

LIPOFUSCINOSE CERÓIDE NEURONAL

RELATO DE QUATRO CASOS COM ESTUDO POR HISTOQUÍMICA RETAL, MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE CONJUNTIVA E NECRÓPSIA.

LUIZ FERNANDO BLEGGI TORRES*, ISAC BRUCK**, SÉRGIO ANTONIUK**, LUBOMIRA OLIVA*,
LÚCIA DE NORONHA*, JOSÉ LUIZ PINTO PEREIRA***

RESUMO - Os autores relatam os achados neuropatológicos e clínicos de quatro casos de lipofuscinose ceróide ou doença de Batten. Dois casos foram estudados por necrópsia: o encéfalo mostrou atrofia e neurônios contendo pigmento citoplasmático com características tintoriais de lipofuscina. Um caso foi diagnosticado por estudo histoquímico de biópsia retal, em material congelado em nitrogênio líquido demonstrando-se células ganglionares mioentéricas contendo acúmulo citoplasmático de material granular fosfatase ácida positivo, bem como em grande número de macrófagos do córion. O quarto caso foi diagnosticado por microscopia eletrônica de biópsia de conjuntiva, com identificação de inclusões curvilineas membranáceas e tipo impressão digital.

PALAVRAS-CHAVE: doença de Batten, lipofuscinose, microscopia eletrônica, histoquímica.

Neuronal ceroid lipofuscinosis: report of four cases with study by rectal histochemistry, conjunctival electron microscopy, and autopsy

SUMMARY - The authors present the neuropathological and clinical findings of four cases of ceroid lipofuscinosis or Batten's disease. In two cases the autopsy findings showed brain atrophy and nerve cells packed with cytoplasmic granules compatible with lipofuscin. One case was diagnosed by histochemical techniques in frozen sections of rectal biopsy which showed myoenteric ganglion cells with cytoplasmic acid phosphatase positive material as well as numerous macrophages filled with lipofuscin in the mucosae. The fourth case was diagnosed by electron microscopy of conjunctival biopsy which showed cytoplasmic inclusions of membranous, curvilinear and fingerprint types.

KEY WORDS: Batten's disease, lipofuscinosis, electron microscopy, histochemistry.

A lipofuscinose ceróide neuronal é doença neurodegenerativa de transmissão autossômica recessiva com sintomas variados de involução psicomotora, dificuldade para deambular, disartria e déficit visual. As formas clínicas descritas incluem forma infantil, infantil tardia, juvenil precoce, juvenil e adulta. As alterações neuropatológicas são variadas e caracterizam-se predominantemente pelo acúmulo intraneuronal de substância com características tintoriais de lipofuscina.

São relatadas as observações realizadas em quatro pacientes nos quais o diagnóstico foi confirmado por estudo histoquímico de mucosa retal (n=1), estudo por microscopia eletrônica de biópsia de conjuntiva (n=1) e necrópsia (n=2).

*Unidade de Neuropatologia e Microscopia Eletrônica, ** Unidade de Neuropediatria, Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná (UFPR), *** APAE, Curitiba. Estudo realizado com apoio parcial do CNPq., Centro de Microscopia Eletrônica e Hospital de Clínicas da UFPR, Centro de Patologia de Curitiba e Hospital Nossa Senhora das Graças, Curitiba. Aceite: 11-junho-1993.

Dr. Luiz Fernando Bleggi Torres - Serviço de Anatomia Patológica, Hospital de Clínicas, UFPR - Rua General Carneiro, 181 - 80060-900 Curitiba PR - Brasil.

MÉTODOS NEUROPATOLÓGICOS

1. Estudo histoquímico de mucosa retal: dois a três fragmentos de mucosa retal foram colhidos acima da linha pectínea por pinça tipo Knoblett, em regime ambulatorial, após lavagem intestinal. Os fragmentos foram colocados em cubos de fígado bovino e congelados em nitrogênio líquido a -160° C; após isto, cortados de forma seriada em criostato Bright Starlet a 4 micrômetros e corados por hematoxilina-eosina, ácido periódico de Schiff (PAS) com e sem tratamento prévio por diastase, fosfatase ácida, oil red e sudan black para lipídeos, luxol fast blue, tionina⁸.

