

## ESTUDO POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA EM DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS NA INFÂNCIA

LUIZ FERNANDO BLEGGI TORRES\*, GRACIELA VANESSA VICELLI JACOB\*\*,  
LÚCIA DE NORONHA\*\*\*, GILBERTO ANTUNES SAMPAIO\*\*\*\*,  
SÉRGIO ANTONIUK\*\*\*\*\*, ISAC BRUCK\*\*\*\*\*

**RESUMO** - As doenças neurodegenerativas infantis compõem grupo variado de entidades em que os erros inatos do metabolismo induzem a defeitos enzimáticos intrínsecos às células com eventual acúmulo de material intracelular. A microscopia eletrônica (ME) pode auxiliar na caracterização do produto acumulado. Os autores relatam a experiência no diagnóstico das doenças neurodegenerativas na infância através da análise por ME de amostras teciduais provenientes de biópsias, principalmente de pele, conjuntiva e reto e em 2 casos material de necrópsia. As amostras teciduais eram de pacientes com quadro de encefalopatia progressiva a esclarecer. As biópsias de 89 pacientes com quadro de encefalopatia progressiva foram estudadas por microscopia eletrônica. A idade dos pacientes variou de 49 dias a 13 anos, com pico de incidência no primeiro ano de vida (n=28), sendo 50 pacientes do sexo feminino e 39 do masculino. Quanto à origem do material, houve predomínio de pele e conjuntiva. Dos 89 pacientes, 15 tiveram diagnóstico de certeza (16,8%) sendo 4 casos de gangliosidose, 3 casos de mucopolissacaridose, 1 caso de doença de Gaucher, 1 caso de doença de Niemann-Pick, 3 casos de lipofuscinose ceróide e 3 casos sugestivos de doença de acúmulo não podendo ser especificadas. Os autores analisaram os aspectos clínicos e os achados ultraestruturais e concluem que a ME é um método complementar valioso no diagnóstico de doença hereditária metabólica de acúmulo, porém de baixa acurácia diagnóstica quando feito como único método de "screening" laboratorial em uma população com encefalopatia progressiva a esclarecer.

**PALAVRAS-CHAVE:** doenças neurodegenerativas, microscopia eletrônica, infância, diagnóstico.

### Electron microscopical study in neurodegenerative diseases in infancy

**ABSTRACT** - Neurodegenerative diseases are a group of disorders in which there is storage of abnormal material in cells throughout the body due to an enzyme defect. The authors present the experience in the diagnosis of the neurodegenerative diseases in infancy by electron microscopical study of skin, conjunctival and rectum material of 89 patients and 2 necropsy cases. The age of the patients ranged from 49 days to 13 years with a peak age of incidence in first year of life (n=28). Fifty patients were female and 39 were male. The most frequent sites of biopsy were the skin and conjunctival. Of the total 89 patients, 15 had a definitive diagnosis (16.8%) including 4 cases of gangliosidosis, 3 cases of mucopolysaccharidosis, a case of Gaucher's disease, a case of Niemann-Pick disease, 3 cases of neuronal ceroid lipofuscinosis and 3 cases of storage disease which could not be specified. The authors studied all these patients within clinic and ultrastructural aspects and concluded that electron microscopy is an important method in diagnosis of storage diseases but with a low sensitivity as a single "screening" test for patients with progressive encephalopathy.

**KEY WORDS:** neurodegenerative diseases, electron microscopy, diagnosis, infancy.

Seção de Microscopia Eletrônica e Neuropatologia, Serviço de Anatomia Patológica, Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC/UFPR), Curitiba. \*Professor Adjunto e Chefe do Serviço de Anatomia Patológica do HC/UFPR e Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR; \*\*Estagiária da Seção de Microscopia Eletrônica e Neuropatologia, HC/UFPR; \*\*\*Médica do Serviço de Anatomia Patológica e Mestranda em Medicina Interna, Departamento de Clínica Médica, HC/UFPR; \*\*\*\*Médico do Serviço de Anatomia Patológica do HC/UFPR, \*\*\*\*\*Professor do Serviço de Neuropediatria, Departamento de Pediatria, HC/UFPR. Aceite: 16-agosto-1997.

