
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

GUIDO PALLADINI, AMICO BIGNAMI

Studio istochimico delle calcificazioni cerebrali nell'ipo-paratiroidismo

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 36 (1964), n.4, p. 566-571.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1964_8_36_4_566_0>

L'utilizzo e la stampa di questo documento digitale è consentito liberamente per motivi di ricerca e studio. Non è consentito l'utilizzo dello stesso per motivi commerciali. Tutte le copie di questo documento devono riportare questo avvertimento.

*Articolo digitalizzato nel quadro del programma
bdim (Biblioteca Digitale Italiana di Matematica)*

SIMAI & UMI

<http://www.bdim.eu/>

Biologia — *Studio istochimico delle calcificazioni cerebrali nell'ipo-paratiroidismo* (*). Nota di GUIDO PALLADINI e AMICO BIGNAMI, presentata (**) dal Corrisp. A. STEFANELLI.

Il problema della calcificazione consiste nell'appurare il meccanismo di deposito del calcio e le cause che producono tale precipitazione solo in regioni ben determinate dei tessuti. L'attenzione dei ricercatori in questo campo si è sempre polarizzata sulla matrice organica (Frendsberg e Gyorgy 1920), postulandone la capacità di legare ioni calcio dal liquido tissutale. A quale sostanza chimica della matrice organica fosse in realtà da attribuire questa capacità, non è invero ancor noto; scartato il collagene e varie proteine, inizialmente proposte, l'attenzione degli Autori si è soffermata in questi ultimi anni sui polisaccaridi solforati; varie e numerose ipotesi sono state fatte sul ruolo esatto che queste sostanze giocano nel processo di calcificazione, però è indubbia la loro presenza in molte zone in procinto di calcificare (Lacroix 1956).

Tuttavia, numerosi sono i punti non ancora chiariti; il ruolo svolto dai mucolisaccaridi solforati nelle calcificazioni distrofiche non è ancora accertato, come incerti sono i rapporti fra zone in calcificazione e substrati fissatori di marcatori di calcificazione (tetraciline; Palladini 1964 [1]).

Sotto questo punto di vista, appare molto promettente lo studio istochimico di quelle calcificazioni abnormi in cui il substrato non è normalmente idoneo alla calcificazione, ma lo diviene in alcuni casi in seguito ad eventi patologici; alcune di queste calcificazioni, come ad esempio quella della parete arteriosa nell'aterosclerosi, sono state ben studiate, ma molte altre non sono mai state indagate con metodi istochimici moderni; la comparsa, infatti, di sostanze per quantità e qualità non fisiologiche in questi distretti può essere serio indizio di un legame fra queste sostanze anormali e il processo di calcificazione. Per una rivista critica e bibliografica sul problema vedi Widman, in *International review of connective tissue*, ed. D. A. Hall, vol. I, Academic Press, N. Y. 1963.

Un interessante esempio di calcificazione nel sistema nervoso con comparsa di sostanze abnormi, è il morbo di Fahr, che è stato preso in esame nel seguente studio.

Esiste in letteratura un gruppo di casi dove si osserva, in assenza di alterazioni locali evidenti, la deposizione nell'encefalo di calcio e di un materiale che, con le comuni colorazioni dà una reazione cromatica eguale a quella data dai sali del calcio, pur non dando le reazioni istochimiche di questa so-

(*) Lavoro eseguito negli Istituti di Anatomia Comparata «G. B. Grassi» (direttore prof. A. Stefanelli) e di Anatomia Patologica (direttore prof. L. Ajello) dell'Università di Roma.

(**) Nella seduta dell'11 aprile 1964.

stanza (pseudocalcio: PC) [2]. Questi casi sono comunemente designati con il termine di *malattia di Fahr*, anche se esistono numerose osservazioni precedenti quella di Fahr del 1930.

Trattasi di un gruppo di casi non omogeneo, che comprende individui di età variabile ed in cui le calcificazioni cerebrali sono talora un reperto accidentale radiologico od autoptico. In alcuni casi si tratta di individui epilettici o tetanici, in altri di ritardati mentali o di dementi; talora la malattia ha carattere familiare. Sono spesso presenti sintomi extrapiramidali; difatto le alterazioni prevalgono nei gangli della base. Nella letteratura recente queste calcificazioni sono messe in rapporto da numerosi Autori con disturbi endocrini ed in particolare con l'ipo-paratiroidismo e lo pseudo-ipo-paratiroidismo di Albright [3].

