

Articoli/Articles

LA REAZIONE NERA: UNA BIOTECNOLOGIA
“COGNITIVA” ANTE LITTERAM

MATTIA QUATTROCELLI¹, PAOLO MAZZARELLO²

¹ Laboratorio di Colture Cellulari, Dip. di Medicina Sperimentale,
Università di Pavia, I

² Dipartimento di Medicina Sperimentale e Sistema Museale d'Ateneo,
Università di Pavia, I

SUMMARY

*THE BLACK REACTION: AN ANTE LITTERAM “COGNITIVE”
BIOTECHNOLOGY*

The black reaction, also known nowadays as “Golgi staining” or “Golgi impregnation”, paved the way to the development of modern neuroscience at the end of XIX century. By this staining, the silhouette of the nerve cell appears in all its morphological complexity with all its ramifications, which could be followed and analyzed even at a great distance from the cell body. However the reaction has been fundamental for discoveries in several other areas of biomedical research: cytology, myology, bacteriology. With the aid of the black reaction, for example, it was possible to observe: the Golgi apparatus, the T system related to the function of the sarcoplasmic reticulum, the Müller-Golgi canaliculi of the peptic glands and many more; this wide and various success is due to its character of morphological amplification of fine structures. In spite of its still controversial biochemical nature, the black reaction has been an unavoidable versatile tool in different areas of biology, so we propose to consider this method as an ante litteram “cognitive” biotechnology.

*La reazione nera: le architetture meravigliose dell'encefalo
La reazione nera, o reazione cromoargentina di Golgi, venne*

Key words: Black reaction - Golgi apparatus - Sarcoplasmic reticulum –
Biotechnology

realizzata, probabilmente tra il 1872 e il 1873, in un luogo periferico rispetto ai grandi centri della ricerca scientifica italiana, il Pio Luogo degli Incurabili di Abbiategrasso, un ospizio per malati cronici. In un laboratorio rudimentale improvvisato nella cucina della sua abitazione privata, un giovane medico ancora poco conosciuto, Camillo Golgi, riuscì ad osservare per la prima volta la struttura fine dell'architettura del tessuto nervoso centrale. Resosi immediatamente conto della grande importanza di quanto andava scoprendo, il 16 febbraio 1873 scriveva all'amico oculista Nicolò Manfredi che lavorava a Pavia:

Sono felice d'aver trovato una nuova reazione per dimostrare anche agli orbi le strutture dello stroma interstiziale della corteccia cerebrale. Faccio agire il nitrato d'argento sui pezzi di cervello induriti in bicromato di potassio. Ho già ottenuto risultati assai belli e spero di ottenere di più¹.

Queste poche parole di Golgi sintetizzano le tappe fondamentali della realizzazione di questa tecnica istologica. Alla prima fase di indurimento-fissazione del tessuto nervoso in bicromato di potassio per un periodo di durata variabile (da uno a 45 giorni e talvolta anche di più), faceva seguito una seconda fase di immersione in una soluzione di nitrato d'argento; il risultato che si otteneva era la formazione di un sale, il cromato d'argento, che impregnava in nero le singole cellule nervose con tutti i loro prolungamenti che risaltavano nettamente su sfondo giallo.

Negli anni seguenti la reazione venne perfezionata diventando successivamente il principale strumento per descrivere a fondo la fine architettura del sistema nervoso, facendo assumere alla neurocitologia, alla neuroistologia e alla neuroanatomia la loro fisionomia moderna.

