

# Metodi e Tecniche di Istologia e Anatomia I anno 2020/21

Fissazione, processazione, inclusione e taglio

---

**Prof.ssa Valeria Barresi**

# Obiettivi

---

- ☐ Mostrare le fasi salienti per l'allestimento di un preparato istologico dopo l'esame macroscopico e l'eventuale dissezione macroscopica:
  - Fissazione
  - Processazione (disidratazione, diafanizzazione, impregnazione, inclusione)
  - Taglio
  - Colorazione standard in istologia

# Fissazione

---

## Obiettivo

Preservare il tessuto dopo l'asportazione, bloccando l'autolisi e la putrefazione

# Fissativi

---

Fissativi fisici

Fissativi chimici

# Fissativi chimici

---

Fissativi COAGULANTI

Fissativi GELIFICANTI

# Parametri che influenzano la fissazione

## PARAMETRI LEGATI AL FISSATIVO

- Potere di penetrazione del fissativo
- Volume: deve essere almeno 10 volte quello del campione
- Pressione osmotica: isotonicità  
(liquidi iper-osmolari provocano raggrinzimento cellulare ed ipo-osmolari, il rigonfiamento)
- Temperatura (+ 4° temperatura ottimale)

# Parametri che influenzano la fissazione

## PARAMETRI LEGATI AL FISSATIVO

### □ pH

Tutti i fissativi tendono ad abbassare il pH e un pH acido provoca frammentazione proteica.

Si usano, pertanto, sostanze «tamponate» che mantengano costante la concentrazione degli ioni idrogeno

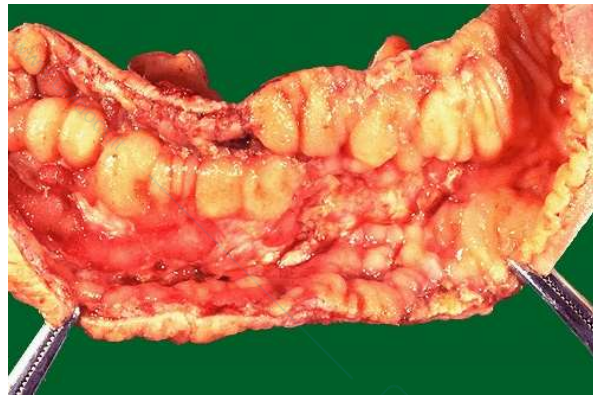
# Parametri che influenzano la fissazione

## PARAMETRI LEGATI AL CAMPIONE

### □ spessore del campione

Se ho un campione troppo spesso, ci sarà disomogeneità di fissazione. La parte esterna del campione sarà fissata, mentre la parte interna non sarà adeguatamente fissata

Per consentire una fissazione adeguata, i pezzi chirurgici vengono preliminarmente sezionati in modo da favorire la penetrazione del fissativo



# Parametri che influenzano la fissazione

---

## PARAMETRI LEGATI AL CAMPIONE

### Natura del tessuto

Il fissativo penetra con più difficoltà in tessuti compatti (es. cartilagine), che avranno quindi fissazione disomogenea

# Parametri che influenzano la fissazione

---

## TEMPO DI FISSAZIONE

- ❑ Dipende dal tipo di tessuto e dalle dimensioni del campione
- ❑ Variabile da 12 a 24 h
- ❑ Può essere accorciato usando il forno a microonde che provoca fissazione istantanea a 60°

# Tecniche di fissazione

---

❑ **Per immersione:** il tessuto viene immerso nel liquido fissativo, con rapporto volumetrico minimo tra fissativo e campione 10:1

E' la più usata

❑ **Per perfusione:** il fissativo viene iniettato (si usa per animali da esperimento o organi asportati in loco con vasi integri)

❑ **Per uso di vapori:** i tessuti vengono fissati grazie all'azione di vapori che si liberano da una soluzione fissativa riscaldata

# Fissativi chimici coagulanti

---

Formano legami stretti tra i gruppi idrofilici delle proteine (coagulazione delle proteine), impedendo che questi interagiscano con le molecole d'acqua

