

CEROLIPOFUSCINOSE: ESTUDO ULTRAESTRUTURAL DE 8 CASOS

CARLOS MATIAS, AGUINALDO CABRAL, TERESA TASSO, REGINA PORTELA, ANA JORGE, J.F. MOURA NUNES, JORGE SOARES

Unidade de Diagnóstico Ultraestrutural, Serviço de Patologia Morfológica, Instituto Português de Oncologia de Francisco Gentil.
Unidade de Doenças Metabólicas, Serviço de Pediatria, Hospital de Santa Maria. Serviço de Pediatria 2, Hospital de D. Estefânia, Lisboa.

RESUMO

Os autores apresentam as principais características clínicas e descrevem os achados ultraestruturais de 8 casos de cerolipofuscinose (CLF) dos tipos infantil tardio (5 casos) e juvenil (3 casos) cujo diagnóstico clínico foi confirmado pela observação em microscopia eletrónica de *microbuffycoats* de linfócitos do sangue periférico, e de biópsias de músculo estriado, pele, conjuntiva palpebral e mucosa rectal. A observação ultraestrutural confirmou o predomínio de agrupamentos de perfis paralelos de membranas e figuras paracristalinas nas células dos casos do tipo juvenil, e de corpos curvilineares nas células dos casos do tipo infantil tardio. Nestes dois tipos não se verificou preferência pela observação de um determinado tecido para a confirmação ultraestrutural do diagnóstico clínico. Em dois casos foram observados, nos linfócitos do sangue periférico, feixes de tubos paralelos associados no mesmo citosoma às inclusões típicas das CLF, o que pode sugerir uma relação daquelas estruturas com a alteração metabólica destas doenças. A sensibilidade e especificidade reveladas pelo exame ultraestrutural de linfócitos do sangue periférico, e a facilidade de execução da técnica, recomendam o seu uso para a confirmação do diagnóstico clínico de cerolipofuscinose.

SUMMARY

Neuronal Ceroid-Lipofuscinosis: Ultrastructural study of 8 cases

The authors studied the clinical and ultrastructural features of 8 cases of Neuronal Ceroid-Lipofuscinosis (NCL). Five cases of the late-infantile type and 3 cases of the juvenile type. The clinical diagnosis of all cases was confirmed by the electron microscopy analysis of the peripheral blood lymphocytes and biopsy material from the skin, palpebral conjunctiva, skeletal muscle and rectal mucosa. Our observations agree with previous reports concerning the predominance of curvilinear bodies in the cells of the late infantile type, and *fingerprint-like* structures in those of the juvenile type. The finding of parallel tubular arrays and NCL inclusions associated in the same lymphocyte (frequently in the same vacuole) suggests that those structures could be related to the metabolic error of NCL. Ultrastructural examination of *microbuffycoats* of peripheral blood lymphocytes is a simple, time-saving and reliable method that allows specific confirmation of a clinical diagnosis of Neuronal Ceroid-Lipofuscinosis.

INTRODUÇÃO

As doenças metabólicas hereditárias (DMH) são uma causa importante de atraso psicomotor e têm considerável morbidade e mortalidade em indivíduos jovens¹. A caracterização diagnóstica de cada entidade deste grupo de doenças é indispensável para o seguimento clínico, a informação prognóstica, e o aconselhamento genético.

As DMH têm como característica comum a acumulação intracelular de metabolitos a qual, na maioria dos casos, é secundária a um defeito enzimático genético. Para muitas das DMH esse defeito é conhecido, o que permite o diagnóstico bioquímico da enzima deficiente. A observação morfo-

lógica de tecidos confirma e documenta a consequente acumulação intracelular dos metabolitos, alguns dos quais assumem padrões morfológicos peculiares que por isso identificam o tipo de DMH.

Há, no entanto, algumas DMH em que a anomalia metabólica não foi ainda caracterizada bioquimicamente. É nestas situações que a observação ultraestrutural de tecidos e células tem valor diagnóstico fundamental, em especial naquelas doenças em que as inclusões citoplasmáticas são consideradas específicas^{2,3}. Estão neste caso as várias formas de acumulação generalizada de pigmento ceróide/lipofuscina (Cerolipofuscinoses, CLF, Lipofuscinoses, Lipofuscinose Neuronal Ceróide, ou Síndrome de Batten-Vogt) que, no seu

conjunto, são a causa mais frequente de encefalopatia progressiva em crianças e adolescentes, e a mais comum das DMH neurodegenerativas^{1,4,5}. Estas designações referem-se à semelhança que os materiais acumulados em algumas células destes doentes têm com a lipofuscina e o pigmento ceróide^{6,8}.

Embora pareça estabelecido que o material acumulado resulta de uma alteração na peroxidação de ácidos gordos poli-insaturados com subsequente polimerização e formação de complexos insolúveis com proteínas, é ainda desconhecida a anomalia metabólica básica, pelo que o diagnóstico das cerolipofuscinoses (CLF) se baseia no padrão morfológico das inclusões intracelulares^{9,11}.

