

## DISTROFIA MUSCULAR CONGÊNITA E DEFICIÊNCIA DE MEROSINA

LINEU CESAR WERNECK\*, ROSANA HERMÍNIA SCOLA\*\*, FÁBIO MASSAITI IWAMOTO\*\*\*

**RESUMO** - Uma proporção variável de pacientes com distrofia muscular congênita (DMC) da forma clássica ou ocidental apresenta deficiência da cadeia  $\alpha_2$  da merosina, uma proteína da matriz extracelular. Foi realizado estudo das características clínicas, laboratoriais e histopatológicas de 18 pacientes com DMC, relacionadas com o padrão de merosina encontrado na biópsia muscular. Estudo imuno-histoquímico demonstrou que 11 pacientes eram merosina-deficiente (MD) e sete pacientes eram merosina-positiva (MP). Nenhum dos nove pacientes MD com idade suficiente para serem avaliados alcançaram a capacidade de deambulação, enquanto quatro dos sete pacientes MP atingiram deambulação sem auxílio. Os níveis de creatinoquinase estavam mais aumentados nos pacientes MD, mas a diferença entre os dois grupos não foi estatisticamente significativa. Estudo da condução nervosa motora foi realizado em 12 pacientes. Todos os quatro pacientes MP apresentaram exames normais, enquanto dois de oito pacientes MD apresentaram diminuição da velocidade de condução nervosa motora. Entre 69 parâmetros de biópsia muscular avaliados, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos MP e MD. Esses resultados sugerem que a diferenciação entre os casos MP e MD serve para fins de prognóstico, pois os pacientes MP chegam a deambular. Além disso, este estudo indica que não existe relação entre a ausência de merosina e as alterações histológicas encontradas na biópsia muscular.

**PALAVRAS-CHAVE:** distrofia muscular congênita, merosina, imuno-histoquímica, biópsia muscular.

### **Congenital muscular dystrophy and merosin deficiency**

**ABSTRACT** - Merosin  $\alpha_2$  chain, an extracellular matrix protein, is deficient in a proportion of patients with classical congenital muscular dystrophy (CMD). A study of clinical, laboratory and histopathological features of 18 patients with CMD was performed in relation to the merosin expression in muscle biopsy. Immunohistochemistry study showed that merosin was deficient in 11 patients and present in 7. None of the 9 merosin-deficient patients evaluated achieved walking. In contrast, 4 of 7 merosin-positive patients achieved independent ambulation. Creatine kinase levels were higher in merosin-deficient patients, but this difference was not statistically significant. Motor nerve conduction study was carried out on 12 children. All 4 merosin-positive patients had normal exams whereas 2 out 8 merosin-deficient patients presented decreased motor nerve conduction velocity. Among 69 histopathological features studied, we did not find any significant difference between merosin-deficient and merosin-positive patients. These results suggest that merosin status evaluation is important in the determination of the prognosis, since merosin-positive patients can achieve independent walking. This study also suggests that there is no relation between absence of merosin and histopathological features.

**KEY WORDS:** congenital muscular dystrophy, merosin, immunohistochemistry, muscle biopsy.

A distrofia muscular congênita (DMC) é doença caracterizada pela ocorrência de fraqueza muscular e hipotonia ao nascimento ou nos primeiros meses de vida, atraso no desenvolvimento motor e padrão distrófico na biópsia muscular.<sup>4,20</sup> A DMC pode se apresentar na forma clássica ou ocidental e na forma de Fukuyama. Nos países ocidentais a maioria dos pacientes apresenta a forma clássica, enquanto a forma Fukuyama, caracterizada pela presença de retardo mental grave, crises

Serviço de Doenças Neuromusculares da Especialidade de Neurologia do Departamento de Clínica Médica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR): \*Professor Titular; \*\*Professora Assistente; \*\*\*Estudante de Medicina, Bolsista de Iniciação Científica (PIBIC/CNPq). Aceite: 29-agosto-1997.

Dr. Lineu Cesar Werneck - Serviço de Doenças Neuromusculares, Hospital de Clínicas da UFPR - Rua General Carneiro 181, 3º andar - 80060-900 Curitiba PR - Brasil.

epilépticas e alterações encefálicas nos exames de neuroimagem, é mais comum no Japão<sup>4</sup>. Em torno de 10 a 60% dos pacientes com DMC da forma clássica apresentam deficiência da cadeia  $\alpha_2$  da merosina, o que permite a subdivisão da DMC ocidental em dois grupos de acordo com o padrão de merosina na biópsia muscular<sup>3,19,26,28-30,35,38</sup>. Estudos recentes têm demonstrado que esses dois grupos apresentam características clínicas, laboratoriais e eletrofisiológicas distintas, mas nenhum analisou a relação entre as alterações histológicas e o padrão imuno-histoquímico da merosina<sup>5,29,31,35,38</sup>.

Neste estudo procuramos avaliar a expressão da merosina muscular através de imuno-histoquímica em pacientes com DMC com os objetivos de (1) avaliar a proporção de casos merosina-deficiente (MD) nesse grupo de pacientes, (2) comparar as características clínicas, laboratoriais e eletrofisiológicas entre os pacientes MD e merosina-positiva (MP) e (3) verificar se existe alguma relação entre a ausência de merosina e as alterações histológicas.

## CASUÍSTICA E MÉTODOS

Foram estudados 18 pacientes com distrofia muscular congênita, sendo 11 do sexo feminino e sete do sexo masculino, com idade média de 4,98 anos. A idade média do início dos sintomas foi 0,23 anos (Tabela 1). Todos os pacientes apresentavam retardo do desenvolvimento motor, hipotonia e hipotrofia muscular generalizadas, fraqueza muscular proximal e hiporreflexia generalizada na época da investigação. Choro débil foi notado em cinco pacientes e hipotonia muscular ao nascimento ou nos primeiros seis meses de vida ocorreu em 15 pacientes. Dois pacientes apresentavam crises epilépticas, dois escoliose, dois cifoescoliose e dois deformidades dos pés (pés valgus). Cinco pacientes apresentavam retrações de tendões como sinal inicial e em dez as retrações surgiram com a evolução da doença (Tabela 1).