2. Microscopia eletrônica de biópsia de conjuntiva: fragmento conjuntival foi fixado em glutaraldeído 3%, pós-fixado em tetróxido de ósmio, desidratado em álcool e óxido de propileno e incluído em resina araldite. Cortes ultrafinos foram corados com acetato de uranila e citrato de chumbo e observados em microscópio Philips EM-300^{12,13}.

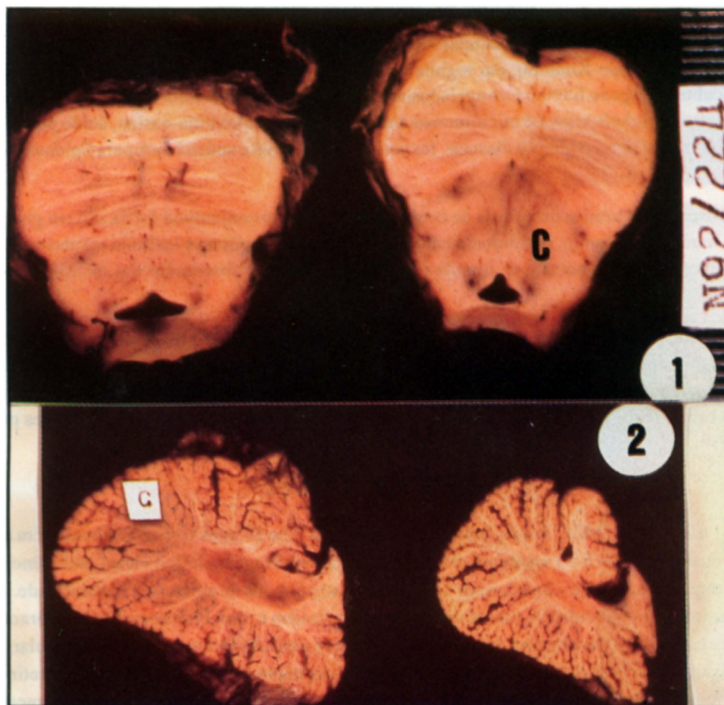
3. Necrópsia: encéfalos foram retirados e fixados em formalina 30% por três semanas; cortes coronais foram estudados e fotografados e amostras de diversas áreas, incluindo lobos frontal, parietal, temporal, occipital e ínsula, núcleos de base, tálamo, mesencéfalo, ponte, medula oblonga, medula espinhal e cerebelo, foram estudados com hematoxilina eosina, luxol fast blue/cresil violeta para mielina, impregnação argêntica de Gleees para axônios e PAS¹².

RELATO DOS CASOS

Casos 1 e 2 - MEC e MLC, irmãs, brancas, falecidas aos 22 e 17 anos respectivamente. Em ambas quadro clínico se iniciou na faixa dos 5 a 6 anos com dificuldades na aprendizagem, déficit visual, deficiência mental com deterioração progressiva, fala desconexa e por vezes ecológica; períodos de agitação e irritabilidade. A partir de 11 anos apresentaram crises convulsivas tônico-clônicas generalizadas e mioclônicas que nunca foram controladas. Aos 14 anos necessitaram de apoio para deambular e após os 16 anos deixaram de deambular e falar, restringindo-se ao leito. O exame neurológico demonstrava demência; fundoscopia com palidez de papilas e retinite pigmentar tipo “sal e pimenta”. Houve inicialmente sinais piramidais de membros inferiores e evolutivamente dos quatro membros, com postura viciosa e emagrecimento. História familiar com pais saudáveis e não consanguíneos. Uma irmã com 20 anos normal. EEG: predominaram surtos de ponta e ponta onda irregular, difuso. LCR: normal. TAC: atrofia cerebral, cerebelar e provável perda de volume em gânglios da base. Necrópsia: alterações similares, com encéfalos pesando respectivamente 900 e 1000 g; o exame microscópico demonstrava acúmulo de pigmento acastanhado no citoplasma de neurônios cerebrais, cerebelares, pontinos, espinhais e de células ganglionares da medular de suprarenal e do plexo mioentérico. Na paciente MLC detectou-se ainda presença de miopatia vacuolar multifocal, provavelmente correspondendo ao acúmulo de lipofuscina fosfatase-ácida positiva em regiões subsarcolemais (Figuras 1 a 3).