As características morfológicas das CLF foram inicialmente descritas em células do sistema nervoso central^{12,13}. Posteriormente foram observadas também em diversos tipos celulares de outros tecidos (pele, conjuntiva palpebral, músculo estriado e liso, mucosa rectal, medula óssea, apêndice ileocecal, retina, nervo periférico, linfócitos do sangue periférico, células do sedimento urinário) pelo que as CLF passaram a ser consideradas doenças generalizadas^{14,21}. Destes tecidos tem sido preferida a análise morfológica de biópsias de pele, de conjuntiva palpebral e de mucosa rectal por serem estruturas de fácil colheita e por permitirem a observação de vários tipos celulares contidos numa única biópsia^{3,14,22}. No entanto o estudo de linfócitos do sangue periférico é um método que tem vindo a ser progressivamente mais usado pela inocuidade da sua colheita, facilidade de separação e maior rapidez de análise dos elementos celulares, bem como por ter uma boa correlação com as alterações morfológicas observadas em outros tecidos^{17,23,24}.

No presente trabalho são estudados oito casos de CLF cujo diagnóstico clínico foi confirmado pela observação de vários tecidos e tipos celulares por microscopia electrónica.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram estudados 8 doentes com idades compreendidas entre os 4 e os 19 anos (média 8,5 anos), sendo 5 do sexo masculino e 3 do sexo feminino. Um era de etnia negra (caso #1) e os restantes de etnia branca. As principais características clínicas de cada caso estão resumidas no Quadro 1.

Nos doentes #1, #2, #3, #4, #5, e no doente #7 foram estudados linfócitos do sangue periférico. No doente #5 foi também estudado músculo estriado (deltóide). Foi examinada conjuntiva palpebral nos doentes #6 e #7 e, naquele, também pele. No doente #8 foi analisada mucosa rectal (Quadro 2).

A separação dos linfócitos foi efectuada por centrifugação de sangue periférico segundo a técnica de Moura Nunes e

col.²³. Todos os outros tecidos foram obtidos por biópsia sob anestesia local.

A fixação foi feita com glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato de sódio (pH 7,4) durante duas horas. Todos os fragmentos foram depois lavados com tampão idêntico, post-fixados em tetróxido de ósmio a 1% em tampão de cacodilato (pH 7,3), e em acetato de uranilo a 0,5% em água destilada, desidratados em concentrações progressiva de etanol e incluídos em Epon-Araldite.

Para cada caso observaram-se cortes de quatro a oito blocos de inclusão que foram cortados com facas de vidro num ultramicrotomo Reichert-Jung Ultracut E. As secções semi-finas, para microscopia óptica, foram coradas com azul de toluidina e delas foram escolhidas áreas para secções finas que foram recolhidas em grelhas de cobre, coradas com acetato de uranilo e com citrato de chumbo e observadas num microscópio Philips CM 10 com uma voltagem de 80 kV.

RESULTADOS

O Quadro 2 resume, para cada doente, os tecidos e os tipos celulares estudados, bem como as alterações ultraestruturais observadas.

Nos linfócitos do sangue periférico dos casos #2, #3, #4 e #5, foram encontrados três tipos de inclusões citoplasmáticas limitadas total ou parcialmente por membrana (Fig. 1): 1 — inclusões osmiofilicas densas com matriz finamente granular (IOD); 2 — grupos de perfis paralelos de membranas densas com uma espessura de 7 nm, separadas umas das outras por zonas com menor densidade electrónica, com cerca de 3 nm, formando em alguns casos figuras curvilíneas semelhantes a impressões digitais (*fingerprints*); 3 — estruturas paracristalinas formadas pela intersecção de grupos de membranas densas paralelas, semelhantes às das *fingerprints*.

Alterando o ângulo do plano que continha o material em observação relativamente ao feixe de electrões foi possível obter imagens de transição entre *fingerprints* e estruturas paracristalinas, o mesmo sucedendo com inclusões idênticas noutros tipos celulares (Quadro 2).

Nos casos #1 e #7 foram encontradas inclusões osmiofilicas densas, formadas por um componente granular com contornos nítidos, e por material menos denso, homogéneo, formando *gotas* com contornos regulares. A percentagem de linfócitos em que foram observadas estas inclusões variou entre 10 e 40%.

Nos casos #2, #3 e #7 observámos, respectivamente em 20%, 15% e 10% dos linfócitos, vacuolos citoplasmáticos,

QUADRO 1 — Características Clínicas Principais

| Caso | #1 | #2 | #3 | #4 | #5 | #6 | #7 | #8 |
|----------------------|----|----|-----|----|------|------|-----|----|
| Sexo | M | M | M | F | M | F | F | M |
| Idade | 6A | 7A | 19A | 4A | 4.5A | 8A | 16A | 4A |
| Consang | — | + | + | — | — | — | — | — |
| Doença em familiares | — | + | + | — | + | — | + | — |
| Início dos Sintomas | 2A | 7A | 7A | 4A | 3.8A | 3.5A | 7A | 3A |
| APM | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Fundoscopia | + | + | + | + | + | + | + | + |
| EEG | — | + | + | + | + | + | + | + |
| ERG | — | + | + | ne | ne | + | + | ne |

+: Presente/com alterações que apoiam o diagnóstico.

—: Ausente/sem alterações.

ne: Não efectuado.

consang: Consanguinidade entre os pais.

APM: Atraso psicomotor.