Dr. Luiz Fernando Bleggi Torres, M.D., Ph.D. - Seção de Microscopia Eletrônica e Neuropatologia, Serviço de Anatomia Patológica. Hospital de Clínicas UFPR - Rua General Carneiro 181 - 80060-900 Curitiba Pr - Brasil. FAX 041 264 2513.

Doenças neurodegenerativas em crianças compõem um grupo heterogêneo de entidades de etiologia quase sempre obscura. Muitas são causadas por defeitos enzimáticos intrínsecos às células, o que provoca o acúmulo de materiais anormais em diferentes tipos de células. Várias destas doenças têm caráter congênito sendo frequentemente de transmissão autossômica recessiva. Este é mais um fator de importância diagnóstica, pois há possibilidade de virem a acometer outros membros da família. Os efeitos clínicos destas doenças vão variar de acordo com os locais onde as substâncias são acumuladas, processo denominado tesarismose<sup>6</sup>. Os quadros clínicos são variados apresentando geralmente involução psico-motora, convulsões e quadros demenciais. O diagnóstico destas doenças em vida é difícil necessitando de avaliação clínica detalhada incluindo fundoscopia, eletrencefalograma, tomografia cerebral computadorizada, ressonância nuclear magnética, "screening" urinário e enzimático, sendo este último aquele que revela o diagnóstico definitivo da maioria das doenças neurodegenerativas de acúmulo. O advento da microscopia eletrônica (ME), permitiu incremento no diagnóstico deste grupo de doenças através da avaliação de biópsias de pele e conjuntiva ocular para pesquisa de material anômalo acumulado no citoplasma de fibroblastos, células epiteliais, inclusive em ductos écrinos e terminações nervosas.

O objetivo do presente estudo é relatar nossa experiência no diagnóstico das doenças neurodegenerativas de acúmulo quando a ME é usada como método inicial de "screening" laboratorial em casos de encefalopatia progressiva a esclarecer.

## MATERIAL E MÉTODOS

No período de 1988 a 1996 foram analisados materiais de 89 pacientes com quadro clínico de encefalopatia progressiva acompanhados no ambulatório de Neuropediatria do Hospital de Clínicas da UFPR. Incluímos na presente casuística 2 casos de necrópsia de pacientes deste ambulatório. Os locais de colheita das amostras foram pele, conjuntiva, reto, nervo, fígado, dependendo da suspeita clínica e facilidade de realização do procedimento (Tabela 1). Nos 2 casos de necrópsia, tivemos amostras de baço e cérebro. Os critérios clínicos para indicação da realização da biópsia tecidual foram a presença de um ou mais dos seguintes dados: regressão do desenvolvimento psico-motor (DPM) ou encefalopatia de etiologia indefinida, história familiar de quadro clínico semelhante ao do paciente e/ou consanguinidade, epilepsia acompanhada de regressão do DPM, achados no exame físico tais como: fácies grotesca, hepatoesplenomegalia, dismorfismos, alterações ao exame de fundo de olho como tipo sal e pimenta ou mancha vermelho cereja. Em alguns casos foram realizados exames complementares que contribuíssem para a indicação da realização da biópsia: eletrencefalograma (EEG), tomografia axial computadorizada (TAC), ressonância magnética (RM), biópsia de medula óssea, "screening" urinário e enzimático, quando possível. Os dados clínicos e dos exames complementares realizados foram retirados dos prontuários dos pacientes.

Tabela 1. Local da realização da biópsia ou do material de necrópsia.

Providência do material	Nº	%
pele**	58	49,6
conjuntiva**	40	34,2
reto	9	7,7
nervo	3	2,55
fígado*	3	2,55
baço*	2	1,7
cérebro*	2	1,7
Total	117	100

Obs: Total de 89 pacientes tendo sido coletados 117 fragmentos teciduais, visto que em 26 pacientes mais de uma amostra de sítios anatómicos diferentes foi colhida.

Legenda: \*Material de necrópsia; \*\*duas das amostras de pele e conjuntiva eram de necrópsia.