In campo neurocitologico la reazione nera permise, tra l'altro, di dimostrare la costante presenza degli assoni nelle cellule nervose, la loro ramificazione, la terminazione libera dei dendriti; sulla base dell'andamento del prolungamento nervoso Golgi introdusse una classificazione delle cellule nervose (distinte in cellule ad "assone lungo" e ad "assone breve") che conserva ancora oggi una rilevante importanza neuroistologica. La reazione nera è poi risultata uno

strumento potente nello studio della morfologia neurogliale² e nel 1898, ha permesso di descrivere una struttura rimasta pressoché ignorata fino a trent'anni fa, la *rete pericellulare nervosa*: si tratta di un rivestimento reticolare finissimo che copre alcuni neuroni; negli ultimi anni, questa struttura, ribattezzata *rete perineurale*, o *matrice extracellulare*³ ha attratto di nuovo l'attenzione di molti studiosi poiché sembra possedere funzioni complesse nella segnalazione intercellulare o nelle attività nutritive, oltre forse ad un ruolo neuroprotettivo.

La reazione nera rese possibile un grande sviluppo della neuroanatomia a partire dagli studi di Golgi che scoprì e disegnò minuziosamente vari tipi di configurazioni nervose, fornendo una rappresentazione del tutto nuova delle varie parti dell'encefalo, per esempio della circonvoluzione dell'ippocampo, del cervelletto (in cui caratterizzò le cellule di Purkinje con tutta la loro complessa arborizzazione dendritica e scoprendo le cosiddette “cellule di Golgi”) e della regione olfattoria centrale.

Inoltre, poiché Golgi era prima di tutto medico, la reazione nera divenne subito anche uno strumento di indagine anatomico-clinica: proprio ad Abbiategrasso, nel 1874, lo studioso effettuerà il primo studio neuroistopatologico su un caso di corea (probabilmente corea di Huntington). Golgi, infatti, osservò in questa affezione la gliosi reattiva (“*un aumento numerico e la insolita robustezza delle cellule connettive*”) e il depauperamento neuronale nei corpi striati, segni neuropatologici distintivi di questa patologia⁴. In questo studio, forse per la prima volta, il quadro clinico di una malattia neurodegenerativa veniva correlato a un'alterazione neuroanatomica e neuroistologica perfettamente individuata all'esame microscopico.

Secondo una metafora molto efficace, la reazione cromoargentea permise di cogliere i singoli alberi all'interno di una foresta intricata⁵; l'affascinante complessità frattale delle strutture nervose si scomponneva dunque in tante parti costitutive elementari. Il volume di Golgi *Sulla fina anatomia degli organi centrali del sistema nervoso* (pubblicato nel 1885 e ristampato l'anno seguente), *summa* delle sue osservazioni al microscopio effettuate utilizzando la rea-

zione nera sul tessuto nervoso centrale, divenne presto una guida insostituibile allo studio strutturale del sistema nervoso centrale.

La reazione nera come biotecnologia “ante litteram”

Applicazione di tecnologie avanzate ai processi biologici: questa era una definizione molto semplice di *biotecnologia* apparsa nel 1979, ancora oggi valida anche alla luce degli sviluppi più recenti di questo ramo della scienza⁶.

Se volessimo riassumere sommariamente le caratteristiche basilari comuni delle biotecnologie, dovremmo prendere in considerazione tre punti: 1) l'integrazione di una tecnologia con un substrato biologico; 2) il vasto campo di applicazioni; 3) l'interesse per la produzione di beni industriali/biomedici o di conoscenza.

Considerando la reazione nera da questa prospettiva, essa sembra proprio assumere i connotati di una biotecnologia *ante litteram*, perché fedele a questi tre requisiti.

Un ampio ventaglio di scoperte e applicazioni

Al di fuori delle applicazioni in campo neurocitologico, neuroistologico e neuroanatomico, la reazione nera, nelle mani di Golgi e di molti altri studiosi, per quasi un secolo⁷, ha permesso la realizzazione di scoperte e osservazioni fondamentali in settori molto diversi, dalla biologia cellulare alla miologia fino alla microbiologia.

