

L'ESAME MICROSCOPICO DEGLI ORGANI EMOPOIETICI

**APPUNTI AD USO DEI MICROSCOPISTI
DILETTANTI**

2[^] Edizione

Marco Brusadin

ROMA - 2010
– PRO MANUSCRIPTO –

AVVERTENZE SUL COPYRIGHT



Questi APPUNTI su L'ESAME MICROSCOPICO DEGLI ORGANI EMOPOIETICI sono rivolti ai Microscopisti dilettanti. Sono stati rilasciati - a titolo completamente gratuito - sotto la Licenza:

Creative Commons Attribuzione-Non commerciale-Non opere derivate 2.5 Italia.

Per leggere una copia della licenza visita il sito web <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/it/>.

L'OPERA È MESSA A DISPOSIZIONE SULLA BASE DEI TERMINI DELLA PRESENTE LICENZA "CREATIVE COMMONS PUBLIC LICENCE" ('CCPL' O 'LICENZA').

L'OPERA È PROTETTA DAL DIRITTO D'AUTORE E/O DALLE ALTRE LEGGI APPLICABILI.

OGNI UTILIZZAZIONE DELL'OPERA CHE NON SIA AUTORIZZATA AI SENSI DELLA PRESENTE LICENZA O DEL DIRITTO D'AUTORE È PROIBITA.

CON IL SEMPLICE ESERCIZIO SULL'OPERA DI UNO QUALUNQUE DEI DIRITTI QUI DI SEGUITO ELENCATI, TU ACCETTI E TI OBBLIGHI A RISPETTARE INTEGRALMENTE I TERMINI DELLA PRESENTE LICENZA AI SENSI DEL PUNTO 8.f.

IL LICENZIANTE CONCEDE A TE I DIRITTI QUI DI SEGUITO ELENCATI A CONDIZIONE CHE TU ACCETTI DI RISPETTARE I TERMINI E LE CONDIZIONI DI CUI ALLA PRESENTE LICENZA.



Creative Commons License Deed

Attribuzione - Non commerciale - Non opere derivate 2.5 Italia

Tu sei libero:

- di riprodurre, distribuire, comunicare al pubblico, esporre in pubblico, rappresentare, eseguire e recitare quest'opera



Alle seguenti condizioni:

Attribuzione. Devi attribuire la paternità dell'opera nei modi indicati dall'autore o da chi ti ha dato l'opera in licenza e in modo tale da non suggerire che essi avallino te o il modo in cui tu usi l'opera.

Non commerciale. Non puoi usare quest'opera per fini commerciali.

Non opere derivate. Non puoi alterare o trasformare quest'opera, né usarla per crearne un'altra.

- Ogni volta che usi o distribuisi quest'opera, devi farlo secondo i termini di questa licenza, che va comunicata con chiarezza.
- In ogni caso, puoi concordare col titolare dei diritti utilizzi di quest'opera non consentiti da questa licenza.
- Questa licenza lascia impregiudicati i diritti morali.

Le utilizzazioni consentite dalla legge sul diritto d'autore e gli altri diritti non sono in alcun modo limitati da quanto sopra.

Questo è un riassunto in linguaggio accessibile a tutti del [Codice Legale \(la licenza integrale\)](#).

Autore: **BRUSADIN Marco**

Titolo dell'opera: **L'ESAME MICROSCOPICO DEGLI ORGANI EMOPOIETICI -
APPUNTI AD USO DEI MICROSCOPISTI DILETTANTI**

Edizioni: I edizione, Marzo 2010 (*pro manuscripto*)

II edizione, Dicembre 2010 (*pro manuscripto*)

PREFAZIONE ALLA SECONDA EDIZIONE

La preparazione della seconda edizione, a meno di un anno dalla prima, di questi APPUNTI si è resa necessaria per emendare alcune sviste e/o imprecisioni purtroppo sfuggite anche in sede di correzione di bozze.

Sono state, inoltre, sostituite con nuove riprese fotografiche alcune immagini della precedente edizione che, in fase di stampa su supporto cartaceo del file distribuito via web, avevano mostrato una resa piuttosto scarsa.

Infine, la Bibliografia è stata completamente rivisitata e spostata in calce al testo.

Confido che questa nuova edizione possa meglio raggiungere gli obiettivi prefissati in sede di prima stesura.

Roma, 16 dicembre 2010

Marco Brusadin

PREFAZIONE ALLA PRIMA EDIZIONE

Questi APPUNTI non hanno, com'è ovvio, alcuna pretesa di esaustività e neppure la benché minima ambizione di proporsi come un testo o come un atlante di istologia o di ematologia: ho voluto esclusivamente offrire un "compagno di viaggio" ai dilettanti che si accostano al meraviglioso mondo della microscopia, con particolare riguardo ai preparati istologici e citologici degli organi emopoietici.

Spero, in tal modo, di poter contribuire ad alleviare le fatiche (soprattutto di ricerca in manuali ben più ponderosi, ma non sempre a... portata di mano) dei principianti; desidero, tuttavia, ricordare ai benevoli lettori che nessun atlante, nessuna descrizione, nessuna immagine potrà mai sostituirsi all'esame strumentale diretto e che ogni buon microscopista ha la necessità di costruirsi il proprio "atlante-catalogo" formato non tanto da immagini, quanto da preparati realizzati e opportunamente conservati per futuri confronti nelle osservazioni.

Le metodiche istologiche descritte si avvalgono - ove non diversamente indicato - esclusivamente della tecnica delle fette e della colorazione con Ematossilina-Eosina, mentre quelle citologiche sono basate sulla realizzazione degli strisci e sulla colorazione con il metodo di May-Grünwald - Giemsa.

Il lettore che desiderasse maggiori informazioni o approfondimenti potrà avvalersi della Bibliografia (anch'essa assolutamente non esaustiva) e di Internet per le proprie ricerche.

Desidero dedicare questo mio modestissimo lavoro alla memoria di uno dei miei più cari Maestri: l'indimenticato Professor Valerio MONESI. I Suoi insegnamenti, la Sua infinita pazienza, la Sua immensa cultura, la Sua accoglienza nei laboratori dell'Istituto di Istologia Umana Normale da Lui diretto, hanno fatto appassionare me e tanti altri Suoi discepoli all'Istologia e alla Citologia, instillando in noi, inoltre, il desiderio di condividere e trasmettere le nozioni e il metodo da Lui appresi.

Ringrazio mia moglie e i miei figli per l'aiuto morale e materiale offertomi nella realizzazione di questo piccolo "sussidio" che, iniziato nel mese di agosto 2009, non avrebbe potuto vedere la luce senza la loro preziosa collaborazione, la loro amabile comprensione e la loro capacità di sopportazione.

Roma, 18 marzo 2010

Marco Brusadin

AVVERTENZE

Ogni manipolazione, anche la più semplice, che comporti l'uso di **sostanze chimiche** o di **materiale biologico** è soggetta (oltre alle **specifiche norme di legge**) a **rischi e pericoli** per l'operatore e per gli altri: chi non fosse sufficientemente preparato - *sia a livello di nozioni sia a livello di manualità* - è vivamente sollecitato (e moralmente tenuto) a **farsi aiutare da una persona esperta!**

In particolare, è bene evitare di agire in casa o in luoghi chiusi: si scelgano spazi e/o locali adeguati e, comunque, ben ventilati e sufficientemente illuminati.

Prima anche solo di stappare una bottiglia, è indispensabile:

- **accertarsi** - leggendo bene l'**etichetta** - del suo contenuto (che non va "annusato" per nessuna ragione!);
- **prendere visione** dei **simboli di pericolo** (inflammabilità, tossicità, ecc.) riportati sulla confezione;
- **informarsi**, se non si è più che sicuri, tramite Internet o consultando il proprio Farmacista sui **rischi** connessi.

Le "**schede di sicurezza**" delle sostanze (di tutte quelle citate in questo lavoro) sono disponibili su internet, alle rispettive voci; ciascuno provveda da sé.

Inoltre, ricordo che i **prodotti chimici** non vanno assolutamente smaltiti tramite la **rete fognaria** o quella dei **rifiuti domestici**: occorre rivolgersi a **Ditte specializzate** o, se queste non fossero reperibili, al proprio **Farmacista** per avere lumi.

Ritengo assolutamente superfluo ricordare che **i materiali biologici sono da considerarsi, sempre, potenzialmente infetti** e vanno smaltiti secondo le norme igieniche appropriate: **niente rifiuti urbani**, se non previa sterilizzazione in autoclave o inattivazione a mezzo fiamma.

Ritengo non superfluo ricordare a tutti che è **assolutamente vietato** dalle normative vigenti (oltre che dal buon senso) **usare bottiglie non chiaramente etichettate** o che - addirittura - rechino l'etichetta di altri prodotti, soprattutto se commestibili!

Spero non ci sia bisogno di sensibilizzare tutti sulla necessità che i prodotti chimici, anche quelli apparentemente innocui, siano **tenuti assolutamente fuori della portata dei bambini e degli animali domestici.**

Inoltre, le persone che vivono con noi debbono essere informate sulla natura dei prodotti che deteniamo; anzi, sarebbe bene farne un **elenco** da tenere a disposizione **per ogni caso di emergenza o necessità**. È bene essere informati sull'ubicazione e sulla reperibilità telefonica del più vicino **Centro Antiveleni**, a cui ci si dovrà rivolgere in ogni caso di intossicazione, anche lieve o semplicemente sospetta, indicando con la maggior precisione possibile la sostanza a cui si attribuiscono i sintomi.

Consiglio di tenere sempre a portata di mano un **estintore a polvere** (almeno del tipo per autovetture), stracci per asciugare eventuali liquidi (in realtà esistono vari prodotti *ad hoc*, come il **Chemizorb**[®] granulare) e **acqua corrente**.

Il **piano di lavoro** deve essere impermeabile e ininfiammabile: meglio il buon vecchio marmo (che peraltro si corrode e si macchia facilmente) piuttosto che il legno o i laminati plastici. L'ideale sarebbe fabbricarsene uno con maioliche bianche opportunamente cementate o, in caso di uso di materiali biologici, rivestito con appositi polimeri lavabili, sterilizzabili e ignifughi (rivolgersi a Ditte specializzate).

Indispensabili, poi, sono il **kit-lavaocchi**, gli **occhiali protettivi** (meglio la **maschera trasparente** tipo giardinaggio), la **maschera antipolveri** (quelle di carta), i **guanti di lattice** (meglio quelli di **vinile per solventi**, per la loro maggiore resistenza alle sostanze chimiche) e il **camice da laboratorio** (che deve essere sempre mantenuto pulito).

Spero sia superfluo ricordare il **divieto assoluto di fumare e di tenere fiamme libere accese** (a meno di aver adottato le **indispensabili precauzioni**).

Attenzione anche allo stato "di salute" dell'**impianto elettrico** il quale deve essere munito di presa a terra e di **salvavita**: può bastare una scintilla in un ambiente in cui siano presenti vapori di alcol, di etere o di altri infiammabili per innescare un incendio o un'esplosione.

Questi APPUNTI sono rivolti a **dilettanti seri e coscienziosi**, capaci di serenità di giudizio e di quell'umiltà che permette di chiedere lumi ed eventualmente aiuto.

DIFFIDO chiunque dall'usare le tecniche descritte per fini diagnostici: incorrerebbe nel reato di **ESERCIZIO ABUSIVO DELLA PROFESSIONE MEDICA!**

Una raccolta dei principali segnali di pericolo relativi ai prodotti chimici (e altri) può essere reperita sul sito: <http://chimica.unical.it/sicurezza/signaletica.html>

In ogni caso, **NON MI ASSUMO ALCUNA RESPONSABILITÀ** per le conseguenze derivate da manipolazioni che chiunque intendesse compiere a seguito della lettura di questi APPUNTI, soprattutto se effettuate in deroga alle vigenti norme di legge e di prudenza "da buon padre di famiglia" che debbono guidare ogni attività umana.

Buone Osservazioni!

Marco Brusadin

INDICE

| | |
|--|--------|
| <i>Prefazione</i> | pag. 4 |
| Avvertenze | 6 |
| <i>L'OSSERVAZIONE DEI PREPARATI EMATOLOGICI E DELLE SEZIONI DEGLI ORGANI EMOPOIETICI</i> | |
| <i>Introduzione</i> | 10 |
| PREMESSA ALLA SECONDA EDIZIONE | 12 |
| L'EMOPOIESI | 16 |
| <i>GLI ORGANI EMOPOIETICI</i> | |
| Midollo Osseo | 25 |
| Timo | 33 |
| Linfonodi | 39 |
| Linfonodi rossi | 48 |
| Follicoli Linfatici delle Mucose | 49 |
| Tonsille | 51 |
| Appendice Vermiforme | 56 |
| Milza | 70 |

INDICE

METODICHE ANALITICHE

PRINCIPALI METODI DI COLORAZIONE

| | |
|--------------------------------------|----|
| Ematossilina-eosina | 81 |
| Colorazione di May-Grünwald - Giemsa | 82 |

REAGENTI

| | |
|-------------------------------|----|
| Tampone Fosfati | 88 |
| Tampone Fosfato-Acido Citrico | 88 |

METODI ISTOCHIMICI

| | |
|-------------------------------|----|
| PAS | 89 |
| FEULGEN | 90 |
| ALCIAN BLU | 91 |
| ALCIAN-PAS | 92 |
| ZINCON | 93 |
| DITIZONE | 94 |
| Reazione cromaffine | 95 |
| Reazione per l'Argentaffinità | 96 |

PREPARAZIONE DI ALCUNI FISSATIVI

| | |
|---------------------------------------|----|
| Fissativo di Carnoy | 97 |
| Soluzione salina di formolo al 10% | 97 |
| Fissativo di Zenker | 97 |
| Formolo calcico di Baker | 97 |
| Miscela Cromato-Bicromato di Potassio | 98 |

| | |
|------------------|----|
| <i>APPENDICE</i> | 99 |
|------------------|----|

| | |
|---------------------|-----|
| <i>BIBLIOGRAFIA</i> | 104 |
|---------------------|-----|

| | |
|-------------|-----|
| <i>NOTA</i> | 112 |
|-------------|-----|

L'OSSERVAZIONE DEI PREPARATI EMATOLOGICI E DELLE SEZIONI DEGLI ORGANI EMOPOIETICI

INTRODUZIONE

Nel Capitolo II di un mio precedente lavoro (“I preparati microscopici - Appunti ad uso dei principianti”, Roma, 2007, reperibile anche sul sito <http://www.funsci.com>), ho trattato dell’allestimento dei preparati ematologici descrivendo tecniche e metodiche che fossero accessibili anche ai dilettanti e ai principianti.

Ora, facendo riferimento al concetto di “studio” (che ritengo opportuno applicare anche ai microscopisti non professionisti), cioè all’apprendimento di nozioni atte ad arricchire il bagaglio culturale personale, traendo il massimo vantaggio dall’osservazione sperimentale diretta, desidero tentare di fornire (senza alcuna pretesa di esaustività) le nozioni basilari per il riconoscimento delle cellule e delle strutture cellulari rinvenibili negli organi emopoietici dopo opportuna preparazione.

Ovviamente, gli interessati ad approfondimenti più professionali potranno documentarsi sia consultando i lavori citati nelle note a piè di pagina, sia con l’uso della bibliografia essenziale che ho posto in fondo a questo mio lavoro, sia consultando Internet o altre fonti bibliografiche.

Tengo comunque a precisare che le tecniche e i protocolli descritti, peraltro in uso nei laboratori non dotati di apparecchiature automatiche, tendono esclusivamente ad aiutare il dilettante (e, perché no, anche lo studente) a comprendere meglio alcuni dati analitici e osservativi.

Per approvvigionarsi del sangue necessario, è assolutamente da proscrivere l’uso di siringhe o il ricorso al prelievo venoso: è decisamente meglio (per varie ragioni, non ultime la sicurezza e l’igiene) adoperare “sangue periferico” intendendo con questa locuzione indicare quello prelevato da un dito, tramite una semplice puntura con uno degli appositi “pungidito” munito di “lancette” sterili monouso (reperibili in farmacia e usati normalmente per l’autodeterminazione della glicemia), previa accurata pulizia e disinfezione della cute.

Per quanto riguarda più specificamente gli organi emopoietici, non potendo ovviamente ricorrere a materiale umano (a meno di frequentare Istituti Anatomici e,

comunque, in tal caso munendosi delle necessarie autorizzazioni del Dirigente), ci si potrà rivolgere a Ditte specializzate in forniture di materiale didattico: esistono, infatti, in commercio collezioni di vetrini anatomici già allestiti, di buona qualità, reperibili (a costi decisamente abbordabili) anche nei negozi specializzati nella vendita di strumenti scientifici.

Tra i vari siti e gruppi di microscopia ai quali rivolgersi per avere riferimenti e consigli in merito, ritengo opportuno segnalare http://tech.groups.yahoo.com/group/microcosmo_italia/: si tratta di una mailing-list e posso garantire che l'accoglienza è delle migliori e la qualità dei suoi componenti veramente rimarchevole.

A livello di sito vero e proprio, mi permetto di citare <http://www.funsci.com> nel quale si trovano (oltre a numerosi spunti interessanti in vari campi della scienza) veri e propri trattati di microscopia ottica.

Non posso, poi, omettere il sito http://spazioinwind.libero.it/andrea_bosi/index.htm anch'esso ricco di spunti riguardanti, oltre la microscopia, numerose discipline scientifiche.

Non è possibile, ovviamente, citare tutti... ma credo sia sufficiente un buon motore di ricerca e un po' di pazienza per trovare tutto ciò che può essere necessario a un dilettante (e non solo).

PREMESSA ALLA SECONDA EDIZIONE

Come ho già dichiarato nella Prefazione alla prima edizione, il presente lavoro NON VUOLE assolutamente sostituirsi a manuali ed atlanti ben più ponderosi e NON VUOLE prescindere dall'esame strumentale: nessuna immagine fotografica potrà mai sostituirsi all'esame diretto dei reperti. I motivi sono vari e facilmente intuibili: poiché la profondità di campo degli obiettivi del microscopio è ridottissima, il microscopista - durante l'osservazione - aggiusta continuamente il fuoco ("fuochetta", come suol dirsi tecnicamente) in modo da avere ben nitida volta per volta l'immagine di piani focali differenti; il cervello memorizza ed elabora le varie informazioni ricevute facendoci percepire l'immagine completa.

La fotografia, al contrario, si limita a registrare (più o meno fedelmente) quanto viene "portato" al sensore (pellicola, CCD, C-Mos, ecc.). Oggigiorno esistono *software* in grado di "sommare" le immagini relative a piani focali diversi, ma il risultato non uguaglia - almeno allo stato attuale della tecnologia - quello osservativo.

Inoltre, la sensibilità dell'occhio umano alla radiazione elettromagnetica di lunghezza d'onda 400-700 nm (la cosiddetta "radiazione ottica") è ben diversa da quella della pellicola o dei vari sensori.

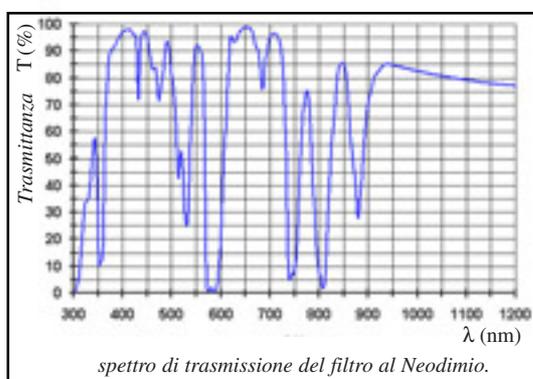
Non ho voluto pubblicare foto eseguite con strumenti altamente professionali (fotomicroscopi), su preparati "eccellenti" per non tradire lo scopo di questo modesto lavoro: essere sussidio e *strumento di stimolo* per microscopisti dilettanti. Ho, pertanto, scelto di riprodurre vetrini "ordinari", colorati con metodi alla portata di tutti e comunemente adottati nei laboratori, usando per le riprese alternativamente sia una fotocamera 24×36 mm analogica (interponendo tra il microscopio e la fotocamera stessa un oculare-adattatore *ad hoc* dotato di ingrandimento 2× o 4×), sia una fotocamera digitale da 7,1 Mpixel (soprattutto per le macrofotografie), sia una videocamera con sensore C-Mos 640×480 pixel (con l'interposizione tra microscopio e videocamera di un oculare fotografico 0,4×). Soprattutto l'uso della videocamera, nonostante l'interposizione dell'oculare 0,4×, ha prodotto (com'era inevitabile, data la piccola dimensione del sensore: 1/4") un ingrandimento notevole dell'immagine. Per ovviare a ciò e non trarre in inganno il lettore, in questa *seconda edizione* in luogo del cosiddetto "ingrandimento originale" - dovuto alle varie combinazioni delle parti ottiche del microscopio - ho preferito riportare solo le caratteristiche dell'obiettivo usato, nonché la "scala metrica di riferimento".

L'argomento relativo alla "fotomicrografia al microscopio con fotocamere digitali" è stato trattato magistralmente dal Dott. Giovanni Pietro SINI il quale è autore di numerose altre pubblicazioni (anche molto professionali e ponderose) reperibili nel sito: <http://www.funsci.com> nella sezione dedicata alla Microscopia Ottica.

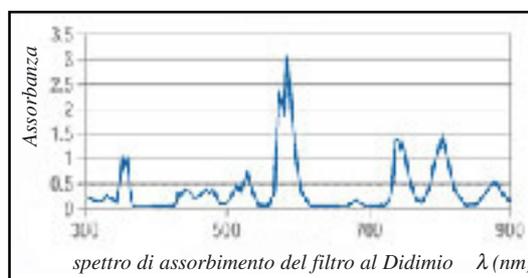
Altre preziose informazioni sulla fotomicrografia possono essere reperite nel testo di Paolo CASTANO, *Microscopia ottica e Fotomicrografia*, nonché in: KODAK, *Photography through the Microscope*, entrambi citati in bibliografia.

Sono stati utilizzati (omessi i nomi delle Case costruttrici) i seguenti obiettivi: 4/0,10 plan-acromatico; 10/0,25 plan-acromatico; 10/0,25 epi-plan; 25/0,40 plan-acromatico; 40/0,95 apocromatico; 60/0,85 plan-acromatico; 100/1,32 NPL Fluotar semiapocromatico (alla Fluorite) a immersione in olio. L'illuminazione ha, generalmente, rispettato il principio di Koëler; per l'obiettivo 4/0,10, tuttavia, è stato necessario privare il condensatore (aplanatico-acromatico con A.N. 1,25 se "immerso in olio" e A.N. 0,95 se usato "a secco") della "cappa" superiore e, talvolta, si è dovuto sostituire il condensatore stesso con un vetro smerigliato posto al di sopra del diaframma di campo.

La maggior parte delle foto è stata ripresa con l'uso di un *filtro al Neodimio* per correggere la risposta della pellicola (o anche del sensore digitale) alla radiazione ottica, attenuando quella di lunghezza d'onda compresa tra 500 e 600 nm nei confronti di quelle di lunghezza d'onda di 400-500 nm (corrispondente alla banda di trasmissione dell'ematosilina, ecc.) e di 620-700 nm (corrispondente alla banda di trasmissione dell'eosina, della fucsina, ecc.).



In realtà, sarebbe richiesto un *filtro al Didimio*, di cui a fianco è riportato lo spettro di assorbimento. Il Didimio, ritenuto fino al 1885 elemento a sé, in realtà è una miscela di due elementi (dal gr. διδυμος = gemello), Neodimio e Praseodimio, spesso associati con il Lantanio.



Le riprese su pellicola sono state effettuate con emulsione pancromatica a colori per luce diurna, con *rapidità* (o *sensibilità*, se si preferisce) di 100 ISO.

La conversione della temperatura di colore, da quella della lampada alogena da 12 V 50W del microscopio (3400 Kelvin) a quella della luce diurna (5500 Kelvin) richiesta dal tipo di emulsione fotografica, è stata realizzata con filtro in vetro 80B (80 A per alcuni preparati inclusi in Balsamo del Canada).

Utili informazioni sui filtri per usi scientifici possono essere reperite, ad esempio, nella pubblicazione *Kodak Filters for Scientific and Technical Uses*, citata in bibliografia. Per evitare l'“abbagliamento” dei sensori digitali si è reso necessario, ai minori ingrandimenti, inserire - al di sotto del condensatore - due filtri *Neutral Density* con assorbimento rispettivamente 50% e 25%, in aggiunta a quello al Neodimio.

Il “fotoritocco” è stato ridotto al minimo indispensabile: le immagini, originariamente riprese in formato *bit-map* (sia quelle provenienti direttamente dal sensore sia quelle acquisite tramite scanner piano per pellicole negative e/o positive) alla risoluzione di 600 dpi a 24 bit (milioni di colori), sono state “depurate” del “fondo” tramite apposito programma *free* (reperibile su Internet) “Background Subtraction Toolkit”. L’aggiustamento della luminosità e del contrasto e il ridimensionamento delle immagini è stato effettuato con un altro programma *free* (“Axiovision”) reperibile anch’esso in rete.

Talvolta, peraltro, è stato necessario intervenire “più profondamente” sul cromatismo o su altre caratteristiche delle immagini, al fine di renderle il più fedeli possibile all’osservazione microscopica originale.

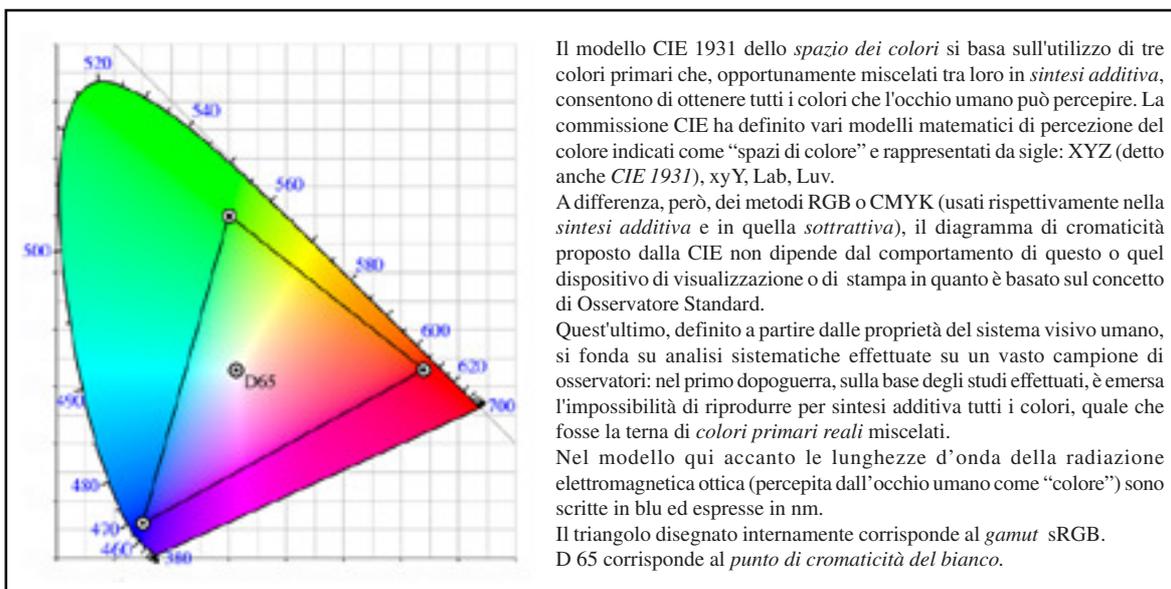
Alcune immagini sono state sostituite: le nuove riprese sono state effettuate (in formato *NEF*, *Nikon Electronic Format*, [simile al *RAV*], convertito poi in *jpeg*) con fotocamera digitale reflex dotata di sensore CCD da 10,1 Mpixel, munita di apposito “adattatore” (dotato di lente apocromatica) e montata sull’oculare fotografico al posto della fotocamera analogica.

Il monitor, utilizzato per realizzare sia le riprese, sia l’elaborazione, sia l’impaginazione, è del tipo TFT (*Thin Film Transistor*) antiriflesso settato alla definizione di 1680×1050 pixel, regolato per una temperatura di colore di 6500 Kelvin (*gamma* 2,2 [di *default*]). Il lavoro si è svolto nelle più disparate ore diurne e notturne (e, dunque, in condizioni di luce estremamente variabili): per poter visualizzare le immagini in condizioni il più possibile standardizzate e riproducibili, è stato utilizzato un apposito “densitometro” (forse, sarebbe meglio chiamarlo “fotocolorimetro”) digitale il quale, una volta azzerato e calibrato il monitor, è in grado di testare continuamente la luce-ambiente e di adeguarvi lo schermo.

I monitor lavorano in RGB, cioè utilizzano tre segnali distinti per generare il “rosso”, il “verde” e il “blu”, *approssimando* gli altri colori.

Nessun genere di schermo è in grado di riprodurre l’intera gamma della radiazione ottica percepibile dall’occhio umano: la resa cromatica dipende in buona parte dalla retroilluminazione e dalla monocromaticità dei colori RGB dei *subpixel*.

Le lampade a scarica utilizzate per la retroilluminazione del *display* consentono di ottenere risultati discreti e l’attuale uso di *led* (acronimo di *Light Emitting Diode* = diodo emettitore di luce) permette di migliorare ulteriormente il livello di monocromaticità dei tre “colori fondamentali”, con il conseguente effetto di aumentare la superficie del *gamut*, cioè di quel triangolo disegnato nel grafico che rappresenta il cosiddetto “spazio dei colori” sancito dalla *Commission Internationale de l’Eclairage* (CIE) nel 1931 riprodotto nella pagina seguente; tale triangolo ha per vertici i tre colori RGB e rappresenta le sfumature di colore riproducibili dal *display*.



Inoltre, poiché non è possibile ottenere con una stampante a getto d'inchiostro (benché settata ad alta definizione e munita del medesimo "profilo colore" del monitor) la stessa resa dell'immagine a video e ritenendo che l'utente medio di questo manuale sia dotato di una normale stampante, si è cercato un compromesso che, tuttavia, privilegiasse la visione al monitor. Per la stampa su carta, suggerisco di usare la "patinata" almeno per le pagine a colori: ha un costo decisamente superiore, ma l'incremento in qualità è veramente notevole; io ho usato la patinata da 120 g/m² che consente una risoluzione di 720/1440 dpi. Ottima è anche la carta "fotografica lucida" (*glossy*) da 190 o da 225 g/m². Ritengo del tutto superfluo rammentare che, nel passare dal formato *bmp* originale (600 dpi e milioni di colori) al *jpeg* standard per il web (72 dpi e 256 colori), sia la definizione sia la profondità di colore delle immagini sono state sacrificate. Per comodità del lettore, onde poter visualizzare nel modo più fedele possibile, almeno sotto il profilo cromatico, le immagini riprodotte, qui sotto è riportata la scala di controllo usata nelle riprese fotografiche e nella successiva stampa sia su video sia su carta.



Nonostante abbia posto la massima cura nella stesura e nella revisione del lavoro, l'errore è sempre in agguato: ne chiedo anticipatamente venia e sarò profondamente grato a chi, riscontrando ulteriori inesattezze, me ne farà segnalazione.

Roma, 16 dicembre 2010

Marco Brusadin
m.brusadin@mclink.it

L'EMOPOIESI

È noto che le cellule ematiche hanno una vita limitata: il processo con cui esse vengono rimpiazzate al termine del loro ciclo prende il nome di **emopoiesi** (o **ematopoiesi**), dal greco **αιμα** [àima]= sangue e **ποιησις** [poièsis]= creare; la loro “produzione” avviene non nel sangue circolante, bensì negli organi “emopoietici” suddivisi in *organi mieloidi* (rappresentati, nell'uomo, dal midollo osseo) e *organi linfoidi* (costituiti dal timo, dai linfonodi - detti anche linfoghiandole -, dalla milza, dal tessuto linfoide presente nelle membrane mucose delle vie respiratorie e delle vie digerenti, nonché in parte anche dal midollo osseo: quest'ultimo, infatti, oltre a produrre eritrociti, granulociti, monociti e trombociti [o piastrine], genera anche i linfociti B, sostituendosi - dunque - nell'uomo e nei mammiferi alla *Borsa di Fabrizio*, presente negli uccelli, nella genesi di questa famiglia di linfociti).

Negli organi emopoietici la genesi cellulare avviene a partire da uno o più elementi precursori, le *cellule staminali*, definite come “cellule indifferenziate capaci di differenziarsi in tutte o in alcune linee cellulari ematiche”⁽¹⁾ pur rimanendo numericamente costanti per mezzo di una serie indefinita di divisioni.

Gli studi di tale meccanismo hanno permesso di formulare le due più accreditate teorie odierne; è maggiormente diffusa quella della *mitosi bivalente* che si fonda sull'ipotesi che ciascuna cellula staminale, dividendosi, dia origine a due cellule figlie una delle quali - poi - si differenzia mentre l'altra mantiene i caratteri di cellula staminale che - in seguito - subirà una nuova mitosi bivalente.

L'altra ipotesi, detta delle *mitosi equivalenti*, sostiene, invece, che gli elementi staminali subiscano due tipi di mitosi, uno dei quali produrrebbe solo cellule figlie differenziantesi, mentre l'altro produrrebbe solo cellule figlie non in grado di differenziarsi e che - dunque - manterrebbero i caratteri staminali per poi ulteriormente dividersi.

Le cellule ematiche, dunque, possono essere contenute nel *pool staminale* o nel *pool circolante* e il trasferimento dall'uno all'altro avviene - in condizioni fisiologiche - esclusivamente a maturazione compiuta. I linfociti, tuttavia, anche in condizioni fisiologiche fuoriescono temporaneamente dal pool circolante per stazionare - per un tempo variabile - nei linfonodi.

In condizioni flogistiche oppure in presenza di sostanze o corpi estranei i granulociti, i linfociti e i monociti abbandonano - per *diapedesi* (dal greco **δια** [dià]= attraverso e **πηδησις** [pèdesis] = saltare) - i vasi sanguigni e penetrano nel tessuto connettivo dove svolgono funzioni loro proprie.

(1) - V. MONESI, *Istologia*, Piccin Editore, Padova, 1980², p. 667.

Tutte le cellule ematiche, al termine del loro ciclo vitale, fuoriescono dal *letto circolatorio* e vengono distrutte nel tessuto connettivo; la loro genesi è stata oggetto di ampie discussioni a partire dagli anni '20 del secolo XX quando, nel reparto di ematologia dell'Università di Pavia, ad opera del professor Adolfo Ferrata (1880-1946) è iniziato lo studio sistematico di queste cellule.

Fino a non molti anni orsono, tre erano le teorie emogenetiche:

a) la *Teoria unitaria* di Ferrata, secondo la quale tutte le cellule ematiche deriverebbero da un unico elemento, l'*emocitoblasto*, il quale darebbe origine a eritroblasti, granulociti, monociti e megacariociti, se localizzato nel midollo (*emocitoblasto mieloide*), oppure genererebbe linfociti, se localizzato negli organi linfatici (*emocitoblasto linfoide*).

Entrambi gli emocitoblasti deriverebbero da un'unica cellula mesenchimale, l'*emoistioblasto*;

b) la *Teoria dualistica* di Naegeli: gli emoistioblasti mieloide e linfoide sarebbero profondamente differenti tra loro sia funzionalmente sia geneticamente;

c) la *Teoria trialistica* di Schilling: ai due emoistioblasti della teoria di Naegeli aggiunge una ulteriore categoria istioide, dalla quale deriverebbero i monociti.

Attualmente, a seguito dell'introduzione delle tecniche funzionali e immunologiche accanto alle metodiche d'indagine morfologica, si è orientati verso la genesi da cellule staminali pluripotenti in grado di differenziarsi nelle diverse linee cellulari ematiche. Appare opportuno ricordare che il termine "cellule staminali" è la traduzione italiana di *stem cells* = "cellule stelo" [dal latino *stamen* = stame, filo del destino].

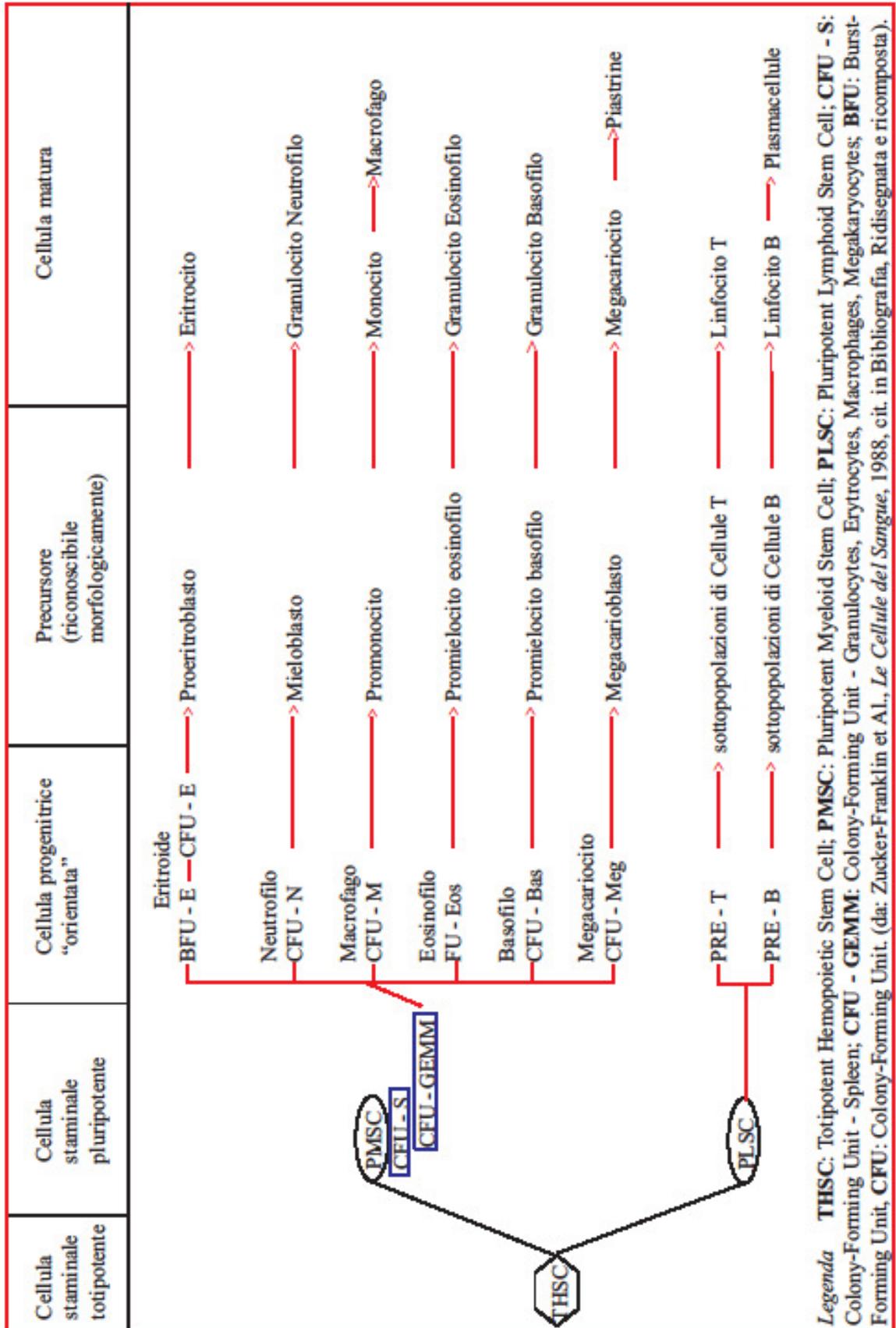
Le cellule staminali pluripotenti, alle quali accennavo sopra, derivano da un'unica *cellula staminale totipotente* (THSC = *Totipotent Hemopoietic Stem Cell*) e si suddividono in due "tipi": *mieloide* (PMSC = *Pluripotent Myeloid Stem Cell*) e *linfoide* (PLSC = *Pluripotent Lymphoid Stem Cell*).

