

Utilidad de la biopsia de piel en el diagnóstico de enfermedades neurológicas

Pilar de la Sotta F¹, William Romero G¹, Sergio González B².

Skin biopsy for the diagnosis of nervous system diseases

Skin biopsy is a powerful diagnostic tool in Dermatology. Its use has been extended to other medical specialties, allowing the diagnosis of several diseases that previously required complex and high risk diagnostic procedures. Skin contains numerous cell types, including blood vessels and peripheral nerves and represents a window to the systemic circulation and nervous system. In this review we discuss the use of skin biopsy to diagnose nervous system diseases in which patients do not exhibit any clinical cutaneous manifestations. We review the usefulness of skin biopsy in cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL), some lysosomal storage diseases, Lafora disease and in peripheral neuropathies (Rev Méd Chile 2008; 136: 1047-55).

(Key words: CADASIL; Diagnostic techniques, surgical, biopsy; Lafora disease; Lysosomal storage)

Recibido el 22 de junio, 2007. Aceptado el 5 de septiembre, 2007.

Fuente de financiamiento: ninguna.

Conflictos de interés: no identificados.

Departamentos de ¹Dermatología y ²Anatomía Patológica, Escuela de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago de Chile.

La biopsia de piel es probablemente la herramienta más importante en Dermatología, no sólo para el diagnóstico, sino para el seguimiento de múltiples dermatosis. Sin embargo, la utilidad de la biopsia de piel se ha extendido a otras áreas de la medicina, especialmente en el campo de las enfermedades neurológicas, donde cambios similares a los observados en el sistema nervioso central pueden verse en la vasculatura o en la inervación cutánea. Así, es posible encontrar

alteraciones de la ultraestructura cutánea patognomónicas de enfermedades como la arteriopatía cerebral autosómica dominante con infartos subcorticales y leucoencefalopatía (CADASIL), algunas enfermedades de depósito lisosomal como la mucopolidosis IV y la lipofuscinosis ceróidea neuronal, y otras enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Lafora. Las enfermedades mencionadas pueden afectar a niños y adultos y, muchas veces, la única forma de hacer el diagnóstico diferencial entre ellas es mediante la biopsia de piel, dado que la clínica no siempre es característica. En este artículo se revisarán estas patologías, con énfasis en la importancia de la biopsia de piel para su diagnóstico. En forma adicional, se indica sitio de biopsia y técnica específica para el diagnóstico de cada patología.

Correspondencia a: Dra. Pilar de la Sotta F. Departamento de Dermatología, Centro Médico San Joaquín, Pontificia Universidad Católica de Chile. Av. Vicuña Mackenna 4686, Macul, Santiago, Chile. Fax: (56 2) 552 9974. E mail: pilardelasotta@yahoo.com

ARTERIOPATÍA CEREBRAL AUTOSÓMICA DOMINANTE
CON INFARTOS SUBCORTICALES Y LEUCOENCEFALOPATÍA
(CADASIL)

La arteriopatía cerebral autosómica dominante con infartos subcorticales y leucoencefalopatía (CADASIL, *Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy*) es una enfermedad cerebrovascular hereditaria caracterizada por accidentes vasculares isquémicos recurrentes, que se manifiesta en la adultez y progresa a demencia^{1,2}. Más de 400 familias afectadas y algunos casos esporádicos, han sido descritos³. Actualmente se piensa que podría ser responsable de muchos de los casos previamente diagnosticados como demencia multifarcto idiopática⁴.

a) Etiología: Se produce por mutación del gen Notch3, localizado en el cromosoma 19q12⁵. Notch 3 es un receptor transmembrana y pertenece a la familia de receptores altamente conservados Notch/LIN-12 que participan en la determinación del destino celular durante la embriogénesis^{5,6}; sin embargo, en adultos sólo se expresa en células de músculo liso vascular y su función es desconocida^{7,8}. Notch 3 contiene 34 repeticiones en tándem tipo EGF. Las mutaciones patológicas se localizan dentro de los exones que codifican las secuencias repetidas, y resultan en la ganancia o pérdida de un residuo de cisteína en el dominio extracelular^{2,3,5,9}.

b) Manifestaciones clínicas: Se caracteriza por presentar problemas de aprendizaje durante la infancia¹⁰, migraña y depresión en la juventud, e infartos subcorticales con déficit neurológico progresivo en la adultez¹¹. Las manifestaciones clínicas de CADASIL generalmente comienzan con cefalea tipo migraña, que progresa con ataques isquémicos transitorios hacia una demencia multifarcto durante la sexta o séptima década de la vida¹¹⁻¹³. En una revisión de 102 pacientes con CADASIL¹⁴, la forma de presentación más frecuente fue como episodios isquémicos recurrentes, tipo accidentes isquémicos transitorios, en el 71% de los casos. Otras manifestaciones son: alteración de la marcha (90%), incontinencia urinaria (86%), parálisis pseudobulbar (52%), déficit cognitivo (48%), migraña (38%), de las cuales 87%

tienen aura, alteraciones psiquiátricas (30%), demencia (28%), desorden de adaptación (24%) y convulsiones (10%)^{14,15}. Los pacientes fallecen, en promedio, 20 años después de iniciados los síntomas.