Nella presente comunicazione riferiamo i risultati preliminari di una ricerca istochimica condotta sulle deposizioni di calcio e sulla parte organica ed inorganica dello PC da noi osservato nell'encefalo in due casi sporadici di ipo-paratiroidismo idiopatico.

Riteniamo opportuno far precedere l'esposizione dei dati istochimici da una breve descrizione dei reperti morfologici.

In alcuni distretti della corteccia cerebrale e cerebellare, nei gangli della base e più raramente nella sostanza bianca si osserva una estesa deposizione di piccoli granuli a forma di cocci nella parete dei capillari. Questi granuli si fondono fra loro trasformando il capillare in un cordoncino solido; oppure si ingrandiscono in masserelle rotondeggianti, dove spesso è riconoscibile una struttura a lamelle concentriche, perdono la loro connessione con il capillare e divengono libere nel tessuto nervoso. Dove le alterazioni sono più gravi, si formano concrezioni macroscopiche che stridono sotto il coltello. Nella sostanza bianca numerosi piccoli vasi, soprattutto arteriosi, presentano pareti affatto omogeneizzate con scomparsa di ogni struttura; queste arterie sono rigide e danno al dito che scorre sulla sostanza bianca la sensazione di « barba mal rasata ».

RICERCHE SULLA PORZIONE INORGANICA.

Le reazioni istochimiche per il calcio ionizzabile (purpurina, pirogallolo, von Kossa, reazione del gesso) sono costantemente positive in corrispondenza delle concrezioni più grossolane.

Per quanto riguarda le deposizioni più fini nella parete dei capillari e delle piccole arterie, esse sono in alcuni distretti positive, in altri invece negative, pur avendo il materiale depositato l'aspetto del Calcio con le comuni metodiche istologiche, colorandosi in blu intenso con l'ematossilina e con il blu di toluidina (PC).

La reazione del blu di Prussia per il ferro (sali ferrici) è costantemente positiva; la colorazione è particolarmente intensa in corrispondenza dello PC.

Per stabilire l'eventuale presenza di calcio non ionizzabile (« Ca mascherato » sec. Lison), siamo ricorsi alla microradiografia. Con questa metodica, si espone una sezione spessa adesa ad una lastra radiografica a grana finissima ad una sorgente di raggi X molli. L'ulteriore studio della lastra viene compiuto osservandola al microscopio.

La microradiografia ha dimostrato la presenza di una fortissima Rx-opacità nel materiale che dava positive le reazioni per il calcio; ha inoltre dimostrato una intensa opacità dove le reazioni istochimiche più sensibili (pirogallolo, reazione del gesso) davano una positività molto lieve, quelle meno sensibili (von Kossa, purpurina) non davano reazione alcuna. Dove le metodiche istochimiche sensibili erano negative, vi era una debole opacità ai raggi.

Per accertare se altri elementi (in pratica, il ferro) partecipassero e in che misura, alla Rx-opacità, abbiamo pensato di trar partito dalla insolubilità negli acidi minerali diluiti del *ferrocianuro ferrico* (blu di Prussia) e dalla solubilità negli stessi dei sali del calcio.

Abbiamo quindi eseguito la reazione del blu di Prussia sopra una sezione istologica e previo trattamento con acido nitrico al 5% per asportare ogni residuo di calcio, l'abbiamo microradiografata. In questo modo si è ottenuta una notevole riduzione della Rx-opacità nelle deposizioni di calcio e PC, le quali erano solo leggermente più opache dei tessuti circostanti (1).

RICERCHE SULLA PORZIONE ORGANICA.

Stabilito così la presenza del calcio mascherato nel materiale da noi studiato, siamo passati allo studio della matrice organica, limitando le nostre ricerche alle *proteine* ed ai *polisaccaridi*.

Proteine. - Le reazioni *xantoproteica* (radicale aromatico), del *biuretto* (legame peptidico) e di *Hrsel* (triptofano) sono risultate costantemente positive.

