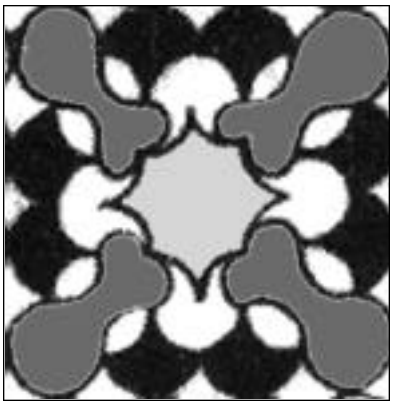
Sped. in A. P. 45% - art.2 comma 20/b legge 662/96 - n°128 - Gennaio 1999 - Direttore responsabile: Sergio Rassu - Editore: Medical Systems S.p.A. Genova - Contiene I.P. - Stampa: Tipolitografia Nuova ATA Genova

ISSN 0394 3291

# Caleidoscopio
*Italiano*



Serie Mosaici Romani

**Paola Muzi**
**Mauro Bologna**

# Tecniche di immunoistochimica

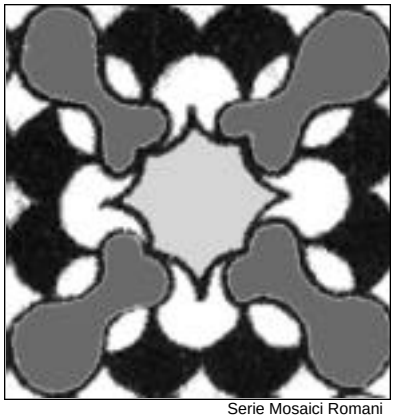
## Un manuale operativo essenziale

128

Direttore Responsabile
**Sergio Rassu**

Via Rio Torbido, 40 - Genova (Italy) Tel. 010 83.401
Stampato a Genova 1999

# Caleidoscopio
*Italiano*


Serie Mosaici Romani

**Paola Muzi**
**Mauro Bologna**

Dipartimento di Medicina
Sperimentale dell'Aquila

# Tecniche di immunoistochimica

## Un manuale operativo essenziale

128

Direttore Responsabile
**Sergio Rassu**

Via Rio Torbido, 40 - Genova (Italy) Tel. 010 83.401
Stampato a Genova 1999

## ISTRUZIONI PER GLI AUTORI

***Informazioni generali.*** *Caleidoscopio* pubblica lavori di carattere monografico a scopo didattico su temi di Medicina. La rivista segue i requisiti consigliati dall'*International Committee of Medical Journal Editors*. Gli Autori vengono invitati dal Direttore Responsabile. La rivista pubblica anche monografie libere, proposte direttamente dagli Autori, redatte secondo le regole della Collana.

***Testo.*** La monografia deve essere articolata in paragrafi snelli, di rapida consultazione, completi e chiari. I contenuti riportati devono essere stati sufficientemente confermati. E' opportuno evitare di riportare proprie opinioni dando un quadro limitato delle problematiche. La lunghezza del testo può variare dalle 60 alle 70 cartelle dattiloscritte. Si prega di dattilografare su una sola facciata del foglio formato A4 con margini di almeno 25 mm. Usare dovunque doppi spazi e numerare consecutivamente. Ogni sezione dovrebbe iniziare con una nuova pagina.

***Frontespizio.*** Deve riportare il nome e cognome dell'Autore(i) -non più di cinque- il titolo del volume, conciso ma informativo, la Clinica o Istituto cui dovrebbe essere attribuito il lavoro, l'indirizzo, il nome e l'indirizzo dell'Autore (compreso telefono, fax ed indirizzo di E-mail) responsabile della corrispondenza.

***Bibliografia.*** Deve essere scritta su fogli a parte secondo ordine alfabetico seguendo le abbreviazioni per le Riviste dell'Index Medicus e lo stile illustrato negli esempi:

1) Björklund B., Björklund V.: Proliferation marker concept with TPS as a model. A preliminary report. J. Nucl. Med. Allied. Sci 1990 Oct-Dec, VOL: 34 (4 Suppl), P: 203.

2 Jeffcoate S.L. e Hutchinson J.S.M. (Eds): The Endocrine Hypothalamus. London. Academic Press, 1978.

Le citazioni bibliografiche vanno individuate nel testo, nelle tabelle e nelle legende con numeri arabi tra parentesi. La Redazione è collegata on-line con le più importanti Banche Dati (Medline, Cancerlit, AIDS etc) e fornisce ogni eventuale assistenza agli Autori.

***Tabelle e figure.*** Si consiglia una ricca documentazione iconografica (in bianco e nero eccetto casi particolare da concordare). Figure e tabelle devono essere numerate consecutivamente (secondo l'ordine di citazione nel testo) e separatamente; sul retro delle figure deve essere indicato l'orientamento, il nome dell'Autore ed il numero. Le figure realizzate professionalmente; è inaccettabile la riproduzione di caratteri scritti a mano libera. Lettere, numeri e simboli dovrebbero essere chiari ovunque e di dimensioni tali che, se ridotti, risultino ancora leggibili. Le fotografie devono essere stampe lucide, di buona qualità. Gli Autori sono responsabili di quanto riportato nel lavoro e dell'autorizzazione alla pubblicazione di figure o altro. Titoli e spiegazioni dettagliate appartengono alle legende, non alle figure stesse.

Su fogli a parte devono essere riportate le legende per le figure e le tabelle.

***Unità di misura.*** Per le unità di misura utilizzare il sistema metrico decimale o loro multipli e nei termini dell'International system of units (SI).

***Abbreviazioni.*** Utilizzare solo abbreviazioni standard. Il termine completo dovrebbe precedere nel testo la sua abbreviazione, a meno che non sia un'unità di misura standard.

***Presentazione della monografia.*** Riporre le fotografie in busta separata, una copia del testo e dei grafici archiviati su un dischetto da 3.5 pollici preferibilmente Macintosh.

Il dattiloscritto originale, le figure, le tabelle, il dischetto, posti in busta di carta pesante, devono essere spedite al Direttore Responsabile con lettera di accompagnamento. L'autore dovrebbe conservare una copia a proprio uso. Dopo la valutazione espressa dal Direttore Responsabile, la decisione sulla eventuale accettazione del lavoro sarà tempestivamente comunicata all'Autore. Il Direttore responsabile deciderà sul tempo della pubblicazione e conserverà il diritto usuale di modificare lo stile del contributo; più importanti modifiche verranno eventualmente fatte in accordo con l'Autore. I manoscritti e le fotografie se non pubblicati non si restituiscono.

L'Autore riceverà le bozze di stampa per la correzione e sarà Sua cura restituirle al Direttore Responsabile entro cinque giorni, dopo averne fatto fotocopia. Le spese di stampa, ristampa e distribuzione sono a totale carico della Medical Systems che provvederà a spedire all'Autore cinquanta copie della monografia. Inoltre l'Autore avrà l'opportunità di presentare la monografia nella propria città o in altra sede nel corso di una serata speciale.

L'Autore della monografia cede i pieni ed esclusivi diritti sulla Sua opera alla Rivista *Caleidoscopio* con diritto di stampare, pubblicare, dare licenza a tradurre in altre lingue in Nazioni diverse rinunciando ai diritti d'Autore.

Tutta la corrispondenza deve essere indirizzata al Direttore Responsabile al seguente indirizzo:

***Dott. Sergio Rassu***
***Via Pietro Nenni, 6***
***07100 Sassari***

# Editoriale

L'immunoistochimica e' una tecnica ampiamente utilizzata per l'identificazione e la localizzazione istologica di antigeni e di costituenti cellulari e tissutali *in situ*. Essa ha rappresentato, negli ultimi anni, uno strumento fondamentale per la diagnosi di molte malattie ed ha avuto, con l'abbinamento alle tecniche di biologia molecolare, un grande impulso ed un notevole sviluppo metodologico. Tra le malattie che di recente hanno trovato un importante miglioramento diagnostico grazie a queste tecniche possiamo annoverare anche le malattie infettive del fegato, che hanno rappresentato a lungo un grave problema eziologico nell'uomo.

Più recentemente, il suo uso ha interessato progressivamente campi sempre più vasti quali l'identificazione del fenotipo cellulare (ad es. la differenziazione negli infiltrati cellulari delle cellule T, delle cellule B e dei macrofagi), dei recettori cellulari (ad es. la differenziazione delle molecole di espressione MHC di classe I e II), ed ancora l'identificazione della produzione di citochine (ad es. IL-1, IL-6, TNF-α), chemochine (ad es. RANTES, MIP-1α/β e MCPs) e fattori di crescita (ad es. GM-CSF, M-CSF) o ancora la dimostrazione di modificazioni funzionali delle cellule come l'induzione enzimatica.

Inoltre, questa tecnica ha permesso l'individuazione di nuovi antigeni tumorali, proteine oncofetali, di proteine codificate da oncogeni, la tipizzazione di neoplasie, la loro valutazione prognostica, e l'individuazione di depositi patologici come immunoglobuline ed amiloide. Studi di immunoistochimica hanno permesso ancora di individuare l'origine e la funzione di vari tipi cellulari.

E' chiaro quindi il ruolo fondamentale che questa tecnica ricopre oggi nella diagnostica. D'altra parte la mancata disponibilità in Italia di un manuale che fornisca le informazioni basilari a coloro che vogliono affrontare questa metodologia di studio e di ricerca ci ha indotto a pubblicare questa monografia.

Il volume è quindi di estrema utilità e di sicuro interesse. L'approccio pragmatico scelto dagli Autori lo rende estremamente prezioso per tutti coloro che hanno bisogno di una guida che illustri, nella realtà, la tecnica e le procedure.

Vengono analizzate infatti tutte le fasi di questa moderna tecnica, dalla preparazione dei campioni biologici alle procedure di colorazione immunoistochimica; è presente inoltre un capitolo specifico dedicato agli accorgimenti per ottimizzare i risultati, e sezioni specifiche per la doppia colorazione e per presentare i rapporti tra l'istochimica e la biologia molecolare. Si tratta quindi di un vero e proprio manuale pratico da tenere costantemente a portata di mano, arricchito da numerose figure che lo rendono facilmente consultabile.

Gli Autori di questa monografia sono ben noti ai nostri lettori che hanno già avuto modo di apprezzarne le capacità comunicative e didattiche ed è proprio per questo motivo che ho accettato con entusiasmo la proposta di questo manuale.

La dottoressa Paola Muzi, biologa, è Tecnico Laureato presso il Dipartimento di Medicina Sperimentale dell'Università dell'Aquila, ha una lunga esperienza nel campo della biologia cellulare dei tumori ed una consolidata attività di ricerca con utilizzo delle tecniche di immunoistochimica applicate a varie tematiche sperimentali di patologia umana. E' autrice di oltre quaranta pubblicazioni nei settori dell'immunologia, dell'oncologia e della biologia cellulare normale e patologica.

Il Professor Mauro Bologna, è medico chirurgo, Professore Associato di Patologia Generale I presso l'Università dell'Aquila. Il Prof. Bologna ha maturato una importante esperienza frequentando in qualità di Post-doctoral Fellow il Dulbecco Laboratory, The Salk Institute for Biological Studies, La Jolla, in California e quindi in veste di Visiting Scientist lo stesso prestigioso Laboratorio. E' autore di oltre 130 pubblicazioni scientifiche su argomenti di immunologia, oncologia, malattie infettive, chemioterapia e patologia.

**Sergio Rassu**

# Introduzione

Le procedure di immunoistochimica permettono la visualizzazione di componenti cellulari in una varietà di campioni biologici comprendenti sezioni di tessuto, strisci e citocentrifugati. I risultati della colorazione dipendono in gran parte dalla qualità del preparato.

I campioni di tessuto, per essere tagliati in sezioni sottili, devono essere impregnati e rivestiti di un mezzo che dia loro più consistenza. Questi mezzi sono per la maggior parte insolubili in acqua. Per poter includere in essi il materiale biologico, quindi, è necessario innanzitutto privarlo di tutta l'acqua che contiene affinché possa essere compenetrato dapprima da un solvente del mezzo di inclusione, e poi dal mezzo di inclusione fuso affinché quest'ultimo, a sua volta, sostituisca il solvente.

I processi di fissazione, disidratazione e chiarificazione sono necessari per stabilizzare il campione e mantenere inalterata la sua struttura al fine di favorire l'infiltrazione da parte del mezzo di inclusione (1).

# Preparazione dei campioni biologici

## La fissazione dei tessuti

Lo scopo principale della fissazione è quello di preservare la morfologia delle cellule e dei tessuti evitando la distruzione dei determinanti antigenici, mantenere le molecole antigeniche che devono essere individuate nella loro posizione originale e renderle disponibili, ovvero accessibili, all'anticorpo primario. Dunque un'appropriata fissazione dell'antigene è uno degli aspetti più critici delle tecniche di immunoistochimica, le quali possono localizzare soltanto quegli antigeni che restano riconoscibili per l'anticorpo.

Un campione contiene soltanto una quantità finita di antigene; ciascun passaggio della sua processazione ne distrugge una parte. Per un risultato ottimale e privo di artefatti, il campione dovrebbe essere sottoposto a differenti tipi di fissativo per quantificare e identificare le migliori condizioni di conservazione antigenica al fine di sviluppare un appropriato protocollo di fissazione che tenga conto delle dimensioni, della struttura, della localizzazione e delle caratteristiche fisico chimiche dell'antigene da ricercare e nel contempo preservi la morfologia cellulare senza provocare alterazioni alla struttura delle proteine.

Questo perfetto equilibrio è difficile da raggiungere e richiede troppo tempo perché lo si possa conseguire con tutti gli antigeni; pertanto, anche quando viene identificata la fissazione ottimale, alcune processazioni particolari limitano l'applicazione dei metodi di immunoistochimica come procedura di routine. Un tessuto fissato o processato non adeguatamente presenterà una varietà di artefatti.

Una fissazione inappropriata può distruggere parzialmente i determinanti antigenici o alterarne la struttura fino a renderli irriconoscibili per l'anticorpo. Un antigene non fissato può scomparire del tutto o può diffondere dal sito di sintesi nel tessuto circostante. Una diffusione dell'Ag intracellulare può anche essere il risultato di un prolungato intervallo tra il momento del prelievo del campione e quello della sua fissazione.

La ipofissazione può conservare l'antigene ma può danneggiare la morfologia tissutale con conseguente difficoltà di interpretazione. Al contrario, con tempi di fissazione più lunghi la qualità della morfologia potrà migliorare ma una maggiore quantità di determinanti antigenici potrà risultare mascherata, denaturata o distrutta. Talvolta i siti antigenici possono essere rivelati mediante una incubazione più lunga in tampone o mediante trattamenti con enzimi proteolitici.

Una fissazione ottimale sarà quella che produce la migliore morfologia con il tempo minimo richiesto per conservare l'antigene (2). Più l'antigene è piccolo, più elevata sarà la probabilità che esso diffonda e più forte sarà la fissazione richiesta. Più l'antigene è grande e complesso, più delicata sarà la fissazione richiesta per prevenire il mascheramento o i cambiamenti strutturali che interferiscono con la sua accessibilità per l'anticorpo.

I campioni di tessuto dovrebbero essere di piccole dimensioni ed essere immersi in un adeguato volume di fissativo il più rapidamente possibile. Per frammenti non superiori a 2 cm di superficie per 4 μm di spessore si consiglia un volume minimo di 200 ml di fissativo.

Se il campione di tessuto non viene fissato rapidamente o è troppo spesso per permettere la completa penetrazione del fissativo, la sua conservazione risulterà impropria e le porzioni di tessuto non esposte al fissativo mostreranno una intensa colorazione non specifica. Una colorazione simile si osserva nelle cellule necrotiche, scoppiate o danneggiate. Una colorazione aspecifica ai margini del tessuto si osserverà nei campioni lasciati essiccare prima di essere posti nel fissativo. L'interpretazione dei quadri di colorazione dovrebbe essere fatta solo sulla base delle aree del campione propriamente fissate.

I seguenti fissativi sono tra quelli che conservano meglio la maggioranza degli antigeni e risultano tra i più adatti per l'immunoistochimica benché non siano tutti ugualmente idonei per tutti gli antigeni.

La formaldeide è un gas incolore, molto solubile in acqua, che viene commercializzato in soluzione acquosa alla concentrazione di circa il 40% con il nome di formalina. Poiché la formaldeide agisce lentamente, le sue soluzioni acide o troppo concentrate possono causare interferenze con le strutture e danni alla morfologia tissutale. Per l'uso in microscopia, la formalina dovrebbe essere fresca, avere una concentrazione compresa tra il 4 e il 10% ed essere tamponata a pH 7,0-7,6. Il fissativo più pratico e probabilmente meglio conosciuto è la formalina di Policard, soluzione al 10% con l'aggiunta di cloruro di sodio allo 0,9%. Col tempo la formaldeide dà luogo a polimeri di paraformaldeide o di triossimetilene che formano depositi di precipitato bianco che devono essere eliminati per filtrazione prima dell'uso. La formaldeide viene ossidata dall'ossigeno atmosferico ad acido formico, che acidifica fortemente la soluzione (pH 4). Per una buona riuscita dei preparati è opportuno neutralizzare la formalina impiegata nelle miscele fissative mediante l'aggiunta di un eccesso di polvere di carbonato di calcio, lasciar riposare per alcuni giorni e infine decantare. La formaldeide possiede un elevato grado di penetrazione, non provoca eccessivo indurimento dei tessuti, non dissolve i lipidi.

A causa dei suoi caratteristici legami crociati essa è un buon fissativo soprattutto per i piccoli antigeni, come gli ormoni. Per ottenere una buona morfologia e prevenire il mascheramento degli antigeni, il tempo di fissazione è critico, dovrebbe essere il più breve possibile e risulta compreso

tra 2 e 24 ore a seconda delle dimensioni dei pezzi. Tessuti fissati per periodi più lunghi non sono danneggiati dalla lunga permanenza in formalina e possono ancora mostrare una colorazione intensa in funzione della concentrazione di antigene presente. Uno degli effetti della iperfissazione è la formazione di un eccesso di legami aldeidici che può mascherare l'antigene e prevenire l'accesso dell'anticorpo ad esso.

Un altro eccellente fissativo è quello di Zenker. Esso non forma legami aldeidici ed è spesso il fissativo di scelta per antigeni che risultano sensibili alla sovrafissazione con formalina (p. es. le immunoglobuline). Il tempo di fissazione è breve, di solito dalle 2 alle 4 ore.

L'acido picrico (2-4-6 trinitrofenolo) è una sostanza cristallina gialla che può diventare bianca (ed esplosiva!) per eliminazione dell'acqua di cristallizzazione. Si usa in soluzione satura acquosa (0,9-2%) o alcolica (1gr / 12ml). Poiché non indurisce i tessuti, interviene nella composizione di molte miscele di fissazione di cui la più comune è il liquido di Bouin. L'intensa tinta gialla che l'acido picrico conferisce ai tessuti non interferisce con la maggior parte dei coloranti. E' un eccellente stabilizzatore delle proteine con le quali forma picrati, parzialmente idrosolubili, che diventano insolubili in etanolo; ha forte affinità per i coloranti acidi, non scioglie i lipidi e non fissa i carboidrati. Scarsamente penetrante, l'acido picrico produce un effetto coartante sui tessuti che può venir attenuato dalla combinazione con l'acido acetico.

Uno dei fissativi migliori tra quelli più comuni è il già citato liquido di Bouin. Essendo molto penetrante, esso si usa per fissare anche pezzi voluminosi e permette l'uso di quasi tutti i metodi di colorazione. Si prepara mescolando, al momento dell'uso, 15 ml di soluzione satura di acido picrico, 5 ml di formalina concentrata (33-40%) e 0,2-1ml di acido acetico glaciale. La combinazione di acido picrico e formalina migliora nettamente la qualità dei preparati istologici ed è raccomandata per la localizzazione dei frammenti J immunoglobulinici, delle catene delle immunoglobuline intere e delle alfa feto proteine. Il tempo di fissazione varia, a seconda della grandezza del pezzo, da 12 a 48 ore ed è seguita da un lavaggio accurato in etanolo 50%, che va cambiato più volte finché il pezzo non cede più colore. L'immersione in etanolo 70% con l'aggiunta di poche gocce di una soluzione satura di bicarbonato di litio può accelerare questo processo.

L'etanolo trova impiego come disidratante per la microscopia elettronica e si usa talvolta in istologia a concentrazioni variabili dal 70 al 100%. E' un mediocre fissativo generale e indurisce troppo il materiale biologico; per le sue caratteristiche di rapidità di penetrazione e buona conservazione dei glucidi viene usato come componente di alcune miscele. L'etanolo porta alla precipitazione delle proteine attraverso la loro denaturazione che può condurre **all'annullamento della reattività istochimica** di queste macromolecole. Mette invece in evidenza gruppi potenzialmente reattivi mascherati dalla formazione di legami salini o di ponti a idrogeno.

L'acido acetico è utilizzato a diluizioni dallo 0,3 al 5% in numerose miscele fissative. Ha un eccellente potere di penetrazione, non solubilizza i grassi, fa precipitare le nucleoproteine, provoca rigonfiamento del collagene e alterazioni dei mitocondri.

L'acido tricloroacetico in soluzione acquosa dal 3 al 10% ha caratteristiche simili al precedente e possiede proprietà decalcificanti.

Per le colorazioni in microscopia elettronica è necessario un fissativo che conservi la morfologia ultrastrutturale. Uno dei fissativi più comunemente usati è la glutaraldeide 2% in tampone fosfato 0,1M pH 7,4. Poiché esso produce legami crociati, può essere necessario effettuare una digestione enzimatica dopo che il mezzo di inclusione è stato rimosso.

Nelle ossa e nei tessuti calcificati, i sali di calcio insolubili devono essere rimossi. Se il campione è stato fissato accuratamente, le soluzioni decalcificanti non provocano danni all'antigene e alle strutture cellulari anche se alcune di esse tendono a dare risultati variabili in immunoistochimica. I risultati migliori si possono ottenere con l'immersione per un'ora in una soluzione di acido nitrico al 5% di campioni tagliati adeguatamente piccoli da consentire una penetrazione completa dell'acido. Dopo la decalcificazione il campione dovrebbe essere lavato in acqua corrente per rimuovere l'eccesso di acido prima di continuare la procedura di routine.

## Disidratazione

Dopo la fissazione i campioni di tessuto dovrebbero essere sciacquati vigorosamente per eliminare l'eccesso di fissativo che può causare artefatti di colorazione. Quindi possono essere disidratati, chiarificati e inclusi. La disidratazione avviene attraverso il passaggio del tessuto in una serie di alcoli a concentrazione progressivamente crescente, dal 25% al 100%, per tempi di permanenza in ciascuna concentrazione variabili da 15 minuti a un'ora, a seconda delle dimensioni del pezzo.

Qualunque sia la concentrazione dell'alcol, le miscele etanolo/acqua sono più pesanti dell'etanolo e tendono a depositarsi sul fondo del recipiente. Piuttosto che utilizzare grandi volumi, quindi, conviene usare alcol nella quantità strettamente sufficiente a ricoprire il pezzo e rinnovarlo spesso. Come disidratanti possono essere impiegati altri liquidi che abbiano in comune la proprietà di miscelarsi in tutte le proporzioni con acqua, alcol, xilene e mezzi d'inclusione. Queste proprietà sono possedute dagli alcoli butilico, isobutilico e isopropilico. I primi due hanno un marcato effetto coartante, mentre l'ultimo indurisce meno dell'etanolo. Altri disidratanti sono rappresentati da diossano e tetraidrofurano.

## Chiarificazione

I liquidi solubili nei mezzi di inclusione, e denominati diafanizzanti, sono numerosi e comprendono lo xilene, comunemente usato nei laboratori per le procedure di routine, il benzene, con basso punto di ebollizione e lenta penetrazione, il toluene che indurisce meno dello xilene ed evapora più lentamente del benzene. Per organi delicati e friabili si usano prevalentemente il cloroformio, l'olio di legno di cedro e il solfuro di carbonio. Attualmente trovano impiego alcuni agenti che sostituiscono a tutti gli effetti gli altri diafanizzanti. Si tratta di prodotti di origine naturale costituiti da miscele di solventi clorurati stabilizzati che hanno la caratteristica di essere non tossici, poco volatili, ininfiammabili e privi dell'odore pungente caratteristico dei solventi aromatici.

I tempi di permanenza nei diafanizzanti, benché funzione delle dimensioni del pezzo, non devono essere troppo lunghi. Quando i campioni ne sono completamente imbevuti, acquistano un aspetto trasparente (diafano). Questa caratteristica permette di riconoscere se il pezzo è stato completamente disidratato. Se dopo una adeguata chiarificazione è rimasta acqua nei pezzi, la loro parte centrale rimane invece opaca e bianchiccia. In tal caso è opportuno effettuare una nuova disidratazione, perché una quota di acqua è ancora presente nelle aree opache.

## Infiltrazione

Consiste nella permanenza del pezzo chiarificato nel mezzo di inclusione fuso per un periodo sufficientemente lungo da consentirne la penetrazione nei più profondi interstizi del campione dapprima occupati dalle molecole di acqua e poi progressivamente sostituite da concentrazioni crescenti di alcoli e infine da agenti diafanizzanti. Lo scopo di questi passaggi è quello di trasformare i tessuti, che hanno composizione ed elasticità diverse, in una massa omogenea affinché, durante il taglio, la lama non incontri differenze di consistenza.

## Inclusione

Il pezzo ben impregnato viene posto in una apposita formella di materiale plastico o metallico e ricoperto con il mezzo d'inclusione fuso al

quale può essere aggiunto un supporto che funga da base di aggancio per il microtomo. Il tutto viene lasciato solidificare.

Nella scelta del mezzo di inclusione si deve tenere conto delle proprietà fisiche del campione e del metodo di taglio. I principali mezzi usati per l'inclusione sono rappresentati da celloidina, paraffina, metacrilati e resine epossidiche.

Ormai la celloidina viene impiegata raramente, soprattutto per l'inclusione di pezzi molto grandi o di organi particolarmente fragili come il cervello.

Il mezzo più usato è la paraffina, per la sua maneggevolezza e la sua economicità. Essa consiste in una miscela di idrocarburi alifatici rispondenti alla formula generale $C_nH_{2n}+2$, dove n è compreso tra 21 e 34. Spesso le paraffine contengono delle fastidiose impurità (in genere oleine) o grossi cristalli che possono modificarne la qualità, variarne il punto di fusione ed impedirne la perfetta penetrazione nel tessuto, quindi il taglio omogeneo al microtomo. Si consiglia perciò di sottoporre la paraffina ad una filtrazione a caldo prima dell'uso. La qualità delle sezioni dipende dal rapporto tra il punto di fusione della paraffina e la temperatura dell'ambiente di lavoro. Se la temperatura ambiente è inferiore ai 18 gradi, con una paraffina a basso punto di fusione si possono effettuare sezioni spesse (10-12 μ) mentre le sezioni sottili richiedono una paraffina a medio punto di fusione (52°C). A temperature ambiente più elevate, è opportuno utilizzare paraffine con punto di fusione medio per sezioni spesse e punto di fusione elevato per sezioni sottili. Mediamente il punto di fusione ottimale oscilla fra 58 e 60°C. Per evitare deformazioni del campione durante il taglio, la paraffina deve possedere alcune caratteristiche di durezza. Per questa ragione spesso si utilizzano paraffine combinate con composti plastici (histowax, paraplast) le quali, essendo molto purificate, presentano infiltrazione ottimale e maggiore consistenza al taglio. A temperature superiori ai 62°C, questi additivi cominciano a formare polimeri molto difficili da rimuovere, che possono causare striature alla lama del microtomo. Per prevenirne la formazione e consentire una conservazione ottimale del tessuto e dell'Ag, i bagni di paraffina dovrebbero essere mantenuti a temperature non superiori ai 57°C.

Per risultati migliori, però, si consiglia l'inclusione in paraffina pura perché essa può essere completamente e facilmente rimossa dal tessuto al momento della colorazione.

L'inclusione in resina consente il taglio di sezioni più sottili di quanto non sia possibile con l'inclusione in paraffina, (fino a 0,2 - 2 μ), le quali hanno il vantaggio di presentare migliori dettagli morfologici e consentire la localizzazione degli antigeni sia a livello di microscopia ottica che elettronica. Le principali resine per inclusione sono rappresentate dalle resine epossidiche e dai metacrilati.

Le resine epossidiche come l'epon o l'araldite polimerizzano in modo omogeneo producendo una eccellente conservazione dei dettagli strutturali,

ma, a causa della loro elevata reattività, possono interagire con le strutture tissutali durante i processi di polimerizzazione. Sono molto utilizzate anche per la microscopia elettronica. L'elevata viscosità ne limita la penetrazione; pertanto la dimensione dei pezzi non dovrebbe essere superiore ai 5x5 mm.

L'inclusione in resine epossidiche, dopo quella in alcol al 100%, richiede una ulteriore disidratazione, generalmente in ossido di propilene al 100%, a temperatura ambiente ed una infiltrazione in epon diluito 1:1 con ossido di propilene per renderlo più fluido. Per le resine epossidiche i tempi di solidificazione variano da 24 a 36 ore a 60°C in stufa.