Così si blocca l'azione degli enzimi (che sono proteine) perché questi agiscono sul substrato solo in presenza di acqua

- Etanolo (95°)
- Metanolo
- Acetone

# Fissativi chimici coagulanti

---

Basso potere di penetrazione

Non sono buoni fissativi per istologia

Eccessiva coartazione e indurimento dei tessuti

# Fissativi chimici coagulanti

---

ETANOLO 95°

Usato in citologia

# Fissativi chimici coagulanti

---

## ALCOL METILICO

- Coagula le proteine per disidratazione
- Usato solo per citologia ematologica

# Fissativi chimici coagulanti

---

## ACIDO PICRICO

- ❑ E' un fissativo «additivo», che viene usato miscelato ad altre sostanze
- ❑ Scarso potere di penetrazione
- ❑ Coarta molto il tessuto e perciò viene usato insieme a acido acetico che attenua questo effetto

# Fissativi chimici gelificanti

---

- ❑ Agiscono stabilizzando le proteine mediante formazione di ponti proteici (gelificazione), senza allontanare l'acqua dalle cellule
- ❑ Si rendono così inaccessibili i siti di clivaggio agli enzimi
- ❑ «Gelificando il tessuto, lo induriscono

ALDEIDE FORMICA (FORMALDEIDE)

ALDEIDE GLUTARICA (GLUTARALDEIDE)

# Fissativi chimici gelificanti

---

## FORMALDEIDE

- Gas solubile in acqua
- Formalina: soluzione acquosa al 40% di formaldeide
- Reagisce con gli atomi di idrogeno liberi delle proteine, formando così legami con le proteine e tra le catene polipeptidiche delle proteine (cross-linking)
- In istologia usiamo formaldeide al 4%

# Fissativi chimici gelificanti

---

## FORMALDEIDE

- ❑ Viene ossidata dall'ossigeno atmosferico ad acido formico, che rende acida (pH4) la soluzione
- ❑ Si neutralizza con una sostanza basica (carbonato di calcio) (sistema tampone)
- ❑ **FORMALINA NEUTRA TAMPONATA**

# Fissativi chimici gelificanti

## FORMALINA NEUTRA TAMPONATA

Forma legami crociati nelle molecole proteiche e legami tra le proteine, così:

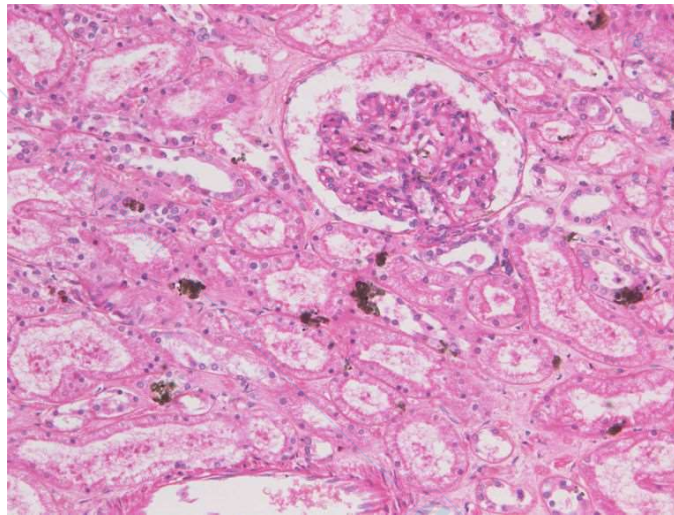
- Modifica la conformazione tridimensionale delle proteine del tessuto, rendendole inaccessibili all'azione degli enzimi litici
- Rende inattivi gli enzimi
- Indurisce il tessuto

# Fissativi chimici gelificanti

## FORMALINA

In caso di prolungata fissazione, può formare nei tessuti dei precipitati di pigmento (ematina acida di formalina), che possono simulare depositi di ferro

La formalina neutral tamponata NON forma pigmento



# Fissativi chimici gelificanti

---

## GLUTARALDEIDE

- ❑ Diluita al 2%
- ❑ Si usa come fissativo per i preparati da osservare al microscopio elettronico

