

Diagnóstico de leucodistrofia de Krabbe por microscopia electrónica de transmisión. Informe de un paciente

Hilda Villegas-Castrejón,* Alma Delia Hernández-Pérez,* Sergio Peralta,**
Jesús Vázquez-Escamilla,** Baltasar Reyes-Marín***

Resumen

La leucodistrofia de Krabbe es una enfermedad rara en México, por este motivo se reporta un caso de una niña de 11 años. Se describen los estudios ultraestructurales de biopsia de nervio sural. Las vainas de mielina fueron muy delgadas. El citoplasma de las células de Schwann contenía estructuras no membranosas y estructuras en forma de agujas parcialmente curvilíneas de longitud variable. Las inclusiones a menudo tenían material electrodenso o electrolúcido. Estas características representan a la leucodistrofia de Krabbe. Los estudios ultraestructurales ayudan al diagnóstico en los casos en que no se dispone de estudios genéticos o técnicas especiales de laboratorio. En la paciente descrita el diagnóstico de enfermedad de Krabbe se estableció tardíamente de acuerdo con el inicio de los síntomas. El diagnóstico de leucodistrofia de Krabbe se puede evidenciar con el estudio de microscopia electrónica de nervio sural.

Palabras clave: leucodistrofia, enfermedad de Krabbe, microscopia electrónica.

Summary

Krabbe's leukodystrophy is a rare hereditary disease in Mexico. For that reason we report the case of an 11-year-old child. Ultrastructural studies of sural nerve biopsy specimen are described. Myelin sheaths were uniformly thin for the fiber diameters. Cytoplasm of Schwann cells exhibited a moderate dilatation with non-membrane masses with partly curvilinear, needle-shaped structures of variable length. The inclusions often had electron-dense or electron-lucent halos. These inclusions ultrastructurally represented Krabbe's leukodystrophy, and this method aids in the diagnosis in cases that are not available for genetic studies or special laboratory techniques. In this patient, diagnosis of Krabbe's disease was delayed and established several years after the initial symptoms. Electron microscopic examination of a sural nerve provided evidence for a diagnosis of Krabbe's leukodystrophy.

Key words: leukodystrophy, Krabbe disease, electron microscopy.

Introducción

Las leucodistrofias son enfermedades hereditarias poco frecuentes ocasionadas por una alteración enzimática. Son padecimientos desmielinizantes que afectan en forma primaria al sistema nervioso central y posteriormente al periférico.¹⁻³ El inicio de las leucodistrofias es muy variable dependiendo del subtipo, y los signos clínicos están en relación con el tiempo

en que se presenta la desmielinización; la heterogeneidad en los síntomas se debe a los múltiples sitios de mutaciones en los genes. Tres variedades han sido reportadas con más frecuencia:

1. *De Krabbe*, originada por una deficiencia en la galactosilceramidasa, relacionada con la alteración del gen localizado en el cromosoma 14q21-31.
2. *Metacromática*, la alteración génica se ubica en el cromosoma 22q13-31.
3. *Adrenoleucodistrofia*, cuyo déficit es perioxosomal ligado al cromosoma Xq28.

Los tipos de mutaciones incluyen deleciones, que pueden ser completas o parciales, y mutaciones puntuales.^{4,5} Hay otras leucodistrofias todavía menos frecuentes como la de Pelizaeus-Merzbacher, Canavan y la de Alexander.⁶⁻⁸

La leucodistrofia de Krabbe (células globoides) es una enfermedad hereditaria que por lo general comienza en forma temprana durante los primeros meses de vida, aunque los síntomas clínicos pueden manifestarse en forma tardía en el infante o en el adulto joven. Las leucodistrofias con inicio tardío son menos frecuentes y el diagnóstico es más difícil

* Unidad de Morfología Celular y Molecular.

** Ortopedia Pediátrica.

*** Jefe de la División de Radiología e Imagen.
Instituto Nacional de Rehabilitación

Solicitud de sobretiros:

Hilda Villegas-Castrejón,

Departamento de Morfología Celular y Molecular, Torre de Investigación, piso 0, Calz. México-Xochimilco 289, Col. Arenal de Guadalupe, Deleg. Tlalpan, 14389 México, D. F.

Tel: 5999 1000, extensiones 19108 y 1909. Fax: 5603 9008.