Da questi due tipi di cellule pluripotenti si "differenziano" le due "linee cellulari" (mieloide e linfoide) che danno origine, poi, alle cellule ematiche mature.

Il contributo più importante alla dimostrazione dell'esistenza di un'unica cellula staminale totipotente nell'ematogenesi è dovuto a Till e McCulloch⁽²⁾ i quali coniarono anche l'acronimo CFU (*Colony-forming unit*) o CFC (*Colony-forming cell*) da loro attribuita alla Cellula Staminale Pluripotente [MONESI].

Per comodità del lettore, riporto sinteticamente - nella pagina seguente - lo schema della differenziazione ematocellulare:

(2) - A.J. BECKER - E.A. McCULLOCH - J.E. TILL, *Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells*, NATURE, 197: 452-454, 1963.



Occorre evitare confusioni terminologiche: a rigor di termini, Cellula Staminali Totipotente è quella in grado di differenziarsi in qualsiasi tipo di tessuto. Le altre cellule staminali saranno Pluripotenti (se sono in grado di differenziarsi solo in alcuni ben determinati tipi tissutali) o Unipotenti (od “orientate” se, invece, sono in grado di differenziarsi in un unico tipo di tessuto).

Ecco perché è necessario specificare che, nel nostro caso, si tratta di **Cellule Staminali Emopoietiche Totipotenti** (oppure Pluripotenti oppure Unipotenti o “Orientate”) e non semplicemente Cellule Staminali Totipotenti, ecc.

Monesi, ad esempio, usa il termine “Cellula Staminali Pluripotente” per indicare la THSC.

La morfologia della Cellula Staminali CFU non è nota e la sua esistenza viene desunta da dati osservativi indiretti.

Nell’Embrione umano, l’emopoiesi avviene in tre fasi: *preepatica*, *epatica* e *definitiva*⁽³⁾.

La *fase preepatica* ha inizio verso la fine della seconda settimana di gravidanza; origina in sede extraembrionale, nella parete del sacco vitellino e, successivamente, interessa - sia pure in misura molto modesta - anche il mesenchima presente nel corpo dell’embrione.

Nel mesenchima interposto tra la splancnopleura e l’endoderma del sacco vitellino, gruppi di cellule mesenchimali si organizzano nelle cosiddette **Isole Sanguigne di Wolff**, i cui *elementi periferici* si appiattiscono e formano l’*endotelio vasale primitivo*. Quest’ultimo secerne il liquido plasmatico primitivo mentre gli *elementi cellulari centrali* rimangono inclusi nei *tubi endoteliali* e si differenziano nelle *cellule staminali primitive*.

Queste cellule staminali iniziano assai precocemente ad elaborare l’*Emoglobina*, trasformandosi in tal modo in *eritroblasti primitivi* che, inseriti nel circolo, si differenziano in *eritroblasti* (*basofili*, *policromatofili* e *ortocromatici*) fino a divenire eritrociti primitivi.

Morfologicamente, gli eritrociti primitivi si differenziano da quelli definitivi (*normociti*) sia per il loro maggiore volume (*megalociti*), sia perché generalmente conservano il nucleo. Ben presto, tuttavia, i megalociti degenerano e scompaiono, venendo sostituiti dagli eritrociti definitivi che originano in parte dal sacco vitellino e soprattutto nel fegato.

Nel periodo preepatico la genesi di granulociti e di megacariociti è assai scarsa.

(3) - Questa “sessione” è tratta (con modifiche) da: V. MONESI, *Istologia, cit.*, p. 668 sgg.

In definitiva, è da osservare che, nel periodo preepatico, l'emopoiesi avviene intravascolarmente, mentre la moltiplicazione cellulare avviene nel circolo ematico. Infine, l'emopoiesi cosiddetta vitellina diminuisce significativamente già verso la settima settimana di vita embrionale, ma continua in misura ridotta - sovrapponendosi - con quella epatica.

La *fase epatica* dell'emopoiesi, nell'embrione umano, ha inizio verso la fine del secondo mese di vita intrauterina e diminuisce rapidamente verso il quinto mese, pur continuando a ritmo ridotto fino al termine della gravidanza e proseguendo, poi, fino alla prima settimana di vita extrauterina, sovrapponendosi all'emopoiesi definitiva.

Cellule staminali pluripotenti si accumulano nel mesenchima presente negli spazi esistenti tra le travate di cellule epiteliali epatiche e la parete dei capillari sanguigni; qui proliferano e si differenziano dapprima in eritroblasti e poi in eritrociti definitivi (normociti) e - in misura assai inferiore - in mielociti e megacariociti.

Gli eritrociti, una volta espulso il nucleo, attraversano la parete dei *sinusoidi epatici* e migrano, così, nella circolazione generale.

Si ritiene che le cellule staminali epatiche, in realtà, originino nel sacco vitellino, pur non potendosi escludere totalmente - almeno per una parte di esse - l'epatogenesi. Appare opportuno ricordare che, nonostante l'attività emopoietica epatica tenda a declinare a decorrere dal 7° mese di vita intrauterina - per poi scomparire del tutto dopo la nascita - il fegato mantiene comunque la sua capacità emopoietica che, in alcune circostanze, può riattivarsi e che viene pertanto chiamata *ematopoiesi extramidollare*.

In definitiva, l'emopoiesi epatica - a differenza di quella vitellina - avviene extravascolarmente ed è sensibile all'ormone *eritropoietina* (Epo).

Nella fase epatica, inoltre, si formano e si sviluppano piccoli focolai emopoietici nella milza: l'emopoiesi splenica, tuttavia, nell'uomo inizia verso il terzo mese e termina verso il quinto mese di gestazione (a differenza di altri mammiferi, ad esempio il topo nel quale essa prosegue per tutta la vita).

La *fase definitiva* dell'emopoiesi inizia, nell'essere umano, verso il 5° - 6° mese di vita intrauterina (sovrapponendosi gradualmente alla fase epatica) e dura tutta la vita.

Le sue connotazioni principali sono:

- la localizzazione nel *midollo osseo*;
- lo sviluppo degli organi linfoidi primari (*Timo e Borsa di Fabrizio* [negli Uccelli] o suo equivalente [nei Mammiferi]);
- lo sviluppo degli organi linfatici secondari (*Linfonodi, Milza e Tessuto Linfatico*)

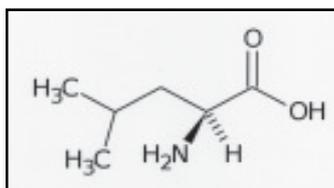
disseminato in vari distretti del tessuto connettivo).

Nella transizione dell'emopoiesi dalla fase embrionale a quella fetale e da quest'ultima a quella adulta, l'*Emoglobina* embrionale viene sostituita da quella fetale (**HbF**) e quest'ultima, infine, da quella adulta (**HbA** e **HbA₂**).

L'emoglobina fetale (detta anche *Emoglobina F* o *HbF*) è predominante nella vita fetale e nella prima infanzia. Alla nascita, il suo valore medio è del 75% circa, ritenendosi Valori Normali quelli compresi nel range 55 - 98%. Nei bambini e negli adulti si reperta unicamente in tracce, rispetto all'emoglobina totale.

L'eventuale presenza abnorme di HbF nell'adulto (> 2%) ha significato patologico; un lieve aumento può riscontrarsi, durante la gravidanza, nel 20-25% delle donne. L'Emoglobina fetale è ricca di Leucina [formula "bruta": C₆H₁₃NO₂] (aminoacido *essenziale*, cioè che il corpo umano non è in grado di sintetizzare, e che deve essere, dunque, introdotto tramite l'alimentazione) della quale - invece - è priva l'Emoglobina A.

La formula di struttura "condensata" della Leucina è HO₂CCH(NH₂)CH₂CH(CH₃)₂ e la formula di struttura "stenografica" è riportata qui sotto:



Dal punto di vista chimico si tratta di un aminoacido *apolare*, a struttura ramificata, *chirale*⁽⁴⁾; la sua denominazione IUPAC è: *acido 2(S)-ammino-4-metilpentanoico*. L'HbF ha una maggiore solubilità e una minore velocità di migrazione rispetto all'HbA ed è molto resistente all'azione denaturante degli alcali. Su queste (e su altre) sue proprietà si fondano alcuni metodi analitici di identificazione (es.: metodo di **Singer**, metodo di **Joep-O'Brien**, ecc.).

(4) - In chimica, è detta *chirale* una molecola che ammette un'immagine speculare non sovrapponibile a sé. Una molecola è detta *achirale*, se - invece - è sovrapponibile alla propria immagine speculare.

Per comodità del lettore riprendo e sintetizzo qui appresso le varie fasi dell'emopoiesi e la morfologia delle cellule emopoietiche.

Innanzitutto, è bene osservare che, a fronte dell'affermazione (riferita a pag.17 del presente lavoro) circa la non conoscenza della morfologia della Cellula Staminate Totipotente (THSC), alcuni Autori⁽⁵⁾, identificandola con l'Emoistioblasto, ne danno la seguente descrizione:

“Cellula di grandezza variabile da 20 a 40 μ , con abbondante citoplasma a contorni spesso non ben definiti, lievemente basofilo occasionalmente contenente granuli azzurrofilii. Il nucleo, generalmente ovale, è di piccolo volume (rapporto nucleo/citoplasma nettamente a favore di quest'ultimo) ed è situato lungo l'asse maggiore della cellula. La cromatina assume generalmente colore rosa-pallido e ha una trama finemente reticolare. Generalmente sono presenti uno o due nucleoli”.

Per contro, altri Autori, riferendo che l'esistenza, nell'uomo, di una cellula staminale totipotente (THSC) comune sia al sistema mieloide sia a quello linfoide può essere desunta da studi su soggetti leucemici o comunque affetti da altre patologie linfoproliferative, ne stimano la frequenza in circa 1:1000 cellule nucleate del midollo osseo e, pur ammettendo l'inesistenza di caratteristiche in grado di consentirne una identificazione certa, ne stimano la morfologia come simile a quella dei linfociti⁽⁶⁾. L'esistenza di una PMSC (*Pluripotent Myeloid Stem Cell* = Cellula Staminate Mieloide Pluripotente) in grado di originare i progenitori delle linee cellulari eritroide, megacariocitica e granulocitica può desumersi sia dalla osservazione di isolotti emopoietici nel midollo di feti umani (nelle quali si repertano colonie miste in luogo di popolazioni cellulari omogenee fin dagli inizi dell'emopoiesi), sia dall'osservazione - in topi irradiati - di colonie spleniche nelle quali il ripopolamento eritro-megacario-granulocitico avviene ad opera di cellule mieloidi⁽⁷⁾.

La PMSC è stata denominata CFU-S (*Colony - Forming Unit - Spleen* = Unità Formante Colonie Spleniche) e, nonostante non esista nell'uomo un test *in vivo* analogo a quello in uso per le CFU-S del topo, è stato tuttavia sviluppato un metodo *in vitro*⁽⁸⁾ ritenuto in grado di identificare cellule staminali pluripotenti mediante la formazione di colonie miste di granulociti, eritrociti, macrofagi e megacariociti, denominate CFU-GEMM.

(5) - Cfr., ad es.: G. McDONALD - T.C. DODDS - G. CRUICKSHANK, *Atlante di Ematologia*, E.M.S.I., Roma, 1979⁴, pag. 3.

(6) - Cfr., ad es.: D. ZUCKER-FRANKLIN - G. GRUSKY - P. L'ESPERANCE, *Granulocyte colonies derived from lymphocyte fractions of normal human peripheral blood*, *PROC. NATL. ACAD. SCI., USA*, 71: 2711-2714, 1974.

(7) - A.J. BECKER - E.A. MCCULLOCH - J.E. TILL, *Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells*, *NATURE*, 197: 452-454, 1963.

(8) - A.A. FAUSER - H.A. MESSNER, *Identification of megakaryocytes, macrophages and eosinophils in colonies of human bone marrow containing neutrophilic granulocytes and erythroblasts*, *BLOOD*, 53: 1023-1027, 1979.

Un ulteriore sostegno alla tesi dell'esistenza delle cellule staminali pluripotenti viene dalla presenza del **cromosoma Philadelphia** (Ph) negli eritrociti, nei granulociti, nei macrofagi e nei megacariociti di soggetti umani colpiti da Leucemia Mieloide Cronica (CML)⁽⁹⁾.

A quanto sopra si aggiunge anche la distribuzione - sempre nella CML e in altri disordini mieloproliferativi - degli isoenzimi della **G-6-PD** (Glucosio-6-Fosfato Deidrogenasi)⁽¹⁰⁾.

Quanto sopra esposto, unitamente ad altre evidenze di laboratorio soprattutto su soggetti umani sottoposti a trapianto, conducono - dunque - ad ammettere l'esistenza della PMSC.

Nel topo, inoltre, è stata dimostrata l'esistenza di una THSC (comune, dunque, sia al sistema mieloide sia a quello linfoide); nell'uomo, benché non sia stato tuttora possibile identificarla, la sua esistenza può tuttavia essere dedotta da numerosi studi sulle leucemie e su altre malattie mieloproliferative⁽¹¹⁾.

A proposito delle cellule staminali va detto che il loro numero è piuttosto scarso, attestandosi su 1 per 1.000 cellule nucleate midollari.

Va ancora osservato che, in condizioni di normalità, tanto le PMSC quanto le PLSC non presentano una proliferazione attiva⁽¹²⁾ e non sono noti neppure i fattori che la regolano.

Sia le PMSC sia le PLSC generano le cosiddette "cellule progenitrici orientate" le quali si differenzieranno, poi, nei precursori (riconoscibili morfologicamente) delle varie "linee cellulari" (cfr.: tabella riassuntiva a pag. 16 del presente lavoro⁽¹³⁾); anche queste cellule progenitrici sono numericamente piuttosto scarse nel midollo, essendovi presenti in rapporto di circa 1:500 elementi nucleati. Morfologicamente, le cellule progenitrici orientate delle serie neutrofilica e monocitica (CFU-NM) presentano grande somiglianza con i linfociti.

Va sempre tenuto presente che la transizione da un elemento a quello successivo nella linea proliferativa non avviene in modo brusco: è facile, pertanto, reperire elementi con caratteristiche "intermedie" tra uno stadio e l'altro della maturazione cellulare.

(9) - J. WHANG - E. FREI III - J.H. TJIO, P.P. CARBONE - G. BRECHER, *The distribution of the Philadelphia chromosome in patients with chronic myelocytic leukemia*, *BLOOD*, 22: 664-673, 1963.

(10) - J.W. ADAMSON - P.W. FIALKOW, *The pathogenesis of myeloproliferative syndromes*, *BRIT. J. HAEMATOL.*, 38: 299-303, 1978.

(11) - Una rassegna bibliografica in merito può essere reperita in: D. ZUCKER-FRANKLIN ET AL., *Le Cellule del Sangue*, cit., Vol. I, pag. 23 ai nn. 11-14.

(12) - D. ZUCKER-FRANKLIN - G. GRUSKY - P. L'ESPERANCE, *Granulocyte colonies derived from lymphocyte fractions*, cit.

(13) - Una tavola illustrante le varie cellule delle 7 linee di elementi corpuscolati del sangue può essere reperita, ad esempio, in: V. MONESI, *Istologia*, cit., fig. 20, pag. 665.

Vds. anche, ad esempio: <http://www.marcoruggiero.org/pdf/2005%20CelluleSangue.pdf>

GLI ORGANI EMOPOIETICI

MIDOLLO OSSEO

È il principale organo emopoietico nella seconda metà dello sviluppo fetale e nella vita postnatale.

È contenuto nelle cavità midollari delle ossa e ha funzioni osteogeniche.

Ha proprietà immunologiche e partecipa alle funzioni generali del tessuto connettivo. Svolge anche un'importante funzione *ematoclastica* (dal greco **αιμα** [àima]= sangue e **κλαω** [klàò]= rompo, spezco), cioè di distruzione delle cellule ematiche al termine del loro ciclo vitale.

Mentre nel feto la maggior parte del midollo (chiamato *midollo rosso* per il suo colore dovuto alle numerose cellule della serie rossa in esso presenti) ha funzioni emopoietiche, durante il periodo di accrescimento la maggior parte di esso perde queste funzioni e diviene *midollo giallo*, così denominato a causa del colore giallastro ad esso conferito dalla degenerazione *adipocitica* delle sue cellule.

Nell'adulto il *midollo rosso* "funzionante" si reperisce quasi esclusivamente della diploe delle ossa della volta cranica, nelle coste, nello sterno, nei corpi vertebrali e nella parte spugnosa di alcune ossa piatte e delle estremità prossimali del femore e dell'omero. Ciò spiega perché, nella diagnostica ematologica, si procede - ad esempio - al cosiddetto *puntato sternale* (o effettuato in altre sedi, come *la cresta iliaca*).

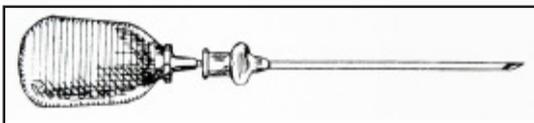


fig. 1. Un "classico" ago da puntura sternale (agoaspirato) provvisto di mandrino e di attacco conico per siringa Record.



fig. 2. Ago di Baserga, provvisto di mandrino e di regolatore della profondità, per biopsia/aspirazione midollare.



fig. 3. Un modernissimo ago di Goldenberg per biopsia midollare: la cannula è lunga ~127 mm

Sul sito <http://www.mysnarecoil.com/MySnareCoil/Steps.asp> è possibile visionare un filmato dell'intera procedura di biopsia midollare.

Con le tecniche di inclusione in resine sintetiche (es.: Araldite, Metacrilato, ecc.) si ottengono fettine “semisottili” di spessore 0,1-2 μ : ciò ha consentito una maggiore diffusione della biopsia midollare che permette una miglior valutazione della cellularità, in riferimento anche ad altre componenti come le trabecole ossee, gli osteoblasti, gli osteoclasti, i vasi e il tessuto adiposo (che si presenta otticamente vuoto)⁽¹⁴⁾.

L'Agoaspirato midollare si differenzia dalla Biopsia del midollo per l'uso di un ago molto più sottile al quale è collegata una siringa con cui si effettua il prelievo: si tratta un'operazione meno invasiva e meno dolorosa. Mentre con la biopsia, infatti, si preleva una parte di tessuto osseo solido contenente il midollo (che si reperisce come un “cilindretto” nel lume dell'ago e che poi viene espulso, fissato e trattato con le tecniche istologiche), con l'agoaspirato si prelevano invece tessuto e sangue midollare: il prelievo può essere effettuato anche da ossa più sottili, come lo sterno, mentre la biopsia viene generalmente effettuata sulla cresta iliaca posteriore.

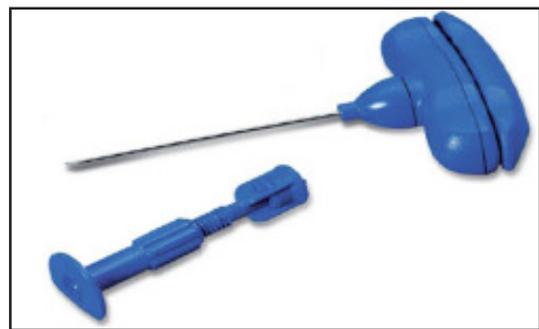


fig. 4 a)

b)

fig. 4 a-b). Ago “Illinois” per aspirazione midollare sternale e iliaca; a) completo; b) con regolatore di profondità smontato.

I moderni aghi da aspirazione midollare sono morfologicamente assai simili a quelli da biopsia: ne differiscono per il diametro, molto più sottile. Un ago da biopsia ha un *gauge* solitamente compreso tra 8G e 13G e una lunghezza compresa tra 89 e 152 mm, mentre un ago da aspirazione ha un *gauge* ordinariamente compreso tra 15G e 18G e una lunghezza generalmente attorno ai 76 mm. Gli aghi da biopsia, inoltre, non necessitano del regolatore della profondità, ma spesso recano una scala metrica incisa sulla guaina esterna. Un classico ago da biopsia è quello di *Jamshidi-Swain*. Il *gauge* è una unità di misura del diametro (=calibro) non appartenente al SI ma tuttora usata in medicina; esso indica il numero di diametri necessari per raggiungere la larghezza di un pollice, tuttavia varia a seconda che si misuri il diametro di un foro o quello di un cilindro. A mo' di esempio, segnalo che: 10G=3,4mm; 13G=2,4mm; 15G=1,8mm; 18G=1,2mm.

(14) - Immagini di sezioni ottenute con questa tecnica possono essere reperite, ad esempio, in:
W. SANDRITTER - C. THOMAS, *Istopatologia*, cit., pp. 194-195.

Istologicamente, la struttura fondamentale del **midollo rosso** è del tutto simile a quella degli altri organi emopoietici. Esso, infatti, presenta uno *stroma reticolare* (costituito da *fibre reticolari argirofile* ⁽¹⁵⁾ intrecciate tra loro in modo da formare una sorta di rete a maglie piuttosto strette chiamata *reticolo cellulare*) nelle cui maglie sono racchiuse *cellule emopoietiche libere*. Sono, inoltre, presenti *adipociti* che, nel midollo giallo, occupano la maggior parte del tessuto.

La circolazione ematica midollare è caratterizzata dalla presenza di capillari e di vasi venosi postcapillari (in genere dilatati) di calibro irregolare, chiamati *sinusoidi* (o, anche: *seni venosi*; o ancora: *seni vascolari*) i quali, unitamente a vasi arteriosi, costituiscono il *compartimento vascolare midollare*[MONESI].

Il *compartimento emopoietico midollare* (costituente la rimanente parte del midollo) è disposto in colonne (o cordoni) irregolari interposte tra i vasi sanguigni sopramenzionati.

La parete dei *sinusoidi midollari* presenta una struttura il cui strato più interno è costituito da *endotelio* superiormente al quale è presente la *lamina basale* e, più esternamente, uno *strato avventiziale*.

In particolare è da notare che le cellule endoteliali non costituiscono uno strato continuo, presentando tra loro ampie fessure attraverso le quali è assicurato il transito cellulare in entrambe le direzioni; inoltre, le cellule endoteliali sinusoidali non sono tra loro connesse per mezzo di giunzioni specializzate (tipo *zonulae occludentes*, *zonulae adherentes*, *desmosomi*).

L'endotelio, come precedentemente accennato, poggia su una *lamina basale*, fenestrata, ricca di mucopolisaccaridi neutri (e, dunque, *PAS-positiva* ⁽¹⁶⁾) e di fibre reticolari argirofile[MONESI].

(15) - Si definisce *argirofilia* la capacità delle cellule di legare *salì di argento*, non riuscendo tuttavia a ridurli e, dunque, a precipitarli, poiché la precipitazione dei sali può avvenire solo in presenza di un agente riducente. L'argirofilia può essere dovuta a varie cause:

- nelle *cellule paracrine* se ne reputa responsabile la presenza di *cromogranitina* nei granuli;
- nelle *fibre reticolari* si ritiene dovuta alla presenza di oligosaccaridi;
- nelle cellule nervose è dovuta alla presenza di sostanza *tigroide* che, diminuendo nel tempo, ne rivela il grado di senescenza. Il reperto di argirofilia è estremamente importante in istologia, ad esempio nello studio del carcinoma mammario con differenziazione neuroendocrina, nello studio del carcinoma bronchiale, nello studio del carcinoma gastrico, in particolare per l'individuazione delle *cellule simil-enterocromaffini* (ECL) le quali, unitamente alle *cellule a gastrina* (G), rappresentano le popolazioni dominanti di questo tumore.

(16) - La **colorazione PAS** (*Periodic Acid - Schiff*) è uno dei metodi chimici utilizzati più frequentemente in istologia. In questa colorazione il materiale viene trattato con acido periodico; durante questo processo i *glicoli 1,2* vengono ossidati a *gruppi aldeidici*. Con il reattivo di Schiff, le aldeidi producono un colore rosso brillante. Con polisaccaridi non sostituiti, mucopolisaccaridi neutri, mucoproteine e glicoproteine, glicolipidi e fosfolipidi, la colorazione PAS dà un prodotto di reazione di colore porpora specifico. Con la combinazione della colorazione PAS con il Blu Alcian (*Metodo Alcian-PAS*), è possibile visualizzare ulteriori sostanze mucose acide (*glicosaminoglicani*): la tecnica è descritta in Appendice di questi Appunti.

All'esterno della membrana basale è sito uno strato, anch'esso fenestrato, costituito da *periciti* (o *cellule avventiziali*), caratterizzati da spiccata attività fagocitica utile ad impedire che eventuali cellule danneggiate possano entrare nel torrente circolatorio. I sinusoidi costituiscono, dunque, la struttura che consente gli scambi tra il midollo e il sangue circolante: attraverso la loro parete, infatti, le cellule ematiche mature - prodotte dal midollo osseo - transitano nel torrente circolatorio mentre cellule ematiche abbandonano il circolo e tornano nel midollo per esservi distrutte o per svolgere funzioni specifiche (es.: granulociti e monociti) nei processi di difesa e immunitari [MONESI].

Abbiamo, dunque, un pool di cellule ematiche "staminali" (intendendo con questo termine il più ampio concetto di differenziazione e maturazione cellulare) e un pool di cellule ematiche circolanti, con possibilità di interscambio.

È opportuno ricordare che il midollo osseo, oltre all'attività emopoietica, svolge le seguenti ulteriori funzioni, cui si è già accennato in precedenza:

- a) *funzione ematoclastica*, cioè di distruzione delle cellule ematiche al termine del loro ciclo vitale, operata - per mezzo della fagocitosi - dai macrofagi appartenenti al sistema reticolo-istiocitario;
- b) *funzioni generali del sistema reticolo-istiocitario*, partecipando - per mezzo dei suoi macrofagi "liberi" in concomitanza con i macrofagi presenti in altri distretti - alle funzioni di difesa proprie di tale sistema;
- c) *funzione di produzione di macrofagi* per mezzo della formazione dei monociti;
- d) *funzioni osteogeniche*, per mezzo degli *osteoblasti* e degli *osteoclasti* in esso contenuti;
- e) *funzioni immunologiche* sia per mezzo delle cellule staminali che esso fornisce al timo (e che poi si differenzieranno in linfociti T all'interno di questo organo), sia intervenendo direttamente (per mezzo della produzione di monociti, macrofagi e linfociti B).

MIDOLLO OSSEO

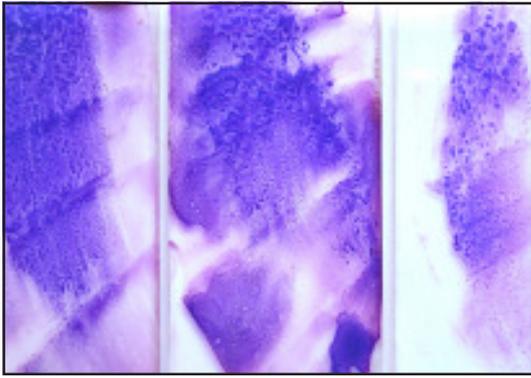
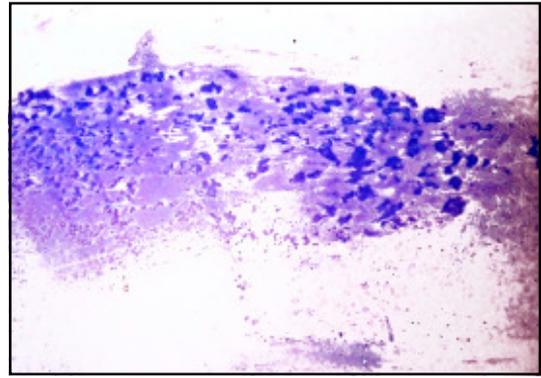


fig. 5 a) b) c)

3 vetrini con striscio di midollo da puntato sternale (agoaspirato)

Colorazione: May Grünwald - Giemsa.



d)

ingrandimento del vetrino c)

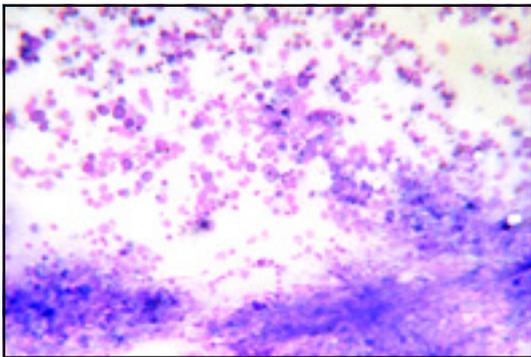
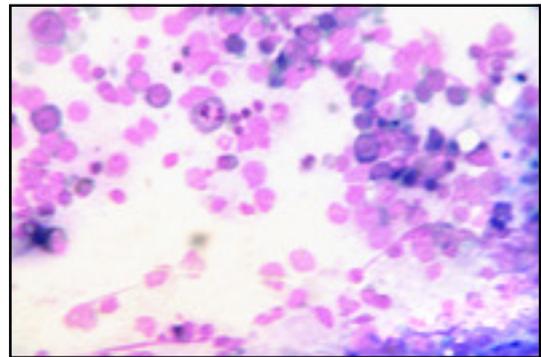
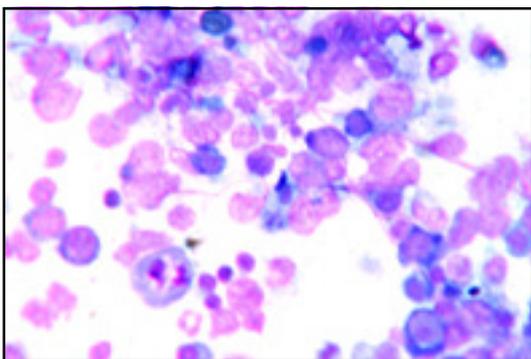


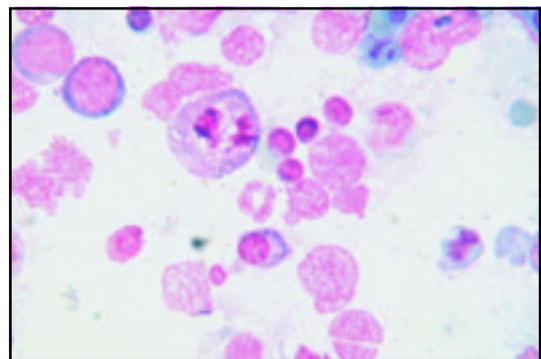
fig. 6 a) *obb.: 10/0,25* 100 μ



b) *obb.: 25/0,40* 50 μ



c) *obb.: 40/0,95* 20 μ



d) *obb.: 60/0,85* 20 μ

fig. 6 a-d). Puntato midollare. Colorazione: May Grünwald - Giemsa.

MIDOLLO OSSEO

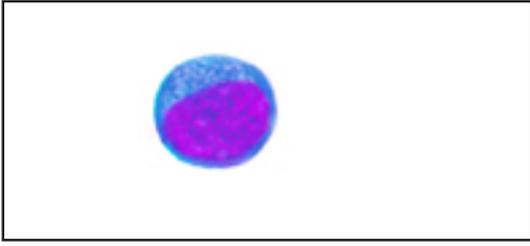


fig. 7 *obb.: 100/1,32* 15 μ
Mieloblasto

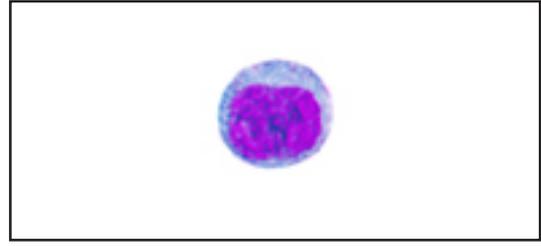


fig. 8 *obb.: 100/1,32* 15 μ
Monocito

Si noti la differenza tra le due cellule qui sopra riprodotte: il monocito presenta una trama cromatinica piú grossolana; inoltre, il suo citoplasma mostra una colorazione grigiastra, mentre quello del mieloblasto è francamente basofilo. Colorazione: May Grünwald - Giemsa. I due fotogrammi sono stati "ripuliti" elettronicamente dagli eritrociti presenti e dal "fondo" dello striscio midollare.

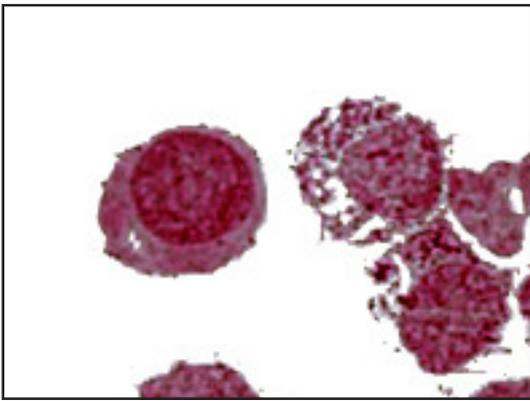


fig. 9 *obb.: 100/1,32* 15 μ
Eritroblasto: forma di transizione tra basofilo e policromatofilo. Colorazione: May Grünwald - Giemsa.

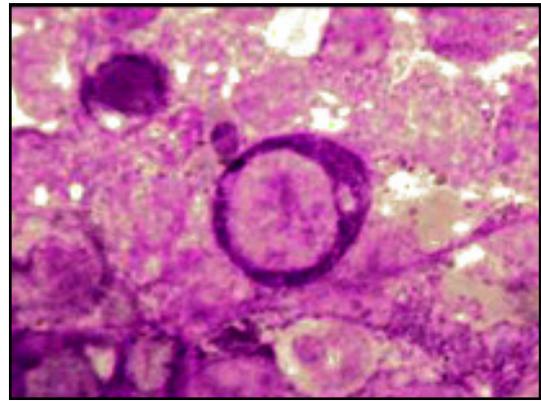


fig. 10 *obb.: 100/1,32* 15 μ
Proeritroblasto vacuolato. Colorazione: May Grünwald - Giemsa.

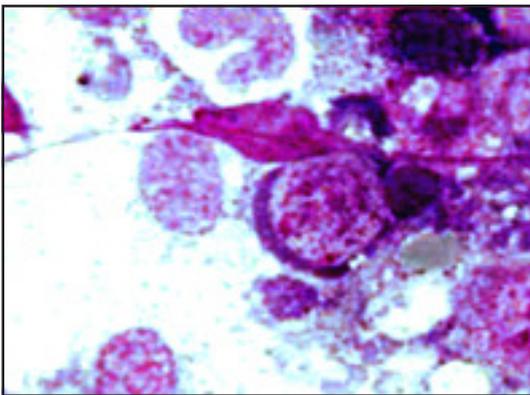
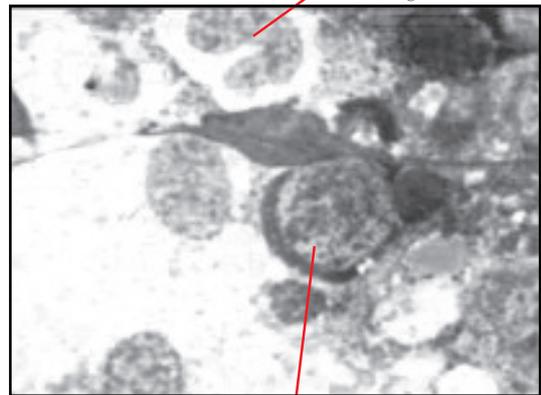


fig. 11 a) *obb.: 100/1,32* 15 μ



b) eritroblasto basofilo

leucocita
polimorfonucleato
non segmentato

fig. 11 a - b). Midollo osseo. Colorazione: May Grünwald - Giemsa.

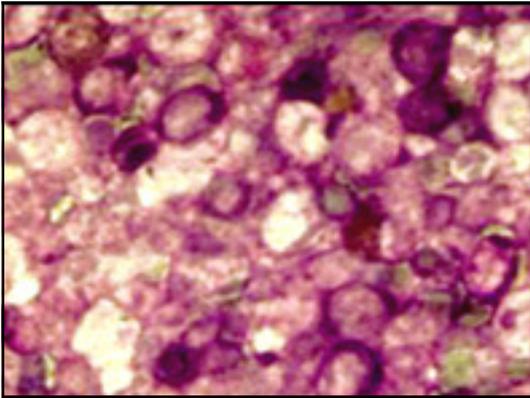


fig. 12 *obb.: 40/0,95* $20\ \mu$
Midollo osseo. Colorazione: May Grünwald - Giemsa.

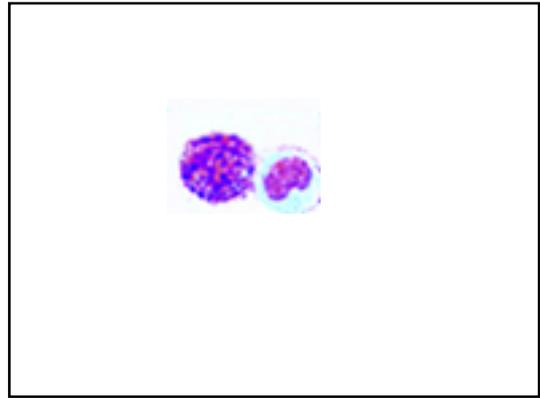


fig. 13 *obb.: 60/0,85* $15\ \mu$
Promielocito basofilo accanto a un promonocito. Colorazione: May Grünwald - Giemsa. Immagine "ripulita" elettronicamente dal "fondo" dello striscio.

