UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
DISCIPLINA DE CONCLUSÃO DE CURSO EM MEDICINA VETERINÁRIA

ACHADOS HISTOPATOLÓGICOS E IMUNO-HISTOQUÍMICOS DA DOENÇA DE LAFORA EM UM CÃO

Cristine Mari

Porto Alegre
Julho 2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
DISCIPLINA DE CONCLUSÃO DE CURSO EM MEDICINA VETRINÁRIA

ACHADOS HISTOPATOLÓGICOS E IMUNO-HISTOQUÍMICOS DE UM CÃO COM DOENÇA DE LAFORA

Aluno: Cristine Mari

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado à Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do grau de Médico Veterinário

Orientador: Saulo Petinatti Pavarini

Co-orientador: Paula Cristina S. Gonzales

Porto Alegre
2014/01

RESUMO

A doença de Lafora é uma doença neurodegenerativa de herança autossômica recessiva que não possui tratamento curativo conhecido. Relata-se os achados clínicos, patológicos e imuno-histoquímicos de um canino, Pastor Alemão, de 12 anos de idade com doença de Lafora. Os sinais clínicos apresentados pelo cão foram de nistagmo bilateral, ataxia, cabeça lateralizada para esquerda, além de crises convulsivas refratárias a tratamento. Na necropsia, não foram observadas alterações macroscópicas significativas. Histologicamente foram observados inúmeros corpos de inclusão basófilos, esféricos, localizados por todo encéfalo e confinados aos neurónios e seus processos. Esses corpos eram mais numerosos na camada molecular do cerebelo. Esses foram corados pelas técnicas histoquímicas de azul de alcian, prata metenamina de Grocott e ácido periódico de Schiff. Ao exame imuno-histoquímico houve marcação no em torno dos corpos basófilicos para neurofilamento, e os mesmo foram negativos para GFAP e NSE.

Palavras-Chave: neurodegeneração; histologia; imuno-histoquímica.

ABSTRACT

Lafora disease is a recessive neurodegenerative disease autosomal that has no known curative treatment, and invariably fatal. We report the clinical, pathological and immunohistochemical findings of a canine, German Shepherd, twelve-year-old with Lafora disease. The clinical signs presented by the animal were bilateral nystagmus, ataxia, head lateralized to the left and a staff of several seizures per day. At necropsy, no significant gross lesions were observed. Histologically numerous basophilic inclusion bodies, spherical, located throughout the brain and confined to neurons and their processes were observed. These were positively stained with Alcian Blue, PAS and Grocott. By immunohistochemical examination was no labeling at around basophilic bodies for neurofilament.

Keyword: *neurodegeneration; histology; Immunohistochemistry.*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 5
2 MATERIAL E MÉTODOS 9
3 RESULTADOS 10
4 DISCUSSÃO 12
5 CONCLUSÕES 13
REFERÊNCIAS 14

1 INTRODUÇÃO

Em medicina veterinária, distúrbios de movimento podem ser categorizados como hipercinéticos (atividade muscular excessiva) ou hipocinéticos (atividade muscular reduzida). Mioclonia é uma forma de hipercinesia, caracterizada por contrações musculares bruscas, rápidas e involuntárias que afetam um músculo ou grupo de músculos. Essa pode ser positiva quando refere-se a contração resultante de repetidos ataques de contração muscular, ou negativa quando ocorre flexibilização súbita e frequente na contração muscular tônica. Mioclonias também podem ser esporádicas (benignas ou uma forma de epilepsia), ou repetitivas aonde podem ser classificados de acordo com sua ocorrência em constante, postural, episódica, ou em repouso. Na medicina humana, no entanto, mioclonias podem ser categorizadas de acordo com a apresentação clínica, origem anatômica ou etiologia. Anatomicamente, elas são classificadas como corticais, talâmicas, reticulares, ou da medula espinhal. Quanto a etiologia, são classificadas em fisiológicas, essenciais, epilépticas, ou sintomáticas (WEBB et al., 2009).