La reazione di *Millon* (tirosina), tanto nella modificazione secondo Bensley, tanto in quella secondo Baker appare positiva in modo molto debole.

Negative o dubbie le reazioni di *Romieu* (radicale indolico) e di *Sakaguchi-Baker*. In complesso queste reazioni, in accordo con i dati della letteratura, indicano la presenza di proteine nel materiale da noi studiato.

Polisaccaridi. - Le reazioni di *Hotchkiss* (paS) e di *Bauer* (polisaccaridi *sensu latu*) sono costantemente positive.

La reazione dell'*Alcian blu* a pH 2,5, considerata elettiva per i mucopolisaccaridi acidi, dà ovunque risultato positivo, eccezion fatta dei granuli più fini situati attorno ai capillari. Nelle masse più voluminose la colorazione è più intensa nelle parti periferiche che non in quelle centrali; è difficile dire se ciò è dovuto alla non buona diffusione del colorante, oppure alla minore quantità di materiale positivo nelle parti centrali.

Poiché l'*Alcian blu* è anche un colorante del calcio, sia pure a concentrazione e pH differenti da quelle da noi usate, abbiamo colorato sezioni contigue decalcificate e no, ottenendo risultati affatto sovrapponibili.

La colorazione combinata *Alcian-PaS* sec. Vialli [4], mostra ovunque una colorazione viola, tipica dei mucopolisaccaridi neutri ed acidi miscelati assieme, tranne i più fini granuli nella parete dei capillari che sono di colorito rosso (mucopolisaccaridi neutri).

A questo punto della nostra ricerca, abbiamo proceduto ad un tentativo di qualificazione (funzione carbossilica ovvero solforata) dei mucopolisaccaridi acidi della matrice di calcificazione.

La reazione di *Bracco-Curti* [5] che secondo questi Autori e come risulta da ricerche appositamente istituite da uno di noi, è specifica dei mucopolisaccaridi esteri solforici, è risultata costantemente positiva nel materiale da noi studiato. Le prove di metilazione (bloccaggio di entrambe le funzioni, carbossilica e solforica) e di successiva saponificazione (ripristino della sola funzione carbossilica) seguite da colorazione all'*Alcian blu*, producono una notevole riduzione dell'intensità di colorazione.

La digestione con ialuronidasi testicolare (Jalovis Vister, ialuronidasi testicolare Organon) (2) non ci hanno dato risultati costanti: in alcuni esperimenti abbiamo ottenuto la totale scomparsa della colorazione Alcian, in altri una riduzione di oltre il 50%.

Anche i risultati della metacromasia eseguita con la tecnica di Landsmeer non sono del tutto probativi; mentre come è noto i *m_{ps}* solforati danno una metacromasia rossa (gamma) alcool-resistente a bassi pH ed i *m_{ps}* carbossilici una metacromasia violacea (beta) a pH più

(1) Deve inoltre tenersi presente come eseguendo la reazione del blu di Prussia il quantitativo di Fe esistente nel materiale aumenta, per cui l'opacità residua dopo l'asportazione del Ca è circa 1,75 volte maggiore di quel che sarebbe dovuto ai sali ferrici esistenti nel materiale in esame prima di ogni manipolazione.

(2) Gli Autori ringraziano la Società Vismara Terapeutici e Organon-Ravasini per aver loro cortesemente fornito gli enzimi ialuronidasici utilizzati nella ricerca.

elevati, alcool-labile, nel materiale da noi studiato abbiamo ottenuto una colorazione rosso-violacea a pH bassi (pH 2) la quale rapidamente scompariva.

Altrettanto possiamo dire delle curve di assorbimento di coloranti basici (*signature-courbes*), in cui a causa della diversa posizione del punto isoelettrico apparente (in pH bassi i *m_{ps}* solforati, a pH più alti i carbossilici), la colorabilità dei polisaccaridi a funzione carbossilica cade bruscamente sotto pH 4, al contrario dei solforici che la conservano anche a pH 2 e oltre. Le curve di assorbimento dei coloranti basici nel materiale in esame sono quelle dei