QUADRO 2: — Material Observado e Alterações Ultraestruturais

| Caso | Tecido observado | Células com alterações | Alterações ultraestruturais |
|------|------------------|------------------------|-----------------------------|
| #1 | Linfócitos | Linfócitos | IOD |
| #2 | Linfócitos | Linfócitos | » FP, PC, VAC, FTP |
| #3 | Linfócitos | Linfócitos | » » » » |
| #4 | Linfócitos | Linfócitos | » » » FTP |
| #5 | Linfócitos | Linfócitos | » » » |
| | Músculo Estriado | C. Musculares | CC |
| | | C. Endoteliais | IOD, FP, PC |
| | | Pericitos | » » » |
| | | Fibroblastos | » » » |
| #6 | Pele | Axonios | IOD |
| | | C.Schwann | » |
| | | C. Endoteliais | IOD, FP, PC |
| | | Pericitos | » » » |
| | | Fibroblastos | » » » |
| | Conjuntiva | C. Endoteliais | IOD, FP, PC, CC |
| | | Pericitos | » » » » |
| | | Fibroblastos | » » » » |
| #7 | Conjuntiva | C. Endoteliais | IOD, FP, VAC |
| | | Fibroblastos | » » » |
| | | Linfócitos | » » » |
| #8 | Linfócitos | C. Muscul Lisas | IOD, FP, PC, CC |
| | M. Rectal | Fibroblastos | » » » » |
| | | Macrófagos | » » » » |
| | | Plasmócitos | » » » » |
| | | Axónio | » |

IOD: Inclusões osmiofilicas densas.
 VAC: Vacuolos.
 FP: Fingerprints.
 PC: Estruturas paracristalinas.
 CC: Corpos Curvilineares.
 FTP: Feixes de tubos paralelos.

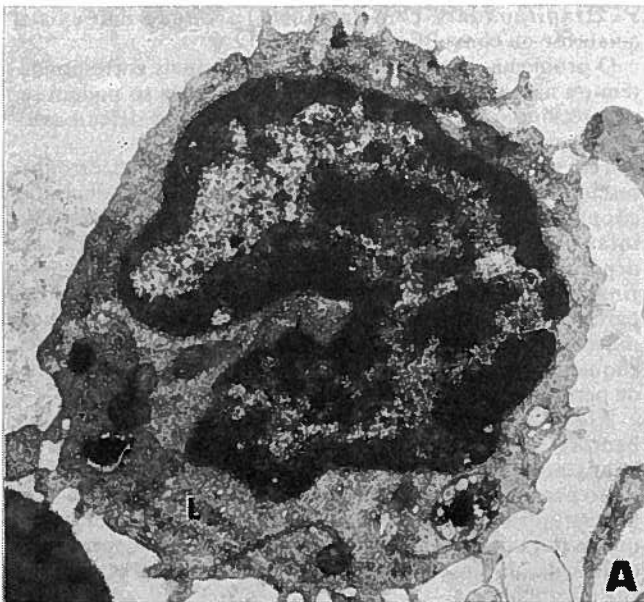
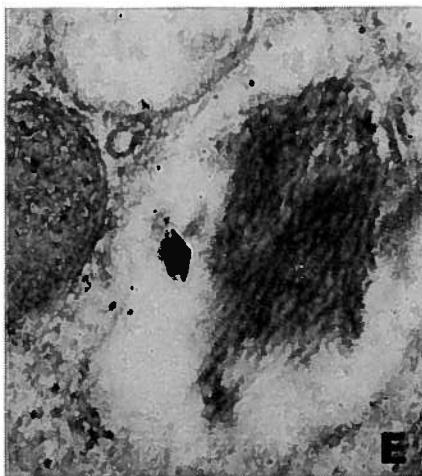
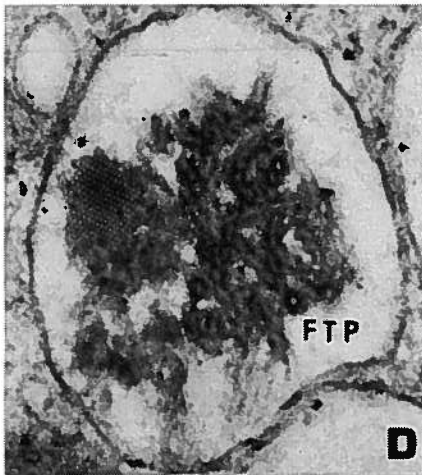
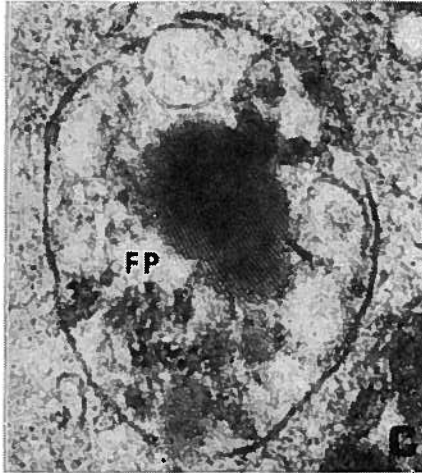


Fig. 1 — A e B: Linfócitos vacuolados (L) com inclusões, (X2000), casos 2 e 4.

uns vazios, outros contendo inclusões semelhantes às descritas (Fig 1B).

Em todos os casos em que foram estudados linfócitos encontrámos feixes de tubos paralelos, com um diâmetro

externo entre 20 a 30 nm, isolados no citoplasma e, nos casos #2 e #3, associados a membranas paralelas no mesmo vacuolo (Fig 1 D e E).



C: Fingerprint (FP) e perfis tubulares, ($\times 72\,000$), caso 2.
 D: Figura paracristalina (PC), feixes de tubos (FTP), ($\times 67\,000$), caso 4.
 E: Feixe de tubos paralelos, ($\times 67\,000$), caso 4.

Nas biópsias de músculo estriado, pele e conjuntiva palpebral (casos #5, #6 e #7) foram encontradas nas células endoteliais e nos pericitos inclusões osmiofílicas densas, grupos de perfis paralelos de membranas e estruturas paracristalinas. Nos vasos da conjuntiva palpebral do caso #6 observamos grupos de corpos curvilíneos associados a essas inclusões (Fig 2). No caso #7 não encontramos alterações vasculares.

