

---

ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI  
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

# RENDICONTI

---

GUIDO PALLADINI, LUISA APPICCIUTOLI, AMICO  
BIGNAMI

## Studio istochimico di calcificazioni cerebrali, Nota II

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,  
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 37 (1964), n.1-2, p.  
104-107.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<[http://www.bdim.eu/item?id=RLINA\\_1964\\_8\\_37\\_1-2\\_104\\_0](http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1964_8_37_1-2_104_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 di calcificazioni cerebrali*<sup>(\*)</sup>.  
Nota II<sup>(\*\*)</sup> di GUIDO PALLADINI, LUISA APPICCIUTOLI e AMICO  
BIGNAMI, presentata dal Corrisp. A. STEFANELLI.

In una Nota precedente [1] abbiamo sottolineato il valore che i dati istochimici deducibili dallo studio delle calcificazioni tissutali abnormi, hanno ai fini della precisazione del ruolo svolto nel fenomeno di precipitazione calcarea dalle varie sostanze chimiche che si riscontrano nella fase organica del sistema (Eisenstein e coll. 1960) [2].

Puntualizzammo altresì il vantaggio che si ha in questo campo dalla osservazione dei fenomeni patologici in confronto alla osservazione di quelli fisiologici; infatti, mentre nei tessuti fisiologicamente destinati alla calcificazione risultano assai malagevoli e spesso tutt'affatto impossibili i confronti istochimici con lo stesso tessuto non in fase di precipitazione calcica, questi risultano assai facili e perspicui nelle calcificazioni patologiche, in quanto si possono prendere a riferimento le zone circostanti del medesimo tessuto rimasto indenne. Tale confronto risulta ancor più agevole nel caso del tessuto nervoso in cui la composizione chimica e l'assoluta incapacità alla calcificazione in condizioni normali si prestano particolarmente bene allo studio. Nel corso delle ricerche sul meccanismo della calcificazione, dopo aver riferito nella Nota precedente [1] i risultati preliminari di una indagine istochimica condotta sulle calcificazioni cerebrali nella cosiddetta malattia di Fahr, prendiamo in esame nella presente un tipo diverso di calcificazione cerebrale, la calcificazione distrofica, quale si osserva nei tessuti necrotici.

Riteniamo infatti necessario estendere la ricerca al maggior numero possibile di tipi di calcificazione, allo scopo di evidenziare quali siano le sostanze che compaiono costantemente assieme al calcio e che quindi son legate al meccanismo di calcificazione, escludendo quei composti la cui presenza è legata specificatamente alla noxa patologica e che quindi hanno, al contrario, un loro notevole valore anatomo-patologico, ma non biologico generale.

Abbiamo esaminato tre cervelli, due con malattia citomegalica ed uno con toxoplasmosi. Nei casi di malattia citomegalica si trattava di neonati con estese calcificazioni dei tessuti periventricolari, come è caratteristico di questa malattia; nel caso di toxoplasmosi, di una bambina di due mesi con deposizioni calcaree a focolai disseminati nella corteccia cerebrale e nei gangli della base.

*Morfologia.* — Il materiale calcifico si presenta sostanzialmente monomorfo, in quanto appare costituito da una sostanza finemente granulare in cui possono distinguersi conglò-

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

(\*\*) Pervenuta all'Accademia il 17 luglio 1964.

merati alquanto più grossi. Questi sono più evidenti nella toxoplasmosi che nella malattia citomegalica.

*Fase inorganica - Calcio.* - Il materiale dà tutto e indistintamente la reazione di von Kossa in maniera intensa; debole ed indistinta la reazione alla purpurina di Grandis-Mainini nel materiale granuloso, intensa la colorazione delle masse di maggiori dimensioni.

*Ferro.* - Nella malattia citomegalica il materiale dà sempre positiva la reazione del blu di Prussia; in corrispondenza delle granulazioni maggiori tale positività è ben accentuata.

Nella toxoplasmosi il materiale, ripetutamente saggiato, non dà la reazione del blu di Prussia; pertanto in questo caso il ferro risulta assente.