I metacrilati tendono a polimerizzare in modo non uniforme e non copolimerizzano con i componenti tissutali; quindi possono causare contrazione del tessuto a scapito della morfologia ma prevengono l'alterazione delle strutture antigeniche; pertanto sono spesso utilizzati quando la concentrazione di antigene è bassa. Il glicole metacrilato ha un'ottima penetrazione che permette l'inclusione anche di pezzi voluminosi. Per la sua semplicità d'uso è indicato soprattutto per procedure di routine. Essendo solubile in acqua rende possibili tutti i metodi di colorazione in microscopia ottica ma non è adatto per la microscopia elettronica. Il metil metacrilato si utilizza soprattutto per materiali duri (ossa, midollo osseo, denti). Richiede una preparazione complessa ma può avere consistenza e durezza variabili. E' insolubile in acqua, pertanto deve essere rimosso prima della colorazione salvo che per quella con blu di toluidina o ematossilina/eosina. Il tempo di indurimento è di circa 2 ore a temperatura ambiente.

Se si usano resine idrosolubili, il campione va immerso direttamente in resina per un tempo variabile da 16 a 20 ore a temperatura ambiente.

## Il taglio al microtomo

Il campione incluso in un blocchetto solidificato è pronto per essere tagliato con un microtomo. A seconda delle esigenze, ne sono disponibili sostanzialmente due tipi: microtomo a slitta e microtomo a rotazione (2).

Vengono definiti a slitta quei microtomi in cui la lama effettua un movimento scorrevole su una guida orizzontale. La lama è fissata in un blocco che viene azionato manualmente dall'operatore avanti e indietro; durante questa corsa esso incontra il pezzo da tagliare (Fig. 1).

Dopo ogni corsa il blocco porta-pezzo si solleva verso la lama di uno spessore corrispondente a quello prefissato, per cui la lama, alla corsa successiva, taglierà una fetta di quello spessore. I microtomi a slitta sono molto pratici e veloci per preparati di routine ma hanno lo svantaggio di non produrre sempre sezioni perfettamente uniformi fra un taglio e l'altro. Questo

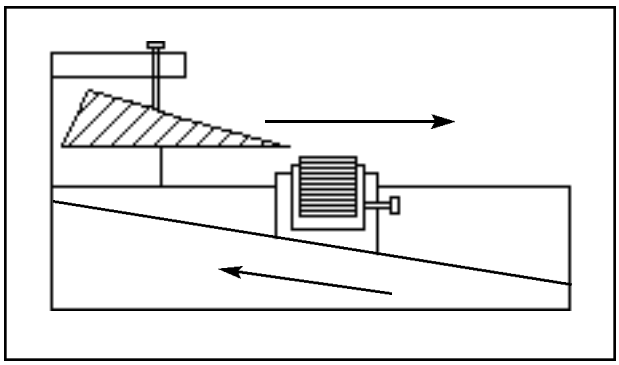


***Figura 1. Microtomo a slitta.***

può dipendere dalla velocità impressa dall'operatore e dalla pressione esercitata durante il trascinamento manuale del blocco porta-lama verso il pezzo da tagliare. Nei microtomi a slitta di nuova generazione, tutte le operazioni manuali sono state completamente automatizzate: la lama è fissata allo stativo ed è il blocco porta-pezzo a muoversi avanti e indietro. Con dispositivi di preselezione elettronici è possibile impostare la velocità di taglio e di ritorno, lo spessore della singola sezione e lo spessore totale da sezionare.

Nei microtomi a rotazione il porta-lama è fissato rigidamente allo stativo. Il pezzo, bloccato su un supporto, scorre su due guide verticali che vengono azionate da una manopola comandata manualmente; esso oscilla alternativamente dall'alto in basso, incontrando la lama posta orizzontalmente e avanzando ad ogni corsa di uno spessore stabilito. Se il microtomo a slitta è veloce e facile da usare, il microtomo rotativo è in genere più preciso, in quanto l'azione dell'operatore non influisce direttamente sull'impatto tra lama e blocchetto (Fig. 2).

Esso si usa soprattutto quando sono richieste sezioni seriate ed uniformi o di spessore molto sottile.

Le lame rappresentano lo strumento di taglio vero e proprio. Una lama non sufficientemente affilata produce cattive sezioni anche dai preparati migliori. Un filo arrotondato comprimerà il campione che incontra e le sezioni che si otterranno saranno di spessore irregolare e diverse da un taglio all'altro. Risulta quindi importante la qualità dell'affilatura.

Essa può essere controllata al microscopio a luce riflessa a 100 ingrandimenti; risulta perfetta quando non si osservano riflessi ed il filo appare come una sottile linea continua di spessore tra 0,1 e 0,3 μ. La composizione dell'acciaio riveste la massima importanza ai fini della qualità del taglio. Una lama troppo tenera non tiene abbastanza a lungo il filo; una lama troppo dura può risultare fragile e, incontrando eccessiva resistenza, può sgretolarsi in fram-

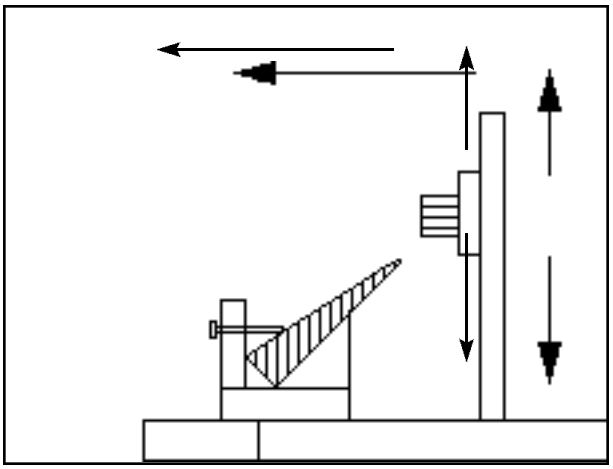
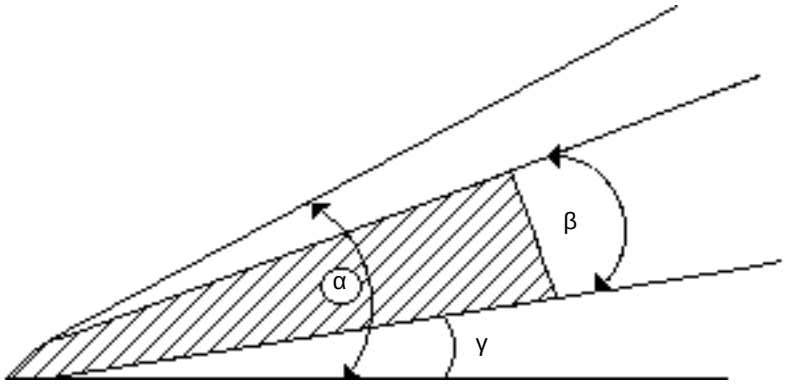


***Figura 2. Microtomo a rotazione.***

menti di acciaio che possono incastrarsi nel blocchetto. La scelta della lama dipende dalla grandezza, dalla durezza e dallo spessore del pezzo da tagliare. La resistenza al taglio dipende da fattori come l'adesione fra lama e materiale, la natura del pezzo, il rapporto tra qualità del mezzo di inclusione e la consistenza del campione. Nella lama si possono identificare due angoli rilevanti ai fini del taglio: l'angolo della lama (β) e l'angolo delle faccette di taglio (α), dove α è generalmente di 35° e β è di 25°. Dunque la differenza α-β è di 10° e rappresenta l'angolo formato dalle due faccette di taglio (2γ) (Fig. 3).

L'angolo di taglio è quello compreso tra il piano del pezzo da tagliare e la faccetta di taglio della lama. Quando il porta lama è in posizione zero, forma con il blocchetto un angolo di circa 10°. Se l'angolo della faccetta di taglio è di 5°, l'angolo libero si riduce a 5°. Questa è la posizione di taglio più comune (Fig. 4).

Di norma l'angolo di taglio va scelto in funzione della resistenza del campione alla deformazione. Esso va aumentato per materiali duri e diminuito fino quasi allo zero per i materiali più teneri. La velocità di taglio dipende dal mezzo di inclusione utilizzato e può essere progressivamente aumentata dai preparati congelati, a quelli inclusi in paraffina tenera o in celloidina fino ai mezzi più consistenti. E' pertanto consigliabile ricercare di volta in volta la velocità di taglio ottimale, correggere l'inclinazione della lama, verificarne l'accurata fissazione al suo supporto e controllare la temperatura dell'ambiente di lavoro. Un campione di un cm di spessore, incluso in paraffina, all'atto del taglio con una lama di 16 cm, subisce una pressione che produce un arretramento del pezzo di circa 1 μ. Pertanto, per la natura tenera del mezzo, lo spessore di una sezione in paraffina non può scendere sotto il limite di 3-4 μ. Quindi, a forti ingrandimenti, si possono os-




α*: angolo della lama + angolo delle faccette di taglio*
β*: angolo della lama*
*La differenza* α - β *= 10°*
*L'angolo della faccetta= 2*γ *= 5°*

***Figura 3. La lama del microtomo.***

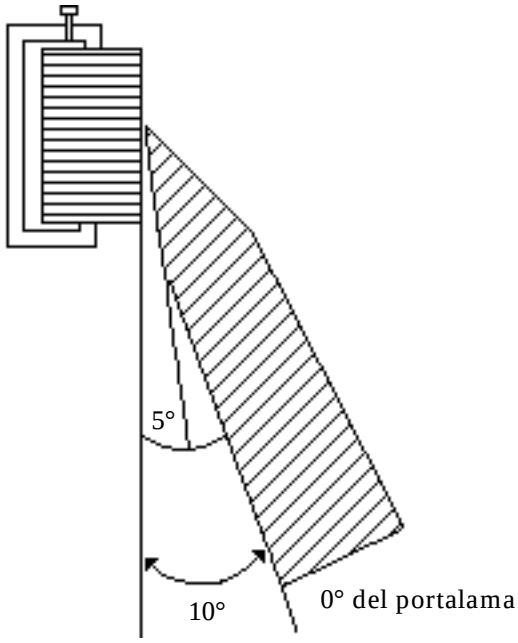



***Figura 4. Angolo di taglio della lama.***

servare aberrazioni rilevanti anche con eccellenti microscopi ottici. L'esigenza è soprattutto quella di esaltare la qualità del preparato per aumentare la risoluzione delle immagini ed evidenziare meglio la morfologia delle cellule per ottenere maggiori dettagli. Tutto ciò si ottiene soprattutto mediante sezioni più fini. Ottimi risultati si ottengono con lame di vetro o con inclusioni in resina.

La lama di vetro può essere utilizzata soprattutto per la paraffina. Per il taglio di resine, ossa non decalcificate e materiali duri, la fragilità del filo richiederebbe invece frequentissime sostituzioni della lama, per cui si useranno in genere lame d'acciaio. Materiali molto duri come legno, plastica, metallo osso non decalcificato, possono essere tagliati con lame speciali al tungsteno.

## La raccolta delle sezioni

Per migliorare la consistenza del mezzo di inclusione, prima del taglio il blocchetto di paraffina può essere raffreddato a -20°C. La sezione ottenuta può essere recuperata a secco o con una vaschetta di raccolta. A secco la fettina viene afferrata con una pinzetta e tirata durante il taglio (4). Quindi viene deposta su una goccia d'acqua situata sul vetrino. Nel taglio a secco è consigliabile spruzzare il filo della lama con uno spray di teflon per consentire alla sezione di scivolare senza impastarsi. Per evitare l'arricciamento della sezione, è consigliabile utilizzare una vaschetta di plastica riempita di acqua e applicata alla lama, la quale permetterà alla sezione appena tagliata di stendersi per essere poi raccolta agevolmente sul vetrino. Una apposita vaschetta per la raccolta delle sezioni può essere utilizzata anche con la lama di vetro. Le sezioni ideali sono comprese tra 2 e 7μ. Esse vengono fatte essiccare mediante incubazione per una notte a 37°C o per 1 ora a 60°C. Quindi possono essere conservate a temperatura ambiente.

## Reidratazione dei preparati inclusi

Prima della colorazione le sezioni devono essere deparaffinate e reidratate mediante immersioni sequenziali di 2-5 minuti ciascuna in solventi organici che sciolgono la paraffina e progressivamente sono sostituiti da mezzi solubili in acqua.

Un fondo di colorazione non specifico dovuto ad una incompleta rimo-

zione dei residui di paraffina è facilmente riconoscibile come una colorazione pallida che si estende oltre i confini del campione e spesso maschera la colorazione specifica.

I residui di plastica, come il paraplast, contenuti in alcuni mezzi di inclusione sono spesso difficili da eliminare.

Per una completa rimozione, i vetrini, prima di essere deparaffinati, dovrebbero essere posti per 30 minuti in una stufa ad una temperatura appena sotto il punto di fusione del materiale usato per l'inclusione, ma comunque non superiore a 60°C, per prevenire la denaturazione dell'antigene e il danno alla morfologia cellulare. Dalla stufa i vetrini dovrebbero essere immersi direttamente in un bagno di xilene o toluene fresco prima che la paraffina solidifichi di nuovo.

Per una deparaffinatura efficace, in un volume di 250 ml non dovrebbero essere posti più di 50 vetrini, per consentire una sufficiente circolazione del liquido. Minore sarà il numero dei vetrini immersi in un bagno di xilene e più completamente verrà rimosso il mezzo di inclusione. Se necessario, si dovrebbe effettuare un secondo bagno di xilene fresco prima dei passaggi in etanolo 100%, etanolo 95%, etanolo 70%, acqua e tampone. Alcuni affermano che per la completa rimozione dei mezzi di inclusione il toluene sia più efficace dello xilene.

Per prevenire la formazione di depositi neri dovuti al cloruro di mercurio presente nei campioni fissati con Zenker, le sezioni deparaffinate dovrebbero venir immerse, prima della colorazione, dapprima in iodio allo 0,5% in etanolo 70% e, dopo risciacquo in acqua corrente, in tiosolfato di sodio al 5% in acqua per due minuti.

Dopo la deparaffinatura le sezioni non dovrebbero essere lasciate essiccare.

Anche i campioni inclusi in resina devono essere reidratati prima della colorazione. Il metodo più comune per rimuovere la resina ed esporre i determinanti antigenici è l'incubazione per 15 minuti in una soluzione satura di idrossido di sodio lasciata maturare per diversi giorni e diluita 1:1 prima dell'uso con etanolo (sodio etossido), o metanolo (sodio metossido). In alternativa si possono incubare le sezioni in perossido di idrogeno al 10% per 15 minuti e poi risciacquarle in acqua prima di processarle.

## Congelamento

Molti antigeni, sia di superficie che intracellulari, vengono spesso distrutti dalla fissazione; quindi la loro localizzazione può essere effettuata soltanto in sezioni di campioni congelati. Il congelamento evita trattamenti

come la fissazione e l'inclusione riducendo il rischio di denaturazione dei componenti tissutali. Questo metodo, per la sua rapidità, è particolarmente indicato per l'esame istologico estemporaneo di pezzi operatori nella sede stessa di intervento. Per i tradizionali metodi di congelamento esterno, i tessuti dovrebbero essere di piccole dimensioni, non superare i 4 mm di spessore, e venir congelati rapidamente per ridurre lo shock termico, consentire una rapida fissazione dell'antigene e prevenire la formazione di cristalli di ghiaccio che potrebbero distruggere la struttura cellulare. Essi dovrebbero essere posti in fogli di alluminio ed immersi, fino al congelamento (1-2 minuti), in un bagno di etanolo / ghiaccio secco, o isopentano / azoto liquido, o acetone preraffreddato in azoto liquido. I campioni immersi direttamente in azoto liquido andrebbero tenuti con delle pinze sotto la sua superficie e agitati delicatamente per disperdere lo strato non conduttore di azoto gassoso che si forma intorno al blocchetto. Una volta fissato ed essiccato all'aria, il materiale può essere conservato a lungo, avvolto in fogli di alluminio, a -20°C o -80°C in contenitori di plastica sigillati per evitare la disidratazione che ne renderebbe difficile il sezionamento. I contenitori per la conservazione in azoto liquido dovrebbero essere dotati di fori che rendano accessibili i campioni al gas.

Prima del taglio, il blocchetto di tessuto dovrebbe essere portato alla temperatura della camera criostatica. Con il microtomo congelatore o con il più sofisticato criostato a congelamento rapido, dotato di un gruppo compressore accessorio di elevata potenza, il blocchetto viene confezionato con un mezzo che solidifica a basse temperature (OCT) e, in circa due minuti, si ottiene un perfetto congelamento del pezzo direttamente nell'apparato di taglio. La temperatura minima in questa fase è di -50°C. Quando il pezzo è congelato, è possibile regolare a piacimento la temperatura di taglio, la quale dovrebbe essere mantenuta tra -10 e -30°C a seconda dei tessuti.

Per il materiale congelato umano (blocchetti o sezioni), si devono seguire le regole di manipolazione usate per il materiale potenzialmente infetto.

Prima del sezionamento, il blocco di tessuto viene fatto aderire ad un supporto di metallo. Le sezioni dovrebbero essere tagliate con uno spessore compreso tra 4 e 7μ, raccolte su vetrini e fatte essiccare a temperatura ambiente. A questo punto il tessuto può essere conservato fino a un mese a 4°C o per tempi superiori a -20°C, sebbene per ottenere risultati migliori sia consigliabile utilizzarlo il più presto possibile.

## Fissazione delle sezioni congelate

Le sezioni essiccate, una volta riportate a temperatura ambiente, sono pronte per essere fissate. Il fissativo più idoneo va scelto in funzione della localizzazione e delle caratteristiche fisico-chimiche dell'Ag da localizzare.

Gli antigeni presenti sulla superficie cellulare e quelli extracellulari possono essere colorati anche senza fissazione ma, per migliorare la morfologia e l'aderenza sul vetrino, può essere consigliata una fissazione per 10 minuti con formalina in rapporto 1:1 con acetone o etanolo; oppure glutaraldeide o paraformaldeide a concentrazione dell'1-3% in fosfato 0,05M pH 7,2; o ancora metanolo, o etanolo, o acetone assoluti a temperature comprese tra +4°C e -10°C.

Gli antigeni nucleari e citoplasmatici devono essere fissati e resi accessibili all'anticorpo; pertanto la membrana deve essere resa permeabile con acetone in rapporto 1:1 con metanolo o cloroformio o con una miscela di acetone: metanolo: formalina 19: 19: 2.

Il fissativo ottimale dovrebbe essere determinato con esperimenti di prova (10 minuti di incubazione a freddo con vari fissativi) e il preparato fissato dovrebbe essere confrontato con quello non fissato. Le sezioni fissate possono essere essiccate all'aria e lavate in tampone oppure conservate a -70°C o -20°C. Prima di iniziare l'immunocolorazione, la sezione viene posta in tampone per 5 minuti. Se la procedura richiede l'inibizione della perossidasi endogena, la fissazione in acetone può essere sostituita da un bagno di metanolo-perossido di idrogeno per 5 minuti.

## Immunocitochimica

L'allestimento dei vetrini per l'esame di liquidi pleurici, peritoneali e pericardici, di lavaggi bronchiali e scrapings, o di materiale citologico ottenuto per agoaspirazione con ago sottile da noduli solidi e cisti presenti in mammella, linfonodi, tiroide, polmone, midollo e numerosi altri organi, può essere effettuato secondo varie modalità (5).

### Preparati ottenuti per striscio

La tecnica è identica a quella usata per gli strisci di sangue: il materiale viene deposto su un vetrino portaoggetti e strisciato con la massima cura in modo da non danneggiare le cellule. Per ottenere preparati citologici qualitativamente e quantitativamente soddisfacenti, gli strisci dovrebbero risultare costituiti da un solo strato cellulare; in preparazioni più spesse, infatti, i reagenti possono venire intrappolati tra gli strati e conferire al preparato una colorazione di fondo che può rendere difficile l'interpretazione dei risultati.

Per assicurare la conservazione dell'antigene gli strisci dovrebbero essere fissati il più rapidamente possibile, o comunque entro le 24 ore dal prelievo (6). I fissativi più comuni sono l'acetone e la formalina tamponata al 10% per

10 minuti. Dopo la fissazione i campioni sono stabili per diversi giorni a temperatura ambiente e per una-due settimane a 4°C. I campioni congelati a -20 sono stabili per diversi mesi. La conservazione dello striscio dipende dalla stabilità dell'antigene che deve essere localizzato. Gli strisci di sangue possono essere fissati per immersione diretta in un bagno di metanolo-perossido di idrogeno che produrrà nel contempo l'inibizione dell'attività della perossidasi endogena. Prima di essere processato, il campione deve essere reidratato e risciacquato in tampone per 5 minuti.

## Preparati ottenuti per citocentrifugazione

Il materiale, opportunamente diluito in tampone fosfato 0,1 M pH 7,2-7,4 (PBS), viene lavato per centrifugazione a 1500 rpm per 5 minuti. Il pellet viene risospeso in 1 ml di PBS contenente albumina bovina (BSA) all'1% o siero di vitello al 10% ed aliquotato in provette idonee per l'allestimento dei citocentrifugati. Il volume di tampone aggiunto al materiale ed i parametri di centrifugazione (tempo e velocità) variano a seconda dei preparati.

L'allestimento di citocentrifugati consente una buona concentrazione del materiale, soprattutto nei casi di scarsa cellularità del campione, ed è preferibile allo striscio in quanto si associa ad una minore colorazione di fondo.

## Allestimento di cell blocks

Le tecniche di cell block, impiegate in parallelo o in sostituzione alle preparazioni su vetrino uniscono i vantaggi delle tecniche citologiche con quelli delle tecniche istologiche. La preparazione dei cell blocks prevede una prima fase di rivestimento del campione citologico con un film di materiale inerte a costituire il cosiddetto "cell bag" e una fase successiva di inclusione del cell bag in paraffina a formare un blocchetto (cell block), che può essere tagliato al microtomo (7). Tale metodica consente di apprezzare le caratteristiche strutturali degli aggregati cellulari riducendo la sovrapposizione cellulare e l'interferenza legata alla presenza di sangue e di detriti cellulari. Anche partendo da modeste quantità di materiale citologico, il cell bag facilita la raccolta di tutto il sedimento e previene la perdita di materiale durante i passaggi successivi. L'inclusione in paraffina consente di conservare a lungo il materiale per poterne disporre anche in tempi successivi.

Le sostanze impiegate per la preparazione dei cell bags sono varie.

***Cell bag in agar***

Il materiale viene lavato, mediante centrifugazione, in alcol 85%. Il sovranatante viene scartato ed il pellet, che contiene tutto il sedimento cellulare,

viene fissato per 24 ore in liquido di Bouin e rivestito di agar neutro. Il cell bag così ottenuto viene disidratato attraverso passaggi in alcol e xilene ed incluso in paraffina.

***Cell bag in celloidina***

Per ottenere un film di 20-50 μ, si riempie una provetta con una soluzione di celloidina preparata sciogliendo 10 g di fiocchi di celloidina in 100 ml di etanolo: etere etilico 1:1 e si lascia sgocciolare. Quindi si riempie la provetta con cloroformio per indurire la pellicola di celloidina e prevenirne l'eccessiva asciugatura (l'eccesso di celloidina e di cloroformio si possono recuperare). Infine, nella provetta così preparata, si versa il materiale citologico sospeso in fissativo (alcol 95% o formalina 10%) e si centrifuga per 10 minuti ad un elevato numero di giri (circa 3000 rpm); si scarta il sovranatante, si elimina la parte superiore del film di celloidina e si estrae dalla provetta la parte inferiore, con il sedimento in essa raccolto, che viene sigillata a formare un sacchetto (cell bag). Esso viene immerso velocemente in una soluzione di eosina alcolica all'1% per facilitarne la rilevazione, disidratato secondo routine e incluso in paraffina.

***Cell bag da coagulo di fibrina***

Si risospende il materiale citologico in soluzione fisiologica e si centrifuga per 10 minuti a circa 3000 rpm; si scarta il sovranatante e si aggiungono al sedimento 5 gocce di plasma umano e una aliquota di trombina attiva. Si agita la provetta fino a che non si formi un coagulo; si colora il coagulo con eosina alcolica e si avvolge in carta bibula. Infine si fissa in formalina al 10%, si disidrata e si include in paraffina.

## Preparati purificati su gradiente

Questo metodo utilizza una tecnica di centrifugazione su gradiente di Ficoll-Hypaque o lymphoprep e risulta particolarmente utile quando si disponga di materiale francamente ematico in quanto permette la quasi totale rimozione dei globuli rossi e consente di ottenere preparati citologici altamente purificati.

Il materiale di partenza viene diluito in tampone e lavato accuratamente per centrifugazione. Il sedimento viene risospeso alla concentrazione di $1x10^6$ cellule/ml di PBS, stratificato su 10 ml di lymphoprep e centrifugato a 300 g per 20 minuti. Le emazie precipiteranno sul fondo della provetta. Si prelevano le cellule nucleate poste all'interfaccia tra il gradiente e PBS e si lavano in tampone per eliminare i residui di lymphoprep. Infine si allestiscono dei citocentrifugati dal pellet risospeso in volume idoneodi tampone.

### Preparati ottenuti per impronta

E' possibile allestire preparati citologici per impronta o apposizione diretta del vetrino su masse tumorali o tessuti bioptici (8). Questo metodo è facile e di rapida esecuzione e permette di ottenere risultati estremamente attendibili in quanto il preparato dovrebbe rispecchiare la cellularità del tessuto di provenienza.

## Immunocitochimica su preparati colorati

Questo tipo di indagine permette di utilizzare lo stesso materiale già colorato con il metodo di Papanicolaou o di May Grunwald Giemsa e sul quale pertanto è stata già formulata una diagnosi sulla base dell'esame morfologico. Tuttavia spesso richiede l'uso di concentrazioni più alte di anticorpo primario; inoltre, trattandosi di materiale già ampiamente processato, è possibile riscontrare una parziale perdita o denaturazione degli antigeni con conseguente riduzione dell'intensità di colorazione (9).

L'immunocitochimica su materiale fissato e colorato rende innanzitutto necessaria la rimozione del vetrino coprioggetto immergendo i vetrini per un tempo variabile (da 1 a 5 giorni) nel mezzo usato per montarlo, che generalmente è xilolo. Nei vetrini montati con film di acetato di cellulosa, è possibile rimuovere rapidamente e completamente tali pellicole immergendo i vetrini in acetone per un tempo massimo di 5 minuti e quindi in xilolo per 10 minuti.

Questi preparati citologici, prima di venire ulteriormente processati, possono essere sottoposti a decolorazione acida, decolorazione blanda o nessuna decolorazione. La decolorazione acida si esegue immergendo i vetrini in una soluzione di HCl all'1% in etanolo 70% per 5-30 minuti, in base all'intensità di colorazione naturale, e lavandoli in acqua distillata e in PBS. Nella decolorazione blanda, eseguita senza acido cloridrico, si immergono progressivamente i vetrini per circa 4 minuti in xilolo-etanolo 1:1, etanolo assoluto, etanolo 95%, etanolo 80%, etanolo 70% e acqua distillata (10).

# Le procedure di colorazione immunoistochimica

## Gli anticorpi primari

La qualità dell'anticorpo primario è di considerevole importanza per la validità della colorazione.

Numerose sono le preparazioni di anticorpi (Ab) disponibili per le procedure di immunoistochimica (11). La più facile da produrre, perché meno costosa e dunque più comune, è rappresentata dalla frazione di siero intero, costituita da sangue centrifugato per separare gli elementi cellulari.

Oltre agli Ab specifici per l'antigene contro cui l'animale è stato immunizzato, essa contiene anche componenti ordinarie del siero come elettroliti, enzimi ed altre proteine, tra cui ci sono gli anticorpi normalmente prodotti dal sistema immunitario (anticorpi naturali e anticorpi aspecifici).

Occasionalmente questi elementi possono interferire con l'immunoistochimica e causare una colorazione aspecifica dovuta alla affinità di anticorpi cross-reagenti e di altre proteine sieriche, prevalentemente albumina, alfa (α) e beta (β) globuline, per alcune componenti tissutali. Risulta quindi importante la qualità del siero.

Poiché il solo elemento necessario per l'immunoistochimica è l'anticorpo specifico, la rimozione delle altre proteine ridurrà l'incidenza di reazioni non specifiche. Spesso un campione di siero viene prelevato dell'animale subito prima che esso sia inoculato con l'antigene; esso è chiamato siero preimmune e viene conservato per studi di confronto rispetto al siero raccolto dopo il tempo necessario per la produzione dell'anticorpo specifico. Se non è disponibile siero proveniente dallo stesso animale che ha prodotto l'anticorpo primario, viene utilizzato il siero non immune, che proviene da un altro animale della stessa specie non immunizzato.

Un tipo di preparazione, chiamata frazione immunoglobulinica e isolata per cromatografia a scambio ionico, contiene prevalentemente anticorpi oltre ad una esigua quantità di proteine sieriche residue. La frazione immunoglobulinica può essere ulteriormente purificata o per affinità o per immunoassorbimento su fase solida, che utilizza i corrispondenti antigeni coniugati ad una matrice solida. Queste procedure rimuovono le tracce di anticorpi che possono cross reagire con l'antigene. In assenza di anticorpi contaminanti, tutti gli anticorpi si legano all'antigene e nessuna colorazione dovrebbe essere osservata dopo l'adsorbimento. Al contrario, una colorazione positiva indica che la soluzione contiene anticorpi contro altri antigeni presenti nel

campione. E' difficile reperire una fonte commerciale di antigeni purificati per adsorbire tutti i differenti anticorpi primari utilizzati nelle colorazioni immunoistochimiche. Spesso le ditte produttrici di anticorpi dispongono di preparazioni purificate di antigeni che utilizzano per immunizzare gli animali.

