

## CORRELAÇÃO CLÍNICO-PATOLÓGICA EM 78 BIÓPSIAS DE NERVO SURAL

LEILA CHIMELLI \* — OSVALDO NASCIMENTO \*\* — MARCOS R. G. FREITAS \*\*

**RESUMO** — As biópsias de nervos periféricos processadas com técnicas convencionais de parafina muitas vezes não fornecem dados suficientes para a conclusão diagnóstica. Se, no entanto, o nervo for processado para inclusão em resina para cortes semi e ultrafinos e microdissecção de fibras, vários aspectos podem ser analisados inclusive por métodos quantitativos ou morfométricos. Estudamos o nervo sural de 78 pacientes biopsiados no Hospital Universitário Antonio Pedro, Niterói, utilizando essas técnicas e observamos que em 55 casos (70,5%) o diagnóstico anátomo-patológico foi conclusivo, em 11 (14,1%) embora o nervo exibisse anormalidades, não foi possível estabelecer um diagnóstico e em 12 (15,4%) o nervo estava normal. Em 68 casos havia um diagnóstico clínico que foi confirmado em 49 casos, o que não ocorreu nos 19 restantes pois, 8 tinham alterações inespecíficas e 11 eram normais. Nos 10 casos em que a situação nosológica não foi estabelecida clinicamente, a biópsia foi conclusiva em 6, exibia alterações inespecíficas em 4, sendo normal em 1 caso. A conclusão diagnóstica na maioria dos nossos casos só foi possível porque, além dos dados clínicos fornecidos, todos os nervos foram processados para inclusão em resina.

### Sural nerve biopsy: clinical-pathologic correlation in 78 patients.

**SUMMARY** — Peripheral nerve biopsies when processed with conventional techniques for paraffin embedding usually do not provide sufficient data for the diagnostic conclusion. However, if the nerve is processed for resin embedding for semi and ultra-thin sections and teasing of fibres, several aspects can be analysed including quantitative and morphometric data. We studied the sural nerve biopsy of 78 patients examined at the Antonio Pedro University Hospital, Niterói RJ, applying those techniques and we found that in 55 cases (70.5%) the pathologic diagnosis was conclusive, in 11 (14.1%) although the nerve had abnormalities it was not possible to establish a diagnosis, and in 12 (15.4%) the nerve was normal. In 68 cases there was a clinical diagnosis which was confirmed in 49 but not in the remaining 19, since 8 had non-specific changes and 11 were normal. From the 10 cases which did not have a clinical diagnosis the biopsy was conclusive in 6, showed non-specific changes in 4, and was normal in 1 case. The pathologic conclusion in most of our cases was possible because not only we had the clinical data but all the nerves were processed for resin embedding.

A utilização de técnicas que permitem melhor avaliação histológica do nervo vem oferecendo diagnósticos mais precisos das neuropatias periféricas. As preparações convencionais em parafina são de utilidade, porém melhores análises do nervo são obtidas com microdissecção de fibras e com inclusão em meio sintético, permitindo cortes semifinos e ultrafinos, para estudo ao microscópio óptico e eletrônico respectivamente<sup>1,4</sup>. O diagnóstico das neuropatias periféricas implica no seu reconhecimento clínico, na verificação eletro-neurofisiológica, em exames complementares vários

Trabalho realizado no Departamento de Patologia (DP) e no Serviço de Neurologia (SN) da Universidade Federal Fluminense (UFF), Niterói: \* Ph.D., Neuropatologista, Professor Adjunto, DP, UFF; \*\* Ph.D., Neurologista, Professor Adjunto, SN, UFF.

Dra. Leila Chimelli — Departamento de Patologia, 4º andar, Hospital Universitário Antonio Pedro — Rua Marquês do Paraná 3033 — 24030 Niterói RJ — Brasil.

e, particularmente, na observação da estrutura neural. Deste modo podemos identificar um número maior de doenças dos nervos periféricos, declinando o percentual de casos ditos idiopáticos. A correlação clínico-patológica adequada das perturbações encontradas no exame histológico favorece a identificação nosológica naqueles casos que fogem às doenças neurais clássicas (como amiloidose, hanseníase e leucodistrofia metacromática, entre outras).