*Fase organica - Mucopolisaccaridi.* - L'applicazione del reattivo di Schiff senza pre-trattamento non rivela aldeidi libere. Dopo ossidazione con acido periodico (paS) tutto il materiale dà una netta reazione positiva (mucopolisaccaridi in genere). La colorazione dei mucopolisaccaridi acidi con Alcian blau o green a pH 2,4 è positiva in tutto il materiale calcifico; in corrispondenza delle masse di maggiori dimensioni tale positività è accentuata.

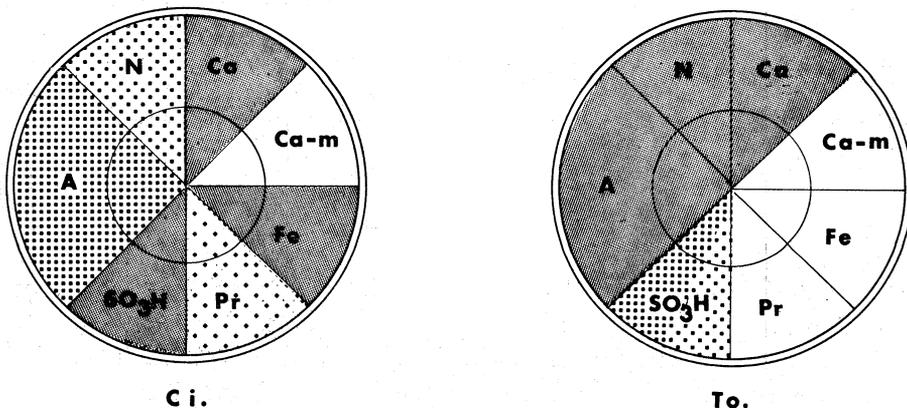


Fig. 1. - Schema riassuntivo della composizione dei granuli calcificati.

L'intensità del puntinato è proporzionale alla intensità della reazione. Ca = calcio ionizzabile; Ca-m = calcio mascherato; Fe = ferro; Pr = proteine; SO<sub>3</sub>H = mucopolisaccaridi acidi solforati; A = id a funzione carbossilica; N = id neutri; Ci = malattia citomegalica; To = toxoplasmosi cerebrale. (Cfr. con tavola analoga nella nota precedente).

La colorazione Alcian/paS rivela il materiale in un tono decisamente spostato verso il blu, il che indica una decisa prevalenza dei mucopolisaccaridi acidi sui neutri. Le concrezioni più grosse si colorano in un tono più rossastro.

Diverse colorazioni differenziali per i mucopolisaccaridi acidi carbossilici e solforici hanno concordemente dimostrato la presenza di entrambi questi composti; la colorazione alcian giallo (pH 2,4) alcian blu (pH 0,54) sec. Ravetto [3] mostra una colorazione verde nel materiale finemente granuloso e bluastro nelle masse di maggiori dimensioni (mucopolisaccaridi carbossilici = giallo; mucopolisaccaridi solforati = blu); la tecnica di Bracco-Curti è positiva per tutto il materiale, con accentuazione per le masserelle più grosse (mucopolisaccaridi solforati). Del tutto sovrapponibili, ma con colorazione più debole, i risultati della tecnica sec. Geyer (mucopolisaccaridi solforati). Eseguendo la metilazione secondo la tecnica di Fischer e Lillie per 2 h 1/2, la colorabilità Alcian blu del materiale scompare totalmente e si ripristina solo parzialmente per saponificazione, soprattutto nelle concrezioni più grosse; in queste condizioni, come noto, si ricolorano i soli mucopolisaccaridi carbossilici.

La digestione con ialuronidasi testicolare (SIGMA 360 USP/mg 14 h 37°, 2 mg/ml in sol. fisiologica) seguita da colorazione Alcian blu mostra nella malattia citomegalica una diminuzione di colorabilità di grado lieve mentre la ialuronidasi batterica (Hyason Organon = 1 fiala in 10 ml, 37°, 14 h) sembra quasi inefficace. Nella toxoplasmosi la digestione con ialuronidasi testicolare digerisce totalmente il materiale finemente granuloso, mentre le masse

di maggiori dimensioni restano ancora visibili, seppure assai pallide. L'azione della ialuronidasi batterica è minima.

