

BIOPSIA MUSCULAR EM MIASTENIA GRAVE

ESTUDO HISTOQUÍMICO E MORFOMÉTRICO DE 4 CASOS

*JOÃO NORBERTO STAVALE **

*MARIA JOSÉ CAVALIERE ***

*SONIA MARIA GAGIOTI ***

*AÇUCENA ATALLA ***

*JOÃO GUIDUGLI NETO ****

Miastenia grave (MG) é patologia na qual se observa alteração da junção neuromuscular (JNM), cujo diagnóstico é feito mediante dados clínicos e eletrofisiológicos. Clinicamente, manifesta-se por fadigabilidade da musculatura estriada, sendo mais afetados os grupos musculares dos olhos, bulbares e das extremidades. Os exames eletrofisiológicos mostram fadiga na estimulação repetitiva e exaustão pós-tetânica. Sua etiologia não está esclarecida parecendo envolver mecanismos imunológicos^{6,7,12,14}. A patologia muscular na miastenia foi classicamente associada ao aparecimento de linforragia e alteração degenerativa¹⁵ e, mais recentemente, a atrofia^{4,5}. A análise histoquímica de biópsias mostra alterações de deservação em aproximadamente dois terços dos pacientes e atrofia do tipo II em 50%, estando presentes as linforragias em menos de 25%¹⁰.

O presente trabalho procura contribuir para o conhecimento da patogenia da MG mediante o estudo histoquímico e morfométrico de quatro casos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizadas biópsias de músculo bíceps braquial esquerdo em 4 pacientes com quadro clínico e eletromiográfico de MG: O.A.S. (60 anos, masculino); J.C.C. (28 anos, masculino); L.P.M. (52 anos, feminino) e M.I.L. (17 anos, feminino). O fragmento muscular foi colhido em gaze embebida em solução fisiológica e dividido em 2 blocos, os quais foram colocados em placa de cortiça de forma a orientar o sentido das fibras musculares para cortes transversais e longitudinais. Os blocos foram congelados em hexano resfriado em nitrogênio líquido³ e foram feitas secções de 10 μ m em criostato. A seguir, foram feitas as colorações de hematoxilina-eosina (HE), tricrômico modificado de Gomori e Sudan Black, bem como as reações histoquímicas para adenosina trifosfatase miofibrilar (ATPase) pH 9,4; ATPases com pré-incubação nos pH 4,6 e 4,3 e para nicotinamida adenina dinucleotídeo tetrazol redutase (NADH-tr). A análise morfométrica foi realizada utilizando uma secção

Trabalho do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital do Servidor Público Estadual de São Paulo: * Médico; ** Bióloga; *** Diretor.

transversal da reação de ATPase pH 9,4 de cada uma das biópsias. Mediu-se o maior e o menor diâmetros ortogonais 17 de 100 fibras musculares de cada secção aleatoriamente escolhidas, sendo 50 do tipo I e 50 do tipo II. As medidas foram feitas utilizando ocular micrometrada Nikon-Kellner, 10x. As médias dos diâmetros das fibras tipo I e II foram comparadas através do teste «t» de Student. Foi feito o histograma das fibras musculares de ambos os tipos.

RESULTADOS

Nas colorações de HE e tricrômico modificado de Gomori não foram evidenciadas alterações miopáticas, mas apenas variação no diâmetro das fibras que, por vezes, mostraram aspecto angular. Não foi observada linforragia em nenhuma das biópsias. A reação para ATPase pH 9,4 evidenciou atrofia seletiva de fibras tipo II (Fig. 1). Na reação para NADH-tr foram observadas, em todos os casos, pequenas fibras angulares escuras (Fig. 2). Em apenas um dos casos foram vistas fibras do tipo

