche riflessa in tutte le direzioni dello spazio. In questo caso con opportuni sistemi ottici accoppiati a fotomoltiplicatori è possibile osservare la luce riflessa e/o rifratta in un angolo di  $90^\circ$ .

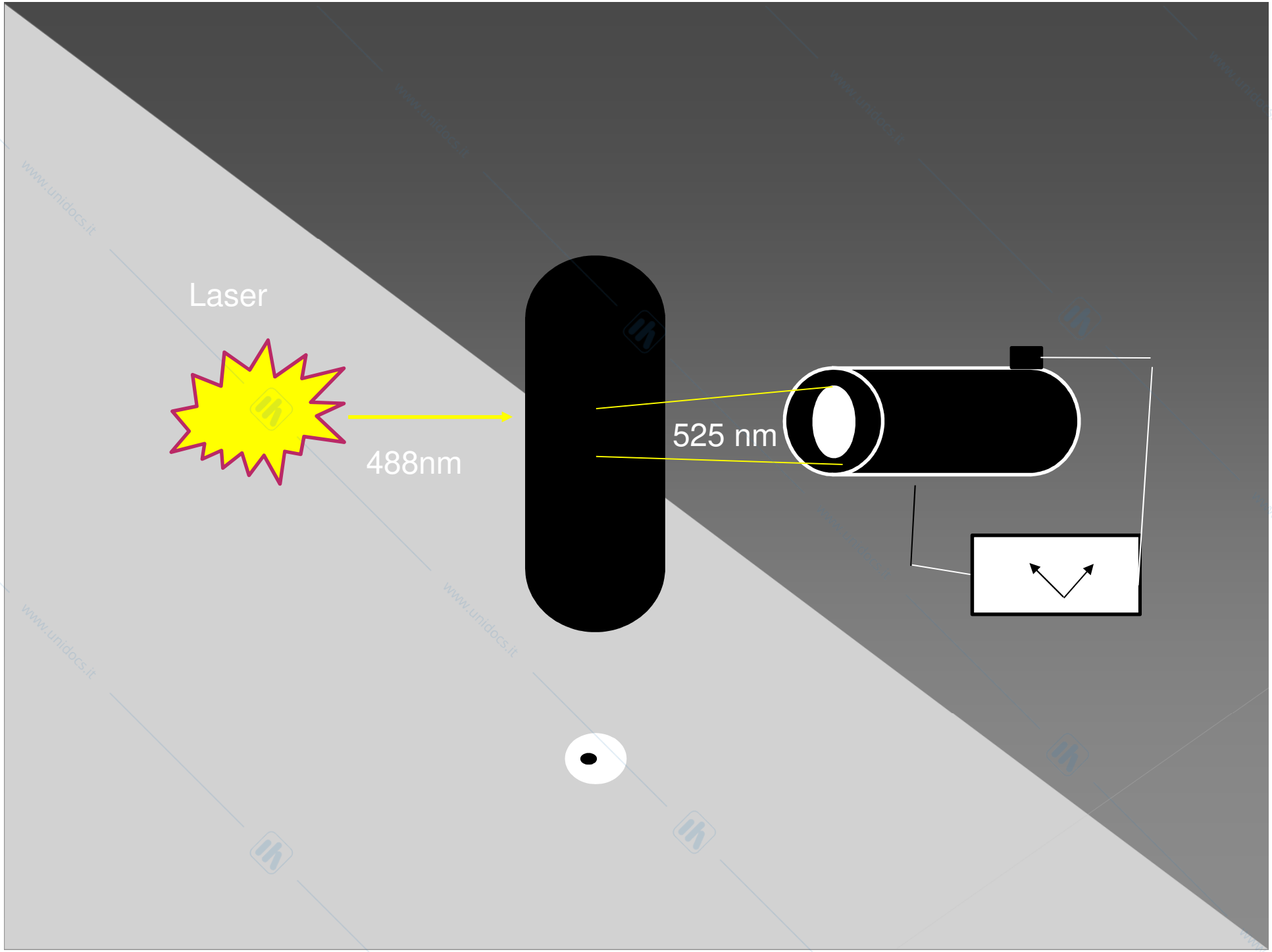
La quantità di luce raccolta sarà proporzionale alla granulosità interna della particella.



## Fluorescenza

Alcuni fluorocromi possono essere coniugati a proteine in modo da poter dimostrare la presenza di alcuni antigeni con test di immunofluorescenza.

Nel caso del citofluorimetro le sostanze fluorescenti presenti sulla particella, colpite da un raggio laser di opportuna lunghezza d'onda, emettono in tutte le direzioni dello spazio una luce ad una lunghezza maggiore che può essere raccolta da un fotomoltiplicatore e trasformata in un segnale elettrico.