O interesse de uma equipe formada pelos docentes dos Serviços de Neurologia e Neuropatologia da Universidade Federal Fluminense e condições de viabilização de técnicas atuais de neuro-histologia no Hospital Universitário Antonio Pedro permitiram a apreciação de 78 casos de neuropatias periféricas no período de 36 meses, que passamos a relatar.

#### MATERIAL E MÉTODOS

O nervo sural de 78 pacientes foi biopsiado no Hospital Universitário Antonio Pedro, com anestesia local. Uma incisão longitudinal de 4 cm foi feita entre o maléolo externo e o tendão de Aquiles e um segmento de 2 a 2,5 cm de nervo foi seccionado com o mínimo de trauma. O patologista, presente na sala de pequena cirurgia, ao receber o nervo, seccionava 3 a 4 mm de cada extremidade com uma lâmina nova, sendo estes fragmentos fixados em formol a 10%. A parte central do segmento biopsiado (cerca de 1,5 cm de comprimento) era estendida sobre um cartão, sendo, após alguns segundos para que aderisse ao cartão, fixada em glutaraldeído a 3% em tampão cacodilato (pH 7,4) por pelo menos 4 horas ou até o dia seguinte numa temperatura de 40°C.

O material fixado em formol era rotineiramente processado para inclusão em parafina, sendo corado com hematoxilina e eosina (HE) e, quando necessário, com colorações especiais como cresil violeta, Ziehl-Nielsen, hematoxilina-van Gieson e PAS; colorações para mielina e axônio não foram realizadas, pois dispúnhamos dos cortes semifinos corados com azul de toluidina, que nos permitiam boa identificação daquelas estruturas.

No material fixado em glutaraldeído, eram feitos 4 a 5 cortes transversos com menos de 1 mm de espessura os quais eram lavados em tampão cacodilato, pós-fixados em tetróxido de ósmio, desidratados em álcool, clarificados com óxido de propileno puro e posteriormente misturado com Araldite e, finalmente, deixados em Araldite puro até o dia seguinte, quando então eram incluídos em Araldite recém-preparado. Cortes semifinos (1  $\mu$ m) para microscopia óptica eram corados com azul de toluidina e, se necessário, algumas áreas eram selecionadas para cortes ultrafinos para exame ao microscópio eletrônico. Estes cortes eram corados com acetato de uranila e citrato de chumbo e examinados em microscópio eletrônico Zeiss OM 109. O restante do nervo era dividido em 3 ou 4 fascículos para permitir melhor penetração do ósmio, sendo processados de maneira semelhante aos cortes transversos descritos acima, exceto que a resina era preparada sem o acelerador (DMP 30). As fibras eram separadas usando agulhas superfina sob uma lupa e estendidas na lâmina sobre uma gota de Araldite com acelerador seguida de lamínula. A lâmina era colocada na estufa durante a noite para permitir a polimerização da resina. Os fascículos não dissecados eram estocados em freezer. Embora em todos os casos o material tenha sido processado para a microdissecção de fibras, esta só foi realizada em casos selecionados, quando era considerada importante para o diagnóstico, já que é técnica que demanda muito tempo para a sua realização. Os métodos quantitativos, embora ainda não rotineiramente empregados, consistem da determinação da densidade das fibras mielínicas, do diâmetro das fibras, do comprimento internodal em fibras isoladas e da contagem de fibras amielínicas em cortes ultrafinos.

Todas as biópsias vinham acompanhadas de história clínica detalhada, obtidas por preenchimento do protocolo por nós organizado.

