

ESTUDO ULTRAESTRUTURAL DE BIÓPSIAS DE CONJUNTIVA EM DOENÇAS METABÓLICAS DO SISTEMA NERVOSO

S. ROSEMBERG *

C. CAMPOS **

As doenças metabólicas do sistema nervoso central (SNC), bem que relativamente raras se comparadas com a totalidade dos outros processos patológicos, constituem contingente não negligenciável de alterações responsáveis pela procura de atendimento especializado em serviços de Neurologia Pediátrica. A tentativa de um diagnóstico preciso é extremamente importante para fins prognósticos, de aconselhamento genético e eventualmente terapêutico. Diante de criança suspeita de sofrer de uma afecção metabólica do sistema nervoso, isto é, que padeça de doença hereditária, progressiva e cuja maior expressão clínica é neurológica, deve-se proceder a uma bateria de exames complementares cujos resultados deverão permitir a máxima aproximação possível do diagnóstico real. Como, por definição, estas doenças são causadas por anomalias bioquímicas, sua detecção é o alvo final e a garantia do diagnóstico correto. Entretanto, em várias doenças cuja natureza metabólica é certa, a alteração molecular permanece desconhecida, inexistindo a possibilidade de um diagnóstico bioquímico. Algumas destas doenças são consideradas como “degenerativas”. O caráter efêmero desta classificação é evidente na medida em que uma simples descoberta bioquímica pode transformar uma doença degenerativa em metabólica¹. Por outro lado, os procedimentos laboratoriais para a pesquisa de certas alterações bioquímicas, sobretudo concernentes a dosagens da atividade de enzimas lisossomiais, são complexos e caros, achando-se nosso país numa posição pouco privilegiada a este respeito. Assim, a pesquisa de alterações morfológicas permanece um método diagnóstico valioso. Se até há alguns anos a tentação da biópsia cerebral era grande, refreada em parte pelos aspectos éticos envolvidos, a demonstração de que certas alterações celulares em nível ultraestrutural existem em células fora do SNC, veio em muito facilitar o diagnóstico^{5,6}. Assim,

Trabalho realizado no Setor de Neuropediatria do Departamento de Pediatria da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo (FCM SC SP) e na Disciplina de Neuropatologia do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP): * Professor Pleno do Departamento de Pediatria da FCM SC SP, chefe do Setor de Neuropediatria e Professor Adjunto do Departamento de Patologia da FMUSP, chefe da Disciplina de Neuropatologia; ** Instrutor do Departamento de Pediatria da FCM SC SP. *Agradecimento* — Aos Drs. Roberto E. Endo e Teruo Aihara do Departamento de Oftalmologia do Hospital da Santa Casa de São Paulo, pela execução das biópsias conjuntivais.

fragmentos de nervo periférico, pele e conjuntiva ocular⁴ podem ser rotineiramente retirados e estudados do ponto de vista ultrastrutural, em crianças suspeitas de certas doenças metabólicas. A gama de afecções passíveis de levar a alterações celulares ultrastruturais fora do SNC é grande, estando nelas incluídas todas as lisosomopatias, as lipofuscinoses ceróides, e, mais recentemente, as doenças peroxissomiais⁷. Certas afecções "avulsas" como a doença de Lafora e a distrofia neuroaxonal infantil¹⁰ podem ser responsáveis por comprometimento de células fora do SNC.

No Setor de Neuropediatria do Departamento de Pediatria da Santa Casa de São Paulo, a biópsia de conjuntiva faz parte da rotina da bateria de exames a que é submetida toda criança suspeita de uma doença metabólica. A biópsia de conjuntiva foi eletivamente escolhida pela facilidade de sua execução (não há necessidade de anestesia), pelo seu caráter não invasivo, ocorrendo reparação rápida, sem cicatriz. Este trabalho tem por objetivo relatar nossa experiência com o exame ultrastrutural da conjuntiva ocular no diagnóstico das doenças metabólicas do sistema nervoso.