Caso 3 - JRS, feminina, branca, 23 meses de vida, filha única de mãe com 37 anos e de pai com 45 anos, primos de terceiro grau. Gestação sem intercorrências com parto cesáreo e Apgar 9/10. Desenvolvimento psicomotor normal até 18 meses, quando começou a apresentar regressão das aptidões adquiridas e deixando progressivamente de falar. Dificuldade na marcha deixando de andar há 30 dias. Movimentos estereotipados das mãos. Exame físico demonstrando perímetro cefálico de 46 cm, peso 16 kg e estatura de 91 cm. Indiferente ao meio ambiente com estigmas de autismo. Não fala ou procura pegar objetos. Permanece em pé com apoio. Pares cranianos normais. Discreto aumento de tono. Reflexos profundos vivos e sinal de Babinski. TAC: atrofia cerebral, EEG: alteração no padrão do sono. Potencial evocado auditivo e visual: normais. Eletroretinografia: anormal, com função dos bastonetes mais reduzida que a dos cones. Biópsia de reto realizada através de pinça tipo Knoblett: presença de acúmulo de material granular citoplasmático intraneuronal em plexo mioentérico compatível com lipofuscina, bem como grande quantidade de macrófagos da lâmina própria contendo esse pigmento anormal, sendo a paciente classificada como tendo a forma infantil da doença (Figura 4).

Caso 4 - PAL, 11 anos e 10 meses, branca, feminina. Gestação e parto domiciliar sem intercorrências. Pai com 69 anos e mãe com 40 anos, sem consanguinidade; cinco irmãos saudáveis (duas irmãs com 22 e 15 anos; três irmãos com 20, 12 e 2 anos). Desenvolvimento psicomotor normal até 9 anos quando se iniciou dificuldade para deambular, déficit visual e disartria. Aos 10 anos apresentou crises convulsivas tônico-clônicas generalizadas. Exame físico: perímetro cefálico de 53 cm (50%), demenciada, emitindo palavras isoladas. Disartria, amaurose e fundoscopia com palidez de papilas e atenuação de calibre dos vasos. Presença de dispersão pigmentar tipo “sal e pimenta” de retina. Sistema motor normal, porém com marcha com passos curtos devido a amaurose. TAC: normal. EEG: sinais de atividade irritativa de projeção difusa. LCR, ácido láctico, metabólitos e gasometria normais. Biópsia de conjuntiva



Figuras 1 e 2. Cortes de ponte (1) e hemisfério cerebelar (2) do Caso 1 mostrando atrofia pontina com redução da base e tecto e proeminente atrofia cerebelar com alargamento de sulcos (c, controles pareados para idade e sexo). x 0,5.

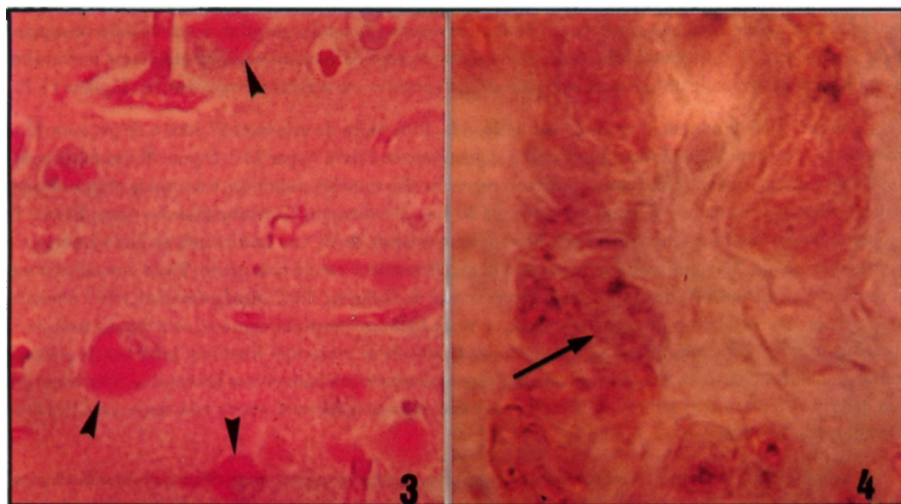


Figura 3. Corte histológico de córtex do Caso 2 demonstrando neurônios piramidais com núcleos deslocados para a periferia por acúmulo de material intensamente positivo ao ácido periódico de Schiff (setas) com características de lipofuscina. PAS, x 400.