#### RESULTADOS

Em 55 casos (70,5%) o diagnóstico patológico foi conclusivo, em 11 (14,1%) embora o nervo exibisse anormalidade, não pudemos estabelecer um diagnóstico morfológico e, em 12 casos (15,4%), o nervo era normal. Dos 68 casos com hipótese diagnóstica sob o ponto de vista clínico houve confirmação em 49, não tendo sido confirmada nos 19 restantes dos quais 8 tinham alterações inespecíficas e 11 eram normais. Nos 10 casos em que clinicamente não foi possível estabelecer um diagnóstico, a biópsia foi conclusiva em 6, exibia alterações inespecíficas em 4 e era normal em 1 caso.

Em 17 casos (21,8%), a exteriorização clínica da neuropatia fez-se sob forma de mono-neuropatia múltipla, das quais 15 foram concluídas com a biópsia, 1 exibia alterações inespecíficas e 1 era normal. Dos 56 casos (71,8%) que se manifestaram sob a forma de polineuropatia, 48 foram concluídas com a biópsia, 4 não foram concluídas e 4 eram normais. Outras exteriorizações clínicas estavam presentes em 5 casos (6,4%) dos quais 2 foram normais e 3 inconclusivos.

Todos estes dados, incluindo as neuropatias encontradas estão mostrados nas tabelas 1, 2 e 3. Alguns dos achados morfológicos estão ilustrados nas figuras de 1 a 4. Observamos ainda que, se analisássemos apenas o segmento incluído em parafina e corado com HE e as colorações mencionadas, teríamos chegado ao diagnóstico em cerca de 15% dos casos. No entanto, temos que levar em consideração o fato de que, por termos o material incluído em Araldite disponível, não esgotamos todas as possibilidades com o material incluído em parafina, já que não realizamos colorações especiais para axônio e mielina.

Diagnóstico anátomo-patológico	Nº de casos
Neuropatia sensitivo motora hereditária (tipos I ou II)	14
Hanseníase	10
Carencial	4
Lúpica	2
Senil	3
Guillain-Barré crônico	4
Diabética	9*
Esclerodermia	1
Artrite reumatóide	1
Paraneoplásica	2
Hipoglicêmica (insulinoma)	1
Tóxica (organofosforado)	1
Neuropatia associada a porfíria	2
Neuropatia associada a hipereosinofilia	1
Inconclusivo	11
Normal	12
Total	78

Tabela 1 — Diagnósticos anátomo-patológicos das neuropatias. \* Em um caso havia também alterações devidas a hipoglicemia.

Exteriorização clínica	Nº de casos	Diagnóstico patológico
Polineuropatia	56 (71,8%)	48 conclusivos 4 inconclusivos 4 normais
Mononeuropatia múltipla	17 ( 21%)	15 conclusivos 1 inconclusivo 1 normal
Outras	5 ( 6,4%)	3 inconclusivos 2 normais
Total	78 casos	

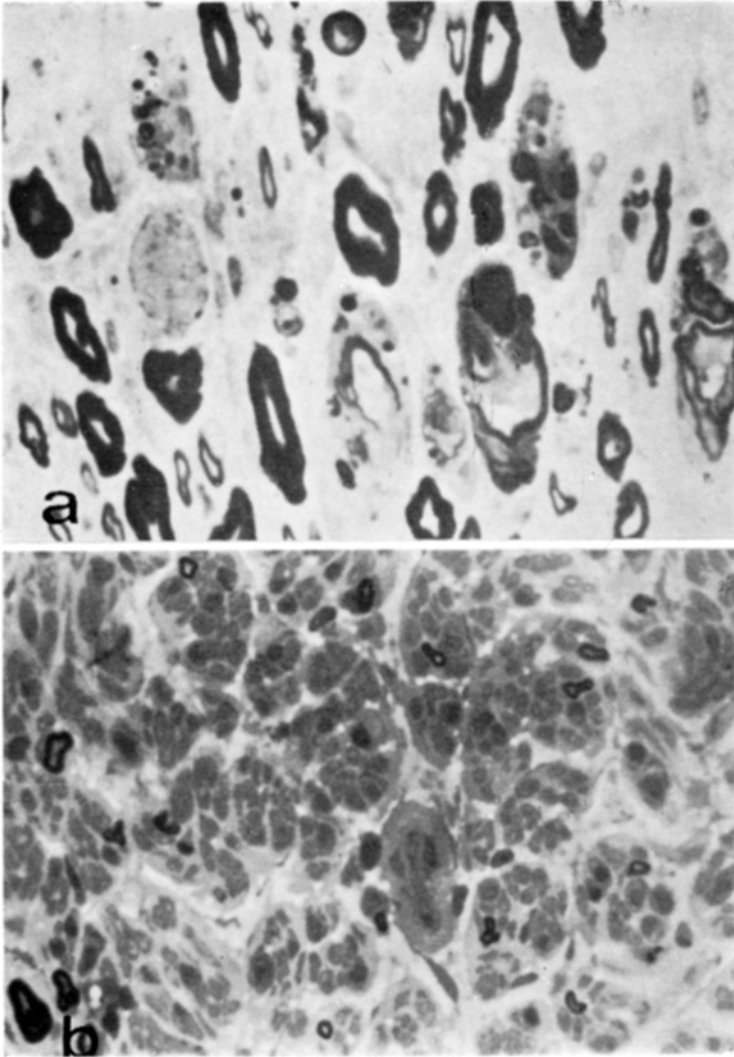
Tabela 2 — Exteriorização clínica das neuropatias.