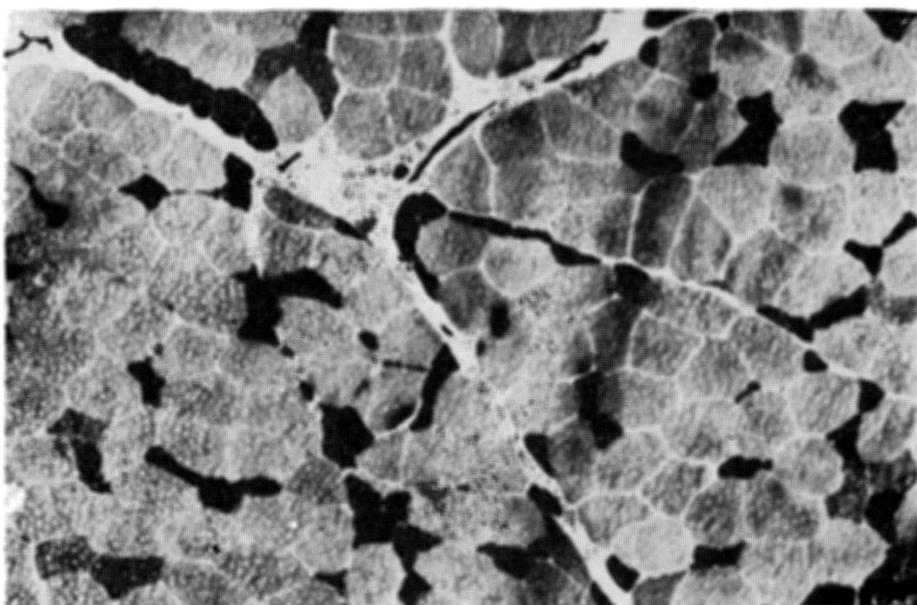


Fig. 1 — Atrofia seletiva de fibras do tipo II (fibras escuras): ATPase pH 9,4; 150x.

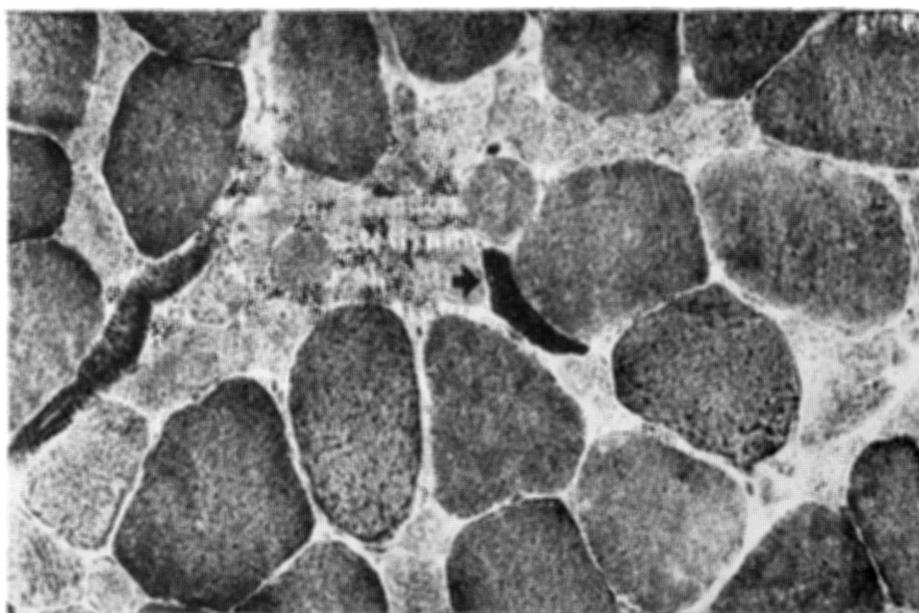


Fig. 2 — Fibra escura angular na reação para enzima oxidativa (seta): NADH-tr; 400x.

“moth-eaten” (Fig. 3). A coloração da Sudan Black mostrou distribuição normal das gotículas de lipídeos. A análise morfométrica e estatística mostrou que as fibras do tipo II eram significativamente menores ($p < 0,001$) que as fibras do tipo I (tabela 1). O histograma evidenciou diferente distribuição dos diâmetros nas populações de fibras tipo I e II com picos respectivamente entre 70-80 μm e 40-50 μm (Fig. 4).

