

DOENÇA DE LAFORA

DIAGNÓSTICO PELA BIOPSIA DE MÚSCULO ESQUELÉTICO

RELATO DE CASO

ALZIRA ALVES DE SIQUEIRA CARVALHO*, VIVIANA PALOU**,
MARIA SHEILA GUIMARÃES ROCHA*, SONIA MARIA DOZZI BRUCKI*, MEIRE ARGENTONI*

RESUMO - Uma paciente de 16 anos apresentava epilepsia mioclônica causada pela doença de Lafora. A biopsia muscular mostrou padrão vacuolar nas fibras musculares com as reações nicotinamida adenina tetrazolium redutase desidrogenase, hematoxilina-eosina e PAS. O aspecto morfológico permite o diagnóstico através da biopsia muscular. Este é um procedimento menos agressivo que a biopsia de fígado e de cérebro. A microscopia eletrônica deve ser reservada para casos nos quais as alterações musculares à microscopia óptica são muito discretas deixando dúvidas quanto ao diagnóstico.

PALAVRAS-CHAVE: doença de Lafora, músculo, biopsia.

Lafora's disease: diagnosis by muscle biopsy (case report)

ABSTRACT - A 16-year-old female patient had myoclonic epilepsy caused by Lafora's disease. Muscle biopsy showed a prominent splitting pattern in muscle fibers with the nicotinamide adenine nucleotide dehydrogenase-tetrazolium reductase reaction, hematoxylin-eosin, and PAS stains. This morphologic appearance of the tissue permits diagnosis using the benign technique of muscle biopsy. The ultrastructural examination of muscle may be necessary to confirm the diagnosis of Lafora myoclonus epilepsy if light microscopical findings are equivocal.

KEY WORDS: muscle, biopsy, Lafora disease.

A doença de Lafora é desordem rara, autossômica recessiva, com início na adolescência precoce, entre 6 e 19 anos de idade, com sobrevida média de 10 anos¹⁻³. O diagnóstico pode ser feito através da biopsia de fígado, pele, músculo esquelético e cérebro, caracterizando-se pela presença dos "corpos de Lafora" neste último ou, pela presença de estruturas amorfas glicogênio-símiles no fígado, pele ou músculo esquelético^{1,4-6}. Segundo Neville et al.¹ em 1891, Unverricht descreveu a forma familiar da epilepsia mioclônica; em 1911, Lafora descreveu as "inclusões intraneuronais" no sistema nervoso central como estruturas de diferentes tamanhos e morfologia. O estudo das alterações musculares na doença de Lafora teve avanço importante a partir de 1974, quando a biopsia muscular passou a ser considerada como procedimento útil em seu diagnóstico^{1,5-7}.

As epilepsias mioclônicas sintomáticas, compreendem grande número de enfermidades que não podem ser distinguidas clinicamente. A doença de Lafora caracteriza-se pelo aparecimento precoce de crises epiléticas, a maioria mioclônicas, seguidas por alterações piramidais, cerebelares e extrapiramidais. Sabe-se que existe acúmulo anormal de polissacarídes em diferentes tecidos; porém, a alteração metabólica permanece ainda indefinida⁸. O diagnóstico definitivo só é possível através de biopsia^{1,4-8}.

*Serviço de Neurologia Clínica do Hospital Santa Marcelina; **Bióloga e assistente técnica da Myogenética – Laboratório de Doenças Neuromusculares. Aceite: 21 agosto 200

Dra. Alzira Alves de Siqueira Carvalho - Rua Jacques Felix 326/15 - 04509-001 São Paulo SP - Brasil.

Com o presente caso permitimo-nos sugerir que a biopsia muscular pode ser utilizada como instrumento diagnóstico na doença de Lafora, considerando que os achados de biopsia são próprios à doença, empregadas as colorações histoquímicas específicas. Além disso, a biopsia muscular possibilita o diagnóstico através de procedimento de fácil execução e menos agressivo que a biopsia hepática ou cerebral. Apresenta ainda como vantagem adicional, a possibilidade de realizar o diagnóstico diferencial com outras enfermidades que também cursam com epilepsia mioclônica, como as citopatias mitocondriais, glicogenoses / lipidoses.