**Tabela 2. Principais achados clínicos e de exames complementares nos pacientes que foram submetidos a biópsia ou necrópsia.**

Achados clínicos e de exames complementares	Nº	%
atraso do DPM	55	78,6
crises convulsivas	33	47,1
EEG alterado	42	60,0
TAC alterada	34	48,5
história familiar	18	25,7
alterações ósseas	10	14,2
alterações no FO	9	12,8
consanguinidade	8	11,4
hepatomegalia	3	4,2
esplenomegalia	2	2,8

Obs: 89 pacientes sendo avaliados 70 prontuários, 19 pacientes sem informação clínica.

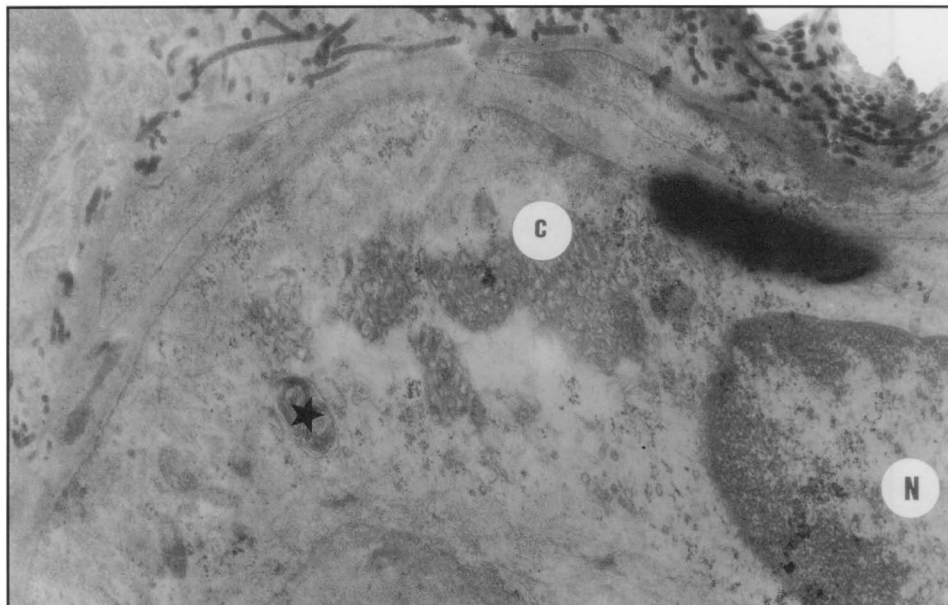
Legenda: DPM, desenvolvimento psicomotor; EEG, eletrencefalograma; TAC, tomografia axial computadorizada; FO, fundo de olho.

As biópsias foram realizadas após autorização dos pais, sob anestesia local com retirada de pequeno fragmento o qual foi fixado em glutaraldeído 3% (Sigma) por 24 horas para estudo por microscopia eletrônica<sup>10</sup>. Em seguida o material foi lavado em cacodilato 0,1 M e pós-fixado em tetraóxido de ósmio a 1% (Sigma) durante 4 horas sendo lavado em água destilada e imerso em acetato de uranila (Riedel) a 2% por 12 horas. Após isto o material foi desidratado em álcool (Merck), concentrações crescentes (70, 80, 90, 100%) por período de 10 minutos cada, tratado com óxido de propileno puro seguido de óxido de propileno (Electron Microscopy Sciences) misturado com resina araldite (Polysciences). Fez-se a inclusão dos fragmentos em resina araldite (Polysciences) pura à temperatura ambiente sendo polimerizados em estufa por 3 dias. O material foi submetido a microtomia através de cortes semi-finos (1 micrômetro) realizados em ultramicrotomo (Reichert & Jung Super Nova) e após escolhida a área a ser examinada os blocos foram submetidos a cortes ultra-finos na interface ouro/prata e em seguida corados por citrato de chumbo (Riedel - de Haën) e acetato de uranila (Riedel). A observação foi realizada em microscópio Philips EM300 e JEOL<sup>8-11</sup>.