c) Diagnóstico: La resonancia nuclear magnética de cerebro muestra grados variables de hiperintensidad dentro de la sustancia blanca subcortical y periventricular, con infartos lacunares en tálamo, ganglios basales y troncoencéfalo¹⁶⁻¹⁸, sin embargo, estos cambios no son específicos de CADASIL y pueden estar ausentes hasta etapas avanzadas de la enfermedad^{11,19}. Existen estudios genéticos para mutaciones del gen Notch 3, sin embargo, son caros y no fácilmente disponibles.

El diagnóstico específico de CADASIL se basa en los hallazgos de la biopsia de cerebro y, en muchos casos, se hacía en forma retrospectiva durante la autopsia.

En la biopsia de cerebro, se observa daño difuso de la sustancia blanca, sin cambios en la corteza, con fibrosis, degeneración del músculo liso vascular con cambios granulares ácido periódico-Schiff (PAS) positivos en la túnica media, y obliteración de las arterias perforantes pequeñas y arterias meníngeas^{11,20}. El estudio con microscopía electrónica (ME) de la vasculatura cerebral revela degeneración y destrucción de las células musculares lisas de las arterias pequeñas, observándose característicamente depósitos de material granular osmiofilico (MGO) alrededor de las células de músculo liso^{21,22}. Se ha postulado que las mutaciones en CADASIL podrían alterar el reciclaje del ectodominio de Notch3 desde la superficie celular lo que explicaría la acumulación del MGO⁷.

Los depósitos de MGO son patognomónicos de CADASIL y fueron, posteriormente, encontrados en arterias de otros órganos, como corazón, riñón, intestino delgado y grueso, hígado, músculo esquelético y piel^{23,24}. Este descubrimiento demostró que CADASIL es una arteriopatía sistémica y, por otro lado, facilitó el diagnóstico, ya que evidenció que los cambios observados en el cerebro se correlacionan con los de la piel.

d) Biopsia de piel: La biopsia de piel es un método fácil y efectivo, para detectar el MGO en pacientes con sospecha de CADASIL, por lo que se ha

convertido en el método diagnóstico de elección²³⁻²⁷. El MGO a la ME se observa en la membrana basal de las células musculares lisas vasculares de los capilares dérmicos (Figura 1)^{21,22,28}.

Se utiliza biopsia de piel tipo sacabocado ("punch") de 2 a 3 mm de diámetro de cualquier zona del cuerpo, que debe ser inmediatamente fijada con glutaraldehído al 2% para el estudio con ME⁴.

Múltiples estudios han determinado que la presencia de MGO en las arterias dérmicas alcanzaría una especificidad de 100% para el diagnóstico de CADASIL. En uno de ellos, todas las 14 muestras tomadas de individuos afectados, incluyendo 2 portadores asintomáticos de mutaciones en Notch3, mostraron los depósitos vasculares de MGO²⁹. Sin embargo, existe la posibilidad de falsos negativos debido a la naturaleza focal del MGO, lo que se evita realizando múltiples cortes profundos^{30,31}.

Existe una estrecha correlación entre los cambios observados en los capilares dérmicos y los encontrados en las arterias cerebrales, lo que sugiere que la biopsia de piel también podría ser útil en la evaluación de la actividad de la enfermedad²⁶. Por otro lado, los cambios cutáneos preceden a los cambios detectables en neuroimágenes y están presentes en portadores asintomáticos, por lo que la biopsia de piel también es útil en el estudio de familiares^{30,32}.

En la mayoría de los casos, es posible sospechar el diagnóstico de CADASIL con los antecedentes clínicos y las neuroimágenes, especialmente si son compatibles con eventos isquémicos en pacientes sin factores de riesgo. En estos casos el examen diagnóstico de elección es la biopsia de piel con estudio de ME. Un mayor grado de sospecha clínica, sumado a la disponibilidad de la biopsia de piel, probablemente permitirá diagnosticar muchos casos previamente subdiagnosticados.

ENFERMEDADES DE DEPÓSITO LISOSOMAL

Las enfermedades de depósito lisosomal (EDL) son un grupo heterogéneo de patologías producidas por defectos en la función de los lisosomas, organelos responsables de la digestión y reciclaje de diversas macromoléculas³³. La mayoría de las EDL son causadas por defectos hereditarios, sin embargo, también existen formas adquiridas. Hasta la fecha se han descrito 51 entidades de causa genética³³. La incidencia combinada de las EDL se ha estimado entre 1 - 4 por 100.000 habitantes³⁴, con variaciones regionales, llegando a 1 en 5.000-8.000 en ciertas zonas de Australia, Europa y Estados Unidos de Norteamérica³⁵. Dependiendo del sitio de la mutación y/o del gen defectuoso, las EDL pueden manifestarse en forma infantil o adulta³⁶.