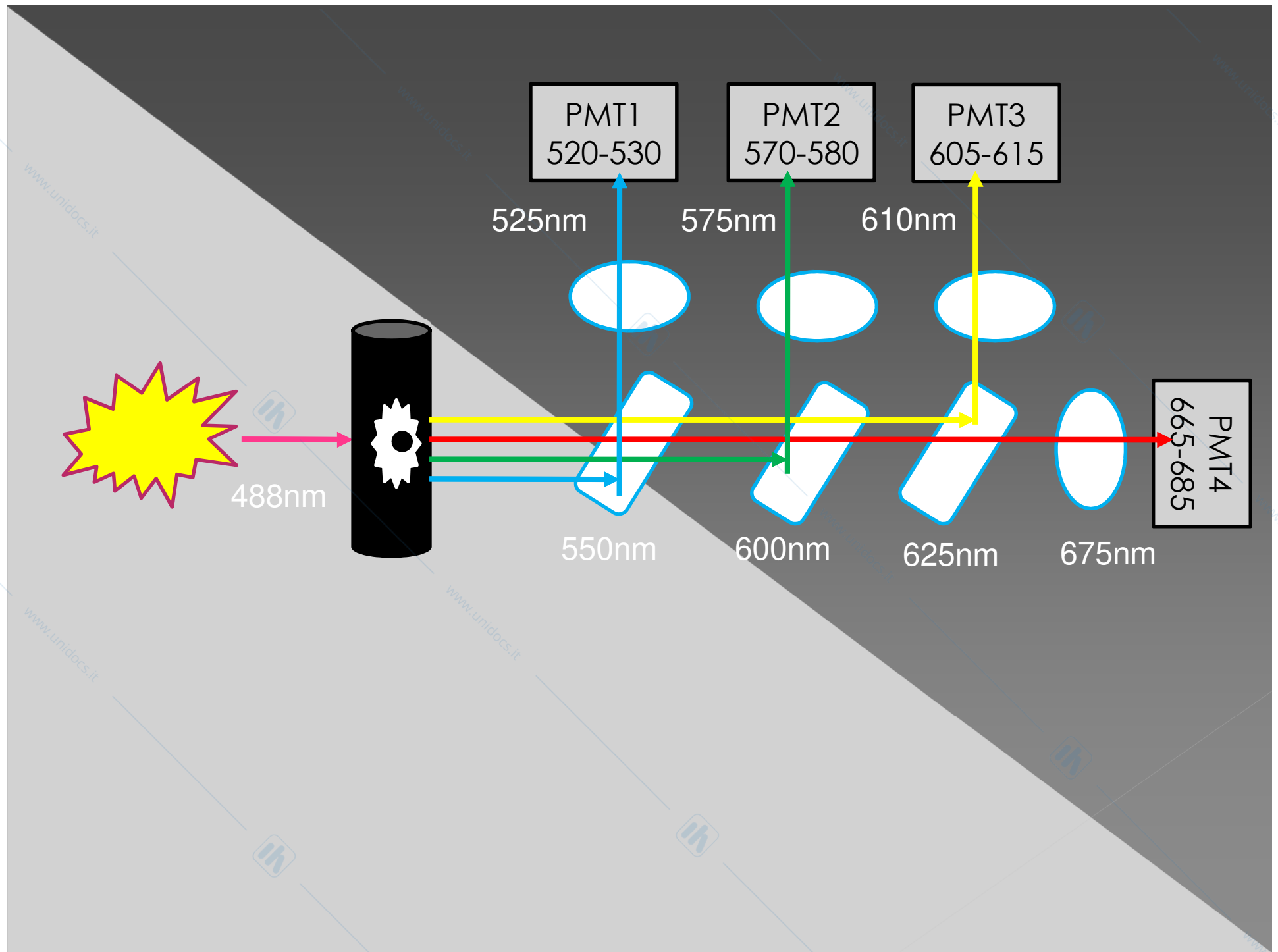
Il fotomoltiplicatore è preceduto in questo caso da un sistema ottico caratterizzato da filtri in grado di selezionare la lunghezza d'onda caratteristica del fluorocromo in esame. Quando la particella trasporta fluorocromi caratterizzati da differenti lunghezze d'onda di luce emessa, sarà necessario utilizzare opportune combinazioni di filtri per evitare interferenze tra i vari fluorocromi.