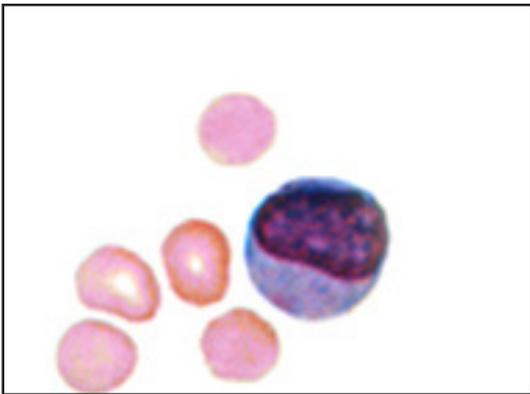


fig. 14 *obb.: 100/1,32* $10\ \mu$
Mieloblasto con eritrociti. Colorazione: May Grünwald - Giemsa. Immagine parzialmente "ripulita" elettronicamente. Nel confronto tra le due figure 14 e 15 la trama cromatinica, i nucleoli e la basofilia citoplasmatica differenziano il mieloblasto dal linfocito.

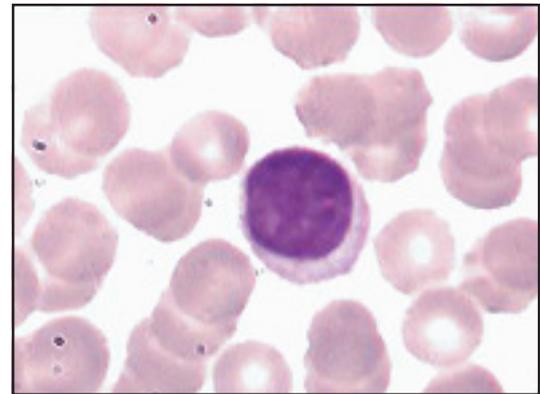


fig. 15 *obb.: 100/1,32* $10\ \mu$
Linfocito con eritrociti. Colorazione: May Grünwald - Giemsa.

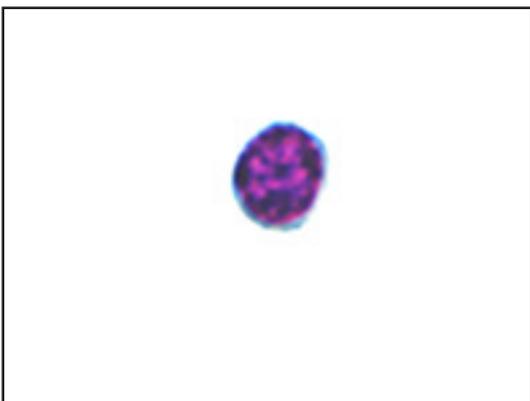


fig. 16 *obb.: 100/1,32* $10\ \mu$
Linfoblasto. Colorazione: May Grünwald - Giemsa. Immagine "ripulita" elettronicamente dal "fondo" dello striscio.

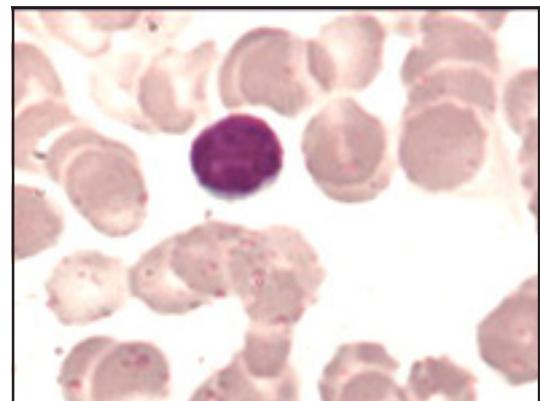


fig. 17 *obb.: 100/1,32* $10\ \mu$
Piccolo linfocito con eritrociti. Colorazione: May Grünwald - Giemsa.

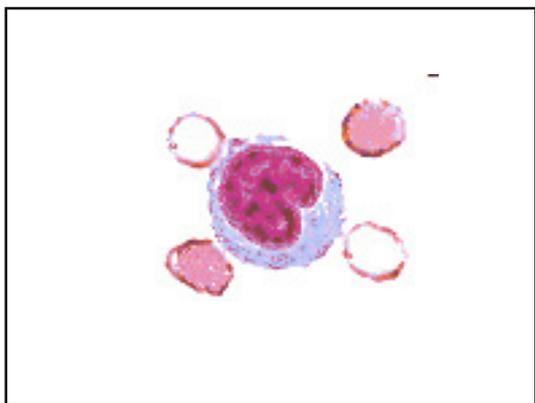


fig. 18 *obb.: 100/1,32* 15 μ
Monocito con eritrociti. Colorazione: May Grünwald - Giemsa.



fig. 19 *obb.: 100/1,32* 15 μ
Granulocito neutrofilo con eritrociti. Colorazione: May Grünwald - Giemsa.

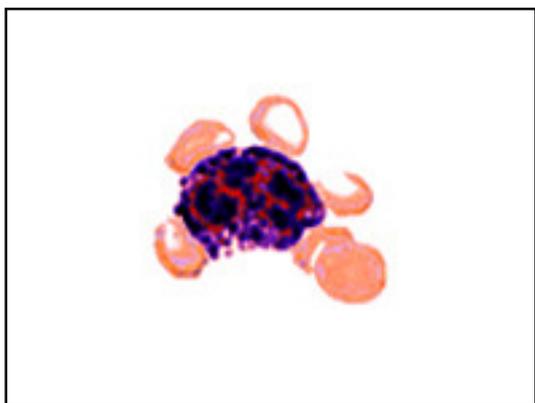


fig. 20 *obb.: 100/1,32* 15 μ
Granulocito basofilo con eritrociti. Colorazione: May Grünwald - Giemsa.

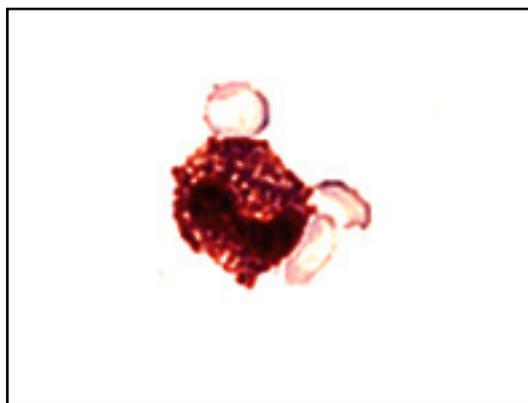


fig. 21 *obb.: 100/1,32* 15 μ
Granulocito eosinofilo con eritrociti. Colorazione: May Grünwald - Giemsa.

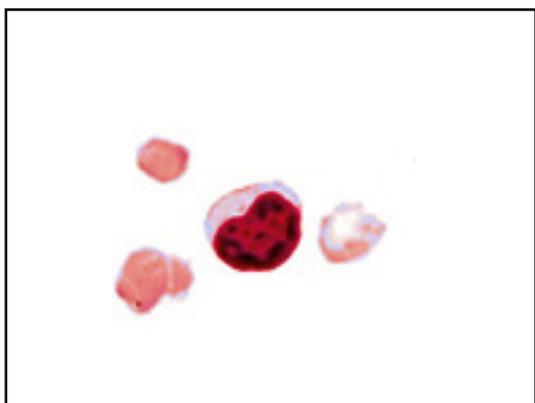


fig. 22 *obb.: 100/1,32* 15 μ
Linfocito con eritrociti. Colorazione: May Grünwald - Giemsa.



fig. 23 *obb.: 100/1,32* 15 μ
Trombociti con eritrociti. Colorazione: May Grünwald - Giemsa.

figg. 18 - 23: le immagini sono state "ripulite" elettronicamente dal "fondo" dello striscio.

TIMO

È un *organo linfoide primario* (o *centrale*), così definito a causa delle sue proprietà immunologiche. Ha due componenti (a differenza degli altri organi linfatici): una linfocitaria e una epiteliale; si tratta, dunque, di un organo *linfo-epiteliale*.

Il timo umano, originantesi precocemente nell'embrione, va incontro - dopo la pubertà e per il resto della vita - a un'involuzione fisiologica, venendo in gran parte sostituito da tessuto connettivo fibroso e da tessuto adiposo. Tuttavia, a causa della "disseminazione" di linfociti T, dotati di notevole longevità e in grado di mantenere la propria vitalità anche in assenza della ghiandola, la funzione timica è assicurata [MONESI]. È situato nel torace, in posizione immediatamente retrosternale alta e la sua parte superiore si spinge nel collo.

Dal punto di vista anatomico macroscopico, il timo si presenta come una massa tissutale color rosa-grigiastro, larga e appiattita, bilobata; ciascuno dei due *lobi* - assomigliante a una foglia di timo - è avvolto da una *capsula* (costituita da connettivo fibroso) dalla quale originano *sepimenti* (ospitanti i vasi sanguigni accompagnati da fibre dei sistemi simpatico e parasimpatico) i quali, approfondendosi all'interno, li suddividono in *lobuli*.

In particolare, poi, ogni lobo presenta una *zona corticale* (o *corteccia*) fortemente basofila - popolata prevalentemente da linfociti - e una *zona midollare* - la cui popolazione è costituita prevalentemente da cellule epiteliali - fortemente eosinofila. Dal punto di vista anatomico microscopico, oltre alle già citate cellule epiteliali e a quelle linfocitarie, si repertano macrofagi, adipociti e scarsi mastociti.

Le cellule epiteliali, disposte a mo' di cordoni intrecciantisi e anastomizzanti tra loro, formano una sorta di rete (priva di fibrille) al cui interno vengono ospitati i linfociti.

Tale morfologia fa somigliare le cellule epiteliali a quelle reticolari mesenchimali: ciò ha portato all'erronea nomenclatura di *cellule reticolo-epiteliali* [MONESI].

Il timo possiede anche un *reticolo connettivale* - composto da cellule reticolari e da fibre e limitato alle zone perivascolari - il quale costituisce una componente minore della ghiandola.

La *corteccia* timica - a differenza di quella linfonodale e della polpa bianca splenica - non è dotata di *centri germinativi*.

I linfociti timici (chiamati anche *timociti*) hanno le stesse caratteristiche morfologiche dei linfociti circolanti: citoplasma basofilo ricco di ribosomi e nucleo tondeggiate e addensato.

Nella *zona midollare* sono presenti caratteristiche formazioni costituite da cellule epiteliali disposte concentricamente che presentano segni di trasformazione cornea,

i *corpuscoli di Hassall* (il cui nome deriva dal medico e anatomico inglese Arthur Hill Hassall che li scoprì nel 1849), la cui funzione - secondo alcuni Autori - sarebbe quella di produrre il cosiddetto *fattore timico* (o *timosina*) responsabile dell'acquisizione della competenza immunologica da parte dei timociti.

Le dimensioni dei corpuscoli di Hassall variano entro un *range* che va dai 10 ai 300 μ ; vengono chiamati anche *corpi concentrici di Ecker* ⁽¹⁷⁾ e all'esame microscopico appaiono composti da una parte centrale - formata da 2 o 3 grosse cellule, pallide, di forma sferica o poliedrica e dotate di nucleo voluminoso - circondata perifericamente da più strati concentrici di cellule epiteliali piatte (che ricordano la struttura della cipolla), anch'esse dotate di nucleo voluminoso e contenenti - spesso - granuli di colesterina e di sostanze cheratoialinosimili.

Presentano una PAS-positività talora assai accentuata [MAZZA].

Durante l'ontogenesi timica, i corpuscoli di Hassall compaiono quando la linfopoiesi già è stabilita e la corteccia, il midollo e la giunzione cortico-midollare sono in grado di condurre la selezione - positiva e negativa - dei linfociti di T che subiscono la maturazione progressiva. I corpuscoli di Hassall derivano strutturalmente dalle cellule del Reticolo Endoteliale, che solitamente ipertrofizzano prima della loro inclusione nello strato esterno delle cellule dei corpuscoli stessi⁽¹⁸⁾.

È inoltre da notare che i corpuscoli di Hassall subiscono continue variazioni morfologiche, a seconda del loro stadio maturativo; accade così di osservare, a carico delle cellule della parte centrale, fenomeni di degenerazione ialina e grassa talora esitanti nella completa distruzione dei corpi cellulari con residuo di sostanza amorfa. Varie teorie sono state di volta in volta proposte circa la genesi dei corpuscoli di Hassall: attualmente sembra prevalere la tesi di Kingsbury secondo la quale queste formazioni timiche sarebbero il risultato dello sviluppo in spazi ristretti di epiteli che avrebbero perduto la propria funzione di superficie⁽¹⁹⁾.

Non esiste una separazione netta tra corticale e midollare, nella quale ultima si repertano i corpuscoli di Hassall che, peraltro, sono reperibili fino al confine cortico-midollare, ma non nella corticale.

Il timo è epato-dipendente durante la vita fetale e midollo-dipendente nell'adulto: proprio da questi organi - infatti - provengono le cellule staminali che, una volta infiltratesi nel suo reticolo epiteliale, proliferano differenziandosi, poi, in timociti, cellule non ancora immunocompetenti (il 90% delle quali ha un ciclo vitale di pochi giorni) dotate dell'antigene di superficie TL [MAZZA].

(17) - L. MAZZA, *Anatomia e istologia dei tessuti emopoietici*, in: P. INTROZZI (a cura di), *Trattato Italiano di Medicina Interna*, USES, Firenze, 1978², Parte terza, Malattie del Sangue e degli organi emopoietici, Vol. I, pag. 300.

(18) - B. BODEY - S. E. SIEGEL - H. E. KAISER, *Immunological Aspects of Neoplasia — The Role of the Thymus*, in: *CANCER GROWTH AND PROGRESSION - CURRENT TOPICS IN PATHOLOGY*, Springer Netherlands, 2006.

(19) - Altre ipotesi in: L. MAZZA, *Anatomia e istologia dei tessuti emopoietici*, *cit.*, pag. 301.

I timociti “superstiti”, annidatisi nella zona midollare del timo, acquisiscono competenza immunitaria (forse, per influenza del “fattore timico” prodotto dalle cellule epiteliali ivi presenti⁽²⁰⁾) trasformandosi in linfociti T i quali ultimi, abbandonato l’organo in cui si sono sviluppati, vanno a popolare le zone T-dipendenti linfonodali e spleniche.

Come accennato precedentemente, dopo la pubertà il Timo va incontro ad una involuzione progressiva che si manifesta in fase già avanzata nell’adulto di mezza età. Questa involuzione avviene ad opera di due diversi meccanismi:

- infiltrazione di grasso;
- progressiva scomparsa dei linfociti.

Gli adipociti compaiono, nel timo, già alla nascita: il loro numero si accresce progressivamente e in maniera costante fino alla pubertà, dopo la quale si assiste ad un notevole incremento della loro velocità di infiltrazione.

Quest’ultima avviene a partire dal tessuto connettivo che circonda i vasi sanguigni, procedendo - dunque - dai setti interlobulari (dalla corteccia, quindi) verso la midollare. Pertanto, a partire circa dal primo anno di vita, le isole di tessuto linfoide vengono progressivamente isolate le une dalle altre da tessuto adiposo, con conseguente costante decremento del numero dei linfociti. Tuttavia, benché il progressivo depauperamento del pool linfocitario timico provochi il collasso della struttura epiteliale, la persistenza - per tutto l’arco della vita dell’individuo - di cordoni di cellule epiteliali secernenti ormoni timici e altri fattori polipeptidici (tra cui la **timulina**, la **timocrescina**, la **timopoietina** e la **timosina $\alpha 1$ e $\beta 4$**) assicurano la funzionalità dell’organo che regola la maturazione, la proliferazione e la funzione dei linfociti T, nonché lo sviluppo degli organi e dei tessuti linfoidei periferici⁽²¹⁾.

L’irrorazione sanguigna è assicurata da numerosi piccoli rami dell’arteria toracica interna e delle arterie tiroidee inferiori che - penetrati attraverso i setti interlobulari - giunti alla giunzione cortico-midollare si suddividono ulteriormente per dare origine ai capillari corticali e midollari. In particolare, i capillari della corticale presentano un endotelio continuo, mentre quelli dei setti e della midollare possono essere fenestrati.

Le venule post-capillari della regione cortico-midollare sono dotate di endotelio cubico specializzato (simile a quello delle venule linfonodali con endotelio alto) che consente il transito bidirezionale dei linfociti circolanti verso l’interno del parenchima timico. Il drenaggio venoso e linfatico segue il decorso dei vasi arteriosi; non esistono, infatti, vasi linfatici afferenti⁽²²⁾.

(20) - V. MONESI, *Istologia, cit.*, p. 694.

(21) - Vds.: P. R. WHEATER, *Istologia e anatomia microscopica*, 3^a ed. italiana (a cura di O. Cremona - P.C. Marchisio) sulla 4^a ed. inglese (curata da B. Young - J. W. Heath), Casa Editrice Ambrosiana, Milano, 2000, p. 202.

(22) - P. R. WHEATER, *Istologia e anatomia microscopica, cit.*, p. 203.

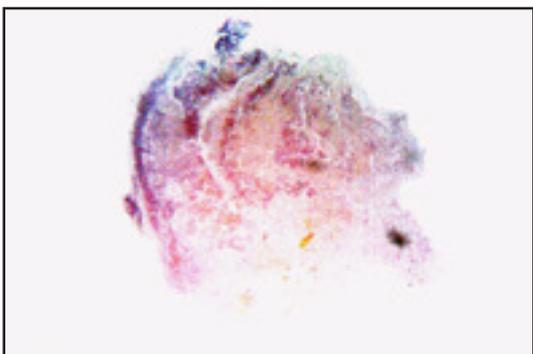
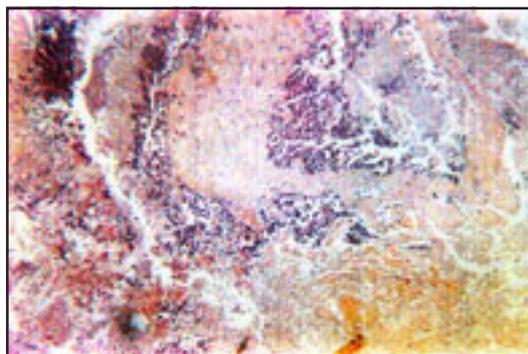
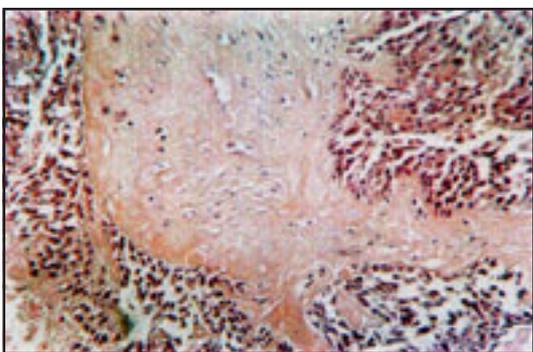


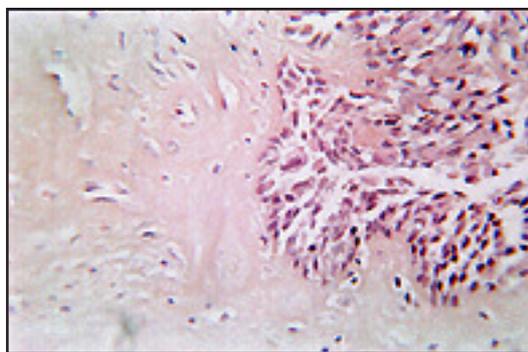
fig. 24 a) *obb.: 4/0,10* 500μ



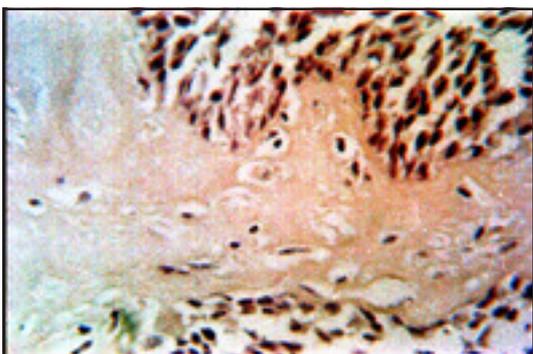
b) *obb.: 10/0,25* 250μ



c) *obb.: 25/0,40* 200μ



d) *obb.: 40/0,95* 100μ



e) *obb.: 60/0,85* 50μ

fig. 24 a-e). Sezione di Timo. Colorazione: Ematossilina-Eosina.

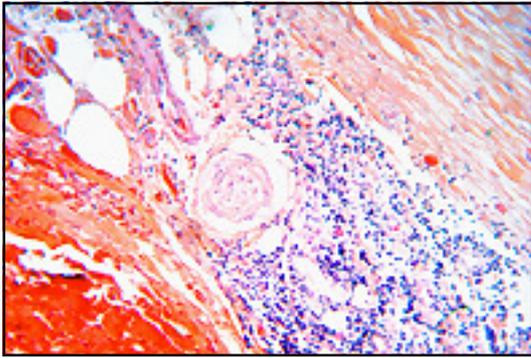
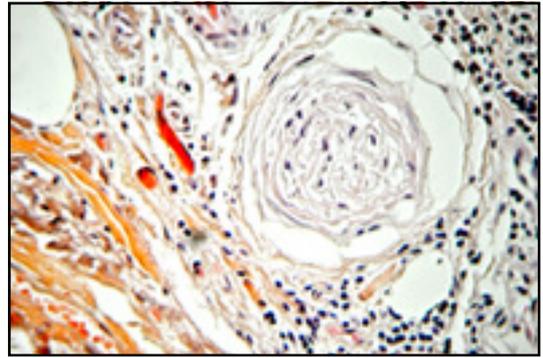
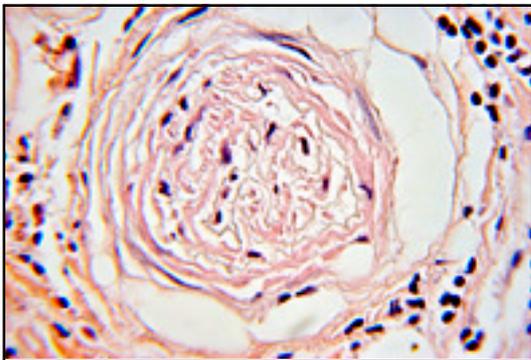


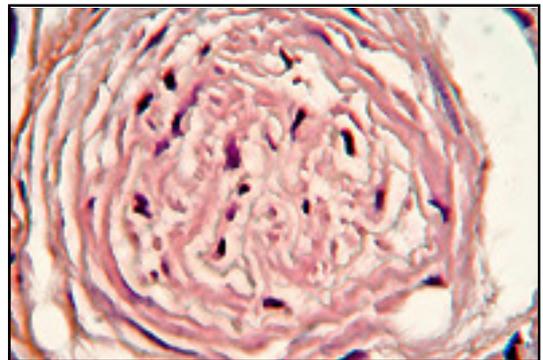
fig. 25 a) *obb.: 10/0,25* 100 μ



b) *obb.: 25/0,40* 50 μ



c) *obb.: 40/0,95* 20 μ



d) *obb.: 60/0,85* 20 μ

fig. 25 a-d). Sezione di Timo: Corpuscolo di Hassall. Colorazione: Ematossilina-Eosina.

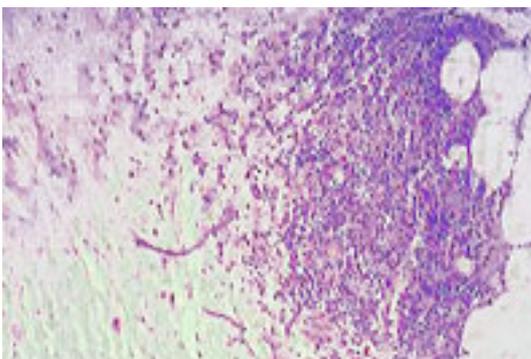


fig. 26 a) *obb.: 4/0,10* 100 μ

Sezione di Timo. Colorazione: Ematossilina-Eosina



b) *midollare* *corticale* *tessuto adiposo*

In fig. 26 a-b) si noti il differente grado di cellularità tra la corticale e la midollare.

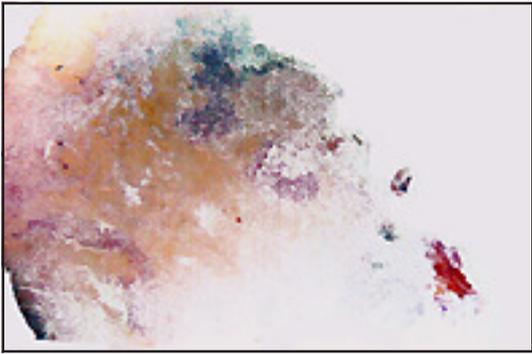
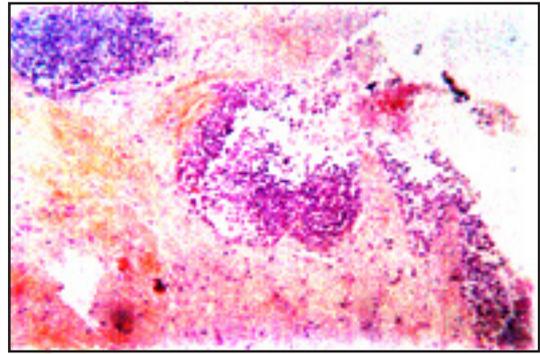
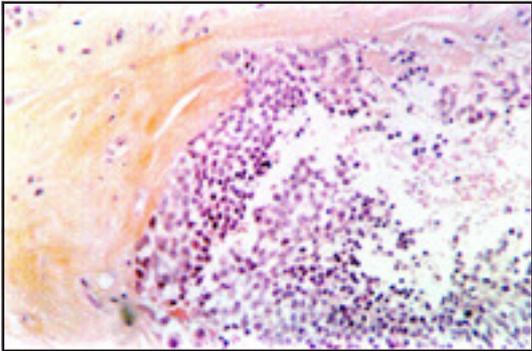


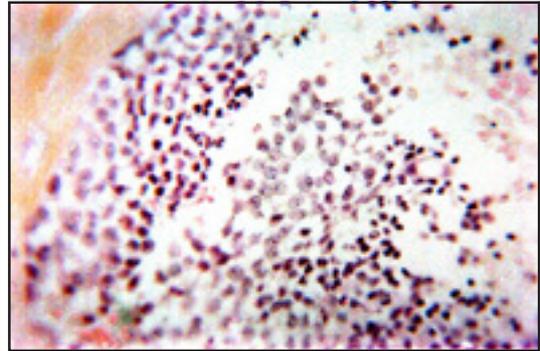
fig. 27 a) *obb.: 4/0,10* 500 μ



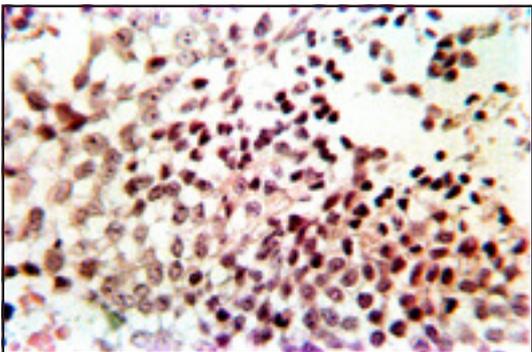
b) *obb.: 10/0,25* 250 μ



c) *obb.: 25/0,40* 200 μ



d) *obb.: 40/0,95* 100 μ



e) *obb.: 60/0,85* 50 μ

fig. a-e). Sezione di Timo. Colorazione: Ematossilina-Eosina.

LINFONODI

Sono formazioni anatomiche disseminate lungo il percorso dei vasi linfatici; vengono chiamati anche *Gangli linfatici o Linfoghiandole* (termine non del tutto corretto, perché il vocabolo “ghiandola”, benché etimologicamente significhi “a forma di ghianda”, nell’accezione corrente è utilizzato prevalentemente per indicare le strutture secernenti; i linfonodi non sono dotati di questa funzione e, tra l’altro, non tutti hanno forma “a ghianda”⁽²³⁾).

La loro forma può essere rotondeggiante, ovalare o a fagiolo e presenta una faccia concava (che ospita i *vasi linfatici efferenti*) e una convessa (che ospita i *vasi linfatici afferenti*).

Le dimensioni dei linfonodi - in condizioni fisiologiche - variano da pochi millimetri a un centimetro circa; questi organi presentano una capsula connettivale dalla cui superficie interna si originano - diretti internamente all’organo stesso - *separimenti* (o *trabecole*) di natura collagenale che circoscrivono le *logge corticali* (nella parte periferica) e i *canali midollari* (nella parte centrale). Gli spazi (corticali e midollari) dei linfonodi sono occupati da un *reticolo* a maglie strettissime che ospita linfociti e alcune cellule libere; vi decorrono i seni linfatici, i vasi sanguigni e i nervi propri dell’organo.

In particolare, i linfociti (che rappresentano di gran lunga la maggior parte della cellularità “libera” dei linfonodi) si raggruppano a formare ammassi irregolari (in rapporto di continuità fra loro) che costituiscono la *corticale* (nella parte periferica dell’organo) e i *cordoni midollari* (nella parte centrale) [MONESI].

È da tener presente che, sia nella parte midollare sia in quella corticale, sono presenti - oltre ai linfociti (nelle tre taglie: piccoli, medi e grandi) - anche plasmacellule e macrofagi.

La *corticale* linfonodale viene generalmente suddivisa in *corteccia esterna* e *corteccia interna*; quest’ultima è formata da tessuto linfatico costituito da piccoli linfociti trattenuti nella maglia reticolare: in realtà, è stato dimostrato che si tratta di linfociti T, per cui la corteccia interna risulta essere l’area T(imo)-dipendente dei linfonodi. La corteccia esterna, invece, presenta addensamenti cellulari rotondeggianti (chiamati *noduli* o *follicoli linfatici primari*) di piccoli linfociti B [MONESI].

Accade talora di reperire noduli (denominati *noduli* o *follicoli linfatici secondari*) la cui parte centrale appare più chiara di quella periferica (chiamata *corona* o *mantello*): la zona chiara si identifica con il *centro germinativo*.

In realtà, le due zone non presentano significative differenze istologiche: il centro germinativo, infatti, deve il suo aspetto tintoriale alla presenza di macrofagi, di grandi linfociti proliferanti e di plasmacellule; tutti questi tipi di cellule hanno citoplasma più

(23) - A.W. HAM, *Istologia*, USES, Firenze, 1969², Vol. I, p. 203.

voluminoso e nucleo meno eterocromatinico conferendo - in tal modo - un aspetto meno denso (e, dunque, più “chiaro”) alla struttura.

Gli esami in immunofluorescenza hanno permesso di chiarire che la popolazione linfocitaria dei centri germinativi dei follicoli linfatici e dei cordoni della midollare è costituita prevalentemente da linfociti B: si tratta, dunque, di aree B-dipendenti. La comunicazione tra i vasi linfatici linfonodali afferenti e quelli efferenti avviene tramite un sistema di capillari linfatici - dilatati, intercomunicanti e attraversanti l'intero linfonodo - detti *seni linfatici*.

Questi ultimi vengono comunemente suddivisi in:

- *seno sottocapsulare* (o *marginale*);
- *seni corticali* (decorrono tra i noduli linfatici);
- *seni midollari* (decorrono tra i cordoni midollari).

Tra i vasi ematici (che entrano ed escono dal linfonodo attraverso l'*ilo*) appare opportuno evidenziare l'importanza di strutture venose specializzate (chiamate *venule postcapillari*) la parete delle quali consente ai linfociti circolanti il transito dal sangue alla linfa.

Poiché i linfonodi sono immersi, ordinariamente, nel tessuto adiposo, quando essi vengono repertati tramite la dissezione è inevitabile che porzioni del tessuto circostante rimangano adese: ciò è utile per distinguere, all'esame microscopico, le sezioni istologiche di linfonodi da quelle - peraltro morfologicamente simili - di milza.

A proposito dei centri germinativi, è da notare che essi originano dai noduli primari esclusivamente durante la vita post-natale.

Inoltre, l'ipocolorazione dei centri germinativi non è una costante obbligata, potendosi repertare centri ipercromici, di colore blu scuro all'ematossilina-eosina: peraltro, anche in questo caso essi sono morfologicamente differenziabili dai noduli primari per il minor numero dei nuclei e per la loro maggiore distanza gli uni dagli altri.

L'ipercromaticità è dovuta non solo alle maggiori dimensioni dei nuclei, ma anche alle maggiori dimensioni e alla accresciuta basofilia citoplasmatiche delle cellule appartenenti ai centri germinativi. Inoltre, in concomitanza con questo incremento basofilo si repertano numerose figure mitotiche che dimostrano l'attiva neoformazione linfocitaria [MONESI].

In realtà, i linfociti possono venire originati anche in noduli primari privi di centri germinativi: tuttavia - a causa della migliore distinguibilità - si preferisce studiare la cellularità di questi ultimi in ordine alla differenziazione e maturazione linfocitarie. Secondo la maggior parte degli Autori⁽²⁴⁾, le cellule mesenchimali (dalle quali si origina il tessuto linfatico) - nella vita post-natale - sarebbero rappresentate dalle cellule reticolari primitive, riconoscibili all'interno dei centri germinativi perché sono visibili

(24) - Cfr.: A.W. HAM, *Istologia, cit.*, Vol. I, pag. 314.

esclusivamente i loro nuclei, di forma ovale, di grandi dimensioni, ipocromici e mononucleolati. Il citoplasma di queste cellule - a differenza di quello delle cellule "libere" che originano dalle cellule reticolari primitive - è scarso e privo di margini ben definiti.

Sempre all'interno dei centri germinativi si repertano linfoblasti in differente fase di evoluzione, riconoscibili per le grandi dimensioni nucleari (quasi comparabili con quelle dei nuclei delle cellule reticolari), per i limiti netti del citoplasma basofilo e per l'evidenza dei nucleoli.

Secondo la teoria di Walther Flemming⁽²⁵⁾ (uno dei padri fondatori della citogenetica), i linfoblasti neoformati migrerebbero verso la periferia del follicolo ove si trasformerebbero in linfociti. Tuttavia a tale teoria sono state mosse varie obiezioni; ad esempio, è risaputo che i centri germinativi non sono formazioni stabili, subendo spesso variazioni di numero e di volume in base alle specie animali, allo stato di nutrizione, all'età e ad altre condizioni: basti pensare che nel decorso del tifo, dell'anemia perniziosa, ecc., scompaiono.

Inoltre, i centri germinativi non sono evidenziabili nel feto, nel neonato e in animali da esperimento adulti allevati in asepsi completa: Thorsten Hellman⁽²⁶⁾ sostiene, pertanto, che i centri germinativi linfonodali siano l'espressione di una reazione circoscritta del tessuto linfatico a sostanze tossiche e/o flogistiche.

Nei centri germinativi sono presenti, quali prodotti di trasformazioni regressive linfocitarie, insieme con gocce di grasso e granuli di pigmento anche i cosiddetti *corpuscoli tingibili di Flemming*.

Nei linfonodi è stata studiata e dimostrata la presenza di plasmacellule e dei loro precursori (plasmablasti e proplasmaciti) nei cordoni midollari linfonodali, ove costituiscono circa il 50% della cellularità. Dalla presenza di frequenti e numerose mitosi, si è dedotto che proprio i cordoni midollari linfonodali costituiscono una sede molto attiva di plasmacellulogenesi⁽²⁷⁾.

Va notato che i macrofagi dei centri germinativi attivi, fortemente tingibili, contengono al loro interno numerosi corpi apoptotici derivanti da quei linfociti B che non sono sopravvissuti alla trasformazione blastica (verosimilmente a seguito di errori nella replicazione del DNA) che in essi si innesca a seguito del contatto con un antigene; da tale trasformazione origineranno, poi, cloni di plasmacellule e di

(25) - W. FLEMMING, *ARCH. MIKR. ANAT.*, 6: 439 (1870), cit. da: G. CHIARUGI, *Istituzioni di Anatomia dell'Uomo*, Vallardi, Milano, 1968⁸, vol. 2, pagg. 676-677.

(26) - T. HELLMAN, *Lymphgefäße und lymphatische Organe*, in: W. VON MÖLLENDORFF, *Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen*, vol. 6 (parte I), Julius Springer, Berlino, 1930.

(27) - Vds.: G. SAINTE-MARIE, *Study on plasmocytopenesis. I. Description of plasmocytes and of their mitoses in the mediastinal lymph nodes of then-week-old rats*, *AM. J. ANAT.*, 114: 207-233, 1964.

cellule della memoria (particolari tipi di linfociti B originatisi durante la risposta immunitaria primaria, capaci di sopravvivere per l'intera esistenza dell'organismo). Dal punto di vista dell'identificazione microscopica, i plasmablasti presentano un nucleo voluminoso, mononucleolato, posizionato centralmente nella cellula e circondato da un relativamente sottile citoplasma basofilo: una morfologia del tutto simile a quella dei linfoblasti, cosa che lascia adito a dubbi sulla reale distinguibilità gli uni dagli altri all'esame in campo chiaro con il microscopio ottico, nonostante il più intenso grado di pironinofilia citoplasmatica e le relativamente maggiori dimensioni nucleolari sovente reperibili nei plasmablasti e che sono attribuibili alla accresciuta sintesi di RNA in queste cellule.

I proplasmaciti sono differenziabili dai plasmablasti per una minore dimensione nucleare, accompagnata da eccentricità posizionale e da accresciuta abbondanza citoplasmatica in rapporto al volume totale cellulare.

I plasmaciti, poi, costituiscono l'anello terminale della serie e si differenziano per le ulteriori minori dimensioni e l'accresciuta eccentricità nucleari, nonché una ancora maggiore abbondanza di citoplasma (basofilo) [HAM].