MATERIAL E MÉTODOS

O material consiste em 40 biópsias de conjuntiva ocular realizadas em 40 pacientes seguidos no setor de Neuropediatria do Hospital da Santa Casa de São Paulo, no período de 1982 a 1985. Os critérios clínicos para suspeita de doença metabólica foram previamente determinados (1,9). Dezesesseis crianças eram do sexo feminino e 24 do sexo masculino. Dezesesseis casos iniciaram sua doença no período infantil precoce (0 a 12 meses), 19 no período infantil tardio (1 a 4 anos) e 5 no período juvenil (acima de 4 anos). A tabela 1 mostra os principais exames laboratoriais realizados nos 40

Exame	Nº pacientes	Resultado normal	Resultado anormal
RX esqueleto	21	10	11
Mielograma	37	25	12
LCR	32	30	2
Exame ocular	40	25	15
Tomografia computadorizada do crânio	27	11	16
Dosagem de enzimas lisossomiais: lágrimas e urina	22	13	9

Tabela 1 — Principais exames laboratoriais realizados.

pacientes. Logo após a retirada, o fragmento de conjuntiva é fixado em glutaraldeído a 2% por 2 horas e ácido ósmico a 1% por mais duas horas. Após passagem em uranila e desidratação, faz-se inclusão em araldite, sendo os cortes semi-finos corados pelo azul de metileno. Após escolha das áreas representativas, procede-se aos cortes finos que são corados pela uranila e citrato de chumbo. A observação foi feita em um microscópio Zeiss M-952.

RESULTADOS

Baseados nos achados das biópsias de conjuntiva ocular, os pacientes foram divididos em dois grandes grupos: Grupo A — biópsias com alterações ultraestruturais: 20 pacientes; Grupo B — biópsias sem alterações ultraestruturais: 20 pacientes. A distribuição das patologias no interior de cada grupo está nas tabelas 2 e 3.

Diagnóstico	Nº pacientes
Mucopolissacaridoses	8
Gangliosidose G_{M1}	6
Distrofia neuro axonal infantil	4
Gangliosidose G_{M2} - Variante AB	1
Lipofuscinoses ceróide	1

Tabela 2 — Diagnóstico dos pacientes com biópsias anormais.

Diagnóstico	Nº pacientes
Doença de Leigh	1
Doença de Hallervorden-Spatz	1
Adrenoleucodistrofia	1
Leucodistrofia metacromática	1
Sem diagnóstico	16

Tabela 3 — Diagnóstico dos pacientes com biópsias normais.

COMENTARIOS

As doenças lisosomiais inatas são as que mais conspicuamente levam a alterações ultraestruturais em células fora do SNC. Os lisossomos ingurgitados com as substâncias não metabolizadas em virtude da baixa atividade enzimática são geralmente bem visualizados. Sua abundância varia segundo a doença. Nas mucopolissacaridoses, sua visualização é imediata: são grandes lisossomos transformados em vacúolos claros contendo no seu interior material filamentar. Estas alterações são intensas, abundantes e presentes em diferentes tipos celulares como células endoteliais, glandulares, fibroblásticas, células de Schwann (Fig. 1). Sendo este aspecto idêntico nos diferentes tipos de mucopolissacaridose, a análise ultraestrutural permite apenas o diagnóstico genérico. As dosagens enzimáticas realizadas em dois casos mostraram tratar-se da MPS III-B (Sanfilippo tipo B) e de MPS I-S (Scheie). Nos demais casos, não se realizaram estas dosagens, porém os quadros clínicos sugeriam as MPS I-H (Hurler) e MPS-II (Hunter). Na gangliosidose G_{M1} , todos pertencentes à forma precoce (doença de Landing),



Fig. 1 - Mucopolissacaridose. Células glandulares de conjuntiva cujo citoplasma está inteiramente tomado por vacúolos claros contendo em seu interior material filamentar. X 3990.

