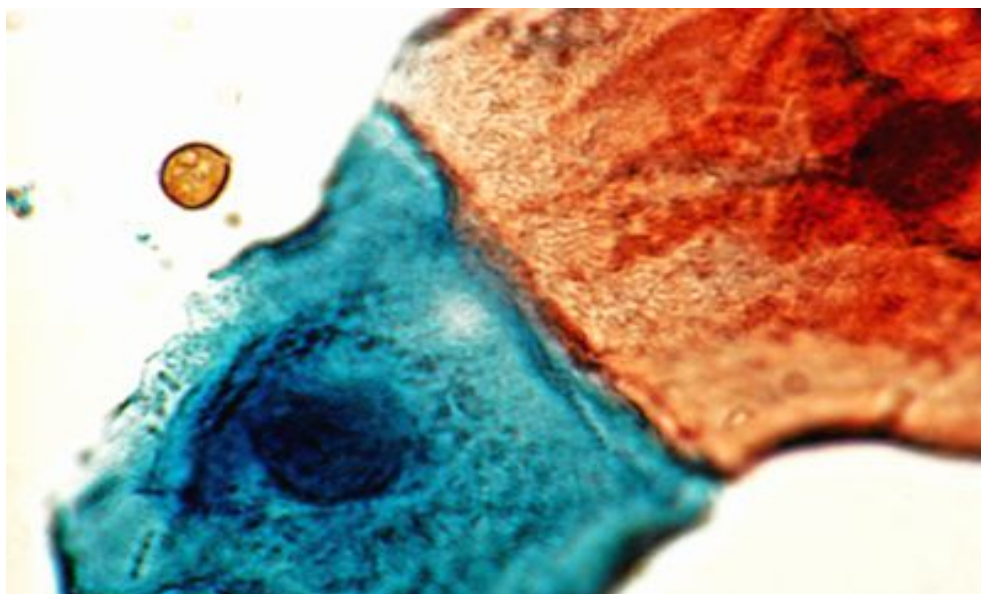


CITOLOGIA ESFOLIATIVA

Dott. Guido Savoini

Direttore responsabile

1



Rosso Congo e Acido FosfoTungstico
Congo Red – Phosphotungstic Acid
CR-PTA

Applicazioni in Citologia esfoliativa

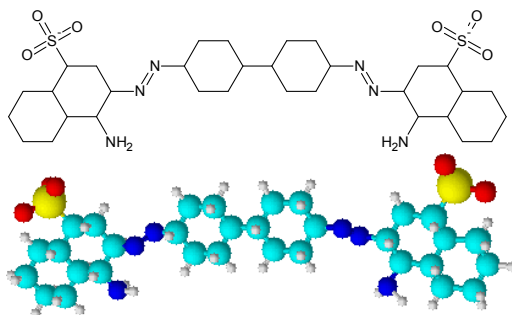
Prime osservazioni Aprile - Luglio 2011
Revisione Settembre 2017

Premessa

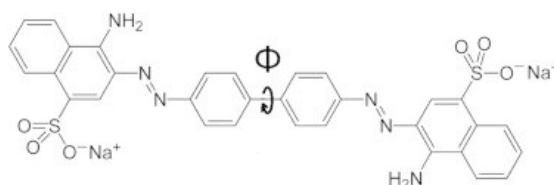
Il Rosso Congo (RC) è da sempre usato in citologia e citochimica per l'analisi dell'amiloide, dell'eleidina, delle cellule delomorfe, del tessuto osteoide, in luce diretta, in luce polarizzata e in fluorescenza sfruttando la sua capacità tintoriale in modo additivo e regressivo.

Rosso Congo è un colorante anionico e può depositarsi nelle fibrille di amiloide e, come illustrerò in seguito, anche lungo le fibre di Keratina mostrando all'esame in luce polarizzata una tipica birifrangenza verde mela.

Altri materiali, che vengono comunque colorati con Rosso Congo, come per esempio il collagene, non sono tuttavia visibili all'esame in luce polarizzata.



Rosso Congo



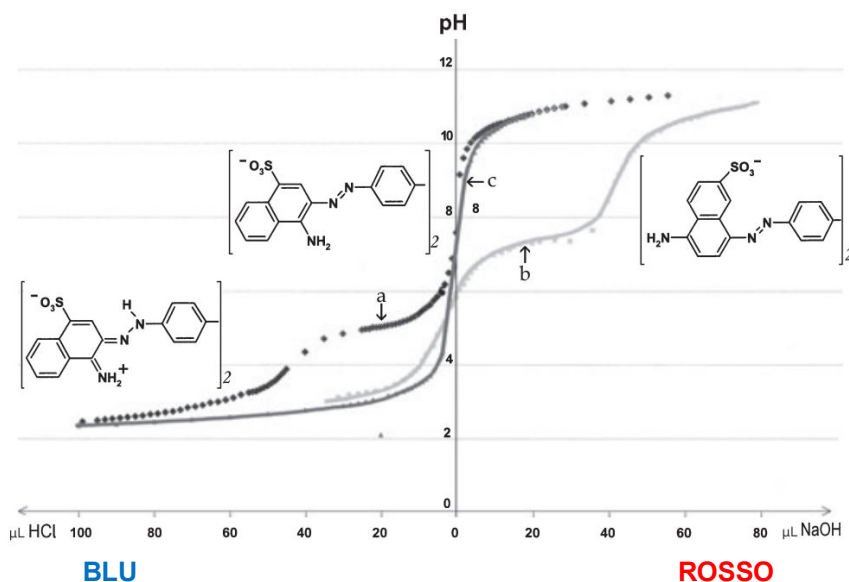
Angolo di torsione

Ma il Rosso Congo è anche un indicatore di pH e in questo lavoro sono riportate e commentate la scoperta delle potenzialità offerte da questa sostanza nello studio di popolazioni cellulari di corneociti in evoluzione, potenzialità indotte dalla sua capacità di virare dal Rosso (pH >5) al Blu (pH < 3) in particolari e specifiche condizioni.