# Miscela fissativa a base di alcol

---

## LIQUIDO DI CARNOY

Miscela fissativa di: soluzione acquosa di alcol etilico 99°, cloroformio acido acetico

# Miscele fissative a base di acido picrico

## LIQUIDO DI BOUIN

Miscela fissativa di: soluzione acquosa di acido picrico, formalina al 10%, acido acetico

Buon potere di penetrazione

Poco usato perché ostacola estrazione DNA



# Decalcificazione

---

Procedimento per trattare tessuti duri che contengono calcio (tessuto osseo) affinché si possano sezionare (campionamento) e poi tagliare al microtomo

## □ EDTA

Sale che lega il calcio e lo sottrae al tessuto

Si usa per tessuto osseo

## □ Acido nitrico o acido formico in piccole concentrazioni

Si usa per piccole concrezioni calcifiche

# Fissativi per la citologia

---

- Etanolo (95%)
- Metanolo
- Propanolo e isopropanolo (80%)

Meno usati perché danno maggior raggrinzimento della cellula

- Spray ad alto contenuto di alcol (citofix) per vetrini con striscio

# Fissativi chimici: formalina

---

- ❑ Potere di penetrazione buono: 0,8 mm/ora
- ❑ Tempo di fissazione variabile da 12-24 h in base alle dimensioni del campione
- ❑ Adeguato indurimento del campione
- ❑ Buona preservazione della morfologia

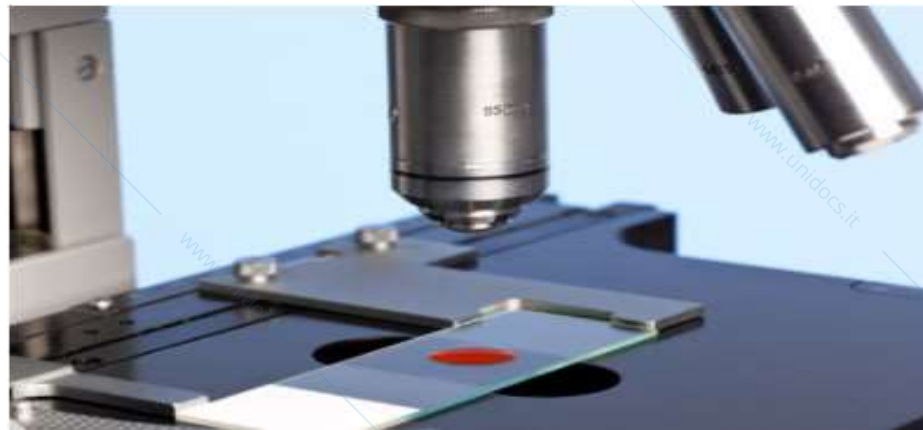
# Rischi uso formaldeide

Classificata dalla UE come sostanza tossica, cancerogena, e probabilmente mutagena (può causare difetti genetici)



# Inclusione

- Dal campione dobbiamo ottenere sezioni dello spessore di 4-5  $\mu\text{m}$  , che possano essere attraversate dalla luce per l'osservazione al microscopio ottico, perciò viene incluso in una resina che lo indurisce per facilitare il taglio



# Inclusione

- ❑ Procedimento che serve a rendere i campioni di consistenza dura, in modo che si possano tagliare sezioni di 4-5  $\mu\text{m}$ , che osserverò al microscopio
- ❑ Non necessario per campioni congelati (il congelamento fissa e indurisce il campione, che sarà pronto per il taglio)
- ❑ I mezzi di inclusione non sono solubili in acqua, né in alcol, perciò dopo la fissazione è necessaria la processazione



# Processazione istologica

---

DISIDRATAZIONE

DIAFANIZZAZIONE

INCLUSIONE

# Disidratazione

---

## Obiettivo

Eliminare l'acqua dal tessuto

L'acqua viene sostituita da alcol etilico a concentrazione crescente, 70%, 80%, 95%, 100%

- Si usano concentrazioni crescenti per evitare brusca disidratazione che determinerebbe coartazione del pezzo
- Tempi dipendenti dalla grandezza del campione