E-mail: hvillegas@cnr.gob.mx

Recibido para publicación: 23-02-2006

Aceptado para publicación: 28-04-2006

debido a que los síntomas son heterogéneos y el progreso de la enfermedad es más lento. Las manifestaciones clínicas varían dependiendo de la edad de aparición, aunque básicamente son alteraciones visuales y motoras: hay retraso en el desarrollo psicomotor, problemas de alimentación, atrofia óptica, rigidez generalizada, entre otras.

Bioquímicamente existe deficiencia de la actividad de la galactosilceramidasa. Este defecto se manifiesta en diferentes tejidos, por lo que el diagnóstico se puede llevar a cabo en leucocitos periféricos, orina, tejido muscular, en nervio periférico y en cultivo de fibroblastos de piel.⁹

El objetivo de este informe es presentar una paciente con leucodistrofia de Krabbe diagnosticada mediante biopsia de músculo y nervio periférico aplicando microscopia electrónica de transmisión.

Caso clínico

Antecedentes perinatales

Producto del primer embarazo de padres no consanguíneos, madre de 20 años, padre de 19 años. Embarazo normoevolutivo de término; el parto fue fortuito en camilla obteniéndose niña de 2,500 g. La madre refiere que la recién nacida tardó en respirar, ignora si recibió maniobras artificiales de respiración, permaneciendo en incubadora un día. El binomio fue egresado sin complicaciones. La recién nacida presentó desarrollo psicomotriz, adaptativo y lingüístico normal hasta los 14 meses de edad.

Padecimiento

La paciente inició su padecimiento a los 14 meses de edad, con deterioro súbito del desarrollo psicomotriz, debilidad muscular en extremidades inferiores y pérdida de la capacidad para la bipedestación y para mantener el tronco erecto. La madre identificó estrabismo, por lo cual consultó a varios médicos; todos coincidieron en retraso psicomotriz. A partir de esa fecha, la niña empezó a recibir tratamientos de terapia física en extremidades inferiores, pocos meses después notaron que los pies empezaban a adquirir una posición de *genu varo*, continuando con la terapia hasta la edad de tres años siete meses, cuando fue remitida al Centro de Salud Mental del DIF, donde se le efectuó tomografía cerebral simple y contrastada, reportándose importante hipodensidad generalizada de la sustancia blanca; el diagnóstico fue "proceso desmielinizante" de etiología a determinar.

La paciente continuó con su tratamiento de rehabilitación y a la edad de cuatro años se le efectuaron exámenes de laboratorio para corroborar el diagnóstico de leucodistrofia metacromática, con los siguientes resultados: arilsulfatasa

68 nmol/ml/hora (rango normal 34 a 120), gránulos metacromáticos en leucocitos negativo, mucopolisacáridos 175 U de cpc/g de creatinina (normal 210).

A la edad de cinco años se le efectuaron los mismos estudios de laboratorio, reportándose: arilsulfatasa 73 nmol/ml/hora, gránulos de leucocitos negativo, sulfatasas en orina negativo, mucopolisacáridos 195 U de cpc/g de creatinina. La paciente continuó con terapias de rehabilitación hasta la edad de 11 años, siendo referida al Servicio de Ortopedia Pediátrica del Instituto Nacional de Rehabilitación.

Exploración física

A su ingreso, la paciente presentó una marcha a saltos asistida con una andadera, con flexión de tronco y miembros pélvicos, estrabismo divergente, con hipotonía en extremidades superiores. Los tonos en escala de Asworth para hombro 2/1, codo 1/1, mano 1/1. En extremidades inferiores el tono fue el siguiente: cadera 1/1+, rodilla 1/1, tobillo 1/1, hipotrofia generalizada con rotación interna de la cadera bilateral. Acortamiento de 1.5 cm en miembro pélvico izquierdo, contractura en flexión de caderas 40/30, isquiotibiales 90/80, regazo para extensión de cadera 30/30 y en rodillas 45/45, clonus y Babinsky bilateral, hiperreflexia+++; control volitivo deficiente ADD. La biometría hemática, la química sanguínea y el examen general de orina fueron normales. La paciente fue referida al Departamento de Oftalmología y Genética, donde se le diagnosticó pérdida de la agudeza visual y ambliopía de ojo izquierdo. En el Servicio de Genética fue valorada emitiéndose el diagnóstico de leucodistrofia. En el examen psicológico se realizaron pruebas de inteligencia: el IQ fue muy bajo. Fue evaluada por la clínica de ortopedia pediátrica, el diagnóstico fue cuadriparesia espástica secundaria. Se practicó tenotomía de abductores, psos e isquiotibiales bilaterales, así como toma de nervio sural y músculo peroneo, enviándose el material al Laboratorio de Microscopia Electrónica.