o aspecto foi o mesmo e o diagnóstico também é facilmente realizado. O aspecto é semelhante ao das mucopolissacaridoses, estando as células epiteliais, endoteliais e fibroblásticas repletas de grandes inclusões citoplasmáticas eletroluscentes, delimitadas por membranas únicas, vazias ou contendo em seu interior escasso material filamentar (Fig. 2). Este aspecto explica-se pelo fato de na gangliosidose G_{M1} haver dupla tesaurosomose, em gangliosídeos nos neurônios e em mucopolissacárides nas vísceras². Em certos casos, sobretudo no início da evolução, o diagnóstico diferencial entre esta doença e a de Niemann-Pick pode ser clinicamente difícil. A biópsia de conjuntiva mostra padrões completamente diferentes em ambas as entidades, constituindo-se assim em valioso meio diagnóstico. As alterações nas gangliosidoses G_{M2} assim como nas lipofuscinoses ceróides⁸ são muito menos abundantes e requerem busca criteriosa. A presença, na gangliosidose G_{M2} , de corpúsculos membrano-citoplasmáticos e de corpos "zebrados" (Fig. 3) é característica, bem que não patognomônica. Em nosso caso, a análise enzimática revelou tratar-se da rara variante A-B da gangliosidose G_{M2} . Nas lipofuscinoses ceróides, a presença de grânulos osmiófilos de corpos curvilíneos ou de inclusões tipo "impressão digital" estarão respectivamente predominantes nas formas infantil, infantil tardia e juvenil. Em nosso caso (forma infantil tardia) observamos os corpos curvilíneos em fibroblas-

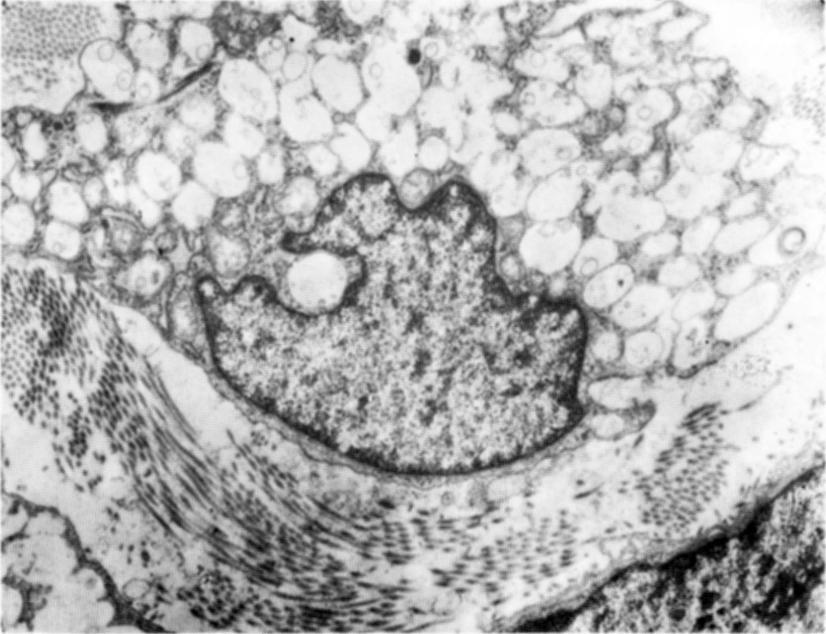


Fig. 2 — Gangliosidose G_{M1} . Fibroblasto cujo citoplasma está preenchido por vacúolos claros. X 11270.