# Disidratazione

---

- ❑ Riducendo l'acqua indurisce il pezzo rendendo più facile il taglio
- ❑ Crea presupposti per inclusione.  
Il mezzo "includente" (paraffina) non è solubile in acqua

# Diafanizzazione

---

- ❑ Prima di tagliare il campione, questo viene “incluso” in paraffina, il che lo rende di maggiore consistenza e agevola il taglio
- ❑ La paraffina è insolubile in acqua e in alcol
- ❑ Perciò si usa una sostanza che allontani l'acqua dal tessuto, ma che sia un solvente della paraffina

# Diafanizzazione

---

## Obiettivo

Sostituire l'alcol con un solvente dei mezzi di inclusione

I campioni (all'interno delle biocassette) vengono immersi (2-3 ore) in un liquido solvente del mezzo di inclusione (diafanizzante)

- xilolo (è il più utilizzato)
- toluolo
- benzolo

I campioni acquistano aspetto trasparente (diafano)

# Diafanizzazione

---

## XILOLO

Sostanza nociva che provoca irritazione cutanea, oculare e delle vie respiratorie

# Infiltrazione

---

## Obiettivo

Trasformare i tessuti, che hanno composizione ed elasticità diverse, in una massa omogenea, affinché, durante il taglio, la lama non incontri aree di differente consistenza

Il pezzo rimane nel mezzo di inclusione fuso (paraffina) affinché questa penetri anche nelle sue parti più interne, prima occupate dalle molecole d'acqua, poi d'alcol e poi dell'agente diafanizzante

# Inclusione

---

Imbibizione del campione con una sostanza (paraffina) che faccia da supporto durante il taglio.

Il mezzo di inclusione non deve essere né troppo duro, né troppo molle

# Mezzi di inclusione

---

- Paraffina
- Celloidina
- Gelatina
- Metacrilati
- Resine epossidiche

# Inclusione in paraffina

---

## 1° FASE

12-24 ore: immersione in paraffina liquida per ottenere la completa imbibizione

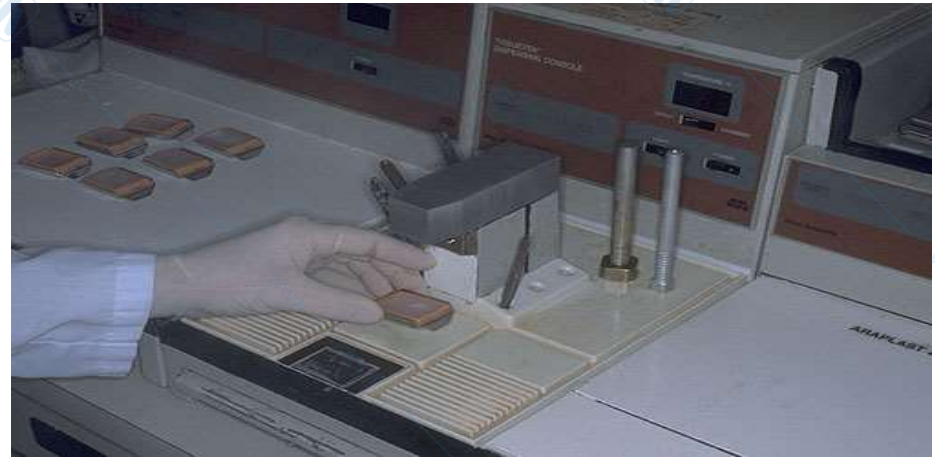
## 2° FASE

Il preparato, orientato, viene messo in appositi stampi di metallo, in cui è stata colata della paraffina liquida, e si lascia solidificare a temperatura ambiente