CASO

Tratava-se de paciente do sexo feminino com 16 anos, natural de Óbidos(PA), vista no Serviço de Neurologia do Hospital Santa Marcelina em maio de 1999. Aos 10 anos, a paciente apresentou a primeira crise convulsiva durante jogo de videogame iniciando uso de fenobarbital e desde então, começou a apresentar mudanças no comportamento tornando-se rebelde. Após 6 meses deste evento, apresentou nova crise convulsiva tônico-clônica generalizada novamente durante uso de videogame. As crises epiléticas passaram a ocorrer com intervalo de aproximadamente 2 meses apesar do uso regular de anticonvulsivantes. A queda no desempenho escolar foi observada a partir dos 13 anos. Aos 14 anos passou a apresentar dificuldade para deambular e tremor, o último observado principalmente na escrita e durante a alimentação. As crises epiléticas tornaram-se mais frequentes e de difícil controle apesar do uso regular de fenobarbital 200 mg/dia, carbamazepina 600 mg/dia e clonazepam 1 mg/dia. As crises caracterizavam-se por versão óculo-cefálica para direita, movimentos involuntários do membro superior direito e generalização secundária, além de mioclonias generalizadas, que ocorriam tanto espontaneamente como desencadeadas por estímulos externos visuais e táteis. Aos 15 anos mostrava-se totalmente dependente para realizar as atividades da vida diária. Os antecedentes obstétricos revelavam gestação sem intercorrência, tendo a paciente nascido de parto normal, a termo, com apresentação pélvica. Apresentou sarampo aos 4 anos. Dos antecedentes familiares destacam-se que os pais são primos em terceiro grau e que não há nenhum outro membro da família com quadro clínico semelhante.

Quando admitida no Serviço de Neurologia do Hospital Santa Marcelina, a paciente encontrava-se consciente, pouco colaborativa ao exame, desatenta, não obedecia ordens verbais simples e, apesar de olhar ao chamado verbal, parecia não enxergar e não estabelecia contato com o examinador. O exame clínico geral não mostrava anormalidades. A força muscular estava aparentemente preservada; os reflexos profundos mostravam-se hipoativos e simétricos; ocorria tremor céfálico em negação e tremor das mãos durante os movimentos. Além disso, era evidente a ataxia de tronco. Observou-se nistagmo espontâneo horizontal e rotatório, e a fundoscopia convencional não revelou alterações. As demais provas do exame neurológico ficaram prejudicadas devido a pouca colaboração da paciente.

Os seguintes exames laboratoriais achavam-se dentro dos limites normais: hemograma, glicemia de jejum, uréia, creatinina, transaminases, bilirrubinas, fosfatase alcalina, gama GT, creatinofosfoquinase, cobre sérico, ceruloplasmina. O exame de liquor, incluindo imunoeletroforese de proteínas, não evidenciou alterações significativas. Os exames de imagem, seja RX de tórax, tomografia computadorizada e ressonância magnética de crânio foram normais. O exame de potencial evocado visual foi impossível de ser realizado por absoluta falta de colaboração da paciente. O exame de eletrencefalografia (EEG), realizado em sono induzido por benzodiazepínico, mostrou atividade paroxística caracterizada por ondas agudas de projeção na região temporal do hemisfério cerebral esquerdo. Foi realizada biopsia do músculo biceps braquial esquerdo.

O critério diagnóstico para o caso em questão foi baseado no quadro clínico de crises epiléticas tônico-clônicas generalizadas e crises mioclônicas iniciando-se na adolescência precoce, ataxia, disartria e amaurose associada a demência progressiva. Os estudos laboratoriais que confirmaram o diagnóstico foram as anormalidades no EEG e os achados da biopsia muscular, esta última revelando material PAS positivo no músculo esquelético, idêntico ao reportado em poucos casos previamente publicados.

Microscopia óptica - Foi obtido do músculo biceps braquial esquerdo fragmento de aproximadamente 0,4x0,8x0,6 cm. Seções de 8 micra de espessura, foram cortadas em criostato a 30 graus Celsius negativos e preparadas usando métodos padrões de histologia e histoquímica. As seguintes colorações foram realizadas: hematoxilina-eosina, tricromo de Gomori modificado, ácido periódico de Schiff (PAS), "oil red O" (ORO), desidrogenase succínica (SDH), "NADH-tetrazolium redutase" (NADH), "alfa-glicerofosfato desidrogenase" (menadiona), ATPase 4,3 e 9,4, fosfatase ácida, citocromo C oxidase e vermelho do Congo. Não foi realizada coloração com diaminobenzidina-peroxidase e sua posterior inibição com 6-aminotriazol por dificuldades técnicas.