Figura 4. Biópsia retal do Caso 3 por sucção com pinça tipo Knoblett congelada em nitrogênio líquido e incubada para demonstrar grupo de células micocêntricas positivas para fosfatase ácida citoplasmática (seta) correspondendo ao acúmulo de lipofuscina. Estas características aliadas a presença de inúmeros macrófagos no córion retal com material similar permitem o diagnóstico de lipofuscinoze ceróide forma infantil. FA, x 400.

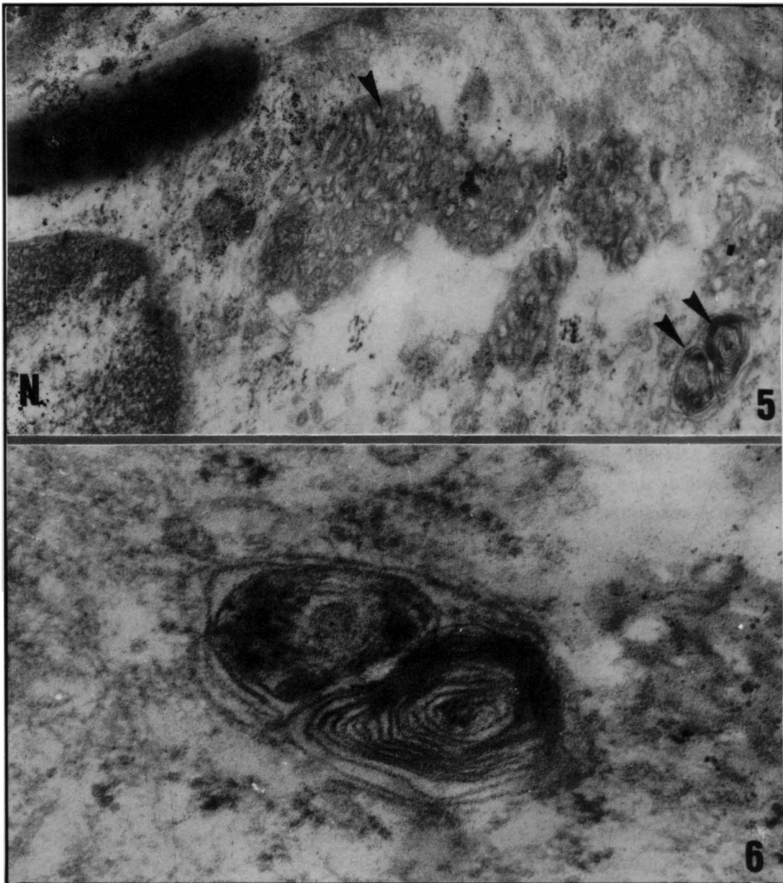


Figura 5. Microscopia eletrônica de biópsia de conjuntiva do Caso 4 demonstrando célula contendo no citoplasma inclusões tipo corpúsculos curvilíneos (seta) e corpúsculos citoplasmáticos membranáceos (seta dupla). Notar ainda o núcleo (N). Acetato de uranila/citrato de chumbo, x38000.

Figura 6. Microscopia eletrônica do Caso 4 demonstrando detalhe do corpúsculo membranáceo citoplasmático presente nos casos de lipofuscinese ceróide. Acetato de uranila/citrato de chumbo, x96000.

processada para microscopia eletrônica: presença de inclusões citoplasmáticas tipo corpúsculos membranáceos e "impressão digital" compatível com lipofuscinese ceróide forma juvenil, além de raras células contendo inclusões tipo corpúsculos curvilíneos (Figuras 5 a 7).

COMENTÁRIOS

A lipofuscinese ceróide neuronal foi inicialmente reconhecida por Batten (1903)³ devido às suas manifestações à fundoscopia. Corresponde a doença degenerativa neuronal de transmissão autossômica recessiva, em que há acúmulo de pigmento intracitoplasmático com características tintoriais compatíveis com lipofuscina. Esta entidade é considerada a mais frequente forma de doença degenerativa no grupo das "idiotias amauróticas"⁷. O defeito bioquímico ainda é desconhecido e estudos em modelo canino sugerem envolvimento do metabolismo do ácido araquidônico^{4,11}.