Biópsias com um diagnóstico clínico = 68		Biópsias com diagnóstico clínico a esclarecer = 10	
Diagn. confirmado = 49	Diagn. não confirmado = 19		
NSMH (I e II) 14	Inconclusivos 8	Conclusivos 6	
Hanseníase 10			
Lúpica 2	DC = EML 2	Diabética 3	
GB crônico 4	ALD 1	Senil 2	
Diabética 6	Eritrofalcemia 1	Carencial 1	
Esclerodermia 1	Colagenose 1		
Senil 1	NSMH 2	Inconclusivos 3	
Paraneoplásica 2	Friedreich 1		
Carencial 3		NSC indeterminada 1	
A. reumatóide 1	Normais 11	Alterações inespecíficas 1	
Hipoglicêmica 1		NSC com perda fibras	
Tóxica 1	DC = NES 1	amielínicas 1	
Porfiria 2	LDM 1		
Hipereosinofilia 1	Etilíco-carencial 1	Normal 1	
	Hanseníase 4		
	EML 1		
	GB 1*		
	Para-neoplásica 1		
	ALD 1**		

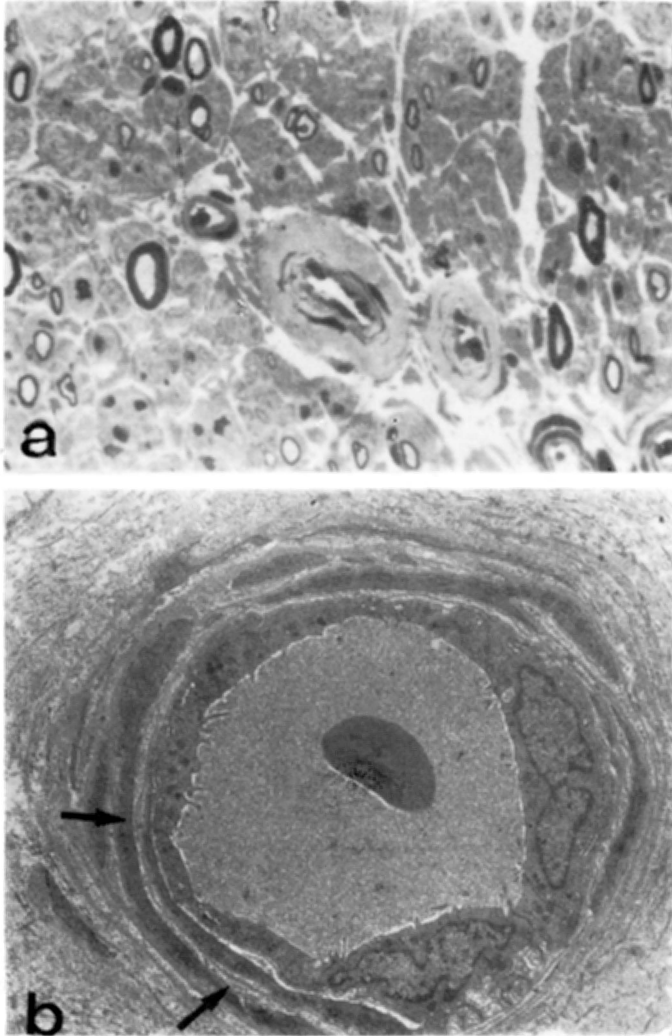
Tabela 3 — Correlação clínico-patológica. NSMH, neuropatia sensitivo-motora hereditária; GB, síndrome de Guillain-Barré; EML, epilepsia mioclônica de Lafora; ALD, adrenoleucodistrofia; NES, nervo epidérmico de Solomon; LDM, leucodistrofia metacromática; NSC, neuropatia sensitiva crônica; DC, diagnóstico clínico; \* biópsia após surto; \*\* necrópsia revelou panencefalite esclerosante sub-aguda.