Microscopia óptica com histoquímica - Cortes transversais do músculo biceps mostraram discreta variação no calibre das fibras musculares sem proliferação do tecido conjuntivo endomisial e perimisial. Fusos neuromusculares não foram visualizados (Fig. 1). A maior parte das fibras musculares, continha numerosas estruturas arredondadas, com aspecto granular medindo cerca de 1-2 micra que se coraram em cor púrpura com hematoxilina-

eosina e com tricromo de Gomori modificado (Figs. 1, 2 e 3). Em distribuição semelhante, acúmulos densos de diformazan naquelas estruturas arredondadas foram demonstrados com NADH (Fig. 4). Leve atividade da succinato desidrogenase estava presente na periferia dos depósitos mas, não em seu interior. Os depósitos eram positivos com PAS (Fig 5). As estruturas mencionadas eram mais numerosas e maiores nas fibras do tipo I. A fosfatase ácida mostrou positividade somente ao redor dos depósitos. As demais colorações não trouxeram novos dados.

DISCUSSÃO

O presente caso, mesmo sem biopsia de cérebro, biopsia de fígado ou biopsia de pele, não nos deixa dúvidas quanto ao diagnóstico de doença de Lafora. Os achados clínicos e as alterações no músculo esquelético são consistentes com o que foi reportado anteriormente.

As alterações encontradas no EEG não foram típicas da doença. Uma explicação possível seria o fato de que a paciente realizou o EEG durante sedação por benzodiazepínico devido aos movimentos involuntários (mioclonias) que impossibilitaram sua realização em vigília, devido aos frequentes artefatos técnicos. Possivelmente, o uso de benzodiazepínico, por aumentar a atividade beta, poderia ter ocultado as espículas que são habitualmente encontradas nesta patologia⁹. Porém cabe considerar que o sono sensibiliza o aparecimento de ondas agudas, que podem ser observadas na doença de Lafora, de modo focal ou multifocal¹⁰.

Com relação à biopsia muscular, alguns autores relatam alterações próprias da doença que permitem um diagnóstico em vida, sem a obrigatoriedade de utilizarmos procedimentos mais agressivos como biopsia cerebral e de fígado^{1,5,7}. Carpenter e Karpati⁶ relataram a utilidade da biopsia de glândula sudorípara para o diagnóstico da doença de Lafora; entretanto, esse procedimento não excluiria uma enfermidade mitocondrial. Não há relatos na literatura quanto a existir correlação entre o tempo de evolução da doença e a intensidade das alterações encontradas no músculo. Assim, recomenda-se o estudo por microscopia eletrônica naqueles casos em que os achados na microscopia óptica não se mostrarem conclusivos¹. O achado anátomo-patológico mais característico é a presença “inclusiones intraneuronais de Lafora” no cérebro. Este material foi identificado como polissacarídes em diferentes estudos. Material semelhante foi encontrado no músculo cardíaco, fígado e músculo esquelético⁴.

Segundo Coleman et al.⁷, na doença de Lafora parece haver um distúrbio metabólico generalizado de depósito, que poderia ser classificado como uma “doença de depósito de glicogênio”. A reação positiva pelo PAS é a característica marcante nos achados de biopsia; entretanto, não é específica da doença de Lafora⁷. Cinco outras glicogenoses podem causar depósito de glicogênio anormal no músculo esquelético ou ausência específica de uma das enzimas da via glicolítica: tipo II ou doença de Pompe (deficiência da maltase ácida); tipo III ou doença de Cori-Forbes (deficiência da desramificação); tipo IV ou doença de Andersen (deficiência da enzima de ramificação); tipo V ou doença de McArdle (deficiência da fosforilase muscular); tipo VII ou doença de Tarui (deficiência da fosfofrutoquinase)^{7,11}.

Os defeitos enzimáticos acima descritos, foram excluídos no presente caso pelo quadro clínico distinto e evolução. Vale relembrar que os vacúolos observados no espécime estudado foram negativos para fosfatase ácida comprovando que os depósitos vistos não são lisossomos.

Em relação às citopatias mitocondriais, algumas observações são importantes, considerando que o quadro clínico e evolução podem ser mesmos da doença de Lafora. Apesar da reação pelo tricromo de Gomori modificado não mostrar fibras rajadas de vermelho, achado esse característico das desordens mitocondriais, somente as reações histoquímicas (NADH, menadiona, COX e, mais especificamente, SDH), poderiam esclarecer a natureza daquelas estruturas, afirmando ou excluindo que se tratassem de mitocôndrias. A coloração pelo NADH, mostra um depósito denso de diformazan nas estruturas arredondadas. Segundo o mecanismo da produção de energia, esse depósito seria compatível com a participação do transporte de elétrons na formação daquelas estruturas⁵. Entretanto, a reação com SDH não foi positiva no interior dessas estruturas e sim na periferia permitindo-nos concluir que não eram mitocôndrias. A reação pelo ORO mostrou que os depósitos não reagiram positivamente, o que possibilita afastar uma alteração no metabolismo dos lípidos. Mas afinal, qual a real natureza desses depósitos?