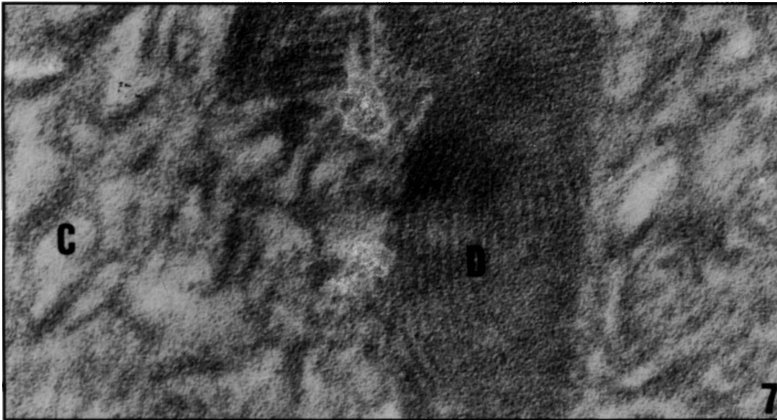


Figura 7. Microscopia eletrônica do Caso 4 demonstrando detalhe das inclusões citoplasmáticas tipo corpúsculo curvilíneo (C) e impressão digital (D). Estes achados permitem a caracterização desta doença como de acúmulo tipo lipofuscinoso ceróide. Acetato de uranila/citrato de chumbo, x96000.

Diversas formas clínicas foram descritas baseadas na idade de início dos sintomas, quadro clínico, duração da doença, patologia e alterações eletrofisiológicas. Os principais grupos incluem: forma infantil (Hagberg-Santavuori), forma infantil tardia (Bielschowsky-Jansky), juvenil precoce (Lake-Cavanagh), juvenil (Batten-Mayou e Spielmeyer-Vogt) e adulta (Kufs)⁹. A forma infantil começa entre 8 e 18 meses com hipotonia, ataxia, mioclonia, perda visual e microcefalia levando a criança à morte entre 3 e 10 anos de idade. A forma infantil tardia caracteriza-se por bom desenvolvimento psicomotor até a deambulação quando, ao redor de 18 meses a 4 anos, aparecem convulsões de difícil controle clínico seguidas por retardo psicomotor, perda visual, tetraplegia espástica e paralisia bulbar. Na forma juvenil, o principal sintoma é deterioração visual com retinopatia pigmentar iniciando-se entre 4 e 9 anos de idade, seguida por convulsões, ansiedade, alterações da fala, ataxia e tetraplegia, vindo a falecer ao redor de 20 anos de idade. A forma juvenil precoce apresenta quadro clínico similar à infantil tardia, porém com alterações patológicas compatíveis com a forma juvenil. A forma adulta, que é rara, pode se apresentar como epilepsia mioclônica progressiva com demência (tipo A) ou quadro demencial com distúrbios de movimentos involuntários (tipo B). Diversos casos atípicos foram descritos^{4,5,9}.

As alterações neuropatológicas incluem graus severos de atrofia cerebral e cerebelar, como encontrado em nossas pacientes autopsiadas. Exame microscópico do encéfalo demonstra neurônios não balonizados com citoplasma contendo pigmento castanho e granular com características histoquímicas de lipofuscina ou ceróide incluindo positividade ao PAS, sudanofilia e autofluorescência. Na forma infantil observa-se intensa perda neuronal com astrocitose e numerosos macrófagos contendo lipofuscina, além de palidez mielínica inclusive fibras em U subcorticais. Ocorre deposição de lipofuscina em outros tecidos, como baço, linfonodos, lâmina própria da parede intestinal, músculo liso e estriado, rim, testículo e pâncreas. À microscopia eletrônica nota-se depósitos de material granular osmiofílico. Na forma infantil tardia as alterações são semelhantes porém não tão intensas observando-se, na microscopia eletrônica, presença de corpúsculos curvilíneos. Na forma juvenil, correspondendo aos dois casos autopsiados em nossa série, nota-se presença de moderada quantidade de neurônios residuais corticais contendo lipofuscina; na biópsia retal o material acumulado apresenta positividade para luxol fast blue em contraste com a forma infantil tardia. À microscopia eletrônica o quadro é variado, observando-se corpúsculos membranáceos e tipo impressão digital; é raro o achado, por nós descrito, de corpúsculos curvilíneos nesta forma clínica, visto que eles predominam na forma infantil tardia. A patologia da forma adulta é controversa devido à raridade desta forma e ao normal acúmulo de lipofuscina em quantidades crescentes com o aumento da idade do paciente^{2,6,10}.