Una soluzione contenente soltanto anticorpi diretti contro un dato antigene avrà una specificità molto elevata. Una singola molecola antigenica, tuttavia, possiede numerosi determinanti antigenici o epitopi. Poiché ogni clone di cellula B può produrre anticorpi contro un solo epitopo antigenico, le preparazioni contenenti una popolazione eterogenea di Ab specifici per epitopi diversi, e cioè costituita da anticorpi policlonali, può mostrare una cross reattività impossibile da eliminare, dovuta alla presenza di epitopi omologhi su differenti molecole. L'interpretazione dei risultati ottenuti con Ab contro epitopi differenti risulta piuttosto difficile, indipendentemente dalle possibili cross reazioni inevitabili. I legami non specifici degli Ab policlonali possono essere ridotti riducendo la concentrazione di lavoro dell'Ab e aumentando il tempo di incubazione.

Per una colorazione specifica per un dato marker, è necessario utilizzare un anticorpo che reagisca esclusivamente con un particolare epitopo di quel marker. Poiché esso è prodotto da un singolo clone di cellule B, esso è denominato anticorpo monoclonale (12). La selezione dei cloni di cellule B che producono specifici anticorpi può avvenire fuori dell'animale. Poiché le cellule B, una volta rimosse dall'organismo, non possono crescere e dividersi, ma muoiono all'incirca entro una settimana, per conservare la capacità di produzione di anticorpi dei vari cloni, la cellula B è fusa con una cellula B tumorale (mieloma) che può vivere per un tempo indefinito al di fuori dell'animale ospite. La cellula ibrida (ibridoma), che si è formata con la fusione, può essere coltivata in vitro e produrre l'anticorpo specifico delle cellule B. Perché l'ibridoma sia stabile e possa produrre una quantità sufficiente di anticorpi monoclonali, la cellula B e la cellula di mieloma devono essere della stessa specie animale; una gran quantità di linfociti B deve essere disponibile per la fusione e la cellula di mieloma utilizzata per l'ibridazione deve facilmente propagarsi in coltura. Il primo passaggio nella produzione di anticorpi monoclonali è identico a quello per produrre gli anticorpi policlonali. Un topo, che è l'animale più utilizzato per queste tecniche, viene immunizzato con un antigene purificato e comincerà a produrre anticorpi contro di esso. Dopo varie immunizzazioni di richiamo, il topo è sacrificato e la milza, ricca di linfociti B, viene rimossa. Una sospensione cellulare viene mescolata con le cellule di mieloma in un mezzo che consentirà alle cellule di fondersi. Le cellule non fuse o fuse impropriamente moriranno mentre gli ibridomi sopravviveranno e cresceranno in coltura.

La procedura per testare gli ibridomi e determinare quale clone produce anticorpi contro un determinato epitopo è molto lunga e laboriosa. Una volta

identificata l'appropriata linea cellulare, essa può venir inoculata in un topo dove produrrà un tumore. Il liquido ascitico del tumore conterrà una elevata concentrazione di anticorpo specifico ma anche altre immunoglobuline che possono causare un aumento della colorazione di fondo. I sopranatanti delle colture di ibridomi contengono una concentrazione di anticorpo inferiore rispetto a quella del liquido ascitico ma la colorazione aspecifica dovuta a proteine indesiderate risulta del tutto eliminata.

La concentrazione dell'Ab primario dipende dalla quantità dell'antigene presente nel campione da testare (dopo una possibile perdita dovuta a lavaggi, diffusione o denaturazione) e dalla sensibilità del sistema di rivelazione. La concentrazione di anticorpo monoclonale non dovrebbe superare i 20 mg/ml per evitare un inaccettabile legame aspecifico.

Poiché gli Ab monoclonali per definizione riconoscono un solo epitopo, una mancata reattività dell'Ab usato può essere dovuta ad una variazione dell'epitopo stesso che può avvenire durante la trasformazione neoplastica; può quindi essere utile servirsi di Ab diretti contro variazioni di questo epitopo o di un Ab specifico per un differente epitopo di questa molecola o di un pannello di Ab che completi le informazioni dell'Ab quando è necessario migliorare la validità delle informazioni ottenute.

## I sistemi di rivelazione

Il legame dell'anticorpo primario con l'antigene può essere rivelato da fluorocromi o da enzimi coniugati (13). Se l'anticorpo diretto contro l'antigene da cercare è marcato con un fluorocromo, il sito di reazione si rende evidente per la fluorescenza legata all'anticorpo che ha reagito con l'antigene. Se il marcatore è costituito da un enzima, esso, in presenza di un opportuno substrato, produrrà un precipitato colorato nel sito di reazione. L'immunofluorescenza, introdotta nel 1941 con la realizzazione di anticorpi coniugati con isotiocianato di fluoresceina (FITC), è il più antico metodo di rivelazione immunologica. Lo svantaggio della immunofluorescenza è rappresentato dalla ridotta sensibilità e dalla facile estinzione della fluorescenza. I fluorocromi più usati sono la fluoresceina, la rodamina (solforodammina 101), la resorufina e la ficoeritrina.

L'immunoistochimica è una tecnica dotata di maggiore sensibilità e precisione rispetto alla immunofluorescenza (14) il cui risultato non è stabile nel tempo e tende a decadere per effetto della luce. Le reazioni enzimatiche possono essere analizzate con un microscopio convenzionale a luce diretta; possiedono una colorazione permanente che permette la documentazione fotografica anche a distanza di tempo e possono essere combinate con le colo-

razioni istologiche convenzionali per valutare la colorazione specifica nel contesto morfologico (controcolorazione). D'altro canto, l'immunoistochimica richiede spesso la manipolazione di substrati potenzialmente carcinogeni, numerose incubazioni addizionali e diversi step di lavaggio se paragonata alla fluorescenza.

Talvolta il contrasto tra colorazione e risoluzione non consente di discriminare chiaramente le reazioni debolmente positive; inoltre il precipitato risultante dalla reazione enzimatica può diffondere nelle zone circostanti e causare un quadro di colorazione diffuso.

Gli enzimi comunemente usati in immunoistochimica sono la fosfatasi alcalina da mucosa di vitello (alcaline phosphatase, AP), la β galattosidasi che viene espressa dal gene lac+ e la perossidasi di rafano (horse-radish peroxidase, POD), che è una molecola di piccole dimensioni, che non interferisce con il legame degli anticorpi ai siti adiacenti e si può facilmente ottenere in forma altamente purificata, quindi il rischio di contaminazione è ridotto al minimo.

I metodi di immunoistochimica utilizzati per localizzare l'antigene possono essere diretti, fare uso di coniugati (indiretti), utilizzare immunocomplessi o sfruttare l'affinità tra avidina e biotina. Ciascuno di essi presenta vantaggi e svantaggi che devono essere opportunamente valutati prima della scelta della procedura più efficace per le proprie esigenze (Tab. 1).

L'amplificazione aumenta la sensibilità e cioè permette la rivelazione di quantità più piccole di Ag con la stessa quantità di Ab o aumenta la specificità mediante la rivelazione della stessa quantità di Ag con una diminuita quantità di Ab.

## Metodo diretto

Il modo più semplice per localizzare un antigene è quello di utilizzare un anticorpo diretto specificamente contro di esso. Esso potrà essere facilmente identificato se sarà un anticorpo coniugato (Fig. 5). La coniugazione è un processo che lega chimicamente alcuni tipi di marcatori su una molecola di anticorpo. Un'ampia varietà di coniugati è disponibile per l'uso in varie colorazioni istochimiche dirette o indirette. Questi possono essere fluorocromi come fluoresceina o rodamina; o enzimi come la perossidasi, la fosfatasi alcalina o la β galattosidasi; o sostanze elettrondense come l'oro colloidale. Sfortunatamente nel processo chimico di coniugazione piccole quantità di anticorpo e di marcatore possono venire distrutte. Questo può far diminuire la sensibilità e la specificità di questi reagenti. Nel metodo diretto l'anticorpo specifico è legato chimicamente al fluorocromo o all'enzima. Il reagente coniugato viene applicato al campione e raggiungerà l'antigene. Viene poi applicato un substrato che produrrà un prodotto terminale colorato che

**Metodo diretto**

| | |
|---|---|
| Anticorpo Primario coniugato con | ● fluorocromo<br>● perossidasi<br>● fosfatasi alcalina<br>● β galattosidasi |

**Metodo indiretto**

| | | |
|---|---|---|
| Anticorpo Primario | Ig dirette contro l'Ab primario e coniugate con | ● fluorocromo<br>● perossidasi<br>● fosfatasi alcalina<br>● β galattosidasi |

**Metodo con immunocomplessi**

| | | | |
|---|---|---|---|
| Anticorpo primario | Anticorpo ponte | | perossidasi<br>α<br>perossidasi |
| | | immunocomplesso | |
| | | | fosfatasi alcalina<br>α<br>fosfatasi alcalina |

**Metodi con Biotina**

| | | | |
|---|---|---|---|
| Anticorpo primario coniugato con biotina | Avidina | biotina coniugata con | ● fluorocromo<br>● perossidasi<br>● fosfatasi alcalina<br>● β galattosidasi |
| Anticorpo primario | Ig coniugate con biotina dirette l'anticorpo primario | avidina coniugata con | ● fluorocromo<br>● perossidasi<br>● fosfatasi alcalina<br>● β galattosidasi |
| Anticorpo primario | Ig coniugate con biotina dirette l'anticorpo primario | Complesso ABC avidina legata alla biotina coniugata | ● fluorocromo<br>● perossidasi<br>● fosfatasi alcalina<br>● β galattosidasi |

***Tabella 1. Schema riassuntivo delle diverse metodiche immunoistochimiche.***

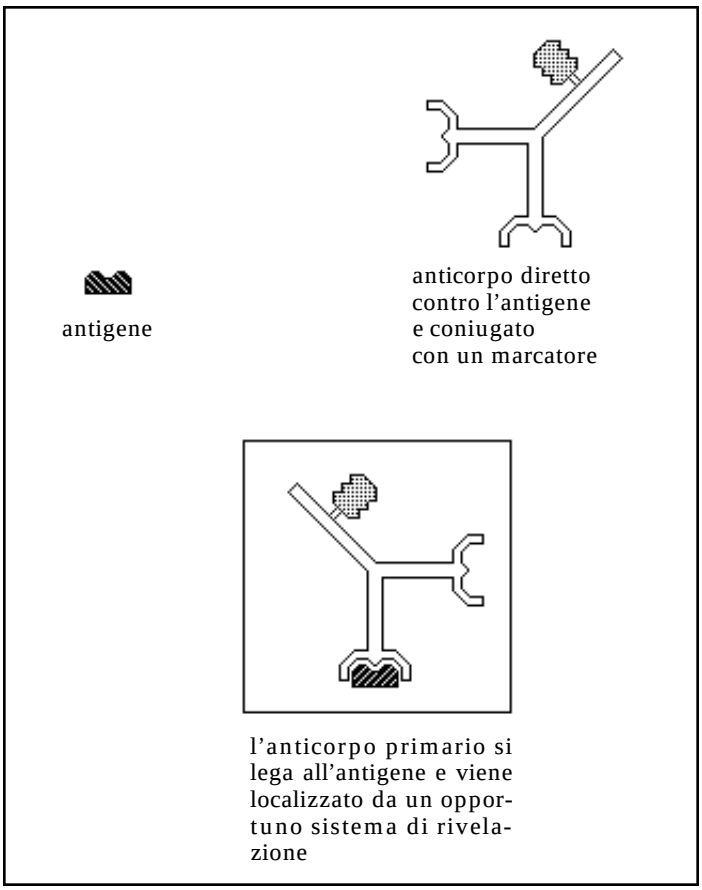



***Figura 5. Metodo di rivelazione diretto.***

precipita nel sito e renderà visibile l'antigene localizzato. La tecnica diretta può essere effettuata rapidamente e con una bassa probabilità di reazione non specifica. Il principale ostacolo è costituito dalla difficoltà di ottenere un differente anticorpo coniugato per ogni antigene da localizzare. Se l'anticorpo non può essere ottenuto in forma coniugata deve coniugarlo l'utilizzatore stesso. Un legame aspecifico del coniugato o FITC può verificarsi se, nella preparazione dell'anticorpo, l'isotiocianato di fluoresceina non legato non è stato rimosso per gel filtrazione. L'applicazione più comune del metodo diretto è la rivelazione di immunoglobuline, di complemento e di depositi di immunocomplessi nelle biopsie renali di casi di lupus eritematoso sistemico (LES) e di altre patologie del tessuto connettivo. Gli antigeni più comuni identificati sono IgG, IgA, IgM, C3 e C4

## Metodo indiretto o con coniugati

Nel metodo indiretto l'antigene da ricercare viene fatto reagire con un anticorpo non coniugato. Successivamente il complesso antigene-anticorpo che si è formato verrà fatto reagire con immunoglobuline di una specie animale diversa da quella da cui è stato prodotto l'anticorpo primario e coniugate con una molecola di marcatore (Fig. 6). La reazione finale risulterà più intensa perché l'antigene tissutale si combina con le molecole di anticorpo, ognuna delle quali si legherà (fungendo a sua volta da antigene), con molecole di anticorpo coniugato.

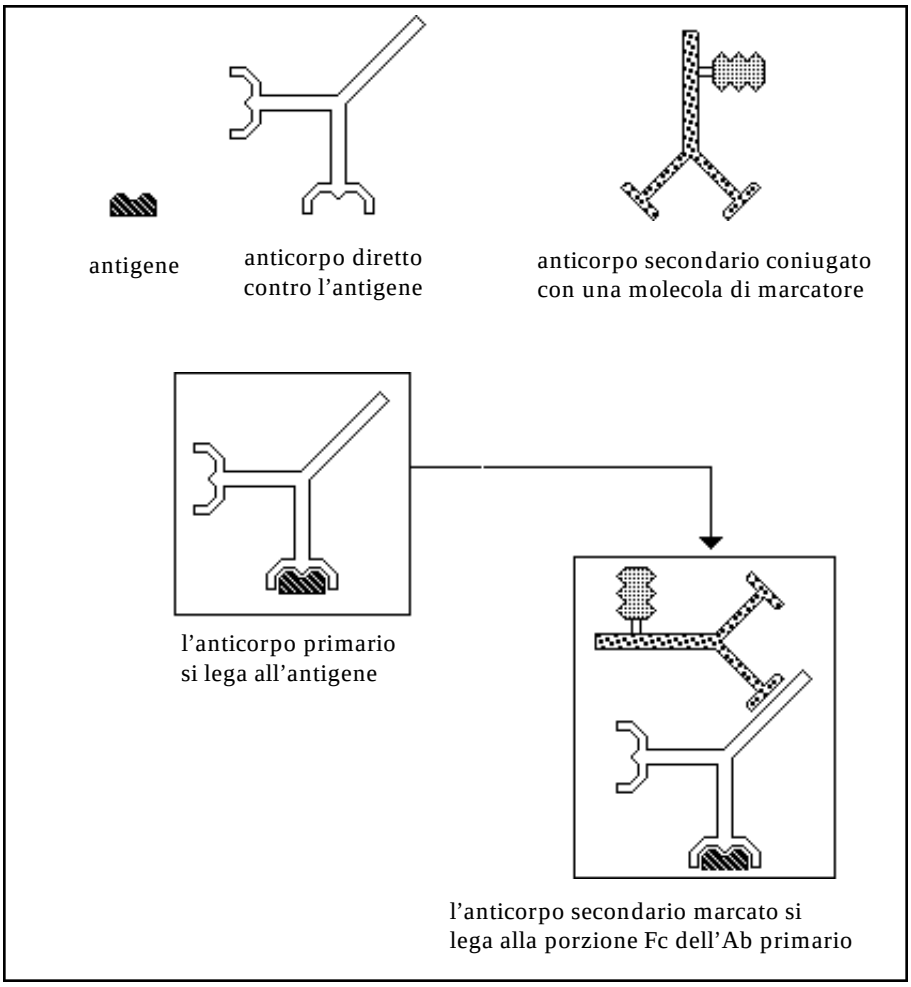



***Figura 6. Metodo di rivelazione indiretto.***

Il metodo indiretto risulta più versatile rispetto a quello diretto perché può essere utilizzata con vantaggio una varietà di anticorpi primari prodotta nella stessa specie animale quando è disponibile un unico anticorpo secondario coniugato con un marcatore. E' più semplice coniugare un solo tipo di anticorpo diretto contro IgG di una sola specie animale.

Comunque i tempi richiesti sono doppi rispetto al metodo diretto e i rischi che si verifichino reazioni non specifiche sono più elevati.

L'immunoistochimica indiretta è utilizzata principalmente per identificare anticorpi contro autoantigeni nucleari, tiroidei, mitocondriali, e della muscolatura liscia, o la presenza di *Treponema pallidum*, *Herpes simplex* e *Citomegalovirus* nonché per la ricerca di anticorpi specifici in soggetti affetti da altre patologie autoimmuni, batteriche o parassitarie. Il siero di questi pazienti è incubato con il relativo antigene adsorbito su un supporto solido. Un anticorpo secondario specifico per le immunoglobuline umane e coniugato con la perossidasi riconoscerà l'anticorpo prodotto dal paziente (che in questo caso funge da antigene per l'anticorpo rivelatore) e mostrerà una colorazione positiva per l'antigene stesso. Nessuna colorazione risulterà evidente se il paziente non produce anticorpi per quell'antigene.

## Metodo con immunocomplessi

Gli immunocomplessi sfruttano la naturale affinità tra antigene e anticorpo e sono costituiti da un complesso formato artificialmente dall'enzima che catalizza la reazione con il cromogeno e da un anticorpo specifico per questo enzima. Questi complessi sono solubili e in soluzione non formano precipitati. L'uso di immunocomplessi anziché di coniugati rende questa procedura fino a 1000 volte più sensibile rispetto alla immunofluorescenza. Questo metodo utilizza tre reagenti: l'anticorpo primario, che è specifico per l'antigene; l'anticorpo secondario o "ponte" e il complesso costituito da un enzima (che può essere la perossidasi, la fosfatasi alcalina o la β galattosidasi) legato per via immune ad un anticorpo diretto contro l'enzima stesso. L'anticorpo ponte è capace di legarsi sia all'anticorpo primario che al complesso coniugato, perché entrambi sono prodotti nella stessa specie animale, e viene aggiunto in eccesso in modo che soltanto uno dei suoi siti Fab si leghi all'anticorpo primario, lasciando l'altro sito Fab libero di legarsi all'anticorpo nell'immunocomplesso (Fig. 7). L'enzima viene visualizzato attraverso una reazione substrato-cromogeno. L'assenza di anticorpi coniugati conferisce a questo metodo una sensibilità superiore a quella attribuita alle tecniche dirette e indirette. Il vantaggio risulta evidente specialmente nei tessuti fissati in formalina e inclusi in paraffina dove può essere osservata una forte colorazione anche se parte dell'antigene è stato distrutto dalla fissazione e dalla processazione.

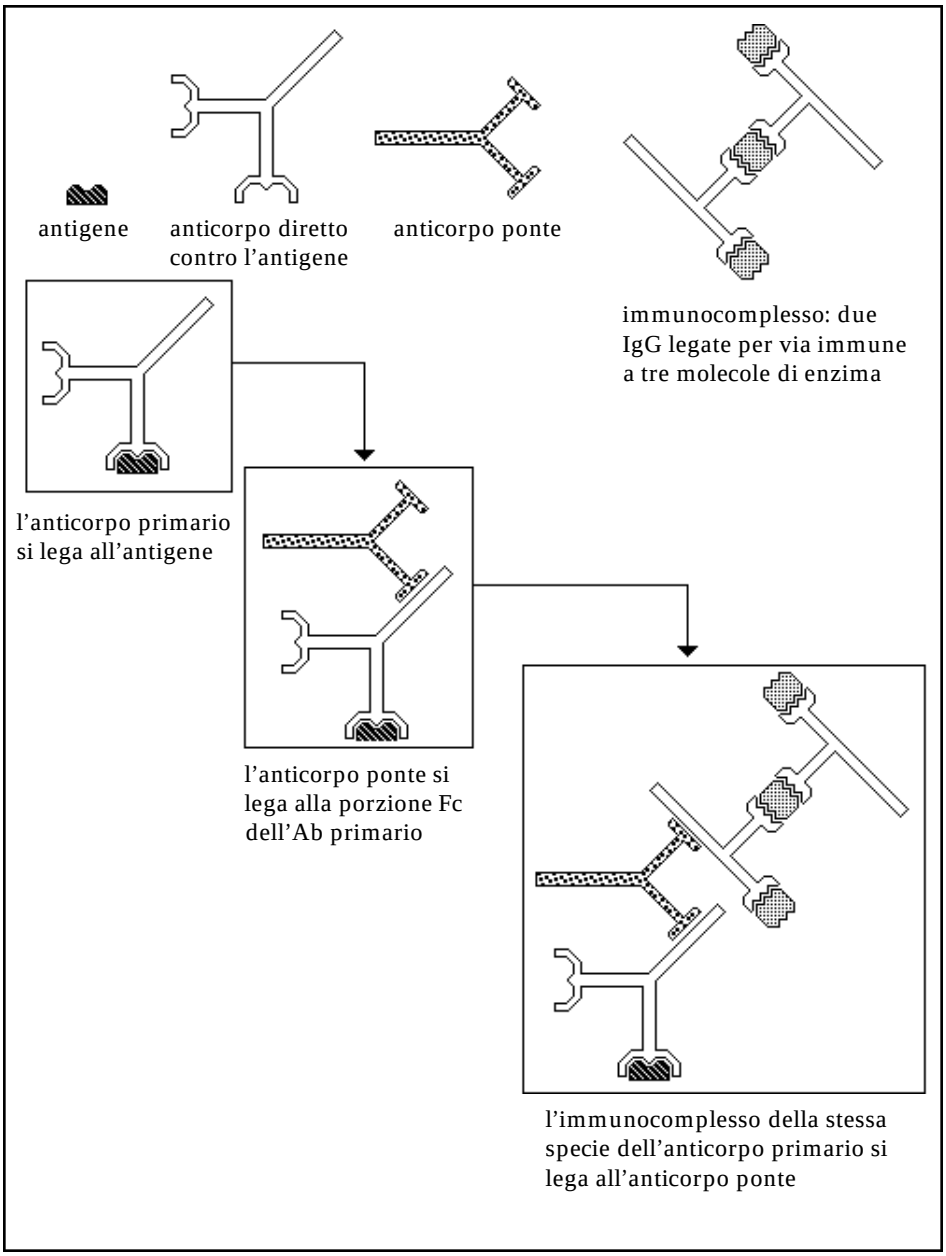



***Figura 7. Metodo di rivelazione con immunocomplessi.***

Al contrario le sezioni congelate sono i campioni di elezione per i metodi diretto e indiretto perché il congelamento consente una maggior conservazione dell'antigene. La maggiore flessibilità del metodo con immunocomplessi consente di determinare l'origine dei tumori mediante l'identificazione di antigeni specifici prodotti nella cellula e quindi permette una classificazione più accurata specialmente per tumori scarsamente differenziati e metastatici che possono essere riconosciuti solo sulla base morfologica. Esso può essere applicato a materiale fissato di routine e incluso in paraffina quindi evita la necessità di sezioni congelate e permette studi retrospettivi.

### Metodo avidina biotina

La tecnica avidina biotina rappresenta uno dei più recenti sviluppi nella colorazione in immunoistochimica (15). Esso è utile per la localizzazione di numerosi antigeni in una varietà di campioni. Questo metodo è basato sulla capacità della glicoproteina del bianco d'uovo, l'avidina, di legare in maniera non immunologica quattro molecole della vitamina biotina. Come per il metodo con immunocomplessi, vengono utilizzati tre reagenti. Il primo è l'anticorpo primario specifico per l'antigene che deve essere localizzato. L'anticorpo secondario, capace di legarsi al primario è coniugato con biotina. Il terzo elemento è un complesso di biotina coniugata con perossidasi o fosfatasi alcalina e avidina. I siti liberi della molecola di avidina consentono il legame alla biotina sull'anticorpo secondario. L'enzima, e quindi l'antigene originale, vengono visualizzati con il cromogeno appropriato. La forte affinità dell'avidina per la biotina conferisce a questo metodo una sensibilità maggiore rispetto a quella di altre tecniche con anticorpi coniugati (come quelle dei metodi diretto e indiretto) e può essere eseguito in tre varianti (Figg. 8a, 8b, 8c). Risultati eccellenti possono esser ottenuti su campioni fissati e inclusi in paraffina.

## Substrati e cromogeni

Un enzima E è un catalizzatore che agisce sul substrato per accelerare la sua conversione a prodotto mediante la formazione un complesso intermedio enzima-substrato come indicato nella seguente reazione:

Enzima + Substrato ——> Enzima-Substrato ——> Enzima + Prodotto

In questa reazione l'enzima non viene consumato ma può reagire con altre molecole di substrato per formare altre molecole di prodotto. Una singola

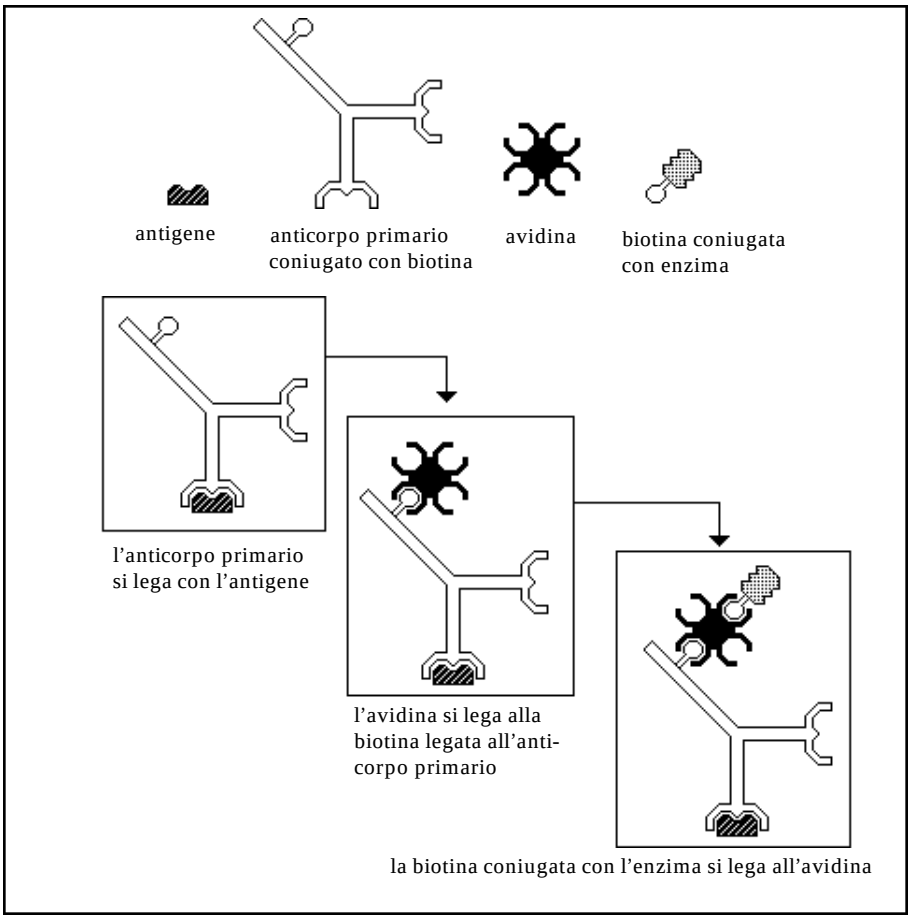



***Figura 8a. Metodo diretto con avidina e biotina***

molecola di enzima può dunque trasformare più molecole di substrato in prodotto. L'aumentata sensibilità delle tecniche immunoenzimatiche rispetto alla immunofluorescenza è dovuta proprio a questa possibilità di amplificazione progressiva. Una molecola fluorescente può cedere soltanto una piccola quantità di luce visibile, mentre un enzima può produrre molte molecole colorate, se sono disponibili abbastanza substrato e tempo di azione.