Estudios de gabinete

En tomografía axial computarizada y resonancia magnética de cráneo se identificaron alteraciones en la sustancia blanca, en forma difusa, tanto cerebral como del hemisferio cerebeloso izquierdo y en el tallo cerebral, asociadas con pérdida de volumen; las características de la imagen indicaban gliosis periventricular y en centros semiovais, que se limitaba a la región anatómica de las fibras en U en las regiones parietales, y que se extendía a las cuatro extremidades posteriores de las cápsulas internas, con alteraciones focales de ambos tálamos, principalmente en la zona de los grupos interlaminares. Había adelgazamiento e irregularidad del cuerpo caloso, con hiperintensidad generalizada.

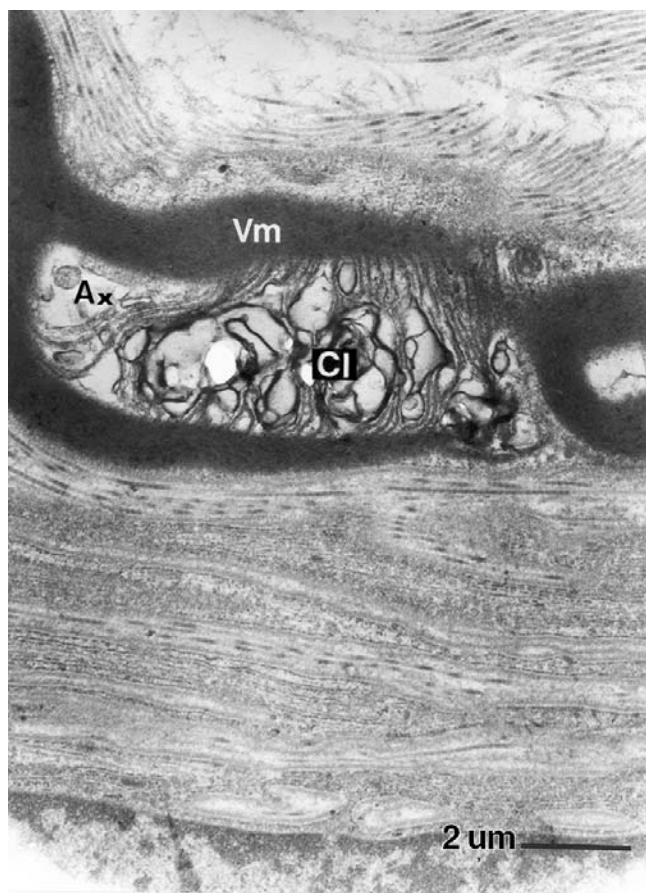


Figura 1. Corte longitudinal de nervio periférico sural, donde se observan cuerpos laminares (Cl) en el axón (Ax) que lo desplazan y comprimen. Las vainas de mielina (Vm) han perdido su periodicidad. 20,500x

Material y métodos

Bajo anestesia general fueron tomadas biopsias de nervio sural y músculo peroneo, después de que los padres aceptaron el procedimiento invasivo. El tejido fue fijado de inmediato en glutaraldehído a 2.5 % en buffer de fosfatos con pH 7.4, y posfijado en tetraóxido de osmio bufferado; se deshidrató con alcoholes ascendentes y la inclusión se efectuó en resina Epon 812. Cortes semifinos de 1 micra se tiñeron con azul de toluidina para seleccionar el área de estudio ultraestructural. Los cortes finos de 90 nm fueron contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo antes de ser examinados en el microscopio electrónico de transmisión Philips Tecnai 10.

Resultados de microscopía electrónica de transmisión

La biopsia de músculo estriado mostró ligera atrofia de las fibras musculares. Ultraestructuralmente se pudo observar

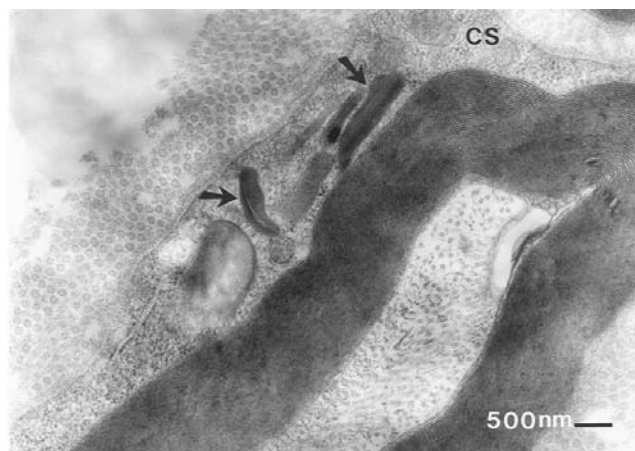


Figura 2. Micrografía electrónica que muestra en el citoplasma de la célula de Schwann (CS), inclusiones lipídicas pleomórficas con formaciones tubulares en su interior (→). 40,500x

buen ordenamiento de las miofibrillas, de las bandas y de los discos Z.