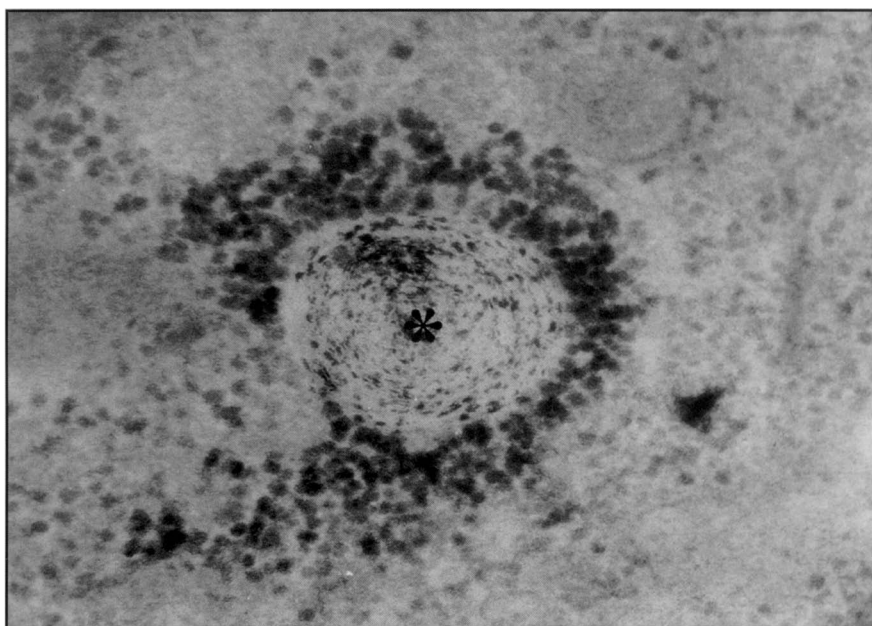
## RESULTADOS

A idade dos pacientes variou de 49 dias a 13 anos, com pico de incidência no primeiro ano de vida (n=28), sendo 50 pacientes do sexo feminino e 39 do masculino. Quanto à origem das amostras teciduais, 58 eram de pele (49,6%), 40 de conjuntiva (34,2%), 9 de reto, 3 de fígado, 3 de nervo, 2 de baço e 2 de cérebro (Tabela 1).

A análise das amostras teciduais por microscopia eletrônica mostrou que 20 destas tiveram diagnóstico de certeza (17,1%). Dentre estas, 5 eram provenientes de necrópsia, sendo 4 do mesmo paciente e 15 de biópsias, sendo 2 do mesmo paciente. Em 4 casos detectaram-se ductos écrinos apresentando no citoplasma de algumas células estruturas membranosas compatíveis com corpúsculos membrano-citoplasmáticos (CMC) sugerindo gangliosidose; 7 casos demonstraram células epiteliais contendo grande quantidade de vacúolos intra-citoplasmáticos, bem delimitados, ora vazios, ora preenchidos por material eletrôn-denso, irregular, compatível com doença de acúmulo tipo mucopolissacaridose; 1 caso demonstrou células epiteliais contendo inclusões alongadas e fragmentadas sugestivas de doença de Gaucher; 1 caso demonstrou células epiteliais com citoplasma intensamente vacuolado contendo corpúsculos citoplasmáticos polimórficos, restos celulares e material filamentar, compatível com doença de Niemann-Pick tipo C; em 2 casos havia células epiteliais com inclusões



*Fig 1. Microscopia eletrônica de lipofuscinese ceróide neuronal mostrando tecido conjuntivo frouxo de pele. Observa-se em célula endotelial presença de inclusões citoplasmáticas tipo corpúsculos curvilíneos ( C ) e corpúsculo membranáceo composto por lâminas concêntricas de material filamentar (\*). Núcleo (N). Acetato de uranila/citrato de chumbo. x 35000.*



*Fig 2. Microscopia eletrônica de pele com ácino écrino demonstrando estrutura membranosa compatível com corpúsculo membrano-citoplasmático (\*). Avaliação clínica e laboratorial indicando gangliosidose. Acetato de uranila/citrato de chumbo; x 60000.*



*Fig 3. Microscopia eletrônica de fígado de material de necropsia com células de Kupffer (K) tendo núcleo (N) e citoplasma contendo vacúolos ora vazios, ora preenchidos por material reticulado ou lamelar (\*) condizente com mucopolissacaridose. Presença de grânulos lipídicos (L). Acetato de uranila/citrato de chumbo; x 20000.*

citoplasmáticas tipo corpúsculos curvilíneos e 2 apresentaram corpúsculos do tipo impressão digital e corpúsculos concêntricos, ambos compatíveis com lipofuscinose ceróide neuronal e em 3 casos havia substância acumulada no citoplasma a qual não pôde ser especificada (Figs 1 a 3).