A seconda degli enzimi utilizzati, numerosi sono i cromogeni che fungono da substrato e possono agire come donatori di elettroni nella reazione enzimatica dando origine ad un prodotto di reazione finale colorato che localizzerà l'antigene mediante la formazione di un precipitato nelle immediate vicinanze del punto in cui è avvenuta la reazione. Per l'uso nelle tecni-

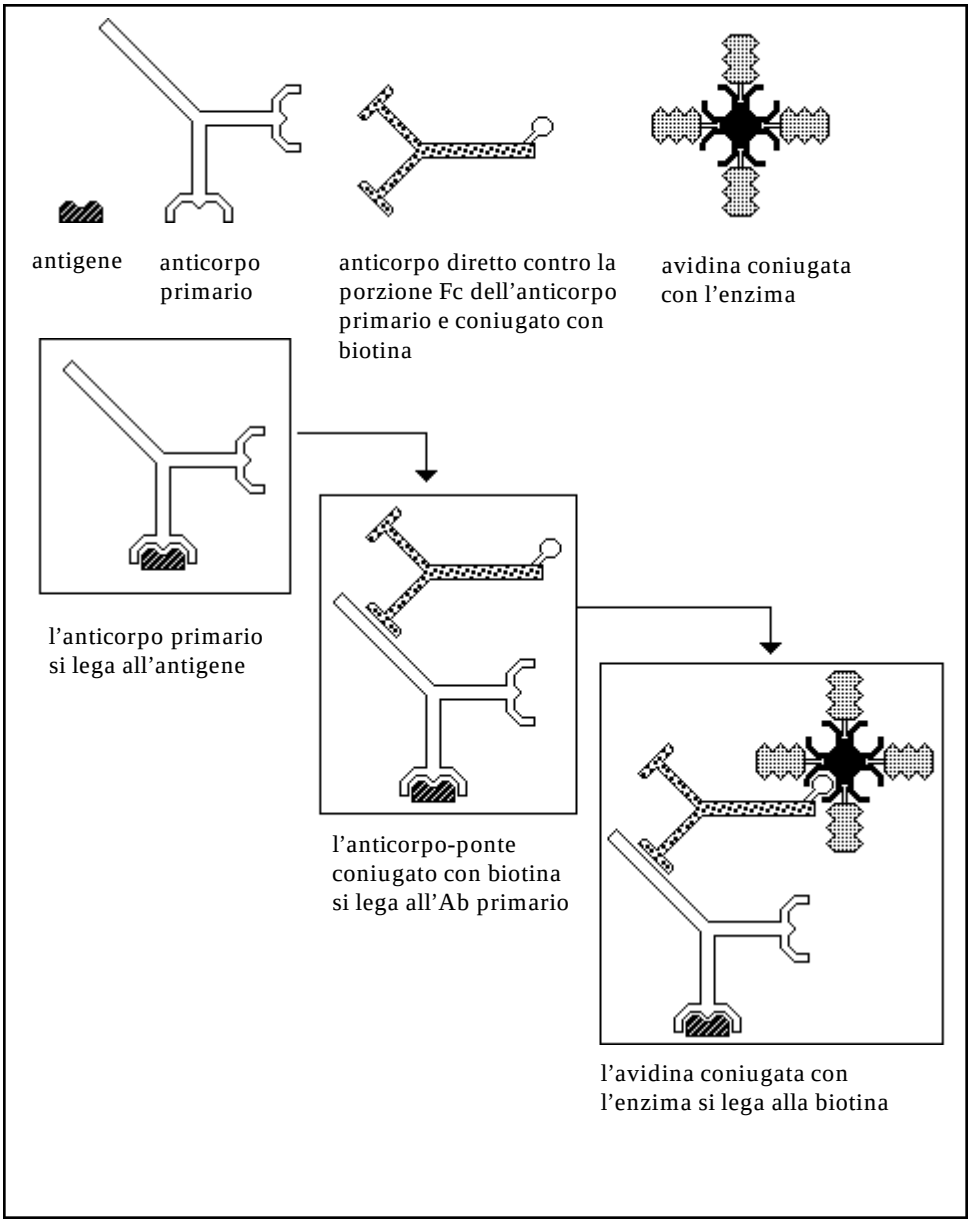



***Figura 8b. Metodo indiretto con avidina e biotina.***

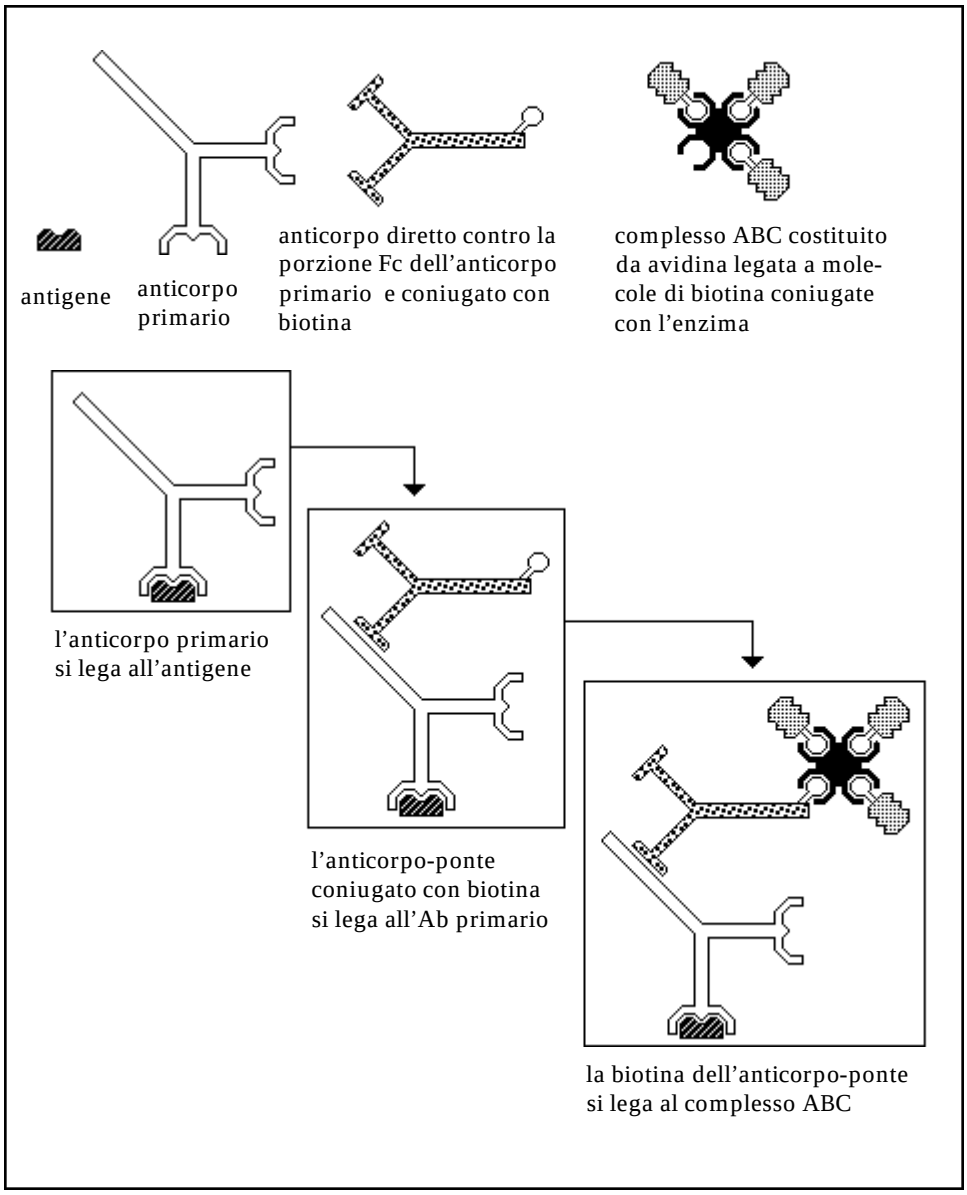



***Figura 8c. Metodo con avidina e biotina denominato ABC.***

che di immunoistochimica, quindi, è indispensabile che il prodotto terminale colorato precipiti nel sito in cui esso è stato prodotto. I cromogeni che formano prodotti terminali solubili non possono dunque essere utilizzati utilmente per queste tecniche.

## Cromogeni per la perossidasi

Un'ampia varietà di cromogeni può essere utilizzata come substrato della perossidasi (POD). Essa catalizza una reazione tra un appropriato substrato donatore di elettrone, che si ossida formando un prodotto finale di reazione costituito da una molecola colorata, e il perossido di idrogeno ($H_2O_2$) che sarà ridotto ad acqua ($H_2O$).

POD+$H_2O_2$+cromogeno —> reazione enzimatica
—> molecola colorata +POD+$H_2O$

Se nella soluzione substrato la concentrazione di $H_2O_2$ risulta insufficiente, essa non consentirà alla reazione di procedere fino al completamento. Al contrario, un eccesso di $H_2O_2$ inibirà l'enzima e impedirà la formazione di colore. La concentrazione finale non dovrebbe superare lo 0,06%. Di solito viene utilizzata una concentrazione di 0,03% che è pari a 0,1 ml di $H_2O_2$ al 3% in 10ml di soluzione substrato. Le concentrazioni e i tempi di incubazione possono essere aggiustati per ottimizzare la colorazione. Una volta che il perossido di idrogeno è stato aggiunto al cromogeno, la soluzione è stabile solo per un breve periodo. Per risultati ottimali il substrato di reazione dovrebbe essere preparato fresco subito prima dell'uso; con il tempo il cromogeno si frammenta e la soluzione comincia a cambiare colore; essa quindi dovrebbe essere scartata e se ne dovrebbe preparare una fresca.

***3,3-diaminobenzidina tetraidrocloruro (DAB)***

La 3,3-diaminobenzidina (DAB) è il substrato di scelta per la immunoperossidasi. Produce una intensa colorazione marrone resistente all'alcol. I vetrini colorati con DAB possono essere disidratati, montati in mezzi di montaggio con i metodi convenzionali e conservati a lungo, perché la reazione produce un precipitato di colore marrone, non solubile in acqua o alcol. La DAB inoltre è elettrondensa e ciò la rende utile anche per studi di immunoperossidasi ultrastrutturali.

La soluzione stock (aliquote di 7,7 mg disciolti in 0,2 ml di Tris-HCl pH 7,7) può essere conservata a -70°C.

La soluzione di lavoro (0,2 ml stock + 10 ml Tris-HCl +25 µl di $H_2O_2$ 3%) dovrebbe essere preparata immediatamente prima dell'uso e filtrata se si verifica una precipitazione. Porre 4-6 gocce su ciascun campione ed incubare

per 5 minuti a temperatura ambiente. Risciacquare con acqua e controcolorare se necessario.

La colorazione marrone può essere potenziata mediante trattamento con tetrossido di osmio o mediante aggiunta di imidazolo 0,01 M pH 7,7 o di cloruro di nickel o cobalto allo 0,04% alla soluzione DAB/substrato per produrre una colorazione più intensa .

Il principale svantaggio della DAB (un derivato della benzidina) è che essa è irritante ed è considerata un sospetto carcinogeno. Si deve dunque maneggiare con cura, evitando l'inalazione della polvere o il contatto con la pelle, seguendo tutti gli accorgimenti raccomandati per le sostanze potenzialmente carcinogene (guanti, vetreria di sicurezza). La decontaminazione della vetreria e degli strumenti è possibile con agenti fortemente ossidanti (ipoclorito di sodio, varechina).

***3-amino-9-etilcarbazolo (AEC)***

Il 3-amino-9-etilcarbazolo (AEC) produce un prodotto terminale marrone-rosso che è insolubile in acqua e solubile in alcol (16). Quindi i campioni non devono essere disidratati, ma montati con un medium a base acquosa. Bisogna aver cura di evitare l'inalazione della polvere o il contatto con la pelle.

La soluzione stock (aliquote di 4 mg di AEC disciolti in 1 ml di N-N dimetilformamide o di 2 mg di AEC disciolti in 1,2 ml di DMSO) è stabile per lunghi periodi di tempo.

Soluzione di lavoro: una aliquota di AEC/formamide + 28,8 ml di Tris-HCl 0,05 M pH 7,3 + 20 µl di $H_2O_2$ 3% oppure una aliquota di AEC/DMSO + 14 ml di tampone acetato 0,1M pH 5,2 + 0,15 ml di perossido di idrogeno 3%. Queste miscele sono stabili per due o tre ore una volta preparate e dovrebbero essere filtrate per evitare precipitati. Porre 4-6 gocce su ciascun campione e incubare per 40 minuti a temperatura ambiente o 20 minuti a 37°C. Risciacquare con acqua e controcolorare.

Anche il 3-amino-9-etil-carbazolo è tossico ed è un sospetto carcinogeno, ma le fonti di riferimento in proposito sono discordanti. Anch'esso deve essere maneggiato con cura evitando l'inalazione della polvere o il contatto con la pelle e seguendo le raccomandazioni per le sostanze potenzialmente carcinogene (guanti, vetreria di sicurezza); la decontaminazione della vetreria e di strumenti è possibile con agenti fortemente ossidanti o acidi.

***4-cloro-1-naftolo***

Il 4-cloro-1-naftolo precipita come un prodotto terminale blu-nero insolubile in $H_2O$ e solubile in alcol, che tende a diffondere dal sito di precipitazione. Quindi i vetrini non possono essere conservati per una documentazione permanente.

La soluzione stock (aliquote di 3 mg di 4-cloro-1-naftolo in 0,2 ml di etanolo assoluto) può essere conservata a 4°C al buio per 2 settimane. Per l'uso diluire una aliquota in 10 ml di tampone Tris 0,05M pH 7,6 con agitazione. Dopo l'aggiunta di 0,1 ml di perossido di idrogeno 3% si formerà un precipitato bianco che deve essere eliminato per filtrazione prima dell'uso. Porre 4-6 gocce su ciascun campione ed incubare per 30 minuti a temperatura ambiente. Risciacquare con acqua e controcolorare se necessario.

Il 4-cloro-1-naftolo è irritante. Manipolare con cura seguendo le regole per gli irritanti. Non ci sono dati circa la sua carcinogenicità.

***Reagente di Hanker-Yates***

Il reagente di Hanker-Yates (P-fenilendiamina diidrocloruro / pirocatecolo) produce un prodotto di reazione blu-nero che è insolubile in acqua o alcol (17). Questa soluzione è disponibile in commercio o può essere preparata mescolando 5 mg di p-fenilendiamina diidrocloruro con 10 mg di pirocatecolo disciolti in 10 ml di tampone Tris 0,05M pH 7,6. Aggiungere 0,1 ml di perossido di idrogeno 3%. Porre 4-6 gocce su ciascun campione e incubare per 15 minuti a temperatura ambiente. Risciacquare con acqua e controcolorare se necessario.

## Cromogeni per la fosfatasi alcalina

***BCIP/NBT***

Il sale di blu di toluidina del 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP) è il substrato di scelta per l'uso di fosfatasi alcalina in immunoblotting e, meno comunemente, nelle procedure di immunoistochimica. Una sensibilità più elevata si raggiunge quando il BCIP è usato in combinazione con il nitro blu di tetrazolio (NBT). Il sistema BCIP / NBT produce una colorazione blu scuro permanente.

***Naftolo AS-TR fosfato***

Il Naftolo AS-TR fosfato è un substrato che si utilizza in fosfatasi alcalina in immunoistochimica. A seconda dei coloranti utilizzati in combinazione con esso può dar luogo ad un prodotto di colore diverso.

***Fast red***

Quando il naftolo fosfato AS-TR è usato in combinazione con il fast red RC si produce un prodotto terminale insolubile di color rosso. Il fast red RC può essere utilizzato anche con altri derivati del naftolo fosfato in varie applicazioni.

La soluzione stock (2 mg di naftolo AS MX fosfato disciolti in 0,2 ml di dimetilformamide e diluiti in 9,8 ml di Tris 0,1 M pH 8,2 con l'aggiunta di 10

µl di levamisole 0,6 mM per bloccare la fosfatasi alcalina endogena) può essere conservata a -20°C per diverse settimane.

Soluzione di lavoro: subito prima dell'uso aggiungere a 10 ml di soluzione stock 10 mg di sale di fast red e filtrare direttamente su vetrino (18) (19).

***Fast blu***

Questo substrato produce un prodotto terminale insolubile che è di color blu porpora e può essere visualizzato anche a occhio nudo.

Soluzione stock: 10 mg di naftolo AS-MX fosfato (sale disodico) vengono disciolti in 0,5 ml di N,N dimetilformamide e diluiti in 50 ml Tris 0,1 M pH 8,2 con 4 gocce di magnesio solfato 10%.

Soluzione di lavoro: prima dell'uso aggiungere 50 mg di sale di fast blu e 12 mg di levamisole e filtrare.

***New fucsin***

La new fucsin produce una colorazione rosso vivo permanente.

Soluzione stock 5%: aliquote di 0,5 ml di new fucsin al 5% in HCl 2M possono essere conservate a 4°C per almeno un anno.

Soluzione di lavoro: una aliquota di soluzione stock aggiunta a 1,25 ml di nitrito di sodio al 4% (fresco!) e agitata per 60 sec. Aggiungere 250 ml di Tris HCl pH 8,7 e, se richiesto, 90 mg di levamisole disciolti in 1,5 ml di dimetil formamide.

Filtrare il substrato in una vaschetta portavetrini o direttamente sul vetrino da trattare. Lasciare agire sui vetrini fino a 30 minuti con agitazione.

Per la rivelazione enzimatica applicare il substrato. Non incubare oltre il tempo necessario (il controllo negativo deve restare negativo).

## Cromogeni per la β galattosidasi

***Xgal***

Il 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranoside (Xgal) è il substrato appropriato per l'identificazione della β galattosidasi espressa dal gene lac+. Esso produce un prodotto terminale blu nero permanente (20).

La reazione dovrebbe essere seguita al microscopio per valutarne l'intensità. Manipolare i substrati con attenzione, perché alcuni di essi sono potenzialmente carcinogeni. Montare in mezzi a base alcolica o gelatinosa a seconda della solubilità dei prodotti enzimatici. Non far essiccare le sezioni di tessuto in nessuno stadio di questo protocollo.

## La controcolorazione

La procedura usata per controcolorare e montare il campione dipende dalla soluzione di substrato utilizzata. Quelli trattati con cromogeni i cui prodotti terminali sono insolubili in alcol e solventi organici (DAB, Hanker-Yates ecc.), possono essere controcolorati con coloranti alcolici, disidratati e montati con mezzi di montaggio contenenti xilene o toluene. I substrati che danno invece prodotti di reazione solubili in alcol e solventi organici (AEC, cloronaftolo ecc.) non dovrebbero ovviamente essere decolorati in alcol acido né disidratati. Altre controcolorazioni possono essere utilizzate al posto dell'ematossilina, come per esempio il verde di metile che può conferire un contrasto maggiore alla colorazione di Hanker-Yates.

### Controcolorazione per prodotti terminali insolubili

Sciacquare delicatamente il vetrino con acqua da una bottiglia di lavaggio per rimuovere il substrato che non ha reagito. Deporre il vetrino su un rastrello di colorazione e applicare 4-6 gocce di ematossilina di Harris o immergere il vetrino direttamente in una vaschetta di colorazione contenente ematossilina di Harris e incubare per 5 minuti. Differenziare in alcol acido (acido cloridrico 0,5% in etanolo 70%) per 10 sec. Lavare bene il vetrino in acqua corrente per 3-4 minuti fino al viraggio al blu dell'ematossilina. L'intensità della controcolorazione può essere regolata aumentando o diminuendo il tempo di colorazione in ematossilina. Una colorazione troppo intensa può mascherare la positività della perossidasi.

### Controcolorazione per prodotti terminali solubili

Sciacquare delicatamente il vetrino con acqua da una bottiglia di lavaggio per rimuovere il substrato che non ha reagito. Applicare sul vetrino 4-6 gocce di ematossilina di Mayer o immergerlo direttamente in una vaschetta di colorazione e incubarlo per 5 minuti. Differenziare al blu l'ematossilina immergendo il vetrino in una soluzione di acqua-ammonio (2 ml di idrossido di ammonio concentrato 17M in 1 litro di acqua) per 10 volte. Sciacquare delicatamente in acqua di fonte per 5 minuti e far asciugare all'aria.

## I mezzi di montaggio

Per conservare il preparato sul vetrino portaoggetti bisogna fissare su di esso un vetrino coprioggetto. Sono disponibili alcune preparazioni a base di resina che, fungendo da collante, fanno aderire fermamente il coprioggetto al vetrino (quando essiccato). Un altro metodo consiste nel fissare il coprioggetto esternamente con smalto per unghie. Le resine di montaggio possono essere naturali, come il balsamo del Canada, o sintetiche ed hanno un indice di rifrazione molto vicino a quello del vetro. Quando si monta il preparato con il vetrino coprioggetto, si dovrebbe prendere la precauzione di evitare l'intrappolamento di bolle di aria. Un campione montato con cura manterrà la sua intensità di colorazione per molti anni. Un importante criterio di scelta del mezzo di montaggio è la solubilità del prodotto di reazione.

Nei preparati trattati con prodotti di reazione, o controcoloranti, solubili in alcol, la disidratazione e il montaggio con mezzi a base di xilene o toluene possono disciogliere i cromogeni; questi campioni dovrebbero essere dunque montati, ancora umidi, con un mezzo di montaggio a base acquosa o con la miscela gelatina-glicerolo di Kaiser facilmente reperibile in commercio.

I campioni i cui prodotti terminali sono insolubili in alcol possono essere disidratati con la scala decrescente degli alcoli, chiarificati in xilolo e montati con mezzi di montaggio contenenti xilene o toluene.

Il pH del mezzo di montaggio di campioni sottoposti ad immunofluorescenza dovrebbe essere quello al quale il fluorocromo manifesta la sua massima luminosità. Per il FITC questo pH è 8,5. La velocità di decadimento della fluorescenza si riduce notevolmente quando il campione, montato in un mezzo a base alcolica, è conservato a 4°C al buio. I mezzi di montaggio a base di polivinil alcol, tra cui Elvanol 51-05 o Miwiol 4-88, hanno il vantaggio di solidificare rapidamente e non richiedono l'aggiunta di un vetrino coprioggetto per proteggere il preparato; essi dovrebbero essere evitati soprattutto con prodotti terminali cromogeni come AEC suscettibile alla ossidazione, perché possono scolorire il preparato dopo un certo periodo di tempo.

# Accorgimenti per un risultato ottimale

## I vetrini per immunoistochimica

L'aderenza delle sezioni sul vetrino risulta molto importante soprattutto se la rivelazione prevede numerose incubazioni e relativi lavaggi. Per prevenire il rischio che le frequenti manipolazioni possano provocare il distacco e la perdita del materiale, numerose soluzioni di adesivi per vetrini sono disponibili in commercio o possono essere preparate in laboratorio. Uno dei metodi migliori e più semplici per far aderire le sezioni al vetrino è una accurata essiccazione. Ponendo i vetrini in una stufa a 60°C per 30 minuti la paraffina si scioglierà e permetterà uno stretto contatto tra il tessuto e il vetrino. Questo importante passaggio dovrebbe essere effettuato anche quando vengono utilizzano adesivi chimici. Tra gli adesivi più comunemente usati, ci sono la gelatina 0,75-1% in acqua distillata, l'Elmer's glue 0,5% in acqua distillata a 60°C e la poli-L-lisina (P.M. 150.000-300.000) 1 mg/ml. Tutti i suddetti preparati vanno conservati a -20°C ed utilizzati in piccole gocce che vanno poste su una estremità del vetrino e poi distribuite uniformemente. I vetrini rivestiti non possono essere conservati per più di una settimana.

L'albumina di Mayer si prepara mescolando bene un albume d'uovo e un ugual volume di glicerina, con l'aggiunta di un cristallo di timolo per prevenire la crescita batterica, e filtrando attraverso una carta da filtro a grana grossa. Si conserva a 4°C. Per l'uso porre una piccola goccia su una estremità del vetrino, strisciare, raccogliere le sezioni ed essiccare i vetrini in una stufa a 60°C per 30 minuti per consentire la coagulazione dell'albumina d'uovo che permetterà l'adesione del campione al vetrino. Questo adesivo non dovrebbe essere utilizzato per campioni da sottoporre a digestione enzimatica.

Un eccellente adesivo spesso utilizzato per assicurare l'aderenza delle sezioni durante la digestione enzimatica è la miscela di gelatina e cromallume, che si prepara sciogliendo in un litro di acqua distillata a 60°C 3,0 gr di gelatina con l'aggiunta, dopo il completo scioglimento, di 0,5 gr di cromo potassio solfato (cromallume). La soluzione apparirà di colore blu. Aggiungere diversi cristalli di timolo. Continuare ad agitare fino a che l'allume e il timolo sono sciolti completamente. Filtrare ancora calda una piccola porzione della soluzione in un beker da 100 ml e porvi diversi vetrini, uno alla volta. Mantenere il beker sempre pieno per 3/4 aggiungendo la soluzione stock calda. I vetrini, tamponati sul bordo con carta bibula ed essiccati in stufa in posizione verticale, si conservano completamente asciutti in una scatola portavetrini a temperatura ambiente.

Gli adesivi tissutali possono anche essere aggiunti al bagno di acqua utilizzato per raccogliere le sezioni di tessuto ma questo dovrebbe essere pulito accuratamente dopo ciascun uso per prevenire la frequente crescita batterica.

Il legame covalente delle sezioni al vetrino è raccomandato per le sezioni di tessuto connettivo. Tutti gli adesivi tissutali dovrebbero essere usati con parsimonia. I vetrini dovrebbero essere rivestiti con uno strato sottile di adesivo e l'eccesso dovrebbe essere eliminato poiché può causare un legame aspecifico di proteine al campione e quindi una colorazione simile a quella prodotta da una cattiva rimozione del mezzo di inclusione.

I vetrini a carica elettrostatica forniscono una superficie fortemente adesiva per tessuti e cellule senza i problemi associati con i vetrini rivestiti con adesivi. Essi prevengono il distacco del tessuto durante pretrattamenti energici come la digestione enzimatica o il trattamento con forno a microonde.

## Le diluizioni dei reagenti

La concentrazione di uno specifico anticorpo per millilitro di soluzione è chiamata titolo anticorpale. Più elevato è il titolo anticorpale e più elevata sarà la diluizione da utilizzare. Per raggiungere risultati significativi, gli anticorpi devono essere usati diluiti in maniera ottimale per un appropriato tempo di incubazione. Se un anticorpo ad una determinata concentrazione causa una intensa colorazione di fondo, dovrebbe essere ulteriormente diluito. Questo fenomeno è frequente quando si utilizzano sieri interi nei quali, oltre all'anticorpo specifico, sono spesso presenti altre proteine varie che possono legarsi in maniera aspecifica ai componenti del tessuto. I sieri sono spesso usati a diluizioni relativamente basse in cui le proteine aspecifiche risultano piuttosto concentrate mentre esse, per non interferire, dovrebbero essere fortemente diluite. Le diluizioni ideali di ogni anticorpo dipendono da vari fattori e devono essere determinate dalle condizioni di ciascun laboratorio. Se ad una certa concentrazione di anticorpo si effettua un'incubazione di 5-10 minuti a 37°C, alla stessa temperatura, allungando il tempo di incubazione a 20 minuti, l'anticorpo può essere usato più diluito. Aumentando il tempo ad un'ora, la diluizione potrà essere ancora più elevata.

La scelta di un tampone di diluizione, l'uso di una camera umida, la fissazione del campione e il protocollo di processazione, interferiranno con la diluizione usata. La concentrazione degli antigeni e degli anticorpi è critica per il completamento della reazione. Se la concentrazione dell'anticorpo è troppo elevata rispetto all'antigene disponibile, si avrà un ridotto legame con l'anticorpo e un risultato negativo non sarà dovuto alla mancanza di

antigene ma ad un eccesso di anticorpo. Perciò quando si prova un nuovo anticorpo si dovrebbe utilizzare un ampio ambito di diluizioni per evitare risultati falsi negativi causati da questo effetto.

Nel metodo diretto si deve valutare l'efficacia di un solo anticorpo. Cinque campioni identici di cui si conosce la positività sono incubati con una serie di diluizioni anticorpali come p. es: 1:5; 1:10; 1:20; 1:40; il quinto campione, incubato con una soluzione priva di anticorpo, serve da controllo negativo. Una colorazione positiva in quest'ultimo campione non sarà dovuta alla localizzazione dell'antigene ma ad un legame non specifico di cui andrà tenuto conto nella valutazione dei risultati.

Nel metodo indiretto la diluizione ottimale deve essere determinata per ciascuno degli anticorpi utilizzati usando un pannello di titolazione (Tab. 2).

Ne risultano nove possibili combinazioni di colorazione. La combinazione ottimale di diluizione sarà rappresentata dal vetrino con la colorazione specifica più intensa e l'intensità di fondo più bassa. Nel metodo con immunocomplessi vengono utilizzati tre anticorpi; la determinazione della diluizione ottimale risulta quindi più difficoltosa. Poiché la concentrazione dell'anticorpo ponte e quella dell'immunocomplesso sono interdipendenti, il pannello di diluizione può essere allestito mantenendo costante la concentrazione dell'anticorpo primario, p. es. secondo i suggerimenti dalla casa produttrice; una volta messa a punto la giusta combinazione di diluizione dell'anticorpo ponte e dell'immunocomplesso, variare la concentrazione del primario lasciando costante la combinazione ottimale del sistema anticorpo ponte-immunocomplesso (Tab. 3).

I risultati di questi test hanno validità solo se le diluizioni sono accurate e riproducibili (21). Gli anticorpi coniugati ed i complessi sono sensibili al deterioramento, quindi dovrebbero essere conservati secondo le istruzioni della ditta produttrice e non essere mai utilizzati dopo la data di scadenza.

| anticorpo secondario | **Anticorpo primario** | | |
|---|---|---|---|
| | 1:50 | 1:100 | 1:150 |
| 1:20<br>1:40<br>1:60 | | | |

***Tabella 2. Schema di diluizione degli anticorpi primario e secondario nel metodo di rivelazione indiretto.***

| **anticorpo ponte** | **Immunocomplesso** | | |
|---|---|---|---|
| | 1:100 | 1:150 | 1:200 |
| 1:40<br>1:60<br>1:80<br>1:100 | | | |

***Tabella 3. Schema di diluizione dell'anticorpo ponte dell'immunocomplesso nel metodo di rivelazione con immunocomplessi.***

Pipette regolabili di qualità e capacità appropriata permettono maggior flessibilità nelle varie diluizioni. Il volume della soluzione da preparare dipende dalla dimensione e dal numero dei campioni che devono essere colorati. Un volume minimo di 0,2 ml è sufficiente a coprire una sezione di ipofisi o un piccolo linfonodo. Strisci o sezioni di tessuti più grandi richiedono circa 0,4 ml di soluzione. Quando si provano varie diluizioni di anticorpo, si dovrebbero preparare solo piccole quantità di soluzione per evitare spreco di reagente. E' spesso utile preparare una soluzione stock 1:100, aggiungendo 10 µl di anticorpo a 1 ml di tampone, e allestire da essa ulteriori diluizioni. Una volta determinata la corretta diluizione possono essere preparati volumi maggiori di soluzione stock. Questo accorgimento evita la preparazione di grandi volumi di soluzioni anticorpali altamente diluite, che possono decadere e causare sprechi di reagenti costosi.