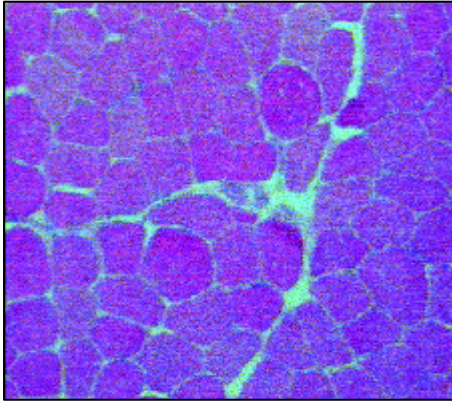


Fig 1. Hematoxilina-eosina.

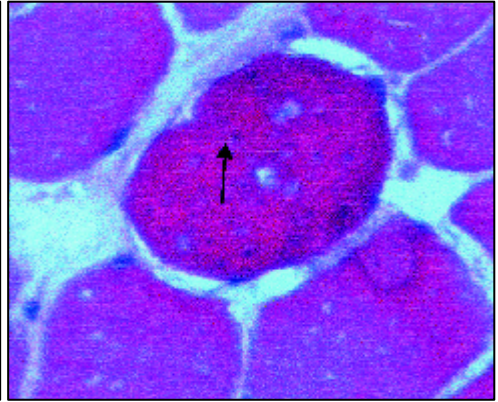


Fig 2. H.E.: fibra com numerosas estruturas arredondadas de cor púrpura.

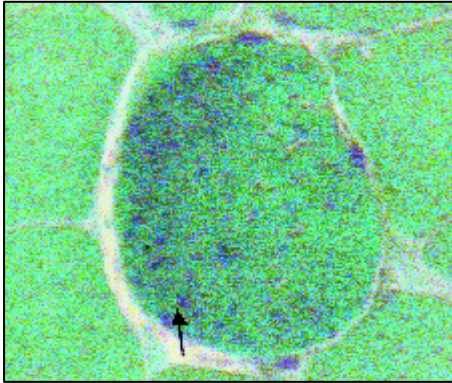


Fig 3. Tricromo de Gomori.

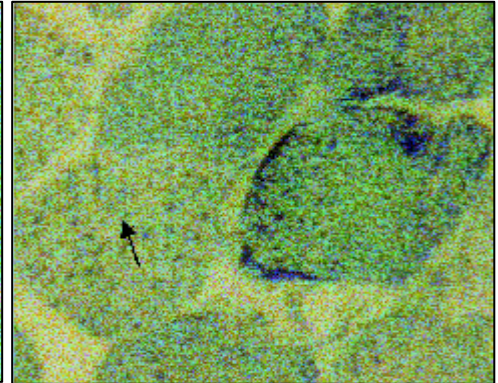


Fig 4. NADH.