LINFONODI

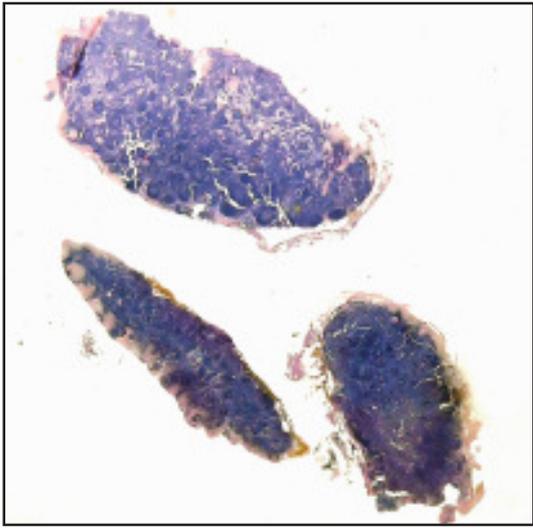
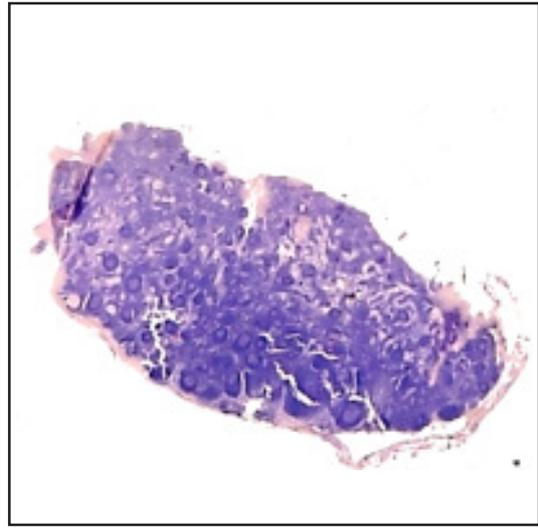


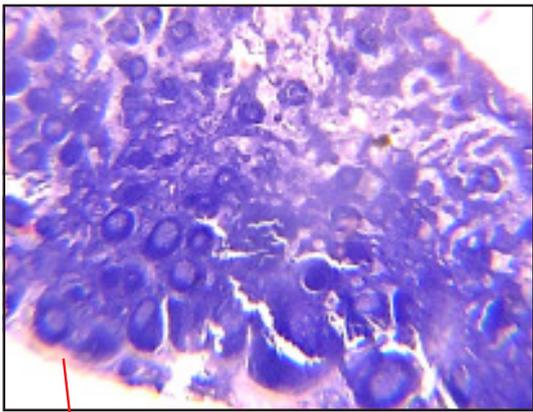
fig. 28 a)

10 mm



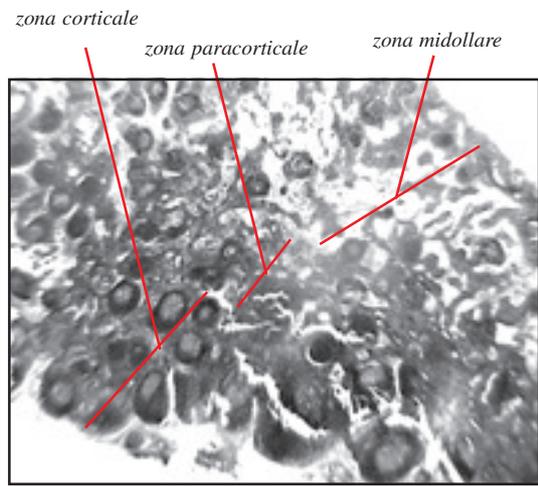
b)

10 mm

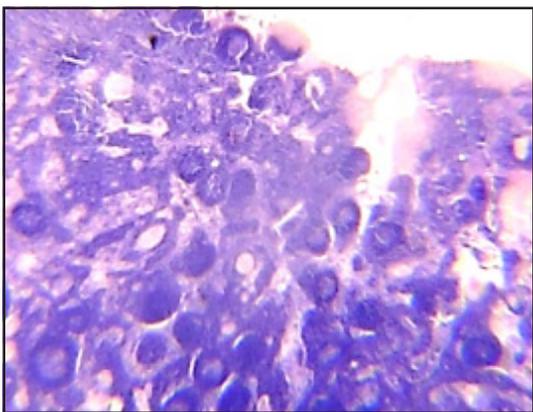


c) capsula

0,5 mm

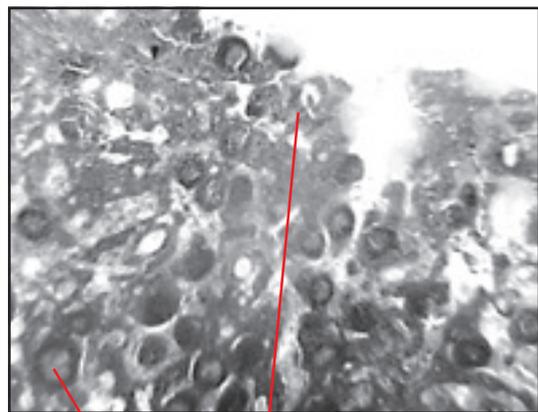


d)



e)

0,5 mm



f)

follicolo

cordoni
midollari

fig. 28 a): 3 sezioni dello stesso linfonodo prelevate a profondità differenti.
b): la sezione maggiore del linfonodo a ingrandimento maggiore.
c)-f): particolari della sezione in b), ingrandimento maggiore.
Colorazione: Ematossilina-Eosina.

LINFONODI

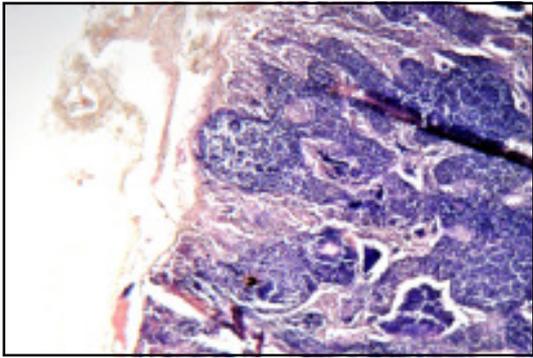
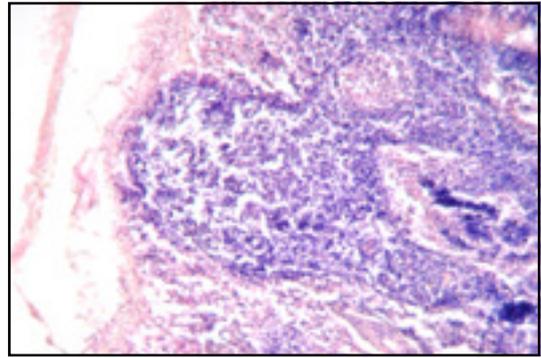
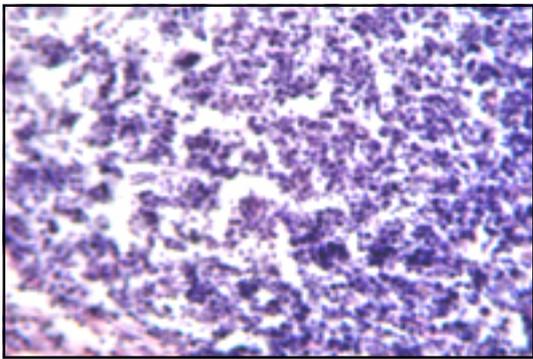


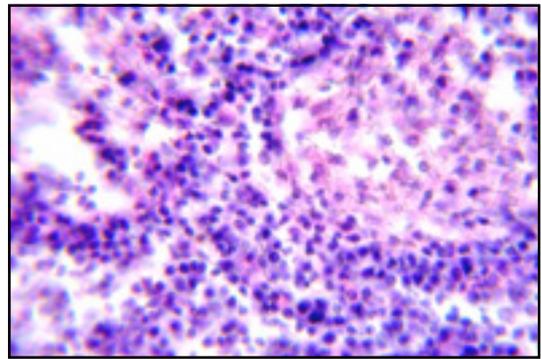
fig. 31 a) *obb.: 4/0,10* 300 μ



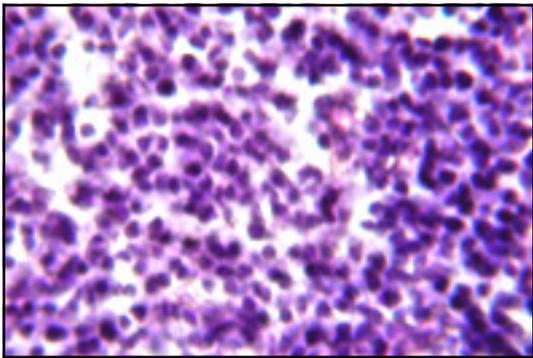
b) *obb.: 10/0,25* 100 μ



c) *obb.: 25/0,40* 50 μ



d) *obb.: 40/0,95* 20 μ



e) *obb.: 60/0,85* 20 μ

*fig. 31 a - e). Linfonodo: altro campo visivo a ingrandimenti crescenti.
Colorazione: Ematossilina-Eosina.*

LINFONODI

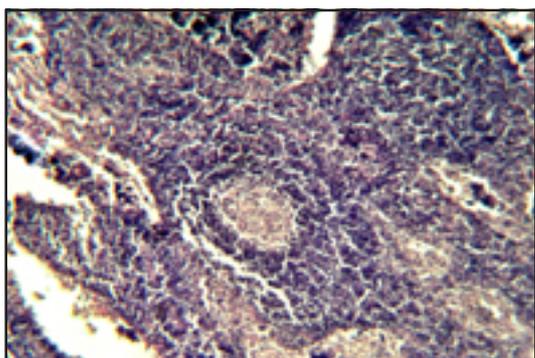


fig. 32 a) *obb.: 10/0,25* 100 μ

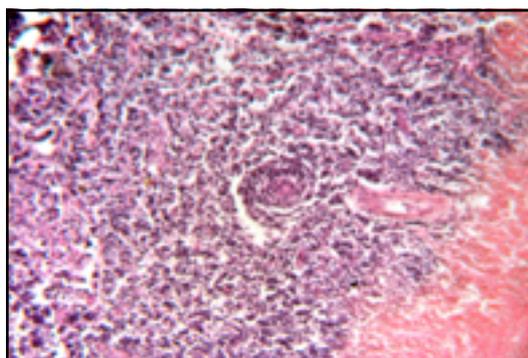


fig. 33 a) *obb.: 10/0,25* 100 μ

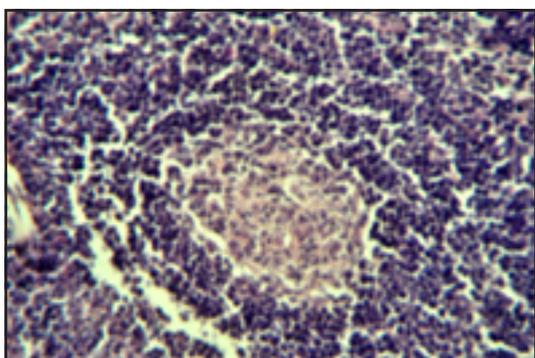


fig. 32 b) *obb.: 25/0,40* 50 μ

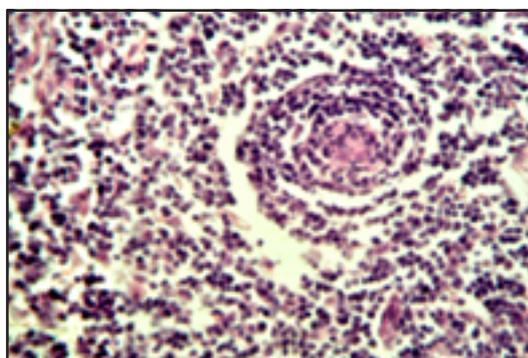


fig. 33 b) *obb.: 25/0,40* 50 μ

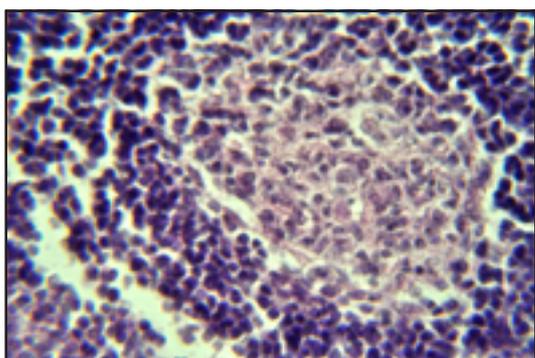


fig. 32 c) *obb.: 40/0,95* 20 μ

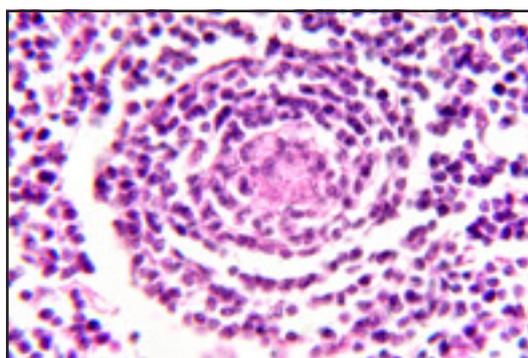


fig. 33 b) *obb.: 40/0,95* 20 μ

fig.32 a - c). Linfonodo; un follicolo linfatico secondario con ampio centro germinativo.
Colorazione: Ematossilina-Eosina.

fig.33 a - c). Linfonodo; follicolo linfatico con centro germinativo in fase iniziale di sviluppo; si nota la tipica disposizione a file dei linfociti. Colorazione: Ematossilina-Eosina.

LINFONODI

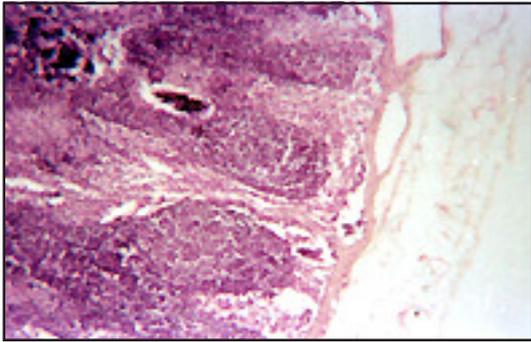


fig. 29) *obb.: 10/0,25* $250\ \mu$

fig. 29. Linfonodo: zona corticale con seni sottocapsulari e corticali e follicoli. Colorazione: Ematossilina-Eosina.

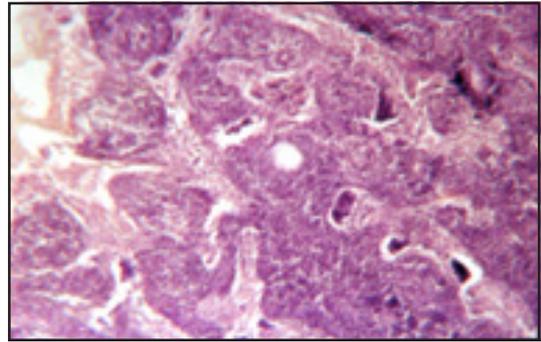


fig. 30 *obb.: 10/0,25* $250\ \mu$

fig. 30. Linfonodo: zona midollare con cordoni e seni midollari. Colorazione: Ematossilina-Eosina.

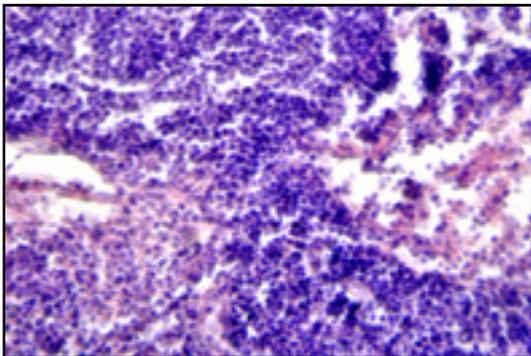
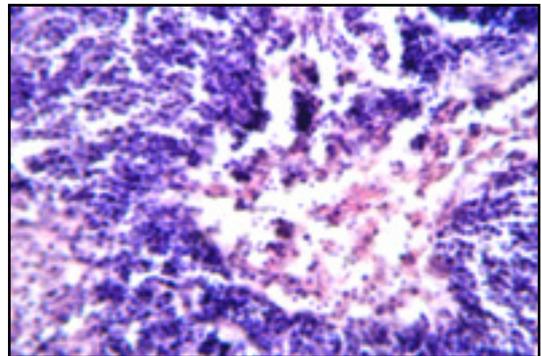
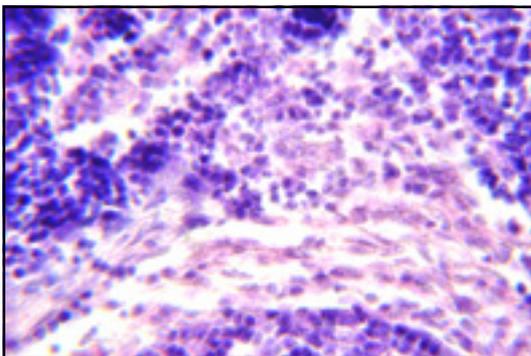


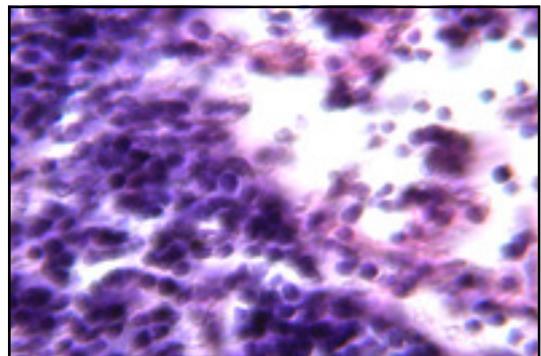
fig. 34 a) *obb.: 10/0,25* $100\ \mu$



b) *obb.: 25/0,40* $50\ \mu$



c) *obb.: 40/0,95* $20\ \mu$



d) *obb.: 60/0,85* $20\ \mu$

fig. 34 a - d). Linfonodo: linfociti e cellule stromali. Colorazione: Ematossilina-Eosina.

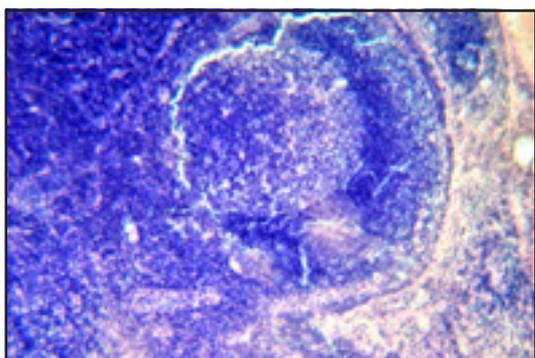
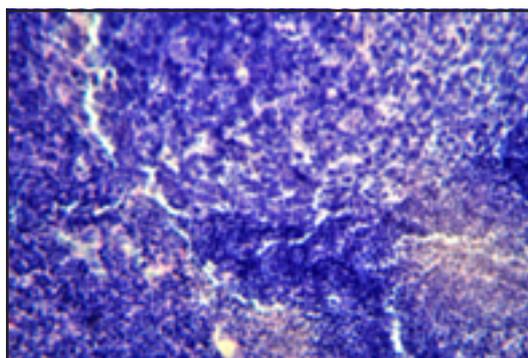
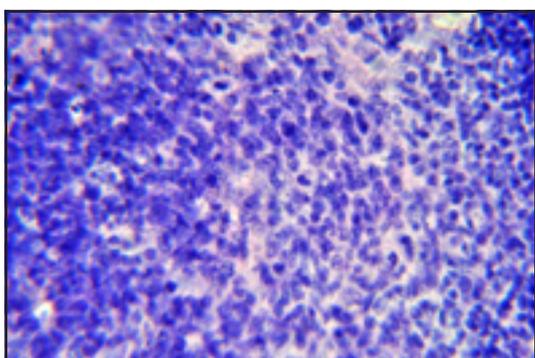


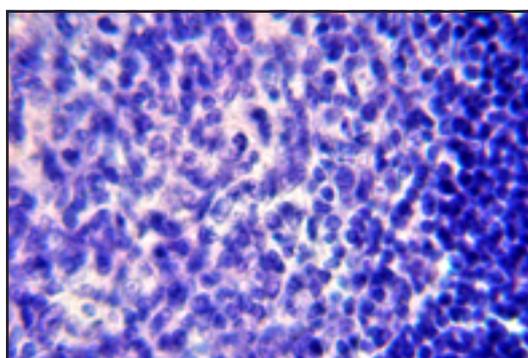
fig. 35 a) *obb.: 10/0,25* 100 μ



b) *obb.: 25/0,40* 50 μ



c) *obb.: 40/0,95* 20 μ



d) *obb.: 60/0,85* 20 μ

fig. 35 a-d). Linfonodo; follicolo con ampio centro germinativo di cui si può osservare il diverso tipo di cellularità.
Colorazione: Ematossilina - Eosina..

In definitiva, i tipi cellulari presenti nei linfonodi sono:

- **Cellule linfoidi:** originano nel midollo osseo e vi appartengono tutti i linfociti e le cellule da essi derivati; va precisato, tuttavia, che i linfociti T, prima di giungere ai linfonodi (penetrandovi attraverso i vasi linfatici afferenti e le venule post-capillari delle aree paracorticali) compiono una ulteriore fase maturativa all'interno del Timo.
- **Cellule immunologiche accessorie:** originano nel midollo osseo, transitano nei tessuti periferici e giungono ai linfonodi attraverso la linfa. Vi appartengono le cellule dotate della capacità di *processare e presentare gli antigeni*, tra le quali i macrofagi dei seni linfatici e le cellule dendritiche (sia le follicolari, sia le interdugitanti paracorticali).
- **Cellule stromali:** vi appartengono le cellule endoteliali dei vasi (sia sanguigni, sia linfatici) e i fibroblasti (che costituiscono l'impalcatura di sostegno linfonodale).

LINFONODI ROSSI

Si tratta di particolari formazioni, note anche come *ghiandole emolinfatich*e (da taluni Autori denominate *emali*), strutturalmente e funzionalmente distinte dai comuni linfonodi. La maggior parte degli Autori li considera come organi appartenenti non al sistema linfatico, bensì a quello ematico: le loro funzioni sarebbero molto simili a quelle spleniche⁽²⁸⁾.

Nell'uomo appaiono come piccole formazioni disseminate nel peritoneo omentale e nella regione gastrosplenica, in prossimità dell'aorta lombare; più raramente sono localizzate nel mediastino, in prossimità dell'aorta ascendente e dell'arco aortico [Lederer].

Poiché in caso di splenectomia tali noduli appaiono ingranditi al punto di rendersi nettamente distinguibili *icto oculi* dai comuni linfonodi, alcuni Autori [Tizzoni, Griffini e altri] sostengono che essi sarebbero dei veri e propri *noduli splenici* originatisi per compensare la mancanza della milza; altri Autori [Foà e altri], al contrario, sostengono che i *linfonodi rossi* sarebbero normalmente presenti nelle sierose addominali, rendendosi peraltro maggiormente evidenti per sopperire l'eventuale mancata funzione splenica.

Macroscopicamente, dunque, i linfonodi rossi si differenziano da quelli comuni per il colore spiccatamente rosso.

Microscopicamente, si differenziano dai linfonodi comuni per la presenza di seni assai sviluppati e dilatati (in varia misura ripieni di eritrociti) intersecati da sottili cordoni di tessuto linfoide; questi seni sono tappezzati di endotelio e - nonostante l'abbondante presenza di sangue nelle cavità - appare evidente il tessuto connettivale a struttura reticolare (a maglie larghe).

Il lume dei seni è costituito da una parete endoteliale costituita da due o tre strati paralleli di cellule del reticolo disposte in fila.

Attualmente si tende a ritenere che i vasi (sia quelli afferenti sia quelli efferenti) di questi linfonodi rossi non appartengano al comparto linfatico, bensì a quello ematico: tale ipotesi porterebbe ad attribuire a tali linfonodi struttura e funzionalità spleno-simili.

(28) - Cfr.: L. MAZZA, *Anatomia e istologia dei tessuti emopoietici*, cit., pag. 289.

FOLLICOLI LINFATICI (SOLITARI OD AGGREGATI) DELLE MUCOSE

Nel canale digerente, nell'apparato respiratorio e nell'apparato uro-genitale sono presenti *noduli linfatici isolati* (chiamati anche *follicoli linfatici solitari*) la cui struttura anatomica è dissimile da quella dei comuni linfonodi, in quanto sono costituiti dal solo follicolo.

Quando il tessuto linfoide è costituito da più follicoli riuniti a gruppi, si hanno i cosiddetti *follicoli aggregati*.

Particolarmente caratteristici sono i follicoli linfatici solitari presenti nell'intestino tenue: appaiono come formazioni rotondeggianti, aggettanti dalla superficie interna intestinale verso il lume, del diametro di 1-2 mm, di colorito biancastro; la loro distribuzione non è omogenea: possono, infatti, essere reperiti prevalentemente (ma non esclusivamente) nel duodeno e nel digiuno.

Tali follicoli - superficialmente rivestiti dall'epitelio intestinale, mentre più in profondità attraversano la *muscularis mucosae* e si spingono fino al tessuto sottomucoso - sono normalmente alloggiati nello spessore della *lamina propria della mucosa* (nella quale sono assenti villi e ghiandole).

La mucosa dell'intestino crasso (in particolare quella cecale e quella rettale) presenta una notevole abbondanza di noduli solitari il cui volume è quasi doppio rispetto a quelli del tenue, mentre la mucosa gastrica in prossimità del cardias e quella della regione pilorica ospitano scarsi follicoli solitari.

Analoga scarsità si reperta nelle mucose faringea, tracheale e uterina.

Le *placche di Peyer* (presenti - in numero di 20-30 - elettivamente nella parte inferiore dell'ileo, di fronte alla linea d'inserzione del mesentere, ma del tutto assenti nel crasso) sono costituite da *noduli linfatici aggregati*, i più piccoli di forma circolare (con diametro compreso tra 0,5 e 1 cm), i più grandi di forma ellittica (con asse maggiore disposto parallelamente all'asse intestinale e con diametri compresi tra 1×2 e 1×12 cm).

La loro morfologia è quella di aree opache, circoscritte irregolarmente, con superficie ondulata che raggiunge l'epitelio, provocando in tal modo il rilievo della superficie della placca rispetto al tessuto circostante; la parte più profonda, invece, occupa la tonaca propria e buona parte del tessuto sottomucoso.

Microscopicamente i follicoli linfatici, sia solitari sia aggregati, appaiono costituiti da tessuto connettivo reticolare assai sottile che ospita nelle sue maglie cellule linfoide. Il centro germinativo (spesso presente nei follicoli linfatici giovanili e rarissimo o del tutto assente in quelli senili) può contenere - talvolta - peculiari strutture granuliformi chiamate *corpi tingibili di Flemming* [MAZZA].

I follicoli linfatici (sia solitari, sia aggregati) sono riccamente vascolarizzati nella parte interna, mentre del tutto assenti sono i vasi linfatici, allocati - invece - alla periferia: tali vasi possono talora risultare molto dilatati, assumendo così l'aspetto di *seni linfatici*. La funzione del tessuto linfoide disseminato negli apparati gastrointestinale e respiratorio era poco e male conosciuta fino a non molti anni orsono. Attualmente tale tessuto è considerato un vero e proprio organo linfoide⁽²⁹⁾ e viene, nella sua totalità, chiamato **MALT** (*mucose-associated lymphoid tissue*).

I grossi aggregati che lo costituiscono catturano, con un'azione del tutto analoga a quella linfonodale, gli eventuali antigeni che transitano attraverso di essi instaurando un'adeguata risposta immunitaria. L'epitelio che riveste gli aggregati MALT è, infatti, specializzato nel riconoscere e selezionare gli antigeni, agendo in maniera del tutto analoga ai vasi linfatici linfonodali afferenti⁽³⁰⁾.

I vasi linfatici associati al MALT (esclusivamente di tipo efferente) drenano, analogamente e unitamente ai vasi linfatici del tessuto circostante, i linfonodi regionali (tonsille, linfonodi mesenterici, ecc.).

In base al tessuto in cui sono residenti, i componenti del MALT vengono, generalmente, suddivisi nelle seguenti 6 categorie:

- GALT (*gut-associated lymphoid tissue*), associato all'intestino [vi appartengono anche le Placche di Peyer].
- BALT (*bronchial-associated lymphoid tissue*), associato all'area bronchiale.
- NALT (*nose-associated lymphoid tissue*), associato al naso.
- SALT (*skin-associated lymphoid tissue*), associato all'epidermide.
- VALT (*vascular-associated lymphoid tissue*), associato ai vasi ematici.
- CALT (*conjunctiva-associated lymphoid tissue*), associato alla congiuntiva.
- FALT (*faringeal-associated lymphoid tissue*), associato al faringe [rappresentato dall'Anello di Waldeyer e dalla Tonsilla faringea].

(29) - Cfr.: P. R. WEATER, *Istologia e Anatomia microscopica*, Casa Editrice Ambrosiana, Milano, 2000³, p. 213.

(30) - Cfr.: P. R. WEATER, *ibidem*.

TONSILLE

Sono organi particolari, situati nella mucosa bucco-faringea, costituiti da infiltrazione linfatica diffusa (interessante, oltre la lamina propria, anche il tessuto epiteliale di rivestimento della mucosa a cui appartengono) e da follicoli linfatici organizzati.

Caratteristica peculiare di ogni tonsilla è che il tessuto linfatico che circonda l'affossamento nella mucosa penetra tra le cellule epiteliali del rivestimento della medesima scompaginandole e formando una rete dalla quale si liberano gruppi isolati di cellule che possono assumere un aspetto non dissimile da quello dei *corpuscoli timici di Hassall*⁽³¹⁾.

Si dividono in:

- *Tonsilla linguale*;
- *Tonsilla palatina* (in numero di 2);
- *Tonsilla faringea*.

Le tonsille palatine insieme con la linguale e con il tessuto linfoide diffuso nella mucosa del palato molle forma il cosiddetto *piccolo anello linfatico di Waldeyer* (dal nome di Heinrich Wilhelm Waldeyer), mentre la tonsilla faringea con la linguale e le palatine formano il *grande anello linfatico di Waldeyer*.

I follicoli linfatici delle tonsille sono strutturalmente assai simili a quelli intestinali. La superficie che affaccia nel lume della cavità buccale è rivestita da epitelio pavimentoso stratificato invaginandosi in profondità nella tonsilla stessa e formando cripte a fondo cieco rivestite, a loro volta, da tessuto linfoide contenente follicoli del tutto simili a quelli linfonodali.

Le *tonsille palatine* presentano, nella parte che affonda nella mucosa, una densa capsula che ne costituisce contemporaneamente il limite e la separazione dal tessuto muscolare sottostante a cui sono ancorate e che viene quasi raggiunta dal fondo delle cripte; queste ultime, a loro volta, si presentano ramificate e con l'epitelio scompaginato ad opera dell'infiltrazione linfatica.

La *tonsilla linguale*, collocata nel terzo posteriore della lingua (dal resto della quale differisce sia embriogeneticamente, sia per la differente innervazione), è anch'essa, analogamente alle tonsille palatine, limitata da epitelio pavimentoso stratificato piuttosto liscio sotto al quale sono alloggiati ammassi di tessuto linfoide contenente i tipici follicoli e cripte. L'epitelio di queste ultime, a differenza di quello delle tonsille palatine, si presenta scarsamente scompaginato; inoltre, nel fondo delle cripte sboccano i condotti di alcune ghiandole salivari.

(31) - Vds.: P. MOTTA, *Anatomia microscopica*, Piccin, Padova, 1984³, p. 178.

TONSILLE

La *tonsilla faringea*, infine, presenta solchi rivestiti da epitelio cilindrico pseudostratificato nel fondo dei quali sboccano le ghiandole faringee; inoltre, lo spesso strato di tessuto linfatico infiltrante la lamina propria è condensato in noduli ordinati su un solo piano.

La tonsilla faringea è un organo impari, ma a causa della sua struttura glanduliforme viene comunemente denominata con il sostantivo plurale *adenoidi*.

Caratteristica comune a tutte le tonsille è che i linfociti costituenti queste strutture sono imbrigliati nelle maglie del tessuto connettivo reticolare, irrorato da una fitta rete di capillari sia ematici sia linfatici.

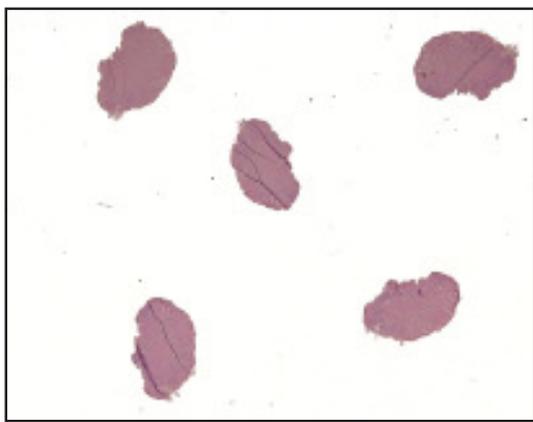
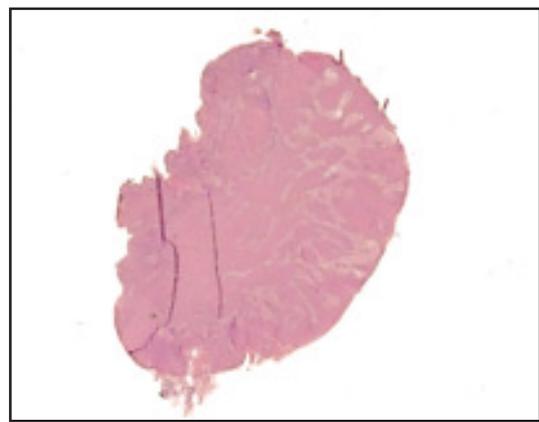


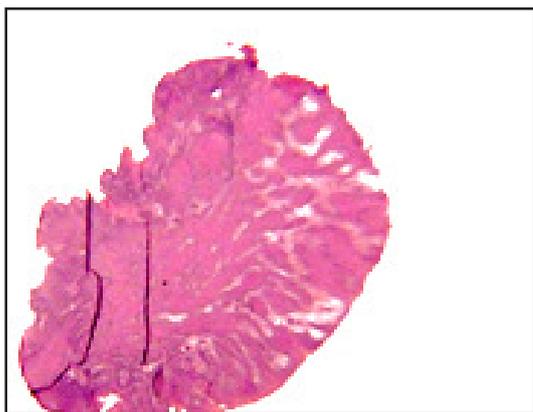
fig. 36 a)

3 mm



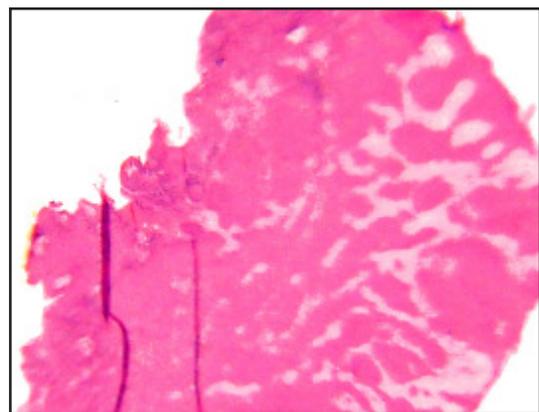
b)

3 mm



c)

3 mm



d)

1 mm

fig. 36 a- d). Sezioni di Tonsilla palatina a ingrandimenti via via crescenti (macrofotografia). Colorazione: Ematossilina-Eosina.

TONSILLE

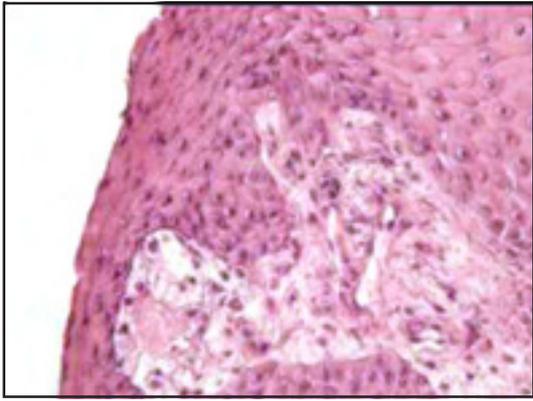
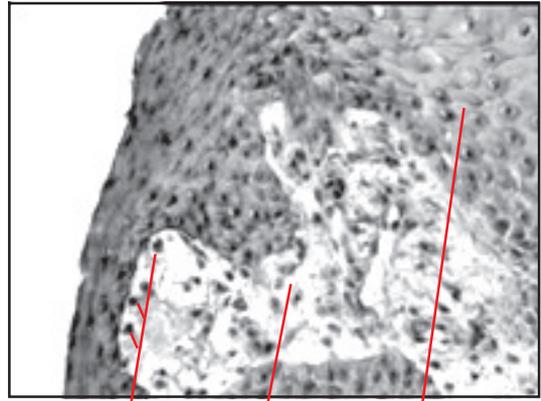


fig. 37 a) *obb.: 10/0,25* 100 μ



b) *tessuto linfoide*
epitelio pavimentoso pluristratificato
linfociti infiltranti l'epitelio

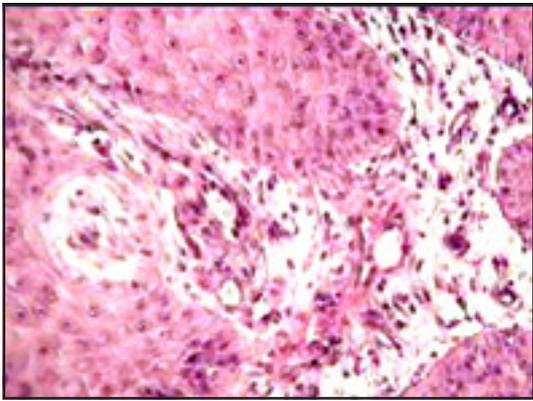


fig. 38 *obb.: 10/0,25* 100 μ

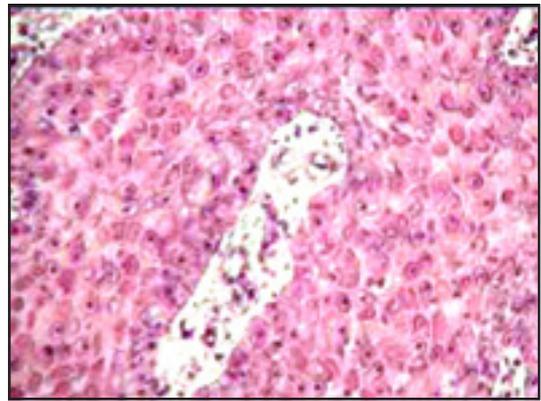


fig. 39 *obb.: 10/0,25* 100 μ

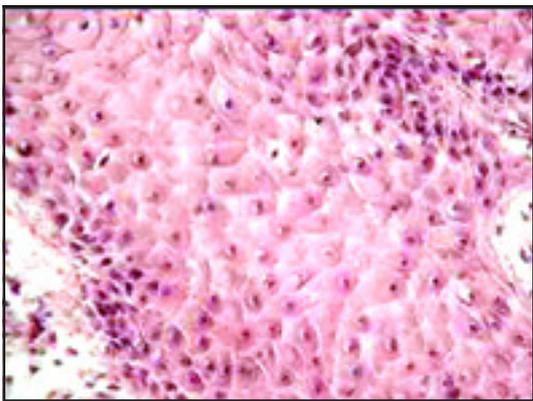
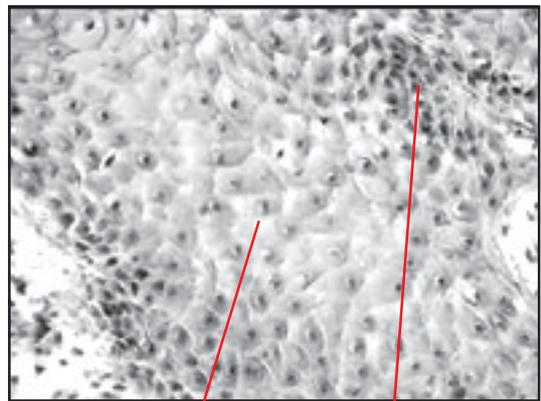


fig. 40 a) *obb.: 10/0,25* 100 μ



b) *epitelio pavimentoso pluristratificato*
linfociti infiltranti l'epitelio

figg. 37 - 40. Tonsilla palatina: vari campi visivi. Colorazione: Ematossilina-Eosina.