A doença de Lafora é uma enfermidade neurodegenerativa de herança autossômica recessiva, que cursa com epilepsia mioclônica progressiva, descrita pela primeira vez em 1911 pelo neurologista espanhol Gonzalo Rodriguez Lafora (LOPEZ, 2011). Esta enfermidade se caracteriza pela presença de acúmulos intracelulares de poliglicanos, também chamados corpos de Lafora (CL). Estes corpos são encontrados em muitos tecidos, especialmente em órgãos como sistema nervoso central, fígado, pele, rim, coração, músculo esquelético e retina o que sugere que a doença possa ser devido a uma desordem generalizada relacionada com a síntese ou degradação do glicogênio (LOPEZ, 2011). O cérebro de mamíferos contém glicogênio em concentrações muito inferiores as encontradas em outros tecidos, tais como fígado ou músculo esquelético. A proporção entre o glicogênio de fígado / músculo esquelético / cérebro é de 100:10:1. O glicogênio do cérebro se encontra quase exclusivamente nos astrócitos, enquanto que os neurônios não o acumulam. É aceito que o sistema nervoso central é dependente de glicose como substrato energético e que depende da circulação sistêmica para obter um fornecimento constante e ininterrupto de glicose, visto que o glicogênio contido no cérebro seria suficiente apenas durante alguns minutos. Embora a função fisiológica deste glicogênio não tenha sido completamente esclarecida, lhe foram designadas funções importantes como fornecedor de substratos energéticos em condições de hipoglicemia Admite-se que, nestas condições, o

glicogênio dos astrócitos forneceria aos neurônios um substrato energético adicional ao suplemento de glicose. Uma série de observações levaram a conclusão de que o conteúdo de glicogênio no cérebro aumenta durante o sono e anestesia, com a consequente mobilização desse polissacarídeo para despertar ou retornar a consciência. Também tem sido observado que a estimulação do cérebro induz glicogenólise, fato que relaciona a atividade fisiológica neuronal com a utilização de glicogênio. Esta glicogenólise ocorre durante períodos de aumento da demanda energética no cérebro, mesmo em situações de normoglicemia. Portanto, embora os neurônios não acumulem glicogênio, se beneficiam das reservas armazenadas em astrócitos (VÍLCHEZ; DE CÓRDOBA; GUINOVART, 2009). Desta forma, podemos concluir que os neurônios evitam acumular glicogênio a todo custo, visto que o polissacarídeo desencadeia nessas células mecanismos de morte. Por outro lado, os astrócitos, células que normalmente acumulam glicogênio em grande parte para atender às demandas energéticas dos neurônios, não morrem quando são forçados a acumular maior quantidade de glicogênio (VÍLCHEZ; DE CÓRDOBA; GUINOVART, 2009).

Em humanos a doença de Lafora é provocada por uma mutação nos genes EPM2A ou EPM2B, que codificam para as proteínas laforina e malina, respectivamente. A função destas proteínas é pouco conhecida. Recentemente, no entanto, tem sido demonstrado que a deficiência de laforina leva à elevação da fosforilação de glicogênio que resulta em polissacarídeos pouco-ramificados de glicogênio intracelular ao longo de uma ampla variedade de tecidos, incluindo sistema nervoso central, pele, coração, músculo, baço, linfonodos, retina e fígado (WEBB et al., 2009). Em cães a doença têm sido associada com mutações no gene EPM2B (MÁRQUEZ et al., 2010).

Laforina é uma proteína de 331 aminoácidos com um domínio para ligação de carboidrato, na sua extremidade N-terminal, que promove a ligação da proteína à região de glicogênio. Na região C-terminal apresenta um domínio fosfatase de especificidade dupla capaz de desfosforilar serinas, treoninas e tirosinas. É encontrada principalmente no citosol associada a polirribossomos e retículo endoplasmático (LOPEZ, 2011). A mutação desta proteína provavelmente é a causa do acumulo de poliglicanos ao redor do núcleo de neurônios e dendritos por falha no seu transporte e degradação. Os corpos de Lafora são patognomônicos da doença, mas pode ser difícil diferencia-los de corpora amilacea no sistema nervoso central dos idosos (BÁEZ; JURADO; GARCÍA, 2005). Para tal, é necessário compará-los quanto a distribuição no

sistema nervoso central, localização celular e imuno-histoquímica negativa para NSE e GFAP no caso dos CL (MÁRQUEZ et al., 2010).

Malina é a segunda proteína conhecida implicada na doença. Possui 395 aminoácidos, a qual apresenta um domínio RING (really interesting new group of proteins) e seis domínios NHL. Os domínios RING são característicos de uma classe de E3 ubiquitina ligase, enquanto domínios NHL formam uma hélice β seis folhas e estão envolvidos em interações entre proteínas (LOPEZ, 2011).