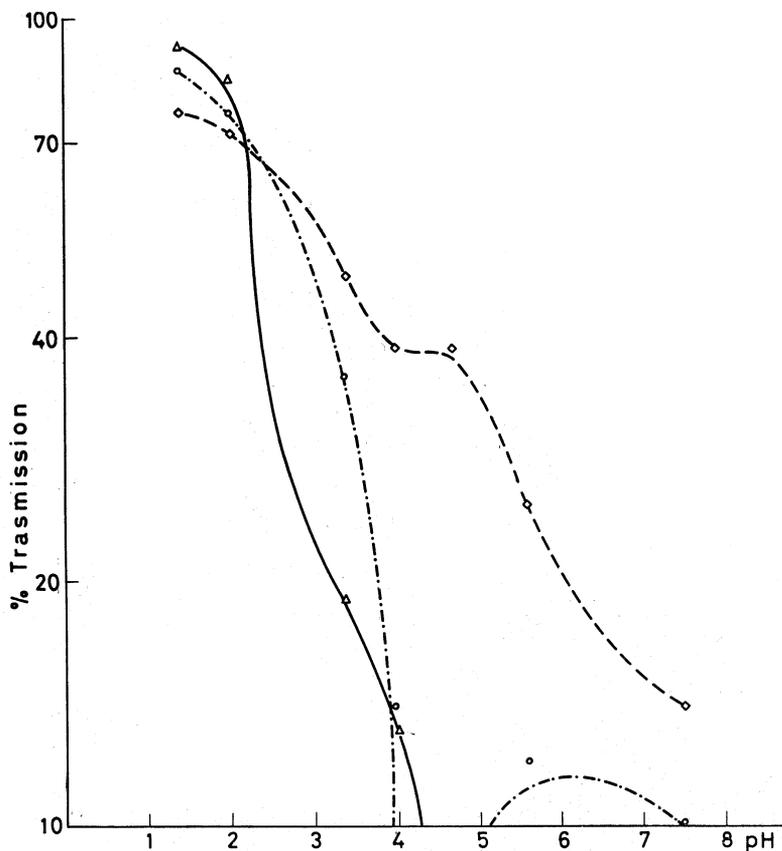


Grafico 1. - Curva di assorbimento di coloranti basici a vario pH. In ascisse il pH della soluzione colorante, in ordinate la trasmissione in per cento.

Azur I 0,1 % in tampone di McIlvaine diluito 1:10; luce bianca; istofotometro mod. Lison. Ogni punto, media di 6 determinazioni. Linea continua: strato esterno dei granuli a struttura concentrica liberi dal tessuto nervoso. Punto e linea: zona centrale degli stessi. Tratteggiata: granuli finissimi della parete dei capillari.

Spiegazione nel testo.

m_{ps} carbossilici: in tutti i casi vi è una brusca diminuzione di colorabilità sotto pH 4 (vedi grafico 1).

Riassumendo, mentre alcune reazioni indicano chiaramente la presenza di *m_{ps}* solforati nel materiale da noi studiato (reazione di Bracco-Curti, reazione di metilazione e saponificazione) altre reazioni danno risultati dubbi (digestione con ialuronidasi, metacromasia); l'assorbimento dei coloranti basici, infine, è quello caratteristico dei mucopolisaccaridi carbossilici.

Riteniamo che questi risultati apparentemente contrastanti siano dovuti alla interferenza fra *m_{ps}* solforati e proteine [6], soprattutto nella colorazione con coloranti basici. A con-

ferma di questa ipotesi l'incubazione con papaina (14 ore a 37°, in mezzo tamponato a pH 7, concentrazione 1 mg/ml) modifica le curve di assorbimento e svela una netta metacromasia gamma.