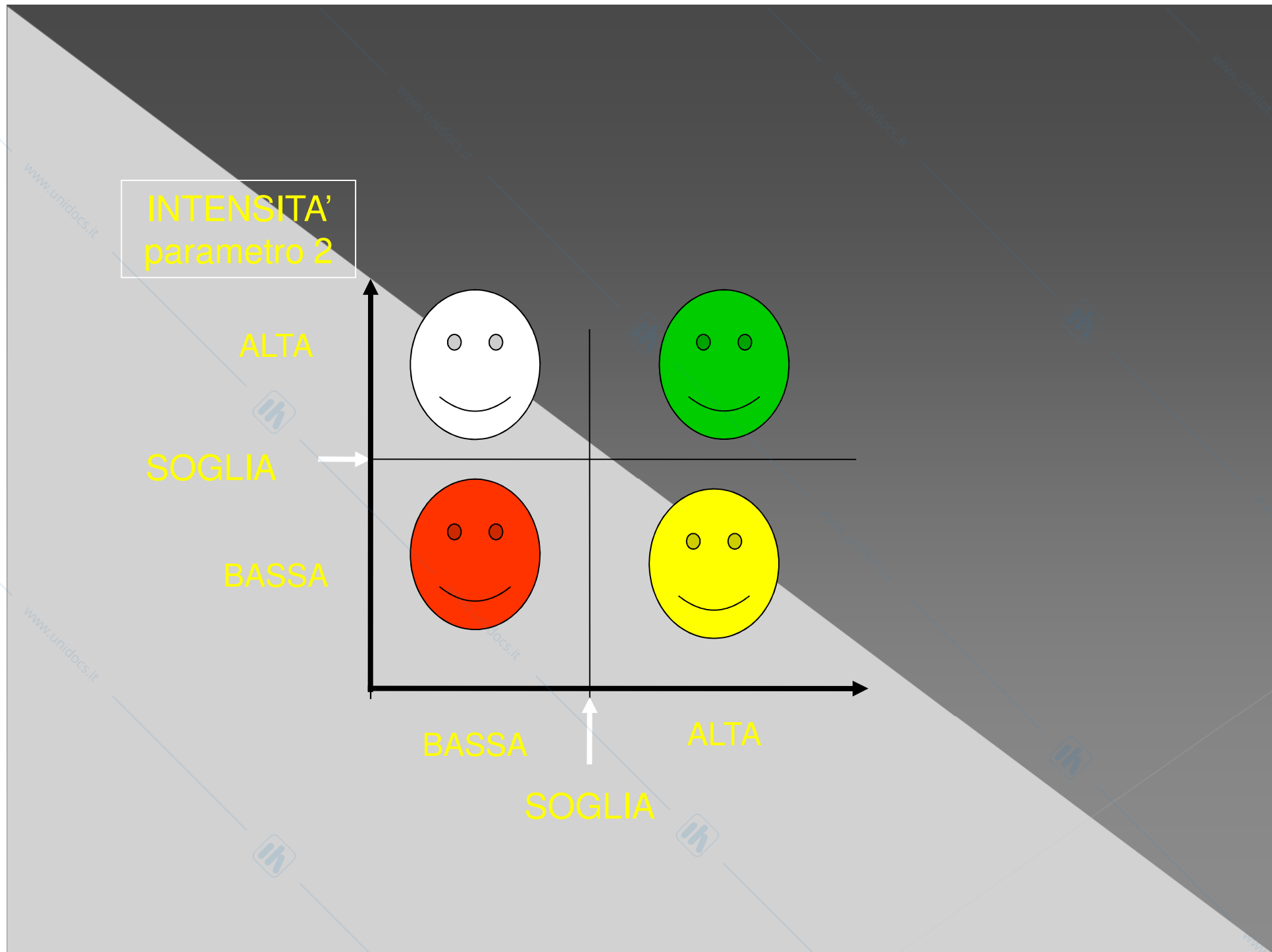
**Filtri dicroici:** Filtro in grado di dividere una miscela di raggi luminosi di differente lunghezza d'onda ( $\lambda$ ) riflettendo quelli con  $\lambda$  inferiore ad una  $\lambda$  specifica del filtro e lasciando passare la luce di  $\lambda$  superiore.