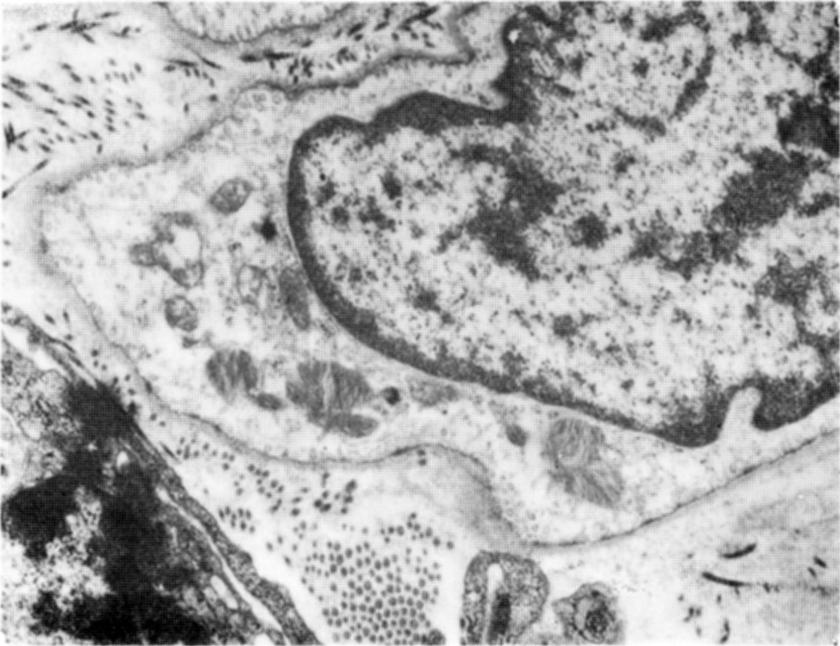


Fig. 3 — Gangliosidose G_{M2} (Variante A-B). Célula pericitária em cujo citoplasma encontram-se numerosas inclusões limitadas por membrana única, constituída de feixes de membranas paralelas. X 16170.

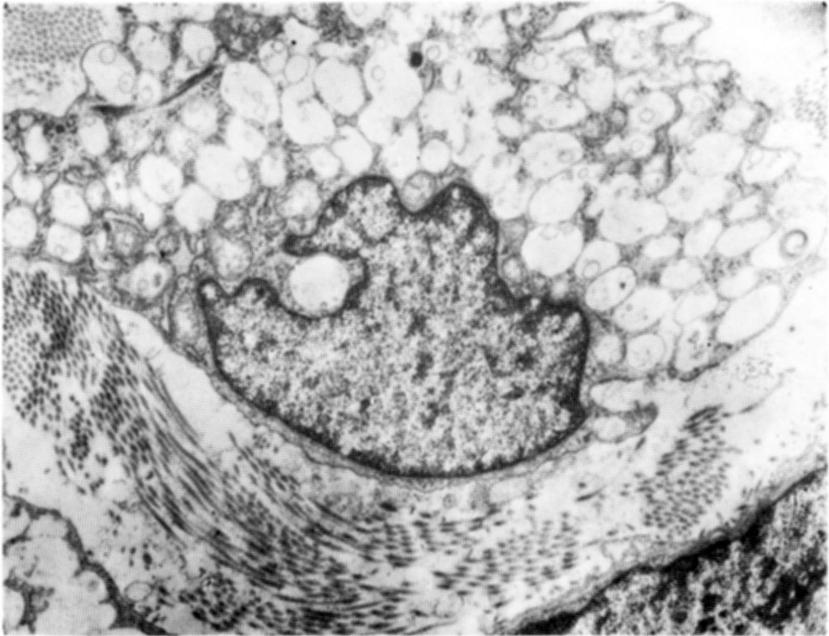


Fig. 2 — Gangliosidose G_{M1} . Fibroblasto cujo citoplasma está preenchido por vacúolos claros. X 11270.