Os pacientes com mutações em laforina ou malina são neurologica e histologicamente indistinguíveis, oque sugere que ambas as proteínas estão envolvidos nas mesmas rotas. No entanto, os pacientes associados com mutações no gene EPM2A parecem ter um desenvolvimento clínico mais grave, visto que os pacientes com deficiência EPM2B tendem a viver mais do que aqueles com defeitos em EPM2A (LOPEZ, 2011). Epilepsia ocorre em 1% dos humanos e é a doença neurológica mais comum em crianças. A maioria das epilepsias resultam de um circuito neuronal anormal ou de uma excitabilidade, e a maioria das convulsões podem ser controladas com medicamentos. Em 1% das epilepsias mioclônicas progressivas epilépticas (PMEs), convulsões intratáveis com a proeminência de crises mioclônicas são associadas com a degeneração cortical progressiva após um período de desenvolvimento normal do cérebro (MINASSIAN, 2001). As convulsões que ocorrem na doença de Lafora se caracterizam por um aumento da frequência e impossibilidade de tratamento, tornando o estatus epiléptico frequente no paciente, que desenvolve ataxia cedo e espasticidade tardiamente. Distúrbios emocionais e confusão mental são comuns no início da doença, juntamente com uma demência gradual. A maioria dos pacientes morre dentro de 10 anos do início da doença. Os componentes principais dessa enfermidade são as mioclonias e convulsões occipitais, que pode cursar com cegueira transitória, alucinações visuais simples ou complexas, convulsões fotomioclônicas ou fotoconvulsivas (MINASSIAN, 2001). Os cães afetados parecem física e neurologicamente normais, exceto por mioclonia progressiva que pode ser desencadeada por estímulo auditivo ou estimulação visual. Ataques atônicos podem resultar em colapso e convulsões generalizadas. Em estágios avançados da doença, no entanto, os animais podem se tornar atáxicos e/ou cegos e ter um aumento da frequência de crises convulsivas refratárias às drogas antiepilépticas (WEBB et al., 2009). Apesar da presença característica de corpos de Lafora em numerosos tecidos, até o momento não se conhece o processo pelo qual eles ocorrem e a sua relação causal com a doença

é desconhecida. Poderiam ser os causadores dos sintomas que desencadeiam a doença ou consequência de uma neurodegeneração prévia no paciente (LOPEZ, 2011).

Em 1981, Carpenter e Karpati propuseram que o diagnóstico desta condição poderia ser feito com base na combinação de sinais clínicos e identificação dos corpos de Lafora em tecido, obtido através de biopsia de pele. Mas é importante salientar que estes corpos de Lafora podem ser identificados na pele clinicamente normal, devido ao processo de envelhecimento, ou no caso de esclerose lateral amiotrófica ou doença do armazenamento de glicogênio. Por esse motivo sempre deve se considerar o contexto clinico correto. Outros métodos diagnósticos possíveis em cães com doença de Lafora são a eletroencefalografia (EEG), eletromiografia (EMG) (WEBB et al., 2009), e a ressonância magnética, que pode ser uma ferramenta auxiliar para descartar neoplasias, acidentes vasculares, visto que as lesões decorrentes da doença de Lafora como dilatação ventricular e atrofia cortical também podem ser características de animais mais velhos (WEBB et al., 2009). Testes histopatológicos e imuno-histoquímicos, tem sido caracterizados extensivamente em humanos, porém foram pouco explorados em cães (MÁRQUEZ et al., 2010).