Alla luce delle attuali conoscenze, la serie degli eventi istochimici nelle calcificazioni cerebrali da noi studiate può così riassumersi: la calcificazione si accompagna e forse è preceduta dalla deposizione di una matrice organica. Tale matrice è costituita da una miscela di *mps* neutri, acidi carbossilici (molto probabilmente ac. ialuronico e ialico) e acidi solforati, ma ci sono forti indizi che nello stadio iniziale sia formata da *mps* neutri che successiva-

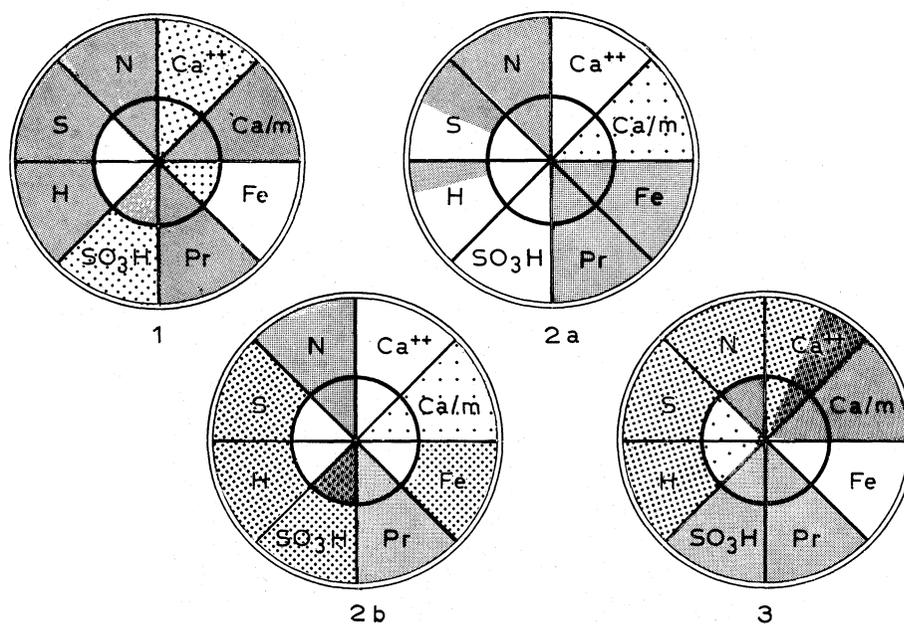
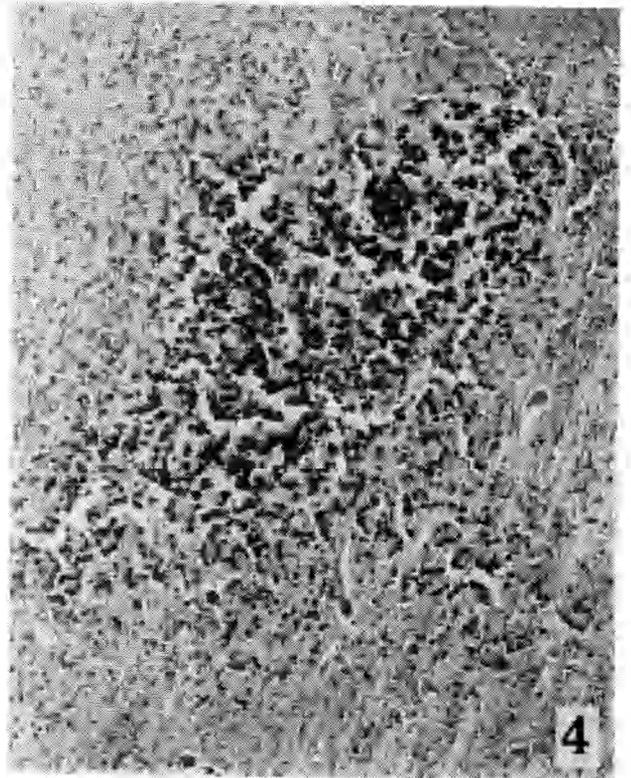
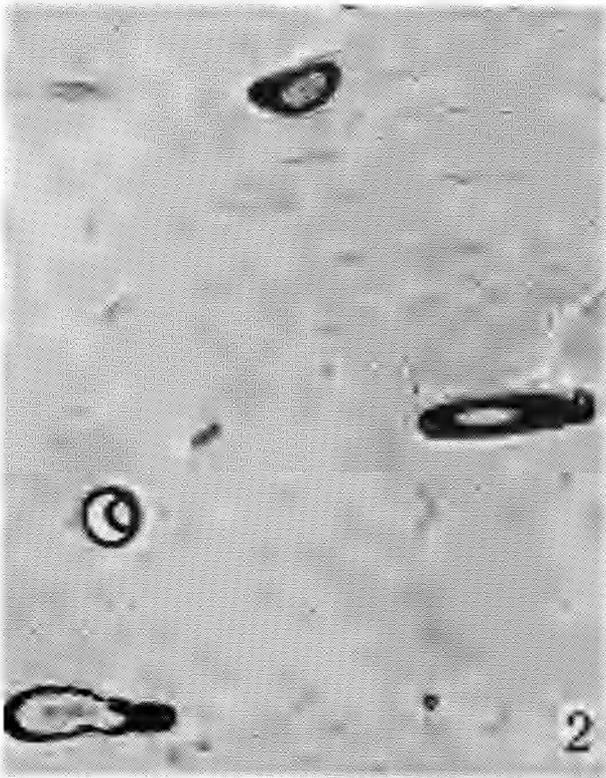
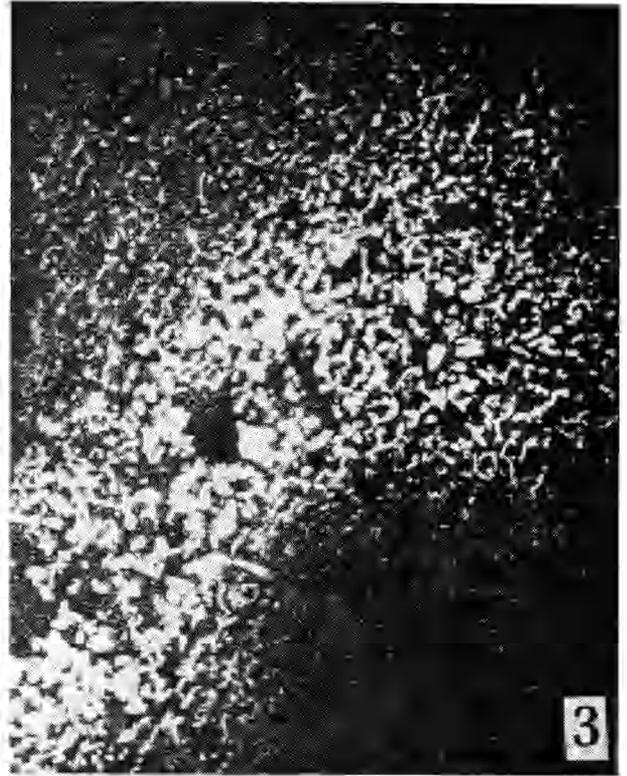
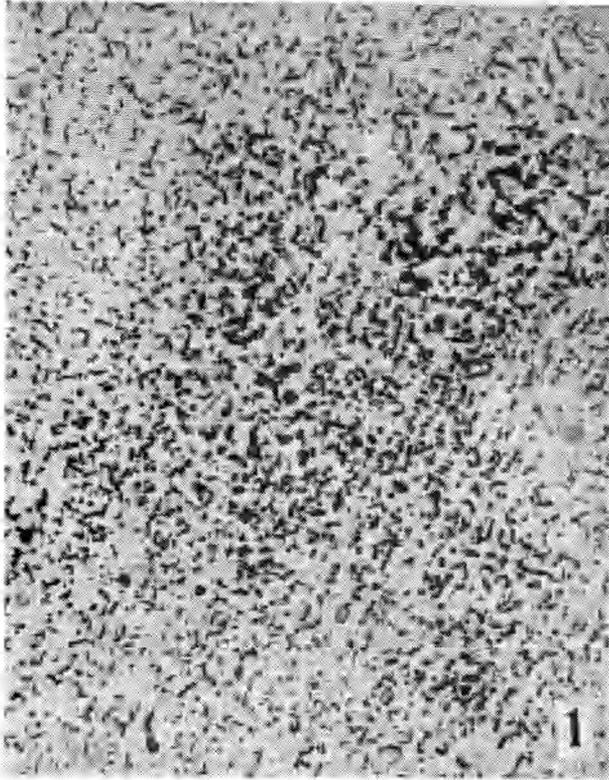