Come noto, mentre la ialuronidasi testicolare digerisce i condroitinsolfati A e C e l'acido ialuronico, la ialuronidasi batterica digerisce solo quest'ultimo.

Il metodo di colorazione aldeide/fucsina sec. Gabe, con le modalità indicate dall'autore per le fibre elastiche è negativo.

La metacromasia eseguita sec. la tecnica del Lison su fette non sparaffinate ha dato risultati poco chiari, che non sono migliorati dopo trattamento con pepsina (2 mg/ml in HCl 0,02 N — 2 h, 37°): una debole metacromasia beta visibile a fresco, scompare del tutto durante l'allestimento del preparato. La basofilia del materiale con il blu di toluidina è massima a pH 7,3, modesta a pH 3,5, minima a pH 2,6.

*Proteine.* - La reazione xantoproteica risulta positiva. Debole, ma evidente, con una accentuazione della positività nelle concrezioni maggiori, la reazione della ninidrina/Schiff. Dubbie le reazioni del biureto e Millon solforico. La reazione del coupled tetrazonium (Pearse) è risultata positiva nella malattia citomegalica, negativa nella toxoplasmosi.

*Lipidi.* - La colorazione combinata Alcian blu/Sudan III colora il materiale finemente granulare in blu, mentre le concrezioni maggiori presentano una sudanofilia centrale.

Il Methasol fast blu (fosfolipidi e fibre elastiche) colora solo le concrezioni più grosse. Negativa la reazione ps. plasmale con e senza ossidazione in bicloruro di mercurio.

#### CONCLUSIONI.

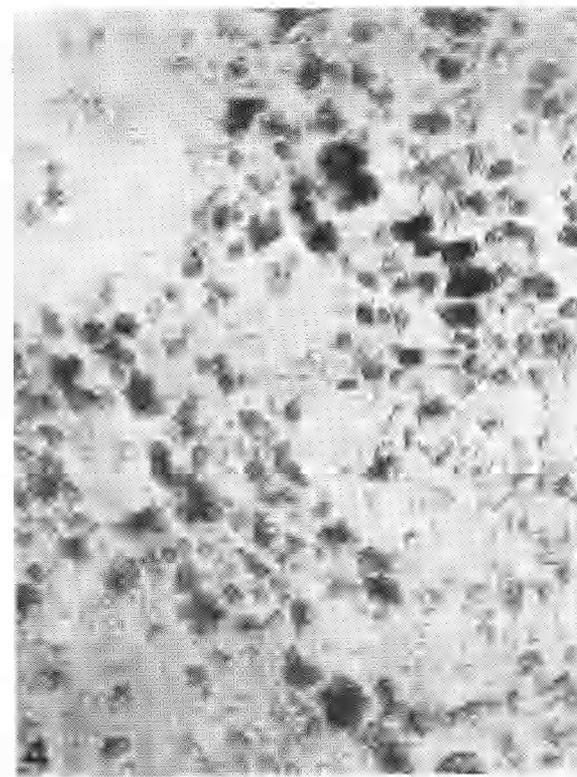
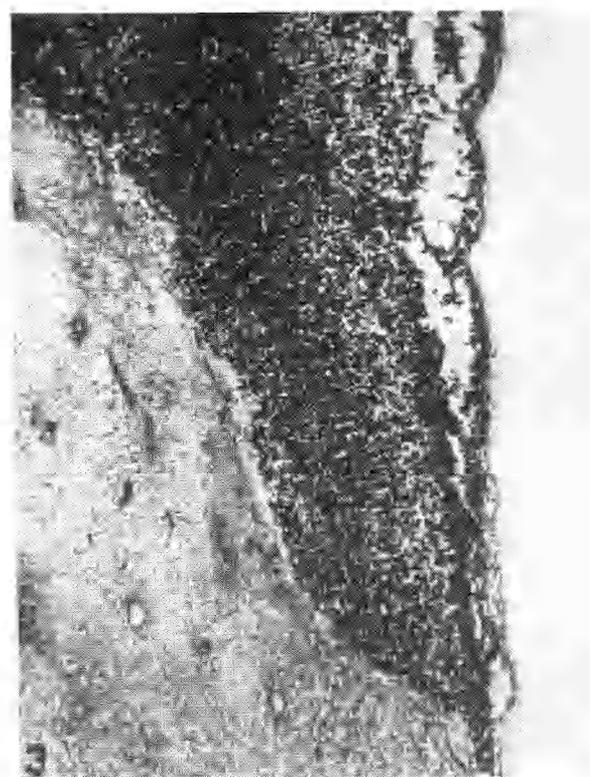
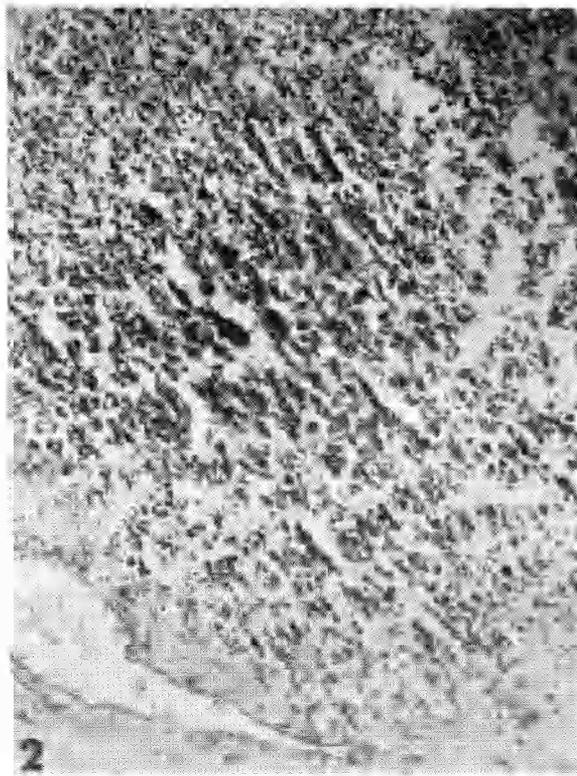
Il materiale in esame si presenta completamente calcificato; non esiste nulla di analogo allo ps. calcio (calcio mascherato).