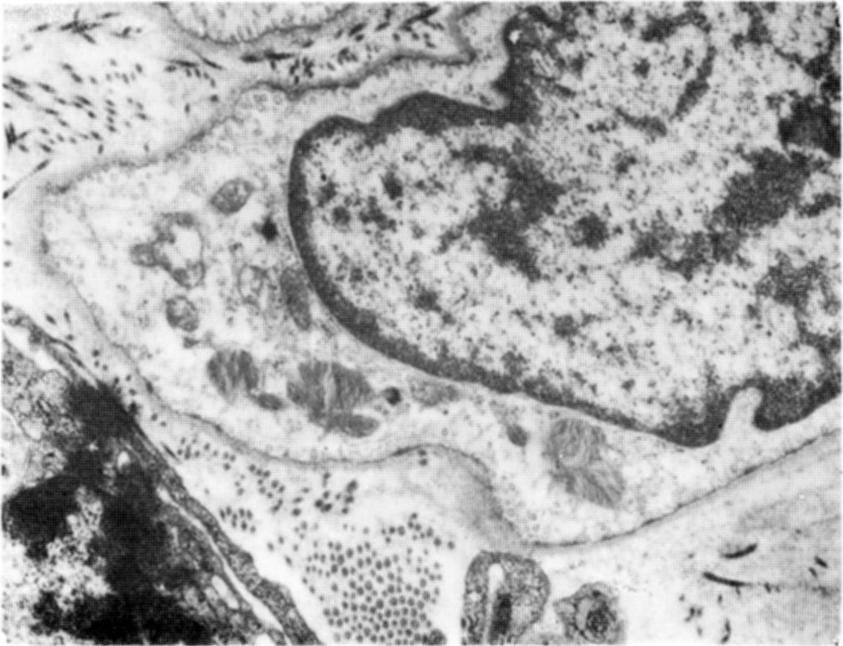


Fig. 3 — Gangliosidose G_{M2} (Variante A-B). Célula pericárdica em cujo citoplasma encontram-se numerosas inclusões limitadas por membrana única, constituída de feixes de membranas paralelas. X 16170.

tos (Fig. 4) e em células de Schwann. A distrofia neuro-axonal infantil carece de qualquer especificidade bioquímica, sendo seu diagnóstico unicamente possível mediante o achado de neurônios distróficos¹⁰. Estes são visíveis principalmente nos nervos amielínicos conjuntivais (Fig. 5).

Em vinte casos, a biópsia da conjuntiva revelou-se normal. Destes, em dois casos, a negatividade da biópsia foi compreensível na medida em que os diagnósticos de doença de Leigh e de Hallervorden-Spatz foram confirmados a posteriori através de autópsia e de outros exames paraclínicos, respectivamente. Em 4 casos de síndromes juvenis extrapiramidais progressivas e em dois casos familiares de uma doença progressiva ligada ao sexo, a biópsia negativa permitiu afastar, nestes quadros clínicos não conformes, a possível natureza lisossomal das afecções. Outros seis casos dizem respeito a observações de pacientes dificilmente agrupáveis por suas características clínicas, nas quais a natureza degenerativa da afecção parecia evidente. Embora sua evolução e quadro clínico não sugeriam, na maioria das vezes, uma doença de acúmulo, a biópsia conjuntival foi realizada em função das próprias dificuldades diagnósticas e pelo fato de a literatura conter, cada vez em maior número, casos tidos como variantes atípicas de doenças bem conhecidas¹. Na observação em que a dosagem da atividade enzimática foi realizada nas lágrimas e urina, esta revelou-se normal. Quatro casos eram clinicamente sugestivos de uma lipofuscinose ceróide, se bem que os exames complementares (mielograma, EEG) não corroborassem esta hipótese. A negatividade da biópsia deveria em princípio afastá-la definitivamente. Atualmente, porém, com maior experiência, sabe-se que as inclusões nestas afecções não são muito freqüentes nem ubiqüitárias. É possível que dentre estes casos, haja alguns falsos negativos, fato não confirmado pela impossibilidade do diagnóstico definitivo, uma vez que estes pacientes não puderam ser seguidos.

Apenas dois casos foram considerados como verdadeiros falsos negativos: uma leucodistrofia metacromática (diagnosticada através de dosagem enzimática e biópsia de nervo periférico) e uma adrenoleucodistrofia. Nestas duas entidades, a biópsia conjuntival não é a melhor-escolha, justamente pela possibilidade de aí não ser o local de mais fácil visualização das inclusões citoplasmáticas, preferindo-se nervo periférico e testículo, respectivamente.

Nossos achados indicam que, efetivamente o estudo ultraestrutural da biópsia de conjuntiva é por si mesmo, ou associadamente a outros exames laboratoriais, um instrumento decisivo para o diagnóstico das doenças metabólicas primárias do SNC, mormente quando os complexos técnicos bioquímicos não se acham ao alcance.