Nos casos #6, #7 e #8 os fibroblastos da derme, do corion da conjuntiva e da mucosa rectal tinham inclusões citoplasmáticas semelhantes às descritas (Fig 3).

As amostras dos casos #5, #6 e #7 permitiram observar fibras nervosas periféricas mielínicas e amielínicas com corpos densos, amorfos, intra-axonais (Fig 4).

No caso #5 foram encontrados, em cerca de 20% das fibras musculares estriadas, corpos curvilíneos de diversas dimensões, limitados por membrana, com localização subsarcolemática preferencial (Fig 5).

No caso #8 foram também observadas células musculares lisas, macrófagos e plasmócitos com inclusões osmiofílicas densas, *fingerprints*, estruturas paracristalinas e corpos curvilíneos, por vezes associados no mesmo citosoma (Fig 6).

DISCUSSÃO

A classificação das cerolipofuscinoses é feita, com base na evolução clínica da doença, em 4 tipos: 1 — tipo infantil ou doença de Haltia-Santavouri, com início antes dos 2 anos de idade, atraso psicomotor rapidamente progressivo e amaurose precoce; 2 — tipo infantil tardio ou doença de Jansky-Bielschowsky, com início entre os 2 e os 4 anos de idade, atraso psicomotor com progressão rápida, crises convulsões frequentes e graves, e alterações visuais ligeiras na maior parte da evolução da doença; 3 — tipo juvenil ou doença de Batten ou de Spielmeyer-Vogt-Sjogren, com início depois dos 4 anos de idade, evolução lenta com alterações visuais precoces, atraso psicomotor, e crises convulsivas terminais; 4 — tipo adulto ou doença de Kuff, com início depois dos 20 anos de idade, em que predominam as alterações cerebelosas e extrapiramidais, com demência, podendo não existir amaurose ou convulsões^{5, 25, 28}.

O problema de estes quatro tipos principais corresponderem ou não a alterações metabólicas distintas só poderá ser esclarecido com a identificação bioquímica do defeito associado a cada um deles^{25, 28, 30}.

Têm sido descritas diferenças ultraestruturais nas cerolipofuscinoses, pela ocorrência predominante de certas inclusões citoplasmáticas em cada um dos tipos clínicos. Nos tipos infantil e adulto têm sido descritos mais frequentemente depósitos de material osmiofílico granuloso com ocasionais *fingerprints* no tipo adulto^{21, 25, 28}. No tipo infantil tardio parece haver um predomínio de corpos curvilíneos, com material granular e *fingerprints* em menor quantidade, enquanto que no tipo juvenil tem sido referido o predomínio de perfis de membranas paralelas e de *fingerprints*^{9, 19, 31}.

Alguns autores³⁰ vêem nesta distribuição diferente dos padrões ultraestruturais uma expressão de heterogeneidade etiopatogénica. Há, no entanto, uma relativa sobreposição tanto nas características e evolução clínica como nos padrões ultraestruturais, o que leva outros autores^{20, 32-34} a considerar que se trata de vários graus da mesma deficiência enzimática, com acumulação de metabolitos em diferentes estádios da sua morfogénese.

Ressalvando a não evidência nos linfócitos de corpos curvilíneos, considerados específicos da forma infantil tardia, em todos os tipos de tecidos analisados, nos oito casos incluídos neste trabalho, foi possível documentar aspectos ultraestruturais que confirmam o diagnóstico clínico de lipofuscínose generalizada.