TONSILLE

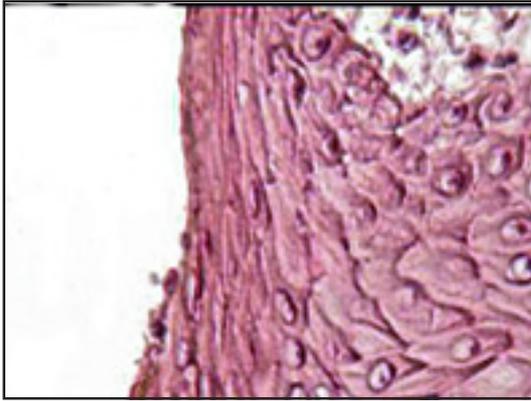
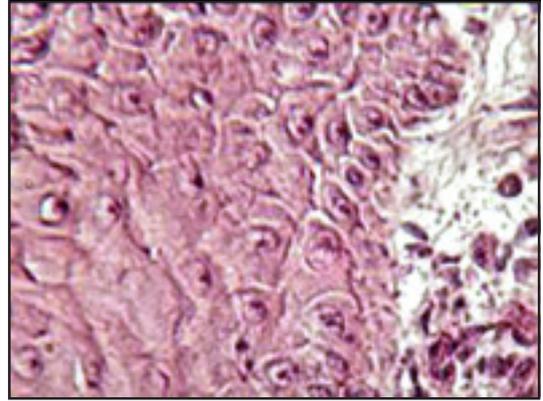
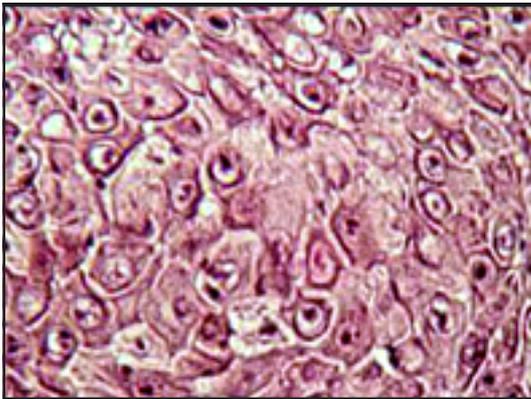


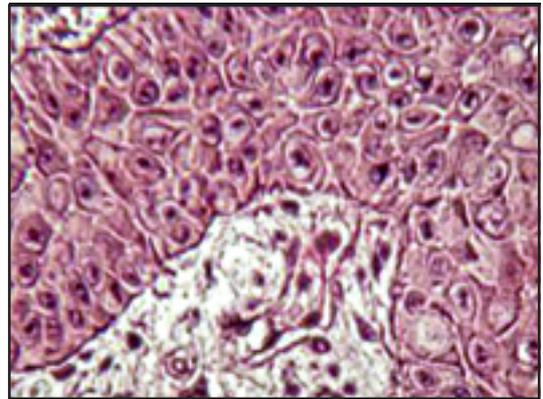
fig. 41 a) *obb.*: 25/0,40 50 μ



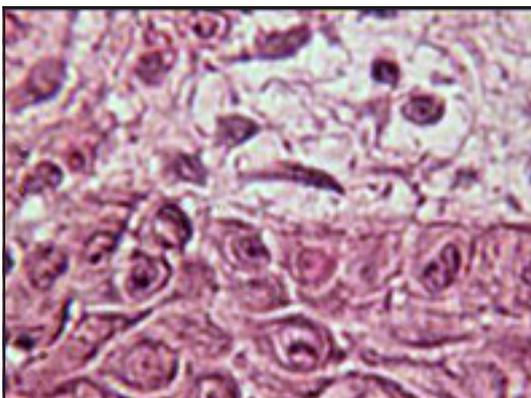
b) *obb.*: 25/0,40 50 μ



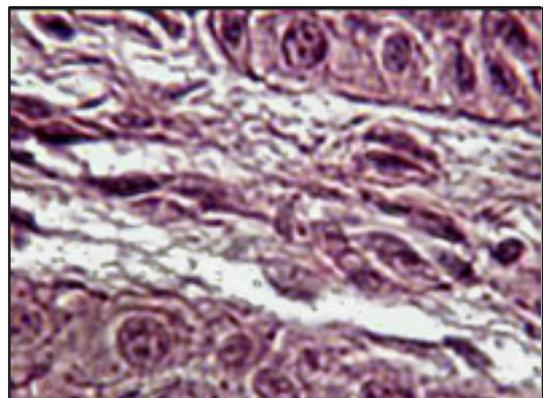
c) *obb.*: 40/0,95 20 μ



d) *obb.*: 40/0,95 20 μ



e) *obb.*: 60/0,85 10 μ



f) *obb.*: 60/0,85 10 μ

fig. 41 a - f). Tonsilla palatina; vari campi a differenti ingrandimenti. Colorazione: Ematossilina-Eosina.

TONSILLE

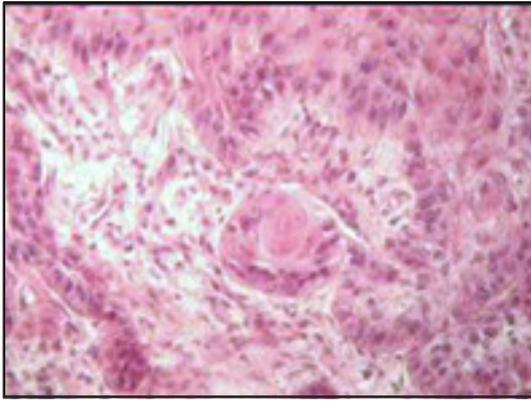
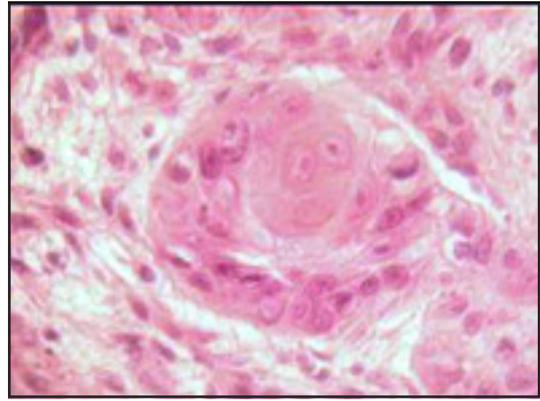
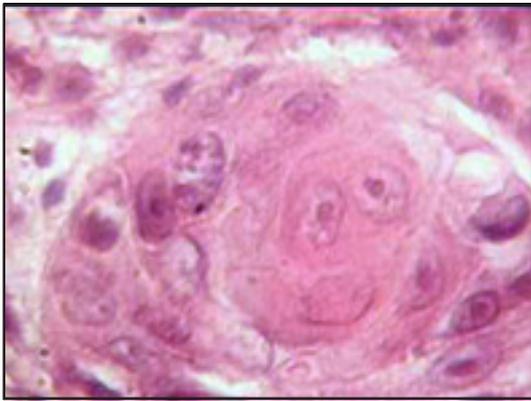


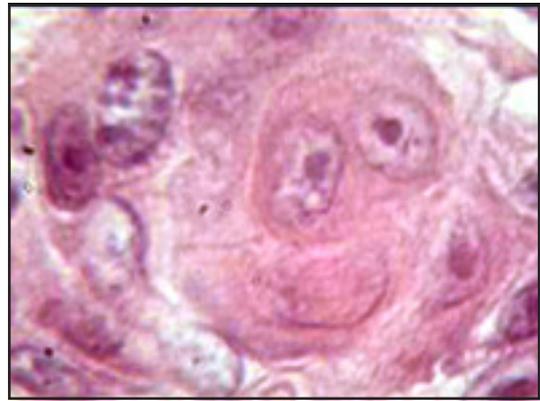
fig. 42 a) *obb.: 10/0,25* $100\ \mu$



b) *obb.: 25/0,40* $50\ \mu$



c) *obb.: 40/0,95* $20\ \mu$



d) *obb.: 60/0,85* $10\ \mu$

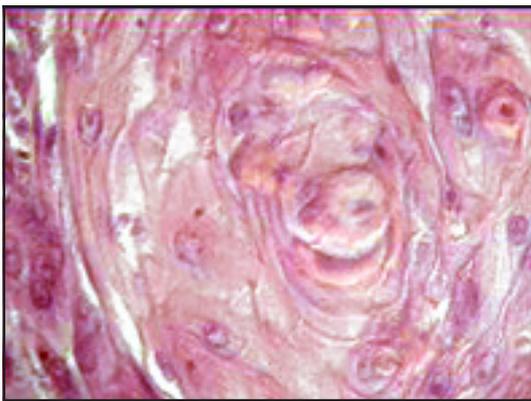


fig. 43 a) *obb.: 40/0,95* $20\ \mu$



b) *obb.: 60/0,85* $10\ \mu$

figg. 42 a-d) e 43 a-b). Tonsilla palatina; due diverse formazioni, morfologicamente simili ai Corpuscoli timici di Hassall. Colorazione: Ematossilina-Eosina.

APPENDICE VERMIFORME

Morfologicamente si presenta come un tubo sottile, cavo, a fondo cieco, lungo circa 9 cm e del diametro medio di circa 7 mm. Origina nella faccia mediale dell'intestino cieco, 2-3 cm sotto l'imbocco dell'ileo. È assai ricca di tessuto linfoide che può essere sia diffuso sia costituito da follicoli aggregati; la sua mucosa è dotata di una *tonaca propria* nella quale si reperisce una fitta infiltrazione - ad opera di cellule linfoide - che raggiunge l'epitelio che tappezza il lume appendicolare: alcune di queste cellule linfoide, attraversato l'epitelio, cadono nel lume cavitario dell'organo. I follicoli appartengono alla categoria dei noduli linfatici aggregati e molti di essi hanno un centro germinativo, composto da grandi linfociti B in vari stadi di proliferazione. Il tessuto linfoide appendicolare subisce variazioni nell'arco dell'esistenza del soggetto, aumentando durante la crescita (con un massimo attorno ai 25 anni) e diminuendo per regressione nell'adulto e ancor più nell'anziano.

La parete dell'appendice, analogamente al resto del tubo digerente, è costituita da quattro guaine concentriche denominate *tonache*; procedendo dal lume del tubo verso la superficie esterna, si incontrano: la *tonaca mucosa*, la *tonaca sottomucosa*, la *tonaca muscolare* e la *tonaca sierosa*.

La *tonaca mucosa* è istologicamente divisa in tre strati: l'*epitelio di rivestimento* (dall'aspetto variabile a seconda dei vari tratti dell'intestino: epitelio pavimentoso pluristratificato nell'intestino cefalico e nell'esofago; epitelio pavimentoso monostratificato - con notevoli differenze di tipi di popolazione cellulare - nello stomaco, nell'intestino tenue e nel crasso), la *lamina propria* (di natura connettivale con funzioni di supporto) e un sottile strato di muscolatura liscia (chiamato *muscularis mucosae*) che, nell'appendice, non è ben sviluppata: in alcuni tratti può mancare del tutto [Ham].

La *tonaca sottomucosa*, formata da tessuto connettivo, contiene fibre e cellule nervose (*plesso di Meissner*), vasi e, a seconda dei tratti dell'intestino, *adenomeri ghiandolari*. La *tonaca muscolare* è formata da due strati di muscolatura liscia a orientamento incrociato (uno *strato circolare* e uno *strato longitudinale*) tra i quali si interpone il *plesso nervoso di Auerbach*. Nel tratto iniziale e in quello terminale la muscolatura è striata.

La *tonaca sierosa* è la più esterna ed è in rapporto di contiguità con il peritoneo. Le *ghiandole intestinali di Galeazzi*, dette anche *cripte di Lieberkühn*, sono ghiandole tubulari semplici presenti in gran numero nella lamina propria della mucosa dell'intestino tenue. Si aprono in superficie, nel lume, alla base dei *villi intestinali*. Fra gli enterociti del loro epitelio sono presenti numerose *cellule caliciformi mucipare* e *cellule argentaffini endocrine* (deputate alla produzione di alcuni ormoni quali la

gastrina, la pancreozimina, la serotonina⁽³²⁾, ecc.). Sul fondo delle ghiandole sono presenti le *cellule di Paneth* (deputate alla sintesi di pochi enzimi proteolici e del lisozima).

Un aspetto evidente delle *cripte di Lieberkühn* è che in esse si reperiscono numerose mitosi, anche nell'individuo adulto.

I primi istologi⁽³³⁾ ritenevano che tale attività mitotica costituisse una sorta di “processo riparativo” dell'epitelio intestinale danneggiato dagli enzimi, dai cibi e dalle tossine batteriche: in seguito, Leblond e Stevens, nel 1948, dimostrarono (con esperimenti su ratti) che il digiuno alimentare - benché atto a impedire i danni tissutali dovuti all'ingestione dei cibi e a ridurre la produzione enzimatica - aveva scarsi effetti sull'attività mitotica: quest'ultima, pertanto, deve essere considerata fisiologica⁽³⁴⁾.

Aspetti particolari della struttura della tonaca mucosa dell'intestino tenue.

Le cellule della mucosa di questo tratto intestinale hanno la caratteristica di non essere monomorfe e di non essere tutte muco-secerenti; infatti, la maggior parte di esse appartiene alla categoria delle *cellule cilindriche alte*, con margine libero “striato” e hanno funzione assorbente: pertanto, non sono muco-secerenti.

Intercalate tra esse, tuttavia, sono presenti vere e proprie *cellule caliciformi* muco-secerenti.

L'epitelio delle *cripte di Lieberkühn* varia secondo la profondità: infatti, sul fondo della cripte si trovano cellule cilindriche (chiamate *cellule di Paneth*) il cui apice ha diametro inferiore rispetto alla base. I nuclei di queste cellule sono situati in prossimità della membrana basale; il citoplasma - nel tratto compreso tra il nucleo e l'apice, contiene granuli eosinofili. Nei granuli delle *cellule di Paneth* (come del resto nelle *Isole di Langerhans*, nelle cellule epiteliali della prostata e nei leucociti) è contenuto - in maggior concentrazione rispetto ad altri distretti corporei - lo Zinco (elemento peraltro molto diffuso, sia pure in quantità esigue, nei tessuti animali) la cui presenza può essere dimostrata con metodi istochimici quali il *Metodo al Ditizone* [difeniltiocarbazone] o con il *Metodo allo Zincon* [acido *o*-{2[α -(2-idrossi-5-solfofenilazo)-benzilidene]-idrazino}-benzoico]. Quest'ultimo metodo, di esecuzione assai semplice, viene usato comunemente sia per sezioni istologiche, sia per strisci ematici; si basa

(32) - La *Serotonina*, il cui nome IUPAC è 5-idrossitriptamina, è un neurotrasmettitore monoaminico sintetizzato sia nei neuroni serotoninergici, sia nelle cellule enterocromaffini dell'apparato gastrointestinale.

(33) - Vds., ad es.: G. BIZZOZERO, *Über die Regeneration der Elemente der schlauchförmigen Drüsen und des Epithels des Magendarmkanals*, *ANAT. ANZ. CENT.*, 3: 781-784, 1888.

Vds. anche: G. BIZZOZERO, *Über die schlauchförmigen Drüsen des Magendarmkanals und die Beziehungen ihres Epithels zu dem Oberflächenepithel*, *ARCH. MIKR. ANAT.*, 40: 325-375, 1892;

A.L.H. DIAS, *Un processus de régénération de l'épithélium intestinal*, *C. R. ASSOC. ANAT.*, 28: 235-239, 1933.

(34) - C.P. LEBLOND - C.E. STEVENS, *The constant renewal of the intestinal epithelium in the albino rat*, *ANAT. REC.*, 100: 357-378, 1948.

sulla reazione cromogena dello *Zincon* che forma con lo Zinco un composto dal colorito rossastro (la metodica è descritta in Appendice).

Le cellule di rivestimento situate verso lo sbocco delle cripte sono di *tipo cilindrico basso*: anche tra esse si trovano intercalate cellule caliciformi.

Le cellule cilindriche delle cripte differiscono da quelle dei villi: infatti, queste ultime hanno dimensioni maggiori, abbondano di vescicole a superficie rugosa nel reticolo endoplasmatico e di microvilli strettamente ravvicinati (contro una scarsità di vescicole a superficie rugosa, ma abbondanza di ribosomi liberi - segno di immaturità -, e scarsità ed irregolare distribuzione dei microvilli nelle cellule delle cripte).

Ad onta delle differenze morfologiche, con lo studio dello sviluppo embriologico si può dimostrare sia la medesima ontogenesi dell'epitelio delle cripte e di quello dei villi e sia che le relative cellule possono trasformarsi le une nelle altre.

Si deve a Leblond e Stevens (citati precedentemente) la descrizione di vari tipi di "zone di estrusione" in corrispondenza dell'apice dei villi, costituite da piccole soluzioni di continuo o da flussi di cellule in corso di eliminazione: la conclusione alla quale giunsero i due Autori fu che le cellule, prodotte nelle cripte, migrano attraverso il contorno dei villi per raggiungere le zone apicali di estrusione.

Gli studi di questi due Autori si svolsero su ratti e solo nel 1961 le loro conclusioni furono dimostrate valide anche per l'uomo, ad opera di Bertalanffy e Nagy⁽³⁵⁾.

Le cellule eliminate attraverso le zone di estrusione vengono, dunque, rimpiazzate (benché il meccanismo di tale *turnover* non sia del tutto noto) da quelle prodotte nelle cripte e proprio a tale "equilibrio" si deve il tipico aspetto istologico dell'epitelio intestinale.

Gli studi di Lipkin, Sherlock e Bell⁽³⁶⁾ hanno dimostrato, tra l'altro, che il *turnover time* nell'uomo è più lungo rispetto a quello degli animali di laboratorio, aggirandosi su 3-4 giorni.

A questo punto, mi sembra non del tutto superfluo rammentare, in modo particolare al principiante, che i *villi* protrudono nel lume della mucosa dell'intestino tenue, mentre le *cripte di Lieberkühn* affondano, dalla superficie, nella mucosa.

Le cellule caliciformi, analogamente a quelle cilindriche, derivano da processi mitotici localizzati nelle cripte e da queste migranti verso i villi, a differenza delle *cellule di Paneth* e delle *cellule argentaffini*. Queste ultime, chiamate anche *cellule enterocromaffini* (a causa dell'affinità con i sali di argento e di cromo presentata dai loro granuli citoplasmatici), si trovano distribuite tra le cellule di Paneth: sono morfologicamente variabili in rapporto con la loro collocazione, presentandosi *cilindriche* nei villi, ma *triangolari* (con gli apici leggermente retratti rispetto alla

(35) - F.D. BERTALANFFY - K.P. NAGY, *Mitotic activity and renewal rate of the epithelial cells of human duodenum*, *ACTA ANAT.*, 45: 362-371, 1961.

(36) - M. LIPKIN - P. SHERLOCK - B. BELL, *Cell proliferation kinetics in the gastrointestinal tract of man*, *GASTROENTEROLOGY*, 45: 721-729, 1963.

superficie, nonché con le basi stipate tra le basi delle cellule adiacenti e la sottostante membrana basale) nelle cripte. I nuclei di queste cellule, di forma rotonda, possono essere situati sia verso il polo apicale sia verso il polo basale, con una certa preferenza per quest'ultimo e, in ogni caso, in posizione paracentrale.

Per inciso, rammento che le cellule argentaffini sono presenti lungo tutto il tubo digerente, benché siano molto più numerose nel tenue; esse non vanno confuse con le cellule argentofile (presenti non solo nel tubo gastroenterico, ma anche in altre sedi quali la tiroide, il pancreas e i bronchi). L'*argentaffinità*, infatti, è la proprietà di una sostanza di *ridurre i sali di Argento ad Argento metallico*, mentre l'argentofilia non consente tale reazione chimica.

Le *cellule enterocromaffini*⁽³⁷⁾ possiedono questa proprietà che è legata alla presenza di 5-idrossitriptamina (conosciuta anche come *Serotonina*⁽³⁸⁾) e proprio per questa caratteristica vengono chiamate anche cellule *argentaffini*. Va precisato che l'argentaffinità non è specifica per la serotonina (e, dunque, per le cellule enterocromaffini), poiché la stessa reazione di riduzione dei sali di Argento è prodotta anche da altre sostanze riducenti, quali l'acido ascorbico, le melanine, ecc. Ritengo opportuno rammentare che, per lo studio istochimico delle cellule enterocromaffini, vengono generalmente utilizzate sezioni di tessuti fissati in formaldeide, poiché quest'ultima consente la differenziazione della serotonina dalle catecolamine le quali vengono, al contrario, inattivate dall'aldeide a seguito di un trattamento prolungato nel tempo. Può essere usata anche la glutaraldeide e, per studi ultrastrutturali, l'acido osmico; sono invece da proscrivere i fissativi a base alcolica⁽³⁹⁾.

(37) - M. VIALLI - V. ERSPAMER, *Contributo alla migliore conoscenza delle cellule enterocromaffini*, ARCH. IT. ANAT. EMBRIOL., 37: 411- 436, 1936.

(38) - Vittorio Erspamer ha isolato la *Serotonina* (inizialmente ritenuta un polifenolo) nel 1935, a Roma; nel 1938, a seguito dei suoi studi sulle ghiandole cutanee di rana e nelle ghiandole salivari di polpo, la sostanza fu chiamata *Enteramina*.

VDS.: M. VIALLI - V. ERSPAMER, *Ricerche sul secreto delle cellule enterocromaffini*, CELL AND TISSUE RESEARCH, 27: 81-99, 1937;

V. ERSPAMER, *Caratterizzazione biologica di una nuova amina di-o-polifenolica negli estratti acetonicici di ghiandola salivare posteriore di Octopus vulgaris*, ARCH. SCIENZE BIOL., 26: 295-340, 1940;

V. ERSPAMER, *Ricerche farmacologiche sull'enteramina. VII. Enteramina e indolalchilamine del veleno di rospo*, ARCH. SCIENZE BIOL., 31: 86-95, 1946;

V. ERSPAMER - G. BORETTI, *Identification of enteramine and enteramine-related substances in extracts of posterior salivary glands of Octopus vulgaris by paper chromatography*, EXPERIENTIA, 6: 348-349, 1950;

V. ERSPAMER - B. ASERO, *Identification of enteramine, the specific hormone of the enterochromaffin cell system, as 5-hydroxytryptamine*, NATURE, 169: 800-801, 1952.

Solo nel 1950, dopo essere stata isolata anche nell'uomo, fu adottato il nome di Serotonina (secondo la terminologia IUPAC: 5-idrossitriptamina [abbreviata in: 5-HT]).

La 5-HT è contenuta, in elevate concentrazioni, anche nelle piastrine: queste la accumulano dal plasma (attraverso un sistema di trasporto attivo) e la rilasciano in seguito al verificarsi della loro aggregazione nei siti di danno tissutale.

(39) - Cfr.: E. BONUCCI, *Manuale di Istochimica*, Lombardo Editore, Roma, 1981, p. 278 sgg.

Per quanto attiene alle cellule argentofile, che pure hanno in comune con le cellule argentaffini la proprietà di secernere polipeptidi di natura ormonale e di rappresentare - quindi - un *sistema endocrino diffuso* non limitato ad uno specifico organo, va precisato che esse, precedentemente considerate come cellule pre-enterocromaffini, sono state invece successivamente identificate come vere e proprie cellule endocrine e catalogate, infine, come *Sistema APUD (Amine Precursor Uptake and Decarboxylation)*, a causa della loro capacità di catturare e decarbossilare i precursori delle amine biogene.

Appare non inopportuno ricordare che, nella nomenclatura delle cellule APUD, si tiene conto dell'ormone prodotto: si hanno, così, cellule C (secernenti calcitonina) [soprattutto nella tiroide], cellule A (secernenti Glucagone) [nel pancreas], cellule G (secernenti gastrina) [nel piloro], cellule ECL (secernenti istamina) [nel fondo gastrico], cellule S (secernenti secretina) [nel duodeno] e cellule EG (secernenti l'entero-glucagone) [nell'intestino].

I metodi per il riconoscimento delle cellule enterocromaffini e delle cellule argentofile sono descritti in Appendice.

APPENDICE VERMIFORME

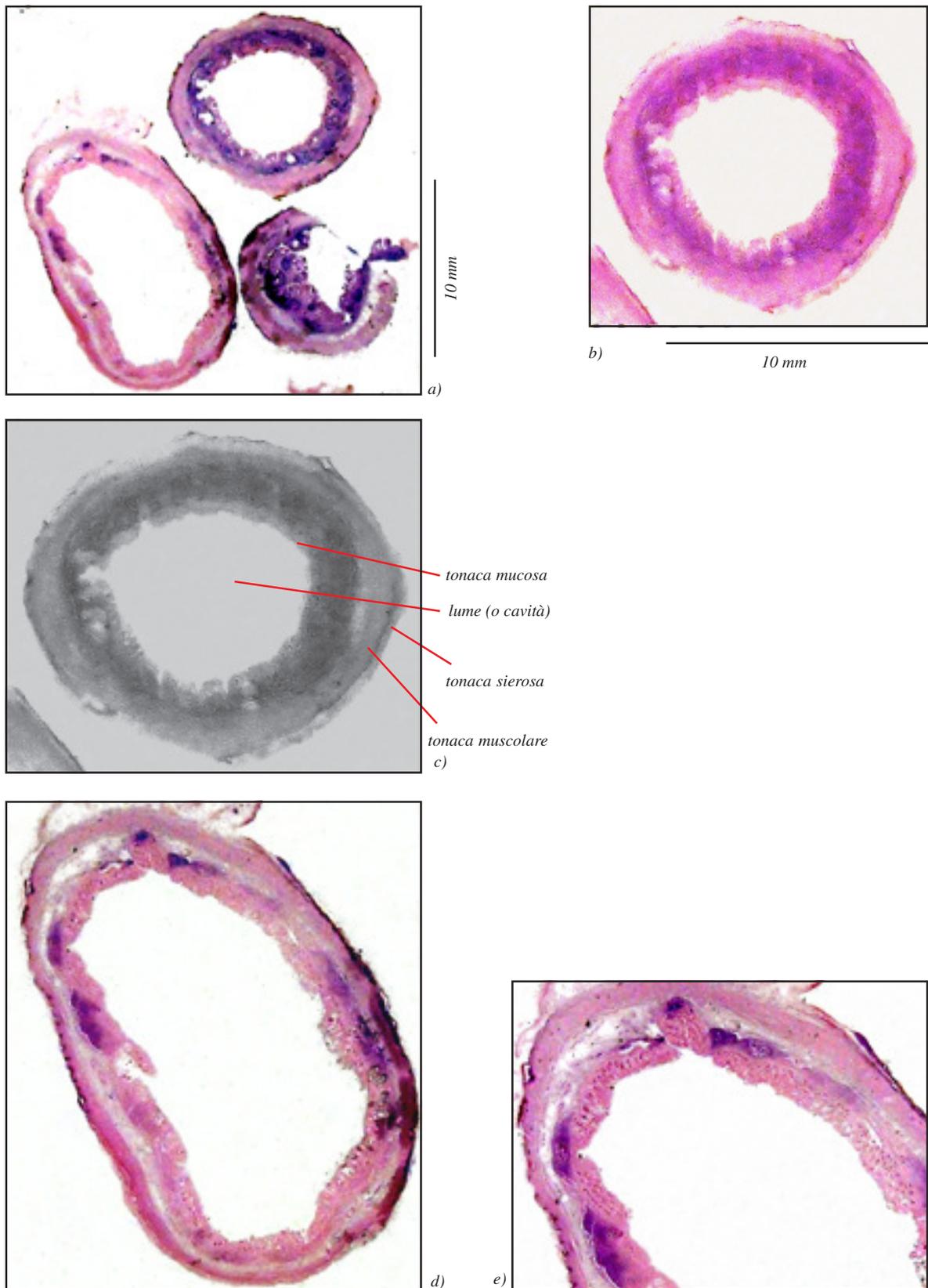


fig. 44 a - e). Appendice (sezione orizzontale). Colorazione: Ematossilina-Eosina.

APPENDICE VERMIFORME

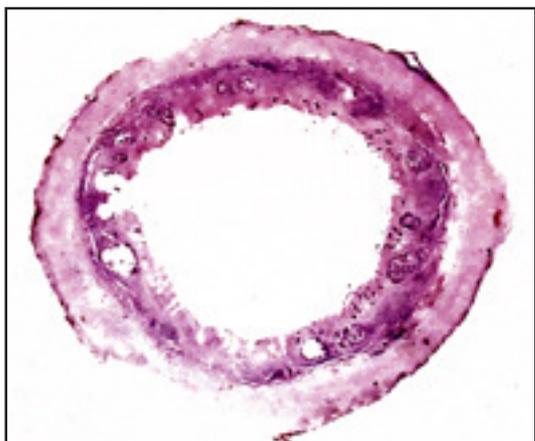
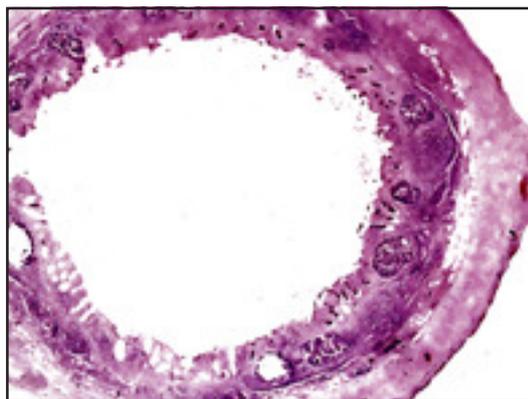
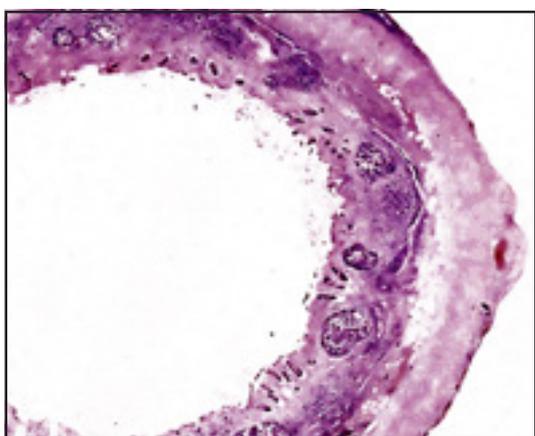


fig. 45 a)



b)



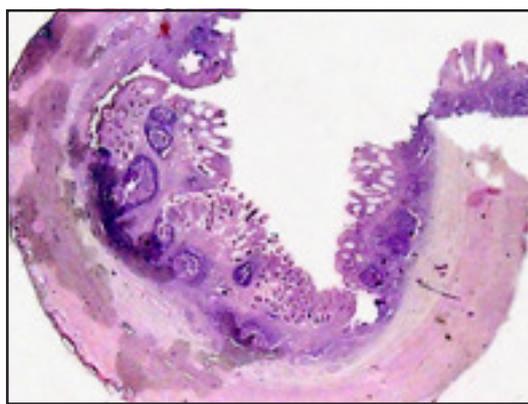
c)



d)



e)



f)

fig. 45 a - f). Appendice vermiforme; macrofotografie delle tre componenti del preparato di fig. 44, a ingrandimenti maggiori.
Colorazione: Ematossilina-Eosina.

APPENDICE VERMIFORME

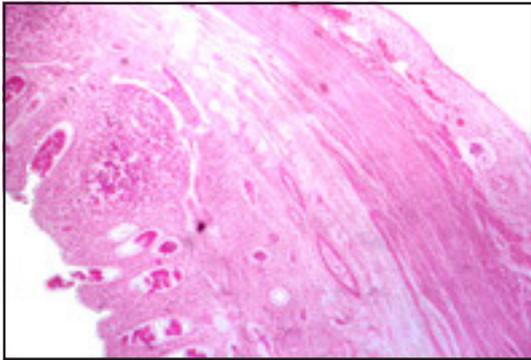
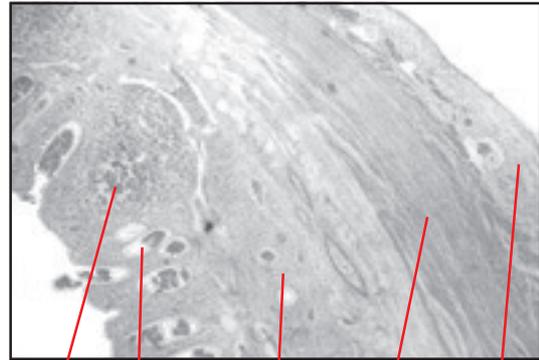
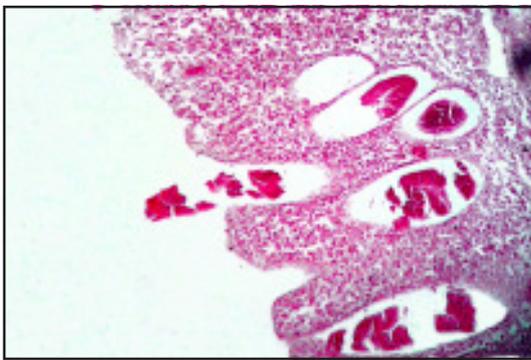


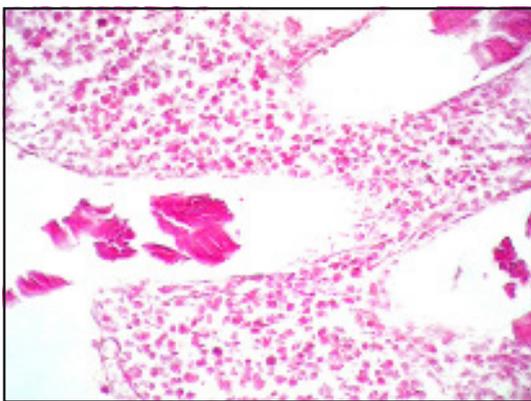
fig. 47 a) obb.: 4/0,10 0,1 mm



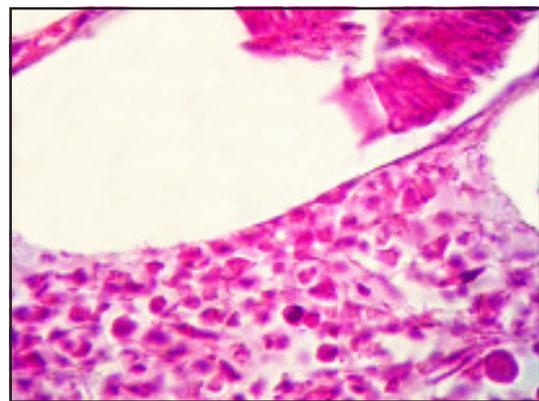
b) cripta di Lieberkühn tonaca muscolare tonaca sierosa
sottomucosa
centro germinativo del follicolo



c) obb.: 10/0,25 0,1 mm



d) obb.: 25/0,40 50 μ



e) obb.: 40/0,95 10 μ

fig. 46 a-e). Appendice. Colorazione: Ematossilina-Eosina.

APPENDICE VERMIFORME

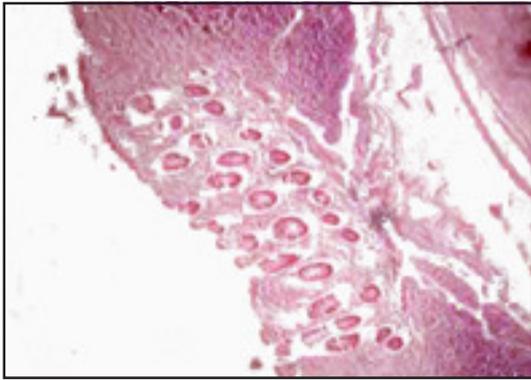
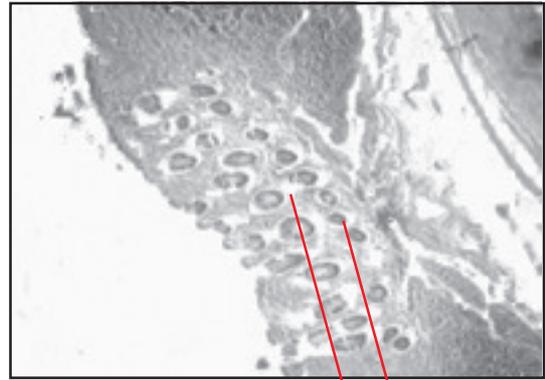
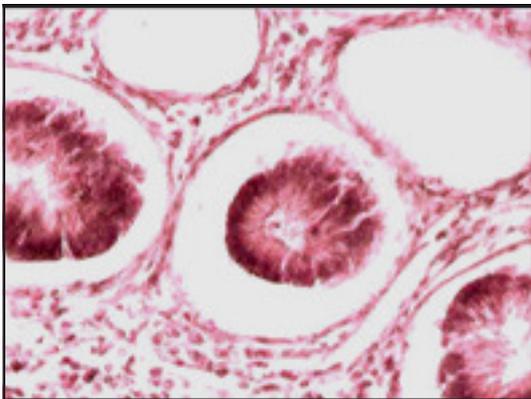


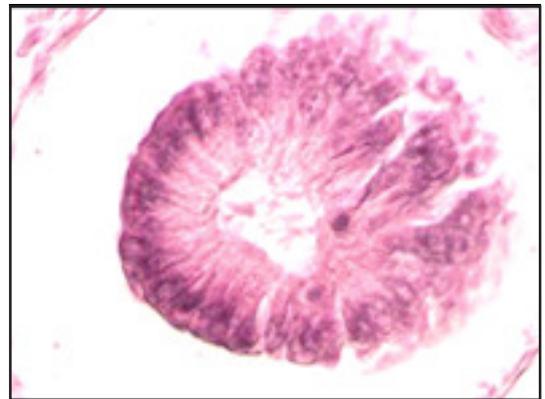
fig. 47 a) *obb.: 4/0,10* *0,1 mm*



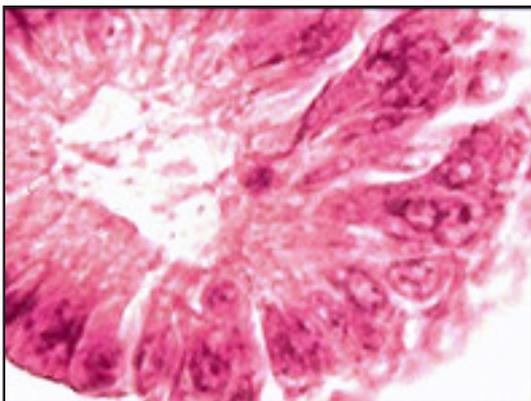
b) *cripte di Lieberkühn*



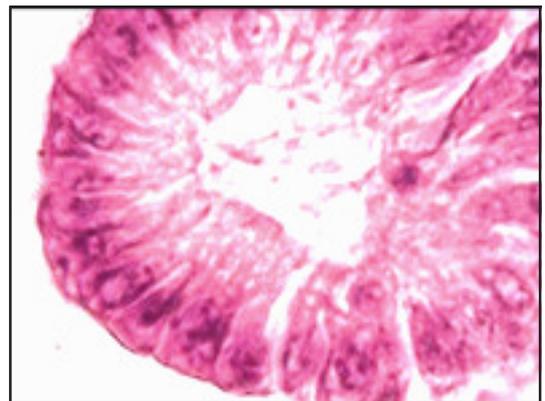
c) *obb.: 10/0,25* *50 μ*



d) *obb.: 25/0,40* *20 μ*



e) *obb.: 40/0,95* *10 μ*



f) *obb.: 40/0,95* *10 μ*

fig. 47 a-f). Appendice: cripte di Lieberkühn a ingrandimento crescente. In particolare, e - f: campi contigui. Colorazione: Ematosilina-Eosina.