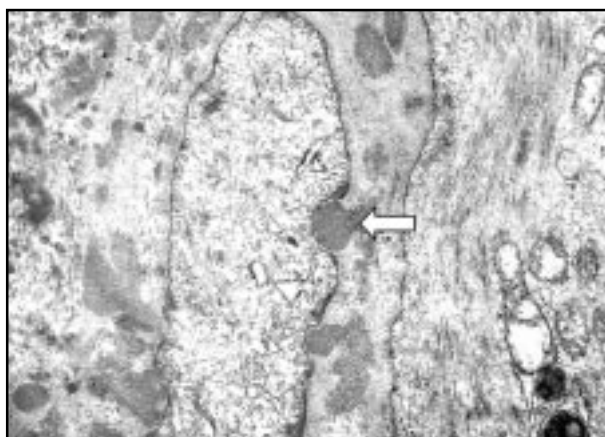


Figura 1. Arteriopatía cerebral autosómica dominante con infartos subcorticales y leucoencefalopatía (CADASIL). Paciente de sexo masculino de 59 años con deterioro orgánico cerebral progresivo. La microscopía electrónica de la biopsia de piel muestra material granular osmiofilicio (flecha) en las células musculares lisas vasculares de los capilares dérmicos (ME, 80.000 x).

a) *Etiología*: Las EDL pueden ser producidas por deficiencias en la actividad de las enzimas lisosomales (hidrolasas ácidas), defectos en la destinación de las enzimas al lisosoma, defectos de transporte en la membrana lisosomal, o deficiencias en proteínas activadoras (saposinas).

b) *Manifestaciones clínicas*: Las manifestaciones de las EDL dependen del tipo de mutación y de su interacción con factores aún desconocidos. La clínica no es específica para una EDL determinada, pero dependiendo del tipo y naturaleza de la mutación, la enfermedad puede presentarse en forma infantil o de la adultez. Las alteraciones más frecuentes son desórdenes neurológicos, hepatoesplenomegalia, opacidad corneal y anomalías esqueléticas, en forma aislada o combinada³⁸. Estas manifestaciones también pueden ser producidas por enfermedades no lisosomales, por lo que en general las EDL representan un enorme reto para el clínico.

c) *Diagnóstico*: En la mayoría de las EDL, el diagnóstico requiere demostrar la deficiencia de una única enzima en el plasma, leucocitos o cultivo de fibroblastos, o identificar la anomalía genética específica^{33,37}. Sin embargo, el dilema para el clínico es sospechar la enfermedad, dado que los signos son inespecíficos. Por otro lado, el costo de estudiar todas las posibles enzimas y genes es extremadamente alto³⁷. En este contexto, es esencial disponer de un examen que permita orientar hacia una enfermedad específica. Se ha demostrado que existen patrones ultraestructurales en los lisosomas enfermos relativamente específicos y, algunos, patognómicos de una determinada EDL, y por ello el estudio histopatológico se ha convertido en una poderosa herramienta en el estudio de estas patologías. Para el diagnóstico de EDL se ha utilizado la ME de biopsias de conjuntiva³⁸, recto³⁹ y piel⁴⁰. La biopsia de piel es la más simple y mejor tolerada, y además permite descartar enfermedades con manifestaciones similares como CADASIL y otras patologías neurodegenerativas²².

d) *Biopsia de piel*: La ME de piel es la herramienta diagnóstica de tamizaje más eficiente y costo-efectiva para las EDL, con una sensibilidad mayor al 90%^{33,37}.

Para el estudio de las EDL se han utilizado biopsias tipo sacabocado de piel de la región axilar⁴¹ y del antebrazo³⁷. La región axilar podría ser superior para el estudio de enfermedades metabólicas debido a que se pueden encontrar múltiples tipos celulares en una sola muestra de piel, especialmente epitelio ductal y glandular de glándulas sudoríparas, células endoteliales, músculo liso, fibroblastos, pericitos y células de Schwann⁴¹.

El diagnóstico morfológico de las EDL por ME depende de la observación de numerosos lisosomas secundarios aumentados de tamaño en las células afectadas y, aunque el defecto genético esté presente en todas las células del individuo, sólo algunas células presentan alteraciones.

La acumulación de material de depósito en un tipo celular específico es determinada por la estructura química y la cantidad de sustrato que es reciclado por esas células⁴². Mediante la identificación de los tipos celulares con lisosomas enfermos y las características ultraestructurales del material acumulado, es posible determinar si el defecto interfiere con el catabolismo de glicolípidos, mucopolisacáridos, glicoproteínas o lípidos. Sin embargo, es raro que la morfología del material almacenado sea patognomónica³⁴.