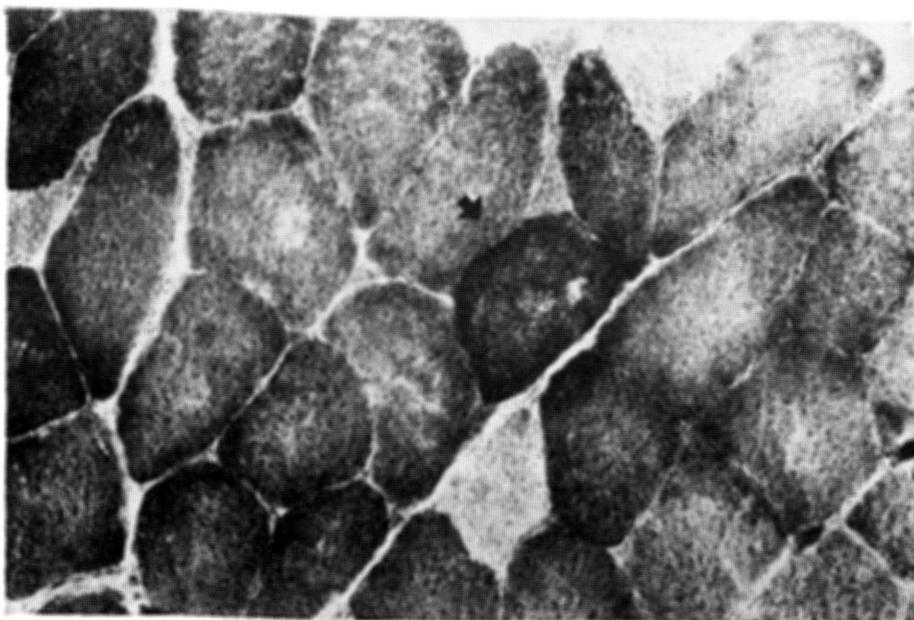


Fig. 3 — Fibra “moth-eaten” na reação para enzima oxidativa (seta): NADH-tr; 400x.

HISTOGRAMA DOS DIÂMETROS DAS FIBRAS EM 4 BIÓPSIAS

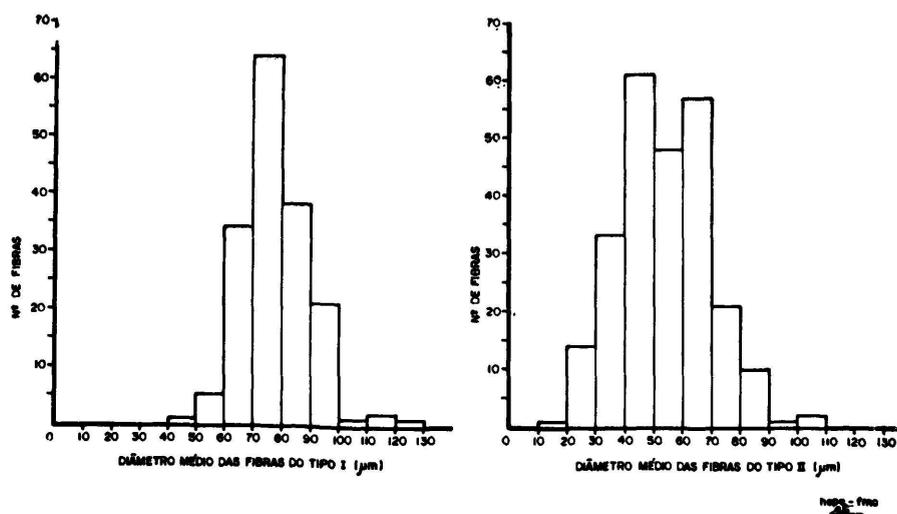


Fig. 4 — Histograma das fibras tipo I e II. Pico entre 70-80 μm (tipo I) e entre 40-50 μm (tipo II).

| Casos | Tipo I (diâmetro μm) | Tipo II |
|--------|-------------------------------------|--------------------|
| O.A.S. | 73,8 (n = 50) | 55,1 (n = 50) |
| J.C.C. | 97,8 (n = 50) | 51,4 (n = 50) |
| L.P.M. | 86,3 (n = 50) | 57,3 (n = 50) |
| M.I.L. | 72,9 (n = 50) | 46,8 (n = 50) |
| Média | 82,7 (\pm 14,4)* | 52,7 (\pm 16,1) |

*p < 0,001

Tabela 1 — Análise morfométrica dos diâmetros ortogonais de fibras musculares tipo I e II em pacientes portadores de miastenia grave.