A análise dos pacientes demonstrou que os achados clínicos mais frequentes foram: atraso do DPM (78,6%), crises convulsivas (47,1%), EEG alterado (60%), TAC alterada (48,5%), sendo frequente a atrofia dos hemisférios cerebrais. A história familiar foi positiva em 25,7% (Tabela 2). Em 12,8% dos casos encontramos alterações na fundoscopia sendo as mais frequentes a mancha cor vermelho cereja, tipo sal e pimenta e em 2 casos atrofia com amaurose. Salientamos que tivemos acesso a 70 prontuários; portanto, em 19 pacientes não pudemos analisar os dados clínicos. Aliando-se aos dados clínicos os achados à microscopia eletrônica detectamos que em 15 pacientes (16,8%) houve confirmação diagnóstica de doença de acúmulo.

## DISCUSSÃO

No Serviço de Neuropediatria do Hospital de Clínicas da UFPR é rotina, em pacientes com quadro clínico de encefalopatia progressiva, a realização de biópsias teciduais, especialmente de pele e conjuntiva pela sua facilidade e baixa invasividade do procedimento, na tentativa do diagnóstico etiológico<sup>11</sup>. Isto ocorre porque este Hospital não dispõe de um laboratório para a dosagem enzimática que daria o diagnóstico definitivo de certeza. Salienta-se, ainda, que os procedimentos laboratoriais para pesquisa de certas alterações bioquímicas, sobretudo concernentes às dosagens da atividade de enzimas lisossomiais, são complexos e caros<sup>7</sup>. Por outro lado, o Hospital de Clínicas da UFPR pode contar com a Seção de Microscopia Eletrônica criada há 10 anos. Diante disto a biópsia tecidual com análise por microscopia eletrônica tornou-se um método inicial de "screening" laboratorial, apesar de se saber que não é esta a sua função, e que somente a dosagem enzimática é que dá o diagnóstico definitivo da doença<sup>7</sup>. Esta é uma das razões de ser feito diagnóstico em apenas 16,8% dos pacientes.

O advento das técnicas histoquímicas e da microscopia eletrônica trouxe grande avanço para o auxílio diagnóstico deste grupo de doenças, principalmente na lipofuscinose ceróide neuronal que se caracteriza por ser doença degenerativa neuronal de transmissão autossômica recessiva, em que há acúmulo de pigmento intracitoplasmático de lipofuscina<sup>4,8</sup>. Esta entidade é considerada a mais frequente forma de doença degenerativa no grupo das "idiotias amauroticas". O defeito bioquímico parece ter relação com o metabolismo do ácido aracdônico. A forma infantil começa entre 8 e 18 meses com progressivo retardo psicomotor, apresentando hipotonia, ataxia, mioclonia, perda visual e microcefalia. O EEG mostra-se isoeletrico nesta fase. O óbito ocorre 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 de idade, aparecem convulsões de difícil controle clínico seguidas por retardo psicomotor, perda visual, tetraplegia espástica e paralisia bulbar que levam a criança à morte entre 4 e 10 anos de idade. A forma juvenil tem como principal sintoma a deterioração visual, com retinopatia pigmentar iniciando-se entre 4 e 9 anos de idade. Em seguida surgem convulsões, ansiedade, alterações da fala, ataxia e tetraplegia, com óbito ao redor de 20 anos de idade. A forma juvenil precoce apresenta quadro semelhante à infantil tardia, porém com alterações patológicas compatíveis com a forma juvenil. A forma adulta é rara. A microscopia eletrônica, na forma infantil, mostra depósitos de material granular osmiofílico. Na forma infantil tardia observam-se corpúsculos curvilíneos. Na forma juvenil, o quadro é variado, observando-se comumente corpúsculos membranáceos e do tipo impressão digital, sendo raro o achado de corpúsculos curvilíneos, os quais curiosamente foram detectados em 2 casos da presente série. Em 2 dos casos relatados havia corpúsculos tipo impressão digital que são patognomônicos da lipofuscinose ceróide<sup>5,9</sup>. Na lipofuscinose ceróide neuronal ainda não é possível fazer diagnóstico pela dosagem enzimática, já que não se conhece a enzima defeituosa e, portanto, a microscopia eletrônica é de fundamental importância para o diagnóstico definitivo já que os achados ultraestruturais são praticamente patognomônicos.