En general existen tres apariencias ultraestructurales principales del material almacenado³⁷.

- a) Estructuras membranosas laminares, se observan por acumulación de glicolípidos, como gangliosidos y esfingomiélin, y pueden tener apariencia de "huellas dactilares" o "cuerpos de cebra" (Figura 2).
- b) Lisosomas vacíos o material fibrilar fino, se observan por depósitos de oligosacáridos, ácido siálico libre o mucopolisacáridos.
- c) Combinación de estructuras membranosas laminares con material fibrilar en el mismo lisosoma, que se produce por inhibición secundaria de enzimas por un primer sustrato ya acumulado, con depósito simultáneo de oligosacáridos y glicolípidos.

A continuación se mencionan en forma breve las características ultraestructurales, de algunas EDL específicas:

Mucopolisacaridosis: se caracterizan por actividad deficiente de enzimas que degradan glicosaminoglicanos y se observa en forma simultánea mate-



Figura 2. Enfermedad de Fabry o angioqueratoma corporal difuso. Paciente de sexo femenino de 51 años que se presentó con múltiples angioqueratomas. Se observan estructuras membranosas laminares por depósitos de glicosfingolípidos (ME, 120.000 x).

rial fibrilar fino y estructuras membranosas laminares dentro de un mismo lisosoma⁴³.

Mucopolipidosis: se caracterizan por deficiencias en el metabolismo de glicolípidos, destacando la *mucopolipidosis IV*, donde se observan estructuras membranosas laminares en los lisosomas de múltiples tejidos, excepto en neuronas, y donde la ME es esencial para el diagnóstico⁴⁴.

Enfermedades con alteración del metabolismo de esfingolípidos: en este grupo destacan las enfermedades de Fabry, de Niemann-Pick, de Krabbe y de Gaucher. La *enfermedad de Fabry* se caracteriza por depósitos de glicosfingolípidos y se observan estructuras membranosas laminares en múltiples células (Figura 2), siendo distintiva la presencia de múltiples capas de lámina basal alrededor de los vasos sanguíneos^{45,46}. En la *enfermedad de Niemann-Pick* se acumula esfingomielina que aparece como estructuras membranosas laminares más gruesas⁴⁷. En la *enfermedad de*

Krabbe se deposita galactosilesfingosina y se observan estructuras tubulares en las células de Schwann e inclusiones tipo hendidura en las glándulas sudoríparas ecrinas^{48,49}. La *enfermedad de Gaucher* se caracteriza por depósitos de glucosilceramida en células de estirpe monocito/macrófago en bazo, médula ósea, hígado, ganglios, pulmones, corazón y cerebro, pero no en piel⁵⁰.

Enfermedades con alteración del catabolismo de glicoproteínas: en este grupo destacan la fucosidosis, las manosidosis y la enfermedad Pompe. La *fucosidosis* se caracteriza porque la enzima defectuosa cataboliza glicolípidos y oligosacáridos, observándose glicolípidos (estructuras membranosas laminares) en las células de Schwann y oligosacáridos (material fibrilar fino) en las células endoteliales adyacentes⁴⁵. En las *manosidosis* se acumulan oligosacáridos, observándose lisosomas vacíos o con material fibrilar. En la *enfermedad de Pompe* se acumula glicógeno observándose partículas electrón-densas de aproximadamente 30 nm de diámetro.

Lipofuscinosis ceróidea neuronal (LCN): se conocen 9 variedades de LCN, cada una con depósitos de material morfológicamente diferentes⁵¹⁻⁵³. Algunas de las formas observadas son: depósitos granulares osmiofílicos, perfiles curvilíneos, "huellas dactilares" y complejos rectilíneos (Figura 3). Algunas de las variantes de LCN tienen material de depósito morfológicamente uniforme, mientras que otras tienen mezclas de estructuras. Actualmente la ME es el único método disponible para el diagnóstico de LCN.

Finalmente, el estudio con ME de biopsias cutáneas representa el test diagnóstico inicial más efectivo en la evaluación de pacientes con sospecha de EDL, y permite orientar el estudio enzimático o genético específico.

ENFERMEDAD DE LAFORA

La enfermedad de Lafora (EL) es una enfermedad genética autosómica recesiva perteneciente al grupo de las epilepsias mioclónicas progresivas. Se caracteriza por degeneración del sistema nervioso central con aparición de cuerpos intracelulares PAS positivos, conocidos como cuerpos de Lafora



Figura 3. Lipofuscinosis ceróidea neuronal. Paciente de sexo masculino de 4 años de edad con deterioro psicomotor progresivo. Se observan depósitos laminares y granulares al interior de los lisosomas (flecha) (ME, 120.000 x).