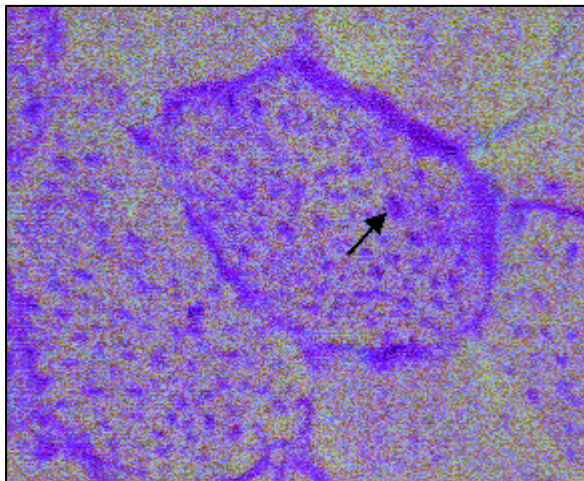


Fig 5. PAS

Apesar de não ter sido realizada a reação pela diaminobenzidina peroxidase pH6 e pH9, é importante ressaltar seu papel na identificação dessas estruturas. Segundo Carpenter et al.⁵, acredita-se que esses depósitos sejam peroxissomos. A catalase, enzima presente no músculo normal, é um marcador universal para os peroxissomos⁵. A reação diaminobenzidina peroxidase no pH 9 mostra uma forte reatividade nas estruturas arredondadas. Esta atividade foi quase completamente inibida pelo 6-aminotriazol, indicando que a reação pela diaminobenzidina foi causada pela atividade peroxidática da catalase dentro das organelas. A reação pela diaminobenzidina peroxidase no pH 6 mostra atividade granular e difusa nas células musculares do músculo normal com ambas atividades mais intensas nas fibras do tipo I. Essa atividade mais intensa, granular, é decorrente da atividade peroxidática da metade heme da citocromo C oxidase. A atividade homogênea é atribuída à ação peroxidática da mioglobina. Já no pH 9, mitocôndria e mioglobina não reagem e, portanto, a atividade presente nos depósitos deve ser decorrente da atividade da catalase nos peroxissomos^{5,12,13}. DeDuvec e Balduin acreditam que, em alguns tecidos, os peroxissomos tenham um papel na gliconeogênese⁸. Visto que, o material encontrado na doença de Lafora é composto por carboidratos como a reação pelo PAS positivo demonstra, a participação dos peroxissomos na gênese do material encontrado é justificada.

As mioclonias ocorrem em variadas desordens, as quais não podem ser diferenciadas clinicamente. A doença de Lafora é uma doença genética cujo defeito enzimático permanece obscuro apesar dos achados que acabamos de expor. O diagnóstico ainda depende da biopsia. A biopsia cerebral e hepática, apesar de diagnósticas, são altamente invasivas, com índices de complicações e dificuldades técnicas que não podem deixar de ser consideradas.

Apesar de não haver estudos clínicos correlacionando os achados da biopsia muscular com o tempo de evolução da doença, Carpenter et al. afirmam que, nas fases precoces da doença, os achados no músculo esquelético podem ser duvidosos⁵. O caso relatado é o primeiro de nosso serviço em que optamos pelo diagnóstico através da biopsia muscular evitando a biopsia de fígado e biopsia cerebral já que a biopsia retal não é utilizada⁶.

Frente ao exposto sugerimos a realização da biopsia muscular com microscopia óptica para definir o diagnóstico excluindo outras enfermidades e evitando procedimentos mais agressivos. A reação pela diaminobenzidina peroxidase deve ser feita sempre que possível, pois corrobora os achados descritos. A microscopia eletrônica só se fará necessária naqueles casos em que a microscopia óptica deixar dúvidas.

REFERÊNCIAS

1. Neville HE, Brooke MH, Austin JH. Studies in myoclonus epilepsy (Lafora body form). Arch Neurol 1974;30:466-474.
2. Roger J, Bureau M, Dravet C. Les épilepsies généralisées secondaires. Paris, Encycl Méd Chir, Neurologie, 17044 M⁰, 11-1984, 16p.
3. Bonduelle M, Degos CF. Les mioclonies. Paris, Encycl Méd Chir, Neurologie, 17009 A¹⁰:6-1988, 8p.
4. Schwarz GA, Yanoff M. Lafora's disease. Arch Neurol 1965;12:172-188.
5. Carpenter S, Karpati G, Andermann F, Jacob JC, Andermann E. Lafora's disease: peroxisomal storage in skeletal muscle. Neurology 1974;24:531-538.
6. Carpenter S, Karpati G. Sweat gland duct cells in Lafora disease: diagnosis by skin biopsy. Neurology 1981;31:1564-1568.
7. Coleman DL, Gambetti P, DiMauro S, Blume RE. Muscle in Lafora disease. Arch Neurol 1974;3:396-406.
8. DeDuvec C, Baudhuin P. Peroxisomes (microbodies) and related particles. Physiol Rev 1966;46:323-357.
9. Glaze DG. Drug effects In Daily DD, Pedley TA. Current practice of clinical electroencephalography. 2 Ed. London: Raven Press, 1990:489-512.
10. Vas AG, Cracco JB. Diffuse encephalopathies In Daily DD, Pedley TA. Current practice of clinical electroencephalography. 2Ed. London: Raven Press, 1990:489-512.
11. Dubowitz V. Muscle disorders in childhood. 2Ed. London: Saunders, 1995:177-210.
12. Novikoff AB, Goldfisher S. Visualization of peroxisomes (microbodies) and mitochondria with diaminobenzidine. J Histochem Cytochem 1969;17:675-680.
13. Goldfisher S. Further observations on the peroxidatic activities of microbodies (peroxisomes). J Histochem Cytochem 1969;17:681-685.