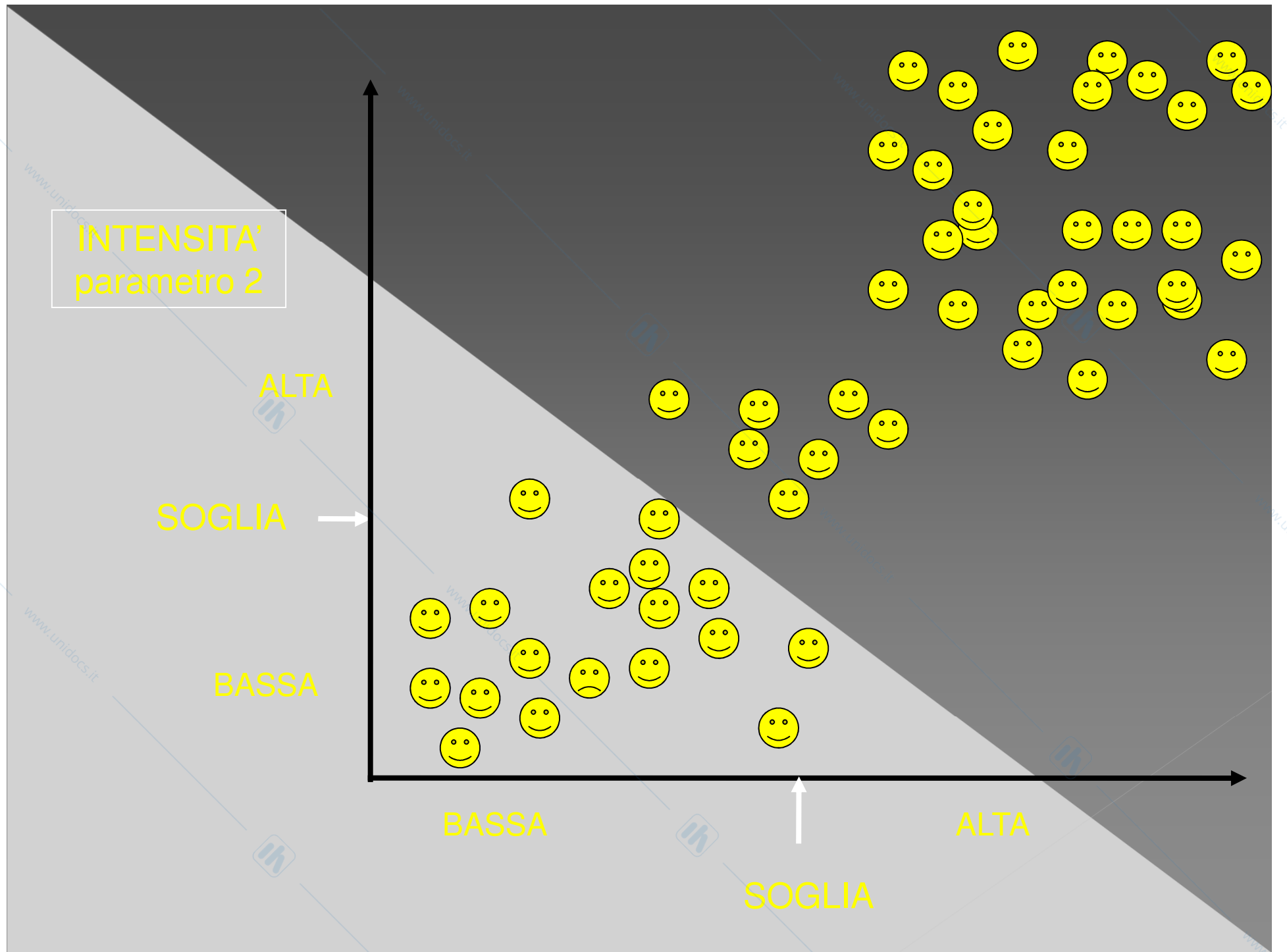
Vengono usati per dividere su due cammini ottici differenti due diversi range di lunghezze d'onda.

**Filtri Band Pass:** Filtri che lasciano passare una ristretta fascia di lunghezza d'onda  $\pm 5\text{nm}$ .