COMENTARIOS

O significado dos achados histopatológicos no músculo esquelético na MG são contravertido. Dubowitz & Brooke⁴, analisando 6 biópsias, encontraram em 4 delas atrofia de fibras do tipo II, de distribuição focal; não foi observada linforragia. Algumas biópsias também apresentavam fibras escuras angulares nas reações para enzimas oxidativas, sugerindo processo de deservação. Engel & Warmölts¹¹, em estudo de biópsias de 52 pacientes, observaram atrofia de fibras sem agrupamento de tipo, indicando insucesso na reinervação colateral; necrose das fibras e linforragia foram achados infrequentes. Segundo esses autores a atrofia na MG é semelhante à atrofia por deservação, podendo afetar os dois tipos de fibras ou estar confinada às fibras do tipo II. A atrofia seletiva do tipo II poderia representar decréscimo seletivo da influência trófica dos motoneurônios do tipo II ou mesmo falta de receptividade seletiva das fibras musculares do tipo II ao fator trófico neural.

Em nosso material foi encontrada variação no diâmetro das fibras, algumas das quais com aspecto angular; nas reações histoquímicas evidenciaram-se fibras escuras angulares e atrofia seletiva focal das fibras tipo II. O mecanismo poderia ser idêntico para ambos os achados. É possível que a deficiência de algum fator trófico específico determine a atrofia das fibras tipo II e a formação de fibras angulares¹¹. Por outro lado, trabalhos experimentais mostram que, em músculos deservados, as fibras tipo II atrofiam-se mais precocemente do que as fibras tipo I, sugerindo maior dependência de seus motoneurônios para a manutenção trófica do tamanho normal¹.

Atualmente, aceita-se que o defeito essencial na MG esteja situado na porção neural da JNM⁹; estudos eletrofarmacológicos mostram anormalidades na transmissão através da junção, acompanhadas de alterações morfológicas⁹. Simpson¹⁸ postulou origem autoimune para esta moléstia sugerindo que poderia ser resultado de hipersensibilidade a algum componente da membrana pós-sináptica da JNM. A recente identificação e subsequente purificação de receptores de acetilcolina do órgão elétrico de enguia mostrou que esses receptores são antígenos capazes de induzir o bloqueio da JNM¹⁴. O bloqueio neuromuscular da miastenia parece ser devido a anticorpos contra receptores de acetilcolina. Engel, Lambert & Howard⁶ demonstraram a presença de imunocomplexos na membrana pós-sináptica em pacientes com MG. Engel & Santa⁸, e Santa, Engel & Lambert¹⁶ descreveram alterações quantitativas na placa terminal na MG. Observaram que a região pós-sináptica era menor e mais simples e as terminações nervosas reduzidas em tamanho; por vezes, múltiplas terminações nervosas pequenas apareciam ao longo do comprimento da fibra muscular. Essas observações vieram confirmar estudos prévios de microscopia óptica utilizando técnica de coloração de azul de metileno, que demonstraram placas anormais em pacientes miastênicos.

Embora as alterações histopatológicas de músculo esquelético em pacientes com MG não sejam patognomônicas dessa doença, existem alguns aspectos que as distinguem dos processos neurogênicos gerais: atrofia seletiva das fibras

tipo II e ausência de agrupamento de tipo. Por outro lado, técnicas histoquímicas, podem ser de utilidade para o estabelecimento do diagnóstico diferencial entre MG e outras condições, especialmente aquelas do grupo das miopatias mitocondriais, cujo quadro pode ser semelhante. Neste grupo de doenças, o aspecto é mais miopático com presença de depósitos subsarcolemais nas fibras musculares que se tornam evidentes nas reações para enzimas oxidativas e na coloração de tricrômico de Gomori correspondendo às fibras vermelhas (fibras "ragged-red"). A microscopia eletrônica mostra, nesses casos, a presença de acúmulo de mitocôndrias anormais no interior das fibras^{2,4,5,13}.

RESUMO

Miastenia grave é doença neuromuscular caracterizada por excessiva fadigabilidade da junção muscular e envolve, particularmente, músculos inervados por nervos cranianos. Acredita-se que o defeito esteja localizado na junção neuromuscular. Os autores estudaram os achados histoquímicos e morfométricos em 4 pacientes com miastenia grave mostrando que as fibras do tipo II eram significativamente menores que as fibras do tipo I.