Nella malattia citomegalica la reazione del ferro è positiva in corrispondenza delle deposizioni calcaree, mentre nella toxoplasmosi contrariamente alle calcificazioni precedentemente osservate, il materiale è privo di ferro. La fase organica consta di una miscela di mucopolisaccaridi neutri ed acidi: mucopolisaccaridi acidi carbossilici (ac. ialuronico) e acidi solforati (condroitinsolfati).

Nella malattia citomegalica il gruppo dei mucopolisaccaridi del tipo estere solforico appare più abbondante di quello dei mucopolisaccaridi a funzione carbossilica; nella toxoplasmosi i mucopolisaccaridi carbossilici sono più abbondanti nel materiale finemente granuloso, i neutri e solforati nelle masse di maggiori dimensioni.

#### BIBLIOGRAFIA.

- [1] G. PALLADINI-A. BIGNAMI, « Rend. Acc. Naz. Lincei », (*in corso di stampa*) (1964).
- [2] R. EISENSTEIN, R. E. TRUHEART, G. M. HASS, in *Calcification in biological Systems*; AAAS Washington 1960.
- [3] C. RAVETTO, « J. Hist. Cytoch. », 12, 44 (1964).





## SPIEGAZIONE DELLA TAVOLA I

- Fig. 1. - *M. citomegalica*. Estese calcificazioni attorno al corno frontale del ventricolo laterale. *Metodo von Kossa per il calcio*  $\times 40$ .
- Fig. 2. - *M. citomegalica*. Deposizioni calcaree. *paS.*  $\times 150$ .
- Fig. 3. - *Toxoplasmosi cerebrale*. Focolaio calcifico nella parete del terzo ventricolo. *Metodo von Kossa per il Calcio.*  $\times 80$ .
- Fig. 4. - *Toxoplasmosi cerebrale*. Deposizioni calcaree. *Metodo di Bracco-Curti per i mucopolisaccaridi solforati.*  $\times 150$ .

A. ROSSI-FANELLI e B. SEGRE