(CL), en múltiples tejidos como cerebro, piel e hígado (Figura 4)⁵⁴. La prevalencia de la enfermedad es desconocida, sin embargo, la mayoría de los casos se han descrito en Europa y provienen de matrimonios consanguíneos⁵⁵.

a) Etiología. La EL es producida por mutación del gen EPM2A, localizado en el cromosoma 6q23-25, en el 75%-85% de los casos⁵⁶. Este gen codifica una proteína de 331 aminoácidos con función tirosina fosfatasa, conocida como laforina, que se localiza en la membrana plasmática, el retículo endoplásmico y los polirribosomas⁵⁷. Esta proteína además contiene una molécula de unión a carbohidratos con la cual parece unirse a glicógeno⁵⁶. No se conoce la función biológica de laforina, pero en la EL la proteína pierde su actividad.

Los CL están compuestos principalmente de polímeros de glucosa (poliglucosanos) y se acumulan principalmente en las células piramidales largas de la tercera y cuarta lámina de la corteza cerebral y en el pericarion.

b) Clínica. La EL comienza a manifestarse en la segunda década de la vida, en promedio a los 14 años⁵⁵, aunque puede ser de inicio tardío. Con-

vulsiones tónico-clónicas generalizadas son en general la primera manifestación, y menos frecuentemente mioclonías o demencia. Otras manifestaciones son convulsiones occipitales con aura de luces de colores, mioclonías, signos cerebelosos, hiperreflexia y alteraciones visuales. Todos los casos desarrollan demencia rápidamente progresiva con disfunción cognitiva global en 2 a 6 años. La muerte ocurre 2 a 10 años después de iniciados los síntomas, en promedio a los 20 años de edad⁵⁵.

c) Diagnóstico. Las neuroimágenes pueden ser normales o se observa atrofia cerebral difusa que aumenta con la progresión de la enfermedad⁵⁵. El examen diagnóstico de elección es la biopsia de piel de la región axilar que permite identificar los CL.

d) Biopsia de piel. La biopsia de piel tiene una sensibilidad de 80%-100% para el diagnóstico de EL⁵⁵. El sitio de elección para la biopsia es la región axilar ya que permite identificar los CL en los ductos de las glándulas sudoríparas ecrinas y apocrinas y en las células mioepiteliales del acino secretor de las glándulas sudoríparas apocrinas (Figura 4)⁵⁸.

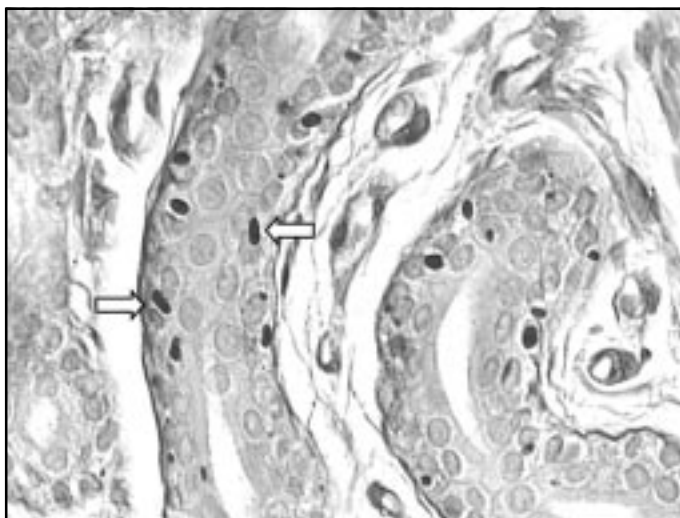


Figura 4. Enfermedad de Lafora. Se observan los cuerpos de Lafora (flechas) como cuerpos intracelulares PAS (+) en los ductos de las glándulas sudoríparas ecrinas (PAS, 200 x).

NEUROPATÍAS PERIFÉRICAS

La biopsia de piel se ha utilizado para el diagnóstico de diferentes neuropatías periféricas, incluyendo neuropatías autonómicas y desmielinizantes.

En el año 2004 la Federación Europea de Sociedades Neurológicas desarrolló guías para el uso de la biopsia de piel en el diagnóstico de neuropatías periféricas⁵⁹. Se recomendó realizar biopsias tipo sacabocado de 3 mm de diámetro en la zona distal de la pierna y cuantificar la densidad lineal de las fibras nerviosas intraepidérmicas no-mielinizadas (FNIE) en muestras marcadas con anticuerpos anti-PGP 9.5, un marcador neuronal citoplasmático. Así, la densidad de FNIE se correlaciona estrechamente con el umbral al calor y dolor, y parece ser más sensible que los estudios de conducción y que la biopsia del nervio sural, para el diagnóstico de neuropatía sensorial de fibras pequeñas⁵⁹. Por otro lado, el estudio en el tiempo de la densidad de FNIE y las tasas de regeneración se correlacionan con la progresión de las neuropatías⁵⁹.

CONCLUSIONES

La utilidad de la biopsia de piel ha sobrepasado el ámbito exclusivo de la dermatología y, actualmente, es un método diagnóstico para múltiples patologías neurológicas.