Servono per lasciar passare (e dare quindi specificità di segnale) solo la luce di un fluorocromo davanti a un fotomoltiplicatore.







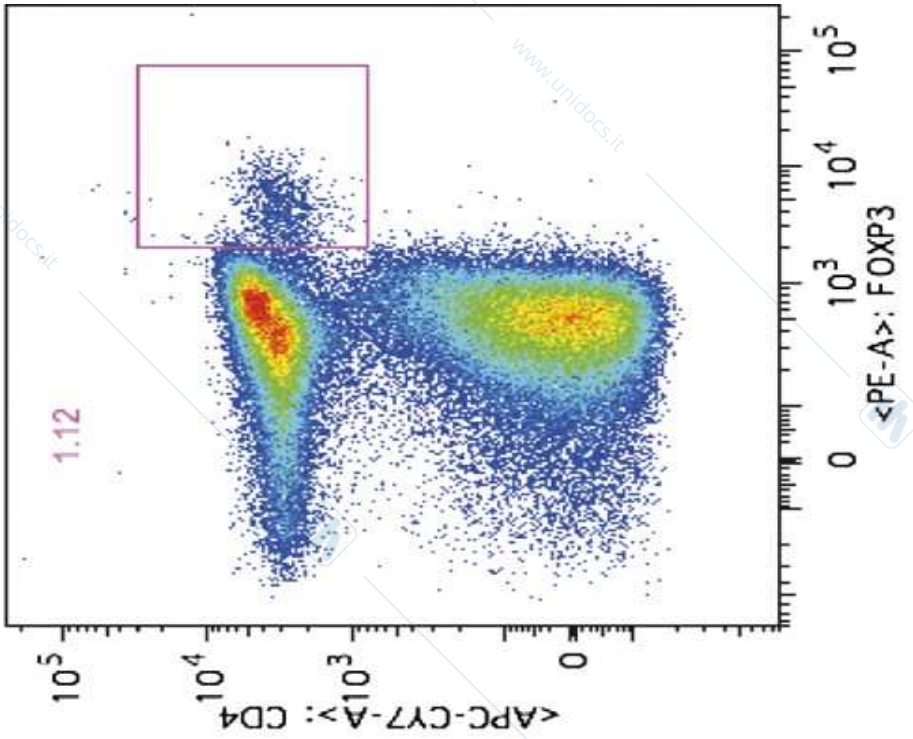
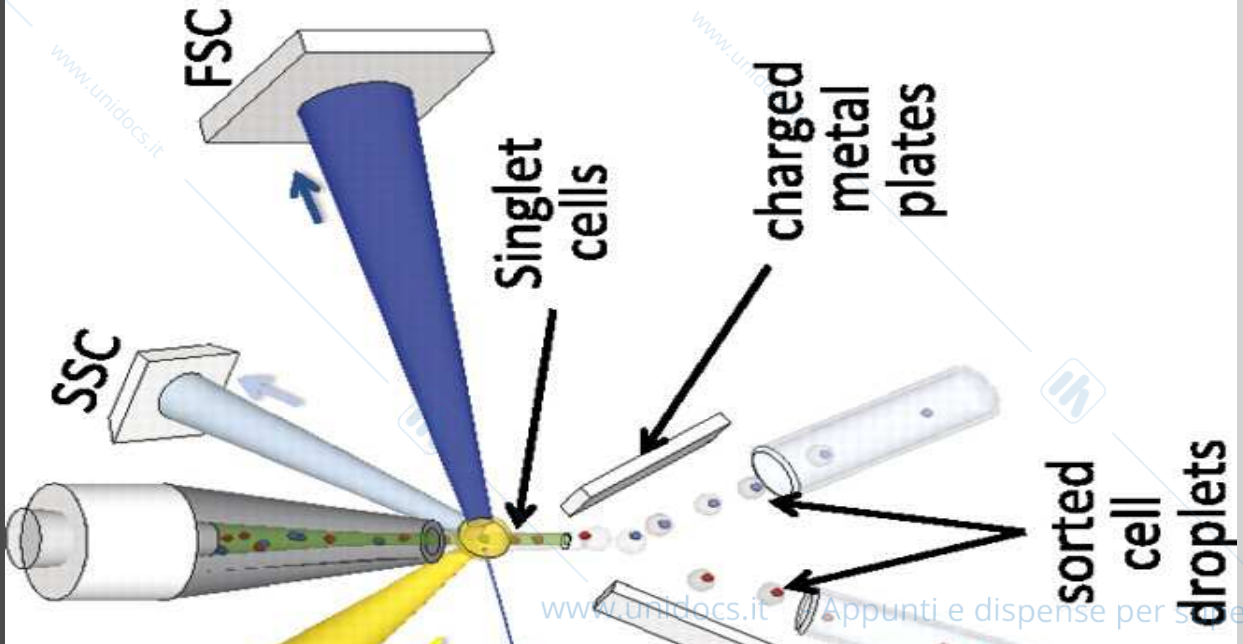
# IL SORTING