Nell'ambito della citologia generale, la reazione nera, con alcune modifiche, ha permesso a Golgi di scoprire nel 1897-98, l'*apparato reticolare interno*, l'organulo che oggi chiamiamo appunto *apparato di Golgi*, o più semplicemente, come si scrive nella letteratura anglosassone, “*the Golgi*”⁸. Per molti anni considerato frequentemente un artefatto dovuto all'aleatorietà dei procedimenti istologici cromoargentici, soltanto negli anni cinquanta-sessanta del secolo scorso, con le osservazioni al microscopio elettronico, è stato definitivamente sancito come organulo eucariotico cellulare individualizzato. Attualmente, dopo più di un secolo dalla sua scoperta, la ricerca sull'apparato di Golgi è passata dalla microscopia ottica alle più aggiornate tecniche di indagine funzionale e molecolare e i bio-

logi cellulari sono ora sulla soglia di risultati che lasciano prefigurare l'affascinante rete di traffici e modificazioni proteiche e di segnale nell'insieme dei complessi compartimenti in cui si organizza questo organulo intracitoplasmatico.

Ma la reazione nera si è dimostrata uno strumento potente di indagine polivalente anche in campo miologico. Nel 1902, Emilio Veratti, allievo di Golgi, riprendendo gli studi iniziati da Santiago Ramón y Cajal e da Romeo Fusari, individuò e descrisse minuziosamente un sistema reticolare regolare della fibra muscolare (poi indicato come *sistema di tubuli T*), distinguendolo dall'apparato reticolare interno⁹. Questa struttura soltanto più di cinquant'anni dopo verrà riscoperta e messa in relazione alla funzione del *reticolo sarcoplasmatico*, la struttura che dirige i processi di liberazione del calcio nella fibra muscolare e che costituisce uno degli elementi essenziali nella sequenza dei processi fisiologici che portano alla contrazione muscolare.

Altri organi svelarono, grazie alla reazione nera, formazioni prima sconosciute: nello stomaco, si identificarono i *canalicoli di Müller-Golgi*, ovvero i dotti di secrezione dell'acido cloridrico da parte delle cellule parietali¹⁰; più tardi e a più riprese, con colorazioni che sono state considerate derivate dal metodo di Golgi, risultarono positivi anche componenti del *sistema neuroendocrino diffuso*¹¹. La reazione cromoargentea è stata poi applicata allo studio di diversi altri organi e tessuti, come il fegato, le ghiandole salivari e il pancreas. Per esempio essa evidenzia bene i fini rapporti d'origine dei dotti escretori di alcune ghiandole esocrine e può essere impiegata per dimostrare le fibre elastiche del connettivo.

Metodi di impregnazione argentea ispirati dalla reazione nera sono stati importanti anche in campo microbiologico. Ricordiamo ad esempio il *silver plating* di Fontana (oggi semplificato come metodo di Rhodes), colorazione molto usata per l'osservazione dei flagelli batterici, altrimenti difficilmente dimostrabili¹².

Infine, come già precedentemente ricordato, la reazione nera è stata utilizzata agli albori della microscopia elettronica, confermando la realtà delle strutture precedentemente già individuate e ren-

dendo possibili nuove indagini neurobiologiche, come ad esempio lo studio quantitativo delle arborizzazioni dendritiche neuronali¹³.

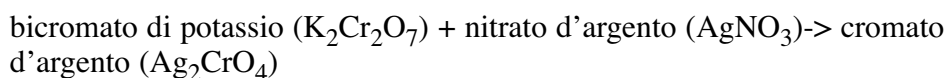
Il successo della reazione cromoargentrica in così tanti e disparati campi dell'indagine biologica è ascrivibile al suo carattere di *amplificazione morfologica*: grazie alla deposizione di un fine precipitato di cromato d'argento, le strutture più fini e indistinguibili al microscopio ottico con le normali colorazioni si stagliano nettamente su sfondo giallo o ambrato e lasciano cogliere particolari tridimensionali, dato che le sezioni utilizzate sono di solito abbastanza spesse (circa 150 nm).