## Tempi di incubazione

Il tempo di incubazione, la concentrazione degli anticorpi, la colorazione di fondo e l'intensità di colorazione specifica sono tutti parametri intercorrelati che dovrebbero essere esaminati insieme. Più lungo è il tempo di incubazione e più elevata sarà la diluizione richiesta per l'anticorpo. Più diluito sarà l'anticorpo e più bassa sarà la colorazione non specifica. Una ridotta colorazione di fondo darà maggior contrasto alla colorazione specifica rendendo più facile l'interpretazione. L'incubazione consigliata per molti anticorpi è di 20-30 minuti. Se, per diminuire l'interferenza del fondo, si effettua una diluizione più elevata dell'anticorpo primario, i tempi di incubazione dovranno essere aumentati a un'ora.

Spesso i tumori scarsamente differenziati o metastatici si colorano meno intensamente dei tessuti normali. Poiché un tempo di incubazione di 20 minuti a temperatura ambiente può dar luogo ad una colorazione debole o negativa, una incubazione a 37°C, mantenendo costanti la diluizione e il tempo di incubazione, aumenterà l'intensità di colorazione rispetto a quella ottenuta a temperatura ambiente. La temperatura di incubazione agirà sulla diluizione dell'anticorpo. Mantenendo costanti la temperatura e i tempi di incubazione, potrà essere aumentata la diluizione dell'anticorpo. La temperatura ottimale per il legame dell'anticorpo è quella della temperatura corporea. Una temperatura d'incubazione superiore a 37°C può causare denaturazione delle proteine anticorpali e può aumentare il rischio di evaporazione e quindi di essiccazione del campione. Una temperatura più bassa richiede un tempo di incubazione più elevato e una diluizione maggiore dell'anticorpo. L'incubazione di un campione in frigorifero (4°C) per una notte (approssimativamente 18 ore) produrrà meno colorazione di fondo e una colorazione specifica più intensa con una elevata diluizione dell'anticorpo primario. La colorazione eseguita a temperature di 37°C richiede maggiori concentrazioni di anticorpo ma permette tempi di incubazione più brevi. Alle stesse diluizioni di anticorpo, una incubazione di 20 minuti a temperatura ambiente, con opportune precauzioni, può essere abbreviata fino a 5 minuti a 37°C.

Tutte le incubazioni dovrebbero essere effettuate in una camera umida, per evitare variazioni dei piccoli volumi delle diluizioni impiegate; l'evaporazione dei preparati dovrebbe inoltre essere controllata periodicamente. Con tempi di incubazione ridotti, i vetrini dovrebbero essere processati in modo che tutti i campioni abbiano tempi di incubazione identici. Quando si processano molti vetrini contemporaneamente, tra l'aggiunta di anticorpo sul primo vetrino e quella sull'ultimo possono trascorrere anche uno-due minuti che, in una incubazione di 20 minuti, costituiscono una differenza anche del 5%. Per una incubazione di 5 minuti, un minuto rappresenta una differenza del 20%, mentre se il primo vetrino viene incubato per quattro minuti e l'ultimo per 6 minuti, la differenza sale addirittura al 40%. Per evitare risultati falsi negativi, un campione di controllo positivo dovrebbe sempre essere processato insieme al campioni da saggiare. Se il controllo non si colora, il test andrà ripetuto perché ogni vetrino che risulta negativo può essere un falso negativo. Come test addizionale, tutti i campioni che non mostrano colorazione dopo una incubazione di 5 minuti dovrebbero essere processati ad un tempo di incubazione di 20 minuti. I tempi di incubazione di 20 minuti a temperatura ambiente non sono critici e possono essere allungati o abbreviati di pochi minuti senza compromettere la colorazione. La quantità di tempo in cui un campione rimane in tampone è meno critica. Sebbene i tempi consigliati siano di 10 minuti, i bagni di lavaggio possono essere abbreviati o allungati secondo le esigenze. Infatti, se per qualche

ragione la procedura di colorazione deve essere interrotta, i vetrini possono essere tenuti in tampone per diverse ore o per diversi giorni senza compromettere l'intensità del risultato finale. Anche il numero di cambi del tampone è variabile a seconda del numero di vetrini e la grandezza della vaschetta di colorazione. Un lavaggio di 10 minuti può essere utilmente sostituito da tre lavaggi di tre minuti ciascuno.

## Vetrini di controllo

In ogni tecnica di colorazione sono essenziali alcuni controlli della procedura e dei reagenti per assicurare l'accuratezza dei risultati. Molti controlli si accentrano intorno all'anticorpo primario affinché la colorazione positiva sia il risultato del suo legame specifico con il relativo antigene. Dopo aver determinato la diluizione e il tempo di incubazione ottimale di un nuovo anticorpo primario, per verificarne la specificità, insieme con i campioni da testare, devono essere processati in modo identico campioni di tessuto di cui è conosciuta con certezza l'espressione o l'assenza di un determinato antigene; questi ultimi campioni fungeranno rispettivamente da controllo positivo e controllo negativo.

Un controllo moderatamente positivo sarà più sensibile alle variazioni di prestazione del metodo e risulterà più valido rispetto ad un controllo che si colora sempre intensamente.

Un metodo per testare la specificità anticorpale è quello di sostituire l'anticorpo primario con una diluizione identica di siero non immune della stessa specie animale. Esso conterrà tutti gli altri anticorpi e le proteine normalmente presenti nell'antisiero di quella specie eccetto l'anticorpo specifico e servirà come controllo sostitutivo da usare come "blank". Ogni colorazione osservata con il siero non immune non è dovuta alla localizzazione dell'antigene da parte dell'anticorpo ma a legami proteici aspecifici, ad attività della perossidasi endogena oppure a legami non specifici di altri reagenti anticorpali. Al contrario, un risultato negativo dimostra che la positività sul vetrino incubato con l'anticorpo non dipende da alcun componente nell'antisiero. Se il siero non immune non è disponibile, per il controllo sostitutivo può essere usato il semplice tampone di diluizione. In tal caso, ogni colorazione osservata sarà dovuta o all'attività della perossidasi endogena o al legame di un altro reagente anticorpale al campione; il vetrino di controllo non rivelerà ulteriori legami non specifici dei componenti del siero animale al tessuto. Una volta dimostrata la specificità dell'anticorpo primario mediante test su campioni noti, positivi e negativi, e mediante sostituzione con siero non immune, esso può essere utilizzato nelle procedure di routine.

E' importante che i campioni di controllo siano sottoposti alla stessa fissazione e processazione del campione da testare. In tal modo una mancata colorazione del campione, non può essere imputabile a fissazione impropria.

## Lavaggio dei vetrini

Particolare attenzione deve essere posta nella manipolazione dei vetrini per evitare la perdita del campione. Per rimuovere l'anticorpo che non ha reagito, i vetrini dovrebbero essere sciacquati accuratamente dopo ciascuna incubazione utilizzando una bottiglia di lavaggio riempita con un appropriato tampone. Il tampone non deve essere spruzzato direttamente sul campione ma piuttosto lasciato scorrere delicatamente su di esso (Fig. 9).

I vetrini dovrebbero essere poi posti in un bagno con lo stesso tampone per completare il processo di risciacquo. Dopo la rimozione dei vetrini dal bagno di lavaggio, dal campione dovrebbe essere scartato più liquido possibile avendo cura di lasciare su di esso una piccola quantità di liquido per evitare sia la completa essiccazione, sia una eccessiva diluizione del reagente successivo con conseguente diminuzione nella intensità di colorazione. Comunque si dovrebbe evitare di far essiccare troppo le sezioni perché l'eventuale formazione di cristalli di sali precipitati provoca fenomeni di colorazio-

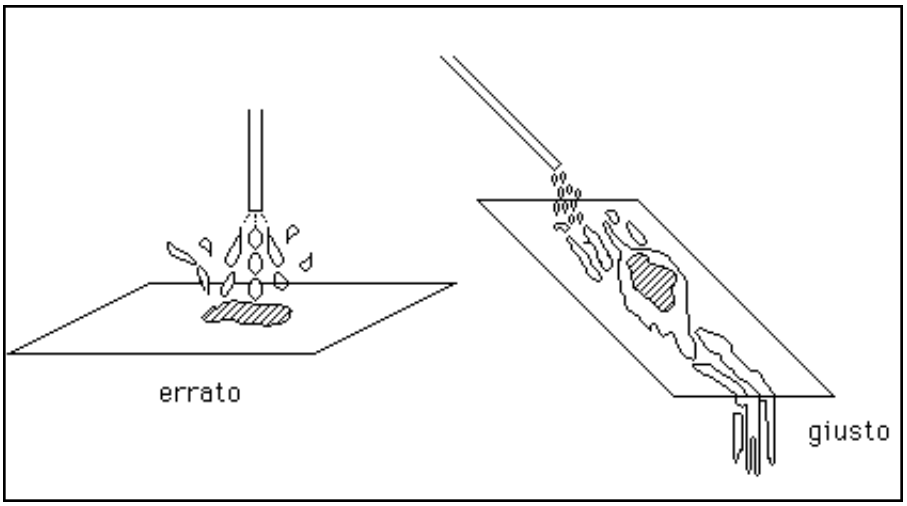



***Figura 9. Modalità errata e corretta di effettuare il lavaggio dei vetrini con tampone.***

ne non specifica. Inoltre una essiccazione ripetuta del campione causerà morfologia scadente e una colorazione non interpretabile.

Di conseguenza, quando si processa un gran numero di campioni, soltanto 3-5 vetrini devono essere asciugati contemporaneamente prima di applicare la soluzione appropriata. Questa procedura dovrebbe essere seguita accuratamente usando carta bibula opportunamente piegata evitando di toccare il campione per non danneggiarlo o provocarne la perdita (Fig. 10). Quando si asciuga l'eccesso di liquido, dovrebbero essere processati soltanto pochi vetrini per volta. Dopo la rimozione del tampone in eccesso, i vetrini sono adagiati in posizione orizzontale con il campione rivolto verso l'alto. Abbastanza gocce di reagente sono applicate per coprire completamente il campione senza inondarlo (Fig. 11). Per evitare l'evaporazione, in laboratori ventilati il vetrino dovrebbe essere posto in camera umida ed i reagenti dovrebbero essere applicati in quantità sufficiente.

Esistono camere di colorazione appositamente progettate, ma esse possono essere allestite semplicemente in laboratorio usando i contenitori di plastica per cibi con coperchi ermetici che sono disponibili in un'ampia varietà di dimensioni. In alternativa si può porre una carta assorbente inumidita lungo il bordo di un largo vassoio piano e, dopo aver applicato la soluzione di anticorpo sui vetrini, coprire il vassoio con un foglio di alluminio, un libro o un pezzo di legno per il tempo di incubazione richiesto (Fig. 12). Prima di cominciare il processo di colorazione, il campione do-

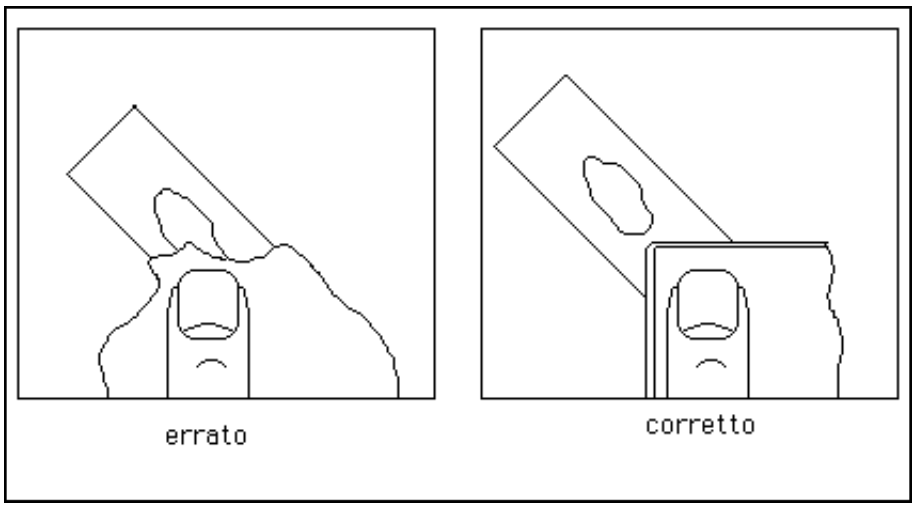



***Figura 10. Modalità errata e corretta di asciugatura dei vetrini con carta o tessuto assorbente.***

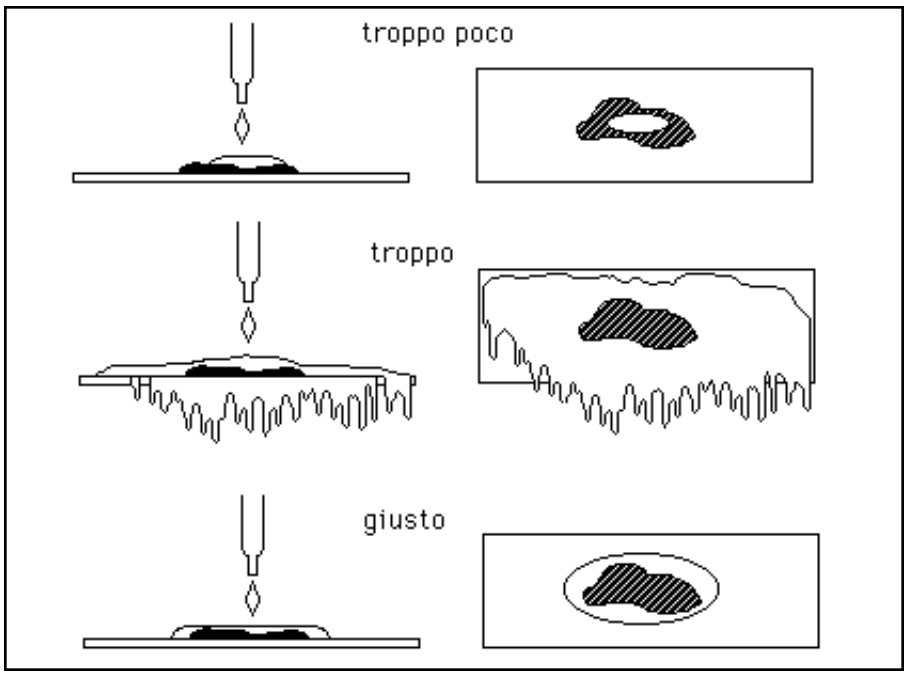



***Figura 11. Modalità di applicazione dei reagenti sul preparato posto sul vetrino.***

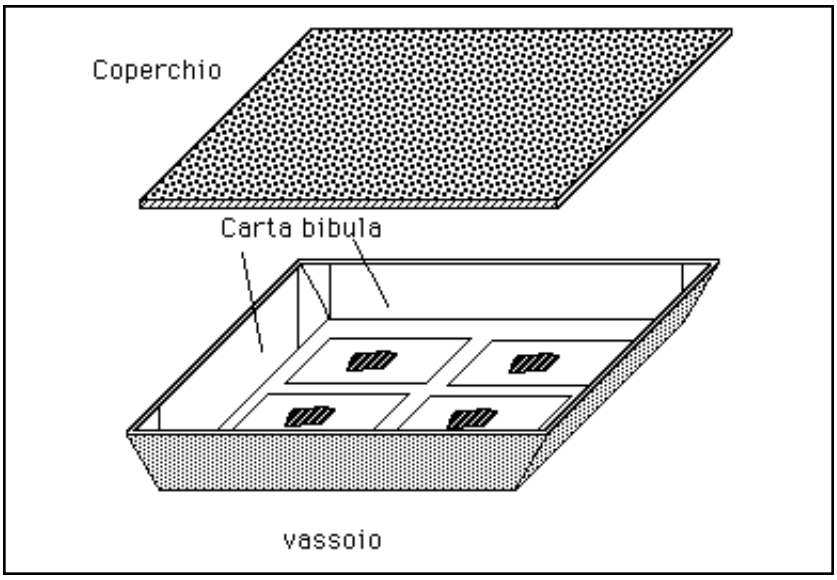



***Figura 12. Camera umida facilmente approntabile in laboratorio.***

vrebbe essere circoscritto con un segno indelebile e i vetrini contrassegnati con la sigla dell'antigene da localizzare. Circoscrivere i campioni è utile perché essi, in particolare gli strisci cellulari, non sono sempre chiaramente visibili una volta reidratati. Inoltre la soluzione di anticorpo può essere applicata facilmente nell'area circoscritta che serve anche come guida quando si asciuga l'eccesso di liquido per impedire che il campione venga accidentalmente rimosso. Essa crea una tensione superficiale che agisce come barriera e mantiene la soluzione di anticorpo sul campione prevenendone la diffusione sul vetrino. Il metodo più efficace di circoscrivere il campione è una matita di diamante. Il segno di pennarelli e pastelli a cera spesso viene lavato via durante la procedura.

## Tamponi

Numerosi tamponi possono essere usati come diluenti, tamponi di lavaggio e di risciacquo. I più comuni sono il Tris 0,05M pH 7,6, il PBS che può essere preparato con varie combinazioni di molarità e di pH e la soluzione salina fisiologica (0,9%) che può essere preparata velocemente e facilmente. Questi tre principali tamponi sono anche usati in combinazione come diluizione 1:10 di Tris in soluzione fisiologica o Tris in PBS. L'aggiunta di soluzione fisiologica o PBS al Tris conferisce ad esso una maggior concentrazione di sali riducendo il legame non specifico e quindi la colorazione di fondo. Come tampone di lavaggio può essere raccomandato PBS o Tris-HCl.

Come tamponi di diluizione possono essere raccomandati il PBS o il Tris-HCl con l'aggiunta di una proteina (p. es. ovoalbumina 0,1-1,5%) o di un siero non immune per bloccare o stabilizzare la soluzione di Ab, riducendo l'aderenza dell'Ab alla plastica o al vetro, o detergenti (p. es. Tween-20 0,1% Triton X-100 0,2-1%) per favorire la penetrazione dell'anticorpo, tenendo presente che i detergenti influiscono sulla morfologia del tessuto e sul legame di anticorpi a bassa affinità.

Nella scelta di un tampone è importante considerare se esso contenga o meno azide ($NaN_3$), un agente antibatterico spesso impiegato come conservante in tamponi commerciali. Ad elevate concentrazioni l'azide sodica può prevenire il legame dell'enzima perossidasi al suo substrato ed inibire così lo sviluppo della reazione. Quindi in presenza di azide sodica, la positività sarà debole o assente. Pertanto nella colorazione con la perossidasi tutti i tamponi usati per le diluizioni e i lavaggi non dovrebbero contenere azide. Inoltre si raccomanda di usare Tris invece di PBS. Molti anticorpi non diluiti contengono modeste quantità di azide per prevenire la contaminazione batterica ma dopo la diluizione i livelli si riducono al punto da non

interferire. L'effetto inibitorio dell'azide sodica sulla reazione del substrato avviene mediante inibizione competitiva. L'azide sodica è anch'essa un substrato dell'enzima perossidasi e compete con il perossido di idrogeno nella formazione di complessi enzima-substrato. La perossidasi ha un'affinità superiore per l'azide sodica e si legherà preferenzialmente ad essa rispetto al perossido di idrogeno. Comunque la reazione si fermerà a questo punto poiché il complesso azide-perossidasi non può reagire con il donatore di elettroni per formare un prodotto terminale colorato. Quando possibile, l'utilizzatore dovrebbe preparare da solo i propri tamponi senza azide sodica. I tamponi disponibili in commercio hanno l'azide sodica citata nell'etichetta, se essa è presente. Il contenuto di azide in un tampone acquistato o proveniente da altri laboratori dovrebbe essere verificato prima dell'uso e non dovrebbe superare la concentrazione dello 0,02-0,1%.

## Blocco delle reazioni non specifiche

### Saturazione dei siti di legame aspecifici

Una colorazione positiva del campione che non deriva dal legame antigene-anticorpo è denominata colorazione di fondo non specifica. La causa più comune è l'adesione delle proteine al collagene e agli elementi a carica elevata del tessuto connettivo del campione. Il legame non specifico può risultare dalle interazioni idrofobiche o elettrostatiche tra l'anticorpo e i componenti del tessuto. I siti di legame non specifici possono essere bloccati da proteine che ne impediscono il legame con l'enzima coniugato mediante incubazione per 30 minuti in camera umida. Se la prima soluzione proteica applicata al campione è l'anticorpo primario, esso può essere adsorbito in maniera aspecifica a questi siti carichi. L'anticorpo secondario può poi legarsi all'anticorpo primario e la reazione può risultare positiva. La colorazione positiva di questi siti però non è dovuta alla localizzazione dell'antigene tissutale ma al legame non specifico dell'anticorpo al collagene e al tessuto connettivo. Il modo più efficace per prevenire questa colorazione non specifica è quella di esporre il campione ad una soluzione proteica inerte prima di applicare l'anticorpo primario. La proteina inerte saturerà i siti carichi e non lascerà spazio per l'adsorbimento dell'anticorpo primario. Le soluzioni proteiche inerti più comunemente consigliate sono il siero di vitello (FCS), la siero albumina bovina (BSA), o il siero non immune, puro o diluito fino a 1/50 in Tris-HCl 0,05 M pH 7,6, proveniente dalla stessa specie animale che ha prodotto l'anticorpo secondario.

Questo accorgimento evita la colorazione positiva dovuta al legame dell'anticorpo secondario ai componenti della soluzione proteica. Il siero non immune è utilizzato a diluizioni da 1:5 a 1:20. Il siero non immune viene lasciato agire per 10-20 minuti. Se la colorazione di fondo persiste dovrebbe essere utilizzata una soluzione più concentrata di siero non immune. Può essere di aiuto l'aggiunta di siero albumina bovina 2-5% (BSA) al siero non immune. Essa aumenterà la concentrazione proteica e ridurrà ulteriormente la colorazione non specifica. Si raccomanda di lasciare la proteina bloccante sul vetrino, per 20-30 minuti a temperatura ambiente o 37°C. Una concentrazione più elevata di sali nelle soluzioni tampone come l'uso di Tris:soluzione fisiologica 1:10 aiuterà a ridurre il legame non specifico. Attenzione particolare dovrebbe essere posta nel rimuovere l'eccesso di siero non immune avendo cura che resti soltanto un sottile strato del siero, spesso viscoso, a ricoprire il tessuto. L'eccesso di tampone o di siero non immune lasciato sul campione diluirà le soluzioni di anticorpo applicato successivamente causando una debole reazione.

I vetrini **non** dovrebbero essere risciacquati con tampone subito dopo l'incubazione con la proteina bloccante. Lavare via il siero può esporre di nuovo i siti che possono legare l'anticorpo primario in maniera aspecifica, provocando una colorazione di fondo.

Non tutti i campioni possiedono un apprezzabile legame non specifico. Nei campioni più poveri di legame aspecifico l'incubazione con siero non immune può essere eliminata. E' importante che il siero usato per bloccare il legame non specifico non presenti alcuna evidenza di emolisi. Quando le cellule rosse del sangue scoppiano (emolisi), esse rilasciano il loro contenuto in forma solubile. Sebbene le cellule vengano successivamente separate dal siero, i prodotti solubili derivanti dalla rottura degli eritrociti contengono enzimi che possono reagire con il substrato della perossidasi. Poiché l'attività della perossidasi endogena legata a cellule viene soppressa prima dell'incubazione con il siero (vedi oltre), ne risulterà una colorazione positiva non-antigene specifica. Tutti i sieri usati nelle tecniche di immunoistochimica dovrebbero essere saggiati accuratamente per assicurarsi che non presentino tracce di emolisi.

## Blocco degli enzimi endogeni

Gli enzimi endogeni presenti nel tessuto danno luogo ad una colorazione non specifica e non causata dal legame Ag-Ab se come sistema di rivelazione viene usato un enzima identico. Infatti, la reazione substrato-cromogeno utilizzata non può distinguere tra l'enzima che fa parte del sistema sperimentale che localizza immunologicamente l'antigene cellulare ed una attività enzimatica simile presente nel campione prima della colorazione.

***Blocco della perossidasi endogena***

L'attività della perossidasi endogena è confinata prevalentemente nelle cellule di sangue, fegato, milza, utero, ghiandole lacrimali, mucosa intestinale, polmone. Sono numerose le tecniche che è possibile utilizzare per inibire irreversibilmente la perossidasi endogena prima della procedura di colorazione. Nelle sezioni di tessuto (deparaffinate e reidratate se si tratta di sezioni in paraffina, e semplicemente fissate se si tratta di criosezioni), l'inibizione è possibile mediante la pre-incubazione delle sezioni prima della aggiunta dell'Ab primario con perossido di idrogeno ($H_2O_2$) 0,03-0,3% in PBS o in acqua o ancora in metanolo. La tecnica più veloce è quella di porre da 4 a 6 gocce di perossido di idrogeno al 3% direttamente sul campione ed incubare per 5-30 minuti prima di risciacquare. Un eccesso di substrato, infatti, può inibire irreversibilmente un enzima a causa di un fenomeno di cinetica enzimatica chiamato inibizione da substrato.

Si raccomanda di usare la concentrazione più bassa di $H_2O_2$ che risulti capace di inibire l'attività delle perossidasi endogene. Una concentrazione superiore al 2% può infatti iniziare a danneggiare la morfologia del tessuto. La concentrazione di perossido di idrogeno del 3%, che rappresenta un eccesso di substrato pari a 100 volte rispetto alla quantità richiesta per la reazione, è una quantità sufficiente ad inibire irreversibilmente l'enzima. I campioni contenenti un gran numero di cellule del sangue come i citocentrifugati, gli strisci di sangue e le sezioni congelate incluse in OCT mostreranno una violenta reazione con il perossido di idrogeno a causa della gran quantità di attività perossidasica presente. Il forte sviluppo di ossigeno libero (formazione di bollicine o effervescenza) che si verifica, può danneggiare la morfologia cellulare; quindi questi campioni devono essere trattati diversamente. Essi dovrebbero essere posti per 20 minuti in un bagno di 4 parti di metanolo assoluto e 1 parte di perossido di idrogeno 3% preparato fresco subito prima dell'uso. Al posto di perossido di idrogeno e metanolo possono essere utilizzate varie altre soluzioni con effetti analoghi. I vetrini possono essere posti per 15 minuti in un bagno di 100 ml di etanolo assoluto contenente 0,2 ml di acido cloridrico concentrato oppure in un bagno di metanolo con nitroferricianuro di sodio 1% e acido acetico 0,2%. Procedure leggermente più lunghe prevedono l'incubazione dei vetrini in fenil-idrazina 0,1% per un'ora a 37°C o l'incubazione con acido periodico 0,01% per 10 minuti seguita da quella con una soluzione di 0,1 mg di potassio boroidruro in 1 ml di acqua per 10 minuti per ridurre ogni aldeide prodotta dall'acido periodico. Per le sezioni in paraffina si consiglia il metodo descritto da Heyderman: incubazione in $H_2O_2$ al 6% in acqua distillata, lavaggio seguito da incubazione di acido periodico 2,5% in acqua distillata, lavaggio, blocco dei gruppi aldeidici con potassio boroidruro 0,02% in acqua distillata.

Se l'attività della perossidasi endogena persiste, si dovrà riprovare il trattamento aumentando il tempo di incubazione o si dovrà utilizzare una

diversa procedura di inattivazione. Si raccomanda comunque un accurato lavaggio dei tessuti ricchi di sangue prima dell'inclusione.

Molti tessuti non contengono una gran quantità di cellule ematiche o di perossidasi endogena, per cui l'attività perossidasica endogena risulta usualmente confinata ai vasi sanguigni. In questi campioni l'incubazione con perossido di idrogeno può essere omessa ma, in tal caso, interpretando i risultati di colorazione, si dovrà tener conto della procedura effettivamente svolta. In campioni ricchi di cellule ematiche, come midollo osseo, placenta e milza, la rimozione della perossidasi endogena è essenziale per una interpretazione corretta. Questi campioni sono utili anche come controllo per valutare l'efficacia di nuovi lotti di perossido di idrogeno nella inattivazione della perossidasi endogena.

***Blocco della fosfatasi alcalina endogena***

La fosfatasi alcalina (AP) si ritrova in elevate concentrazioni nella mucosa intestinale, placenta, rene, fegato, milza. Il blocco è possibile mediante l'aggiunta di levamisole 1 mM al substrato.

Gli isoenzimi intestinali e placentali sono bloccati dal trattamento delle sezioni prima della colorazione mediante incubazione in acido acetico 20% per 15 minuti a 4°C o acido periodico 2,3% per 5 minuti seguito da potassio boroidruro 0,02% per 2 minuti.

## Riesposizione di antigeni celati

Per molto tempo l'identificazione degli antigeni su sezioni di routine è stata fortemente limitata dagli effetti dei fissativi sulle componenti proteiche e glicoproteiche (22) (23). Una iperfissazione dei campioni di tessuto in formalina può mascherare fortemente gli antigeni tissutali (24) e può impedire la loro localizzazione da parte dell'anticorpo primario sia a causa dell'alterazione delle strutture molecolari che dell'instaurarsi di legami fra gruppi specifici come la formazione di un eccesso di legami aldeidici e di ponti metilenici (25). Ciò rendeva spesso necessario il ricorso alle sezioni criostatiche. Tuttavia tale approccio appariva limitato dalla disponibilità di materiale criopreservato; inoltre il dettaglio citologico delle sezioni criostatiche, e quindi le possibilità interpretative, risultavano di gran lunga inferiori rispetto a quanto offerto dalle sezioni ottenute da campioni tissutali trattati con le metodiche di routine (26).

