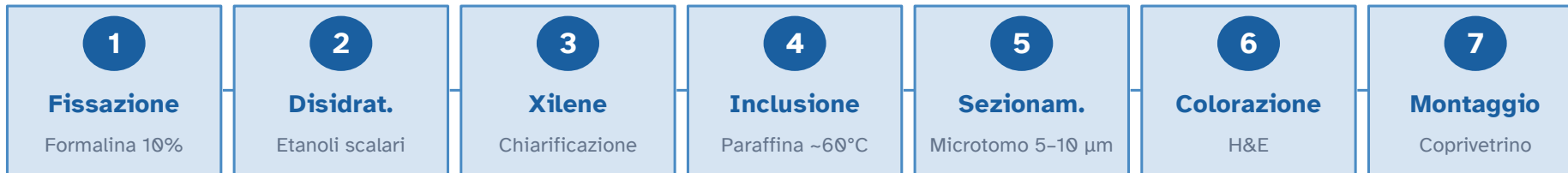


# Processazione Istologica

Dal campione fresco al vetrino definitivo

*Fissazione · Inclusione in paraffina · Sezionamento · Colorazione H&E · Montaggio*

# Panoramica del processo



**Durata totale:** 1-3 giorni per piccoli embrioni (rana, pollo); fino a 1 settimana per embrioni di maiale o sezioni seriali complete.  
**Ogni passo è irreversibile** – un errore di orientamento nel blocchetto compromette l'intera serie.

**Perché la paraffina?** Permette sezioni sottilissime (5-10 µm), conserva la morfologia fine ed è compatibile con la quasi totalità delle colorazioni istochimiche e immunoistochimiche.

Proprietà	Vantaggio	Limitazione
Idrofobicità	Supporto rigido uniforme	Richiede disidratazione completa
Spessore sezione	5-10 µm: dettaglio cellulare	Artefatti da ritiro possibili
Compatibilità	H&E, IHC, FISH, ISH	Non ideale per lipidi

# Fasi 1-4: dal campione al blocchetto

## Fase 1 — Fissazione

**Reagente:** Formaldeide tamponata al 10% (NBF) o PFA 4%

**Meccanismo:** Cross-linking delle proteine → blocco autolisi

**Tempo:** 4-24 h (piccoli embrioni); 24-72 h (maiale)

**Alternativa:** Bouin per embrioni piccoli (migliore morfologia)

## Fase 2 — Disidratazione scalare

**Serie:** EtOH 70% → 80% → 95% → 100% (x2)

**Scopo:** Eliminare l'acqua (la paraffina è idrofoba)

## Fase 3 — Chiarificazione in xilene

**Agente:** Xilene (o sostituti: Histo-Clear, limonene)

## Fase 4 — Inclusione in paraffina

**T°:** Paraffina fusa a ~60°C infiltra i tessuti sotto vuoto

**Blocchetto:** Solidificando forma il supporto rigido per il taglio

**⚠ Orientamento:** Il piano scelto qui determina se la sezione sarà trasversale, sagittale o frontale — non modificabile in seguito

**Standard:** Paraffina per istologia (punto di fusione 56-58°C)

# Fasi 5-6: Sezionamento e Colorazione H&E

## Fase 5 – Sezionamento al microtomo

**Strumento:** Microtomo rotativo (lama d'acciaio o tungsteno)

**Spessore:** 5-10 µm (embrioni); 3-5 µm per dettaglio cellulare

**Raccolta:** Sezioni galleggiano su bagno d'acqua tiepida (~40°C) per distendersi

**Adesione:** Pescate con vetrino trattato con poli-L-lisina o albumina

**Asciugatura:** 37°C overnight (o 60°C per 30 min) prima di colorare

**Sezioni seriali:** Raccolte in sequenza → ricostruzione 3D dell'embrione

**Controllo:** Sezioni con artefatti (coltello, pieghe) escluse dalla serie

## Fase 6 – Colorazione H&E

*Prima: reidratazione (xilene → EtOH scalare → acqua)*

### Ematossilina

**Natura:** Colorante basico (catione)

**Legame:** Strutture acide → DNA, RNA, ribosomi

**Risultato:** Nuclei e cromosomi → blu-viola

### Eosina

**Natura:** Colorante acido (anione)

**Legame:** Strutture basiche → proteine citoplasmatiche, collagene

**Risultato:** Citoplasma, ECM → rosa-arancio

*Dopo H&E: disidratazione rapida → xilene → pronto per montaggio*

Colorazioni alternative: Masson tricromica (connettivo), PAS (glicogeni), Alcian-Blue (GAG)

# Fase 7: Montaggio, Osservazione e QC

## Fase 7 — Montaggio definitivo

**Mezzo:** Eukitt®, DPX o balsamo del Canada (n di rifrazione ~1.52)

**Procedura:** Goccia di mezzo → coprivetrino applicato senza bolle

**Essiccamento:** RT overnight o 37°C (evitare pressione prima del set)

**Scopo:** Protegge il preparato, fissa n di rifrazione → contrasto ottimale

## Osservazione al microscopio ottico

### Obiettivo Uso

- 4x** Panoramica: morfologia generale, piano di sezione
- 10x** Identificazione degli organi e dei tessuti principali
- 20x** Dettaglio tissutale: strati, cavità, strutture
- 40x** Dettaglio cellulare: nuclei, mitosi, morfologia

## Artefatti comuni e cause

Artefatto	Causa	Prevenzione
Retrazione del tessuto	Fissazione insufficiente o troppo lunga	Rispettare i tempi di fissazione
Pieghe nella sezione	T° bagno d'acqua errata o lama consumata	Bagno a 40°C; sostituire lama regolarmente
Colorazione non uniforme	Reidratazione incompleta	Serie graduale completa di reidratazione
Bolle nel montaggio	Eccesso di mezzo o appl. rapida	Calare il coprivetrino ad angolo lentamente