E' facile verificare che qualsiasi materiale in grado di colorarsi con RC, compresi i tessuti e le cellule animali o vegetali, vira al blu con diverse intensità, ma sempre in modo omogeneo e senza alcuna differenziazione cromatica degli elementi cellulari a pH inferiore a 3,5.

Il grafico illustra come reagisce il Rosso Congo rispetto alle concentrazioni di ioni OH⁻ e H⁺

Grafico 1



(Da Chem Biol Drug Des 2007; 70; 491-501)

Titolazione acido base del Rosso Congo (a) e il suo analogo [4,4'-bis(1-amino-6-sulphonaphtil-4-azo) bisphenyl] (b) contro titolazione di H₂O come controllo (c).

Le formule mostrano, nel caso del Rosso Congo, la ionizzazione dell'amminogruppo colorato a basso pH.

Osservazione sperimentale:

Ammassi di cellule epiteliali colorate in Rosso con RC sono state divise in due fondamentali popolazioni cellulari, una rossa e una blu, per differenziazione con soluzione di Acido Fosforotungstico (PTA).

Questo comportamento non è stato rilevato con nessun altro reagente in grado di abbassare il pH fino al punto di viraggio al blu. (Non ho notizie di metodiche basate su questo principio).

Ritengo il fenomeno rilevante dal punto di vista citochimico e questo lavoro intende documentarlo con commenti e considerazioni preliminari.

Il metodo è estremamente semplice, veloce ed economico e può essere utile per l'individuazione di popolazioni cellulari rappresentative del loro stadio evolutivo come previsto dalla citologia esfoliativa, infatti anche se non si procede direttamente con una colorazione selettiva del nucleo, le caratteristiche nucleari risultano ugualmente rilevabili almeno dal punto di vista morfologico.

Sono personalmente convinto che il metodo possa offrire anche spunti per un ulteriore approfondimento dei meccanismi di azione del PTA in citochimica che ad oggi risultano ancora poco chiari e contraddittori.

METODICA CR-PTA (Congo Red – PhosphoTungstic Acid) Per preparati essiccati Guido Savoini 2011

Materiali:

- Cellule epiteliali dal cavo orale, delle vie urinarie, da prelievi per Pap Test, ecc.
- Soluzione idro metanolica di Rosso Congo al 1% p/v (*)
- Soluzione acquosa di Acido Fosfotungstico (PTA) a pH 2,5

Metodo:

1. Spalmare Cellule epiteliali su un vetrino portaoggetti
2. Essiccare all'aria o in termostato a 37°.
3. Passare in soluzione di Rosso Congo (**) per 30-60 minuti.
4. Allontanare il colorante con una soluzione acquosa di PTA a pH 2,5 (**) e mantenere in PTA per almeno 30' fino a differenziazione completa. (controllare al microscopio)
5. Allontanare l'eccesso di liquido tenendo inclinato il vetrino senza farlo asciugare.
6. Porre una goccia di PTA Glicerinato (****) e mettere il coprioggetti premendo leggermente al fine di disporre le cellule sullo stesso piano. (premendo evitare la rotazione de coprioggetti pena la disaggregazione delle strutture e ammassi cellulari presenti)
7. Per osservazioni differite fino a 24 ore lutare con vaselina o silicone (i solventi degli smalti possono interferire sulla reazione ai bordi del preparato).

Note :

(*) Alcool Metilico 50 ml. Acqua deionizzata 50 ml. Rosso Congo 1 gr. (1gr. Per 100 ml.)

(**) La soluzione di Rosso Congo se tenuta in al buio e a bassa temperatura dura a lungo

(***) Il pH è critico per ottenere la massima escursione cromatica e il migliore contrasto di colore (Blu-Rosso)

(****) La soluzione di PTA - Glicerina è così preparata:

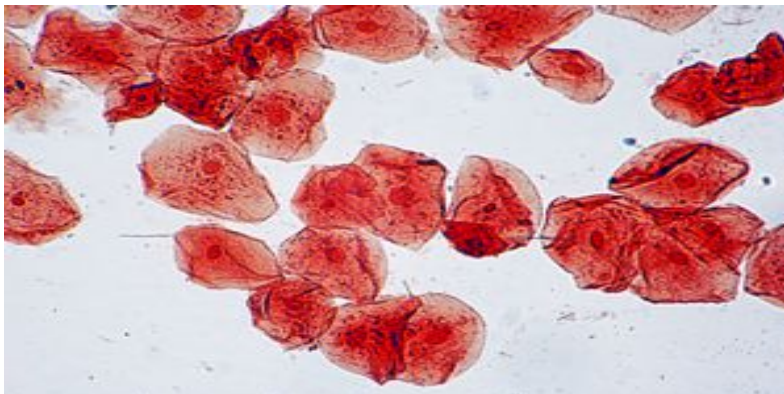
30 parti di Glicerina – 70 parti di Soluzione acquosa di PTA a pH 2,5 – Sotto agitazione aggiustare il pH a 2,5 con gocce di una soluzione concentrata di PTA ottenuta sciogliendolo a caldo in acqua.

Il vetrino può essere conservato per qualche giorno saltando le fasi 6.7.8 - lasciando asciugare all'aria e poi montando in resina. (In questo caso è però previsto un imbrunimento dei colori con perdita di contrasto cromatico)

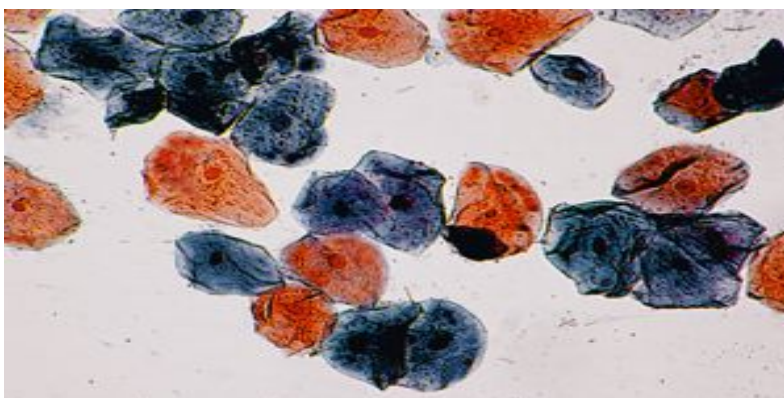
Risultati:

La rassegna fotografica che segue illustra bene quanto si può osservare.