Una reazione intimamente legata al substrato biologico

Proprio la natura e le modalità di deposizione del precipitato ci introducono nell'ambito più discusso e incerto della reazione nera: la sua natura chimico-biologica. Soltanto nel 1971 studi di diffrazione ai raggi X hanno iniziato a chiarire l'identità chimica del fine precipitato bruno: si tratterebbe di cromato d'argento (Ag_2CrO_4)¹⁴.

Precedentemente il dibattito sulla composizione del precipitato era rimasto sempre aperto: dagli "ossiduli" di argento (e mercurio quando si consideri la variante al bicloruro di mercurio del metodo¹⁵) al bicromato d'argento (in uno stato cristallino diverso dal normale, che appare rossastro), dall'argento metallico alle prime supposizioni sul cromato¹⁶. L'identificazione di questo sale d'argento avrebbe chiuso questo dibattito, aprendone però un altro più generale.

Teoricamente, infatti, la formazione del cromato potrebbe essere descritta secondo questa formulazione:



Infatti le sezioni di tessuto venivano prima indurite in bicromato di potassio per un tempo assai variabile (da 1 a 45 giorni o più), e poi colorate in nitrato d'argento per alcune ore. Tuttavia, una reazione del genere non è stechiometricamente corretta e bilanciabile,

il che lasciava supporre l'esistenza di dinamiche ossidoriduttive complesse. Questi sospetti si sono ripresentati nel 1994, quando è stata dimostrata la necessità dell'ossidoriduzione del cromo (Cr^{VI} - Cr^{III}) per il corretto funzionamento della reazione stessa. Questi flussi elettronici non sono direttamente derivabili dallo schema teorico della reazione, eppure sembrerebbero basilari e introdurrebbero allora un'altra ipotesi: almeno una parte della colorazione, per esempio su tessuto nervoso, è forse dovuta a ponti di proteine neuronali mediati proprio dal Cr^{III} ¹⁷.

Inoltre, occorre ricordare che il segreto della reazione nera risiede nel suo carattere "capriccioso" e nel contempo *selettivo*: soltanto dall'1 al 5 % dei neuroni risponde positivamente al procedimento. Non si conosce ancora la ragione di questo comportamento che esprime una probabile relazione con lo stato di attivazione neuronale o cellulare e ha reso possibile la precisa decifrazione delle architetture encefalo-midollari.

Dal quadro incerto emerso da queste osservazioni, sembra delinearsi con chiarezza una visione abbastanza condivisa, anche se non ancora rigorosamente dimostrata: la reazione nera non è semplicemente una colorazione chimica, ma una reazione complessa che si interfaccia a fondo con l'intima natura biologica del tessuto indagato. La deposizione assai selettiva del cromato d'argento e l'ipotetica formazione di ponti proteici sarebbero, molto probabilmente, legati ai micropotenziali ossidoriduttivi e ai flussi elettronici locali, oppure ai gradienti elettrochimici, presenti in stati biochimici cellulari non ancora caratterizzati.

In questo senso la reazione nera diventa uno strumento legato a doppio filo con il mondo biologico, dunque non soltanto una colorazione istologica, ma una vera e propria biotecnologia. Non si tratta certamente di una tecnologia nel senso contemporaneo ed industriale del termine, bensì, più semplicemente, di un metodo riproducibile in un'ampia gamma di situazioni biologiche.

Una biotecnologia "cognitiva"

Un mezzo in grado di produrre conoscenza è stato definito, dal

punto di vista epistemologico, uno *strumento cognitivo*. “Cognitivo” può essere considerato, ad esempio, sia un libro, sia una lavagna su cui dimostrare un teorema, sia la figura disegnata sulla lavagna attraverso la quale interpretiamo il significato geometrico del teorema stesso, sia un concetto teorico in grado, magari, di aiutarci nella dimostrazione e, dunque, nella comprensione¹⁸.