RESUMO

Quarenta biópsias de conjuntivas obtidas de um número igual de crianças portadoras de doenças metabólicas do SNC, ou supostas de tal acometimento, foram analisadas do ponto de vista ultraestrutural. Em 20 casos foram observadas alterações ultraestruturais que possibilitaram firmar o diagnóstico de mucopolissacaridose em 8, gangliosidose G_{M1} em 6, distrofia neuro-axonal infantil em 4, gangliosidose G_{M2} em um e forma infantil tardia de lipofuscinose ceróide em um. Nos 20 casos em que o exame revelou-se negativo, este era esperado em dois (doença de Leigh e de Hallervorden-Spatz); em dois, o resultado revelou-se falso negativo (leucodistrofia metacromática e adrenoleucodistrofia); em 12 casos sua negatividade permitiu afastar doença de acúmulo; em 4 casos suspeitos de lipofuscinose ceróide seu resultado foi inconclusivo. O estudo ultraestrutural de biópsias de conjuntiva é um instrumento importante para o diagnóstico de doenças metabólicas do SNC.

SUMMARY

Ultrastructural study of conjunctival biopsies in metabolic diseases of the nervous system.

Forty conjunctival biopsies from children suffering from metabolic diseases of the CNS were studied ultrastructurally. In 20 cases they were abnormal (8 mucopolysaccharidosis, 6 G_{M1} gangliosidosis, 4 infantile neuroaxonal dystrophy, 1 G_{M2} gangliosidosis, 1 late infantile ceroid lipofuscinosis). In the 20 remaining cases the biopsies did not show abnormalities. From these, 2 were proven as Leigh disease and Hallervorden-Spatz disease in which there is no conjunctival ultrastructural alterations; in 2 cases (one metachromatic leukodystrophy and one adrenoleukodystrophy) the results were false negative); in 4 clinically suspected cases of late infantile ceroid lipofuscinosis no alterations were observed and the results were not conclusive. In the remaining 12 cases the negatives allowed to rule out lysosomal disorders. The ultrastructural study of the conjunctival biopsy is an important tool for the diagnosis of neurological metabolic diseases of children mainly when sophisticated biochemical procedures are not available.

REFERÊNCIAS

1. ADAMS, R.D. & LYON, G. — Neurology of Hereditary Metabolic Diseases of Children. Hemisphere Publish. Corporation, Washington, 1982.
2. ARITA, F.N.; CAMPOS, C.C. & ROSEMBERG, S. — Gangliosidose G_{M1} forma precoce. Aspectos clínicos e diagnósticos. (A propósito de quatro observações). *Pediatrics* 58:299, 1985.
3. ARSENIO-NUNES, M.L. & GOUTIERES, G. — An ultra-microscopic study of the skin in the diagnosis of the infantile and late infantile types of ceroid-lipofuscinosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.* 38:994, 1975.
4. ARSENIO-NUNES, M.L.; GOUTIERES, F. & AICARDI, J. — An ultramicroscopic study of skin and conjunctival biopsies in chronic neurological disorders of childhood. *Ann. Neurol.* 9:163, 1981.

5. CARPENTER, S.; KARPATTI, G. & ANDERMANN, F. — Specific involvement of muscle, nerve and skin in late infantile and juvenile amaurotic idiocy. *Neurology* 22:170, 1972.
6. CEUTERICK, C.L.; MARTIN, J.J.; CASAER, P. & EDGAR, G.W. — The diagnosis of infantile generalized ceroid-lipofuscinosis (type Hagberg-Santavuori) using skin biopsy. *Neuropediatric* 7:250, 1976.
7. MOSER, H.W. — Peroxisomal disorders. *J. Pediat.* 108:89, 1986.
8. RAPOLA, J.; SANTAVUORI, P. & SAVILARTI, E. — Suction biopsy of rectal mucosa in the diagnosis of infantile and juvenile types of neuronal ceroid lipofuscinosis. *Hum. Pathol.* 15:352, 1984.
9. ROSEMBERG, S. — A criança que involui (encefalopatia evolutiva). In J. Murakovschi — *Pediatria. Diagnóstico + Tratamento*. Ed. 2. Sarvier, São Paulo, 1981, pg. 233.
10. ROSEMBERG, S.; ARITA, F.N. & CAMPOS, C. — Distrofia neuroaxonal infantil. Diagnóstico em vida por biópsia conjuntival. *Arq. Neuro-Psiquiat.* (São Paulo) 43:48, 1985.

Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo — Caixa Postal 2921 — 01000, São Paulo, SP — Brasil.