## Uso di enzimi proteolitici

Un mezzo per superare queste limitazioni e smascherare i siti antigenici celati è stato l'impiego di enzimi proteolitici volti a digerire i legami aldeidici istituiti nel corso dei processi di fissazione, consentendo così la disponibilità di un maggior numero di siti combinatori per gli anticorpi utilizzati nelle indagini immunoistochimiche (27). L'enzima più comunemente usato è la tripsina. Esso è il meno distruttivo per il tessuto e la sua reazione può essere facilmente controllata (28). Altri enzimi proteolitici spesso usati sono la pronasi P e la pronasi E (anche indicata come proteasi XIV) allo 0,1% in Tris 0,5M, pH 7,5 e la pepsina 0,4% in acido cloridrico 0,01N.

Queste soluzioni vengono preparate e utilizzate allo stesso modo della tripsina. E' fondamentale che anche controlli positivi e negativi noti siano sottoposti a digestione enzimatica per evitare problemi di interpretazione. Il tempo di digestione può variare in funzione delle condizioni del campione e dell'enzima usato. Una digestione eccessiva può danneggiare il tessuto, perciò i tempi di incubazione dovrebbero essere più brevi possibile (29). Per assicurare la completa esposizione di tutte le sezioni alla soluzione enzimatica, non più di 5 vetrini dovrebbero essere posti in un volume di 250 ml. I vetrini dovrebbero restare ben separati e la soluzione agitata delicatamente durante la procedura. Per una attività ottimale della tripsina, come di molti altri enzimi, le incubazioni dovrebbero essere effettuate a determinati valori di temperatura e di pH (30) ponendo i contenitori delle varie soluzioni in un bagno d'acqua a 37°C oppure usando tamponi o vetrini preriscaldati. Temperature al di sotto di 37°C ridurranno l'attività dell'enzima.

I limiti del trattamento enzimatico sono rappresentati dalla definizione della concentrazione ottimale del reagente e dal rispetto rigoroso dei tempi e della temperatura di esposizione a questo, pena la irriproducibilità dei risultati (31).

La digestione con enzimi proteolitici deve essere controllata accuratamente per evitare danni ai tessuti o la distruzione dell'antigene. Essa dovrebbe essere usata solo quando è assolutamente necessaria e non per cercare di ovviare ad una fissazione inappropriata. Quando gli enzimi digeriscono i legami aldeidici spesso causano il distacco e la perdita delle sezioni di tessuto dal vetrino. Si dovrebbero usare quindi vetrini a carica elettrostatica o trattati con un adesivo resistente alla digestione come la gelatina cromo allume. Per maggior sicurezza è bene inoltre processare due o tre vetrini in più nello stesso tempo, perché anche se una o due sezioni andranno perdute, la procedura potrà ancora essere completata.

***Trattamento proteolitico con tripsina***

Ricoprire le sezioni deparaffinate con 150 µl di tripsina 0,1% in $CaCl_2$ 0,1% pH 7,8 e incubare in camera umida a temperatura ambiente o a 37°C per 20-30 minuti. Il tempo ottimale di incubazione dipende dalla durata della fissazione in formalina. Trasferire i vetrini nel tampone comunemente usato per l'immunoistochimica (Tris o PBS) e procedere come di consueto.

***Trattamento proteolitico con pronase***

Ricoprire le sezioni reidratate con 150 µl di pronase 0,05% in tampone Tris e incubare a temperatura ambiente per 5-10 minuti in camera umida (32). Il tempo ottimale di incubazione dipende dalla durata della fissazione in formalina. Trasferire i vetrini nel tampone (Tris o PBS) e procedere come di consueto.

## Uso delle alte temperature

A partire dall'inizio degli anni 90 sono stati descritti numerosi approcci, tutti estremamente efficaci, per la riesposizione di antigeni mascherati dalla fissazione e basati sulla esposizione delle sezioni ad alte temperature per tempi limitati (33). Le fonti di calore proposte sono state: il becco bunsen, il forno a microonde (34), la pentola a pressione e l'autoclave. I mezzi nei quali effettuare in trattamento (che in ogni caso comporta il raggiungimento del punto di ebollizione), sono soluzioni di vario tipo che vanno dai sali di metalli pesanti, al tampone citrato 10mM pH 6,6 (35) all'urea 6M, al Tris HCl 10mM pH8 ed all'EDTA 1 mM pH 8 (36). A tutt'oggi non è del tutto chiarito come la combinazione calore-soluzione tampone renda accessibili quei siti antigenici un tempo identificabili soltanto su materiale criopreservato. Fra le ipotesi avanzate, alcune riconducono l'efficacia del sistema alla precipitazione o alla chelazione degli ioni calcio legati ai tessuti e dei cationi metallici divalenti (37). L'allontanamento di tali componenti ioniche, dovuto sia al calore che al tipo di soluzione utilizzata durante la fase di riscaldamento, smaschererebbe un'ampia gamma di siti combinatori stabilizzati dai procedimenti di fissazione. L'approccio basato sulle alte temperature appare efficace con tipi diversi di fissativo e minimizza le variazioni di immunoreattività legate all'impiego di tempi di fissazione diversificati (da 1 giorno ad alcune settimane). L'unica condizione che riduce l'efficacia delle nuove tecniche di smascheramento antigenico mediante calore è rappresentata dalla sottofissazione; le componenti tissutali non fissate adeguatamente, infatti, vanno incontro ad un processo di denaturazione.

***Smascheramento con pentola a pressione***

Tra le fonti di calore, la pentola a pressione, pur determinando un minimo deterioramento dei fini dettagli citologici, risulta molto maneggevole e consente il simultaneo trattamento di un numero elevato di sezioni (80/100 secondo il tipo di pentola), permettendo l'omogenea distribuzione del calore, e la riduzione dei tempi di lavoro.

Dopo aver deparaffinato le sezioni, riempire la pentola a pressione per un terzo con tampone citrato o EDTA e portarla ad ebollizione; si consiglia di non chiudere ermeticamente il coperchio durante questo passaggio. Raggiunta l'ebollizione immergere i vetrini (contenuti in una apposita griglia portavetrini di metallo) nel tampone e, raggiunta la massima pressione segnalata dalla fuoriuscita del vapore, attendere 90 minuti; quindi spegnere la sorgente di calore e far fuoriuscire tutto il vapore tramite l'apposita valvola. Lasciare il coperchio leggermente aperto e far raffreddare i vetrini facendo fluire lentamente acqua corrente nella pentola per ottenere un raffreddamento graduale che eviti il distacco delle sezioni. Quindi trasferire i vetrini nel tampone Tris-HCP o PBS e procedere con la metodica immunoistochimica.

***Smascheramento con forno a microonde***

I vantaggi della pentola a pressione non sono offerti dal forno a microonde, il quale eroga calore in modo lievemente disomogeneo al suo interno (anche se è dotato di un piatto rotante), permette il trattamento di un numero limitato di vetrini (non più di 20 alla volta per non incorrere in significative disomogeneità dei risultati) e richiede numerosi cicli di trattamento (2-5 cicli di 5 minuti ciascuno) ed un periodo di raffreddamento di circa 20 minuti, con un tempo globale di trattamento per gruppo di preparati trattati che è compreso fra 30 e 45 minuti (38). I vetrini, deparaffinati come di consueto, sono alloggiati in una vaschetta riempita con tampone citrato, Tris-HCl o EDTA in modo da rimanere completamente immersi nella soluzione per tutta la durata del trattamento. La vaschetta viene inserita nel forno a microonde al centro del piatto rotante con il coperchio appoggiato diagonalmente in modo da non sigillare il contenuto (39).

Il numero di vetrini da trattare deve essere sempre lo stesso affinché il trasferimento di calore alla sezione di tessuto sia costante durante il trattamento. Quindi se il cestello consente di alloggiare p. es. 20 vetrini, si deve aver cura di rispettare tale carico anche nel caso che si debba trattare una sola sezione, perché solo occupando con vetrini bianchi tutte le 19 posizioni restanti si ha omogeneità di condizioni rispetto ad altri trattamenti (40).

Effettuare 1 ciclo di 5 minuti a 750 watt ed aggiungere 50 ml di acqua distillata per rimpiazzare il volume di acqua che evapora. Se necessario ripetere il ciclo (si possono effettuare fino ad un massimo di 5 cicli). Nei primi 2 cicli il rabbocco va eseguito con acqua distillata; nel caso che i cicli siano più

di 2 si procede all'aggiunta, di volta in volta, di solo tampone, dal momento che la soluzione di lavoro riscaldata va incontro ad un processo di concentrazione dei sali in essa contenuti.

Rimuovere la vaschetta dal forno a microonde e lasciarla raffreddare a temperatura ambiente per 20 minuti prima di trasferire i vetrini nel tampone utilizzato di solito per l'immunoistochimica e procedere come di consueto.

***Trattamento in autoclave***

Porre i vetrini deparaffinati e reidratati in un rastrello e immergerli in 500 ml di tampone citrato 10 mM pH 6. Autoclavare a 121°C per 15 minuti e procedere come di consueto per le colorazioni.

Per il conseguimento di risultati ottimali con la massima parte degli anticorpi si suggerisce il trattamento in pentola a pressione per 1 minuto e 30 secondi utilizzando quale soluzione l'EDTA 1 mM (pH8).

# Valutazione dei risultati

Numerosi sono i quadri di positività specifica che si possono osservare in un campione processato per l'immunoistochimica. Quando viene aggiunto un cromogeno esso reagirà con l'enzima e precipiterà nella sede istologica dell'antigene. Il cromogeno precipitato indica la presenza dell'antigene, e l'intensità della reazione è proporzionale alla quantità di antigene presente (Fig. 13). Le cellule che non contengono antigene e le strutture circostanti saranno contrastate mediante controcolorazione.

Se gli antigeni sono presenti nel citoplasma delle cellule, la colorazione può coinvolgere l'intero citoplasma o solo una parte di esso, in funzione del contenuto antigenico. Le proteine di alcuni virus e quelle coinvolte nel ciclo cellulare risulteranno localizzate nel nucleo della cellula. La colorazione positiva per i marcatori di superficie apparirà invece alla periferia, in prossimità delle membrane cellulari. Il quadro di colorazione può essere ulteriormente distinto in focale e diffuso. Il primo sarà localizzato in alcune aree discrete della cellula mentre una colorazione diffusa coinvolge zone più ampie e, spesso, numerose cellule adiacenti. Alcuni antigeni producono un caratteristico quadro di colorazione che rende più facile l'interpretazione. Non tutte le cellule contengono la stessa quantità di antigene e perciò diverse cellule si coloreranno con una intensità variabile. L'assenza di una colorazione variabile tra cellule simili può indicare viceversa una colorazione non specifica. L'aspetto più difficile dell'immunoistochimica è la valutazione del prodotto finale. Nell'interpretazione dei risultati devono essere valutati sia la colorazione specifica dell'antigene che la colorazione non specifica di fondo. Se la positività dipende dalla localizzazione di un particolare antigene, diversi altri fattori, come la condizione del tessuto, l'omogeneità della fissazione e i possibili artefatti, possono giocare un ruolo rilevante per una accurata interpretazione (41). L'intensità di ciascuna reazione viene generalmente classificata su una scala da zero a quattro, cioè da negativa a molto intensa (Tab. 4).

Mentre la colorazione specifica è localizzata nelle cellule, la colorazione di fondo si ritrova principalmente nel collageno e nel connettivo. Inoltre non sarà confinata alle singole cellule ma coinvolge gruppi di cellule senza un particolare quadro di distribuzione. Un'eccezione è rappresentata dall'attività della perossidasi endogena che è abitualmente confinata alle cellule ematiche bianche e rosse. L'interpretazione è un confronto della intensità del quadro di colorazione specifico con quello non specifico del campione sconosciuto rispetto al controllo. L'obiettivo è quello di ottenere, alla più elevata diluizione anticorpale, la maggior intensità di colorazione specifica con la

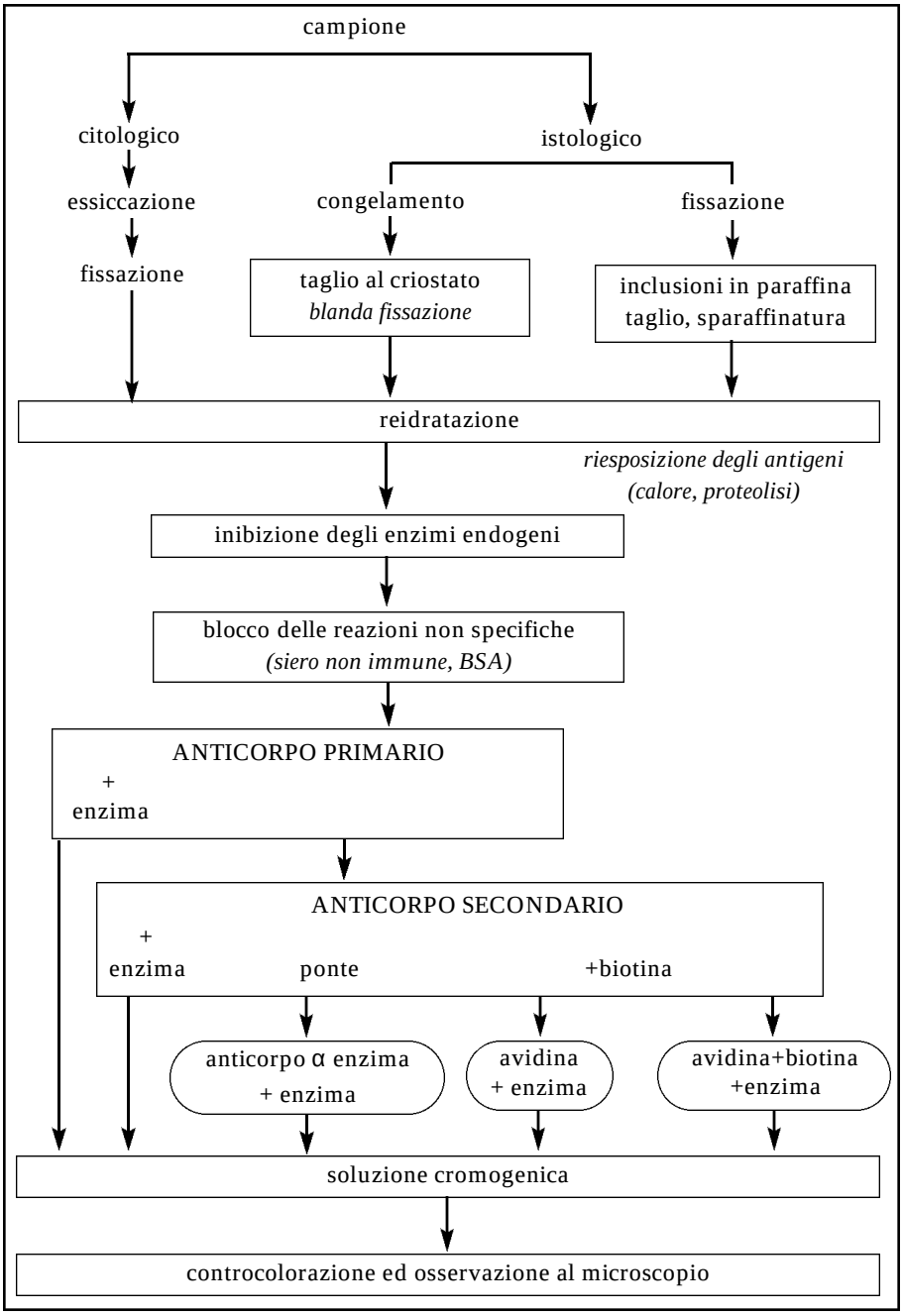



***Figura 13. Schema riassuntivo della processazione di un campione biologico.***

| **Colorazione** | | **Fondo** |
|---|---|---|
| molto buona | 4 | Inteso |
| buona | 3 | moderato |
| leggermente pallida | 2 | debole |
| pallida | 1 | molto debole |
| negativa | 0 | assente |

***Tabella 4. Valutazione della colorazione di un preparato e del fondo aspeci - fico.***

minor quantità di interferenza di fondo dovuta al legame con proteine aspecifiche. Il quadro di colorazione può essere accuratamente valutato soltanto prendendo in considerazione fattori come la provenienza del tessuto, le caratteristiche dell'antigene localizzato e le procedure usate.

Gli artefatti che possono prodursi nei campioni daranno luogo ad una colorazione che interferirà con una corretta interpretazione. Essi possono essere approssimativamente divisi in quattro categorie:

1) I precipitati: sono spesso confusi con una colorazione positiva del campione. Risultano riconoscibili dal fatto che non sono confinati all'interno delle cellule ma appaiono sparsi casualmente in tutto il campione. I granuli di cromogeno che non hanno reagito e i pigmenti di controcoloranti si ritrovano quando le rispettive soluzioni non sono state adeguatamente filtrate. L'uso di fissativi che generano gruppi aldeidici (p. es. quelli a base di formalina non tamponata) o la mancata rimozione dei cristalli di clururo di mercurio del fissativo di Zenker causano la formazione di precipitati neri correlati con la fissazione. Le sezioni dovrebbero essere trattate per 15 minuti a temperatura ambiente con $NH_4Cl$ 0,05 M e lavate con cura prima dell'incubazione con l'Ab primario ma dopo l'inibizione della perossidasi endogena.

2) Gli artefatti tissutali: sono dovuti a colorazioni non specifiche che usualmente si verificano quando le sezioni sono tagliate troppo spesse o risultano piegate. Se il campione è di spessore superiore a quello di uno strato cellulare non tutte le cellule sono sullo stesso piano focale e i reagenti possono venir intrappolati tra gli strati, lungo i segni del coltello o nelle pieghe del tessuto dando luogo ad una impropria colorazione di ciascuno strato cellulare. Quindi una corretta interpretazione non è sempre possibile e

la procedura dovrebbe essere ripetuta su un campione più sottile. Il controllo può anche non mostrare una colorazione aumentata in funzione dello spessore. Le sezioni di tessuto dovrebbero essere di spessore di 4-5 μ e gli strisci cellulari dovrebbero essere eseguiti nel modo più sottile possibile.

3) Artefatti cellulari: la positività presente nelle cellule necrotiche o frantumate è quasi sempre un artefatto e si distingue da quella specifica per il fatto di presentare la stessa intensità in ogni punto. Anche le cellule che hanno subito una autolisi ed i tessuti emorragici presenteranno questo tipo di colorazione aspecifica. Ai fini dell'interpretazione si dovrebbe considerare soltanto il quadro di colorazione delle cellule vitali.

4) Colorazione di fondo specifica: sono pochi i casi in cui una positività di fondo specifica può interferire con l'interpretazione dei risultati. Un campione molto ricco di sangue o che non è stato lavato prima di essere processato, conterrà una certa quantità di siero nelle aree interstiziali. Se l'antigene che si ricerca è presente ad alte concentrazioni anche nel siero, si verificherà una intensa colorazione dovuta ad una localizzazione specifica dell'antigene nel siero, che spesso può oscurare l'antigene presente nelle cellule. Occasionalmente i macrofagi possono mostrare una positività specifica dovuta alla fagocitosi di cellule che esprimono l'antigene cercato.

Altre cause di colorazione di fondo non specifica sono una inappropriata diluizione dell'anticorpo, una rimozione incompleta della paraffina, un risciacquo improprio dei vetrini e una incubazione non corretta del substrato. La colorazione in porzioni di campione in cui si è verificata una cattiva fissazione non è specifica e deve essere ignorata.

L'interpretazione dei campioni trattati con enzimi proteolitici può essere difficile poiché la digestione espone una quantità maggiore di siti antigenici dando luogo ad una colorazione più intensa rispetto ai campioni non digeriti. E' importante che controlli positivi, negativi e "blank" siano processati insieme con i campioni sconosciuti. Se il campione fissato in formalina richiede la digestione con enzimi proteolitici, anche i controlli dovrebbero subire lo stesso trattamento.

Una elevata colorazione di fondo su tutti i vetrini può essere dovuta ad uno sviluppo eccessivo della reazione del substrato, causato da un eccesso di cromogeno nella soluzione, un'elevata concentrazione di antigene nel campione, una reazione accelerata causata da temperature elevate. Il rimedio più semplice è quello di diminuire la concentrazione di cromogeno in soluzione o i tempi di incubazione del substrato (42).

Se la una colorazione aspecifica deriva dai componenti delle preparazioni policlonali, è opportuno aumentare la concentrazione del siero normale della stessa specie del sistema di rivelazione o dell'anticorpo ponte prima dell'in-

cubazione con l'Ab primario. Se l'aumento della colorazione specifica è dovuto ad un'elevata espressione di antigene nel campione, il controllo non dovrebbe mostrare alcuna colorazione di fondo. Per ridurre il grado di colorazione specifica è consigliabile diminuire il tempo di incubazione del substrato; aumentare la diluizione dell'anticorpo primario o del secondario prima dell'incubazione col sistema di rivelazione; rimuovere, mediante centrifugazione a 10000 rpm delle soluzioni anticorpali, i microaggregati di Ab che si formano facilmente per precipitazione e si legano in modo non specifico.

L'assenza di colorazione può dipendere invece da altre possibilità. La causa più comune dei falsi negativi può essere una fissazione impropria. Il protocollo di fissazione applicato può aver provocato una perdita dell'epitopo antigenico; le condizioni per la fissazione possono non essere ottimali (temperatura, presenza o assenza di cationi divalenti); oppure l'antigene può non essere accessibile all'anticorpo.

I passaggi della colorazione devono essere effettuati in modo corretto per poter consentire il legame di tutti i reagenti. Se l'anticorpo secondario viene applicato prima di quello primario, quest'ultimo potrà ancora legarsi all'antigene tissutale ma non ci sarà alcun modo per localizzarlo. E' indispensabile l'uso di un protocollo da seguire per assicurarsi che tutti i passaggi vengano effettuati nella sequenza corretta. L'omissione di un reagente anticorpale impedisce ovviamente il legame dell'anticorpo successivo. P. es. se viene omesso l'anticorpo ponte, non sarà possibile il legame dell'immunocomplesso.

Se i controlli positivi si colorano bene ma i campioni si colorano molto debolmente, l'antigene è presente in basse concentrazioni; la colorazione dovrebbe essere ripetuta o utilizzando una soluzione più concentrata di anticorpo primario o aumentando il tempo di incubazione. Se l'antigene è stato mascherato da una sovrafissazione in formalina, la digestione enzimatica dovrebbe aumentarne l'intensità.

# Tecniche di pre e post inclusione

La colorazione in immunoistochimica può essere effettuata o prima o dopo che il tessuto sia incluso (tecnica di pre- o post-inclusione). Ciascun metodo ha i suoi vantaggi e svantaggi. La principale applicazione per la tecnica di pre-inclusione è la microscopia elettronica. Nella tecnica di pre-inclusione il tessuto fissato è tagliato in sezioni spesse (5-50 μ) che vengono poste su un vetrino o lasciate flottanti.

Il campione viene colorato in maniera consueta ma con tempi di incubazione più lunghi (2-24 ore) per permettere all'anticorpo di attraversare lo spessore della sezione. Una penetrazione incompleta o non uniforme provocherà una colorazione scarsa. Per rimuovere completamente tutto l'anticorpo che non ha reagito, anche i bagni di tampone saranno più lunghi e più numerosi (tre bagni di 20 minuti dopo ciascuna incubazione). L'aumento dei tempi richiesti da ciascun passaggio rende questa procedura piuttosto lunga. Dopo la colorazione il campione è postfissato per un'ora in tetrossido di osmio, lavato e disidratato ed infine incluso in resina. Le tecniche di post- inclusione possono essere approntate rapidamente e facilmente con piccole modifiche della routine di immunoistochimica. Nella tecnica di colorazione post-inclusione i campioni sono fissati, disidratati e inclusi in plastica prima di essere colorati. Per l'esame al microscopio ottico le sezioni sono tagliate dello spessore di 1 μ e poste su un vetrino. Per l'uso in microscopia elettronica le sezioni ultrasottili (di spessore inferiore ad 1 μ) sono invece poste su griglie d'oro o di nichel. Speciale cura deve essere posta nel fissare il campione per impedire che i processi di polimerizzazione alterino la morfologia delle cellule colorate.

# La doppia colorazione

Numerose metodiche enzimatiche sono state messe a punto per poter localizzare due antigeni nella stessa sezione di tessuto. Alcuni metodi utilizzano lo stesso enzima con differenti substrati, per la rivelazione di diversi antigeni, mentre altri metodi usano differenti enzimi per marcare ciascun antigene (43). Sebbene le procedure descritte siano state messe a punto su sezioni in paraffina, i metodi possono essere usati anche per altri sistemi.

## Metodo che usa lo stesso enzima e differenti substrati

### Uso dell'enzima fosfatasi alcalina

La procedura è simile a quella comunemente usata per rivelare un solo antigene: il primo antigene viene localizzato usando un substrato che produce una colorazione blu (BCIP / NBT). Il secondo antigene viene localizzato da un substrato che produce una colorazione rossa (New fucsin). Entrambi i substrati sono permanenti, sicché i preparati possono venir disidratati e montati.

Le sezioni deparaffinate, reidratate e lavate in PBS sono sottoposte a inibizione della fosfatasi alcalina endogena con acido acetico 20% per 15 minuti a 4°C, e preincubate con proteina bloccante (BSA 0,1% in PBS).

Dopo l'incubazione con l'anticorpo primario e con il secondario coniugato con biotina, le sezioni sono incubate con streptavidina coniugata con fosfatasi alcalina e quindi fatte reagire con il primo substrato (BCIP / NBT). Quindi sono incubate con l'altro anticorpo primario da saggiare. Dopo le normali incubazioni con l'anticorpo secondario biotinilato e con la streptavidina coniugata con fosfatasi alcalina, viene utilizzato come secondo substrato la new fucsin; quindi, dopo la controcolorazione, si disidrata il preparato e si monta.

### Uso dell'enzima perossidasi

Dopo la disidratazione si inibisce la perossidasi endogena con $H_2O_2$ 3% in PBS per 30 minuti.

Eseguite le incubazioni con l'anticorpo primario e con quello secondario coniugato con biotina, viene effettuata un'incubazione con avidina coniugata con perossidasi.

Il primo substrato, costituito da DAB / $H_2O_2$, dà luogo ad un prodotto di colore marrone.

Dopo le incubazioni con l'altro anticorpo primario, con il secondario biotinilato e con l'avidina coniugata con perossidasi, si effettua l'incubazione con il secondo substrato che può essere costituito da DAB / $H_2O_2$ con l'aggiunta di cloruro di cobalto (o di nickel) 0,04% che conferisce ad essa una colorazione blu nera oppure da AEC / $H_2O_2$ che conferisce al prodotto di reazione un colore rosso.

Nel caso di reazione con AEC, il preparato risulta solubile in alcol e deve essere montato con mezzo acquoso.

## Metodo che usa enzimi differenti

Prevede la localizzazione del primo antigene con un sistema di rivelazione che utilizza la perossidasi e la localizzazione del secondo antigene con la fosfatasi alcalina.

Dopo la disidratazione, la perossidasi endogena viene inibita con $H_2O_2$ 3% in PBS per 30 minuti. Seguono le incubazioni con la proteina bloccante, con l'anticorpo primario, con l'anticorpo secondario biotinilato e con streptavidina coniugata con perossidasi. La reazione viene fatta avvenire con DAB / $H_2O_2$.

Si effettua quindi l'incubazione con l'altro anticorpo primario che viene rivelato mediante incubazione con l'anticorpo secondario coniugato con biotina, seguito da quella con streptavidina coniugata con fosfatasi alcalina e dall'incubazione con un substrato della fosfatasi alcalina (p. es. BCIP / NBT). Il substrato del primo sistema di rivelazione, cioè la DAB, conferisce una colorazione marrone. Il substrato del secondo sistema, cioè BCIP / NBT, conferisce una colorazione blu-nera.

Lo stesso metodo che utilizza enzimi differenti può associare al primo sistema di rivelazione, costituito dalla perossidasi, un secondo sistema costituito dalla β galattosidasi. In tal caso la streptavidina verrà coniugata con β galattosidasi e la rivelazione verrà effettuata con il substrato della β galattosidasi.

Seguono lavaggio, controcolorazione (anche con verde di metile), disidratazione e montaggio. Poiché la β galattosidasi è un sistema meno sensibile rispetto alla perossidasi, risultati migliori si raggiungono aumentando la concentrazione del secondo anticorpo primario di circa 3-5 volte.

# Tra l'istochimica e la biologia molecolare

## Metodi di studio della proliferazione cellulare

Le cellule in divisione possono essere identificate da anticorpi diretti contro proteine che si esprimono durante il ciclo cellulare e che in alcuni casi possono distinguere anche le fasi specifiche del ciclo cellulare (44).

L'anticorpo anti KI67 reagisce con un antigene nucleare espresso in tutte le cellule proliferanti, preferenzialmente durante le fasi tardo G1, S, G2 e M del ciclo cellulare e che invece è assente nelle cellule a riposo o fuori dal ciclo (in fase G0). Le cellule in continua proliferazione (linee cellulari) risultano positive a KI67 durante l'intero ciclo cellulare (45)(46).

L'anticorpo anti P34 riconosce la subunità P34 di una protein chinasi coinvolta nella regolazione dei passaggi attraverso le fasi di confine G1/S e G2/M del ciclo cellulare.

L'anticorpo anti PCNA (Proliferating Cells Nuclear Antigen)/ciclina reagisce con un antigene proliferativo delle cellule nucleari, un peptide di 36 kd. Il PCNA è una proteina ausiliaria della polimerasi δ del DNA.