Cortes transversales de nervio periférico de 1 micra, teñidos con azul de toluidina, mostraron filetes nerviosos de diverso grosor, con diferente grado de desmielinización, no se observaron formaciones de bulbos en cebolla; el tejido conectivo endoneural estaba ligeramente incrementado.

Para el estudio ultraestructural del nervio periférico y para valorar la cantidad y el grosor de los nervios, se efectuaron numerosos cortes de varios bloques que fueron observados por el microscopio electrónico, encontrando en diversos cam-

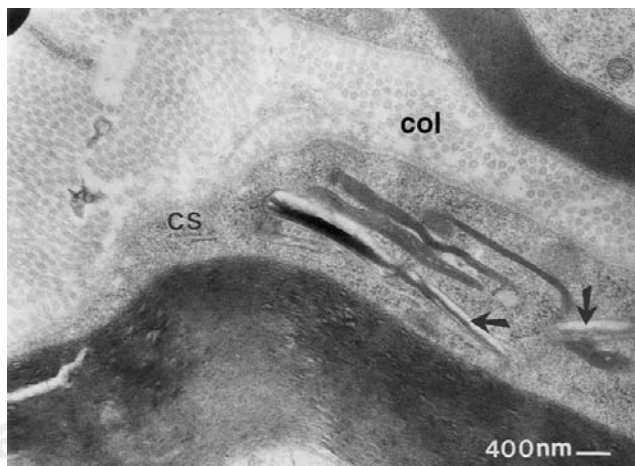


Figura 3. El citoplasma de la célula de Schwann (CS) presenta en su interior inclusiones tubulares cristalinas en forma de aguja (→). Rodeando a los nervios se puede apreciar incremento de las fibras de colágena (col). 40,500x

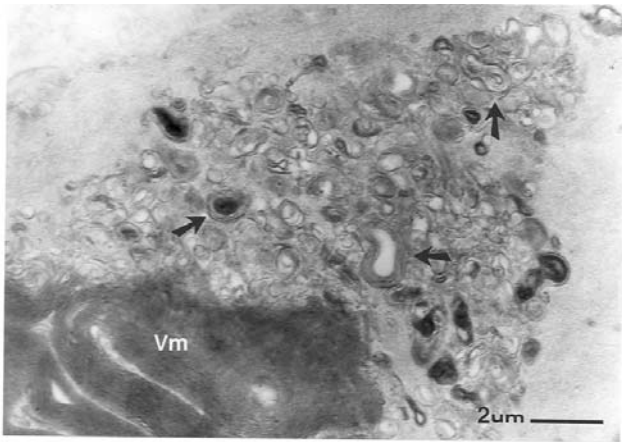


Figura 4. Micrografía donde se puede observar abundantes restos mielínicos (→) y destrucción de los organelos en una célula de Schwann. 20,500 x.

pos una reducción importante del tamaño de los nervios, así como desmielinización. La mayoría de los nervios mostraba incremento de fibras de colágena alrededor. Los filetes nerviosos presentaban disminución considerable de mielina y fragmentación de la periodicidad. El axón se encontró reducido en tamaño, con escasos filamentos y microtúbulos; en algunos campos, dentro de los axones se identificaron restos mielínicos en forma abundante (figura 1). En las imágenes de cortes longitudinales de los nervios mielínicos, el citoplasma de las células de Schwann presentaba depósitos pleomórficos de restos lipídicos; en su mayoría, estas inclusiones se apreciaron como agrupamientos de restos de membranas (figura 2); también se reconocieron conjuntos de material electrodensito. Se identificaron inclusiones aisladas o formando agrupaciones que a menudo estaban rodeadas por halos claros; alternando con estas inclusiones se observaron estructuras multiangulares en forma de agujas cristaloides (figura 3). Ocasionalmente se encontró material osmiofílico dentro del citoplasma de la célula de Schwann (figura 4).