RISULTATO PRIMARIO DELLA REAZIONE



Cellule epiteliali - Rosse dopo colorazione con RC



Cellule epiteliali - Rosse e blu dopo trattamento con PTA

Osservazione preliminare delle varie situazioni registrate

Come illustrato nelle seguenti foto 3a, 3b, 3c, 3d le cellule epiteliali:

1. Si colorano tutte indistintamente in Rosso
2. Sono nettamente differenziate in Rosso o Blu solo da soluzioni di PTA
3. Diventano tutte Blu con ogni reagente a pH inferiore a 3,5
4. Diventano nuovamente rosse dopo lavaggio con acqua

Foto 3a- Dopo colorazione con Rosso Congo

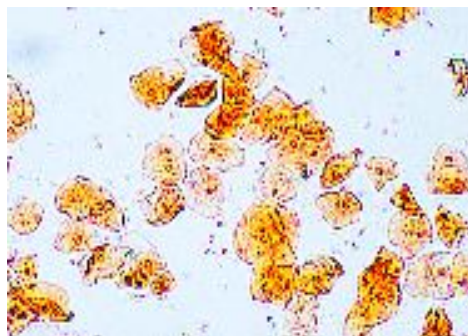


Foto 3b - Dopo trattamento con PTA

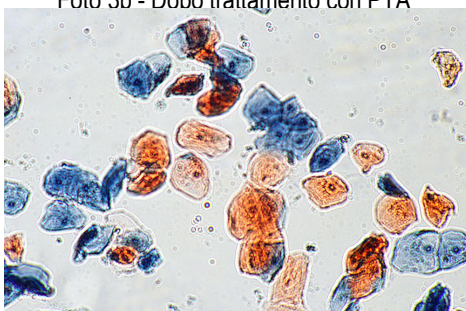


Foto 3c - Dopo trattamento con Acido acetico a pH 3

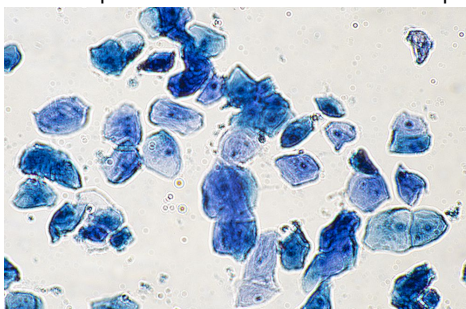
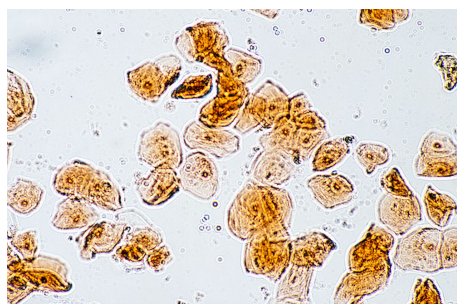


Foto 3d - Dopo solvatazione con acqua di fonte



Il processo è reversibile (anche se si riscontra un progressivo leggero imbrunimento delle cellule rosse che tende via via al violaceo)

PRIME CONSIDERAZIONI

Questi effetti fanno pensare che nelle cellule che rimangono rosse dopo trattamento con **PTA** siano presenti Sostanze (**A**) in grado di impedire al Rosso Congo (**RC**) di virare al blu attraverso legami deboli con i siti di viraggio del colorante. ($\text{NH}_2 \longleftrightarrow \text{NH}_2^+$)

Possiamo pensare che nelle cellule che rimangono rosse in presenza di PTA di formi un complesso **RC – A – PTA** dove il PTA interagisce in qualche modo con i gruppi attivi che nel colorante presiedono al viraggio, mentre nelle cellule che diventano Blu in presenza di PTA tale complesso non si formerebbe.

Il complesso **RC – A – PTA** sembra comunque caratterizzato da legami deboli, infatti il colore rosso rimasto dopo differenziazione con PTA, vira immediatamente al blu quando nel sistema, come sopra accennato, è aggiunta una qualsiasi sostanza acida in grado di produrre pH <3 e il blu diventa rosso per successiva semplice solvatazione (Foto 3d e 3c)