Para la mayoría de las patologías discutidas en esta revisión se requiere el uso de microscopía electrónica de transmisión, que requiere de una técnica, instrumental y personal altamente especializados. Sin embargo, el costo actual es relativamente bajo y es asequible a todo tipo de pacientes y formas de financiamiento existentes en nuestro país. Para realizar este examen y obtener muestras de óptima calidad y la mejor información posible de las biopsias, es necesaria una comunicación previa entre el equipo tratante y el laboratorio de Anatomía Patológica para acordar el lugar de toma de muestra y la mejor forma de fijación para su envío al laboratorio.

En este artículo intentamos sistematizar el uso de la biopsia de piel en enfermedades sistémicas sin manifestaciones cutáneas, y así facilitar la interacción de los distintos especialistas ante la sospecha de alguna de estas patologías.

REFERENCIAS

1. SOURANDER P, WALINDER J. Hereditary multi-infarct dementia. Morphological and clinical studies of a new disease. *Acta Neuropathol (Berl)* 1977; 39: 247-54.
2. TOURNIER-LASSERVE E, JOUTEL A, MELKI J, WEISSENBACH J, LATHROP GM, CHABRIAT H ET AL. Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy maps to chromosome 19q12. *Nat Genet* 1993; 3: 256-9.
3. JOUTEL A, DODICK DD, PARISI JE, CECILLON M, TOURNIER-LASSERVE E, BOUSSER MG. De novo mutation in the Notch3 gene causing CADASIL. *Ann Neurol* 2000; 47: 388-91.
4. RUMBAUGH JA, LADUCA JR, SHAN Y, MILLER CA. CADASIL: the dermatologic diagnosis of a neurologic disease. Cerebral autosomal-dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy. *J Am Acad Dermatol* 2000; 43: 1128-30.
5. JOUTEL A, CORPECHOT C, DUCROS A, VAHEDI K, CHABRIAT H, MOUTON P ET AL. Notch3 mutations in CADASIL, a hereditary adult onset condition causing stroke and dementia. *Nature* 1996; 383: 707-10.
6. ARTAVANIS-TSAKONAS S, RAND MD, LAKE RJ. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 1999; 284: 770-6.
7. JOUTEL A, ANDREUX F, GAULIS S, DOMENGA V, CECILLON M, BATTAIL N ET AL. The ectodomain of the Notch3 receptor accumulates within the cerebrovasculature of CADASIL patients. *J Clin Invest* 2000; 105: 597-605.
8. VILLA N, WALKER L, LINDSELL CE, GASSON J, IRUELA-ARISPE ML, WEINMASTER G. Vascular expression of Notch pathway receptors and ligands is restricted to arterial vessels. *Mech Dev* 2001; 108: 161-4.
9. KALIMO H, VIITANEN M, AMBERLA K, JUVONEN V, MARTTILA R, POYHONEN M ET AL. CADASIL: hereditary disease of arteries causing brain infarcts and dementia. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1999; 25: 257-65.
10. DESMOND DW, MORONEY JT, LYNCH T, CHAN S, CHIN SS, SHUNGU DC ET AL. CADASIL in a North American family: clinical, pathologic, and radiologic findings. *Neurology* 1998; 51: 844-9.
11. CHABRIAT H, VAHEDI K, IBA-ZIZEN MT, JOUTEL A, NIBBIO A, NAGY TG ET AL. Clinical spectrum of CADASIL: a study of 7 families. Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy. *Lancet* 1995; 346: 934-9.
12. DAVOUS P. The natural history of CADASIL. *Stroke* 1999; 30: 22-47.
13. DESMOND DW, MORONEY JT, LYNCH T, CHAN S, CHIN SS, MOHR JP. The natural history of CADASIL: a pooled analysis of previously published cases. *Stroke* 1999; 30: 1230-3.
14. DICHGANS M, MAYER M, UTTNER I, BRUNING R, MULLER-HOCKER J, RUNGGER G ET AL. The phenotypic spectrum of CADASIL: clinical findings in 102 cases. *Ann Neurol* 1998; 44: 731-9.
15. KANTAKIS J, THOBOIS S, CLAUDY A, BROUSSOLLE E. CADASIL (cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy): a neurovascular disease diagnosed by ultrastructural examination of the skin. *J Cutan Pathol* 2002; 29: 498-501.
16. CHABRIAT H, LEVY C, TAILLIA H, IBA-ZIZEN MT, VAHEDI K, JOUTEL A ET AL. Patterns of MRI lesions in CADASIL. *Neurology* 1998; 51: 452-7.
17. CHABRIAT H, MARISSA R, LEVY C, VAHEDI K, TAILLIA H, IBA-ZIZEN MT ET AL. Brain stem MRI signal abnormalities in CADASIL. *Stroke* 1999; 30: 457-9.
18. YOUSRY TA, SEELOS K, MAYER M, BRUNING R, UTTNER I, DICHGANS M ET AL. Characteristic MR lesion pattern and correlation of T1 and T2 lesion volume with neurologic and neuropsychological findings in cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL). *AJNR Am J Neuroradiol* 1999; 20: 91-100.
19. CHABRIAT H, TAILLIA H, IBA-ZIZEN MT, LEVY C, VAHEDI K, ABANOU A ET AL. MRI features of cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy. *Neurology* 1996; 46 (Suppl): A212.
20. WALSH JS, PERNICIARO C, MESCHIA JF. CADASIL (cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy): diagnostic skin biopsy changes determined by electron microscopy. *J Am Acad Dermatol* 2000; 43: 1125-7.
21. RUCHOUX MM, MAURAGE CA. CADASIL: Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy. *J Neuropathol Exp Neurol* 1997; 56: 947-64.
22. RUCHOUX MM, MAURAGE CA. Endothelial changes in muscle and skin biopsies in patients with CADASIL. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1998; 24: 60-5.
23. RUCHOUX MM, CHABRIAT H, BOUSSER MG, BAUDRIMONT M, TOURNIER-LASSERVE E. Presence of ultrastructural arterial lesions in muscle and skin vessels of patients with CADASIL. *Stroke* 1994; 25: 2291-2.
24. RUCHOUX MM, GUERROUAOU D, VANDENHAUTE B, PRUVO JP, VERMERSCH P, LEYS D. Systemic vascular smooth muscle cell impairment in cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy. *Acta Neuropathol* 1995; 89: 500-12.
25. SCHRODER JM, SELHAUS B, JORG J. Identification of the characteristic vascular changes in a sural nerve biopsy of a case with cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL). *Acta Neuropathol (Berl)* 1995; 89: 116-21.
26. BRULIN P, GODFRAIND C, LETEURTRE E, RUCHOUX MM. Morphometric analysis of ultrastructural vascular changes in CADASIL: analysis of 50 skin biopsy specimens and pathogenic implications. *Acta Neuropathol (Berl)* 2002; 104: 241-8.
27. ISHIKO A, SHIMIZU A, NAGATA E, OHTA K, TANAKA M. Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADA-