La specificità di anticorpi contro antigeni come KI67 e PCNA ha permesso il loro utilizzo in particolari analisi cliniche (47) per la determinazione della frazione cellulare proliferativa di vari tumori (Figg. 14a e 14b).

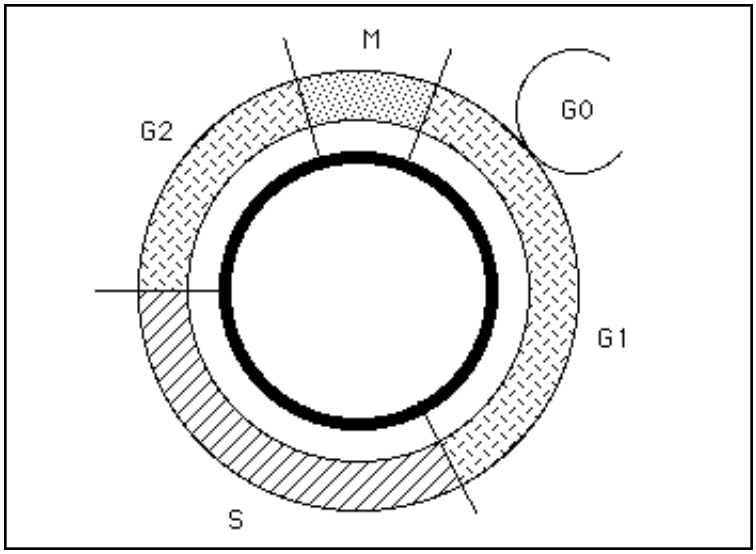



***Figura 14a. Immunoreattività del KI 67 nelle diverse fasi del ciclo cellulare.***

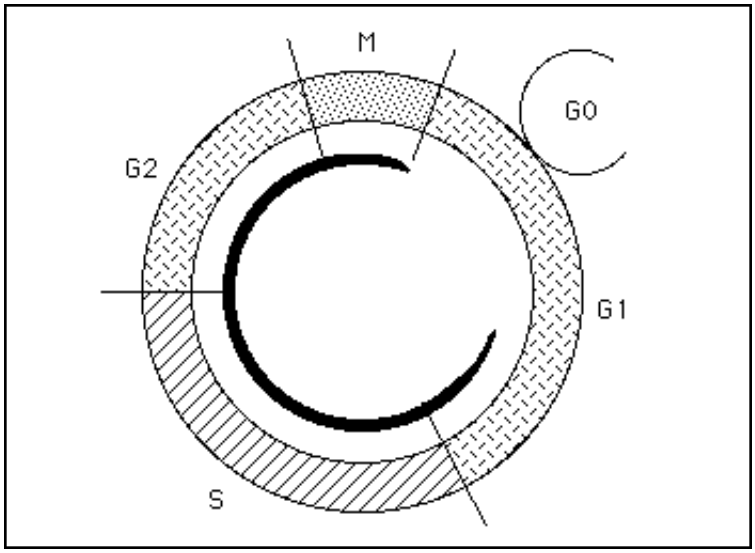



***Figura 14b. Immunoreattività del PCNA nelle diverse fasi del ciclo cellulare.***

Oltre alla possibilità di testare l'espressione di proteine specifiche del ciclo cellulare come PCNA e KI67 in campioni di tessuto, esiste quella di utilizzare alcune tecniche immunoistochimiche basate sulla stretta associazione tra sintesi del DNA e duplicazione cellulare (48). Durante la proliferazione cellulare, prima che la cellula si divida in due cellule figlie, il DNA si deve replicare. La misura dell'incorporazione di nucleotidi marcati da parte del DNA in replicazione risulta utile per quantificare la proliferazione cellulare (49).

Fino a tempi molto recenti, a questi scopi sono stati utilizzati nucleotidi radiomarcati, in particolare la timidina triziata. Essi, aggiunti alle colture cellulari, sono incorporati nel DNA da parte delle cellule che sono in procinto di dividersi e possono essere misurati con un opportuno contatore di radiazioni mediante l'uso di un liquido di scintillazione.

Più recentemente sono stati utilizzati degli analoghi non marcati della timidina, le allopirimidine, in cui il gruppo metilico della pirimidina viene sostituito rispettivamente dal bromo nella 5-bromo-deossi-uridina (BrdU) o dallo iodio nella 5-iodio-deossi-uridina (IdU) (Fig. 15). Queste molecole, come la timidina, vengono incorporate nel DNA cellulare e possono essere rivelate con specifici anticorpi diretti contro di esse e coniugati con un opportuno sistema di rivelazione, che potrà essere misurato con tecniche di immunoistochimica o di citometria a flusso (50).

Solo le cellule proliferanti possono incorporare BrdU o IdU nel loro DNA. (51). Quindi questa procedura può essere utilizzata per marcare le cel-

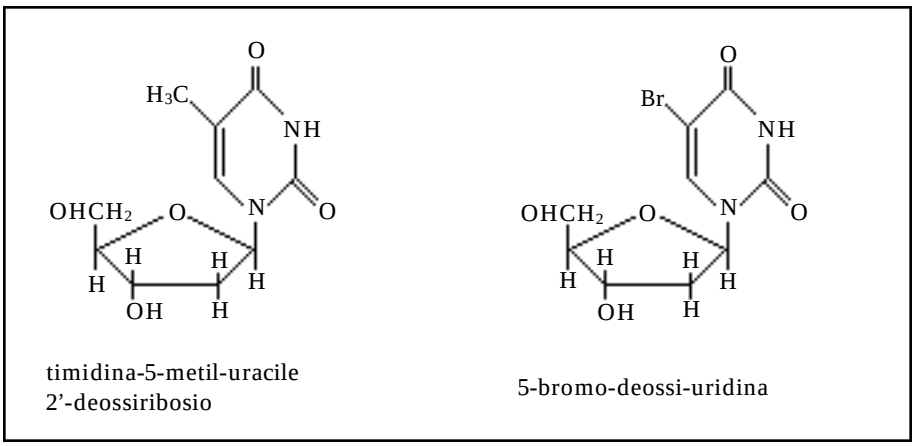



***Figura 15. Confronto tra timidina 5-metil-uracile-2'-deossiribosio e 5-bro - mo-deossi-uridina.***

lule proliferanti sia in vitro, operando su linee cellulari, cellule isolate di fresco, o espianti tissutali in coltura, che in vivo, iniettando la BrdU nell'animale e, dopo un tempo necessario all'incorporazione nel DNA, sacrificando l'animale per allestire sezioni di tessuti (congelate o incluse in paraffina) o per raccogliere le cellule su un vetrino secondo uno dei metodi descritti (52).

I campioni sono incubati con una miscela di anticorpo anti BrdU e nucleasi che degradano parzialmente il DNA prima di procedere con il sistema di rivelazione più idoneo (53).

L'immunocolorazione nucleare risulta facilmente identificabile in assenza di fondo e, insieme alla controcolorazione, consente di visualizzare nel contesto dell'organizzazione del tessuto quelle cellule che hanno incorporato BrdU o IdU nel DNA quindi sono nella fase di proliferazione (54). La positività delle cellule in fase S si manifesta con due possibili aspetti differenti: una colorazione diffusa ed omogenea dell'intera area nucleare o una positività localizzata, ristretta alla periferia del nucleo, in forma di anello o di irregolari granulazioni variamente coalescenti.

Un prerequisito essenziale per la rivelazione immunoistochimica delle allopirimidine è la denaturazione del DNA, al fine di esporre le catene polinucleotidiche e renderle accessibili agli anticorpi contro la BrdU o la IDU inserite entro la doppia elica (55). Gli agenti denaturanti possono essere chimici (HCl, NaOH, DNasi), fisici (calore) e chimico-fisici (formamide e calore). La durata, la temperatura del trattamento e la concentrazione dell'agente denaturante variano, entro un ambito molto ampio, anche in funzione delle condizioni sperimentali.

## Metodi di studio della morte cellulare

L'apoptosi è una modalità di morte cellulare che si verifica in normali condizioni fisiologiche ed è spesso riscontrata durante il normale ricambio cellulare, l'omeostasi cellulare, l'embriogenesi e il mantenimento della tolleranza immunitaria. Essa è diversa dalla necrosi cellulare e non è associata a risposta infiammatoria o a danno tissutale. La cellula subisce alcune trasformazioni morfologiche e biochimiche che portano alla aggregazione della cromatina, alla condensazione del nucleo e del citoplasma, alla degradazione del DNA genomico e alla formazione di vescicole denominate corpi apoptotici. Esistono numerosi test che permettono di misurare questa morte cellulare.

Oltre all'immunoistochimica, che fa uso di anticorpi diretti contro alcune delle proteine che mediano l'apoptosi, una tecnica molto sensibile è quella che permette di evidenziare le estremità dei frammenti originati dalla estesa degradazione del DNA, caratteristica dei primi stadi dell'apoptosi.

La rottura del DNA può produrre sia frammenti a doppia elica di DNA a basso peso molecolare, i quali risultano quindi aumentati nelle cellule apoptotiche, che punti di rottura (nicks) a singola elica nel DNA ad alto peso molecolare che invece risulta ridotto durante l'apoptosi. Questi frammenti di DNA possono essere rivelati mediante marcatura enzimatica.

### Nick traslation

L'enzima DNA polimerasi agisce sul DNA nei punti in cui una delle eliche di una molecola a doppia elica risulta frammentata. L'aggiunta di nucleotidi su un frammento libero (Nick traslation), nel punto di rottura di una singola elica in un DNA a doppio filamento, è dipendente dalla lettura dello stampo disponibile sulla elica controlaterale. Ciò permette quindi di evidenziare non solo il DNA apoptotico ma anche una frammentazione casuale del DNA durante la necrosi cellulare (56).

I campioni reidratati vengono digeriti mediante un opportuno pretrattamento per facilitare la penetrazione dei reagenti necessari per la marcatura. In campioni cellulari le cellule devono essere permeabilizzate ma, per evitare la perdita del DNA a basso peso molecolare, esse devono essere fissate con formaldeide o glutaraldeide prima della permeabilizzazione.

L'incorporazione dei nucleotidi in situ nei frammenti di DNA per opera della polimerasi richiede l'incubazione con dATP, dCTP, dGTP e con il dUTP biotinilato in posizione 11 (biotin-11-dUTP).

La rivelazione citochimica avviene attraverso il legame alla biotina dell'avidina coniugata con la perossidasi o la fosfatasi alcalina e alla reazione

con il cromogeno opportuno. Successivamente i vetrini sono controcolorati con ematossilina o verde di metile.

## Tecnica Tunel

L'enzima terminal nucleotidil trasferasi (TdT), riconosce l'estremità terminale 3'OH del DNA frammentato a doppia o singola elica dove aggiunge cataliticamente residui di nucleotidi a formare un eteropolimero random (57). L'aggiunta dei nucleotidi marcati e modificati, X-dUTP, dove X può indicare biotina, digossigenina o fluoresceina è quindi indipendente dallo stampo. Questo metodo di marcatura terminale è denominato **T**dT mediated X-d**U**TP **N**ick **E**nd **L**abeling (TUNEL) abbreviata con l'acronimo tunel che può essere tradotto come "marcatura dell'estremità terminale con deossi uridina marcata e mediata dall'enzima terminal nucleotidil trasferasi".

Il metodo tunel è considerato più sensibile e più veloce della traduzione dipendente dallo stampo. E' stato inoltre dimostrato che le cellule ai primi stadi della apoptosi sono marcati dalla reazione tunel mentre le cellule necrotiche sono identificate dalla traduzione del frammento libero (Nick Translation). Quindi si può concludere che la reazione tunel è più specifica per l'apoptosi e l'uso combinato di tunel e nick translation può essere utile per differenziare l'apoptosi dalla necrosi cellulare (58).

La metodica tunel può essere effettuata sullo stesso tipo di campioni sui quali si possono effettuate le comuni colorazioni di immunoistochimica. Le sezioni incluse in paraffina, dopo la reidratazione, sono sottoposte ad una digestione con proteinasi K per rendere gli acidi nucleici accessibili ai nucleotidi marcati (59). Le sezioni al criostato, i citocentrifugati e gli strisci cellulari devono essere fissati in formalina neutra tamponata e permeabilizzati con acetone:metanolo 1:1 o etanolo:acido acetico 2:1.

Se il sistema di rivelazione prevede l'uso di una tecnica immunoenzimatica si procede all'inibizione dell'attività degli enzimi endogeni con i substrati opportuni: perossido di idrogeno per bloccare le perossidasi o levamisole per bloccare la fosfatasi alcalina.

I vetrini sono quindi incubati con la soluzione di marcatura costituita dall'enzima TdT e dal deossinucleotide trifosfato coniugato con digossigenina o con biotina. In genere la reazione avviene con un tempo di incubazione di un'ora a 37°C in camera umida. La marcatura viene bloccata lavando i vetrini con una idonea soluzione tampone (60).

L'incorporazione dei nucleotidi può essere rivelata da una ulteriore incubazione con streptavidina o con un anticorpo antidigossigenina. L'immunocomplesso risulta facilmente visibile se l'avidina o l'anticorpo antidigossigenina sono coniugati con una molecola che ne consenta la visualizzazione e cioè un fluorocromo o un enzima che catalizzi la reazione con un cro-

mogeno, cioè la perossidasi o la fosfatasi alcalina. Si procede quindi alla reazione con l'opportuno cromogeno e si controlla al microscopio l'intensità della reazione. Infine si controcolora con ematossilina o verde di metile.

Questo sistema misto di biologia molecolare e istochimica consente una colorazione sensibile e specifica delle elevate concentrazioni di estremità 3'OH che sono localizzate nei corpi apoptotici. L'unica fonte naturale di digossigenina è la pianta di digitale. Quindi nessun ligando immunochimicamente simile, per il legame all'anticorpo antidigossigenina con affinità, si ritrova naturalmente nei tessuti animali il che assicura un basso livello di colorazione di fondo (back ground). La specificità dell'anticorpo anti digossigenina presenta meno dell'1% di cross reattività con altri steroidi e sembra preferibile agli altri sistemi di marcatura in situ per l'apoptosi in cui il legame dell'avidina con la biotina cellulare può essere fonte di errori.

## Immunoistochimica e tecnica tunel nella stessa sezione

L'analisi tunel viene effettuata in un primo tempo ed è seguita dall'incubazione con l'anticorpo diretto contro l'antigene che deve essere cercato con l'immunoistochimica.

Nella tecnica tunel vengono introdotte alcune modifiche rispetto alla procedura raccomandata dai protocolli, per consentire una miglior conservazione degli antigeni che devono essere rivelati successivamente dall'immunoistochimica. Le proteine non vengono digerite con proteinasi K e il sistema di rivelazione, costituito da anticorpo secondario anti digossigenina coniugato con perossidasi, viene diluito circa 1:4. Lo sviluppo della colorazione con il cromogeno viene fatta procedere per tempi inferiori per ridurre il fondo aspecifico. Successivamente la sezione viene incubata con un anticorpo primario, che a sua volta viene rivelato con un Ab secondario coniugato con biotina. Di seguito ancora, la biotina viene rivelata da streptavidina coniugata con fostatasi alcalina che catalizza la reazione con uno dei suoi substrati a scelta a seconda del colore che si vuole conferire alla reazione (61).

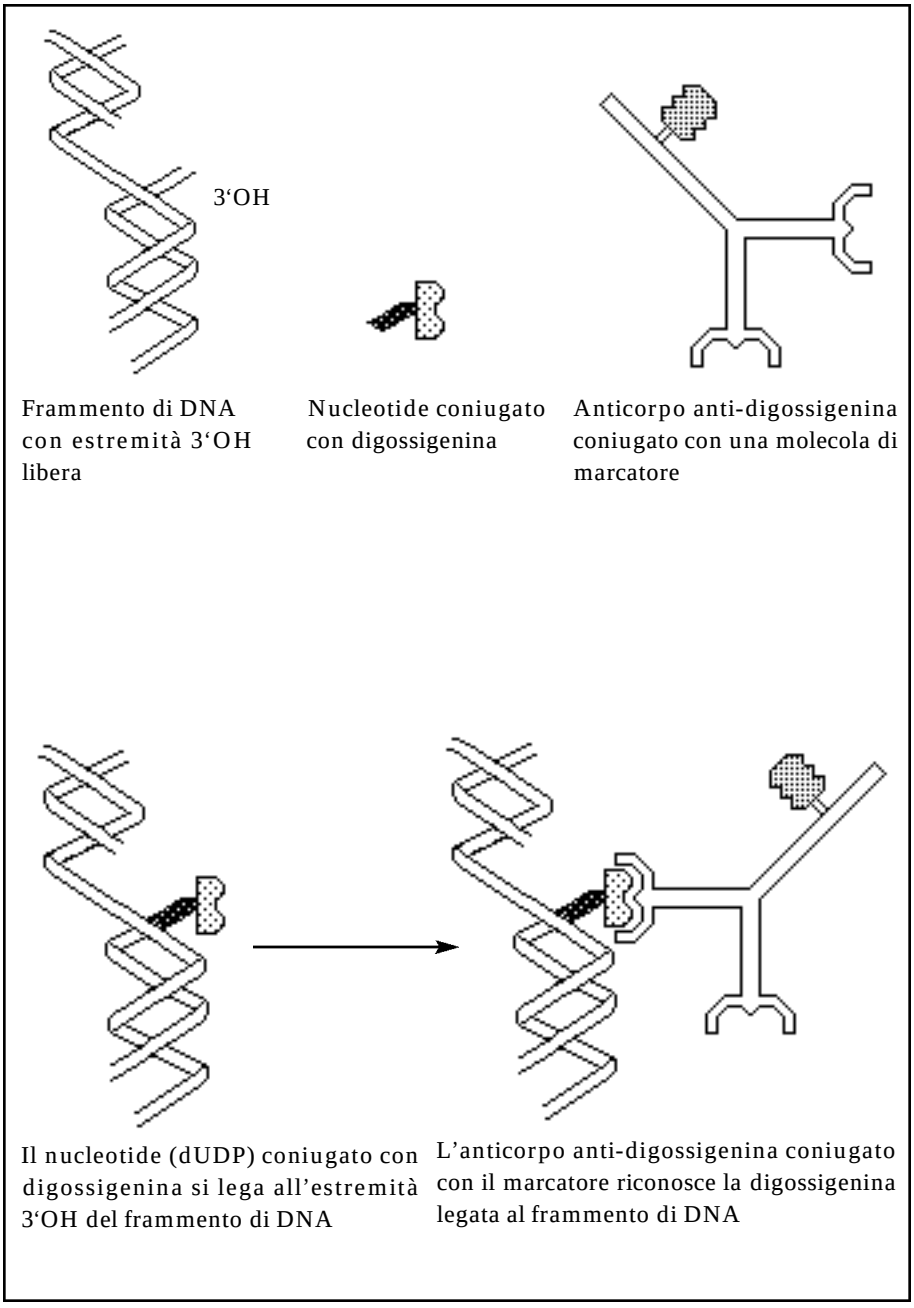



***Figura 16. Metodica TUNEL con digossigenina anti-digossigenina.***

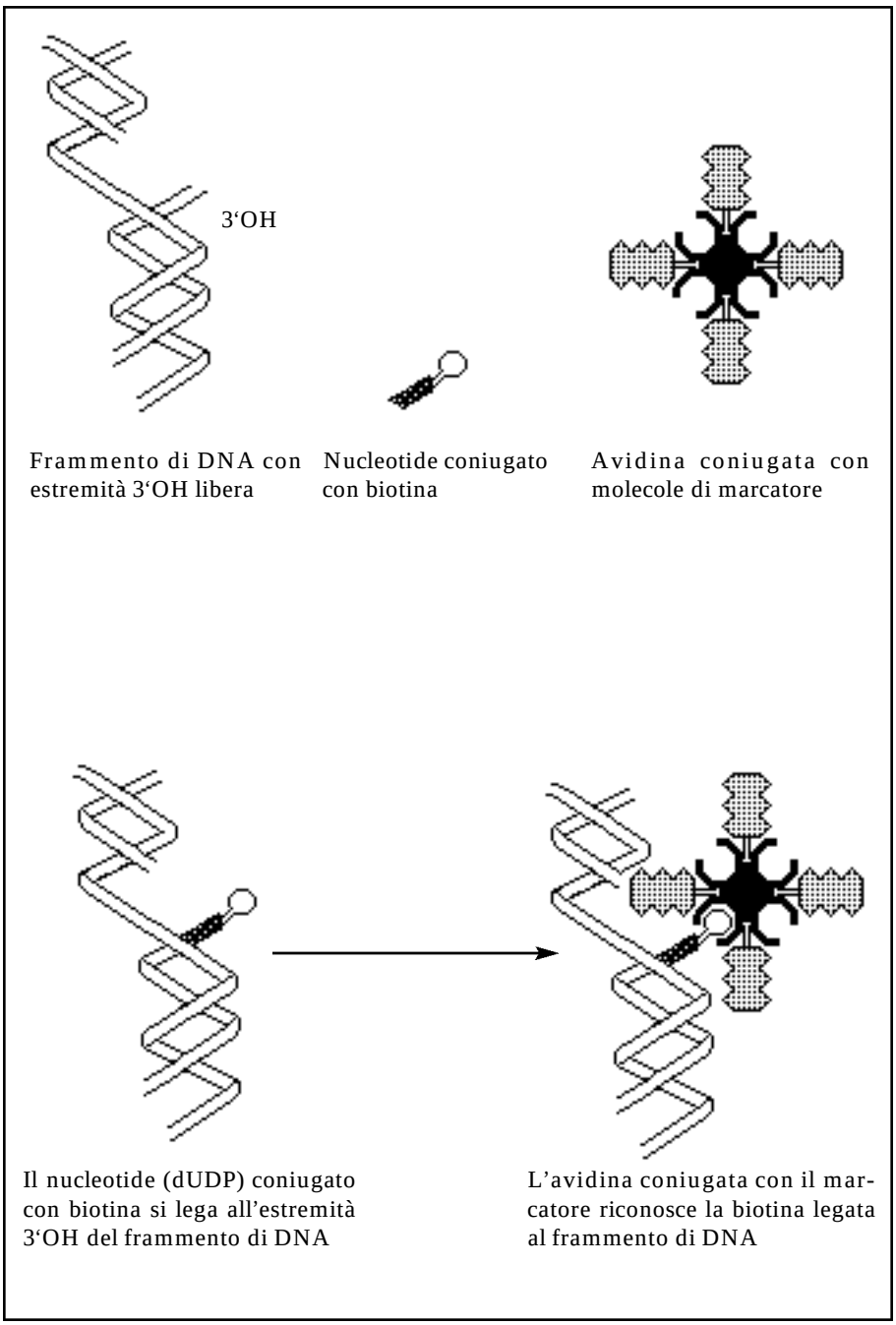



***Figura 17. Metodica TUNEL con Avidina Biotina.***

# Bibliografia


1. Pileri S., Rinavo M.T. (Eds): Compendio di Immunoistochimica. Principi e Metodi Applicati alla Microscopia Ottica. Milano. Labometrics Editore, 1983.
2. Hopwood D.: Cell and tissue fixation 1972-1982. Histochem. J. 1985, Vol: 17 (4 Suppl.), P: 389-442.
3. Guenzi S.: Microtomi, criostati e ultramicrotomi. Laboratorio 2000. 1995, Vol. 8, P:90-94,
4. Walter F. Schmitt W. (Eds): Il Microtomo. Guida per la Tecnica di Preparazione e di Taglio. Germany Ernst Leitz, Wetzal GmbH Ed. 1980
5. Polak J.M., Van Noorden S. (Eds): Immunocytochemistry: Modern Methods and Applixations, 2a ed. Bristol. Wright PSG, 1986.
6. Dinges H.P., Wirnsberger G., Höefler H: Immunocytochemistry in cytology: comparative evaluation of different tecniques. Anal. Quant Cytol. Histol. 1989, Vol: 11, P: 22-32,.
7. Confortini M., Massimo V., Minuti P.A., Carozzi F. (Eds): Protocolli Preanalitici di Immunocitochimica. Firenze. Menarini Industrie Farmaceutiche Riunite, 1994.
8. Tome Y., Hirohashi S., Noguchi M., Matsuno Y, Kishik Uei Y., Shimosato Y.: Immunocitologic diagnosis of small cell lung cancer in imprints smears. Acta Cytol. 1991, Vol: 35, P: 485-490.
9. Leong A.S.Y.: Immunostaining of cytologic specimens. Am. J. Clin. Pathol. 1996, P: 139-140
10. Shield P.W., Perkins G., Wright G.R.: Immunocytochemical staining of cytologic specimens: how helpful is it? Am J Clin Pathol: 1996, Vol:105, P: 157-162.
11. Scala C., Pasquinelli G., Cenacchi G. (Eds): Microscopie in Biologia e Medicina. Bologna. CLUEB Ed., 1995.
12. Shi S.R., Prince J.B., Jones C.M., Kalra K.L., Tandon A.K.: Use of monoclonal antibodies in immunohistochemistry. Meth. Mol. Biol. 1995, Vol: 45, P: 89-108
13. Bourne J.A.(Eds): Handbook of Immunoperoxidase Staining Methods. Santa Barbara CA. Dako Corporation, 1983.

14. Heiderman E.: Immunoperoxidase techniques in histopathology: applications, methods and controls: J. Clin. Pathol. 1979, Vol: 32, P: 971-978.

15. Childs G., Unabia G.: Application of the avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) method to the light microscopic localisation of the pituitary hormones. J. Histochem. Cytochem. 1982, Vol:30 P: 713-716.

16. Graham R.C., Ludholm U., Karnovsky M.J.: Cytochemical demonstration of peroxidase activity with 3-amino-9-ethil carbazole. J. Histochem Cytochem. 1965, Vol: 13, P: 150.

17. Hanker J.S.: A new specific, sensitive and non carcinogenic reagent for the demonstration of the horseradish peroxidase. Histochem.1977, 9: 789.

18. Pluzek K.J., Ramlau J.: H. (Eds): Handbook of Immunoblotting of Proteins vol. I P: 177. Boca Raton Fl. Bjerrum OJ, Heegaar NHH crc Press Inc, 1988

19. Larsoon L.I. (Eds): Immunocytochemistry: Theory and Practice. Boca Raton Fl. CRC Press Inc, 1988

20. Sambrook J ( Eds): Molecular Cloning: a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory. p. 1.86. B. 14, 1989

21. Cattoretti G.: Standardization and reproducibility in diagnostic immunohistochemistry. Hum Pathol. 1994, Vol: 25 (10 Suppl), P: 1107-1109.

22. Cattoretti G., Pileri S., Parravicini C., Becker M.N., Poggi S., Bifulco C., Key G., D'Amato L., Sabattini E., Feudale E.: Antigen unmasking on formalin fixed, paraffin embedded tissue section. J. Pathol. 1993, Vol: 171 (2 Suppl), P: 83-98.

23. Shi S.R., Coté R.J., Taylor C.R.: Antigen retrieval immunoistochemistry: past, present and future. J. Histochem. Cytochem. 1997, Vol: 45 (3 Suppl), P: 327-343.

24. Pileri S., Falini B., Sabattini E., Bigerna B., Gherlinzoni F., Tazzari P.L.: Immunohistochemistry of malignant lymphomas. Advantages and limitations of the new monoclonal antibodies working in paraffin sections. Haematologica 1991, Vol:76 (3 Suppl), P: 226-234.

25. Puchtler J., Meloan S.N. On the chemistry of formaldeide fixation and its effects on immunohistochemical reactions. Histochemistry. 1985, Vol: 82, P: 201-204.

26. Shi S.R., Coté R.J., Yang C., Chen C., Xu H.J., Benedict W.F., Tailor C.R.:

Development of an optimal protocol for antigen retrieval: a 'test battery' approach exemplified with reference to the staining of retinoblastoma protein (pRB) in formalin fixed paraffin sections: J. Pathol 1996, Vol: 179 (3 Suppl), P: 347-355

27. Finley J.C.W., Perutz P.: The use of proteolytic enzyme for improved localisation of tissue antigens with immunocytochemistry in Techniques in Immunocytochemistry. Bullock G.R., Petrusz P. (Eds) New York. Academic Press, 1982

28. Huang S., Minassian H., More J.D.: Application of the immunofluorescent staining in paraffin sections improved by trypsin digestion. Lab. Invest. 1976, Vol: 35, P: 383-391.

29. Battifora H., Kopinski M.: The influence of protease digestion and duration of fixation on the immunostaining of keratins: A comparison of formalin and ethanon fixation. J. Histochem Cytochem 1986, Vol: 34, P: 1095

30. Shi S.R., Imam S.A., Young L., Coté R.J., Taylor C.R.: Antigen retrieval immunohistochemistry under the influence of pH using monoclonal antibodies. J. Histochem Cytochem. 1995, Vol: 43 (2 Suppl), P: 193-201.

31. Shi SR Coté C., Kalra K.L., Taylor C.R., Tandon A.K.: A technique for retrieving antigens in formalin-fixed, routinely acid-decalcified, celloidin-embedded human temporal bone sections for immunohistochemistry. J. Histochem. Cytochem 1992 Vol:40 (6 Suppl), P: 787-792.

32. Pileri S., Serra L., Martinelli G.: The use of pronase enhances sensitivity of PAP method in the detection of intracytoplasmic immunoglobulins; Basic Appl. Histochem. 1980, Vol: 24 (3 Suppl), P: 203-207.