APPENDICE VERMIFORME

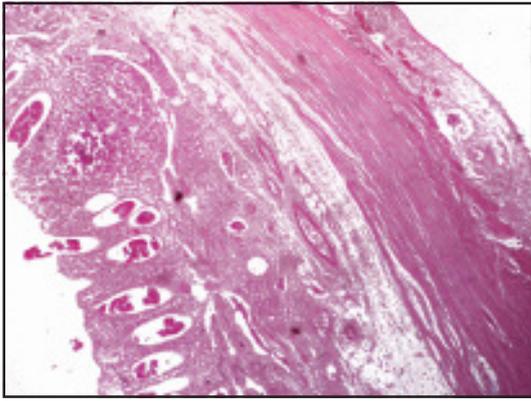
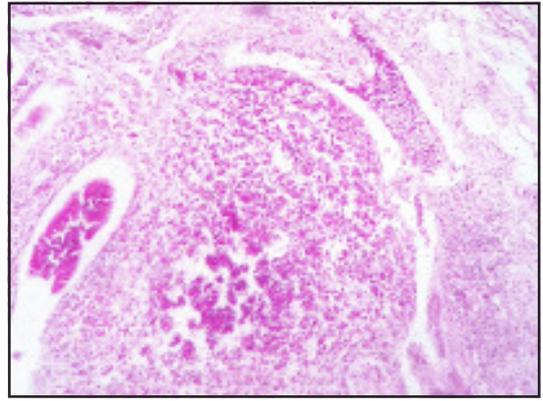
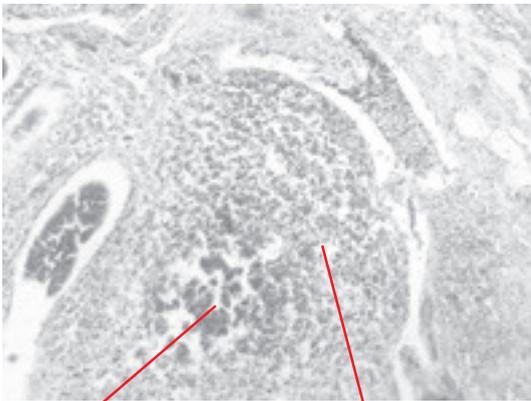


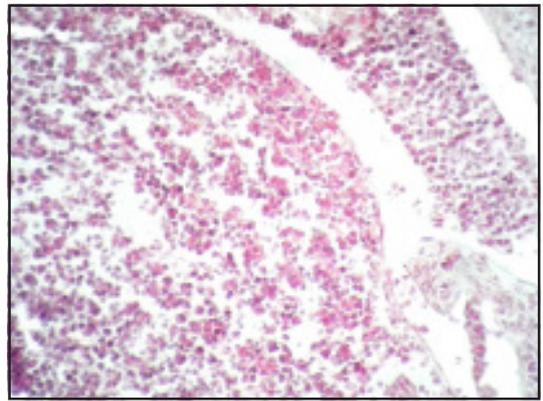
fig. 48 a) *obb.: 4/0,10* $0,1\text{ mm}$



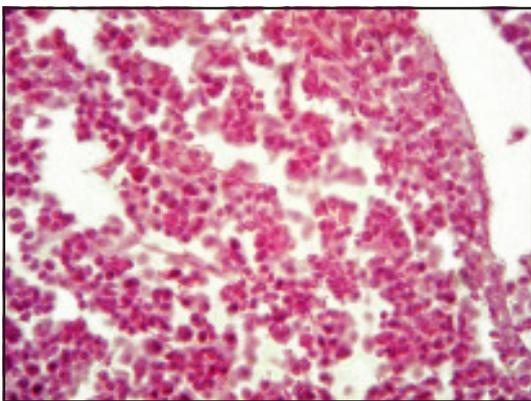
b) *obb.: 10/0,25* $0,1\text{ mm}$



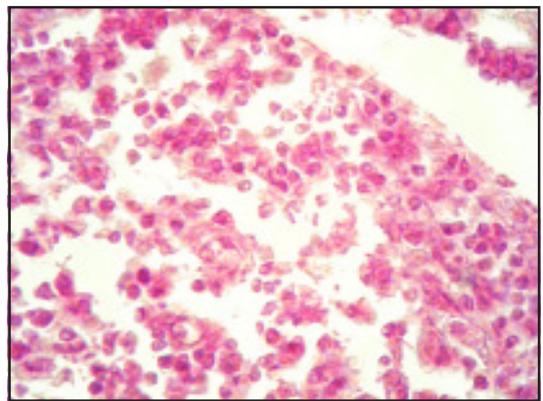
c) *centro germinativo* *follicolo*



d) *obb.: 25/0,40* $50\ \mu$



e) *obb.: 40/0,95* $10\ \mu$



f) *obb.: 60/0,85* $20\ \mu$

fig. 48 a - f). Appendice: cripte di Lieberkühn e un follicolo contenente un centro germinativo. Colorazione: Ematossilina-Eosina.

APPENDICE VERMIFORME

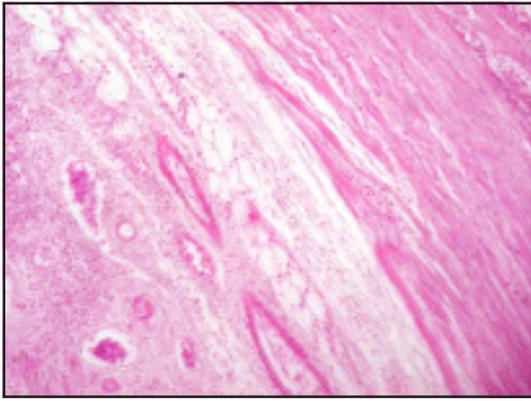
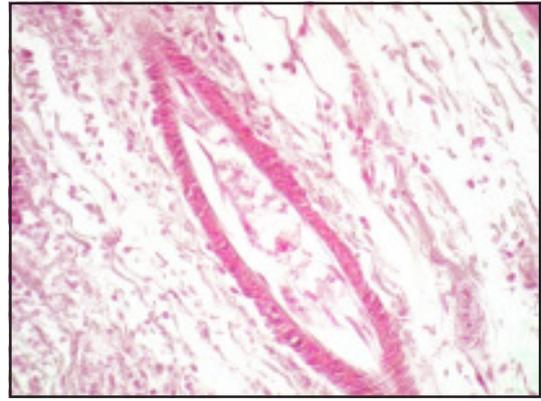
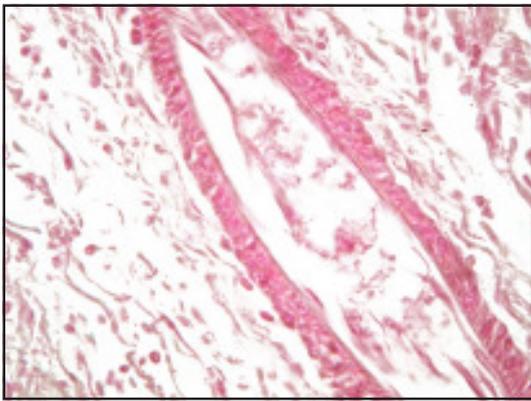


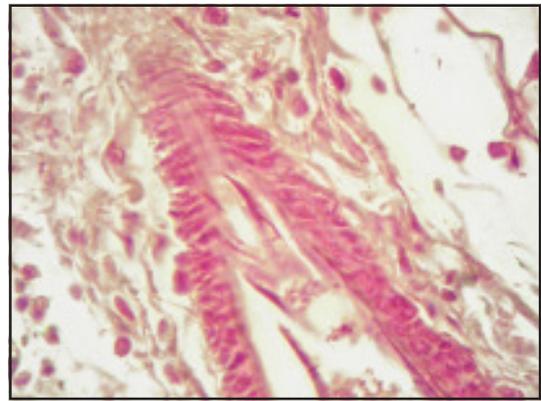
fig. 49 a) *obb.: 10/0,25* $0,1\text{ mm}$



b) *obb.: 25/0,40* $50\ \mu$



c) *obb.: 40/0,95* $10\ \mu$



d) *obb.: 60/0,85* $20\ \mu$

fig. 49 a - d). Appendice: tonaca sottomucosa. Colorazione: Ematossilina-Eosina.

APPENDICE VERMIFORME

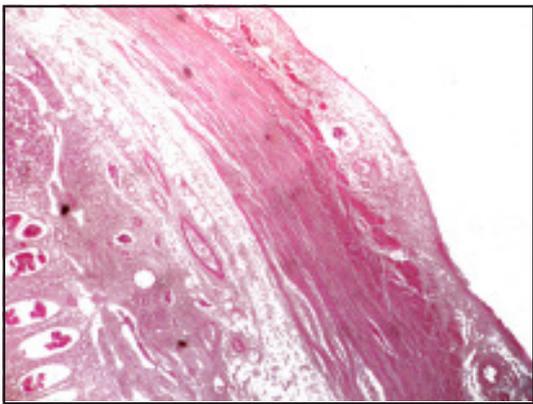
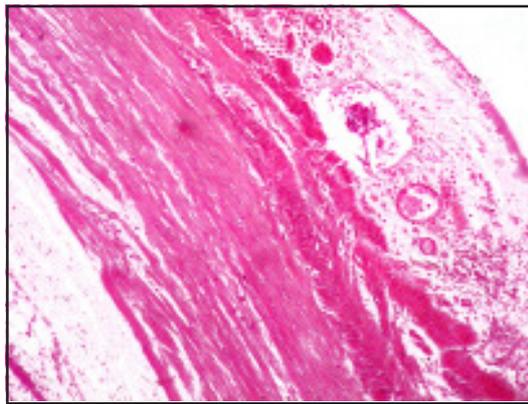
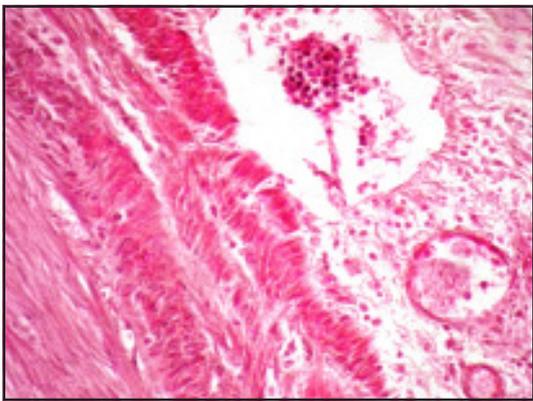


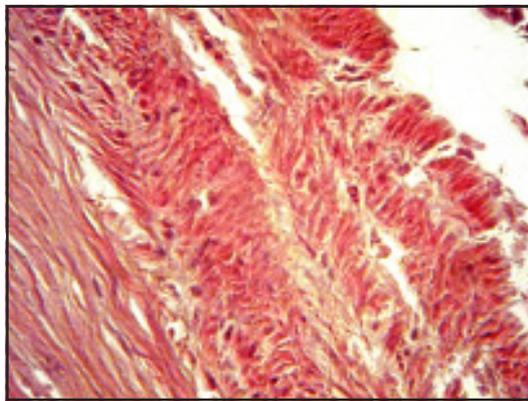
fig. 50 a) *obb.: 4/0,10* $0,1\text{ mm}$



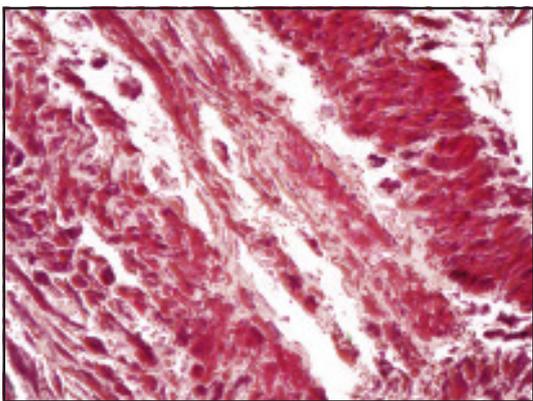
b) *obb.: 10/0,25* $0,1\text{ mm}$



c) *obb.: 25/0,40* $50\ \mu$



d) *obb.: 40/0,95* $10\ \mu$



e) *obb.: 60/0,85* $20\ \mu$

fig. 50 a - e). Appendice: tonache muscolare e sierosa.
Colorazione: Ematossilina-Eosina.

APPENDICE VERMIFORME

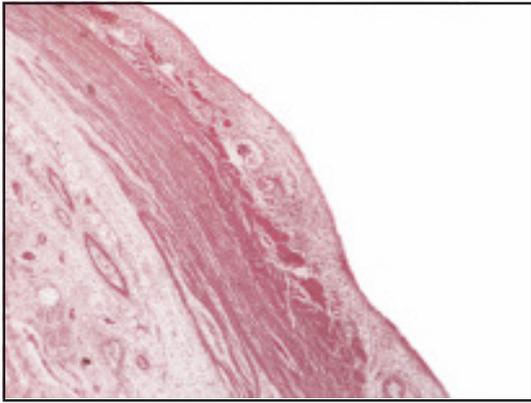
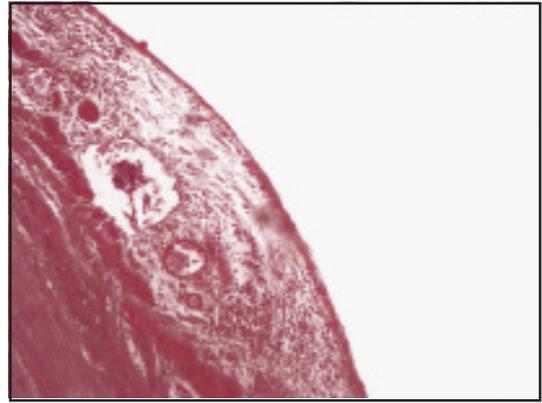
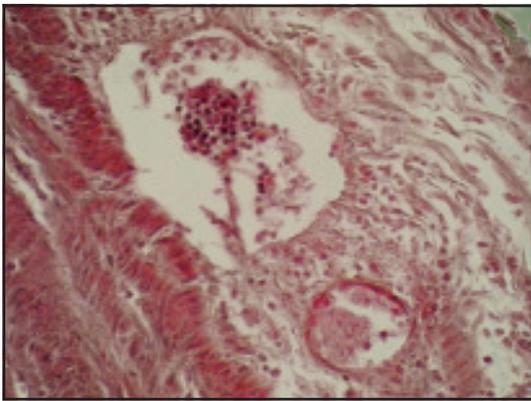


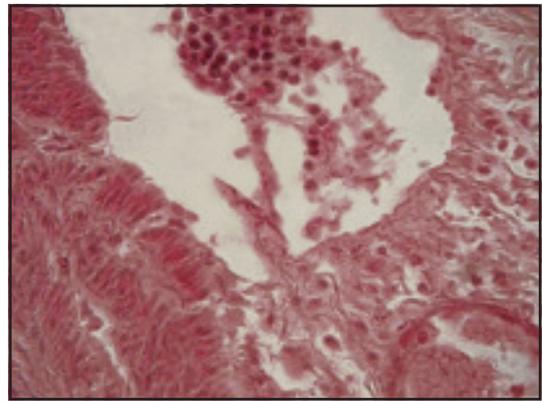
fig. 51 a) *obb.: 4/0,10* *0,1 mm*



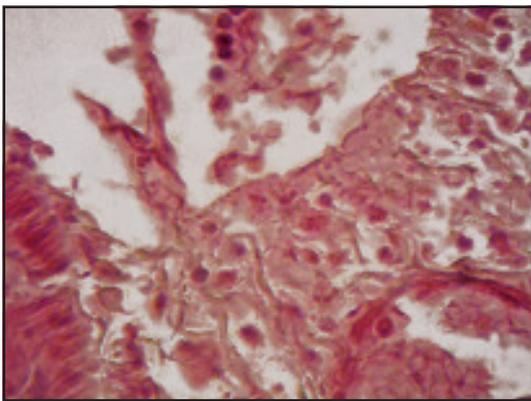
b) *obb.: 10/0,25* *0,1 mm*



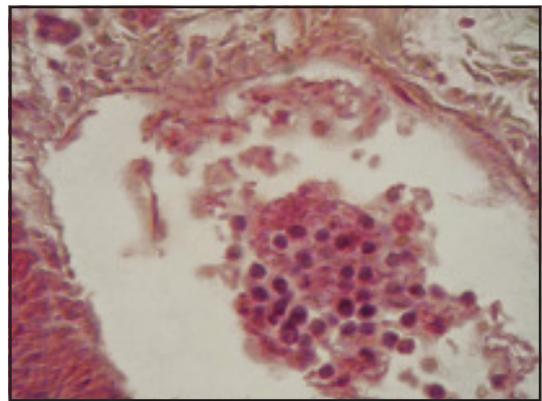
c) *obb.: 25/0,40* *50 μ*



d) *obb.: 40/0,95* *10 μ*



e) *obb.: 60/0,85* *20 μ*



f) *obb.: 60/0,85* *20 μ*

fig. 51 a - f). Appendice; immagini varie della tonaca sierosa, nella zona di contatto con la tonaca muscolare.
Colorazione: Ematossilina-Eosina

APPENDICE VERMIFORME

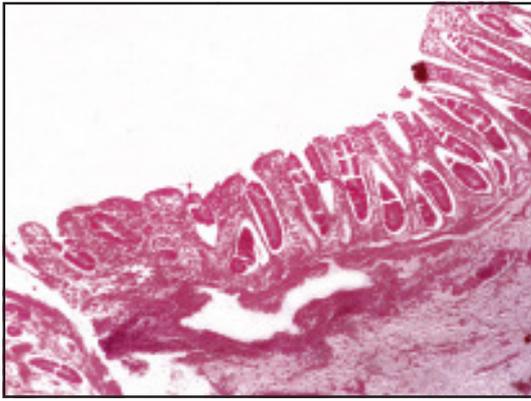
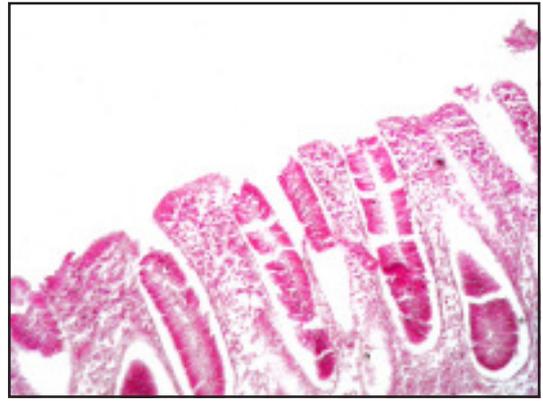


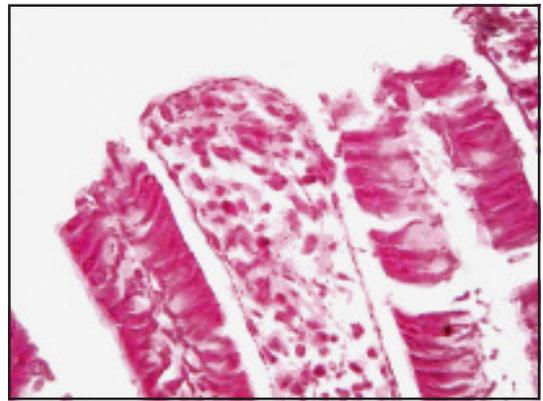
fig. 52 a) *obb.: 4/0,10* *0,1 mm*



b) *obb.: 10/0,25* *0,1 mm*



c) *obb.: 25/0,40* *50 μ*



d) *obb.: 40/0,95* *10 μ*

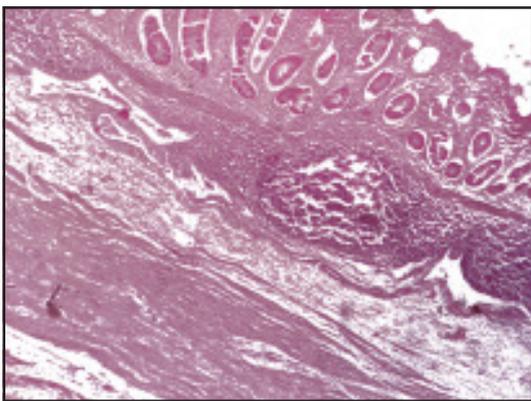
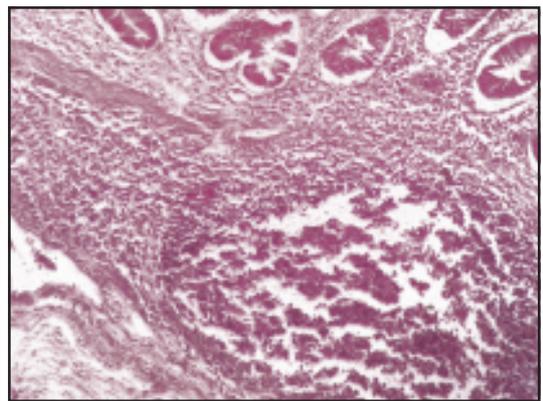


fig. 53 a) *obb.: 4/0,10* *0,1 mm*



b) *obb.: 10/0,25* *0,1 mm*

Fig. 52 a-d: Appendice; villi. Colorazione: Ematossilina-Eosina.

Fig. 53 a-b: Appendice; un tipico follicolo linfoide dell'appendice; la morfologia è simile a quella delle Placche di Peyer. Colorazione: Ematossilina-Eosina.

MILZA

È un voluminoso organo situato profondamente nell'ipocondrio sinistro, in prossimità del rachide, sotto lo stomaco in posizione iuxta-diaframmatica, e completamente rivestito dal peritoneo; quest'ultimo, in corrispondenza dell'ilo splenico, si ripiega e forma due legamenti che congiungono la milza (che occupa la loggia splenica e aggetta nella cavità peritoneale) con gli organi vicini: il *legamento gastro-lienale* (anteriormente) e il *legamento posteriore della milza* (posteriormente). In particolare, il legamento gastrolienale può prolungarsi, in basso, fino al mesocolon e al colon trasverso, formando il *legamento colico-lienale*; il legamento posteriore della milza, una volta raggiunta la parete addominale posteriore, presenta le lamine che lo costituiscono ormai separate: una di esse si dirige cranialmente, si inserisce nel diaframma chiudendo la sommità del *recesso lienale* e prende la denominazione di *legamento frenico-lienale*; l'altra, denominata *legamento pancreatico-lienale*, si ripiega caudalmente e va ad includere la *coda del pancreas* e i *vasi lienali*.

Morfologicamente può essere assimilata a una piramide con la base - grossolanamente triangolare - rivolta antero-caudalmente e il vertice, invece, rivolto postero-cranialmente; l'asse principale di questo organo è diretto in basso e in avanti, verso le coste fluttuanti con le quali contrae rapporto di prossimità.

Il colore della milza è rosso vinoso; la sua superficie è liscia; la consistenza è molle (tanto da essere facilmente danneggiata da traumi anche di non eccezionale entità). Le dimensioni e il peso sono variabili con l'età: il volume, infatti, va crescendo con l'età, fino al massimo tra i 20 e i 40 anni per poi diminuire (conseguentemente a progressiva atrofia) nella senescenza. La lunghezza è compresa tra i 12 e i 13 cm; la larghezza tra i 6 e gli 8 cm; lo spessore tra i 3 e i 3,5 cm. Il peso medio - nell'adulto - si aggira sui 225 g circa, rappresentando così circa 1/320 - 1/400 del peso corporeo totale. La milza, nell'adulto, è normalmente unilobata; tuttavia, appartengono alla normalità anche casi di polilobatura, situazione peraltro del tutto normale nel feto umano e in altri mammiferi e che è causa delle incisure superficiali che si possono repertare sul margine superiore e sulla faccia diaframmatica dell'organo.

La milza è un organo linfoide e vascolare: si comporta sia da organo anticorpopoietico sia come filtro selettivo nel circolo ematico, reagente a influenze sistemiche; è formata, infatti, da ampi spazi vascolari specializzati entro i quali scorre il sangue (a differenza dei linfonodi che, disposti nel circolo linfatico, filtrano la linfa).

È opportuno precisare che l'aspetto istologico di questo organo è notevolmente variabile secondo la specie: la milza umana è notevolmente differente da quella di altri animali. Inoltre, lo studio microscopico è reso difficoltoso dai precoci fenomeni di autolisi *post-mortem* e dalle alterazioni delle condizioni fisiologiche generali

dell'organismo nel caso di reperti operatori.

La milza è avvolta da una spessa *capsula* (denominata *albuginea*) di tessuto miofibroso dalla cui superficie interna si originano trabecole che, penetrate nell'organo, si ramificano suddividendolo in compartimenti tra loro comunicanti.

Gli spazi delimitati dalla capsula e le trabecole sono occupati dalla *polpa splenica* nelle sue due tipologie, *bianca* o *rossa*, separate dalle *zone marginali* (consistenti in una fine tessitura reticolare contenente cellule). Entrambe sono costituite da tessuto connettivo reticolare (simile a quello degli altri organi linfo-emopoietici) e da cellule libere catturate nelle maglie della rete cellulo-fibrillare; tuttavia, la *polpa bianca* è un tessuto linfatico costituito essenzialmente da accumuli di linfociti, plasmacellule e macrofagi liberi immersi nelle maglie del reticolo. Essa è formata da *manicotti linfatici periarteriolarari* (formati da accumuli - poco organizzati nell'essere umano - [comunemente denominati in letteratura come **PALS**: *PeriArteriolar Lymphoid Sheets*] di linfociti T e costituenti l'area splenica T-dipendente) - che circondano le ramificazioni di minor calibro dell'arteria centrale - e dai *corpuscoli di Malpighi* (noduli linfatici di colore biancastro, tondo-ovalari, di diametro 0,2 - 0,7 mm, formati da linfociti B e costituenti l'area splenica B-dipendente).

I corpuscoli malpighiani sono morfologicamente simili ai noduli corticali linfonodali: anch'essi, infatti, sono provvisti di *centri germinativi* con funzione reattiva in presenza di stimoli antigenici.

In realtà, i corpuscoli di Malpighi sono formati dall'ispessimento di un manicotto linfatico contornante un ramuscolo arterioso derivante da un'arteria trabecolare⁽⁴⁰⁾. Nel centro di questi corpuscoli si evidenzia un'arteria centro-follicolare dotata di tunica media assai sviluppata e di avventizia le cui cellule collagene si continuano nel reticolo follicolare (a maglie lasse, di forma poligonale, contenente grandi cellule rotondeggianti - spesso nucleolate - con struttura cromatinica assai fine e dotate di protoplasma ampio e notevolmente basofilo).

Partendo dal centro dei follicoli malpighiani e procedendo verso la loro periferia si nota una progressiva maturazione cellulare, evidenziata dalla presenza di elementi cellulari via via più grandi e dotati di protoplasma più diafano e nucleo con trama cromatinica sempre più fine.

Appare del tutto naturale, dunque, correlare l'attività proliferativa dei corpuscoli di Malpighi con l'evoluzione del loro centro germinativo e della loro struttura periferica. I *centri germinativi* possono essere di *tipo istioide* (con presenza di cariocinesi) o di *tipo epitelioido* (contenenti elementi di origine reticolo-endoteliale mostranti un aspetto epiteliale tubercolare); talora, questi centri possono presentarsi in

(40) - Cfr.: L. MAZZA, *Anatomia e istologia dei tessuti emopoietici, cit.*, pag. 315.

degenerazione ialina, microscopicamente evidenziabile per la presenza di sostanza ialina amorfa, fortemente eosinofila.

Il reticolo follicolare, alla sua periferia si continua con quello della polpa rossa e le cellule appartenenti ad entrambi si confondono tra loro.

La *polpa rossa* (così denominata per l'abbondante presenza ematica) presenta due tipi di strutture: i *sinusoidi* (o *seni*) venosi e i *cordoni di Billroth* (o *cordoni lienali*), composti da cellule riunite in cordoni che riempiono gli spazi interposti tra i sinusoidi. I *cordoni di Billroth* contengono, oltre al sangue, cellule libere connettivali, tra le quali macrofagi liberi e plasmacellule immerse disordinatamente nelle maglie della rete.

Mettendo a confronto milza e linfonodi, si nota che - strutturalmente - i corpuscoli di Malpighi corrispondono ai follicoli linfatici linfonodali, mentre i cordoni di Billroth corrispondono ai cordoni midollari linfonodali e contengono i medesimi elementi cellulari.

I *sinusoidi*, lunghi canali vascolari venosi con lume ampio e irregolare, sono costituiti da endotelio e dalla lamina basale; confluiscono nelle vene della polpa splenica.

Microscopicamente, l'endotelio dei sinusoidi è costituito da caratteristiche cellule fusiformi, di lunghezza di circa 100 μ , il cui asse maggiore è parallelo all'asse longitudinale del vaso; queste cellule non sono interconnesse tra loro ma sono separate da piccole *lacune* tra le quali possono transitare le cellule ematiche⁽⁴¹⁾⁽⁴²⁾.

L'arteria splenica penetra nell'ilo lienale e si ramifica, seguendo il decorso delle trabecole, i suoi rami assottigliandosi viepiù fino a che - raggiunto un diametro di circa 0,2 mm - le loro terminazioni si trovano libere nella polpa bianca e circondate dalla guaina linfoide: vengono denominate *arteriole centrali del follicolo* e alcuni loro rami penetrano - insieme con il tronco principale - nella polpa rossa assottigliandosi e suddividendosi ulteriormente fino a esitare in piccoli vasi a decorso rettilineo, i *rami penicillari* (a causa della loro morfologia "a pennello").

Sia i rami dell'arteria centrale (nella polpa bianca) sia i rami penicillari (nella polpa rossa) esitano dando origine a una ricca rete capillare.

Il circolo venoso splenico inizia con i *seni venosi* che affluiscono alle *vene della polpa* che decorrono nelle trabecole e, giunte all'ilo, formano le radici della vena splenica, tributaria della vena porta.

Le modalità di raccordo tra il circolo arterioso e quello venoso della polpa splenica hanno dato origine a molteplici teorie e discussioni. Allo stato attuale delle conoscenze, due sono le ipotesi accreditate: la prima sostiene che la circolazione ematica

(41) - Al M.E. il citoplasma di queste cellule appare ripieno di filamenti actino-simili (dello spessore di circa 50 Å) e di filamenti "intermedi" (dello spessore di circa 100 Å).

(42) - Alcuni Autori ritengono che le *lacune* non sarebbero precostituite, ma al loro posto esisterebbero specifici aggregati micellari in grado di modificare - secondo necessità - il grado di compattezza cellulare così da originare alternativamente una zona compatta o una zona lacunare (Cfr.: L. MAZZA, *Anatomia e istologia dei tessuti emopoietici*, cit., pag. 317).

intrasplenica sia “aperta”, con ciò indicando che i capillari arteriosi sfociano direttamente nella polpa rossa, previo un ispessimento dell'avventizia, denominato *guaina di Schweigger-Seidel*.

Il sangue, fuoriuscito dai capillari arteriosi, filtrerebbe attraverso i cordoni di Billroth i quali, dunque, risulterebbero essere funzionalmente ampi spazi vascolari cavernosi. La seconda teoria, al contrario (sostenuta da Knisely⁽⁴³⁾ fin dal 1936), afferma che la circolazione ematica intrasplenica sia “chiusa” (analogamente a quanto avviene in tutti gli altri distretti vascolari del corpo umano) e, pertanto, i capillari arteriosi sfocerebbero - senza soluzione di continuità - nel lume dei seni venosi: in tal modo il sangue, per filtrare nei cordoni di Billroth, deve attraversare la parete dei sinusoidi e ritornarvi ripercorrendo - all'inverso - lo stesso tragitto. Il *plasma*, secondo questa teoria, verrebbe riassorbito tramite i vasi linfatici e verrebbe reimpresso nel torrente ematico attraverso il *dotto toracico*. Knisely ha descritto *formazioni sfinteriche* alle estremità dei seni venosi, nonché *formazioni ellissoidi* - costituite da elementi cellulari claviformi e disposte ad intervalli lungo il decorso delle arteriole - alle quali attribuì funzioni valvolari⁽⁴⁴⁾.

Il flusso ematico, pertanto, attraversando le anastomosi capillari - regolate dagli sfinteri - può transitare attraverso la milza senza riversarsi nella polpa rossa o nei sinusoidi. Knisely ha anche dimostrato che in corrispondenza delle estremità dei sinusoidi sono presenti sfinteri i quali, a seconda del loro stato di contrazione o di rilassamento, hanno morfologia e funzioni diverse.

Infatti, quando un sinusoidi si trova nella *fase di conduzione*, sia lo *sfintere afferente* sia quello *effidente* sono *aperti* e il diametro del sinusoidi risulta piuttosto stretto.

Quando un sinusoidi presenta lo *sfintere afferente aperto* e quello *effidente contratto*, le sue pareti tratterrebbero gli eritrociti lasciando passare il plasma nella polpa: il sinusoidi sarebbe, dunque, nella fase di *filtrazione-riempimento*. Una volta riempitosi di eritrociti, il sinusoidi entra nella *fase di accumulo*: lo *sfintere afferente si chiude*. In seguito *entrambi gli sfinteri si aprono* e il sinusoidi entra nella *fase di svuotamento*, con immissione in circolo degli eritrociti accumulatisi [HAM].

Appare opportuno ricordare la difficoltà di ripetere le esperienze osservative di Knisely: egli, infatti, si servì di un particolare metodo di illuminazione - detto “a bacchetta di quarzo” - che presenta non poche difficoltà realizzative: infatti, MacKenzie, Whipple e Wintersteiner⁽⁴⁵⁾ non riuscirono a riottenere i risultati di Knisely. Peck e Hoerr⁽⁴⁶⁾,

(43) - M.H. KNISELY, *Spleen studies: I. Microscopic observations of the circulatory system of living unstimulated mammalian spleens*, *ANAT. REC.*, 65: 23, 1936;

M.H. KNISELY, *Spleen studies: II. Microscopic observations of the circulatory system of living traumatized, and of drying spleens*, *ANAT. REC.*, 65: 131, 1966.

(44) - Cfr.: L. MAZZA, *Anatomia e istologia dei tessuti emopoietici*, cit., pag. 318.

(45) - D.W. MACKENZIE JR.- A.O. WIPPLE - M.P. WINTERSTEINER, *Studies on the microscopic anatomy and physiology of living transilluminating mammalian spleens*, *AM. J. ANAT.*, 68: 397- 456, 1941.

(46) - H.M. PECK - N.L. HOERR, *The intermediary circulation in the red pulp of the mouse spleen*, *ANAT. REC.*, 109: 447- 477, 1951.

tuttavia, rivisitando la metodica kniselyana con un maggior grado di accuratezza, riuscirono a confermare i dati sperimentali di quell'Autore.

Le funzioni della milza sono molteplici e di notevole importanza:

a) *funzione emocateretica* (dal greco **αιμα** [aìma]= sangue e **καθαιρεσις** [katàiresis] = distruzione) o *emoclastica* (dal greco: **αιμα** [aìma]= sangue e **κλαω** [klào]= rompo, spezzo). La struttura reticolare (ospitante nelle sue maglie numerosissimi macrofagi) presente nei cordoni di Billroth determina un notevole rallentamento del flusso ematico, favorendo in tal modo l'azione emocateretica.

Gli eritrociti danneggiati o invecchiati, avendo perduto l'elasticità della membrana citoplasmatica, vengono letteralmente sequestrati nel letto vascolare splenico, ove i macrofagi provvedono alla loro distruzione, separando il *ferro* dalla *porzione non ferrosa dell'eme* la quale ultima viene convertita in *bilirubina*.

Il ferro, invece, si deposita come *ferritina* ed *emosiderina* oppure si lega alla *transferrina*, proteina plasmatica che provvede a veicolarlo verso il midollo osseo, ove verrà nuovamente utilizzato nell'emopoiesi.

La funzione emocateretica della milza si esplica anche nei confronti dei leucociti e dei trombociti invecchiati nonché su qualsivoglia genere di materiale particolato (o comunque estraneo) eventualmente presente nel plasma.

Mi sembra utile rammentare che la funzione emocateretica non appartiene solo alla milza, ma è presente anche nel sistema reticolo-istiocitario midollare, epatico, polmonare e di altri organi, pur pertinendo all'organo splenico il maggior carico di lavoro.

b) *funzione di separazione delle cellule ematiche dal plasma e di accumulo degli elementi ematici*. La polpa rossa splenica, come si è già visto, svolge funzioni di accumulo degli eritrociti per mezzo soprattutto del reticolo fibrillo-cellulare spugnoso in essa presente. Tuttavia, appare opportuno rammentare che tra i meccanismi che regolano l'accumulo degli eritrociti o la loro cessione al circolo ematico vanno ricompresi anche la contrazione muscolare della vena splenica e della capsula a seguito di stimolazione nervosa simpatica⁽⁴⁷⁾.