Un aspetto importante della reazione nera è il suo carattere strumentale polivalente: in molti dei campi in cui è stata applicata ha permesso la realizzazione di scoperte miliari, quando non ha addirittura aperto interi nuovi campi di ricerca (basti pensare all’apparato di Golgi o alla moderna neuroanatomia microscopica). Un metodo dunque versatile tanto da essere sfruttato, con successo, in contesti di ricerca anche tematicamente molto distanti tra loro. Paradossalmente la stessa *teoria del neurone* venne sviluppata dallo spagnolo Santiago Ramón y Cajal, in opposizione alle idee stesse di Camillo Golgi, grazie ai risultati applicativi ottenuti mediante un impiego magistrale della reazione nera.

Questo metodo è dunque stato, storicamente, uno strumento imprescindibile *di conoscenza*, che ha aperto la strada all’esplorazione di nuovi campi del dominio biologico, talvolta precorrendo i tempi. La reazione cromoargentina, inoltre, è ancora un ambito aperto di studio e le ricerche volte a chiarirne i caratteri più intimamente chimico-biologici potrebbero suggerirci prospettive nuove nell’ambito della biologia e della fisiologia cellulare. Dunque, prendendo in considerazione un significato meno usuale, sul piano storico, del termine “biotecnologia”, la reazione nera si configura come una vera e propria *biotecnologia “cognitiva”*.

Le biotecnologie, infatti, possono servire a produrre beni industriali, farmaceutici, biomedici, sanitari, ma anche, poiché si basano comunque su uno stretto rapporto con la ricerca teoretica, beni intellettuali e scientifici, ovvero *conoscenza*. Con la dilatazione dello sfruttamento industriale ed economico di queste nuove frontiere del sapere, si è offuscata questa seconda ottica, altrettanto importante quanto la prima. Il centenario del Nobel a Golgi è stata un’occasione importante per rivalutare la reazione nera, in una prospettiva sto-

La reazione nera

rico-critica più matura, come esempio significativo di biotecnologia *ante litteram* e, in particolare, *cognitiva*.

BIBLIOGRAPHY AND NOTES

1. MAZZARELLO P., *Il Nobel dimenticato*. Torino, Bollati Boringhieri, 2006, p.107.
2. BENTIVOGLIO M., MAZZARELLO P., *The history of radial glia*. Brain Res. Bull. 1999; 49: 305-315.
3. CELIO M. E., *Evolution of the concept of "extracellular matrix" in the brain*. J. Hist. Neurosci. 1999; 8: 186-190; VITELLARO-ZUCCARELLO L., DE BIASI S., SPREAFICO R., *One hundred years of Golgi's "perineuronal net": history of a denied structure*. Ital. J. Neurol. Sci. 1998; 19:249-253.
4. GOLGI C., *Sulle alterazioni degli organi centrali nervosi in un caso di corea gesticolatoria associata ad alienazione mentale*. Rivista Clinica 1874 (serie 2, anno 4): 361-377. MAZZARELLO P., *Il Nobel dimenticato*, op. cit. nota 1, pp.141-145.
5. MAZZARELLO P., *Il Nobel dimenticato*, op. cit. nota 1, p.112.
6. Cfr. ad esempio la voce relativa in: SABATINI F., COLETTI V., *Dizionario della lingua italiana*. Milano, Rizzoli Larousse, 2003.
7. PANNESE E., *The Black Reaction*. Brain Res. Bull. 1996; 41:343-349.
8. GOLGI C., *Intorno alla struttura delle cellule nervose*. Bollettino della Società Medico-Chirurgica di Pavia, 1898; anno 13 (n°1): 3-16; cfr. MAZZARELLO P., BENTIVOGLIO M., *The centenarian Golgi apparatus*. Nature 1998; 392: 543-544; BENTIVOGLIO M., MAZZARELLO P., *The pathway to the cell and its organelles: one hundred years of the Golgi apparatus*. Endeavour 1999; 22: 101-105; DRÖSCHER A. *L'apparato di Golgi nella ricerca italiana*. In: *Golgi e Bizzozero nel centenario della scoperta dell'apparato reticolare interno*. Torino, Accademia di Medicina di Torino, 1999, pp.74-82.
9. VERATTI E., *Sulla fine struttura della fibra muscolare striata*. Rendiconti del R. Istituto Lombardo di Scienze e Lettere 1902 (serie 2); 35: 279-283; ID., *Ricerche sulla fine struttura della fibra muscolare striata*. Memorie dell'Istituto Lombardo Classe di Scienze Matematiche e Naturali 1902; 19: 87-133; ID., *Investigations on the fine structure of the striated muscle fiber*. Journal of Biophys. Biochem. Cytology 1961; 10 (4 suppl): 3-59. Cfr. MAZZARELLO P., *Emilio Veratti and the first applications of the «black reaction» to muscle research: a historical account*. Atti della Accademia Nazionale dei Lincei, Rendiconti Scienze Fisiche e Naturali, 2002 (s.9); 13: 273-288; MAZZARELLO P., CALLIGARO A., VANNINI V., MUSCATELLO U. *The sarcoplasmic reticulum: its discovery and rediscovery*.