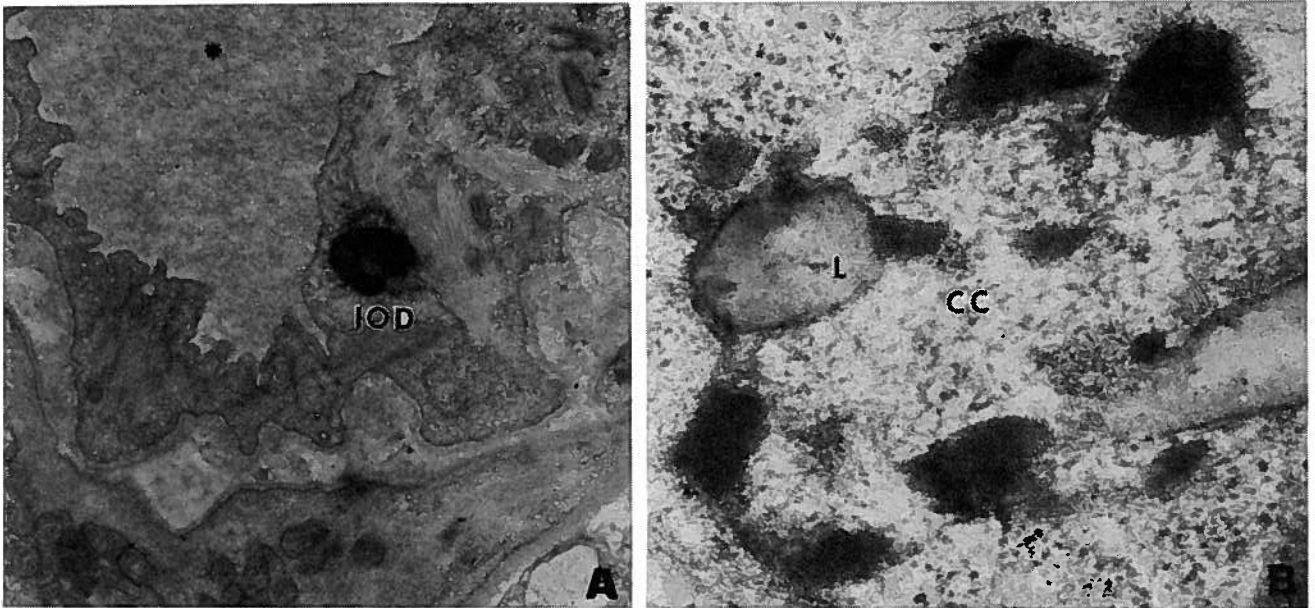


Fig. 2 — A: Endotélio com inclusão osmifílica densa (IOD), ($\times 13\,600$), caso 6.

b: Fingerprint, figuras paracristalinas, corpos curvilíneos (CC) e gotas lipídicas (L) numa célula endotelial, ($\times 57\,500$), caso 7.

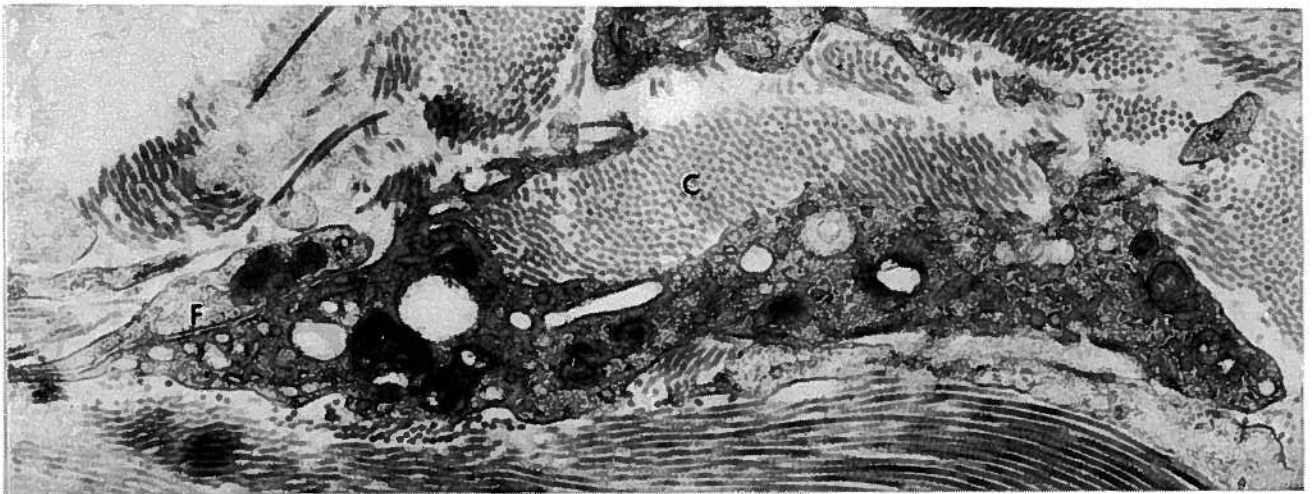


Fig. 3 — Fibroplasto (F) vacuolado com inclusões densas; colágeno (C), ($\times 14\,000$), caso 7.

Segundo a idade de início dos sintomas e sinais clínicos e a evolução da doença, os casos #2, #3 e #7 podem ser incluídos no tipo juvenil ou doença de Batten, e os restantes no tipo infantil tardio, ou doença de Jansky-Bielschowsky.

A distribuição dos vários tipos de alterações ultraestruturais nestes dois grupos confirmou existir um predomínio de corpos curvilíneos nas células dos casos do tipo infantil tardio, (casos #1, #4, #5, #6 e #8) e de agrupamentos de perfis paralelos de membranas, fingerprints e figuras paracristalinas nas células dos casos do tipo juvenil (casos #2, #3 e #7). Em nenhum dos casos do tipo juvenil foram encontrados corpos curvilíneos.

É de notar que em todos os casos do tipo infantil tardio foram observadas formas ultraestruturais comuns com as encontradas nos casos do tipo juvenil (estruturas paracristalinas e fingerprints).

Os achados ultraestruturais dos 8 doentes estudados apoiam observações anteriores que demonstraram que os

diferentes padrões de inclusões citoplasmáticas, não sendo específicos de qualquer um dos quatro tipos de CLF, têm todavia uma probabilidade maior de serem predominantes nos casos cuja idade de início de sintomas e progressão clínica são semelhantes^{32,33,35}.

Embora as lesões celulares nas CLF sejam generalizadas, tem sido defendido que certos tecidos são mais úteis para identificar cada uma das formas clínicas. Assim, as biópsias de mucosa rectal, de pele, e de músculo estriado seriam preferíveis, respectivamente, para o estudo da forma infantil, das formas juvenil e do adulto, e da infantil tardia^{14,15,19,22,34}. Essa utilidade relacionar-se-ia com a ocorrência mais frequente naqueles tecidos de padrões ultraestruturais considerados específicos de cada um dos tipos de CLF.