- SIL): a hereditary cerebrovascular disease, which can be diagnosed by skin biopsy electron microscopy. *Am J Dermatopathol* 2005; 27: 131-4.
28. BAUDRIMONT M, DUBAS F, JOUTEL A, TOURNIER-LASSERVE E, BOUSSER MG. Autosomal dominant leukoencephalopathy and subcortical ischemic stroke: a clinicopathologic study. *Stroke* 1993; 24: 122-5.
 29. MAYER M, STRAUBE A, BRUENING R, UTTNER I, PONGRATZ D, GASSER T ET AL. Muscle and skin biopsies are a sensitive diagnostic tool in the diagnosis of CADASIL. *J Neurol* 1999; 246: 526-32.
 30. RUBIO A, RIFKIN D, POWERS JM, PATEL U, STEWART J, FAUST P ET AL. Phenotypic variability of CADASIL and novel morphologic findings. *Acta Neuropathol* 1997; 94: 247-54.
 31. SCHULTZ A, SANTOIANI R, HEWAN-LOWE K. Vasculopathic changes of CADASIL can be focal in skin biopsies. *Ultrastruct Pathol* 1999; 23: 241-7.
 32. EBKE M, DICHGENS M, BERGMANN M, VOELTER HU, RIEGER P, GASSER T ET AL. CADASIL: skin biopsy allows diagnosis in early stages. *Acta Neurol Scand* 1997; 95: 351-7.
 33. ALROY J, UCCI AA, PFANNL R. Why skin biopsy is useful for the diagnosis of lysosomal storage diseases. Current Medical Literature: *Lysosomal Storage Disease* 2006; 5: 70-6.
 34. REUSER AJJ, KROOS MA, VISSER WJ, WILLEMSSEN R. Lysosomal storage diseases: cellular pathology, clinical and genetic heterogeneity, therapy. *Ann Biol Chem* 1994; 52: 721-8.
 35. WENGER DA, COPPOLA S, LIU S-L. Insight into the diagnosis and treatment of lysosomal storage diseases. *Arch Neurol* 2003; 60: 322-8.
 36. NEUFELD EF. Natural history and inherited disorders of lysosomal enzyme, b-hexosaminidase. *J Biol Chem* 1989; 264: 10927-30.
 37. ALROY J, UCCI AA. Skin biopsy: a useful tool in the diagnosis of lysosomal storage diseases. *Ultrastruct Pathol* 2006; 30: 489-503.
 38. MERIN S, LIVNI N, BERMAN ER, YATZIV S. Mucopolidosis, IV: ocular, systemic and ultrastructural findings. *Invest Ophthalmol* 1975; 14: 437-48.
 39. USHIYAMA M, IKEDA S, NAKAYAMA J, YANAGISAWA N, HANYU N, KATSUYAMA T. Type III (chronic) GM1-gangliosidosis. Histochemical and ultrastructural studies of rectal biopsy. *J Neurol Sci* 1985; 71: 209-23.
 40. BELCHER RW. Ultrastructure of the skin in the genetic mucopolysaccharidoses. *Arch Pathol* 1972; 94: 511-8.
 41. ABRAMOVICH CM, PRAYSON RA, McMAHON JT, COHEN BH. Ultrastructural examination of the axillary skin biopsy in the diagnosis of metabolic diseases. *Hum Pathol* 2001; 32: 649-55.
 42. CASTAGNARO M, ALROY J, UCCI AA, GLEW RH. Lectin histochemistry and ultrastructure of feline kidneys from six different storage diseases. *Virchows Arch B Cell Pathol* 1987; 54: 16-26.
 43. AVILA JL, CONVIT J. Inhibition of leukocytes lysosomal enzymes by glycosaminoglycans in vitro. *Biochem J* 1975; 152: 57-64.