Inoltre, va ricordato che i monociti - in varie circostanze - possono venire sequestrati e accumulati nella milza, subendo poi la trasformazione in macrofagi.

Destino simile possono subire anche i granulociti e le piastrine (ad es., nello shock da trauma): essi possono venire accumulati in quantità enormi nella milza, essendo in tal modo sottratti al circolo ematico.

c) *funzioni immunologiche*. Si tratta della capacità splenica di sequestro degli antigeni emoveicolati, con susseguente concentrazione a livello della polpa bianca, ove avviene la conseguente risposta immunitaria vera e propria ad opera della fagocitosi, dell'attività T-linfocitaria e della produzione anticorpale da parte dei linfociti B.

(47) - Cfr.: V. MONESI, *Istologia, cit.*, p. 706.

La proliferazione dei linfociti e la produzione anticorpale avvengono essenzialmente nei centri germinativi glomerulari, analogamente a quanto avviene nei linfonodi. In particolare, a seguito di un primo contatto con l'antigene, i centri germinativi ospitano le *cellule responsabili della memoria immunologica* le quali sono in grado di produrre massivamente l'anticorpo specifico (la cosiddetta *risposta immunologica secondaria*) nel caso di un ulteriore "insulto" da parte del medesimo antigene.

d) *funzioni emopoietiche*. La linfopoiesi splenica, in assenza di stimolazione antigenica, è di assai modesta entità, venendo - invece - enormemente esaltata in presenza di antigeni. È opportuno rammentare che, nel primo trimestre di vita fetale, la milza esplica funzioni eritro e mielopoietiche, che vengono meno con l'avvento dell'attività emopoietica midollare. Peraltro, in alcune patologie (es.: leucemia mieloide, fibrosi midollare, ecc.) la polpa rossa splenica va incontro a metaplasia mieloide, assumendo nuovamente la capacità eritro-granulocitopoietica.

Circa la formazione e la distribuzione delle plasmacellule nella milza, appare opportuno spendere qualche parola.

Nel 1965 Movat e Fernando ⁽⁴⁸⁾ pubblicarono i risultati da loro ottenuti stimolando, con l'introduzione per via endovenosa di un antigene, la milza di conigli.

Nelle loro esperienze, questi due Autori hanno dimostrato che, circa 9 giorni dopo la stimolazione antigenica, le arterie penicillari - normalmente inguainate da linfociti - risultavano avvolte soprattutto da plasmacellule: in conclusione dei loro esperimenti sembra potersi affermare che i linfociti della polpa bianca, a seguito di uno stimolo antigenico, evolvano come immunoblasti (del tutto simili a quelli che compaiono - in analoghe stimolazioni - nei follicoli linfatici linfonodali); tali cellule, connotate da grande abbondanza di ribosomi liberi all'interno del loro citoplasma, migrano rapidamente nella polpa rossa ove svolgono - verosimilmente - funzione di plasmablasti che si dividono e si differenziano per formare le plasmacellule visibili (otticamente, peraltro, solo con metodi all'impregnazione argentea) nella polpa rossa e in particolare ai confini con la polpa bianca.

Ricordo che linfociti e plasmacellule non appartengono a linee cellulari diverse, in quanto le ultime risultano essere la forma attiva dei linfociti, in grado di sintetizzare e immettere nel circolo ematico una grande quantità di anticorpi quale risposta immunitaria ad un eventuale stimolo antigenico ⁽⁴⁹⁾.

A proposito dell'attivazione dei linfociti B maturi (cioè in grado di esprimere le immunoglobuline di membrana *mIgM-IgD* e dotati di altre caratteristiche

(48) - H.Z. MOVAT - N.V.P. FERNANDO, *The fine structure of lymphoid tissue after antigenic stimulation*, *EXP. MOLEC. PATH.*, 4:155-188, 1965.

(49) - Cfr.: V. MONESI, *Istologia*, cit., p. 536.

immunofenotipiche⁽⁵⁰⁾, essi possono essere attivati - a seguito di contatto con un antigene appropriato - in presenza di cellule T e di cellule accessorie. *In vivo* l'attivazione dei linfociti B è "un fenomeno complesso che comporta aspetti di traffico linfocitario, di assorbimento, di trattamento dell'antigene e di interazione tra cellule regolatorie"⁽⁵¹⁾.

In vitro, invece, i linfociti B umani possono essere attivati da antigeni specifici o anche da agenti mitogeni policlonali (in genere di origine vegetale, es.: *Fitoemoagglutinina* [PHA], *Concanavalina A* [Con A], ecc.) che "mimano" l'effetto antigenico.

L'attivazione dei linfociti B inizia con la loro trasformazione in *linfoblasti proliferanti*; si tratta di cellule dotate, oltre che delle caratteristiche morfologiche tipiche di tutte le cellule in moltiplicazione, di un citoplasma ampio (che al M.E. si rivela ricco di poliribosomi "a rosetta") e di un esteso *apparato di Golgi*.

La differenziazione in *plasmablasti* avviene a seguito di una incrementata genesi di cisterne del *Reticolo Endoplasmatico Granulare* (o "Rugoso", RER) e di una espansione (ulteriore) dell'*apparato di Golgi*: ciò è indice della realizzazione - da parte delle cellule attivate - di un apparato *ad hoc* per la sintesi (e la successiva secrezione) delle *Immunoglobuline*.

L'ulteriore incremento del RER, la sua organizzazione in complessi di cisterne disposte parallelamente e la sua dilatazione a seguito di accumulo delle Immunoglobuline, insieme con il contemporaneo sviluppo - ancor più marcato - dell'apparato di Golgi (che risulta visibile al microscopio ottico come una zona paranucleare non basofila) portano alla trasformazione in plasmacellule, riconoscibili - tra l'altro - per l'eterocromatina organizzata in zolle periferiche che dà al nucleo la particolare conformazione "a ruota", nonché per l'intensa reazione citochimica per le idrolasi acide lisosomiali.

Le plasmacellule "post-mature" - se osservate al microscopio ottico - presentano nel citoplasma peculiari formazioni eosinofile, i *corpi di Russell*, esprimenti un blocco della secrezione anticorpale e appartenenti alla cosiddetta *sostanza ialina cellulare*⁽⁵²⁾. La dimostrazione delle immunoglobuline citoplasmatiche può essere effettuata con il microscopio a fluorescenza dopo trattamento con anticorpi anti-catene leggere marcati con *Rodamina B*.

(50) - Cfr.: D. ZUCKER-FRANKLIN - M.F. GREAVES - C.E. GROSSI - A.M. MARMONT, *Le Cellule del Sangue, - Funzioni e patologia*, Edi-Ermes, Milano, 1988², Vol. II, pp. 398-399.

(51) - D. ZUCKER-FRANKLIN - M.F. GREAVES - C.E. GROSSI - A.M. MARMONT, *cit.*, Vol. II, p. 406.

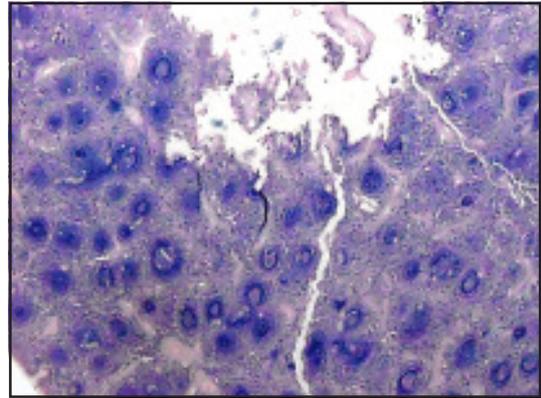
(52) - Con il termine *ialinosi* si identificano tutte le sostanze tissutali o cellulari che, con l'eosina, assumono colorazione rossa e si presentano omogenee e spesso dotate di alto indice di rifrazione. Si suole adottare la seguente suddivisione: sostanza ialina epiteliale; s. ialina cellulare ed ematogena; s. ialina connettivale; s. ialina vasale; amiloide. Cfr.: W. SANDRITTER - C. THOMAS, *Istopatologia*, Editoriale Grasso, Bologna, 1979³, pp. 7-11.

MILZA



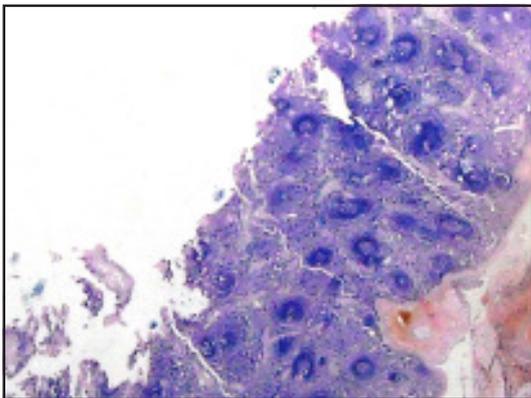
fig. 54 a)

10 mm



b)

5 mm



c)

3 mm

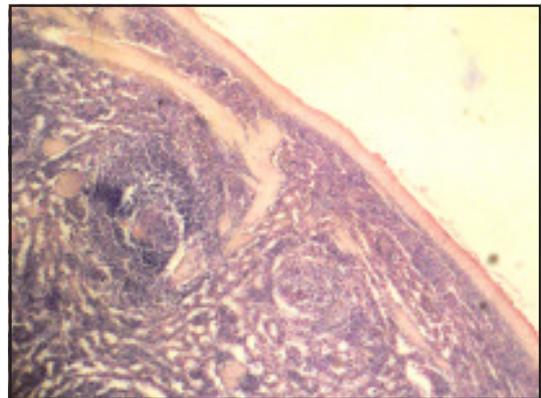


fig. 55

40x

0,1 mm

fig. 54 a - c). Milza; macrofotografia.
Colorazione: Ematossilina-Eosina.

fig. 55. Milza; macrofotografia; altro campo.
Colorazione: Ematossilina-Eosina.

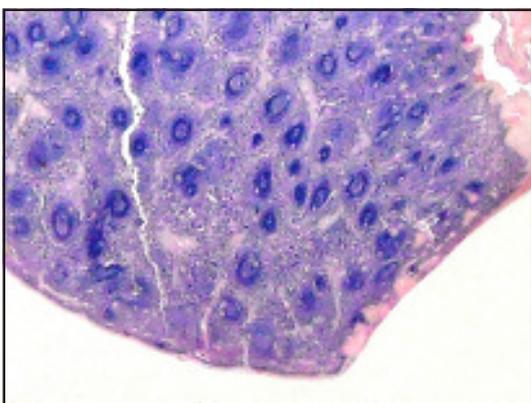
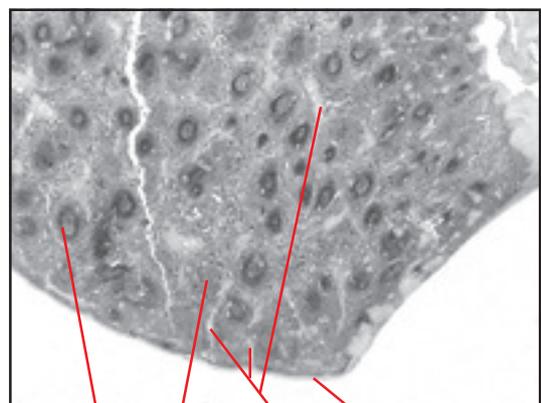


fig. 56 a)

4 mm



b)

polpa bianca
polpa rossa
setti o trabecole
capsula

fig. 54 a - b). Milza; macrofotografia; altro campo.
Colorazione: Ematossilina-Eosina.

MILZA

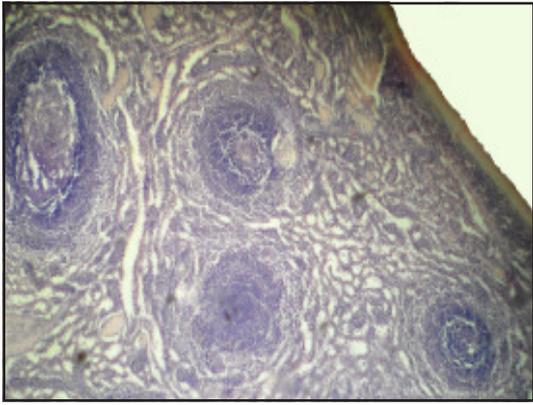


fig. 57

obb.: 4/0,10

0,1 mm

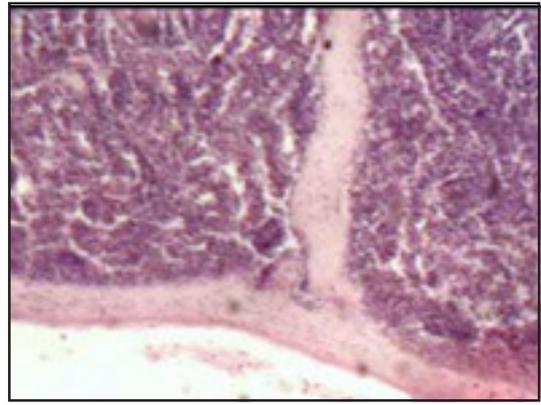


fig. 58

obb.: 10/0,25

0,1 mm

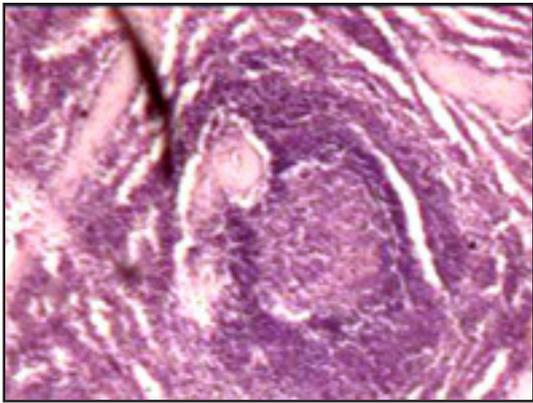


fig. 59

obb.: 10/0,25

0,1 mm

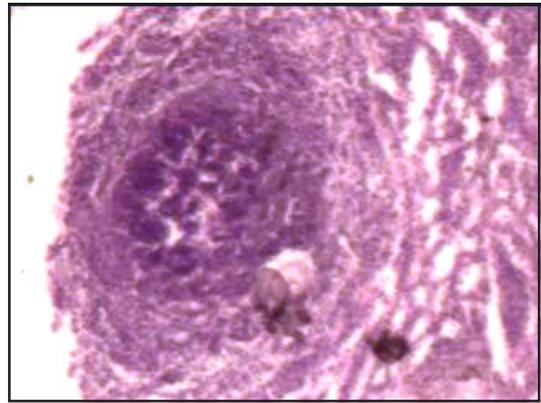


fig. 60

obb.: 25/0,40

50 μ

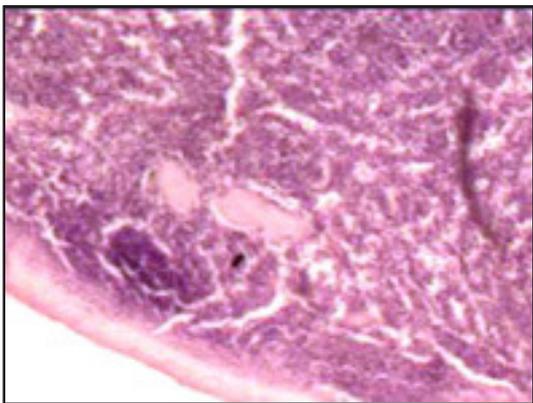
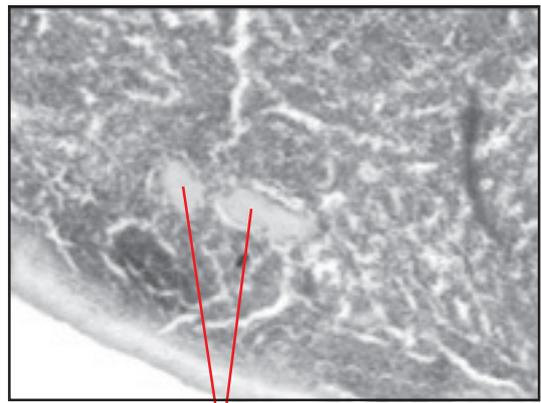


fig. 61 a)

obb.: 10/0,25

0,1 mm



b)

seni venosi comunicanti

figg. 57 - 61. Milza; vari campi e ingrandimenti. Colorazione: Ematossilina-Eosina.

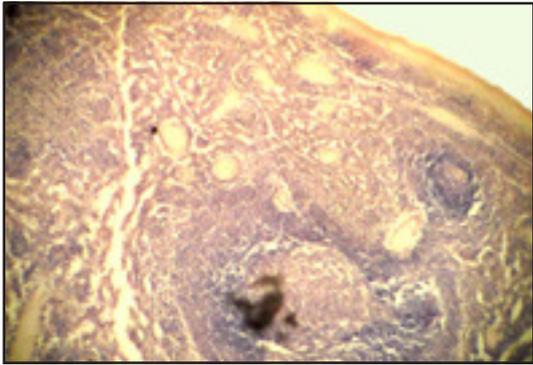
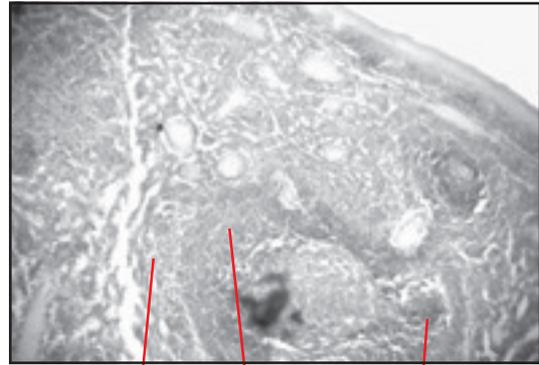
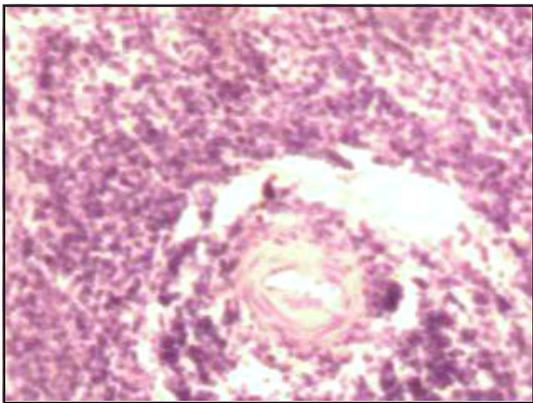


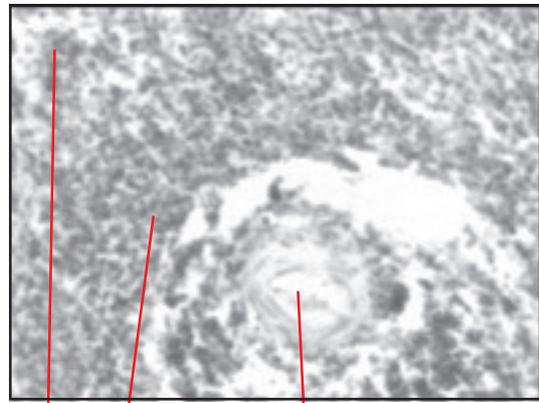
fig. 62 a) *obb.: 4/0,10* 0,1 mm



b) *polpa rossa* *zona marginale* *arteriola*



c) *obb.: 10/0,25* 0,1 mm



d) *zona marginale* *zona a mantello* *arteriola*

fig. 62 a-d). una tipica area a cellule T che forma una sorta di guaina cilindrica attorno a un'arteriola. In tale area sono contenuti piccoli linfociti prevalentemente del tipo T helper.
 In particolare, nelle fig. a e b (a minore ingrandimento) si noti il modo in cui l'insieme di cellule T si fonde con il parenchima della polpa rossa che lo avvolge. Colorazione: Ematossilina-Eosina

METODICHE ANALITICHE

PRINCIPALI METODI DI COLORAZIONE

Ematossilina-eosina⁽⁵³⁾

- 1) Strisci essiccati all'aria (il metodo è applicabile sia agli strisci, sia ai preparati di colture tissutali su vetrino coprioggetti).
- 2) Fissare in liquido di Zenker per almeno 8h.
- 3) Lavare in Acqua di fonte (30').
- 4) Disidratare in Etanolo a 80° (2-3').
- 5) Trasferire in una soluzione di Iodio allo 0,5% in Etanolo a 95° (5').
- 6) Lavare in soluzione di Sodio Tiosolfato allo 0,5% in H₂O distillata (5').
- 7) Lavare in Acqua corrente (5').
- 8) Colorare in Ematossilina di Harris (o altro tipo) non diluita (10').
- 9) Differenziare in NH₃ al 1,5% in H₂O (circa 10', finché compare un colore blu).
- 10) Colorare con Eosina allo 0,5% in H₂O (2-5').
- 11) Disidratare in Etanolo a 95° (tre passaggi di 5-10" ciascuno).
- 12) Completare la disidratazione in Etanolo assoluto (100°) (2 passaggi di 2-3" ciascuno).
- 13) Diafanizzare in Xilene (2 bagni di 5' ciascuno).
- 14) Montare in Balsamo sintetico.

I nuclei e le sostanze a carattere anionico si colorano in blu più o meno scuro.

I citoplami assumono colore rosa-rosso, se eosinofili; celeste più o meno scuro se basofili.

Il collagene e altre componenti stromali assumono colore rosa.

Le inclusioni eosinofile assumono un colore rosso brillante.

(53) - Ho descritto solo una delle tante varianti di questo metodo, adatta per la colorazione degli strisci. Per la colorazione delle sezioni al microtomo, rinvio al mio precedente lavoro "I Preparati microscopici istologici", Roma, 2007, pagg. 23-26, liberamente scaricabile dal sito <http://www.funsci.com> o dal mio sito personale <http://www.marcobrusadin.it>; in alternativa, si possono consultare i testi di istologia o di istochimica.

MAY-GRÜNWARD – GIEMSA⁽⁵⁴⁾

- 1) Si pone il vetrino su un piano, con la faccia contenente lo striscio verso l'alto. Per evitare spandimenti di colorante, conviene usare una vaschetta (di vetro o di plastica) su cui appoggeremo due supporti (vanno bene anche i legni per spiedini) sui quali poggeremo il nostro vetrino: in tal modo, l'eccesso di colorante scolerà nella vaschetta evitando... *coloriture* di altro genere nel linguaggio che ci verrà rivolto da mogli, mamme e affini per aver imbrattato acquai, mobili, ecc.).

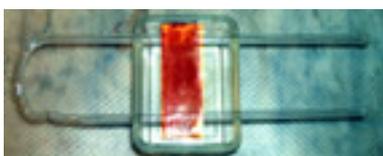


fig.62. Uno striscio su portaoggetti, posto sulla vaschetta (munita di supporto costituito da un tubo di vetro piegato ad "U"), coperto con il colorante.

- 2) Sul vetrino, così preparato e disposto, si versa il **colorante di May-Grünwald** fino a ricoprire interamente lo striscio (servirsi di un contagocce e contare le gocce: il calcolo ci servirà dopo).
- 3) Lasciar agire per 3 minuti (il colorante non colora, perché i cromogeni sono disciolti in metanolo e, dunque, non sono ancora allo stato ionizzato).
- 4) Trascorso tale tempo, versare sul preparato, con un contagocce, tante gocce di acqua distillata quante sono state le gocce di **colorante di May-Grünwald** usate nel passaggio precedente e, soffiando leggermente attraverso un tubicino (una *pipetta Pasteur* o simili), mescolare l'acqua e il colorante.

Attenzione: per l'uso dell'acqua distillata, vedere l'apposita nota più avanti.

- 5) Lasciare che i coloranti – ormai ionizzati in acqua – compiano il loro mestiere per 3 minuti (tempi minori esaltano le granulazioni eosinofile... ma occorre pratica!).
- 6) Versare via il colorante, senza sciacquare.
- 7) Ricoprire lo striscio con il **colorante di Giemsa** diluito 1:10 in acqua distillata (vedi l'apposita nota).

(54) - tratto da: M.BRUSADIN, *I preparati ematologici*, Roma, 2008, pagg. 18 ss., liberamente scaricabile dai siti:
<http://www.funsci.com> oppure <http://www.marcobrusadin.it>



fig. 63. Un portaoggetti poggiato su due supporti all'interno della vaschetta; lo striscio è posto sulla faccia inferiore del vetrino che affaccia verso il fondo. Il colorante verrà versato nella vaschetta fino a ricoprire totalmente il vetrino: in tal modo si eviteranno depositi.

- 8) Lasciare agire per 20 – 30 minuti (la pratica suggerirà il tempo ottimale che varia in base alla fabbricazione del colorante, alla temperatura ambiente, ecc.).
- 9) Terminata la colorazione, sciacquare il vetrino immergendolo in una vaschetta con acqua corrente (getto sottile, per evitare il distacco delle cellule) per alcuni minuti (la pratica e gli errori di colorazione suggeriranno i tempi migliori).
- 10) Lasciare asciugare completamente in posizione verticale (o quasi!) all'aria.

Montaggio in balsamo (o No?)

Normalmente gli strisci ematologici vengono esaminati con l'obiettivo ad immersione in olio: il vetrino coprioggetti e il relativo montaggio in Balsamo del Canada *sarebbero* superflui.

Anzi, Marcel BESSIS (vedi bibliografia) afferma che non solo è inutile ricoprire gli strisci con il coprioggetti, ma addirittura errato ritenere che gli strisci si conservino meglio se ricoperti.

Si potrebbe ritenere più facile allontanare l'olio da immersione da un coprioggetti che non da uno striscio (che si rovinerebbe se strofinato con una pezzuola imbevuta di solvente): in realtà, basta immergere – dopo l'uso – il vetrino direttamente in un bagno di xilene e lasciarvelo per 2-3 minuti, dopodiché lo si fa asciugare all'aria ed... è come nuovo!

Strisci non ricoperti che risalgono ai miei anni di liceo (1966 e dintorni) fanno parte della mia raccolta e posso assicurare che si conservano meravigliosamente, basta usare un po' di cautela nel maneggiarli (evitare, ad esempio, di urtare lo striscio con la lente frontale dell'obiettivo a immersione...).

Tuttavia, poiché è buona norma iniziare qualsiasi osservazione a basso ingrandimento e poiché la maggior parte degli obiettivi dai 25× ai 40× “esigono” la presenza del coprioggetti, pena la perdita di contrasto e l'introduzione di aberrazioni anche

notevoli, ... è giocoforza ricoprire gli strisci, a meno di disporre di obiettivi calcolati proprio per fare a meno del coprioggetti (vedansi in proposito le mie note sull'allestimento dei preparati istologici [reperibili anch'esse nei siti indicati a p. 78]). Ovviamente, se si decide di ricoprire gli strisci, non si potranno usare i coprioggetti "standard" da 24×32 mm, ma si dovrà ricorrere ai 24×50 o anche ai 24×60 mm, entrambi di facile reperibilità in commercio.

OSSERVAZIONE DEI PREPARATI

Effetti dopo la colorazione di May-Grünwald – Giemsa

- 1) *Nuclei*: si colorano in rosso-violetto o in rosa, a seconda del tipo di cromatina.
- 2) *Citoplasm*i:
 - a) *basofili*: assumono colorazione variabile dal celeste al blu scuro;
 - b) *acidofili*: si colorano in rosa.
- 3) *Granuli*:
 - a) *Neutrofili*: si presentano nei colori beige e rosato a causa del miscuglio delle granulazioni;
 - b) *Eosinofili* (o *acidofili*): si colorano in arancione;
 - c) *Basofili*: assumono colore violetto scuro a causa della metacromasia;
 - d) *Azzurrofili*: si colorano in porpora o in violetto-porpora.
- 4) *Granulazioni basofile degli eritrociti*: del tutto eccezionali nell'adulto (in condizioni fisiologiche) ma non rare nell'embrione e nel lattante, si presentano di colore azzurro cobalto.

A proposito di tali granulazioni, ritengo utile precisare che esse si riscontrano nell'anemia da intossicazione da piombo (il cosiddetto *saturnismo*) e che tale reperto ha valore medico-legale; tuttavia, esse sono presenti anche in molte altre anemie tossiche o comunque gravi.
- 5) *Mitocondri e Centrioli*: non sono visibili con questa colorazione (è bene ricordarlo per non prendere abbagli!).
- 6) *Eritrociti (normali)*: quelli esaminati al centro di uno striscio ben eseguito (vedi paragrafo sugli artefatti) si presentano isolati gli uni dagli altri, rotondeggianti, a forma biconcava, del diametro di circa 8 micrometri (micron, se si preferisce la vecchia dicitura), di colore rosa più marcato nella parte esterna (a mo' di anello nuziale) e sfumante via via verso il centro che appare pallido. Come è noto, ciò è dovuto alla perdita del nucleo (che non ha alcuna funzione riproduttiva o di sintesi proteica nell'eritrocito maturo) da parte di queste cellule che hanno

esclusivamente funzioni di trasporto dell'ossigeno e una vita media di 120 giorni dalla loro immissione nel circolo sanguigno.

Artefatti

Possono essere dovuti a varie cause.

1) La presenza di eritrociti nei quali il colore rosa invece che sfumare verso il centro vi si distingue con una linea netta, talvolta irregolare, che conferisce alla cellula una forma particolare a figura geometrica "toroide" (da cui il nome *torociti* dato ai globuli rossi con questa morfologia) è ascrivibile – in genere – a un essiccamento eccessivamente lento dello striscio appena eseguito.

2) Il colore "globalmente" assunto dallo striscio dovrebbe essere rosa-bluastro:

- se esso è **troppo blu**, ciò può dipendere da:

- uno spessore eccessivo dello striscio;
- un lavaggio insufficiente a seguito della colorazione con il Giemsa;
- una colorazione troppo prolungata con il Giemsa;
- uso di Acqua distillata troppo alcalina (vedi nota in proposito).

In tal caso:

- . gli eritrociti appariranno di colore blu o verde;
- . il citoplasma dei linfociti si presenterà grigio o color lavanda;
- . i granuli dei neutrofilo appariranno voluminosi e scuri;
- . i granuli degli eosinofili appariranno grigi o blu.

· se esso è **troppo rosso**, ciò può dipendere da:

- uno spessore troppo esiguo dello striscio;
- un lavaggio eccessivamente prolungato dopo il Giemsa;
- uso di un colorante eccessivamente acido;
- uso di acqua distillata troppo acida(vedi nota in proposito).

In tal caso:

- . la cromatina nucleare apparirà di colore rosso anziché violaceo;
- . gli eritrociti si presenteranno di colore rosso o arancione, anziché rosa;
- . i granuli eosinofili assumeranno un colore rosso brillante.

Ovviamente, per poter giudicare la bontà dell'esecuzione e della colorazione di uno striscio occorrerà far riferimento a elementi cellulari di morfologia e cromatismo perfettamente noti: in genere, a tal fine si "usano" gli eritrociti.

Per comodità, riassumo qui i principali *dati morfometrici* degli *eritrociti normali in circolo*:

- **forma**: disco biconcavo (da cui il nome, talvolta usato, di **discocito**);
- **diametro**: 8 micrometri (per i “precisini” fanatici del Sistema Internazionale: 8×10^{-6} m; per i “nostalgici”: μ “micron”);
- **spessore al bordo**: 2,5 micrometri;
- **spessore al centro**: 1 micrometro;
- **superficie**: 1,60 micrometri quadrati (μ^2);
- **volume**: 90 micrometri cubici (μ^3).

Tali valori debbono intendersi affetti da una *variabilità* del ± 5 % circa.

3) Deformazioni notevoli degli eritrociti sono presenti nella parte iniziale, lungo i bordi e nelle sfrangiature dello striscio: tali forme anomale, dovute agli effetti meccanici della strisciatura, debbono essere ben conosciute dall'osservatore, per non incorrere in madornali errori diagnostici. Si consulti un buon testo-atlante (vedi, ad esempio, in bibliografia).

Tra gli artefatti possibili, va annoverata la presenza di **echinociti** (eritrociti dotati di spicole). Essi si repertano nella maggior parte degli strisci mal eseguiti, ma anche – sia pure sporadicamente – negli strisci eseguiti a regola d'arte.

La motivazione che più facilmente potrebbe essere addotta è la disidratazione della goccia di sangue in fase di fissazione: ma non è così.

La causa sembra, invece, doversi ricercare nel cosiddetto “**effetto vetro**” (infatti non si presenta se si usano vetrini in plastica) dovuto alla diffusione, nello striscio umido, di sostanze alcaline liberate dalla superficie del vetro per “aggressione chimica” da parte di alcuni componenti del sangue.

La comparsa di echinociti in sangue conservato (bastano 24 ore a $+30$ °C o circa tre settimane in frigo a $+4$ °C) è dovuta, invece, alla diminuzione dell'ATP (adenosin-trifosfato) intracellulare e alla comparsa di **lisolecitina** nel plasma (per il principiante, rammento sommariamente che il **plasma** è la parte non corpuscolata che si separa nel sangue reso incoagulabile con opportune sostanze quali l'eparina, il citrato di Sodio, l'EDTA – acido Etilen-Diamino Tetracetico, ecc. Il **siero**, invece, è quella parte liquida, contenente proteine ed altro, che si separa dalla parte corpuscolata dopo coagulazione del sangue intero).

Anche il plasma conservato diviene echinogeno: ciò va tenuto presente nella diagnostica.

Se il sangue viene scaldato per 30 minuti a +56 °C, viene distrutta la **lecitin-colesterol-acil-transferasi**, enzima che presiede alla formazione della lisolecitina: in tal modo viene bloccata l'echinocitogenesi.

(Per ulteriori dettagli, vedi: M. BESSIS, opera citata in bibliografia).

NOTA

SULL'USO DELL'ACQUA DISTILLATA NELLE COLORAZIONI

L'acqua distillata, qualora veramente "pura" (*resistenza* elettrica compresa tra i 15 e i 18 MΩ [megaohm] e *conducibilità* compresa tra 0,067 e 0,05 μS [microsiemens]) dovrebbe avere **pH 7,0**, cioè **neutro**.

In realtà, quest'acqua, tecnicamente definita "ultrapura" e ottenuta per scambio ionico su opportune resine (usata in gascromatografia, spettrometria di massa e altre metodiche), è tale solo al momento della produzione. Appena entra in contatto con l'aria dell'ambiente circostante, si comporta letteralmente come una spugna assorbendo, in particolare, l'anidride carbonica e formando, così, tracce di acido carbonico. Ecco che il pH diviene leggermente acido.

Per l'acqua deionizzata o distillata "ordinaria", quella reperibile in commercio, la reazione è senz'altro lievemente acida, attestandosi attorno a pH 6,5 o anche inferiore. Tale leggera acidità, potendo interferire sulla resa cromatica delle colorazioni, **rende necessario** (soprattutto ai fini della ripetitività e della precisione delle analisi) l'uso di **soluzioni tampone**, "sistemi chimici" in grado di mantenere costante il pH iniziale.

In Biochimica si usa molto il **Tampone Fosfati** che, comunque, è di facile reperibilità - già pronto o in fiale da "ricostituire" con acqua distillata - in commercio.

REAGENTI

Tampone Fosfati secondo Sørensen, 1909.

Ne esiste più di una variante; la formulazione “classica” - riportata da GOMORI⁽⁵⁵⁾ - è: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{NaH}_2\text{PO}_4$ (buffer 0,1 M).

(Per chi non si intendesse di chimica, 0,1 M significa: **0,1 molare**, cioè che contiene 0,1 moli in 1000 millilitri *di soluzione*: la mole è la *quantità in grammi di una sostanza, pari al suo peso molecolare*).

ATTENZIONE: per preparare una “soluzione titolata” occorre pesare la quantità di sostanza da disciogliere, porla in un pallone “tarato” e **portare al volume finale** desiderato con acqua distillata (**non** aggiungere la quantità finale di acqua!).

Poiché esistono varie “preparazioni” di Fosfato di Sodio, contenenti più o meno H_2O (come acqua di cristallizzazione), ecco i pesi molecolari (**m.w., molecular weight**) dei prodotti reperibili in commercio:

- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - m.w: 178,05; la soluzione 0,2 M ne contiene 35,61 g che dovranno essere sciolti in H_2O (distillata), portando al volume finale di 1000 ml.
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ - m.w: 358,22; la soluzione 0,2 M ne contiene 71,64 g .
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ - m.w.: 156,03; la soluzione 0,2 M ne contiene 27,6 g .
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - m.w.: 138,0; la soluzione 0,2 M ne contiene 31,21 g.

Si possono ottenere diversi valori di pH, a seconda delle quantità delle soluzioni dei due Sali che si mescolano tra loro; per ottenere **pH 7,0**:

soluzione 0,2 M di Na_2HPO_4 61,0 ml

soluzione 0,2 M di NaH_2PO_4 39,0 ml

mescolare e portare a 200 ml con H_2O (distillata).

Tampone Fosfato-Acido Citrico secondo Pearse (1980).

Per ottenere **pH 5,4** (necessario per la Colorazione di Mommsen⁽⁵⁶⁾) occorre:

soluzione 0,2 M di Na_2HPO_4 27,8 ml (vedi qui sopra)

soluzione 0,1 M di Acido Citrico 22,2 ml (21,01 g in 1000 ml H_2O)

mescolare e portare a 100 ml con H_2O (distillata).

Misurare il pH con un pH-metro elettronico (ne esistono di “portatili” il cui costo è di circa 50 euro) ed eventualmente “aggiustare” il valore al pH desiderato aggiungendo – goccia a goccia – **HCl** (0,01 M) o **NaOH** (0,01 M), secondo necessità.

Poiché le soluzioni tampone non sono di semplicissima preparazione per un principiante, conviene acquistarle già pronte presso le Ditte fornitrici di prodotti chimici.

(55) - G. GOMORI, *Methods in Enzymology*, Academic Press Inc., New York, 1955, Vol. 1, pag. 143.

(56) - Vds.: M.BRUSADIN, *I preparati ematologici*, cit., pag. 35.