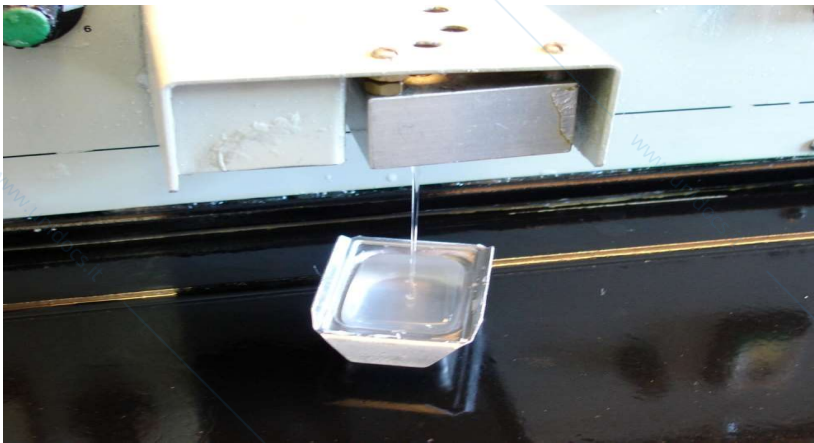
<https://www.youtube.com/watch?v=xlyXA3c3oxU>

# Inclusione in paraffina

Dispensatore di paraffina



# Inclusione in paraffina



# Inclusione in paraffina



# Inclusione in paraffina



# Inclusione in resina

- ❑ Resine epossidiche
- ❑ Resine metacrilate

Consentono il taglio di sezioni più sottili che la paraffina

Si usano per la microscopia elettronica



# Processatori automatici

- ❑ Disidratazione, diafanizzazione, imbibizione in paraffina possono essere effettuate in un processore automatico, che regola la durata dei passaggi
- ❑ Così la processazione viene svolta overnight
- ❑ L'inclusione negli stampi è manuale



# Processatore automatico

## A CAROSELLO

- ❑ E' composto da più contenitori, disposti in modo circolare, che contengono i diversi reagenti (alcoli, xilolo, paraffina)
- ❑ Le biocassette vengono messe in un cestello e trasferite da una stazione all'altra
- ❑ Per favorire la penetrazione dei fluidi nel tessuto, questi vengono agitati, muovendo il cestello in alto e in basso



# Processatore automatico

## A trasferimento dei fluidi

- ❑ Il cestello con le biocassette è fermo
- ❑ I reagenti sono contenuti in taniche e “pompati” sul cestello e successivamente espulsi



# Mezzi di inclusione per campioni congelati

## □ OCT

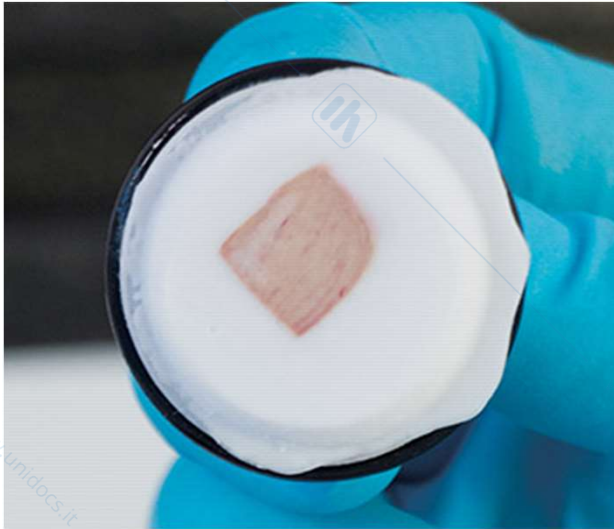
E' una sostanza gelatinosa a temperatura ambiente, che solidifica la freddo

E' un crioprotettivo: non penetra nei tessuti, ma circonda il frammento per "proteggerlo" dal trauma del congelamento

Indurendosi col freddo, fa da supporto per il taglio al criostato



# Mezzi di inclusione per campioni congelati



# Taglio dei blocchetti



# Microtomo

---

Strumento per il taglio dei blocchetti in paraffina

Consente di tagliare sezioni dello spessore di alcuni  $\mu\text{m}$

- ❑ MICROTOMO A SLITTA
- ❑ MICROTOMO ROTATIVO

# Microtomo a slitta

---

- ❑ Supporto orizzontale per la lama (che si muove)
- ❑ Supporto porta-oggetti dove si inserisce il blocchetto (che rimane fermo)