Il termine “sorting” indica la capacità di un citofluorimetro (FACS), di raccogliere le sottopopolazioni cellulari separate dalla popolazione eterogenea iniziale in base alla diversa espressione antigenica.

Il campione fluido viene frammentato in minuscole goccioline, ognuna delle quali contiene una singola cellula. Le goccioline vengono caricate elettricamente e deviate mediante piastre di deflessione negli appositi raccoglitori.

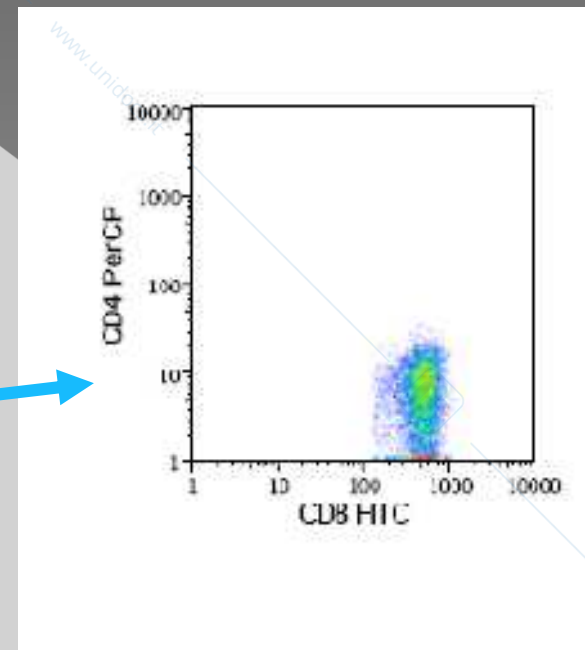
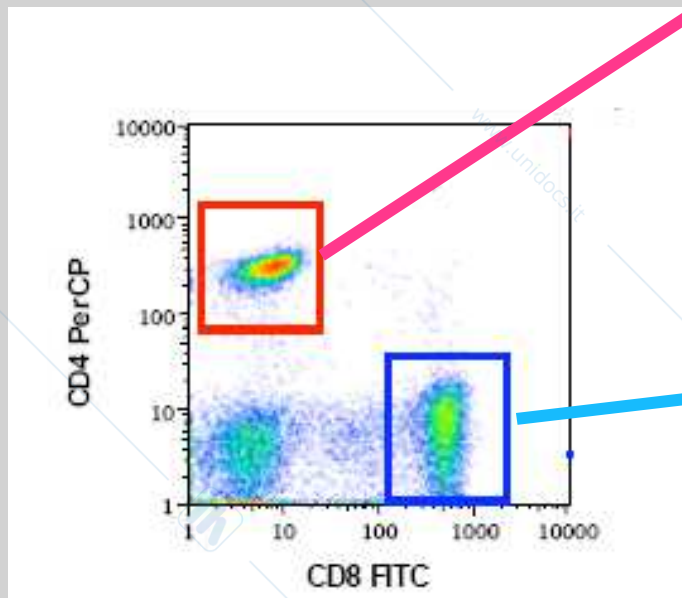
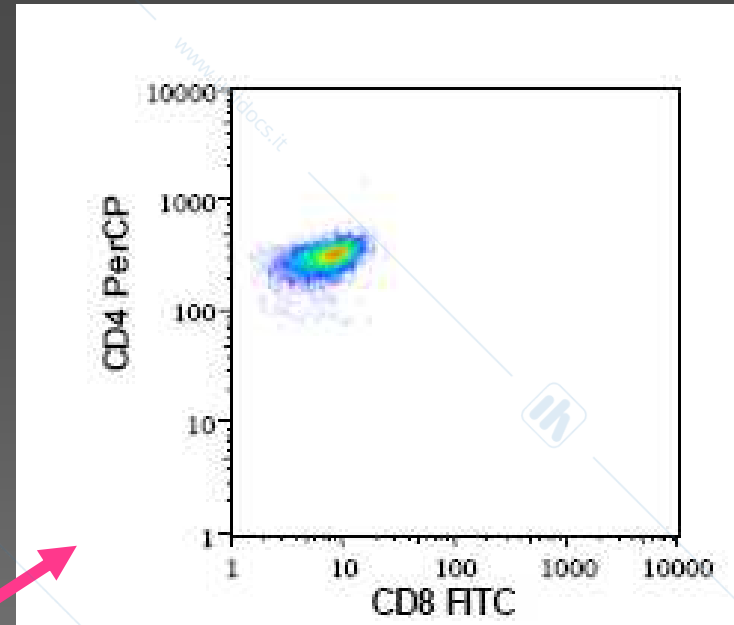
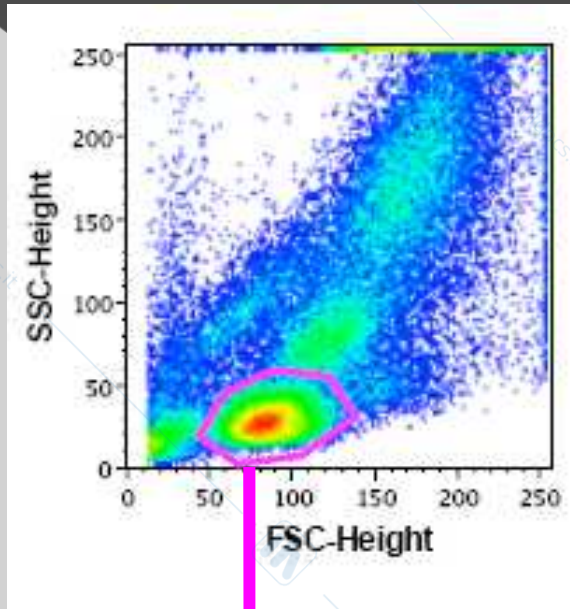
Al termine del “sorting” le cellule mantengono la vitalità.

**B**



# GATING

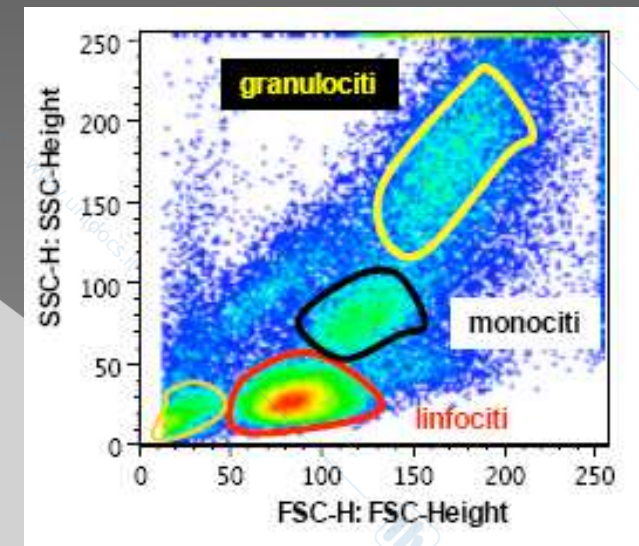
Utilizzando una finestra elettronica, permette di isolare una determinata popolazione da tutte le altre cellule, e di analizzare i parametri successivi solo all'interno della popolazione "ghettata", dividendola così in ulteriori subpopolazioni