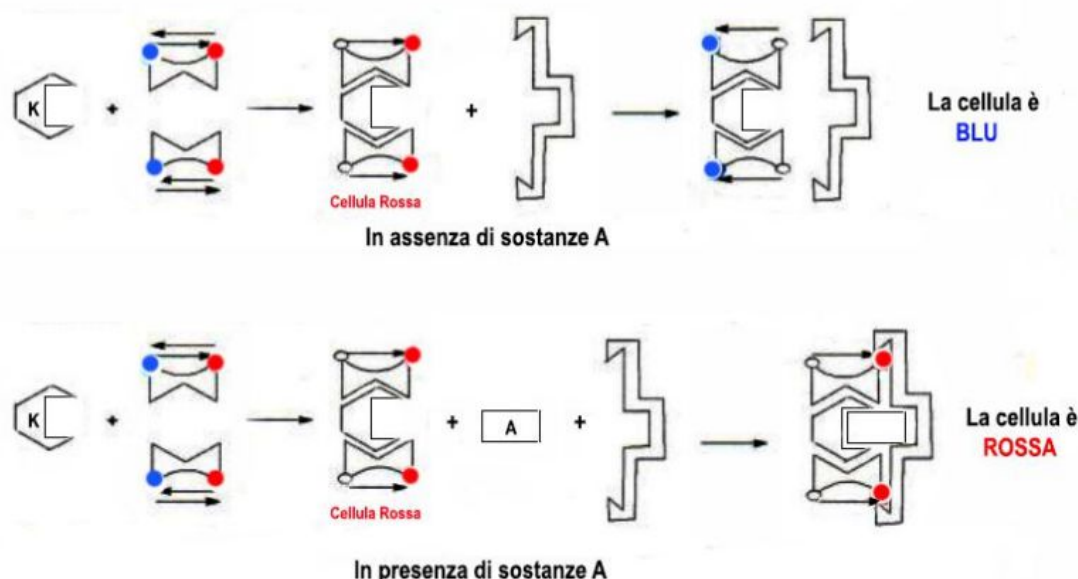
7

SCHEMA DI FUNZIONAMENTO DEL PROCESSO

Simbologia



Schema di processo



Sostanze K = Keratine

Riassumendo

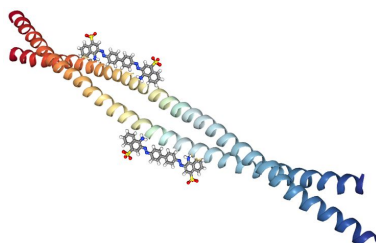
- Esistono cellule che contengono molecole simili (**A**) in grado di legarsi debolmente al PTA impedendo la sua capacità di esprimere protoni (H^+).
- Le cellule che contengono queste molecole si colorano in rosso con l'RC e non virano al Blu in presenza di PTA.
- Le cellule che non contengono le molecole di tipo **A** diventano blu dopo il trattamento con PTA perché il PTA non impedisce al RC di ionizzare l' NH_2 a NH_2^+ come indicato nel Grafico 1.

E' possibile ipotizzare che il RC si leghi lungo le molecole in punti diversi in cui esistono siti di legame più o meno capaci di formare un "ponte" RC-A-PTA per cui le Proteine fibrose, diventando via via più strutturalmente più complesse durante l'evoluzione cellulare, esprimono crescente capacità di legarsi, tramite i ponti (**A**), al PTA, inibendone progressivamente la sua capacità protonante con persistenza del colore rosso. Questo può spiegare perché con questo metodo di differenziazione in una stessa cellula sono evidenziabili aree ben delimitate di colore blu e di colore rosso come in seguito verrà illustrato.

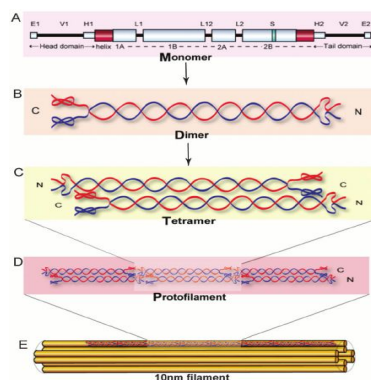
L'evidenza mostra infatti che esistono situazioni intermedie in cui cellule rosse contengono aree anche minime blu a contorni netti e viceversa. (Vedi rassegna fotografica)

E' verosimile credere quindi che le aree rosse siano presenti più strutture molecolari complesse in grado di interagire con PTA di quelle presenti nelle aree blu.

Nelle cellule giovani il RC si lega a monomeri o dimeri di Keratina diffusi nel citosol esprimendo una colorazione blu diffusa.



Nelle cellule giovani in grado di evolversi verso la desquamazione le molecole di cheratina si evolvono strutturalmente come nello schema seguente



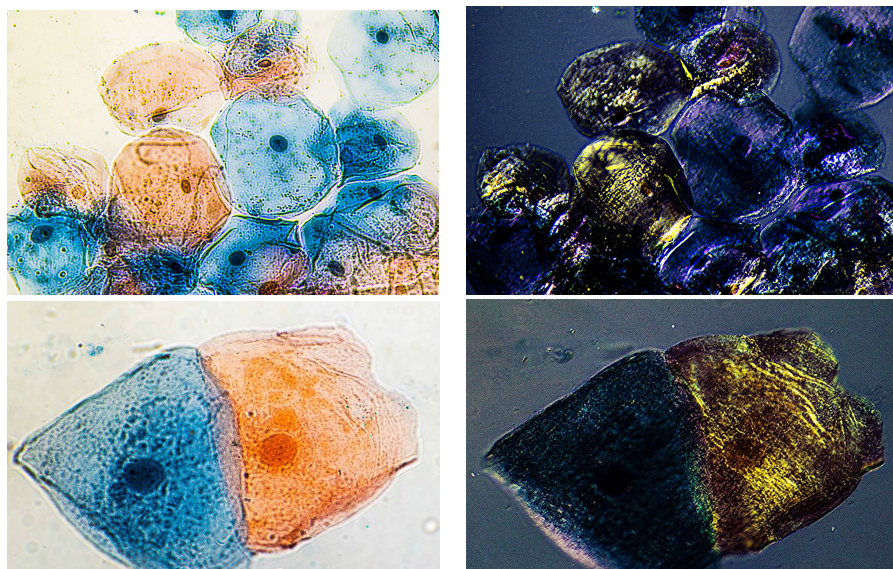
Probabilmente aumentano anche le sostanze di tipo A che fanno da ponte tra RC e PTA e le cellule rimangono rosse e globalmente aumenta il punto isoelettrico dell'intera cellula o di aree via via più ampie della stessa. (vedi allegato 1)

Infatti quando trattiamo con PTA un preparato colorato con Rosso Congo notiamo che nelle cellule il viraggio al BLU è totale, parziale o assente e questa assenza, corrispondente alla permanenza del colore rosso, può avere almeno tre cause che operano singolarmente o insieme:

1. Progressiva formazione di sostanze tipo A che agiscono come indicato nello schema di processo (schema 1)
2. Progressiva strutturazione delle molecole di keratina in fibre e fasci all'interno dei quali il PTA, probabilmente anche per impedimento sterico, non può attivare la ionizzazione dell' NH_2 a NH_2^+ e quindi il viraggio al blu.
3. Stabilizzazione del punto isoelettrico globale sopra pH 3,5 per accumulo di Keratine basiche. (Vedi allegato 1)

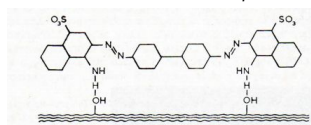
Con questa ipotesi interpretativa del fenomeno è possibile perché una stessa cellula può contenere aree rosse e aree blu.