#### COMENTARIOS

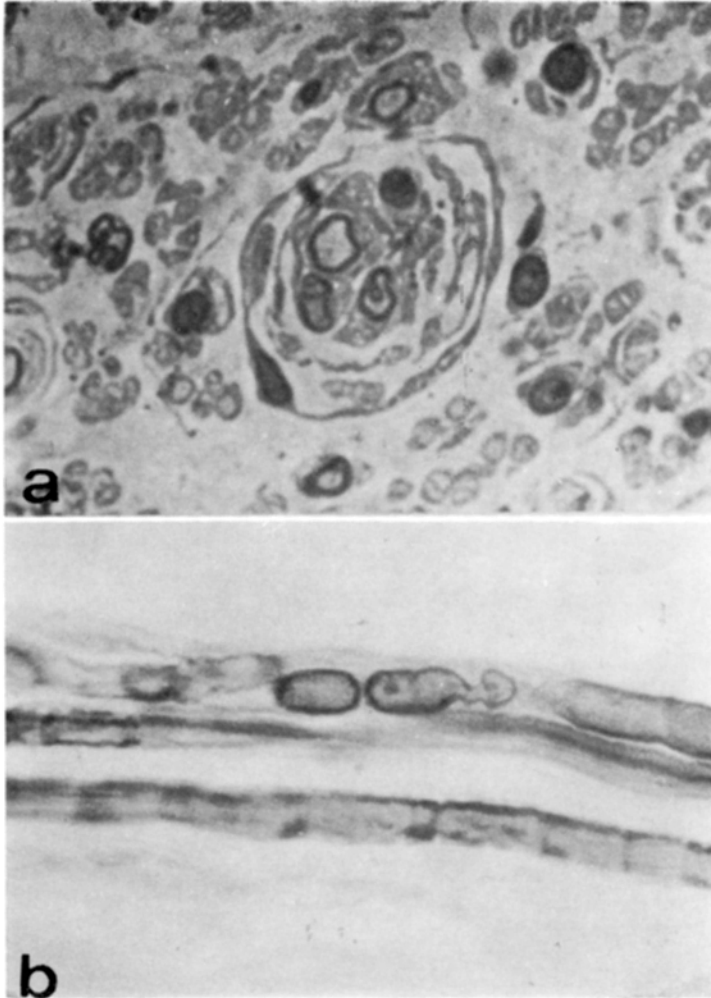
Consideramos que a indicação de biópsia de nervo periférico deve ser orientada para os casos que necessitem de definição nosológica ou confirmação precisa da suspeita clínica. Acreditamos, no entanto, ser da maior importância a existência de condições técnicas atuais para evitar a realização de biópsias que, se processadas apenas para inclusão em parafina, sejam em grande parte inconclusivas devido à grande limitação do método, como documentado por Werneck<sup>13</sup>. Concordamos com o autor que o clínico deve estar ciente da limitação dos laboratórios de anatomia patológica que utilizam apenas os métodos convencionais de parafina. Segundo Asbury e Johnson<sup>1</sup>, embora o material incluído na parafina seja satisfatório quando se procura infiltrado inflamatório, depósito de amilóide ou alterações de vasa vasorum, ela não resulta em preparações que permitam boa avaliação das fibras, o que é possível em cortes semifinos. Comentam ainda que o exame ao microscópio eletrônico só é útil se usado em conjunto com o exame do corte semifino já que, em geral, poucas alterações patológicas de importância diagnóstica serão encontradas no exame ao microscópio eletrônico que já não tenham sido vistas no corte semifino do mesmo local. Fazem exceção os casos em que se procuram alterações específicas (por exemplo, espessamento e duplicação de membrana basal), que só podem ser apreciadas em nível ultraestrutural.