O pequeno número de casos estudados não nos permite concluir sobre este aspecto. Contudo, nos três casos (#5, #6 e #7) em que foi estudado mais do que um tecido (Quadro 2)

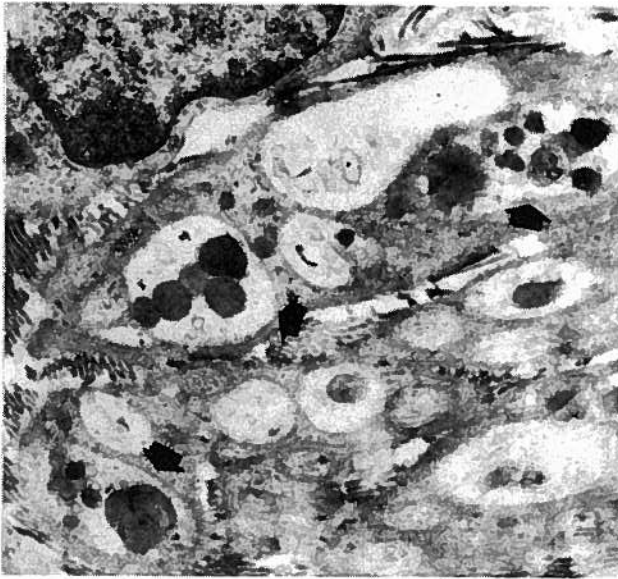


Fig. 4 — Inclusões densas intra-axonais, ($\times 25\,000$), caso 6.



Fig. 5 — Longo corpo curvilinear (CC) sub-sarcolemático, ($\times 18\,800$), caso 5.

foram encontradas alterações ultraestruturais descritas nas CLF. Pelo menos nestes tipos de CLF não se verificou, portanto, haver preferência por um determinado tecido para a confirmação morfológica do diagnóstico clínico.

Alguns autores³⁴ referem casos de CLF do tipo infantil tardio em que não se demonstraram alterações ultraestruturais nos linfócitos do sangue periférico³⁴. No presente trabalho, nos casos em que a análise de linfócitos complementou a de outros tipos celulares (casos #5 e #7), foram encontradas alterações ultraestruturais típicas das CLF em ambos.

No caso #5 (tipo infantil tardio) os linfócitos tinham inclusões citoplasmáticas características das CLF (inclusões osmiofílicas densas, *fingerprints*, inclusões paracristalinas) mas não continham corpos curvilineares. Estes, considerados específicos do tipo infantil tardio, foram não só observados nas células musculares estriadas mas também em outros

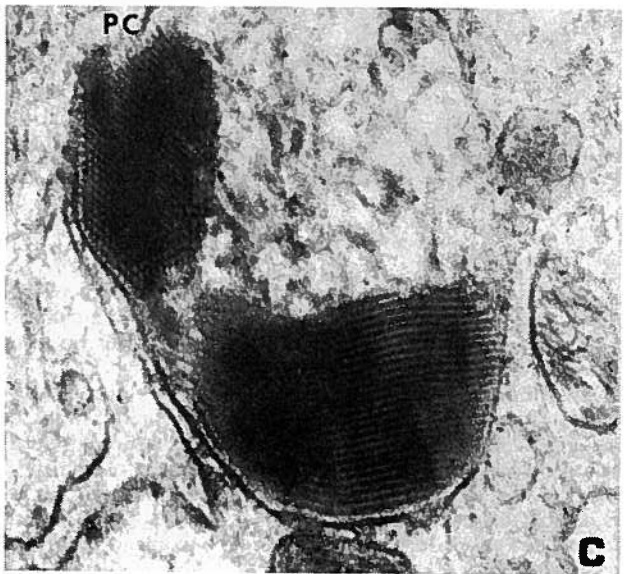
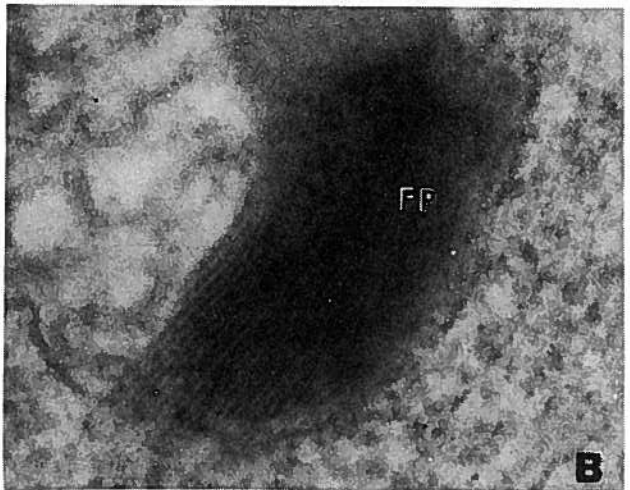
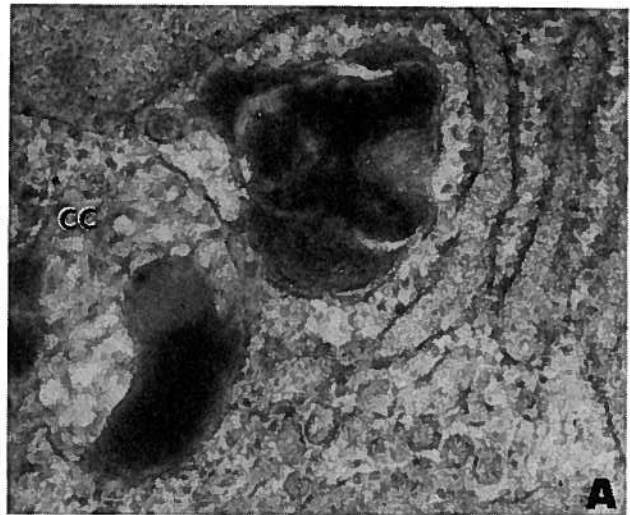


Fig. 6 — A: Perfis curvilineares (CC) e fingerprint no citoplasma de um plasmodio, ($\times 63\,500$), caso 8. B: fingerprint em maior ampliação (FP), ($\times 15\,500$), caso 8. C: estrutura paracristalina (PC), Fingerprint e perfis curvilineares em plasmodio, ($\times 14\,000$), caso 8.

tipos celulares da conjuntiva palpebral e da mucosa rectal (Quadro 2), o que confirma a utilidade destes tecidos no estudo ultraestrutural deste tipo particular de CLF.