 44. FOLKERTH RD, ALROY J, LOMAKINA I, SKUTELSKY E, RAGHAVAN SS, KOLODNY EH. Mucopolidosis IV: morphology and histochemistry of an autopsy case. *J Neuropathol Exp Neurol* 1995; 54: 154-64.
 45. PRASAD A, KAYE EM, ALROY J. Electron microscopic examination of skin biopsy as a cost-effective tool in the diagnosis of lysosomal storage disease. *J Child Neurol* 1996; 11: 301-8.
 46. DVORAK AM, CABLE WJ, OSAGE JE, KOLODNY EH. Diagnostic electron microscopy. II. Fabry's disease: use of biopsies from uninvolved skin. Acute and chronic changes involving the microvasculature and small unmyelinated nerves. *Pathol Annu* 1981; 16 Pt 1: 139-58.
 47. BOUSTANY R-MN, KAYE E, ALROY J. Ultrastructural findings in skin from patients with Niemann-Pick disease, type C. *Pediatr Neurol* 1990; 6: 177-83.
 48. ELLEDER M. Eccrine gland involvement in Krabbe's disease. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1992; 421: 351-4.
 49. CEUTERICK C, MARTIN J-J. Krabbe globoid cell leukodystrophy, electron microscopy shows characteristic inclusions in eccrine sweat gland. *Path Res Pract* 1993; 189: 384-6.
 50. BEUTLER E, GRABOWSKI GA. Gaucher disease. In: Scriver R, Beaudet AL, Sly WS et al, eds. *The Metabolic and Molecular Base of Inherited Disease*, ed 8. New York: McGraw-Hill; 2001: 3635-68.
 51. SCHULZ A, DHAR S, RYLOVA S, DBAIBO G, ALROY J, HAGEL C ET AL. Impaired cell adhesion and apoptosis in a novel CLN9 Batten disease variant. *Ann Neurol* 2004; 56: 342-50.
 52. HALTIA M. The neuronal ceroid-lipofuscinoses. *J Neuropathol Exp Neurol* 2003; 62: 1-13.
 53. WISNIEWSKI KE, ZHONG N, PHILIPPART M. Pheno/genotypic correlations of neuronal ceroid lipofuscinoses. *Neurology* 2001; 57: 576-81.
 54. ZUPANC ML, LEGROS B. Progressive myoclonic epilepsy. *Cerebellum* 2004; 3: 156-71.
 55. ACHARYA JN, SATISCHANDRA P, ASHA T, SHANKAR SK. Lafora's disease in south India: a clinical, electrophysiologic, and pathologic study. *Epilepsia* 1993; 34: 476-87.
 56. CHAN EM, BULMAN DE, PATERSON AD, TURNBULL J, ANDERMANN E, ANDERMANN F ET AL. Genetic mapping of a new Lafora progressive myoclonus epilepsy locus (EPM2B) on 6p22. *J Med Genet* 2003; 40: 671-5.
 57. MINASSIAN BA, ANDRADE DM, IANZANO L, YOUNG EJ, CHAN E, ACKERLEY CA ET AL. Laforin is a cell membrane and endoplasmic reticulum-associated protein tyrosine phosphatase. *Ann Neurol* 2001; 49: 271-5.
 58. IANACCONE S, ZUCCONI M, QUATTRINI A, NEMNI R, COMOLA M, TACCAGNI L ET AL. Early detection of skin and muscular involvement in Lafora disease. *J Neurol* 1991; 238: 217-20.
 59. LAURIA G, CORNBLATH DR, JOHANSSON O, McARTHUR JC, MELLGREN SI, NOLANO M ET AL. EFNS guidelines on the use of skin biopsy in the diagnosis of peripheral neuropathy. *Eur J Neurol* 2005; 12: 747-58.