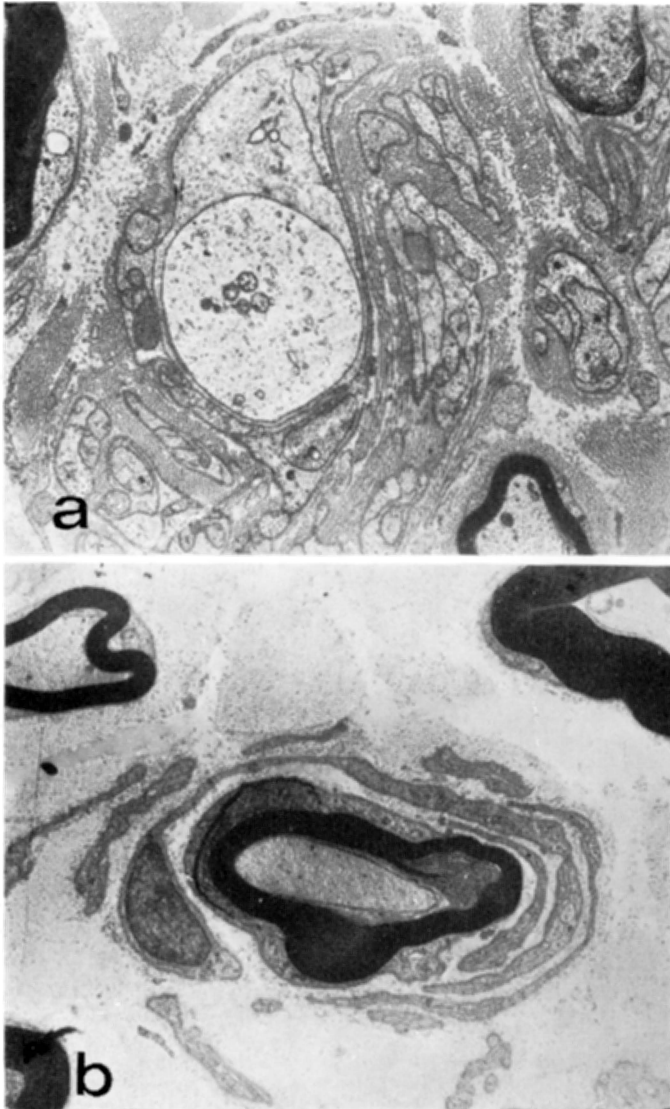
*Fig. 1 — (a) Corte semifino de um dos casos de porfiria mostrando degeneração axonal e mielínica de várias fibras. (Azul de toluidina, 100×); (b) Corte semifino mostrando difusa perda de fibras mielínicas no caso de esclerodermia (Azul de toluidina, 100×).*



*Fig. 2 — (a) Corte semifino mostrando perda de fibras mielínicas e espessamento da parede de vasos endoneurais em um caso de polineuropatia diabética (Azul de toluidina, 100 $\times$ ); (b) Eletromicrografia de vaso endoneural em um caso de neuropatia diabética mostrando duplicação da membrana basal (setas) (4400 $\times$ ).*