Em todos os seis casos em que foram estudados linfócitos do sangue periférico, estes continham feixes de tubos paralelos no citoplasma. Estas estruturas têm sido descritas noutras doenças, em doentes submetidos a terapêutica com esteróides, em indivíduos normais e em casos de CLF³⁶⁻³⁹. Parece-nos no entanto interessante o facto de, em dois dos casos, uma percentagem apreciável de linfócitos conter feixes de tubos paralelos associados no mesmo citosoma a inclusões osmiofílicas densas, *fingerprints* e estruturas paracristalinas. Esta observação pode sugerir a hipótese da existência de uma relação daquelas estruturas com a alteração metabólica das CLF.

Considerados inicialmente predominantes nos linfócitos T, os feixes de tubos paralelos foram posteriormente observados noutras classes de linfócitos³⁷. Se bem que alguns autores^{36,38} os considerem como organelos celulares, não foi até hoje demonstrada a sua relação com nenhum processo metabólico celular. No presente trabalho não foi feita a separação ou identificação das populações de linfócitos T e B, pelo que não foi possível valorizar a coexistência dos feixes de tubos paralelos e das inclusões que predominam nas cerolipofuscinoses, nem avaliar a influência da duração média de vida das diferenças subpopulações linfocitárias no tipo de alterações ultraestruturais observadas. Parece-nos importante salientar que nos 6 casos em que foram estudados linfócitos do sangue periférico, o exame ultraestrutural destas células revelou sensibilidade e especificidade para a confirmação do diagnóstico clínico. A facilidade de execução desta técnica de estudo recomenda a sua utilização como passo indispensável para a confirmação do diagnóstico clínico de cerolipofuscinoze.

AGRADECIMENTOS

Os autores desejam agradecer ao Sr. Pedro Branco e Sra. D. Dina Raquel Aguilera Leitão o trabalho técnico realizado.