In luce polarizzata si vede bene come il Rosso Congo si allinea con le fibre di cheratina complesse mentre non è allineato con le proteine ancora disperse nel citosol delle cellule giovani come mostrato sotto. nella cellula indicata con la freccia



Il Pearse nel suo Trattato di Istochimica riporta:

"Le molecole del colorante (RC) orientate parallelamente mostrano differenti coefficienti di assorbimento in direzione del piano della luce polarizzata, a seconda che il piano di polarizzazione sia parallelo all'asse delle molecole, ovvero formi con esso un angolo retto. In questo caso la conclusione è che le lunghe molecole del colorante si dispongono lungo l'asse della fibra, come si dimostra nella figura che segue. Vickerstaff (1954) trattò approfonditamente tutto l'argomento riguardante l'orientamento del colorante lungo le fibre e mise in rilievo che l'effetto dicroico è maggiore con basse concentrazioni di colorante; tale fatto è dovuto probabilmente all'assorbimento elettivo da parte delle strutture maggiormente orientate della fibra"



Nel nostro caso la fibra è di Keratina

ANALISI CRITICA

Ad una prima osservazione delle cellule epiteliali sottoposte al trattamento con RC e PTA si nota in generale che:

1. Cellule con nucleo grande a cromatina dispersa, virano al blu
 2. Cellule con nucleo piccolo picnotico, apparentemente "vecchie" In fase di cheratinizzazione e ancor più di corneificazione, restano rosse e tendono al giallo.
- (Vedi fato n. 5a,5b,6 a,b)

10

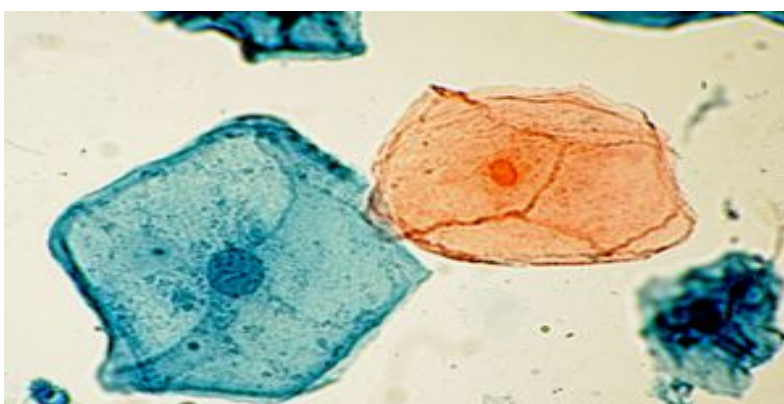


Foto 5a - Cellule a confronto X400

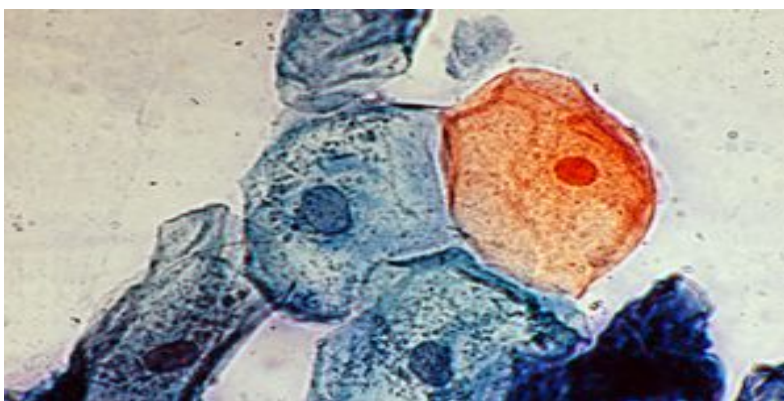


Foto 5b -Cellule a confronto X400

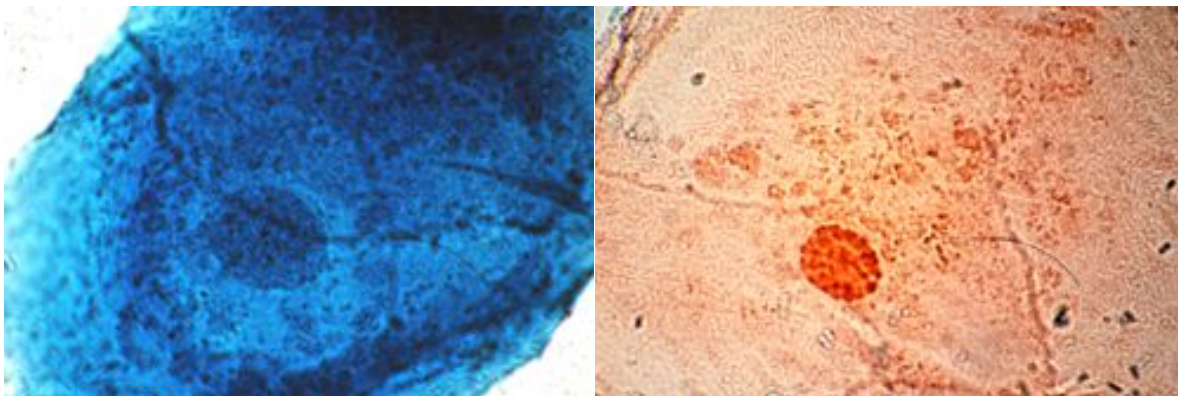


Foto 6a e 6b - Dettaglio dei nuclei X 1000

Ma questo non è sempre vero come si vede nelle seguenti foto (ad es. nella n.7 due cellule Blu (B e C) hanno nuclei diversi di cui uno simile alla cellula A (rossa).
 Ciò significa che il dimorfismo nucleare e la cheratinizzazione non hanno gli stessi tempi.