*Fig. 3 — (a) Corte semifino mostrando proliferação concêntrica de prolongamentos de células de Schwann ao redor de agrupamento de fibras mielínicas regeneradas em um caso de doença de Charcot-Marie-Tooth; esboços de formações em bulbo de cebola são também observados ao redor de outras fibras (Azul de toluidina, 100×); (b) Fibras isoladas, uma delas exibindo fragmentação do axônio e da mielina constituindo 'ovóides' em um caso de doença de Charcot-Marie-Tooth (Azul de toluidina, 100×).*



*Fig. 4 — (a) Eletromicrografia de um axônio desmielinizado circundado por prolongamentos de célula de Schwann e fibras colágenas em um caso de doença de Charcot-Marie-Tooth (4400X); (b) Eletromicrografia mostrando proliferação concêntrica de prolongamentos de células de Schwann ao redor de fibra mielinica constituindo um bulbo de cebola (4400X).*



O nervo sural é o de escolha para a biópsia, pois ele engloba todos os requisitos que, segundo Dyck e Lofgren<sup>2</sup>, devem ser avaliados na seleção do nervo para a biópsia. Óptamos pela realização da biópsia do nervo em toda a sua espessura em vez da biópsia fascicular porque, embora esta última tenha sido recomendada para minimizar perdas sensitivas pós-operatórias ou desconforto<sup>2,12</sup>, Pollock et al.<sup>10</sup> seguiram pacientes por 5 ou mais anos após a biópsia e não acharam qualquer vantagem da biópsia fascicular sobre a de toda a espessura do nervo, no que diz respeito à perda sensitiva. Concluíram eles que o último procedimento era mais simples e permitia avaliação mais completa do nervo. Consideramos importante, ainda, o uso de métodos morfométricos e quantitativos para determinar a densidade das fibras, a perda seletiva de um determinado tipo de fibra, o comprimento internodal e a contagem de fibras amielínicas. Tais métodos têm sido realizados de rotina em muitos centros, o que tem sido facilitado pelo uso de analisadores de imagem<sup>5</sup>. Enfatizamos a necessidade de serem estabelecidos os critérios de normalidade do nervo sural, o que já foi descrito inclusive nas diversas idades<sup>6-9</sup> pois, como se sabe, redução do número de fibras, degeneração axonal, desmielinização e remielinização podem ser normalmente encontradas em pacientes idosos. Apesar disso, achamos de utilidade estabelecermos nossos próprios controles para as diversas idades, o que temos conseguido pela retirada do nervo sural de necrópsias de pacientes sem história ou sintomatologia relacionada com os nervos periféricos e, nos quais, o nervo pode ser retirado em curto espaço de tempo entre o óbito e o início da necrópsia. A microdissecção de fibras é necessária para o estudo da natureza e topografia das alterações do axônio e da mielina ao longo de fibras isoladas, o que dificilmente é conseguido num corte histológico, mesmo quando muito bem orientado longitudinalmente.

No que diz respeito aos nossos resultados, observamos que coincidem com os de Dyck et al.<sup>3</sup> que, usando técnicas semelhantes às nossas, conseguiram a classificação das neuropatias em 76% dos pacientes. Destas, 42% eram doenças hereditárias, 21% eram poliradiculoneuropatias inflamatórias desmielinizantes, 13% tinham neuropatias associadas a outras desordens e 24% não foram diagnosticadas. Também em nosso material 29,5% não foram diagnosticadas seja porque o nervo estava com padrão morfológico dentro dos limites de normalidade ou porque as alterações encontradas eram discretas e insuficientes para a conclusão diagnóstica ou, ainda, a perda axonal era tão severa, indicando uma neuropatia em estágio final, que era difícil estabelecer sua etiologia. Os autores mencionados enfatizam que, em muitos dos casos de neuropatias hereditárias, o diagnóstico foi possível a partir da avaliação da família dos pacientes, o que também aconteceu em nossos casos.