METODI ISTOCHIMICI

PAS (Periodic Acid - Schiff) [ne esistono diverse varianti]

- 1) Sezioni sparaffinate e portate all'acqua attraverso la serie discendente dell'Etanolo.
- 2) Trattare con Acido periodico 1% preparato di fresco (5').
- 3) Lavare in H₂O (almeno 5-10 cambi).
- 4) Trattare con il Reattivo di Schiff (al buio) (20-40').
- 5) Lavare in "Acqua solforosa" (HCl al 37%: 0,5 ml + Sodio bisolfito al 10%: 12 ml + H₂O: 50 ml) (3 bagni della durata di 2' ciascuno).
- 6) Lavare in acqua corrente (10').
- 7) Controcolorare i nuclei con Ematossilina di Harris (3').
- 8) Differenziare in Etanolo 95° acidulato con 1% di HCl.
- 9) Lavare in acqua corrente (5').
- 10) Colorare con Orange G (10").
- 11) Lavare in H₂O fino a ottenerte una colorazione giallo-chiaro (30" circa).
- 12) Disidratare in Etanolo (70°, 80°, 96°, 100°-100°) (5-10" per ogni bagno).
- 13) Diafanizzare in Xilene (2 bagni di 1' ciascuno).
- 14) Montare in Balsamo sintetico.

I Glucidi si colorano in rosso porpora; i nuclei assumono colore blu; le proteine e i citoplasmi risultano colorati in giallo.

reattivo di Schiff

| | |
|---|--------|
| Fucsina basica | 1,0 g |
| K ₂ S ₂ O ₅ (metabisolfito di K) | 2,0 g |
| Carbone | q.b. |
| HCl 1N | 20 ml |
| H ₂ O | 200 ml |

- Portare ad ebollizione l'H₂O.
- Aggiungere la Fucsina basica.
- Raffreddare fino a 50°C e filtrare su carta.
- Aggiungere l'HCl e raffreddare a temperatura ambiente.
- Aggiungere il metabisolfito e lasciar riposare per una notte.
- Se il giorno dopo la soluzione non fosse divenuta color paglia, aggiungere circa 0,5g di Carbone: agitare e filtrare su carta dopo 1'.
- Conservare a 4°C.

Il reattivo può essere utilizzato finché assume un colore rosa.

colorazione di Feulgen

- 1) Colture su vetrino (o altro tipo di colture).
- 2) Lavare le colture in soluzione fisiologica tamponata con fosfati di sodio e di potassio a pH 7,3 (per rimuovere le proteine) (2 passaggi di 5-10" ciascuno).
- 3) Fissare in Carnoy (20').
- 4) Etanolo 95° (2').
- 5) Etanolo 70° (2').
- 6) Lavare in acqua corrente (2').
- 7) Immergere in HCl 0,1N (2').
- 8) Immergere in HCl 0,1N preriscaldato a 60°C (2').
- 9) Immergere in HCl 0,1N a temperatura ambiente (2').
- 10) Lavare rapidamente in acqua di fonte.
- 11) Immergere in Reattivo di Schiff (30').
- 12) Lavare in acqua corrente (15').
- 13) Colorazione di contrasto con Verde chiaro allo 0,5% (1').
- 14) Lavare in Acqua di fonte (10-20").
- 15) Disidratare rapidamente in Etanolo 70° (2-3").
- 16) Disidratare in Etanolo 95° (2 passaggi di 2" ciascuno).
- 17) Disidratare in Etanolo 100° (2 bagni di 2-3" ciascuno).
- 18) Diafanizzare in Xilene (2 bagni di 2' ciascuno).
- 19) Montare in Balsamo sintetico.

È una reazione citochimica per il DNA. Viene impiegata per i nuclei e per le inclusioni intracitoplasmatiche e intranucleari di DNA, che appaiono di colore rosso porpora.

N.B.:

- Per "Acqua di fonte" si intende la comune acqua di rubinetto, raccolta in una apposita vaschetta nella quale vengono immersi i vetrini (raccolti o meno su apposita rastrelliera verticale).
- Per "Acqua corrente" si intende, invece, un sottile getto (un vero e proprio "filo") di acqua di rubinetto che viene fatto cadere entro la vaschetta (di cui sopra) contenente già acqua di fonte e i vetrini immersi: in tal modo si agevola il ricambio dell'acqua stessa e la rimozione del colorante (o dei reattivi) in eccesso.

Metodo all'Alcian blu

(può essere adoperata la soluzione colorante a pH 2,5, o pH 1, o pH 0,4)

- 1) Sezioni fissate e portate all'acqua distillata attraverso la serie discendente dell'Etanolo.
- 2) Colorare con Alcian Blu pH 2,5 (sol. A) o pH 1 (sol. B) o pH 0,4 (sol. C) (1').
- 3) Differenziare in acqua corrente (30').
- 4) Lavare in H₂O (distillata).
- 5) Colorazione di contrasto con ematossilina di Mayer (1').
- 6) Differenziare con acqua di fonte (circa 30-60").
- 7) Lavare in H₂O (distillata).
- 8) Disidratare attraverso la serie ascendente dell'Etanolo:
- 9) Diafanizzare in Xilene.
- 10) Montare in balsamo sintetico.

Soluzione A

(Alcian Blu pH 2,5)

| | |
|-----------------------|---|
| Alcian Blu in polvere | 1 g |
| Acido Acetico | sol. al 3% in H ₂ O (distillata) |

- Sciogliere la polvere nella soluzione di Acido Acetico.

Soluzione B

(Alcian Blu pH 1)

| | |
|-----------------------|--------|
| Alcian Blu in polvere | 1 g |
| HCl 0,1N | 100 ml |

- HCl 0,1 N si prepara diluendo in 90 ml di H₂O (distillata) 10 ml di HCl 1 N.
 - HCl 1 N si prepara con 8,27 ml di HCl al 37% portati a 100 ml con H₂O (distillata).

Soluzione C

(Alcian Blu pH 0,4)

| | |
|---|--------|
| Alcian Blu in polvere | 2,5 g |
| Soluzione Acida Fosfato-Idrocloridrica. | 250 ml |

- La soluzione Acida Fosfato-Idrocloridrica si prepara con:

| | |
|----------------------------------|---------|
| NaH ₂ PO ₄ | 1,38 g |
| HCl al 37% | 4,2 ml |
| H ₂ O (distillata) | 95,8 ml |

Risultati:

- Alcian pH 2,5: si colorano le mucine acide debolmente solfate
- Alcian pH 1: si colorano le mucine debolmente e fortemente solfate

Per evidenziare ulteriori mucosostanze acide (glicosaminoglicani), si può ricorrere alla colorazione con il

metodo Alcian-PAS

- 1) Sparaffinare e portare le sezioni all'acqua attraverso la serie discendente dell'Etanolo.
- 2) Colorare con la Soluzione Blu Alcian (5').
- 3) Differenziare in Acqua corrente (3').
- 4) Sciacquare con H₂O (distillata).
- 5) Immergere in Acido periodico (10').
- 6) Lavare in acqua corrente (3').
- 7) Sciacquare con H₂O (distillata).
- 8) Trattare con Reattivo di Schiff (15').
- 9) Lavare in acqua corrente (3').
- 10) Sciacquare con H₂O (distillata).
- 11) Controcolorare con Ematossilina secondo Gill III (20").
- 12) Lavare con acqua corrente (3').
- 13) Disidratare con Etanolo (serie ascendente).
- 14) Diafanizzare in Xilene.
- 15) Montare in Balsamo sintetico.

Risultati:

- Nuclei: blu.
- Mucosostanze acide: blu chiaro.
- Polisaccaridi, mucopolisaccaridi neutri: porpora.

N.B.: L'Ematossilina secondo Gill III si trova già pronta in commercio, presso varie Ditte; non è assolutamente conveniente prepararsela da soli.

Metodo allo ZINCON

- 1) Si può eseguire su strisci essiccati all'aria o su sezioni sparaffinate e portate all'acqua attraverso la serie discendente dell'etanolo.
- 2) Ricoprire il preparato con lo ZINCON (vedi appresso).

La reazione avviene immediatamente.

- 3) Lavare in acqua di fonte.
- 4) Lasciar asciugare all'aria se si tratta di strisci.
- 5) Montare in glicerina se si tratta di sezioni.
- 6) Osservare a immersione.

- Le aree contenenti zinco si presentano di colorito rossastro negli strisci; di colorito bluastro nelle sezioni.

preparazione del reattivo allo ZINCON [acido *o*-{ $-2[\alpha-(2\text{-idrossi-5-solfofenilazo})\text{-benzilidene}]\text{-idrazino}$ }-benzoico]

- 1) ZINCON 0,5 g
- 2) NaOH 1N 2 ml
- 3) Tampone Sorensen a pH 8,0 (vedi appresso)

- Sciogliere lo ZINCON nell'NaOH.

- Al momento dell'uso, diluire 1:5 con Tampone secondo Sørensen⁽⁵⁷⁾.

N.B.: Il **tampone secondo Sørensen** descritto a pag. 83 del presente lavoro ha pH 7,0! Quello richiesto per il metodo allo ZINCON deve avere pH 8,0: pertanto, seguendo le indicazioni di BONUCCI⁽⁵⁸⁾, sarà necessario ricorrere alla seguente formulazione:

Soluzione A

KH_2PO_4 M/15 (3,078 g in 1000 ml di H_2O)

Soluzione B

Na_2HPO_4 M/15 (11,876 g in 1000 ml di H_2O)

- Mescolare 3,1 ml della soluzione A con 96,9 ml della soluzione B.

(57) - Soren Sørensen è il chimico danese (1868-1939) che ha proposto l'uso dei logaritmi per indicare i valori del pH, onde facilitarne l'uso, trattandosi di numeri molto piccoli rappresentati da decimali o da potenze negative di 10.

(58) - E. BONUCCI, *Manuale di Istochimica, cit.*, pag. 408.

metodo al DITIZONE (DIFENILTIOCARBAZONE)

- 1) Tessuti fissati in formaldeide neutra o in etanolo, inclusi in paraffina oppure sezioni al microtomo congelatore essiccate all'aria.
 - 2) Ricoprire le sezioni con DITIZONE (vedi appresso) (5-10', finché la colorazione vira al giallo chiaro.
 - 3) Eliminare l'eccesso di colorante.
 - 4) Immergere le sezioni in Cloroformio.
 - 5) Rimuovere il Cloroformio e lavare rapidamente in H₂O distillata.
 - 6) Montare in sciroppo di Fruttosio.
- Lo Zinco presente nelle sezioni si colora in rosso.

N.B.: Si tratta di un metodo piuttosto aspecifico (il reattivo può *chelare* vari metalli), a meno di sciogliere il Ditizone in un tampone particolare, del quale non fornisco la formulazione perché la ritengo **eccessivamente pericolosa** per chi non sia professionista: basti pensare che è indispensabile operare sotto una cappa "chimica" con aspiratore munito di filtri a carboni attivi...

Reazione cromaffine

L'istochimica delle cellule enterocromaffini viene, generalmente, condotta su tessuti fissati in aldeide formica: questo procedimento, infatti, consente una facile differenziazione della serotonina dalle catecolamine, sostanze queste ultime che vengono inattivate da un prolungato trattamento con la formaldeide.

Il meccanismo di questa reazione, peraltro non perfettamente noto⁽⁵⁹⁾, sembra coinvolgere un aminofenolo alla cui ossidazione sarebbe dovuto il colore bruno che si forma.

- 1) Fissare in Formolo calcico di Baker (vedi).
- 2) Immergere i frammenti di tessuto con miscela Cromato-Bicromato (vedi) (24 - 48 h).
- 3) Lavare in H₂O (distillata).
- 4) Sezionare al microtomo congelatore.
- 5) Montare in Glicerolo.

N.B.: È possibile, in alternativa, includere in Paraffina, con le solite modalità.

- La Serotonina appare di colore bruno.

(59) - Vds.: E. BONUCCI, *Manuale di Istochimica, cit.*, pag. 278.

Reazione per l'Argentaffinità

La presenza di *5-idrossitriptamina* [= *Serotonina*] nelle cellule enterocromaffini conferisce loro la proprietà (chiamata *argentaffinità*, da cui deriva il nome di *cellule argentaffini* loro attribuito) di ridurre i sali d'Argento ad Argento metallico.

Va ricordato che l'argentaffinità non è specifica per la Serotonina, perché altre sostanze (Acido Ascorbico [=Vitamina C], orto- e para-fenoli, melanine, ecc.) possono provocare la medesima reazione.

- 1) Sezioni sparaffinate e portate all'Acqua tramite la serie discendente dell'etanolo.
- 2) Immergere le sezioni in liquido di Lugol (vedi) diluito al 50% in H₂O (10').
- 3) Immergere in Na₂S₂O₃ (Tiosolfato di Sodio) sol. acquosa al 5% (2').
- 4) Lavare in Acqua corrente (10').
- 5) Lavare in H₂O (2 bagni da 30" ciascuno).
- 5) Trattare con AgNO₃ - metenamina a 60°C (1-3 h).
- 6) Lavare in H₂O (30").
- 7) Trattare con AuCl sol. acquosa allo 0,1% (4').
- 8) Lavare con Na₂S₂O₃ sol. acquosa al 5% (30").
- 9) Fissare con Na₂S₂O₃ sol. acquosa al 5% (2').
- 10) Lavare in Acqua corrente (5').
- 11) Controcolorare con Safranina O acetica (vedi) (5').
- 12) Lavare in H₂O.
- 13) Serie ascendente dell'Etanolo.
- 14) Diafanizzare in Xilene.
- 15) Montare in Balsamo sintetico (Eukitt o simili).

metodi alternativi⁽⁶⁰⁾:

metodo di Fontana

metodo di Bielschowsky

metodo di Gomori

Liquido di Lugol

- | | |
|----------------------------|--------|
| 1) I (Iodio metallico) | 1 g |
| 2) KI (Ioduro di Potassio) | 2 g |
| 3) H ₂ O | 200 ml |

Può essere acquistato pronto dal commercio.

(60) - Vds.: E. BONUCCI, *Manuale di Istochimica, cit.*, pag. 279. Altri metodi di colorazioni speciali possono essere reperiti, ad esempio, in: <http://www.in5.it/download/Cimino%20colorazioni%20speciali.pdf>

PREPARAZIONE DI ALCUNI FISSATIVI

fissativo di Carnoy

| | |
|------------------------|--------|
| Etanolo 100° | 600 ml |
| Cloroformio | 300 ml |
| Acido Acetico glaciale | 100 ml |

- Aggiungere i reagenti secondo l'ordine sopra riportato.
- Conservare a temperatura ambiente.

Penetra circa 1mm/h e la fissazione non deve essere prolungata oltre le 24 h.

soluzione salina di formolo al 10%

| | |
|----------------------|--------|
| NaCl | 8,5 g |
| HCHO 40% (formalina) | 100 ml |
| H ₂ O | 900 ml |

- Sciogliere l'NaCl nell'H₂O e aggiungere la formalina.
- Conservare a temperatura ambiente.

fissativo di Zenker

| | |
|---------------------------------|---------|
| HgCl ₂ | 70 g |
| Na ₂ SO ₄ | 25 g |
| H ₂ O | 1000 ml |

- Sciogliere i sali in H₂O riscaldando.
- Conservare a temperatura ambiente.
- Immediatamente prima dell'uso, aggiungere Acido Acetico glaciale fino ad ottenerne una concentrazione finale del 5%.

formolo calcico di Baker

| | |
|----------------------|-------|
| HCHO 40% (formalina) | 10 ml |
| CaCl ₂ | 1 g |
| H ₂ O | 90 ml |

- Preparare poco prima dell'uso, per evitare un abbassamento del pH a causa dell'acidificazione dovuta alla trasformazione della formalina (Aldeide Formica) in Acido Formico.

miscela Cromato-Bicromato di Potassio

$K_2Cr_2O_7$ (bicromato di Potassio) sol. acquosa al 5% 10 ml

K_2CrO_4 (cromato di Potassio) sol. acquosa al 5% 1 ml

- Mescolare le due soluzioni.

N.B.: Ematossilina (sia nella formulazione di Harris, sia in altre), Eosina, Colorante di May-Grünwald, Colorante di Giemsa ed eventualmente tutti i coloranti per il metodo di Papanicolau possono essere vantaggiosamente acquistati dal commercio. Le loro formulazioni, tuttavia, sono reperibili facilmente anche in un mio precedente lavoro su “I Preparati microscopici”, liberamente scaricabile dai siti: <http://www.marcobrusadin.it> oppure: <http://www.funsci.com>.

APPENDICE

Per allertare soprattutto i principianti circa la **pericolosità delle sostanze chimiche** di uso comune negli esperimenti di microscopia, nelle pagine seguenti ho riportato alcune “schede” tratte dal sito:

<http://www.sicurezzaincasa.it/schede/solventi.htm>

Ribadisco la **necessità inderogabile di** INFORMARSI - direttamente sul sito delle Ditte produttrici - circa la **pericolosità**, la **tossicità**, l'**infiammabilità** delle *sostanze chimiche* che si intende acquistare, nonché sul **modo di manipolarle**, di **conservarle**, di **smaltirle** e di **prestare l'eventuale primo soccorso**.

PRODOTTO
SOSTANZA E ASPETTO

XILOLO
XILENE (liquido incolore)

PERICOLI

ESPLOSIVO
INFIAMMABILE
TOSSICO

VAPORI DEL SOLVENTE CON L'ARIA
ALTAMENTE
Irrita pelle ed occhi, i vapori creano
stati confusionali

CORROSIVO

NO

MISURE DI SICUREZZA

STOCCAGGIO

Tenere in contenitori sigillati in
luogo asciutto, non fumare

AMBIENTE DI LAVORO

Buona ventilazione, non fumare,
NESSUNA FIAMMA LIBERA

MISURE DI PROTEZIONE
IGIENE

PORTARE GUANTI ED OCCHIALI
Usare crema protettiva, lavarsi le
mani dopo il lavoro

SMALTIMENTO RIFIUTI

Tramite IMPRESA SPECIALIZZATA

PRONTO SOCCORSO

BRUCIATURE
INALAZIONE
INGESTIONE

PORTARE ALL'APERTO E RICORRERE AL MEDICO
SCIACQUARSI LA BOCCA CON ACQUA E RICORRERE AL
MEDICO

OCCHI
PELLE

LAVARE ABBONDANTEMENTE CON ACQUA
LAVARSI CON ACQUA E SAPONE, APPLICARE CREMA

PRODOTTO
SOSTANZA E ASPETTO

ACETONE
ACETONE, PROPANONE O
DIMETILKETONE (liquidi
chiari di odore dolciastro)

PERICOLI

ESPLOSIVO
INFIAMMABILE
TOSSICO

VAPORI DEL SOLVENTE CON L'ARIA
ALTAMENTE
Irrita pelle ed occhi, i vapori creano
stati confusionali

CORROSIVO

NO

MISURE DI SICUREZZA

STOCCAGGIO

Tenere in contenitori sigillati in
luogo asciutto, non fumare

AMBIENTE DI LAVORO

Buona ventilazione, non fumare,
NESSUNA FIAMMA LIBERA

MISURE DI PROTEZIONE
IGIENE

Portare guanti ed occhiali
Usare crema protettiva, lavarsi le
mani dopo il lavoro

SMALTIMENTO RIFIUTI

Tramite IMPRESA SPECIALIZZATA

PRONTO SOCCORSO

BRUCIATURE

INALAZIONE

PORTARE ALL'APERTO E RICORRERE AL MEDICO

INGESTIONE

SCIACQUARSI LA BOCCA CON ACQUA E RICORRERE AL MEDICO

OCCHI

LAVARE ABBONDANTEMENTE CON ACQUA

PELLE

LAVARSI CON ACQUA E SAPONE, APPLICARE CREMA

PRODOTTO
SOSTANZA E ASPETTO

ALCOLI
ALCOOL ETILICO O
ETANOLO (liquido incolore di
odore gradevole)

PERICOLI

ESPLOSIVO
INFIAMMABILE
TOSSICO
CORROSIVO

VAPORI DEL SOLVENTE CON L'ARIA
ALTAMENTE
Irrita pelle ed occhi, i vapori creano stati
confusionali
NO

MISURE DI SICUREZZA

STOCCAGGIO
AMBIENTE DI LAVORO
MISURE DI PROTEZIONE
IGIENE
SMALTIMENTO RIFIUTI

Tenere in contenitori sigillati in
luogo asciutto, non fumare
Buona ventilazione, non fumare,
NESSUNA FIAMMA LIBERA
Portare guanti ed occhiali
Usare crema protettiva, lavarsi le
mani dopo il lavoro
Tramite IMPRESA SPECIALIZZATA

PRONTO SOCCORSO

BRUCIATURE
INALAZIONE
INGESTIONE
OCCHI
PELLE

PORTARE ALL'APERTO E RICORRERE AL MEDICO
SCIACQUARSI LA BOCCA CON ACQUA E RICORRERE AL
MEDICO
LAVARE ABBONDANTEMENTE CON ACQUA
LAVARSI CON ACQUA E SAPONE, APPLICARE CREMA

PRODOTTO
SOSTANZA E ASPETTO

OLIO DI PARAFFINA
Liquido oleoso giallastro

PERICOLI

ESPLOSIVO
INFIAMMABILE
TOSSICO

CORROSIVO

VAPORI DEL SOLVENTE CON L'ARIA
SI
Irrita pelle ed occhi, i vapori creano stati
confusionali
NO

MISURE DI SICUREZZA

STOCCAGGIO

AMBIENTE DI LAVORO

MISURE DI PROTEZIONE
IGIENE

SMALTIMENTO RIFIUTI

Tenere in contenitori sigillati in
luogo asciutto, non fumare
Buona ventilazione, non fumare,
NESSUNA FIAMMA LIBERA
Portare guanti ed occhiali
Usare crema protettiva, lavarsi le
mani dopo il lavoro
Tramite IMPRESA SPECIALIZZATA

PRONTO SOCCORSO

BRUCIATURE
INALAZIONE
INGESTIONE

PORTARE ALL'APERTO E RICORRERE AL MEDICO
SCIACQUARSI LA BOCCA CON ACQUA E RICORRERE AL
MEDICO

OCCHI
PELLE

LAVARE ABBONDANTEMENTE CON ACQUA
LAVARSI CON ACQUA E SAPONE, APPLICARE CREMA

BIBLIOGRAFIA

ADAMSON JOHN W. - FIALKOW PHILIP J., *The pathogenesis of myeloproliferative syndromes*, *BRIT. J. HAEMATOL.*, vol. 38 (3), 1978, pagg. 299-303.

BAINTON D.F. - ULLYOT J.L. - FARQUHAR M.G., *The development of neutrophilic polymorphonuclear leucocytes in human bone marrow*, *JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE*, n. 134, 1971, pagg. 907-934.

BALBONI Giuseppe Carlo - TEDDE Giovanni, *Anatomia Microscopica*, Società Editrice Universo, Roma, 1977.

BARONI Carlo D., *Le cellule immunocompetenti. Aspetti morfologici e funzionali*. Lezioni del Corso di aggiornamento in Immunologia Clinica, Roma, 1973.

BARONI Carlo D. - MARZULLO Antonella, *Citologia dei linfonodi*, in Trattato Italiano di Medicina di Laboratorio [fondato da Angelo Burlina], Volume VIII, Citopatologia Diagnostica, 2^a edizione (a cura di Paolo Boccato), Piccin, Padova, 2006.

BECKER A.J. - MCCULLOCH E.A. - TILL J.E., *Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells*, *NATURE*, vol. 197, 1963, pagg. 452-454.

BERNARD J. - LEVY J.-P. (et AL.), *Ematologia*, Masson, Milano, 1978 (trad. italiana dalla 4^a ed. francese).

BERTALANFFY F.D. - NAGY K.P., *Mitotic activity and renewal rate of the epithelial cells of human duodenum*, *ACTA ANAT.*, vol. 45, 1961, pagg. 362-371.

BESSIS Marcel, *Reinterpretazione degli strisci di sangue*, Piccin, Padova, 1978.

BIZZOZERO Giulio, *Über die Regeneration der Elemente der schlauchförmigen Drüsen und des Epithels des Magendarmkanals*, *ANAT. ANZ. CENT.*, vol. 3, 1888, pagg. 781-784.

BIZZOZERO Giulio, *Über die schlauchförmigen Drüsen des Magendarmkanals und die Beziehungen ihres Epithels zu dem Oberflächenepithel*, *ARCH. MIKR. ANAT.*, vol. 40, 1892, pagg. 325-375.

BODEY B. - SIEGEL S. E. - KAISER H.E., *Immunological Aspects of Neoplasia — The Role of the Thymus*, in: *CANCER GROWTH AND PROGRESSION - CURRENT TOPICS IN PATHOLOGY*, Springer Netherlands, 2006.

CHIARUGI Giulio, *Istituzioni di Anatomia dell'Uomo*, 5 voll., Vallardi, Milano, 8^a ed., rist. 1968.

DE CARNERI Ivo, *Parassitologia Generale e Umana*, Casa Editrice Ambrosiana, Milano, 4^a ed., 1972.

DIAS Amado Luís Hernâni, *Un processus de régénération de l'épithélium intestinal*, *C. R. ASSOC. ANAT.*, vol. 28, 1933, pagg. 235-239.

ERSPAMER Vittorio, *Caratterizzazione biologica di una nuova amina di-o-polifenolica negli estratti acetonicici di ghiandola salivare posteriore di Octopus vulgaris*, *ARCH. SCIENZE BIOL.*, vol. 26, 1940, pagg. 295-340.

ERSPAMER Vittorio, *Ricerche farmacologiche sull'enteramina. VII. Enteramina e indolalchilamine del veleno di rospo*, *ARCH. SCIENZE BIOL.*, vol. 31, 1946, pagg. 86-95

ERSPAMER V. - BORETTI G., *Identification of enteramine and enteramine-related substances in extracts of posterior salivary glands of Octopus vulgaris by paper chromatography*, *EXPERIENTIA*, vol. 6, 1950, pagg. 348-349.

ERSPAMER Vittorio - ASERO Biagio, *Identification of enteramine, the specific hormone of the enterochromaffin cell system, as 5-hydroxytryptamine*, *NATURE*, vol. 169, 1952, pagg. 800-801.

FAUSER A.A. - MESSNER H.A., *Identification of megakaryocytes, macrophages and eosinophils in colonies of human bone marrow containing neutrophilic granulocytes and erythroblasts*, *BLOOD*, vol. 53, 1979, pagg. 1023-1027.

GOMORI George, *Methods in Enzymology*, Academic Press Inc., New York, 1955.

HAM Arthur W., *Istologia*, 2 voll., USSES, Firenze, 2^a ed. italiana, 1969.

HAYHOE F.G.J. – FLEMANS R.J., *Atlante di Citologia Ematologica*, E.T.I.M. - Vaduz (FL).

HELLMAN Torsten, *Lymphgefäße und lymphatische Organe*, in: VON MÖLLENDORFF Wilhelm, *Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen*, vol. 6 (parte I), Julius Springer, Berlino, 1930.

INTROZZI Paolo (diretto da), *Trattato Italiano di Medicina Interna*, Parte terza, *Malattie del Sangue e degli organi Emopoietici – Malattie del Sistema Reticolo-Istiocitario*, 5 voll., USES, Firenze, 2^a edizione, 1978-1988.

KATZ D. H., *Lymphocyte Differentiation Recognition and Regulation*, Academic Press, New York, 1977.

KNISELY Melvin H., *Spleen studies: I. Microscopic observations of the circulatory system of living unstimulated mammalian spleens*, *ANAT. REC.*, vol. 65, 1936, pagg. 23-50.

KNISELY Melvin H., *Spleen studies: II. Microscopic observations of the circulatory system of living traumatized, and of drying spleens*, *ANAT. REC.*, vol. 65, 1936, pagg. 131-148.

LEBLOND C.P. - STEVENS C.E., *The constant renewal of the intestinal epithelium in the albino rat*, *ANAT. REC.*, vol. 100, 1948, pagg. 357-378.

LIPKIN M. - SHERLOCK P. - BELL B., *Cell proliferation kinetics in the gastrointestinal tract of man*, *GASTROENTEROLOGY*, vol. 45, 1963, pagg. 721-729.

MACKENZIE JR. D.W. - WIPPLE A.O. - WINTERSTEINER M.P., *Studies on the microscopic anatomy and physiology of living transilluminating mammalian spleens*, *AM. J. ANAT.*, vol. 68, 1941, pagg. 397-456.

MANDELLI Franco, *Lezioni di Ematologia*, La Goliardica Editrice, Roma, ristampa 1978.

MCDONALD George A. – DODDS T.C. – CRUIKSHANK Bruce, *Atlante di Ematologia*, Edizioni Mediche Scientifiche Internazionali, Roma, 2^a ed. italiana (trad. dalla 4^a inglese), 1979.

BIBLIOGRAFIA

MAZZA Luigi, *Anatomia ed istologia dei tessuti emopoietici*, in INTROZZI Paolo (diretto da), *Trattato Italiano di Medicina Interna, Parte terza, Malattie del Sangue e degli organi Emopoietici – Malattie del Sistema Reticolo-Istiocitario*, vol. I, USES, Firenze, 2^a edizione, 1978-1988.

VON MÖLLENDORFF Wilhelm, *Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen*, vol. 6 (parte I), Julius Springer, Berlino, 1930.

MONESI Valerio, *Istologia*, Piccin, Padova, 2^a edizione, 1980.

MOTTA Pietro, *Anatomia Microscopica*, Vallardi, Milano, 2^a ed., 1977.

MOVAT Henry Z. - FERNANDO Neil V.P., *The fine structure of lymphoid tissue after antigenic stimulation*, *EXP. MOLEC. PATH.*, vol. 4 (2), 1965, pagg. 155-188.

PECK H.M. - HOERR N.L., *The intermediary circulation in the red pulp of the mouse spleen*, *ANAT. REC.*, vol. 109, 1951, pagg. 447- 477.

SAINTE-MARIE G., *Study on plasmocytogenesis, I. Description of plasmocytes and of their mitoses in the mediastinal lymph nodes of then-week-old rats*, *AM. J. ANAT.*, vol. 114, 1964, pagg. 207-233.

SANDRITTER W. - THOMAS C., *Istopatologia*, Editoriale Grasso, Bologna, 3^a ed. italiana dalla 7^a ed. tedesca, 1979.

TURA Sante, *Lezioni di Ematologia*, Editrice Esculapio, Bologna, 2^a ed., 1977.

VIALLI Maffo - ERSPAMER Vittorio, *Contributo alla migliore conoscenza delle cellule enterocromaffini*, *ARCH. IT. ANAT. EMBRIOL.*, vol. 37, 1936, pagg. 411-436.

VIALLI Maffo - ERSPAMER Vittorio, *Ricerche sul secreto delle cellule enterocromaffini*, *CELL AND TISSUE RESEARCH*, vol. 27, 1937, pagg. 81-99.

WHANG Jacqueline - FREI III Emil - TJIO J.H. - CARBONE Paul P. - BRECHER George, *The distribution of the Philadelphia chromosome in patients with chronic myelocytic leukemia*, *BLOOD*, vol. 22, 1963, pagg. 664-673.

BIBLIOGRAFIA

WHEATER Paul Richard, *Istologia e anatomia microscopica*, Casa Editrice Ambrosiana, Milano, 3^a ed. italiana (a cura di O. Cremona - P.C. Marchisio) dalla 4^a ed. inglese (curata da B. Young - J. W. Heath), 2000.

ZUCKER-FRANKLIN D. – GREAVES M.F. – GROSSI C.E. – MARMONT A.M., *Le Cellule del sangue – Funzioni e patologia*, Atlante, 2 voll., Edi-Ermes, Milano, 2^a ed., 1988.

ZUCKER-FRANKLIN D. - GRUSKY G. - L'ESPERANCE P., *Granulocyte colonies derived from lymphocyte fractions of normal human peripheral blood*, *PROC. NATL. ACAD. SCI. USA*, vol. 71, n. 7, 1974, pagg. 2711-2714.

Per gli approfondimenti in **Istochimica**:

BONUCCI Ermanno, *Manuale di Istochimica*, Lombardo Editore, Roma, 1981.

GALLO Piero, *Introduzione allo studio dell'Istochimica*, Lombardo Editore, Roma, 1976.

MASTROSTEFANO Roberto, *Istochimica*, Fonte del Libro Medico, Roma, 1974.

Per la parte più strettamente **analitica**, vedasi:

BURLINA Angelo, *Medicina di Laboratorio – Principi di tecnologia*, 2 voll., C.G. Edizioni Scientifiche, Torino, 1994.

INTROZZI Paolo (diretto da), *Trattato Italiano di Medicina Interna - Tecniche e Diagnostica di Laboratorio*, 5 voll., USES, Firenze, 3^a ed., 1978 - 1987.

PASQUINELLI Filippo, *Manuale per Tecnici di Laboratorio*, 2 voll., Edizioni Rosini, Firenze, 1967.

TELÒ Walter, *Esami di Laboratorio*, Minerva Medica, Saluzzo, 2^a ed., 1967.

Per approfondimenti in **microscopia ottica**, vedasi:

CASTANO Paolo, *Microscopia Ottica e Fotomicrografia*, Tamburini Editore, Milano, 1975.

DETERMANN Hans - LEPUSCH Friedrich, *Il Microscopio e le sue applicazioni*, Ernst Leitz, Wetzlar, 1969.

KODAK, *Photography through the Microscope*, Eastman Kodak Company, Rochester, 6^a ed., 1974.

Kodak Filters for Scientific and Technical Uses, Eastman Kodak Company, Rochester, 1970.

MÖLLRING Friedrich Karl, *Nozioni basilari di Microscopia*, Carl Zeiss, Oberkochen/Württ, 1967.

NEUPERT Helmut, *Dispositivo a contrasto d'interferenza secondo Nomarski*, in *INFORMAZIONI ZEISS*, Carl Zeiss, Oberkochen/Württ., ed. italiana, Carl Zeiss S.r.l., Milano, n. 65, 1967, pp. 96-97.

NIKLOWITZ Werner, *Metodi di preparazione adatti per l'uso della microscopia a contrasto di fase nell'istologia*, in *INFORMAZIONI ZEISS*, Carl Zeiss, Oberkochen/Württ., ed. italiana, Carl Zeiss S.r.l., Milano, n. 64, 1967, pp. 42-44.

SINI Giovanni Pietro, *Problemi Tecnici della Microscopia Ottica*, Bologna, 2005, reperibile nel sito http://www.funsci.com/fun3_it/sini/mo/alone.pdf

Principali Riviste e Pubblicazioni citate ⁽⁵⁹⁾:

Acta anatomica [ACTA ANAT.], reperibile al sito:

<http://biomednet.com/library/aan>

American Journal of Anatomy, [AM. J. ANAT.], reperibile al sito:

https://www.researchgate.net/journal/0002-106_American_Journal_of_Anatomy

Anatomical Record [ANAT. REC.], reperibile al sito:

<http://www3.interscience.wiley.com/journal/117927936/grouphome/home.html>

Anatomischer Anzeiger (Centralblatt für die Gesamte Wissenschaftliche Anatomie) (Jena, 1886), [ANAT. ANZ. CENT.], il cui *Generalregister* (1886-1912) è reperibile al sito:

<http://www.archive.org/details/anatomischeranze140anat>

Le annate più recenti della Rivista sono reperibili al sito:

<http://www.sciencedirect.com/science/journal/09409602>

Archiv für mikroskopische Anatomie [ARCH. MIKR. ANAT.], reperibile al sito:

<http://lane.stanford.edu/online/ejsubjectbrowse.html?m=Anatomy>

Archivio Italiano di Anatomia ed Embriologia [ARCH. IT. ANAT. EMBRIOL.], reperibile

al sito: <http://journalseek.net/cgi-bin/journalseek/journalsearch.cgi?field=issn&query=0004-0223>

Blood, reperibile al sito:

<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/>

British Journal of Haematology, [BRIT. J. HAEMATOL.], reperibile al sito:

<http://www.wiley.com/bw/journal.asp?ref=0007-1048>

(59) - Le principali abbreviazioni riferite a Riviste di carattere Biologico possono essere reperite ai siti:

http://home.ncifcrf.gov/research/bja/journams_a.html

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=journals&term=>

http://it.wikipedia.org/wiki/Elenco_di_riviste_scientifiche

<http://library.caltech.edu/reference/abbreviations/>

<http://www.df.unibo.it/library/riso/files/jcr.pdf>

Cancer Growth and Progression, reperibile al sito:
<http://www.springer.com/series/5721>

Comptes Rendus de l' Association des Anatomistes [C. R. ASSOC. ANAT.]

Experimental and Molecular Pathology [EXP. MOLEC. PATH.], reperibile al sito:
<http://www.elsevierdirect.com/index.jsp>

Gastroenterology, reperibile al sito:
<http://www.gastrojournal.org/>

The Journal of Histochemistry and Cytochemistry [J. HISTOCHEM. CYTOCHEM.], reperibile al sito: <http://www.jhc.org/cgi/reprint/> o anche al sito: <http://cancerres.aacrjournals.org/>

The Journal of Histochemistry and Cytochemistry [J. HISTOCHEM. CYTOCHEM.], reperibile al sito: <http://www.jhc.org/cgi/reprint/> o anche al sito: <http://cancerres.aacrjournals.org/>

Nature, reperibile al sito:
<http://www.nature.com/>

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, [PROC. NATL. ACAD. SCI.], reperibile al sito: <http://www.pnas.org/>

Proceedings of the Royal Society [PROC. ROY. SOC.], reperibile al sito:
<http://rspa.royalsocietypublishing.org/>

Nota: Ovviamente, non tutti i siti citati mettono a disposizione le loro pubblicazioni *on-line-free*! Inoltre, le pubblicazioni più antiche sono consultabili praticamente solo nelle Biblioteche degli Istituti Universitari.

NOTA

Questa è solo una *bibliografia essenziale* (basata su testi e articoli in mio possesso o che ho potuto consultare in biblioteca) per chi vuole cominciare a interessarsi seriamente alle osservazioni microscopiche nel campo dell'ematologia e degli organi emopoietici: dovrebbe assolutamente essere arricchita con altri numerosi testi specifici (di istologia, di istochimica, di immunofluorescenza, di istopatologia, di citopatologia, di ematologia, di microscopia ottica, di microscopia elettronica, ecc.).

Ho voluto indicare per esteso - quando ciò è stato possibile - anche il nome degli Autori, come piccolo segno di gratitudine a Coloro che hanno contribuito, con il loro insegnamento e/o con le loro opere, alla mia formazione: a tutti Loro va il mio grato pensiero.

Desidero precisare, infine, che le citazioni infratestuali degli Autori, contraddistinte dalle parentesi quadre[], debbono intendersi come “brano tratto da...” e non come “citazione letterale”: è esclusivamente mia, pertanto, la responsabilità di eventuali inesattezze o imprecisioni nei confronti del testo originale.

Marco Brusadin