Não existe tratamento curativo conhecido para a doença de Lafora. Em humanos os sintomas clínicos começam na adolescência e progridem para convulsões corticais intratáveis, mioclonias, alucinações e demência. A doença é invariavelmente fatal em pessoas afetadas que morrem dentro de 10 anos desde o início do desenvolvimento dos sinais clínicos (WEBB et al., 2009). Em cães, muitos dos animais afetados são sacrificados quando sua qualidade de vida é considerada inaceitável. Embora a gabapentina tenha efeitos anti-epilépticos sinérgicos em combinação com outros medicamentos anti-epilépticos em alguns cães com epilepsia refratária, esta terapêutica adjuvante não apresenta nenhum benefício adicional no controle de ataques mioclônicos e, de fato, os sinais clínicos progridem (WEBB et al., 2009). O objetivo desse trabalho é descrever um caso de doença de Lafora em um canino no Sul do Brasil, salientando os achados histopatológicos e imuno-histoquímicos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Um canino fêmea, Pastor Alemão, de 12 anos de idade, foi encaminhado para necropsia ao Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV-UFRGS). Os sinais e o tempo de evolução do quadro neurológico foram obtidos com o veterinário clínico. Fragmentos de diversos órgãos foram coletados, fixados em solução de formalina a 10% e processados rotineiramente para histologia. Foram analisadas as seguintes áreas do sistema nervoso central: medula espinal (região cervical, torácica e lombar), medula oblonga, mesencéfalo, tálamo, hipocampo, cerebelo, corpo estriado, lobo piriforme, córtex telencefálico (temporal, parietal, frontal e occipital). Os cortes dos tecidos foram corados pela técnica de hematoxilina e eosina (HE), azul de Alcian, ácido periódico de Schiff (PAS) e prata metenamina de Grocott (PMG). Adicionalmente, cortes histológicos do encéfalo foram submetidos à técnica de imuno-histoquímica para proteína glial fibrilar ácida (GFAP), enolase neurônio especifica (NSE) e neurofilamento bovino, pelo método streptavidina-biotina ligada a peroxidase. A recuperação antigênica foi realizada através de calor com tampão citrato, pH 9.0 por 10 minutos à uma temperatura de 100ºC para GFAP, pH 6.0 por 40 minutos à 96ºC para NSE e pH 6.0 por 10 minutos à 37ºC para neurofilamento. As lâminas foram reveladas com o cromógeno 3´3-diaminobenzina (DAB) (DAKO), e posteriormente contracoradas com hematoxilina de Harris.