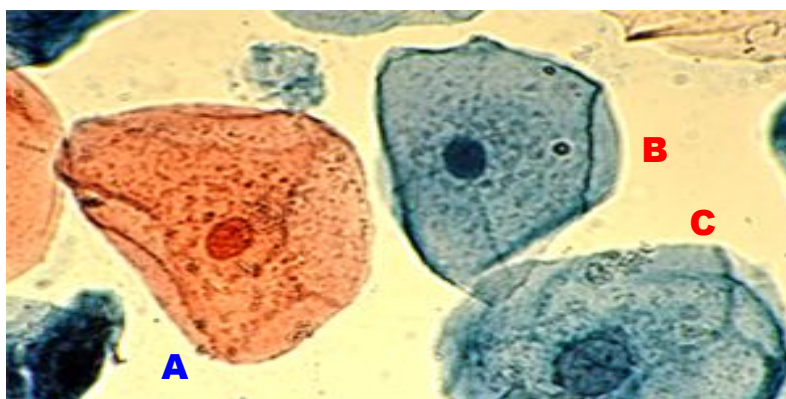


Foto 8a – Morfologia generale dei nuclei

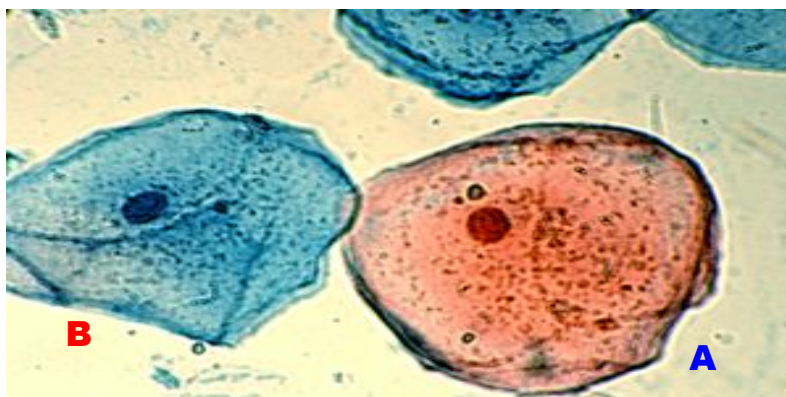


Foto 8b – Cellule diverse con nuclei simili in dimensione

La cellula rossa presenta leggera reazione blu alla periferia come indice di non completa maturazione
 Come detto per la foto 8° la cellula rossa A non è ancora completamente cheratinizzata e il suo nucleo è ancora simile a quello della cellula matura B

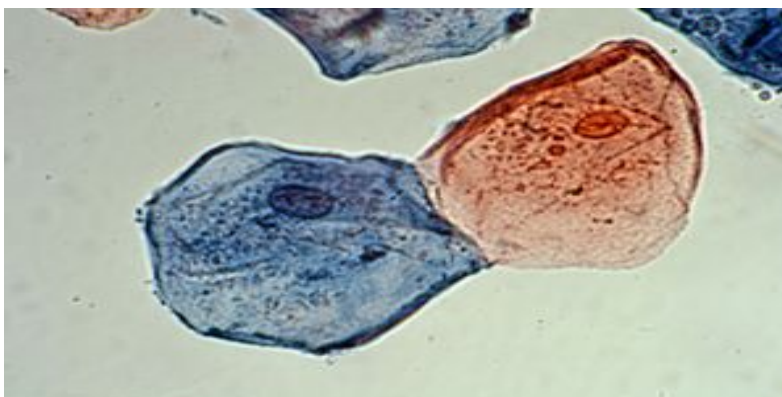


Foto 8c – Cellule dell'epitelio pavimentoso ancora collegate
 La cellula blu mostra nucleo leggermente più giovane

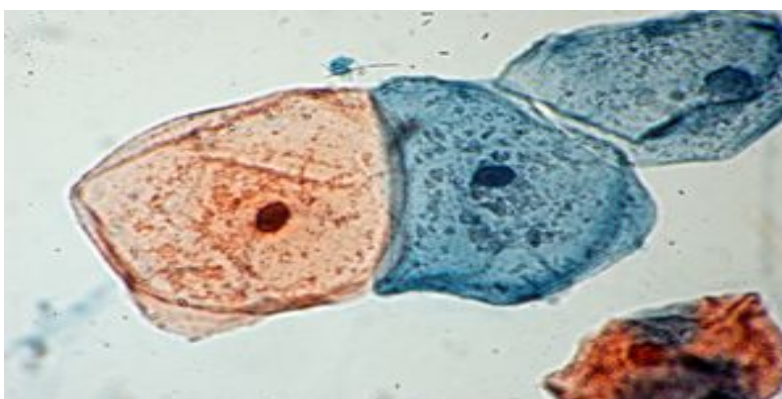


Foto 8d – Cellule dell'epitelio pavimentoso ancora collegate
 La cellula blu e rossa al centro presentano nuclei simili e simile aspetto del citoplasma
 ma le striature nel citoplasma della cellula rossa ne indicano la cheratinizzazione avanzata

Queste immagini, rese possibili dal Metodo RC-PTA descritto, come anche quelle della Cover della 5b e della 12 indicano in ogni caso che le giunzioni cellula-cellula sul piano orizzontale (Desmosomi) sono apparentemente “impermeabili” cioè impediscono il passaggio di sostanze tra cellule adiacenti, per lo meno delle proteine fibrose, e che ogni cellula è un organismo indipendente con una sua autonoma evoluzione verso la corneificazione.

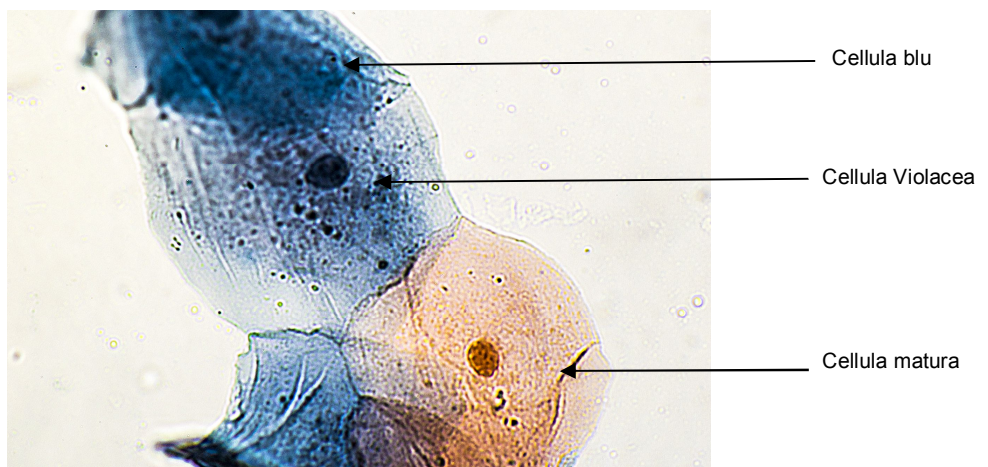
In Luce polarizzata il metodo RC-PTA permette di registrare la presenza di strutture fibrillari di cheratina a livello giunzionale^(*) come mostrano le immagini seguenti.