O diagnóstico desta doença neurodegenerativa deve ser suspeitado pela clínica, EEG, TAC e fundoscopia. A biópsia cerebral está contra-indicada e não se justifica, visto que há acúmulo neuronal detectável por biópsia retal com estudo do plexo mioentérico ou alterações ultra-estruturais passíveis de análise à microscopia eletrônica. Outros métodos incluem biópsia de pele, conjuntiva e músculo, onde ocorrem depósitos anormais. Na forma juvenil, linfócitos vacuolados podem ser detectados no sangue periférico^{4,9}.

A evolução desses pacientes é sempre fatal devido a perda progressiva de função neuronal pelo acúmulo de lipofuscina e ceróide, com estabelecimento de quadros progressivos de demência e involução psicomotora. A confirmação diagnóstica é importante para aconselhamento genético, sendo a necrópsia com estudo de encéfalo e medula espinhal indispensável para total caracterização desta entidade.

Agradecimentos- Agradecemos a Dra. Elizabeth Schneider Gugelmin pela realização da colheita da biópsia retal no caso 3 e à bióloga Fádua de Queiroz pelas preparações para microscopia eletrônica.

REFERÊNCIAS

1. Armstrong D, Koppang N, Nilsson SE. Canine hereditary ceroid lipofuscinosis. *Eur Neurol* 1982, 21:147-156.
2. Arsenio-Nunes ML, Goutieres F, Aicardi JK. An ultramicroscopic study of skin and conjunctival biopsies in chronic neurological disorders of childhood. *Ann Neurol* 1981, 9:163.
3. Batten FE. Cerebral degeneration with symmetrical changes in the maculae in two members of a family. *Transactions of the Ophthalmological Society of the United Kingdom* 1903, 23:386-390.
4. Becker LE, Yates AJ. Inherited metabolic disease. In: Davis RL, Robertson DM (eds). *Textbook of neuropathology*. Ed. 2. Baltimore: Williams & Wilkins, 1991, p.331-427.
5. Carpenter S, Kartpati G, Wolfe LS, Andermann F. A type of juvenile cerebromacular degeneration characterized by granular osmiophilic deposits. *J Neurol Sci* 1973, 18:67-87.
6. Friede RL. *Developmental neuropathology*. Ed. 2. London Springer, 1989, p.448-460.
7. Gordon NS, Marsden HB, Noronha MJ. Neuronal ceroid lipofuscinosis (Batten's disease). *Arch Dis Child* 1972, 47:285-291.
8. Izabel Filipe M, Lake BD. *Histochemistry in pathology*. Ed. 2. London Churchill Livingstone, 1990.
9. Lake BD. Lysosomal and peroxisomal disorders. In: Hume Adams J, Duchen LW (eds). *Greenfield's Neuropathology*. Ed 5. London Edward Arnold, 1992, p.709-810.
10. Nakano T, Sakai H, Kinoshita J, Yagishita S, Ito Y. Spielmeyer-Vogt disease (generalized juvenile ceroid lipofuscinosis): distribution and morphology of inclusions. *Adv Neurol Sci* 1978, 22:1376-1391.
11. Reddy TS, Armstrong D, Bazan NG. Arachidonic acid and other long-chain fatty acids in canine ceroid lipofuscinosis. *Neurochem Pathol* 1985, 3:83-97.
12. Torres LFB, Duchen LW. The mutant mdx: inherited myopathy in the mouse: morphological studies of nerves, muscles and end-plates. *Brain* 1987, 110:269-299.
13. Torres LFB, Coutinho L, Bruk I, Antoniuk S, Costa JC, Gugelmin ES. Microscopia eletrônica e histoquímica retal no diagnóstico de doenças de acúmulo em crianças. *Arq. Neuropsiquiatr* 1990, 48(Suppl):233.