Em relação ao estudo de Werneck<sup>13</sup>, no qual técnicas convencionais foram usadas, a conclusão diagnóstica em 22% dos casos contrasta com nossos achados de 70% de casos diagnosticados, diferença que atribuímos em grande parte às técnicas utilizadas. E ainda, em nossa casuística, não incluímos neuromas e neurofibromas, os quais estavam incluídos nos casos diagnosticados de Werneck<sup>13</sup>. Analisando nossa incidência de normalidade (15,4%), comparada à desse autor (37%), fica demonstrada mais uma vez a vantagem do método, pois alterações sutis, tais como perda discreta de fibras, só são aparentes em cortes semifinos e, como citamos anteriormente, se tivéssemos analisado apenas nosso material incluído em parafina teríamos chegado a um número muito menor de diagnósticos, dado que muitos dos nervos pareciam normais histologicamente.

As polineuropatias foram mais frequentes que as mononeuropatias o que era de se esperar já que, como em outras séries<sup>3,11</sup>, as doenças hereditárias constituíram a maior parte das neuropatias e se apresentaram como polineuropatias.

Concluimos comentando que, uma vez indicada a biópsia, esta deve ser realizada com o mínimo de trauma, devendo-se levar em consideração a rapidez da fixação para permitir boa preservação do material já que artefatos, principalmente na morfologia da mielina, podem prejudicar a análise do material. De qualquer forma é importante ficar claro que o exame completo de uma biópsia de nervo é procedimento complexo, que consome o tempo do patologista, daí dever ser praticado levando-se em consideração todos os dados mencionados, para que possamos obter, através desse exame, o máximo de informações possíveis.

*Agradecimentos* — Gostaríamos de agradecer às Srtas. Rita de Cassia da Costa Cunha e Suely Menezes da Cunha pela realização dos cortes semi e ultrafinos e à Srta. Rosely da Costa Cunha pelo trabalho fotográfico.

## REFERÊNCIAS

1. Asbury AK, Johnson PC — Pathology of Peripheral Nerve. Saunders, Philadelphia, 1978.
2. Dyck PJ, Lofgren EP — Nerve biopsy: choice of nerve, method, symptoms and usefulness. *Med Clin N Amer* 52:885, 1968.
3. Dyck PJ, Oviatt KF, Lambert EH — Intensive evaluation of referred unclassified neuropathies yields improved diagnosis. *Ann Neurol* 10:222, 1981.
4. Dyck PJ, Karnes J, Lais A, Lofgren EP, Stevens JC — Pathologic alterations of the peripheral nervous system of humans. In Dyck PJ, Thomas PK, Lambert EH, Bunge R: *Peripheral Neuropathy*. Saunders, Philadelphia, 1984.
5. Friede RL — Computer editing of morphometric data on nerve fibers: an improved computer program. *Acta Neuropath* 72:74, 1986.
6. Jacobs JM, Love S — Qualitative and quantitative morphology of human sural nerve at different ages. *Brain* 108:897, 1985.
7. Ochoa J, Mair WGP — The normal sural nerve in man: I. Ultrastructure and number of fibres and cells. *Acta Neuropath* 13:197, 1969.
8. Ochoa J, Mair WGP — The normal sural nerve in man: II. Changes in the axons and Schwann cells due to ageing. *Acta Neuropath* 13:217, 1969.
9. O'Sullivan DJ, Swallow M — The fibre size and content of the radial and sural nerves. *J Neurol Neurosurg Psychiat* 31:467, 1968.
10. Pollock M, Nukada H, Taylor P, Donaldson I, Carroll G — Comparison between fascicular and whole sural nerve biopsy. *Ann Neurol* 13:65, 1983.
11. Prineas J — Polyneuropathies of undetermined cause. *Acta Neurol Scand* 46 (Suppl 44):5, 1970.
12. Thomas PK — The quantitation of nerve biopsy findings. *J Neurol Sci* 11:285, 1970.
13. Werneck LC — Biópsia de nervos periféricos: análise de 89 casos. *Arq Neuro-Psiquiat (São Paulo)* 46:22, 1988.