La colorazione verde ben visibile nel particolare ingrandito presente nella giunzione dipende dall'angolo di polarizzazione che è perpendicolare all'asse delle fibre verde mela all'interno della cellula. (Come si sa a livello desmosomiale le fibre di Keratina sono perpendicolari alla linea di giunzione cellule-cellula)

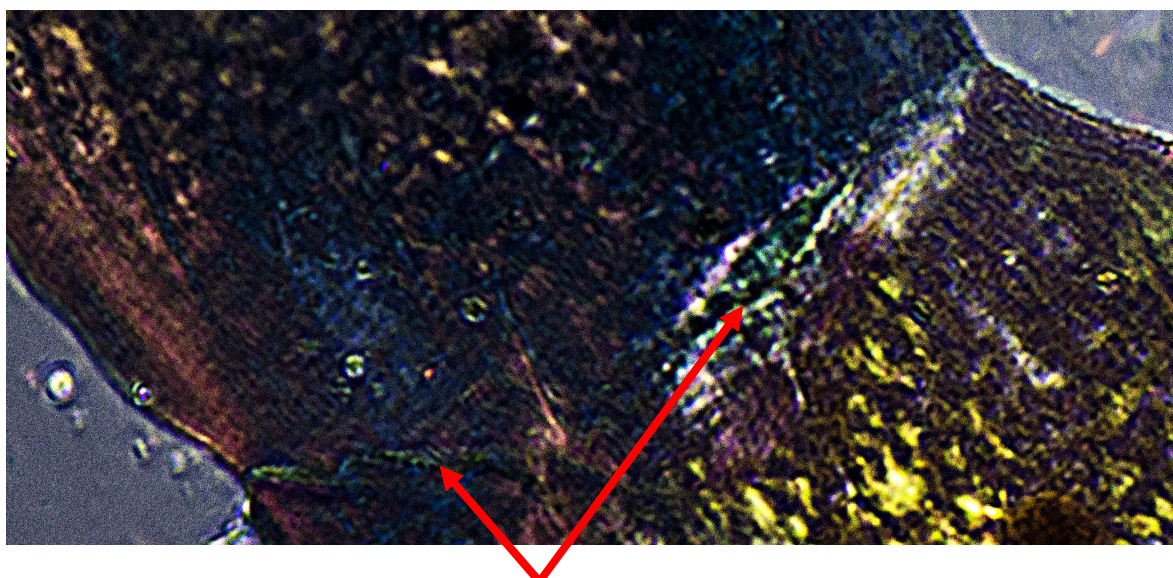
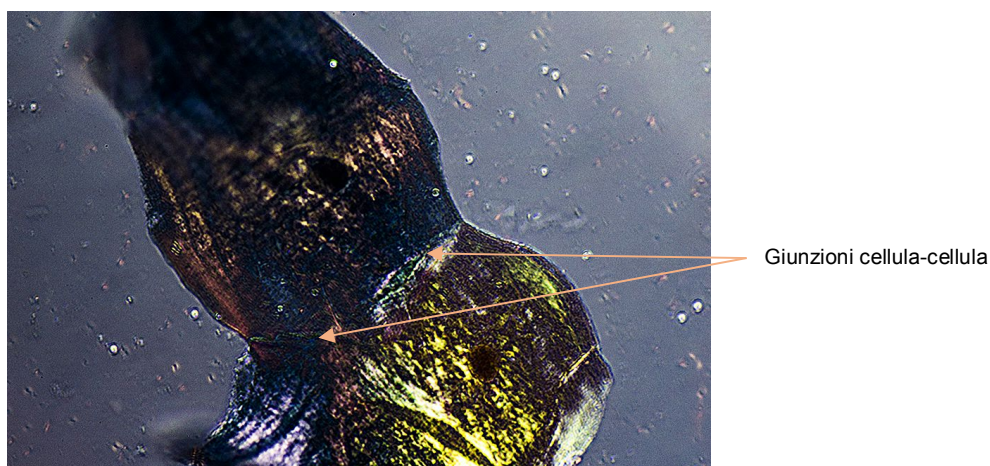
Nota:

La cellula blu addossata a quella violacea non presenta segni di dicroismo, mentre quella violacea, più matura, li presenta, ma non ancora di colore “verde mela” come quello sviluppato dalle fibre di cheratina delle cellule mature (rosse).

^(*) ben evidenziabili dalla microscopia elettronica a trasmissione.



13



Cheratina a livello delle giunzioni cellula-cellula

EVOLUZIONE CELLULARE

Di seguito alcune immagini che evidenziano come il metodo RC-PTA permetta la differenziazione cellulare rispetto allo stadio evolutivo.

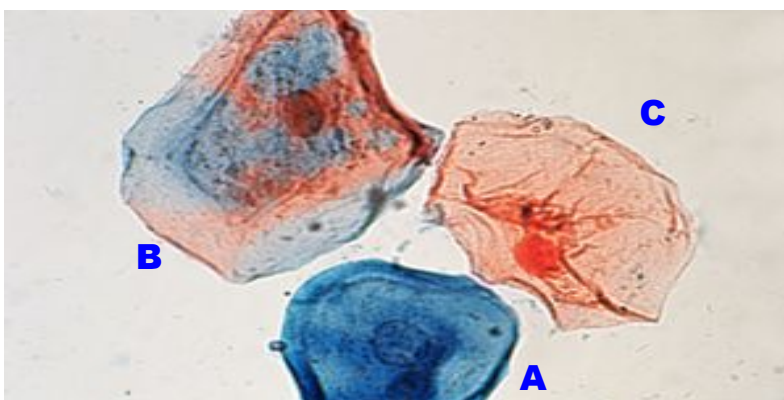


Foto. 9 - Le tre fasi fondamentali del processo di invecchiamento (A>B>C)