Grafico 2. - Schema riassuntivo della composizione dei granuli di PC. L'intensità del puntinato è proporzionale all'intensità della reazione.

Ca⁺⁺ = calcio ionizzabile; Ca/m = calcio mascherato, svelabile con la microradiografia; Fe = ferro; Pr = proteine; SO₃H = mucopolisaccaridi acidi a funzione solforica; H = mucopolisaccaridi acidi a funzione carbossilica, da riportarsi ad acido ialuronico; S = idem da riportarsi ad acido ialico; N = mucopolisaccaridi neutri.

1 = granuli a struttura lamellare, liberi nel tessuto nervoso; 2 a e 2 b = piccoli granuli della parete dei capillari; 3 = grosse calcificazioni macroscopiche.

mente vanno incontro ad una esterificazione *in loco*, come ammesso da molti Autori per i *mps* delle ghiandole intestinali. Il calcio successivamente si deposita come calcio mascherato, non abbiamo ancora acclarato se in preciso rapporto con i *mps* solforati, e da ultimo è dimostrabile con le reazioni istochimiche che evidenziano il calcio allo stato ionizzabile; assieme al calcio è presente anche il ferro; le reazioni del ferro sono intensamente positive nelle lesioni iniziali, si fanno più deboli nelle concrezioni grossolane; è difficile dire se il ferro sia realmente esistente oppure si tratti di una siderofilia locale.



Nel grafico 2 abbiamo riassunto la composizione dei diversi granuli e la relativa concentrazione delle varie sostanze nelle zone centrali e periferiche, quale finora ci risulta dalle indagini topochimiche fin qui eseguite.

Da queste prime ricerche risulta avvalorata la teoria che vuole substrato della calcificazione i mucopolisaccaridi; dalle indagini finora condotte non risulta ancora con esattezza il rapporto fra *mps* esteri solforici e precipitazione di calcio, ma dalle ricerche che stiamo tuttora conducendo su questa malattia ci sembra di poter trarre a questo proposito dati molto interessanti.

I risultati di queste ricerche contribuiranno poi forse ad un chiarimento dei rapporti fra ipo-paratiroidismo e calcificazioni cerebrali, nonché alcuni caratteri oscuri della malattia, quali ad esempio l'ipertensione endocranica conseguente ad edema della sostanza nervosa che si osserva in alcuni di questi pazienti, ed in particolare in uno dei nostri casi.

È noto, infatti, che l'ormone paratiroideo agisce sul metabolismo dei mucopolisaccaridi [7], sostanze queste che entrano nella costituzione dei capillari cerebrali, prendendo forse parte alla formazione della barriera ematoencefalica [8].

BIBLIOGRAFIA.

- [1] G. PALLADINI, « Riv. Istoch. Norm. Pat. », 1964 (in corso di stampa).
- [2] F. ERBSLOH-N. BOCHNIK, in *Handbuch der speziellen pathologischen Anatomie und Histologie*, vol. 13, 2/b, p. 1769. Springer, Berlin 1958
- [3] D. BRONSKY, D. S. KUSHNER, A. DUBIN, I. SNAPPER, « Medicine », 37, 317 (1958).
- [4] M. VIALLI, « Arch. Zool. », 40, 399 (1955).
- [5] G. PALLADINI, L. ALFEI, Riv. Istoch. 1964 (in corso di stampa).
- [6] J. E. FRENCH, P. BENDITT, « J. Histochem. Cytochem. », 1, 321 (1953).
- [7] M. B. ENGEL, « Arch. Path. », 53, 339 (1952).
- [8] A. MAYER, in *Greenfield's Neuropathology*, pp. 236-237, Arnold - London 1963.

SPIEGAZIONE DELLA TAVOLA I

- Fig. 1. - Depositi di calcio e PC in corrispondenza dei capillari nel nucleo laterale del talamo. Osservare in alcuni punti il formarsi di masserelle calcaree. Nissl $\times 28$.
- Fig. 2. - Calcificazione di piccole arterie nella sostanza bianca del cervelletto, von Kossa $\times 40$.
- Fig. 3. - Sezione contigua alla fig. 1. Istoradiografia 20 KV 5 mA. Osservare come non solo le concrezioni più grossolane, ma anche la rete dei capillari è opaca ai raggi. $\times 28$.
- Fig. 4. - Sezione contigua alla precedente, colorata con il metodo von Kossa per il Calcio. Notare che solo le masserelle più grossolane danno una reazione positiva. $\times 28$.