<https://www.youtube.com/watch?v=VcOmtP566b4>

# Microtomo rotativo

E' il tipo più comune

- ❑ Supporto orizzontale per la lama
- ❑ Supporto porta-oggetti dove si inserisce il blocchetto
- ❑ Manopola che regola l'abbassamento del blocchetto

In quelli automatizzati si può impostare velocità di taglio e spessore delle sezioni

<https://www.youtube.com/watch?v=KnMdSgd5mts>



# Criostato

Congela e taglia



# Variabili nel taglio

---

- ❑ Composizione delle lame
- ❑ Resistenza al taglio ( tipo di campione, tipo di mezzo di inclusione, consistenza del campione)
- ❑ Angolo di taglio (tra il piano del pezzo da tagliare e la faccetta di taglio della lama)
- ❑ Velocità di taglio

# Angolo di taglio

---

- ❑ Viene scelto in base alla resistenza del campione
- ❑ Va aumentato per campioni duri e diminuito per campioni con minor consistenza

# Velocità di taglio

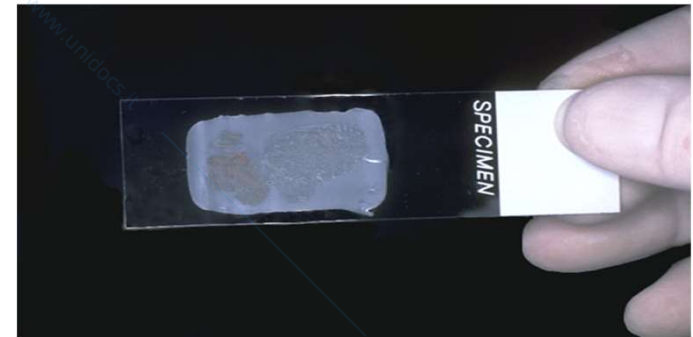
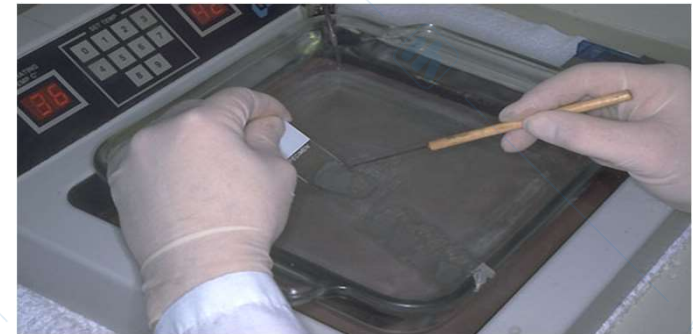
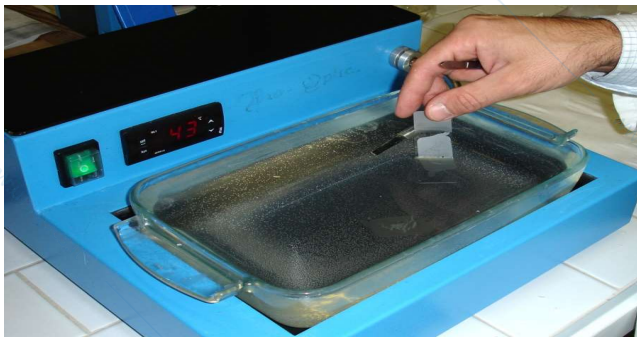
---

- ❑ Varia in base alla consistenza del campione
- ❑ Minore per campioni congelati, maggiore per campioni in paraffina

# Taglio dei blocchetti



# Raccolta delle sezioni su vetrino



# Adesione delle sezioni su vetrino

- ❑ Incubazione 37° overnight
- ❑ 60° (30-60')



# Colorazione delle sezioni

---

Le sezioni di tessuto per poter essere osservate al microscopio ottico devono essere colorate per aumentare il contrasto dell'immagine che altrimenti risulterebbe assente o troppo scarso.