33. Taylor C.R., Shi S.R., Chen C., Young L.; Yang C., Coté R.J.: Comparative study of antigen retrieval heating methods: microwave, microwave and pressure cooker, autoclave, and steamer: Biotech. Histochem. 1996, Vol:71 (5 Suppl), P: 263-270.

34. Boon M.E., Kok L.P. (Eds): Microwave Cookbook of Pathology: the Art of Microscopic Visualization. Leyden. The Netherlands. Coulomb Press Leyden, 1988.

35. Morgan J.M., Navabi H., Schmid K.W., Jasani B.: Possible role of tissue bound calcium ions in citrate-mediated high temperature antigen retrieval. J. Pathol. 1994, Vol:174 (4 Suppl), P: 301-307

36. Shi S.R., Coté R.J., Young L., Imam S.A., Taylor C.R.: Use of pH 9,5 buffer containing 5% urea for antigen retrieval immunohistochemistry. Biotech Histochem. 1996, Vol: 71 (4 Suppl), P: 190-196.

37. Morgan J.M., Navabi H., Jasani B.: Role of calcium chelation in high temperature antigen retrieval at different pH values. J. Pathol, 1997, Vol:182 (2 Suppl), P: 233-237.

38. Shi S.R., Key M.E., Kalra K.L.: Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on wicrowave oven heating of tissue sections. J. Histochem Cytochem.1991, Vol: 39 (6 Suppl), P: 741-748.

39. Janssen P.I., Brinkmann A.O., Boersma W.J., Van Der Kwast T.H.: Immunohistochemical detection of the androgen receptor with antibody F39.4 in routinely processed, paraffin embedded, human tissues after microwave pre-treatment. J. Histochem. Cytochem. 1994, Vol: 42 (8 Suppl), P: 1169-1175.

40. Hopwood D., Coghill G., Ramsay J., Milne G., Kerr M.: Microwave fixation: its potential for routine tecniques histochemistry, immunocytochemistry and elecron microscopy. Histochem. J. 1984, Vol:16, P: 1171-1192.

41. Pileri S., Sabattini E., Poggi S., Merla E., Raspadori D., Benfenati D., Rondelli D., Benni M., Ventura M.A., Falini B.: Bone-marrow biopsy in hairy cell leukaemia (HCL) patients. Histological and immunohistological analysis of 46 cases treated with different therapies. Leuk Limphoma. 1994, Vol:14 (Suppl), P: 67-71.

42. Cattoretti G.: Diagnostic immunoistochemistry recent developments and practical relevance (editorial). Pathol. 1996, Vol. 88: (1 Suppl), P: 3-7.

43. Riesenberg R., Oberneder R., Kriegmair M., Epp M., Bitzer U., Hofstetter A., Braun S., Riethmüller G., Pantel K.: Immunocytochemical double staining of cytokeratin and prostate specific antigen in individual prostatic tumur cells. Histochemistry 1993, Vol: 99, P: 61-66.

44. Chieco P., Robutti F. (Eds): Metodi in Citologia Analitica. Bologna. S.C.A.T.,. 1993.

45. Bruno S., Darzynkievicz Z.: Cell cycle dependent expression and stabiluty of the nuclear protein detected by Ki-67 antibody in HL-60 cells. Cell. Prolif. 1992, Vol: 25, P: 31-40.

46. Cattoretti G., Orazi A., Gerdes J.: Proliferating normal bone marrow cells do stain for Ki-67 antigen. Br. J. Haematol. 1993, Vol: 85 (4 Suppl), P: 835-836.

47. Budke H., Orazi A., Neiman R.S., Cattoretti G., John K., Babens M.: Assessment of cell proliferation in paraffin sections of normal bone marrow by the monoclonal antibodies KI67 and PCNA. Mod. Pathol. 1994, Vol: 8, P: 860-866.

48. Scott R.J., Hall P.A., Haldane J.S., Price Y, Van Noorden, Pryce Y.: A comparison of histochemical markers of cell proliferation with experimentally determined growth fraction. J. Pathol. 1991, Vol:165, P: 173-178.

49. Cattoretti G., Becker M.H., Key G., Duchrow M., Schlüter C., Galle J., Gerdes J.: Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave processed formalin-fixed paraffin sections. J. Pathol. 1992, Vol: 168: P: 357-363.

50. Hayashi Y, Koke M, Matsutani M, Hoshino T: Effect of fixation time and enzimatic digestion on immunohistochemical demonstration of bromodeoxiuridine in formalin fixed, paraffin embedded tissue. J. Histochem. Cytochem. 1988, Vol: 36, P: 511-514.

51. Falini B., Canino S., Sacchi S., Ciani C., Martelli M.F., Gerdes J., Stein H., Pileri S., Gobbi M., Fagioli M et al. Immunocytochemical evaluation of the percentage of proliferating cells in pathological bone marrow and peripheral blood samples with Ki67 and anti-bromo-deoxyuridine monoclonal antibodies. Br J Haematol. 1988, Vol: 69 (3 Suppl), P: 311-320.

52. Di Nucci G.D., Tazzari P.L., Bontadini A., Tassi C., Dinota A., Pileri S., Gobbi M.: Improved methods for the determination of 5-bromo-2-deoxyuridine labelling index in clones and colonies growing in plasma clots. Basic Appl. Histochem. 1990, Vol: 34 (1 Suppl), P: 71-77

53. Veronese S., Gambacorta M., Falini B.: In situ demonstration of tissue activity using anti-bromo-deoxyuridine monoclonal antibody: J. Clin Pathol 1989, Vol: 42 (8 Suppl), P: 820-826.

54. Gerdes J., Becker M.H,. Key G., Cattoretti G. Immunological detection of tumour growth fraction (Ki-67 antigen) in formalin fixed and routinely processed tissues. J. Pathol. 1992, Vol: 168 (1 suppl), P: 85-86.

55. Meiers J.S., Navert J., Koehm S. Hughes J: cell kinetics of human tumors by in vitro bromo-deoxiuridine labeling. J. Histochem Cytochem. 1989, Vol: 37, P:1449-1454.

56. Gold R., Schemied M., Rothe G., Zischler H., Breitschopf G., Wekerle H., Lassmann H.: Detection of DNA fragmentation in apoptosis; application of in situ nick traslation to cell culture systems in tissue section. J. Histochem. Cytochem. 1993, Vol: 41 (7 Suppl), P: 1023-1030.

57. Orazi A., Cattoretti G., John K., Neiman R.S.: Terminal deoxynucleo-

tidyl transferase staining of malignant lymphomas in paraffin sections. Mod Pathol. 1994, Vol:7, P: 582-586.

58. Gavrieli Y., Sherman Y., Bren-Sasson S.A.; Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. J. Cell. Biol. 1992, Vol: 119, P: 493-501.

59. Orazi A., Cotton J., Cattoretti G., Kotilo P.K., John K., Manning J.K., Neiman R.S.: Terminal deoxynucleotidyl transferase staining in acute leukemia and normal bone marrow in routinely processed paraffin sections. Am. J. Clin. Pathol. 1994, Vol:102 (5 Suppl), P: 640-645.

60. Wijsman J.H., Jonker R.R., Kejzer R., Van Der Velde C.J.H., Cornelisse C.J. Van Dierendonck J.H.: A new method to detect apoptosis in paraffin sections in situ end labeling of fragmented DNA. J. Histochem. Cytochem. 1993, Vol: 41 (1 Suppl), P: 7-12.

61. Gal A, Tamir S, Kennedy L.J., Tannenbaum S.R., Wogan G.N.: Nitro-tyrosine formation, apoptosis and oxidative damage: relationship to nitric oxide production in SJL mice bearing Rcsx tumor. Cancer Res. 1997, Vol: 57, P: 1823-1828.

# Indice

Editoriale . . . . . pag. 3

Introduzione . . . . . » 5

Preparazione dei campioni biologici . . . . . » 6
La fissazione dei tessuti . . . . . » 6
Disidratazione . . . . . » 9
Chiarificazione . . . . . » 10
Infiltrazione . . . . . » 10
Inclusione . . . . . » 10
Il taglio al microtomo . . . . . » 12
La raccolta delle sezioni . . . . . » 16
Reidratazione dei preparati inclusi . . . . . » 16
Congelamento . . . . . » 17
Fissazione delle sezioni congelate . . . . . » 18
Immunocitochimica . . . . . » 19
Preparati ottenuti per striscio . . . . . » 19
Preparati ottenuti per citocentrifugazione . . . . . » 20
Allestimento di cell blocks . . . . . » 20
Cell bag in agar . . . . . » 20
Cell bag in celloidina . . . . . » 21
Cell bag da coagulo di fibrina . . . . . » 21
Preparati purificati su gradiente . . . . . » 21
Preparati ottenuti per impronta . . . . . » 22
Immunocitochimica su preparati colorati . . . . . » 22

Le procedure di colorazione immunoistochimica . . . . . » 23
Gli anticorpi primari . . . . . » 23
I sistemi di rivelazione . . . . . » 25
Metodo diretto . . . . . » 26
Metodo indiretto o con coniugati . . . . . » 29
Metodo con immunocomplessi . . . . . » 30

Metodo avidina biotina . . . . . » 32
Substrati e cromogeni . . . . . » 32
Cromogeni per la perossidasi . . . . . » 36
3,3 diaminobenzidina tetraidrocloruro (DAB) . . . . . » 36
3-amino-9-etilcarbazolo (AEC) . . . . . » 37
4-cloro-1-naftolo . . . . . » 37
Reagente di Hanker-Yates . . . . . » 38
Cromogeni per la fosfatasi alcalina . . . . . » 38
BCIP / NBT . . . . . » 38
Naftolo AS-TR fosfato . . . . . » 38
Fast red . . . . . » 38
Fast blu . . . . . » 39
New fucsin . . . . . » 39
Cromogeni per la b galattosidasi . . . . . » 39
Xgal . . . . . » 39
La controcolorazione . . . . . » 40
Controcolorazione per prodotti terminali insolubili . . . . . » 40
Controcolorazione per prodotti terminali solubili . . . . . » 40
I mezzi di montaggio . . . . . » 41

Accorgimenti per un risultato ottimale . . . . . » 42
I vetrini per immunoistochimica . . . . . » 42
Le diluizioni dei reagenti . . . . . » 43
Tempi di incubazione . . . . . » 45
Vetrini di controllo . . . . . » 47
Lavaggio dei vetrini . . . . . » 48
Tamponi . . . . . » 51
Blocco delle reazioni non specifiche . . . . . » 52
Saturazione dei siti di legame aspecifici . . . . . » 52
Blocco degli enzimi endogeni . . . . . » 53
Blocco della perossidasi endogena . . . . . » 54
Blocco della fosfatasi alcalina endogena . . . . . » 55
Riesposizione di antigeni celati . . . . . » 55
Uso di enzimi proteolitici . . . . . » 56
Trattamento proteolitico con tripsina . . . . . » 56
Trattamento proteolitico con pronase . . . . . » 57
Uso delle alte temperature . . . . . » 57

Smascheramento con pentola a pressione . . . . . » 57
Smascheramento con forno a microonde . . . . . » 58
Trattamento in autoclave . . . . . » 59

Valutazione dei risultati . . . . . » 60

Tecniche di pre e post inclusione . . . . . » 65

La doppia colorazione . . . . . » 66
Metodo che usa lo stesso enzima e differenti substrati . . . . . » 66
Uso dell'enzima fosfatasi alcalina . . . . . » 66
Uso dell'enzima perossidasi . . . . . » 66
Metodo che usa enzimi differenti . . . . . » 67

Tra l'istochimica e la biologia molecolare . . . . . » 68
Metodi di studio della proliferazione cellulare . . . . . » 68
Metodi di studio della morte cellulare . . . . . » 71
Nick traslation . . . . . » 71
Tecnica Tunel . . . . . » 72
Immunoistochimica e tecnica Tunel nella stessa sezione . . . . . » 73

Bibliografia . . . . . » 76

Indice . . . . . » 82

# Caleidoscopio
## *Italiano*

1. **Rassu S.:** ***Principi generali di endocrinologia.*** **Gennaio '83**
2. **Rassu S.:** ***L'ipotalamo endocrino.*** **Giugno '83**
3. **Rassu S.:** ***L'ipofisi.*** **Dicembre '83**
4. **Alagna., Masala A.:** ***La prolattina.*** **Aprile '84**
5. **Rassu S.:** ***Il pancreas endocrino.*** **Giugno '84**
6. **Fiorini I., Nardini A.:** ***Citomegalovirus, Herpes virus, Rubella virus (in gravidanza).*** **Luglio '84.**
7. **Rassu S.:** ***L'obesita'.*** **Settembre '84**
8. **Franceschetti F., Ferraretti A.P, Bolelli G.F., Bulletti C.:*****Aspetti morfofunzionali del - l'ovaio.*** **Novembre '84.**
9. **Kubasik N.P.:** ***Il dosaggio radioimmunologico (1).*** **Dicembre '84.**
10. **Kubasik N.P.:** ***Il dosaggio radioimmunologico (2) parte prima.*** **Gennaio'85.**
11. **Kubasik N.P.:** ***Il dosaggio radioimmunologico (2) parte seconda.*** **Febbraio '85.**
12. **Kubasik N.P.:** ***Il dosaggio radioimmunologico (3) parte prima.*** **Aprile '85.**
13. **Nacamulli D, Girelli M.E, Zanatta G.P, Busnardo B.:** ***Il TSH.*** **Giugno '85.**
14. **Facchinetti F. e Petraglia F.:** ***La β-endorfina plasmatica e liquorale.*** **Agosto '85.**
15. **Baccini C.:** ***Le droghe d'abuso (1).*** **Ottobre '85.**
16. **Kubasik N.P.:** ***Il dosaggio radioimmunologico (3) parte seconda.*** **Dicembre '85.**
17. **Nuti R.:** ***Fisiologia della vitamina D: Trattamento dell'osteoporosi post-menopausale.*** **Febbraio '86**
18. **Cavallaro E.:** ***Ipnosi: una introduzione psicofisiologica.*** **Marzo '86.**
19. **Fanetti G.:** ***AIDS: trasfusione di sangue emoderivati ed emocomponenti.*** **Maggio '86.**
20. **Fiorini I., Nardini A.:** ***Toxoplasmosi, immunologia e clinica.*** **Luglio '86.**
21. **Limone P.:** ***Il feocromocitoma.*** **Settembre '86.**
22. **Bulletti C., Filicori M., Bolelli G.F., Flamigni C.:** ***Il Testicolo. Aspetti morfo-funzionali e clinici.*** **Novembre '86.**
23. **Bolcato A.:** ***Allergia.*** **Gennaio '87.**
24. **Kubasik N.P.:** ***Il dosaggio enzimoimmunologico e fluoroimmunologico.*** **Febbraio '87.**
25. **Carani C.:** ***Patologie sessuali endocrino-metaboliche.*** **Marzo '87.**
26. **Sanna M., Carcassi R., Rassu S.:** ***Le banche dati in medicina.*** **Maggio '87.**
27. **Bulletti C., Filicori M., Bolelli G.F., Jasonni V.M., Flamigni C.:** ***L'amenorrea.*** **Giugno '87.**
28. **Zilli A., Pagni E., Piazza M.:** ***Il paziente terminale.*** **Luglio '87.**
29. **Pisani E., Montanari E., Patelli E., Trinchieri A., Mandressi A.:** ***Patologie prostatiche.*** **Settembre '87.**
30. **Cingolani M.:** ***Manuale di ematologia e citologia ematologica.*** **Novembre '87.**
31. **Kubasik N.P.:** ***Ibridomi ed anticorpi monoclonali.*** **Gennaio '88.**
32. **Andreoli C., Costa A., Di Maggio C.:** ***Diagnostica del carcinoma mammario.*** **Febbraio '88.**

**33. Jannini E.A., Moretti C., Fabbri A., Gnessi L., Isidori A.:*Neuroendocrinologia dello stress.* Marzo '88.**
**34. Guastella G., Cefalù E., Carmina M.: *La fecondazione in vitro.* Maggio '88.**
**35. Runello F., Garofalo M.R., Sicurella C., Filetti S., Vigneri R.: *Il gozzo nodulare.* Giugno '88.**
**36. Baccini C.: *Le droghe d'abuso (2).* Luglio '88.**
**37. Piantino P., Pecchio F.: *Markers tumorali in gastroenterologia.* Novembre '88.**
**38. Biddau P.F., Fiori G.M., Murgia G.: *Le leucemie acute infantili.* Gennaio '89.**
**39. Sommariva D., Branchi A.: *Le dislipidemie.* Febbraio '89.**
**40. Butturini U., Butturini A.: *Aspetti medici delle radiazioni.* Marzo '89.**
**41. Cafiero F., Gipponi M., Paganuzzi M.: *Diagnostica delle neoplasie colo-rettali.* Aprile '89.**
**42. Palleschi G.: *Biosensori in Medicina.* Maggio '89.**
**43. Franciotta D.M., Melzi D'Eril G.V. e Martino G.V.: *HTLV-I.* Giugno '89.**
**44. Fanetti G.: *Emostasi: fisiopatologia e diagnostica.* Luglio '89.**
**45. Contu L., Arras M..: *Le popolazioni e le sottopopolazioni linfocitarie.* Settembre '89.**
**46. Santini G.F., De Paoli P., Basaglia G.: *Immunologia dell'occhio.* Ottobre '89.**
**47. Gargani G., Signorini L.F., Mandler F., Genchi C., Rigoli E., Faggi E. : *Infezioni oppor - tunistiche in corso di AIDS.* Gennaio '90.**
**48. Banfi G., Casari E., Murone M., Bonini P.: *La coriogonadotropina umana.* Febbraio '90.**
**49. Pozzilli P., Buzzetti R., Procaccini E., Signore E.: *L'immunologia del diabete mellito*. Marzo '90.**
**50. Cappi F.: *La trasfusione di sangue: terapia a rischio*. Aprile '90.**
**51. Tortoli E., Simonetti M.T.: *I micobatteri*. Maggio '90.**
**52. Montecucco C.M., Caporali R., De Gennaro F.: *Anticorpi antinucleo*. Giugno '90.**
**53. Manni C., Magalini S.I. e Proietti R.: *Le macchine in terapia intensiva.* Luglio '90.**
**54. Goracci E., Goracci G.: *Gli allergo-acari.* Agosto '90.**
**55. Rizzetto M.: *L'epatite non A non B (tipo C).* Settembre '90.**
**56. Filice G., Orsolini P., Soldini L., Razzini E. e Gulminetti R.: *Infezione da HIV-1: patogenesi ed allestimento di modelli animali*. Ottobre '90.**
**57. La Vecchia C. *Epidemiologia e prevenzione del cancro (I).* Gennaio '91.**
**58. La Vecchia C. *Epidemiologia e prevenzione del cancro (II).* Febbraio '91.**
**59. Santini G.F., De Paoli P., Mucignat G., e Basaglia G., Gennari D.: *Le molecole dell'adesività nelle cellule immunocompetenti.* Marzo '91.**
**60. Bedarida G., Lizioli A.: *La neopterina nella pratica clinica.* Aprile '91.**
**61. Romano L.: *Valutazione dei kit immunochimici.* Maggio '91.**
**62. Dondero F. e Lenzi A.: *L'infertilità immunologica.* Giugno '91.**
**63. Bologna M. Biordi L. Martinotti S.: *Gli Oncogèni*. Luglio '91.**
**64. Filice G., Orsolini P., Soldini L., Gulminetti R., Razzini E., Zambelli A. e Scevola D.: *In - fezione-malattia da HIV in Africa*. Agosto '91.**
**65. Signore A., Chianelli M., Fiore V., Pozzilli P., Andreani D.: *L'immunoscintigrafia nella diagnosi delle endocrinopatie autoimmuni.* Settembre '91.**
**66. Gentilomi G.A.: *Sonde genetiche in microbiologia*. Ottobre '91.**
**67. Santini G.F. , Fornasiero S., Mucignat G., Besaglia G., Tarabini-Castellani G. L., Pascoli L.: *Le sonde di DNA e la virulenza batterica.* Gennaio '92.**
**68. Zilli A., Biondi T.: *Il piede diabetico.* Febbraio '92.**
**69. Rizzetto M.: *L'epatite Delta.* Marzo '92.**
**70. Bracco G., Dotti G., Pagliardini S., Fiorucci G.C.: *Gli screening neonatali.* Aprile '92.**
**71. Tavani A., La Vecchia C.: *Epidemiologia delle patologie cardio e cerebrovascolari.* Luglio '92.**

**72. Cordido F., Peñalva A., De la Cruz L. F., Casanueva F. F., Dieguez C.: *L'ormone della crescita.* Agosto '92.**
**73. Contu L., Arras M.: *Molecole di membrana e funzione immunologica (I)*. Settembre '92.**
**74. Ferrara S.: *Manuale di laboratorio I*. Ottobre '92.**
**75. Gori S.: *Diagnosi di laboratorio dei patogeni opportunisti*. Novembre '92.**
**76. Ferrara S.: *Manuale di laboratorio II*. Gennaio '93.**
**77. Pinna G., Veglio F., Melchio R.: *Ipertensione Arteriosa.* Febbraio '93.**
**78. Alberti M., Fiori G.M., Biddau P.: *I linfomi non Hodgkin.* Marzo '93.**
**79. Arras M., Contu L.: *Molecole di membrana e funzione immunologica (II)*. Aprile '93.**
**80. Amin R.M., Wells K.H., Poiesz B.J.: *Terapia antiretrovirale*. Maggio '93.**
**81. Rizzetto M.: *L'epatite C*. Settembre '93.**
**82. Andreoni S.: *Diagnostica di laboratorio delle infezioni da lieviti*. Ottobre '93.**
**83. Tarolo G.L., Bestetti A., Maioli C., Giovanella L.C., Castellani M.: *Diagnostica con radionuclidi del Morbo di Graves-Basedow.* Novembre '93.**
**84. Pinzani P., Messeri G., Pazzagli M.: *Chemiluminescenza.* Dicembre '93.**
**85. Hernandez L.R., Osorio A.V.: *Applicazioni degli esami immunologici*. Gennaio 94.**
**86. Arras M., Contu L.: *Molecole di Membrana e funzione immunologica. Parte terza: I lnfociti B*. Febbraio '94.**
**87. Rossetti R.: *Gli streptoccocchi beta emolitici di gruppo B (SGB)*. Marzo '94.**
**88. Rosa F., Lanfranco E., Balleari E., Massa G., Ghio R.: *Marcatori biochimici del rimodel - lamento osseo*. Aprile '94.**
**89. Fanetti G.: *Il sistema ABO: dalla sierologia alla genetica molecolare*. Settembre '94.**
**90. Buzzetti R., Cavallo M.G., Giovannini C.: *Citochine ed ormoni: Interazioni tra sistema endocrino e sistema immunitario*. Ottobre '94.**
**91. Negrini R., Ghielmi S., Savio A., Vaira D., Miglioli M.: *Helicobacter pylori.* Novembre '94.**
**92. Parazzini F.: *L'epidemiologia della patologia ostetrica*. Febbraio '95.**
**93. Proietti A., Lanzafame P.: *Il virus di Epstein-Barr*. Marzo '95.**
**94. Mazzarella G., Calabrese C., Mezzogiorno A., Peluso G.F., Micheli P, Romano L.: *Im - munoflogosi nell'asma bronchiale*. Maggio '95.**
**95. Manduchi I.: *Steroidi*. Giugno '95.**
**96. Magalini S.I., Macaluso S., Sandroni C., Addario C.: *Sindromi tossiche sostenute da prin - cipi di origine vegetale*. Luglio '95.**
**97. Marin M.G., Bresciani S., Mazza C., Albertini A., Cariani E.: *Le biotecnologie nella diagnosi delle infezioni da retrovirus umani.* Ottobre '95.**
**98. La Vecchia C., D'Avanzo B., Parazzini F., Valsecchi M.G.: *Metodologia epidemiologica e sperimentazione clinica*. Dicembre '95.**
**99. Zilli A., Biondi T., Conte M.: *Diabete mellito e disfunzioni conoscitive.* Gennaio '96.**
**100. Zazzeroni F., Muzi P., Bologna M.: *Il gene oncosoppressore p53: un guardiano del genoma*. Marzo '96.**
**101. Cogato I. Montanari E.: *La Sclerosi Multipla.* Aprile '96.**
**102. Carosi G., Li Vigni R., Bergamasco A., Caligaris S., Casari S., Matteelli A., Tebaldi A.: *Malattie a trasmissione sessuale.* Maggio '96.**
**103. Fiori G. M., Alberti M., Murtas M. G., Casula L., Biddau P.: *Il linfoma di Hodgkin*. Giugno '96.**
**104. Marcante R., Dalla Via L.: *Il virus respiratorio sinciziale*. Luglio '96.**
**105. Giovanella L., Ceriani L., Roncari G.: *Immunodosaggio dell'antigene polipeptidico tis - sutale specifico (TPS) in oncologia clinica: metodologie applicative.* Ottobre '96.**

**106.Aiello V., Palazzi P., Calzolari E.:** ***Tecniche per la visualizzazione degli scambi cromatici (SCE): significato biologico e sperimentale*****. Novembre '96.**
**107.Morganti R.:** ***Diagnostica molecolare rapida delle infezioni virali*****. Dicembre '96.**
**108.Andreoni S.:** ***Patogenicità di Candida albicans e di altri lieviti*****. Gennaio '97.**
**109. Salemi A., Zoni R.:** ***Il controllo di gestione nel laboratorio di analisi*****. Febbraio '97.**
**110. Meisner M.:** ***Procalcitonina*****. Marzo '97.**
**111. Carosi A., Li Vigni R., Bergamasco A.:** ***Malattie a trasmissione sessuale (2)*****. Aprile '97.**
**112. Palleschi G. Moscone D., Compagnone D.:** ***Biosensori elettrochimici in Biomedicina.*** **Maggio '97.**
**113. Valtriani C., Hurle C.:** ***Citofluorimetria a flusso.*** **Giugno '97.**
**114. Ruggenini Moiraghi A., Gerbi V., Ceccanti M., Barcucci P.:** ***Alcol e problemi correlati*****. Settembre '97.**
**115. Piccinelli M.:** ***Depressione Maggiore Unipolare.*** **Ottobre '97.**
**116. Pepe M., Di Gregorio A.:** ***Le Tiroiditi.*** **Novembre '97.**
**117. Cairo G.:** ***La Ferritina*****. Dicembre '97.**
**118. Bartoli E.:** ***Le glomerulonefriti acute*****. Gennaio '98.**
**119. Bufi C., Tracanna M.:** ***Computerizzazione della gara di Laboratorio*****. Febbraio '98.**
**120. National Academy of Clinical Biochemistry:** ***Il supporto del laboratorio per la diagnosi ed il monitoraggio delle malattie della tiroide.*** **Marzo '98.**
**121. Fava G., Rafanelli C., Savron G.:** ***L'ansia*****. Aprile '98.**
**122. Cinco M.:** ***La Borreliosi di Lyme*****. Maggio '98.**
**123. Giudice G.C.:** ***Agopuntura Cinese.*** **Giugno '98.**
**124. Baccini C.:** ***Allucinogeni e nuove droghe (1)*****. Luglio '98.**
**125. Rossi R.E., Monasterolo G.:** ***Basofili.*** **Settembre '98.**
**126. Arcari R., Grosso N., Lezo A., Boscolo D., Cavallo Perin P.:** ***Eziopatogenesi del diabete mellito di tipo 1*****. Novembre '98.**
**127. Baccini C.:** ***Allucinogeni e nuove droghe (1I)*****. Dicembre '98.**
**128. Muzi P., Bologna M.:** ***Tecniche di immunoistochimica.*** **Gennaio '99.**

**Caleidoscopio**
***Rivista mensile di Medicina***
anno 17, numero 128

**Direttore Responsabile**
Sergio Rassu
Via Pietro Nenni, 6
07100 Sassari
Tel.-Fax 079 270464
Tel. mobile 0338 2202502
E-mail: rassu@ssnet.it

**Responsabile Ufficio Acquisti**
Giusi Cunietti

**EDITORE**

**Consulenti di Redazione**
Giancarlo Mazzocchi ed
Angelo Maggio

**Segretaria di Direzione**
Letizia Cuccuru

**Servizio Abbonamenti**
Fina Grandeppieno
Flavio Damarciasi

...il futuro ha il cuore antico MEDICAL SYSTEMS SpA

Via Rio Torbido, 40
16165 Genova (Italy)
Tel. (010) 83401 Numero Verde 167 801005 (senza prefisso);
Telex 270310 Ideal I.
Telefax (010) 803498- 809070.
Internet URL:http://medicalsystems.editoria.com e http://www.medicalsystems.it
La Medical Systems pubblica anche le seguenti riviste: Journal of Clinical Ligand Assay, Guida Pratica Immulite®, Caleidoscopio, Kaleidoscope, Caleidoscopio letterario, Pandora, Journal of Preventive Medicine and Hygiene, Tribuna Biologica e Medica.

**Stampa**
Tipolitografia ATA
16143 Genova - Via G. Torti, 32 c.r.
Tel. (010) 513120 - Fax (010) 503320

Registrazione Tribunale di Genova n. 34 del 31/7/1996
Iscrizione al Registro Nazionale della Stampa n° 2661 del 2 Settembre 1989

Finito di stampare: Gennaio 1999
Sped. in Abb. Post. 50%

Pubblicazione protetta a norma di legge dall'Ufficio proprietà letteraria, artistica e scientifica della Presidenza del Consiglio dei Ministri, dedicata all'aggiornamento professionale continuo e riservata ai medici.

Caleidoscopio viene anche letto e rilanciato da:
"L'ECO DELLA STAMPA"
Via Compagnoni, 28 - Milano