Outra área em que a microscopia eletrônica contribui é na doença de Niemann-Pick, que na realidade é um grupo de doenças que ocorrem pelo acúmulo de esfingomielina e colesterol no sistema

nervoso e nas vísceras. Clinicamente detecta-se esplenomegalia e células espumosas (células de Niemann-Pick) na medula óssea e em outros órgãos,<sup>3,10,12</sup>. Basicamente dividem-se em dois grupos. No primeiro, grupo I, há déficit da enzima lisossomal esfingomielinase. No segundo, grupo II, esta enzima está normal ou parcialmente deficiente. Na microscopia eletrônica observam-se células vacuoladas contendo corpúsculos citoplasmáticos polimórficos e material filamentar o que foi detectado em uma das biópsias relatadas<sup>2,6</sup>. O diagnóstico desta doença por microscopia eletrônica é relativamente fácil pelos achados serem patognomônicos.

Os resultados deste estudo mostram que a utilização da microscopia eletrônica como "screening" inicial, em pacientes com suspeita de doença neurodegenerativa de acúmulo, é um método de alta sensibilidade porém de baixa especificidade, já que a negatividade da pesquisa não exclui o diagnóstico da doença. A dificuldade deste método, que foi mostrada pelo grande número de biópsias inconclusivas, ocorre devido às amostras serem muitas vezes inadequadas, pela distribuição da substância acumulada nos tecidos ser aleatória e principalmente por este método estar sendo usado como "screening" único em vários casos de pacientes com quadro de encefalopatia progressiva.

## REFERÊNCIAS

1. Arsenio-Nunes ML, Goutieres F, Aicadi JK. An ultramicroscopic study of skin and conjunctival biopsies in chronic neurological disorders of childhood. *Ann Neurol* 1981;9:163.
2. Elleder M, Niemann-Pick disease. *Pathol Res Pract* 1989;185:293-328.
3. Harzer K, Peiffer J. Morbus Niemann-Pick type C (subakute neuroviscerale Lipidosis). *Arch Psychiatr Nervenkr* 1981;230:71-79.
4. Lake BD, Hall NA, Patrick AD. Dolichyl pyrophosphate oligosaccharides are increased in Batten's disease. *Proc R Microscop Soc* 1988;23:45.
5. Nakano T, Sakai H, Kinoshita J, Yagishita S, Ito Y. Spielmeier-Vogt disease (generalized juvenile ceroid lipofuscinosis): distribution and morphology of inclusions. *Adv Neurol Sci* 1978; 22:1376-1391.
6. Rosemberg, S. *Neuropediatria*. São Paulo: Savier. 1995:237-263.
7. Rosemberg S, Campos C. Estudo ultraestrutural de biópsias de conjuntiva em doenças metabólicas do sistema nervoso. *Arq Neuropsiquiatr* 1987;45:7-15.
8. Torres LFB, Bruck I, Antoniuk S, Oliva L, Noronha L, Pereira LP. Lipofuscinose ceróide neuronal: relato de quatro casos com estudo por histoquímica retal, microscopia eletrônica de conjuntiva e necrópsia. *Arq Neuropsiquiatr* 1994;52:52-57.
9. Torres LFB, Coutinho L, Bruck I, Antoniuk S, Costa JC, Gugelmin ES. Microscopia eletrônica e histoquímica retal no diagnóstico de doenças de acúmulo em crianças. *Arq Neuropsiquiatr*, 1990;48(Supl):233A.
10. Torres LFB, Duchon LW. The mutant mdx: inherited myopathy in the mouse: morphological studies of nerves, muscles and end-plates. *Brain* 1987;110:269-299.
11. Torres LFB, Noronha L, Jacob GVV, Antoniuk S. Achados anátomo-patológicos e ultraestruturais na mucopolissacaridose: relato de um caso. *Arq Neuropsiquiatr* 1997;55:114-121.
12. Vanier MT, Wenger DA, Comley ME, Rousson R, Brady RO, Pentchev PG. Niemann-Pick disease group C: clinical variability and diagnosis based on defective cholesterol esterification. *Clin Genet* 1988;33:331-348.