I coloranti devono avere la capacità di penetrare il tessuto e legarsi a esso

# Prima della colorazione

---

- Poiché i coloranti sono solubili in acqua è necessario re-idratare le sezioni

DEPARAFFINIZZAZIONE (XILOLO)



REIDRATAZIONE (scala di alcol a concentrazione crescente: 70°, 80°, 95°, 100°)

# Colorazione delle sezioni

☐ COLORANTI BASICI: per le strutture acide (acidi nucleici) **EMATOSSILINA**

☐ COLORANTI ACIDI: per le strutture basiche (citoplasma)

**EOSINA**

COLORANTI SOLUBILI IN ACQUA



DEPARAFFINIZZAZIONE (XILOLO)



REIDRATAZIONE (scala di alcol a concentrazione crescente)

# Colorazione delle sezioni

---

Colorazioni chimiche

Colorazioni fisiche

Colorazioni chimico-  
fisiche

# Colorazioni chimiche

---

- Si basano sull'interazione tra sostanza colorante e substrato

# Colorazioni fisiche

---

- ❑ Avvengono indipendentemente dall'affinità del colorante con la sostanza da colorare e obbediscono a leggi fisiche
- ❑ Il colorante non reagisce con il tessuto
- ❑ la colorazione si ha perché il colorante è solubile nel composto da colorare, e riesce a diffondere in esso e ad imbibirlo, penetrando nelle lacune del tessuto

# Colorazioni fisico-chimiche

---

- Sfruttano la struttura elettrica del substrato, la capacità del colorante di dissociarsi in ioni

# Colorazioni

---

## □ PROGRESSIVE

Il colorante viene fatto agire fino a quando non si ha la colorazione

## □ REGRESSIVE

Il tessuto viene sovracolorato e l'eccesso di colorante viene successivamente rimosso

# Colorazione delle sezioni

Coloratore automatico



# Montaggio del vetrino

Montaggio del copri-oggetto con balsamo del Canada o resine sintetiche



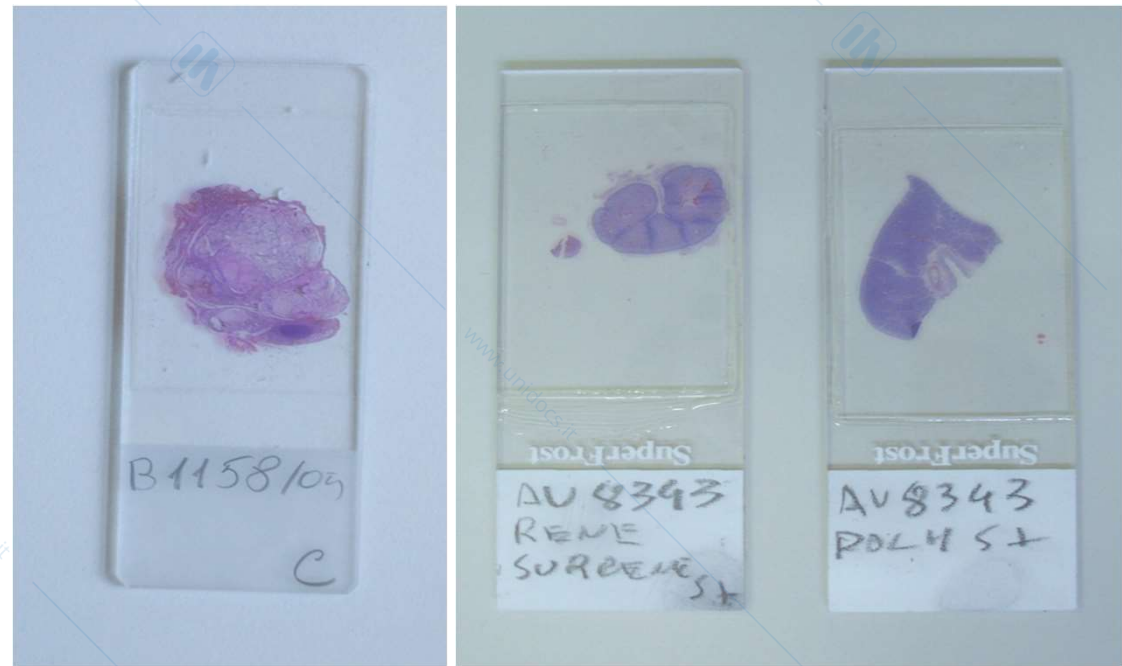
# Montaggio del vetrino

---

I mezzi di montaggio non sono idrosolubili, quindi bisogna prima:

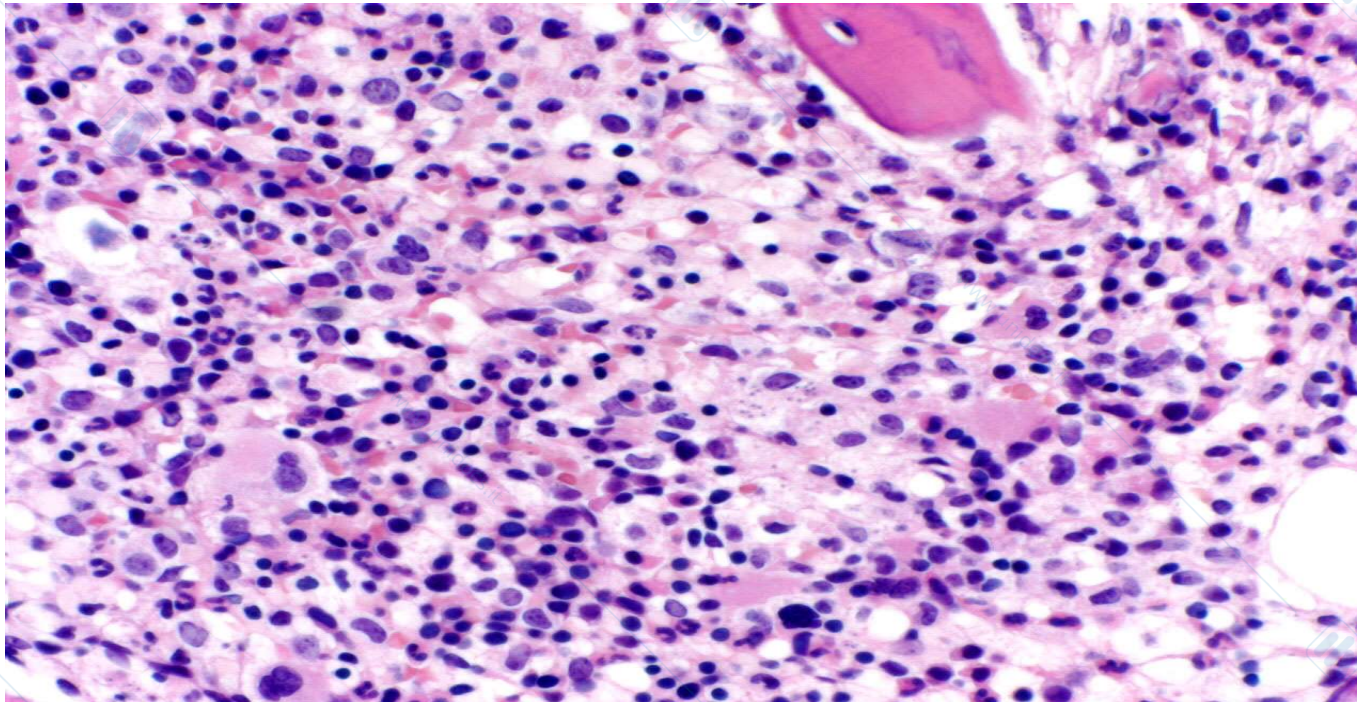
- disidratare in scala di alcol ascendente
- diafanizzare in xilolo

# Osservazione microscopica



# Osservazione microscopica

Midollo osseo colorato con ematossilina-eosina



# Conclusioni

---

- ❑ La fissazione è un procedimento che serve a conservare la struttura del tessuto e la morfologia del cellulare, impedendo i processi di autolisi e di putrefazione
- ❑ Il fissativo viene scelto in base al tipo di campione, ma il fissativo più usato per l'istologia è la formalina neutra tamponata
- ❑ La processazione serve a rendere il campione idoneo all'inclusione
- ❑ L'inclusione serve a rendere duro in modo omogeneo il campione per facilitare il successivo taglio