Discusión

El caso que se reporta inicialmente fue diagnosticado como enfermedad desmielinizante a nivel central, posteriormente se emitió el diagnóstico de leucodistrofia metacromática por presentar una sintomatología clínica de daño periférico no bien definido. La paciente tuvo retraso psicomotor tardío, considerándose como daño a nivel del sistema nervioso central, motivo por el cual los exámenes de laboratorio solicitados fueron para confirmar el diagnóstico de leucodistrofia metacromática, reportándose en dos ocasiones resultados negativos para arilsulfatasa, para gránulos metacromáticos en leu-

cocitos, para sulfatasas en orina, así como para mucopolisacáridos.

En el análisis retrospectivo suponemos que se pensó en el diagnóstico mencionado, pues la leucodistrofia metacromática es más frecuente que la de Krabbe y los síntomas al inicio del padecimiento son muy similares en ambas entidades. Así mismo, las alteraciones morfológicas de los nervios periféricos en la enfermedad de Krabbe se manifiestan más tardíamente que en la metacromática.

Se ha informado la utilidad de la tomografía computarizada y de la resonancia magnética en el diagnóstico de la leucodistrofia de Krabbe. La tomografía computarizada se ha recomendado como un estudio de imagen con mayor utilidad en la etapa temprana de la enfermedad, por su capacidad para exponer con mayor detalle microcalcificaciones en los núcleos basales.¹⁰⁻¹⁵ Tanto la tomografía computarizada como la resonancia magnética permiten identificar los cambios de la sustancia blanca, que se manifiestan como áreas de hipodensidad e hiperintensidad respectivamente, tienden a ser confluentes y progresivamente de mayor extensión conforme avanza la enfermedad, involucrando ganglios basales y tallo cerebral.¹³⁻¹⁵ La sustancia blanca puede encontrarse respetada a nivel de la fibras en U hasta las etapas tardías de la enfermedad. En el caso presentado se observaron cambios avanzados que señalan las alteraciones para la sustancia blanca asociadas a pérdida de volumen, así como del trayecto de la vía piramidal y posible alteración a nivel del cuerpo calloso. Existen otros métodos como la aplicación intravenosa de gadolinio¹⁶⁻¹⁸ o estudios por espectroscopia para confirmar el diagnóstico de esta enfermedad.¹⁹ Definitivamente los hallazgos en imágenes de la enfermedad de Krabbe en una etapa tardía pueden ser inespecíficos, y puede ser difícil emitir el diagnóstico diferencial preciso con la enfermedad metacromática.²⁰

En cuanto a las observaciones por microscopía electrónica, en la leucodistrofia metacromática las inclusiones presentes en el citoplasma de las células de Schwann son figuras mielínicas multicéntricas laminadas con una periodicidad de 5.8 nm formando cuerpos tipo “cebra”, donde se alternan bandas claras y oscuras; el hallazgo más frecuente es la presencia de lípidos sudanófilos que alternan con las estructuras antes mencionadas.²¹ Comparando estas características con la presencia de las inclusiones en forma de aguja propias de la enfermedad de Krabbe, ultraestructuralmente podemos establecer el diagnóstico diferencial entre estas dos entidades.

Estudios previos realizados en biopsias de nervio sural, de personas con síntomas clínicos tardíos de la enfermedad de Krabbe, han reportado desmielinización de tipo segmentario, así como disminución en el número de fibras nerviosas, bulbos en cebolla y cuerpos de inclusión.²² En nuestras observaciones no fue posible encontrar bulbos en cebolla, pero sí desmielinización acentuada con daño axonal y fibrosis. También se ha mencionado que en el citoplasma de las células de

Schwann se puede observar restos mielínicos, hallazgo que se presentó en nuestro caso y que se ilustra en la figura 4 de este estudio ultraestructural, sin embargo, no se han reportado en la literatura restos mielínicos en el axón, como se muestra en la figura 1.

Lo más relevante de este reporte fue la presencia de inclusiones tubulares e inclusiones cristalinas en forma de agujas en el citoplasma de las células de Schwann (figuras 2 y 3), que se deben a deficiencia de la galactosilceramidasa (enzima lisosomal que transforma la galactosilceramida en ceramida y galactosa). Estas inclusiones fueron informadas por primera vez en células del sistema nervioso central.²²⁻²⁴

Las inclusiones cristalinas en forma de aguja encontradas en la biopsia de nervio periférico fueron decisivas para el diagnóstico, ya que se consideran elementos clásicos de la leucodistrofia de Krabbe y son muy diferentes a las presentes en la leucodistrofia metacromática o en otras lipidosis.