BIBLIOGRAFIA

1. DYKEN P, KRAWIECKI N: — Neurodegenerative diseases of infancy and childhood. *Ann Neurol* 1983; 13: 351-364.
2. ARSÉNIO-NUNES ML, GOUTIERES F, AICARDI J: — An ultramicroscopic study of skin and conjunctival biopsies in chronic neurological disorders of childhood. *Ann Neurol* 1981; 9: 163-173.
3. MARTIN JJ, CEUTERICK C: — Morphological study of skin biopsy specimens: a contribution to the diagnosis of metabolic disorders with involvement of the nervous system. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1978; 41: 232-248.
4. MACLEOD PM, DOLMAN CL, CHANG E, et al: — The neuronal ceroid — lipofuscinosis in British Columbia: A clinical epidemiologic and ultrastructural study. *Birth Defects* 1976; 12: 289-296.
5. GREENWOOD RS, NELSON JS: — Atypical neuronal ceroid-lipofuscinosis. *Neurology* 1978; 28: 710-717.
6. DOLMAN CL, MACLEOD PM, CHANG EC: — Lymphocytes and urine in ceroid-lipofuscinosis. *Arch Pathol Lab Med* 1980; 104: 487-490.
7. HARTROFT WS, PORTER FA: — Ceroid. *Am J Med Sci* 1965; 250: 324-245.
8. WOLMAN M: — Biological peroxidation of lipids and membranes. *Israel J. Med Sci*, suppl. 1975; 11:
9. GOEBEL HH, ZEMAN W, PATEL V, PULLARKAT RK, LENARD HG: — On the ultrastructural diversity and essence of residual bodies in Neuronal Ceroid-Lipofuscinosis. *Mechanisms of ageing and development*, Lausanne, Elsevier Sequoia SA 1979; 10: 13-70.
10. SIAKOTOS AN, KOPPANG N, YOUMANS S, BUCANA C: — Blood levels of alpha-tocopherol in a disorder of lipid peroxidation: Batten's disease. *The Am J Clin Nutrition* 1974; 27: 1152-1157.
11. DUSTIN P, TONDEUR M, LIBERT J: — Metabolic and Storage Diseases. In Johannessen JV: *Electron Microscopy in Human Medicine*, 1972, McGraw-Hill; 149-274.
12. ZEMAN W, DONAHUE S: Fine structure of the lipid bodies in juvenile amaurotic idiocy. *Acta Neuropath (Berlin)*. 1963; 3: 144-149.
13. GONATAS NK, TERRY RD, WINKLER K, KOREY SR, GOMEZ CJ, STEIN A: — A case of juvenil lipidosis. The significance of electron microscopy and biochemical observation of a cerebral biopsy. *J Neuropath Exp Neurol*. 1963; 22: 555-586.
14. ARSÉNIO-NUNES ML, GOUTIERES F: — An ultramicroscopic study of the skin in diagnosis of the infantile and late infantile types of neuronal ceroid-lipofuscinosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1975; 38: 994-999.
15. GOEBEL HH, ZEMAN W, PILZ H: — Significance of muscle biopsies in neuronal ceroid-lipofuscinoses. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1975; 38: 985-993.
16. DUFFY PE, KORNFELD M, SUZUKY K: — Neurovisceral storage disease with curvilinear bodies. *J Neuropath Exper Neurol*. 1968; 27: 351-370.
17. MARKESBERY WR, SHIELD LK, EGEL RT, JAMESON HD: — Late-infantile neuronal ceroid-lipofuscinosis: An ultrastructural study of lymphocyte inclusions. *Arch Neurol*. 1976; 33: 630-635.
18. DE BAEQUE C: — Diagnosis of neuronal ceroid-lipofuscinosis by electron microscopy of urinary sediment. *N Engl J Med*. 1975; 292: 1408.
19. CARPENTER S, KARPATI G, ANDERMAN F: — Specific involvement of muscle, nerve and skin in late infantile and juvenile amaurotic idiocy. *Neurology (Minneapolis)*. 1972; 22: 170-186.
20. SIEGISMUND G, GOEBEL HH, LOBLICH HJ: — Ultrastructure and visceral distribution of lipopigments in infantile neuronal ceroid-lipofuscinosis. *Path Res Pract*. 1982; 175: 335-347.
21. RAPOLA J, HALTIA M: — Cytoplasmic inclusions in the veriform appendix and skeletal muscle in two types of so-called neuronal ceroid-lipofuscinosis. *Brain*. 1973; 96: 833-840.
22. RAPOLA J, SANTAVUORI P, SAVILANT E: — Suction biopsy of rectal mucosa in the diagnosis of infantile and juvenile types of neuronal ceroid-lipofuscinosis. *Hum Pathol*. 1984; 15: 352-360.
23. MOURA NUNES JF, SOARES JO, ALVES DE MATOS AP: — Micro Buffycoats of whole blood: a method for the electron microscopic study of mononuclear cell. *Stain Technology*. 1979; 54 (5): 257-260.
24. AGUAS AP, MOURA NUNES JF, HASSE FERREIRA AD, VITAL JP: — Neuronal ceroid-lipofuscinosis: Ultrastructural study of lymphocyte dense bodies. *Neurology*. 1980; 30: 976-980.
25. HALTIA M, RAPOLA J, SANTAVUORI P, KERANEN A: — Infantile type of so-called neuronal ceroid-lipofuscinosis. 2 — Morphological and biochemical studies. *J Neurol Sciences*. 1973; 18: 269-285.
26. CHOU SM, THOMPSON HG: — Electron microscopy of storage cytosomes in Kuf's disease. *Arch Neurol*. 1970; 23: 489-501.
27. BOEHME DH, COTRELL JC, LEONBERGER SC, ZEMAN W: — A dominant form of neuronal ceroid-lipofuscinosis. *Brain*. 1971; 94: 745-766.
28. SANTAVUORI P, HALTIA M, RAPOLA J, RAITTA C: — Infantile type of so-called neuronal ceroid-lipofuscinosis. 1-A clinical study of 15 patients. *J Neurol Sciences*. 1973; 18: 257-276.
29. ZEMAN W: — Studies in the neuronal ceroid-lipofuscinosis. *J Neuropath Exp Neurol*. 1974; 23: 1-12.
30. GONATAS NK, GAMBETTI P, TUCHER SH, et al: — Cytoplasm inclusions in juvenile amaurotic idiocy. *J Pediatr*. 1969; 75: 769-805.

31. ZEMAN W, DYKEN P: — Neuronal ceroid-lipofuscinosis (Batten's disease): Relationship to amaurotic family idiocy? *Pediatrics*. 1969; 44: 570-583.
32. DEKABAN AS, HERMAN MH: — Childhood, juvenile and adult cerebral lipidoses. Are they different entities? *Arch Pathol*. 1974; 93: 65-73.
33. TOWFIGHI J, BAIRD HW, GAMBETTI P, GONATAS K: — The significance of cytoplasmic inclusions in late infantile and juvenile amaurotic idiocy. *Acta Neuropath (Berl)*. 1973; 23: 32-42.
34. BODIAN M, LAKE BD: — The rectale approach to neuropathology. *The Br J Surg*. 1963; 50: 702-714.
35. STEKHOVEN JHS, VAN HAELEST UJGM, JOOSTEN EMG, GABREELS FJM: — Ultrastructural study of so-called curvilinear bodies and fingerprint structures in lymphocytes in late-infantile amaurotic idiocy. *Acta Neuropath (Berl)*. 1976; 35: 295-306.
36. BRUNNING RD, PARKIN J: — Ultrastructural studies of parallel tubular arrays in human lymphocytes. *Am J Pathol*. 1975; 78: 59-64.
37. PAYNE CM, GLASSER L: — The effect of steroid on peripheral blood lymphocytes containing parallel tubular arrays. *Am J Pathol*. 1978; 92: 611-618.
38. PAYNE CM, JONES JF, SIEBER OF, FULGINITI VA: — Parallel tubular arrays in severe combined immunodeficiency disease: an ultrastructural study of peripheral blood lymphocytes. *Blood*. 1977; 50: 55-63.
39. SHWENDEMANN G.: — Lymphocyte inclusions in the juvenile type of generalized ceroid-lipofuscinosis. *Acta Neuropath (Berl)*. 1976; 36: 327-338.

Pedido de separatas:
Carlos Matias
Serviço de Patologia Morfológica
Instituto Português de Oncologia de Francisco Gentil
R. Prof. Lima Basto
1093 Lisboa Codex.