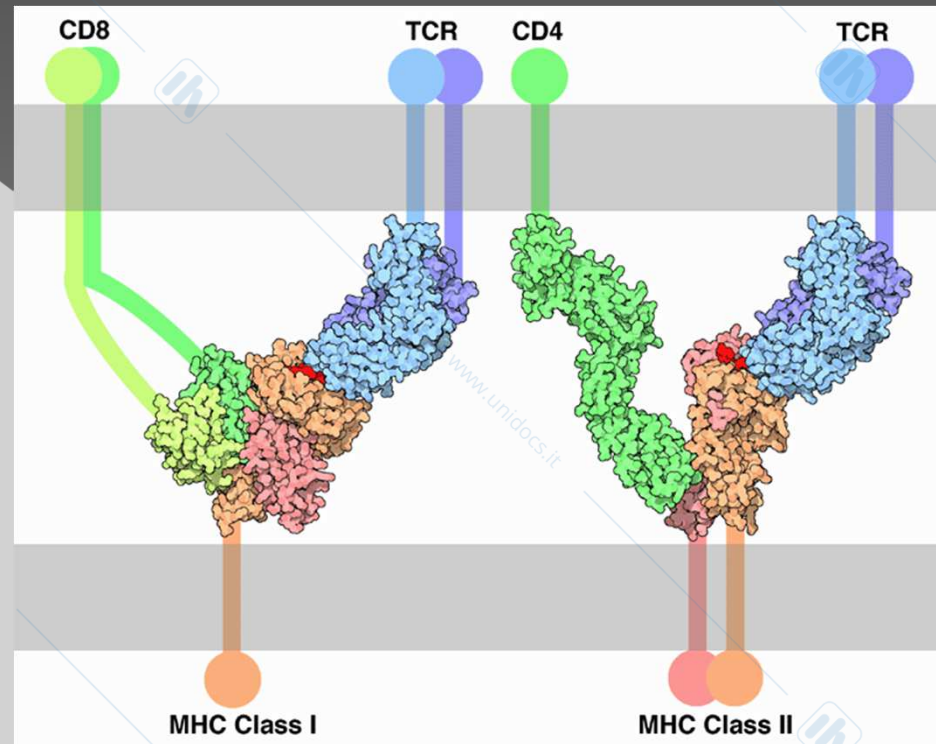
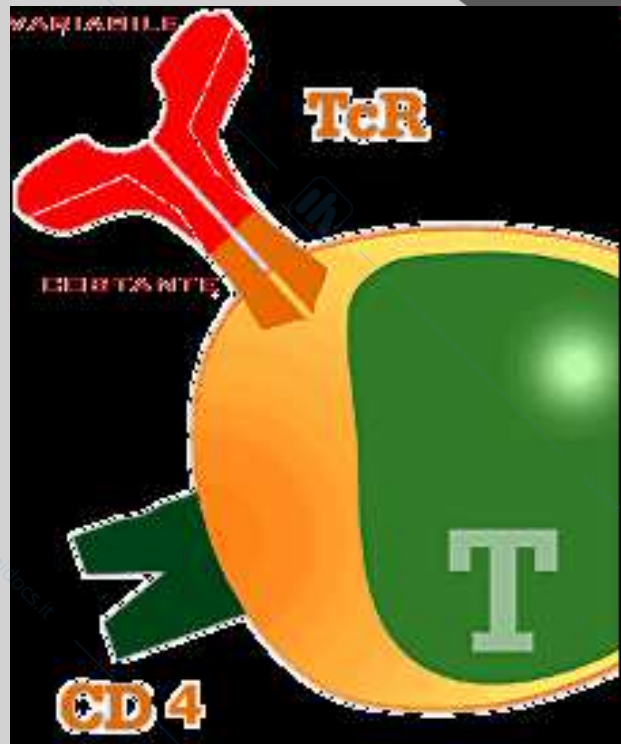
# STUDIO DEL SISTEMA IMMUNITARIO

Una delle maggiori applicazioni della citofluorimetria e' rappresentata dall'analisi (e sorting) delle diverse popolazioni di cellule del sangue.

nella maggior parte delle cellule del sangue mostrano distinti profili di forward and side scatter



Ma in alcuni casi si sfruttano i profili immunologici di queste cellule andando a identificare meglio le sottopopolazioni



# ANALISI DEL CICLO CELLULARE

Nelle cellule dei tumori (soprattutto solidi) e' spesso riscontrabile una variazione nel contenuto di DNA, principale conseguenza di mutamenti genetici cromosomici e subcromosomici, aventi un ruolo fondamentale per lo sviluppo e il decorso della malattia.