Agradecimientos

Este trabajo se realizó gracias al equipo donado por la Fundación Rio-Arronte.

Referencias

1. Seitelberger F. Structural manifestations of leukodystrophies. *Neuropediatrics* 1984;15(Suppl):53-61.
2. Wenger DA. Research update on lysosomal disorders with special emphasis on metachromatic leukodystrophy and Krabbe disease. *APMIS* 1993;Suppl 40:101:81-87.
3. Korn LI, Dor WT, Soffer D, Raas RA, Hurvits H, Nevo Y. Early peripheral nervous system manifestations of infantile Krabbe disease. *Pediatr Neurol* 2003;28:115-118.
4. De Gasperi R, Gama Sosa MA, Sartorato E, Battistini S, Raghavan S, Kolodny EH. Molecular basis of late-life globoid cell leukodystrophy. *Hum Mutat* 1999;14:256-262.
5. Sabatelli M, Quaranta L, Madia F, et al. Peripheral neuropathy with hypomyelinating features in adult-onset Krabbe's disease. *Neuromuscul Disord* 2002;12:386-391.
6. Matalon R, Matalon KM. Canavan disease: prenatal diagnosis and genetic counseling. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2002;29:297-304.
7. Johnson AB. Alexander disease: a review and the gene. *Int J Dev Neurosci* 2002;20:391-394.
8. Golomb MR, Walsh LE, Carvalho KS, Christensen CK, DeMyer WE. Clinical findings in Pelizaeus-Merzbacher disease. *J Clin Neurol* 2004;19:328-331.
9. www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispmim.cgi?id=245200; Krabbe disease; MIM#245200.
10. Kwan E, Drace J, Enzmann D. Specific CT findings in Krabbe's disease. *AJNR* 1984;5:453-458.
11. Baram TZ, Goldman AM, Percy AK. Krabbe's disease: specific MRI and CT findings. *Neurology* 1986;36:111-115.
12. Cavanagh N. High density in CT in infantile Krabbe's disease: a case report. *Dev Med Child Neurol* 1986;28:799.
13. Sasaki M, Sakuragawa N, Takashima S, et al. MRI and CT findings in Krabbe disease. *Pediatr Neurol* 1991;7:283-288.
14. Farley TJ, Ketone LM, Bodensteiner JB, Wang DD. Serial MRI and CT findings in infantile Krabbe disease. *Pediatr Neurol* 1992;8:455-458.
15. Finelli DA, Tarr RW, Sawyer RN, Horwitz SJ. Deceptively normal MR in early infantile Krabbe disease. *AJNR* 1994;15:167-171.
16. Jones BV, Barron TF, Towfighi J. Optic enlargement in Krabbe's disease. *AJNR* 1999;20:1228-1231.
17. Bernal OG, Lenn N. Nerve enhancement in early infantile Krabbe's disease. *Neurology* 2000;54(12):2348-2349.
18. Given CA, Santos CC, Durden DD. Intracranial and spinal MRI findings associated with Krabbe's disease: case report. *AJNR* 2001;22:1782-1785.
19. Alexander CG, Petrella JR, Kurtzberg J, Provenzale JM. Evaluation of white matter anisotropy in Krabbe disease with diffusion tensor MRI: initial experience. *Radiology* 2001;218:809-815.
20. Loes DJ, Peters Ch, Krivit W. Globoid cell leukodystrophy: distinguishing early-onset from late-onset disease using a brain MR imaging scoring method. *AJNR* 1999;20:316-323.
21. Thomas PK, King RH, Kocen RS, Brett EM. Comparative ultrastructural observations on peripheral nerve abnormalities in the late infantile juvenile and late onset forms of metachromatic leukodystrophy. *Acta Neuropathol* 1977;39:237-245.
22. Matsumoto R, Oka N, Nagahama Y, Akiguchi I, Kimura J. Peripheral neuropathy in late-onset Krabbe's disease: histochemical and ultrastructural findings. *Acta Neuropathol* 1996;92:635-639.
23. Bischoff A, Ulrich J. Peripheral neuropathy in globoid cell leukodystrophy (Krabbe's disease). Ultrastructural and histochemical findings. *Brain* 1969;92:861-870.
24. Schochet SS, McCormick WF, Powell GF. Krabbe's disease. A light and electron microscopic study. *Acta Neuropathol* 1976;36:153-160.