SUMMARY

Muscle biopsy in myasthenia gravis: histochemistry and morphometric study of 4 cases.

Myasthenia gravis is a neuromuscular disease characterized by excessive fatigability of muscle function and particularly involves muscles innervated by the cranial nerves. It is believed that the defect is in the neuromuscular junction. The authors studied histochemical and morphometric findings in 4 patients with myasthenia gravis showing that the type II fibres were significantly smaller than the type I fibres.

REFERÊNCIAS

1. BAJUSZ, E. — Red skeletal muscle fibers: relative independence of neural control. *Science* 145:938, 1964.
2. BLACK, J. T. — Neuromuscular diseases that affect the eye. *Int. Ophthalmol. clin.* 18:83, 1978.
3. CHAYEN, J.; BITENSKY, L. & BUTCHER, R. G. — *Practical Histochemistry*. John Willey & Sons, London, 1973.
4. DUBOWITZ, V. & BROOKE, M. H. — *Muscle Biopsy: a Modern Approach*. W. B. Saunders, London, 1973.
5. DUBOWITZ, V. — *Muscle Disorders in Childhood*. W. B. Saunders, London, 1973.
6. ENGEL, A. G.; LAMBERT, E. H. & HOWARD, F. M. — Ultrastructural localization of immune complexes (IgG and C3) at the neuromuscular junction in myasthenia gravis. *Neurology (Minneapolis)* 27:364, 1977.
7. ENGEL, A. G.; LINDSTROM, J. M.; LAMBERT, E. H. & LENNON, V. A. — Ultrastructural localization of the acetylcholine receptor in myasthenia gravis and its experimental autoimmune model. *Neurology (Minneapolis)* 27:307, 1977.

8. ENGEL, A. G. & SANTA, T. — Histometric analysis of the ultrastructure of the neuromuscular junction in myasthenia gravis and in the myasthenia syndrome. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 183:46, 1971.
9. ENGEL, W. K. — Myasthenia gravis. *Ann. int. Med.* 81:225, 1974.
10. ENGEL, W. K. & McFARLIN, D. E. — Muscle lesion in myasthenia gravis: discussion of a paper of Fenichel. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 135:68, 1966.
11. ENGEL, W. K. & WARMOLTS, J. R. — The motor unit: disease affecting it *in toto* or *in partio*. In J. E. Desmett, ed.: *New Developments in Electromyography and Clinical Neurophysiology*. Karger Libri, Basel, 1973, vol. 1, pg. 141.
12. OOSTERHUIS, H.; BETHLEM, J. & FELTKAMP, T. E. W. — Muscle pathology, thymoma and immunological abnormalities in patients with myasthenia gravis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.* 31:460, 1968.
13. PASCUZZI, L.; SOUZA DIAS, J. C.; CAVALIERE, M. J.; GAGIOTI, S. M. & MELARAGNO FILHO, R. — Miopatia ocular tipo Kiloh-Nevin. Estudo de um caso com alterações histoquímicas e ultraestruturais. *Arq. Neuro-Psiquiat.* (São Paulo) 37:424, 1979.
14. PATRICK, J. & LINDSTROM, J. M. — Autoimmune response to acetylcholine receptor. *Science* 180:871, 1973.
15. RUSSEL, D. S. — Histological changes in the striped muscles in myasthenia gravis. *J. Path. Bact.* 65:279, 1953.
16. SANTA, T.; ENGEL, A. G. & LAMBERT, E. H. — Histometric study of neuromuscular junction. I. Myasthenia gravis. *Neurology (Minneapolis)* 22:71, 1972.
17. SCHMITT, H. P. — Measurement of voluntary muscle fiber cross sections: a comparative study of different possible methods. *Microsc. Acta.* 77:427, 1975.
18. SIMPSON, J. A. — The correlations between myasthenia gravis: a new hypothesis. *Scottish med. J.* 5:419, 1960.

Serviço de Anatomia Patológica — Hospital do Servidor Público Estadual Francisco Morato de Oliveira, 7º andar — Rua Pedro de Toledo, 1800 — 04039, São Paulo, SP — Brasil.