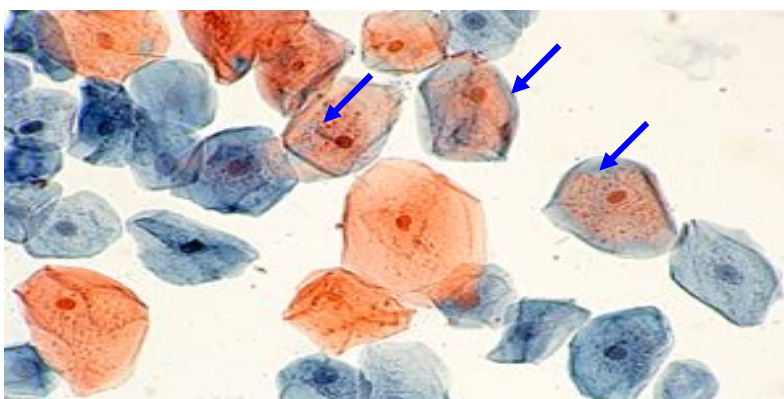


Foto 10 – Le frecce indicano residui di aree blu che evolveranno al rosso nel processo di invecchiamento delle cellule

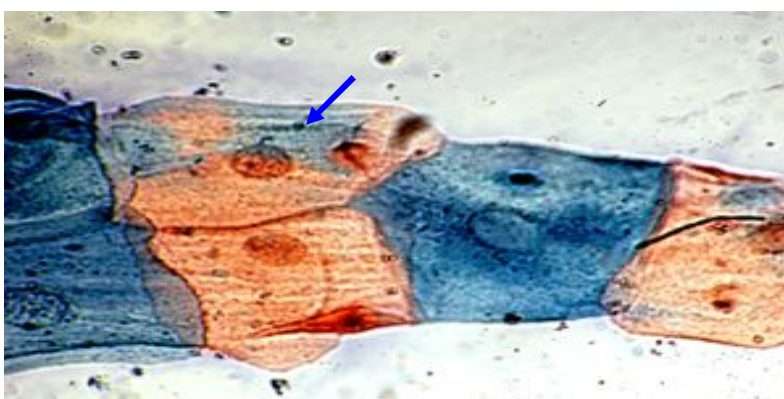


Foto 12 – Lamina epiteliale con cellule in diversi stadi di invecchiamento (dettaglio)

Gli stadi evolutivi delle cellule epiteliali sono ben evidenziati nelle seguenti foto:



15

Foto 11 – Evoluzione delle cellule

La cellula gialla quasi completamente cheratinizzata diventa impermeabile al colore

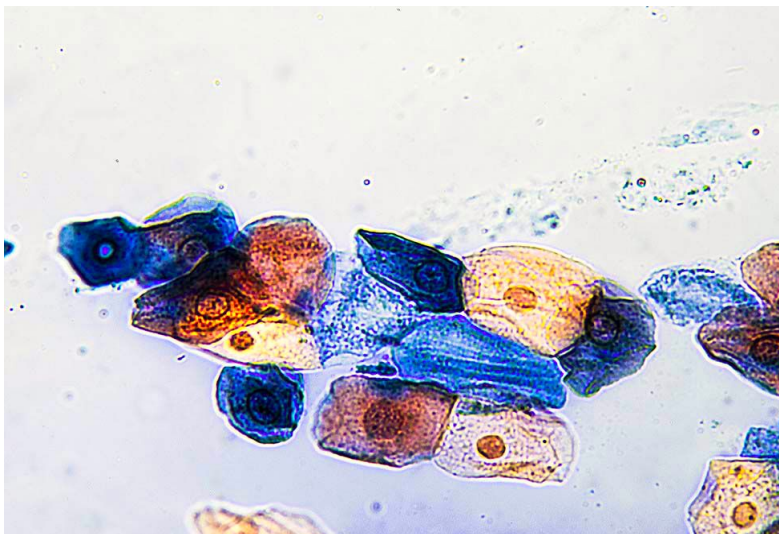


Foto 12 – Evoluzione delle cellule

In questa immagine sono presenti cellule provenienti dai diversi livelli e con grado diverso di maturazione

METODO RC-PTA PER CELLULE IN SOSPENSIONE

Utile per sedimenti urinari, aspirati e lavaggi bronchiali, gastrici, vescicali, ecc.

Procedura:

1. Disperdere il materiale repertato in 10 ml di soluzione fisiologica diluita 1:1 con acqua
2. Introdurre la sospensione in una provetta conica da centrifuga e disperdere con vortex
3. Centrifugare per 15' a 500 rpm
4. Allontanare tutto il surnatante con una pipetta
5. Aggiungere al sedimento 1 ml di soluzione CRAM (Congo Red – Acqua – Metanolo)
6. Dopo 60 minuti aggiungere 9 ml di acqua e risospendere con vortex
7. Centrifugare per 15' a 500 rpm
8. Allontanare tutto il surnatante con una pipetta
9. Aggiungere nella provetta la soluzione di PTA e disperdere con vortex
10. Dopo 30 minuti centrifugare per 15' a 500 rpm
11. Allontanare il surnatante con una pipetta
12. Aggiungere 200 microlitri di PTA Glicerinato
13. Prelevare 20 microlitri, porli sul portaoggetti
14. Adagiare il coprioggetto con leggera pressione aliminando l'ecceddo di liquido dai bordi
15. Osservare e registrare con microcamera

16

Risultato:

Ottima differenziazione delle cellule in base al loro grado di cheratinizzazione.

La colorazione in fase liquida e il successivo allontanamento dell'eccesso di colorante permettono di evidenziare una maggior quantità di stadi evolutivi con cellule blu, rosse, rosa, gialle, incolore.

Le immagine che seguono illustrano il risultato registrato su popolazioni di cellule provenienti dalla gola, dalle guance e dalle labbra esaminate con la metodica sopra descritta.