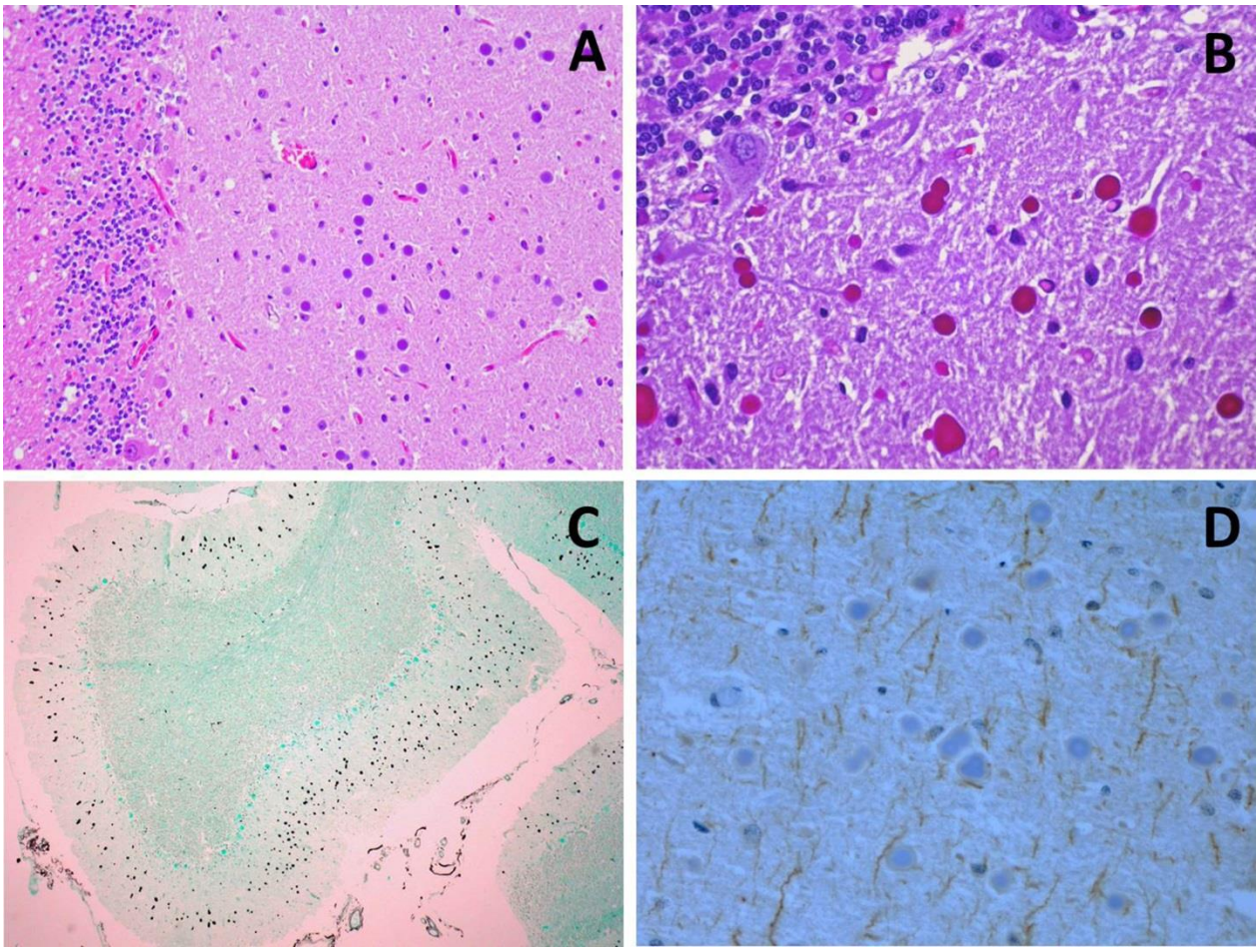
3 RESULTADOS

O canino apresentava um quadro de crises convulsivas, refratárias a tratamento com anti-convulsivantes, além de cabeça lateralizada para a esquerda e ataxia. Dois dias após a internação não conseguia manter-se em decúbito esternal e apresentava nistagmo bilateral. Devido a gravidade do caso optou-se pela eutanásia do animal. Ao exame de necropsia não foram observadas alterações macroscópicas significativas.

Histologicamente, foram observados inúmeros corpos basófilos, esféricos, medindo 5 a 25 µm (fig. 1.A), frequentemente de aspecto homogenio e por vezes com um halo periferico. Esses foram identificados por todo sistema nervoso central e estavam confinados aos neurónios e seus processos. A maior concentração desses corpos foi observada na camada molecular do cerebelo (fig. 1.C), ocasionalmente nas células de Purkinje e principlamente nas suas extensões dendríticas na camada molecular. Essas estruturas coraram-se nas técnicas histoquímicas de PAS (fig. 1.B), PMG e azul de Alcian. Observou-se ainda no cerebelo ocasionais células de Purkinje enrugadas, com citoplasma hipereosinofílico e homogêneo.

No exame imuno-histoquímico houve leve marcação no em torno dos corpos basófilicos para neurofilamento (fig.1.D). As mesmas estruturas não foram positivas na imuno-histoquímicas para GFAP e NSE.

Figura 1 - Achados histopatológicos e imuno-histoquímicos em um cão com doença de Lafora. **A.** Múltiplos copos basofílicos, esféricos na camada molecular do cerebelo (corpos de Lafora). HE, 200X. **B.** Cerebelo. Corpos de Lafora positivos na coloração de PAS, 400X. **C.** Grande concentração de corpos de de Lafora na camada molecular do cerebelo. PMG, 40X. **D.** Marcação para neurofilamento no entorno dos corpos de Lafora. Cromógeno DAB, 400X.



Fonte: Pavarini (2014)[1]

[1] Fotografia cedida pelo professor Doutor Saulo Petinatti Pavarini.

4 DISCUSSÃO

O diagnóstico de doença de Lafora no canino desse relato baseou-se nas alterações clínicas, achados histopatológicos e imuno-histoquímicos. As principais alterações observadas foram convulsões de início tardio e refratárias a medicação anticonvulsivante e ataxia. Esses sinais juntamente com a idade avançada do canino (12 anos) correspondem a uma fase mais tardia da doença, visto que na fase inicial, crises mioclônicas são os sinais clínicos mais frequentemente relatados e os cães afetados possuem em torno de 5 a 7 anos de idade. Outros sinais clínicos, que podem aparecer quando a doença progride, incluem depressão, sonolência, cegueira e demência (BELTRAN, 2012). Segundo Davis (1990), as manifestações clínicas dessa enfermidade ocorrem quando as inclusões estão amplamente difundidas nos neurônios, causando a interrupção progressiva da função neuronal e produzindo epilepsia mioclônica grave e progressiva e crises convulsivas (DAVIS; FINNIE; HOOPER, 1990). No presente caso, os corpos de Lafora foram observados em toda extensão do sistema nervoso central, e esses estavam em maior concentração na camada molecular do cerebelo. Os corpos de Lafora podem ser visualizadas em diversos órgãos como fígado, miocárdio, músculo esquelético, ou podem ficar restritas aos neurônios como no presente caso (DAVIS; FINNIE; HOOPER, 1990). Essas inclusões podem ser diferenciadas histologicamente de um processo de envelhecimento normal através da sua localização que nesse caso tende a ocorrer no tálamo e mesencéfalo enquanto que os corpos de Lafora são visualizados principalmente nas células de Purkinje e tálamo (DAVIS; FINNIE; HOOPER, 1990) e essa limitação aos neurônios é o que os distingue também de corpora amylacea (HOLLAND et al., 1970).