- Nature Rev. Mol. Cell Biol. 2003; 4: 69-74.
10. GOLGI C., *Sulla fina organizzazione delle ghiandole peptiche dei mammiferi*. Gazzetta Medica di Pavia 1893; 2: 241-247. Bollettino della Società Medico-Chirurgica di Pavia 1893; 8: 16-21. ID., *Sur la fine organisation des glandes peptiques des mammifères*. Archives Italiennes de Biologie 1893; 19: 448-453.
 11. SOLCIA E., *Presentazione*. In: MAZZARELLO P., *La struttura nascosta*. Milano, Istituto Cisalpino-Monduzzi, 1996, pp.XI-XII.
 12. BURROWS W., *Textbook of microbiology 17th ed.* Philadelphia, Saunders Co., 1959, pp. 21-22; WEST M., BURDASH N. M., FREIMUTH F., *Simplified Silver-Plating Stain for Flagella*. J Clin Microb 1977, 6:414-419.
 13. FAIRÉN A., *Pioneering a golden age of cerebral microcircuits: the births of the combined Golgi-electron microscope methods*. Neuroscience 2005, 136:607-614.
 14. FREGERSLEV S., BLACKSTAD T. W., FREDENS K., HOLM M. J., *Golgi potassium-dichromate silver-nitrate impregnation. Nature of the precipitate studied by-ray powder diffraction methods*. Histochemie 1971; 25:63-71; CHAN-PALAY V., *A brief note on the chemical nature of the precipitate within nerve fibers after the rapid Golgi reaction: selected area diffraction in high voltage electron microscopy*. Z. Anat. Entwicklungsgesch 1973; 139:115-117; BLACKSTAD T. W., *Golgi preparations for electron microscopy: controlled reduction of the Silver chromate by ultraviolet illumination*. In: SANTINI M., (Ed.) *Golgi centennial symposium*. Perspectives in neurobiology, New York, Raven Press, 1975, pp. 123-132.
 15. GOLGI, C. *Di una nuova reazione apparentemente nera delle cellule nervose cerebrali ottenuta col bicloruro di mercurio*. Archivio per le Scienze Mediche 1878; 3 (fasc. 2, memoria 11) : 1-7.
 16. MOSCHINI A., *Sul meccanismo chimico della reazione nera di Golgi*. Bollettino della Società medico-chirurgica di Pavia 1927, pp. 143-165.
 17. ANGULO A., MERCHÁN M. J., MOLINA M., *Golgi-Colonnier method: correlation of the degree of chromium reduction and pH change with quality of staining*. J. Histochem Cytochem 1994, 42: 393-403.
 18. Cfr., tra gli altri MAGNANI L., *Conoscenza come dovere*. Pavia, Associated International Academic Publishers, 2005.

Correspondence should be addressed to
Paolo Mazzarello, Museo per la Storia dell'Università di Pavia, Strada Nuova 65 -
27100 Pavia paolo.mazzarello@unipv.it