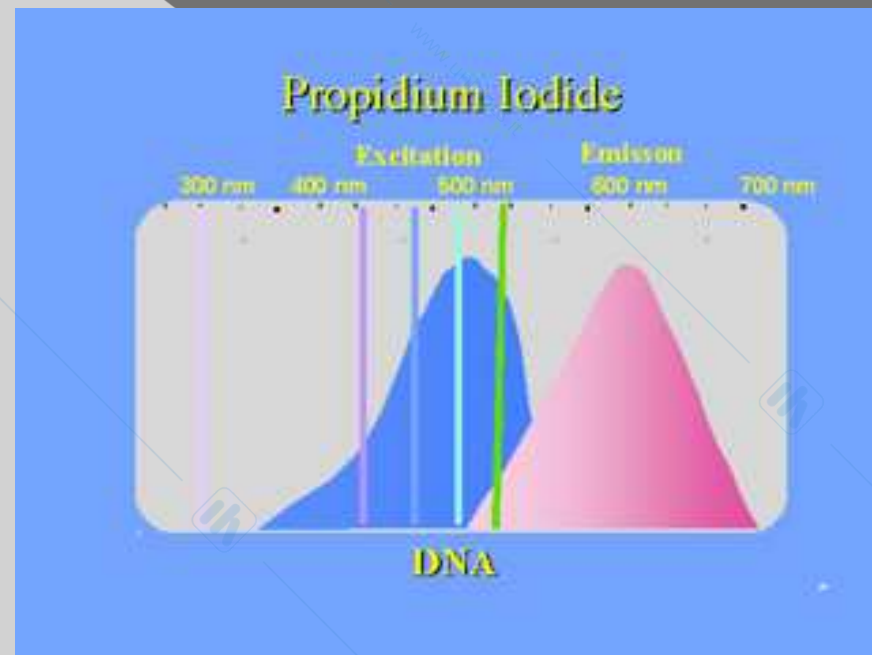
Una delle prime applicazioni della citofluorimetria e' stata proprio l'analisi della posizione nel ciclo cellulare, effettuata tramite quantificazione del DNA cellulare.

La citofluorimetria e' ancora oggi la tecnica piu' utilizzata per una veloce ed accurata determinazione della distribuzione delle cellule nelle varie fasi del ciclo cellulare.

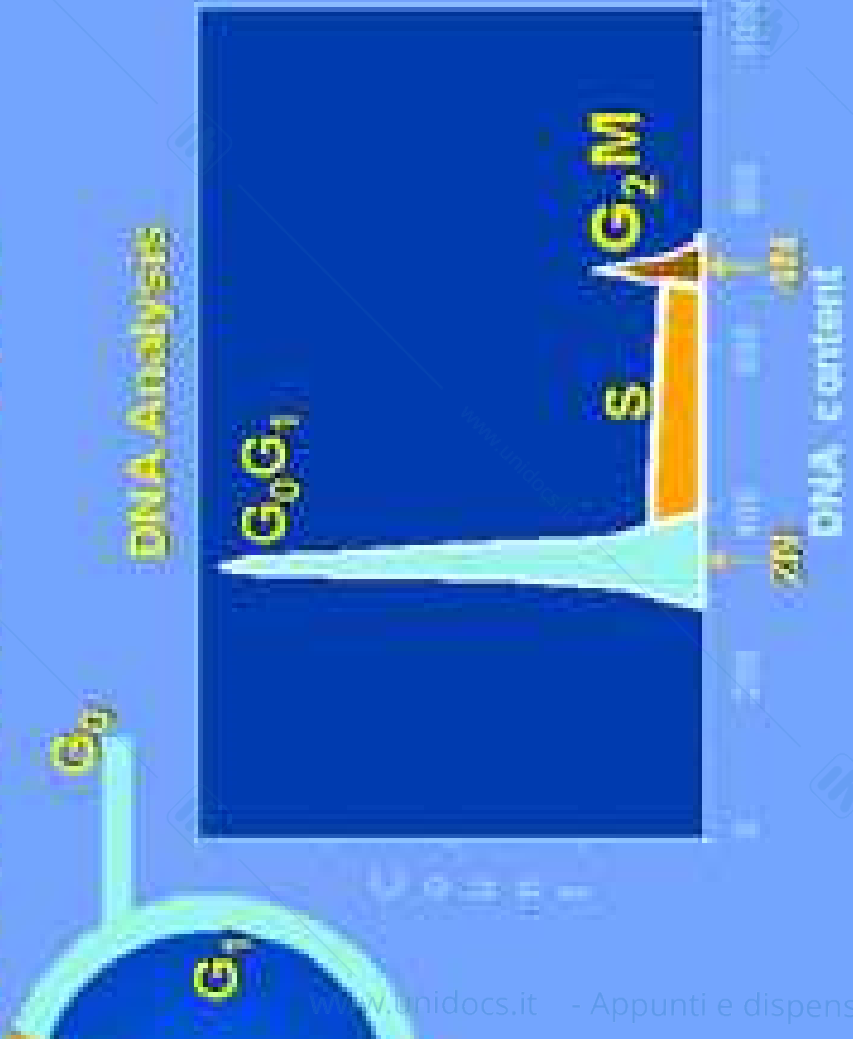
Nel metodo piu' semplice, il contenuto di DNA e' rilevato usando un colorante fluorescente in grado di legare il DNA con alta affinita'.

**Propidium iodide:** e' il colorante piu' comunemente utilizzato.

Dopo essersi legato al DNA, aumenta notevolmente la propria fluorescenza. Richiede la permeabilizzazione delle membrana plasmatica.



# Normal Cell Cycle



Il monitoraggio della proliferazione cellulare per mezzo della misurazione del DNA quale singolo parametro pone diverse limitazioni:

- non permette di distinguere cellule in G0 da quelle in G1 (stesso contenuto di DNA)
- non permette di distinguere cellule in G2 da quelle in M, (stesso contenuto di DNA);
- totale mancanza di informazioni circa la cinetica cellulare.