Os resultados dos estudos imuno-histoquímico juntamente com a intensa positividade para o PAS indicam que o material é um complexo glicoproteíco (HOLLAND et al., 1970).Sua imunomarcação negativa para NSE e GFAP são semelhantes aos resultados encontrados em humanos (MÁRQUEZ et al., 2010). Em cães o diagnóstico definitivo da doença de Lafora só é possível através da realização de biopsia e emprego de colorações e imuno-histoquímicas específicas, como as utilizadas neste caso através de exames post mortem. *In vivo*, a biopsia muscular apresenta maiores vantagens uma vez que é pouco agressiva e permite o diagnóstico diferencial de outras enfermidades como glicogenoses e lipidoses (CARVALHO et al.,2000).

5 CONCLUSÕES

A doença de Lafora ocorre em cães no Rio Grande do Sul, e a realização dos exames histopatológico e imuno-histoquímicos foram de total importância para a identificação, caracterização e diagnóstico dessa enfermidade no presente caso.

REFERÊNCIAS

WEBB, A. A.; et al. Lafora disease as a cause of visually exacerbated myoclonic attacks in a dog. **Veterinary Journal** , Ottawa, v. 50, n. 9, p.963-967, Sept. 2009.

LÓPEZ, M. T. R. **Efecto de piasy sobre proteínas implicadas em la enfermedad de Lafora**. 2011. 239 f. Tesis (Doctoral en Bioquímica) –Instituto de Biomedicina de Valencia, Universitat de Valencia.

VÍLCHEZ, D.; DE CÓRDOBA, S. R.; GUINOVART, J. J. Enfermedad de Lafora: epilepsia y regulación del metabolismo de glucógeno por laforina y malina**. Monografia de la Real Academia Nacional de Farmacia**, Madrid, monografia 25, Farmacia 11 28004. Disponível em: <http://digital.csic.es/bitstream/10261/45229/1/Tesis%20Teresa%20Rubio.pdf>. Acesso em: 18 fev. 2014.

MÁRQUEZ, M.; et al. Characterisation of Lafora-like bodies and other polyglucosan bodies in two aged dogs with neurological disease. **The Veterinary Journal**, London, v.183, n. 2, p. 222–225, Feb. 2010.

MINASSIAN, B. A. Lafora's Disease: towards a clinical, pathologic, and molecular synthesis. **Pediatric Neurology**, New York, v. 25, n. 1, p. 21-29, July. 2001.

BÁEZ, L. M.; JURADO, R. R.; GARCÍA, M. R. Enfermedad de Lafora: utilidad de la biopsia de piel en enfermidades neurodegenerativas. **Acta Pediátrica de México,** Ciudad de Mexico**,** v. 26, n. 1, p. 44-47, ene. 2005.

BELTRAN, E.; **Canine Epilepsy and Lafora disease**. New Market, UK: The Animal Health Trust, Lanwades, Apr. 2012. 6p. Disponível em: <http://dachshundbreedcouncil.files.wordpress.com/2012/02/epilepsy-and-lafora-daschund-breed-conference-2012.pdf>. Acesso em: 6 Mar. 2014.

DAVIS, K. E.; FINNIE, J. W.; HOOPER, P. T. Lafora's disease in a dog. **Australian Veterinary Journal,** Victoria, v. 67, n. 5, p. 192-193, May. 1990.

HOLLAND, J. M.; et al. Lafora's disease in the Dog: a Comparative Study. **American Journal of Pathology,** Philadelphia, v. 58, n. 3, p.509-530, Mar. 1970.

CARVALHO, A. A. S.; et al. Doença de Lafora: diagnóstico pela biopsia de músculo esquelético. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, São Paulo, v. 58, n. 4, p. 1118-1122, Dez. 2000.