Na investigação, a creatinoquinase estava aumentada em média 6,08 vezes, desidrogenase láctica 0,67, aldolase 1,12, aspartato aminotransferase 0,25 e alanina aminotransferase 0,07 vezes acima do limite superior normal. A eletromiografia de agulha (EMG) foi compatível com padrão miopático em 14 pacientes, limítrofe para miopático em um e normal em outro paciente. Estudo da condução nervosa motora mostrou diminuição da velocidade de condução em dois pacientes, diminuição da amplitude dos potenciais em um paciente e foi normal em nove pacientes (Tabela 2). Estudo da condução nervosa sensitiva foi normal nos 12 pacientes em que foi realizada.

Tabela 1. Características clínicas em 18 pacientes com distrofia muscular congênita.

Caso	Sexo	Idade na investigação	Início dos sintomas	Retrações	Pés valgus	Deformidades da coluna	Choro débil	Epilepsia	Escala de Vignos
1	M	0,42	0,04	+	-	-	-	-	
2	F	0,58	0,00	+	-	-	-	-	
3	M	0,66	0,08	+	+	-	-	-	
4	F	0,75	0,00	+	-	+	+	-	
5	M	1,08	0,00	-	-	-	+	-	
6	F	2,00	0,25	-	-	-	-	-	
7	F	2,50	0,00	+	-	+	+	+	
8	F	5,00	0,00	+	-	-	-	-	
9	M	7,00	0,00	+	+	-	+	-	7
10	M	8,00	0,33	+	-	-	-	-	
11	F	11,00	0,00	+	-	-	-	+	7
12	F	4,00	0,00	+	-	-	-	-	
13	F	4,75	0,00	+	-	-	-	-	
14	F	5,00	0,50	+	-	-	-	-	7
15	M	6,00	0,00	+	-	+	-	-	6
16	M	8,00	0,00	+	-	+	+	-	7
17	F	10,00	0,00	-	-	-	-	-	4
18	F	13,00	3,00	+	-	-	-	-	3

M, masculino; F, feminino; +, presente/positivo; -, ausente/negativo. A idade na investigação e o início dos sintomas estão expressos em anos.

Tabela 2. Características laboratoriais e eletrofisiológicas em pacientes merosina-deficiente e merosina-positiva.

Caso	CK	LDH	ALD	AST	ALT	EMG	VCN motora
1	13,04	0,62	3,21	NA	NA	Normal	NA
2	39,21	2,68	NA	2,60	0,33	Miopática	NA
3	13,82	1,02	2,00	0,00	0,00	Miopática	Normal
4	8,75	1,26	4,06	0,20	0,00	Miopática	Normal
5	3,24	0,00	0,00	0,67	0,00	Miopática	Normal
6	8,15	0,62	1,32	0,00	0,00	Miopática	Normal
7	0,20	NA	NA	0,00	0,00	Miopática	Normal
8	0,00	0,00	0,20	0,00	0,00	Miopática	Diminuída
9	0,77	0,84	0,00	0,00	0,00	Miopática	Normal
10	10,27	NA	NA	NA	NA	Miopática	Diminuída
11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	Miopática	NA
12	7,80	1,42	2,38	0,00	0,58	Limítrofe	Normal
13	0,00	NA	NA	NA	NA	Miopática	NA
14	0,00	0,18	NA	0,00	0,00	NA	Normal
15	0,23	NA	0,00	0,00	0,00	Miopática	Normal
16	0,00	0,15	0,00	0,00	0,00	NA	NA
17	2,40	0,50	1,17	0,00	0,00	Miopática	Normal
18	1,56	0,07	0,19	NA	NA	Miopática	NA

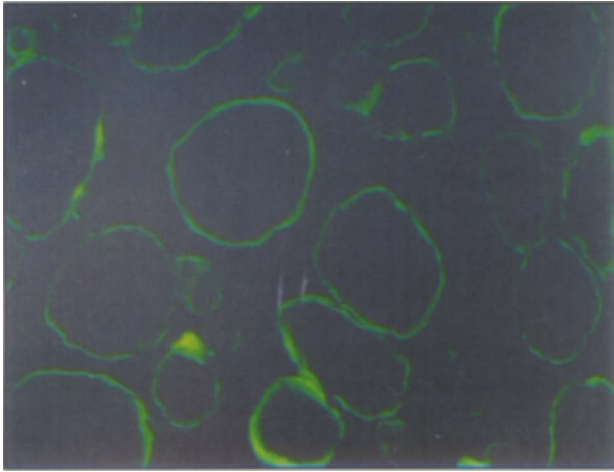
CK, creatinquinase; LDH, desidrogenase láctica; ALD, aldolase; AST, aspartato aminotransferase; ALT, alanina aminotransferase. NA, não avaliado; EMG, eletromiografia; VCN, velocidade de condução nervosa. Os valores das enzimas estão expressos em número de vezes acima do limite superior normal.

Tabela 3. Padrão imuno-histoquímico de merosina e distrofina e características clínicas em pacientes com DMC.

Caso	Merosina	Distrofina	Idade na última avaliação	Deambulação
1	-	Falhas focais	3,10	-
2	-	Falhas focais	0,58	NA
3	-	Falhas focais	2,60	-
4	-	Falhas focais	6,07	-
5	-	Falhas focais	1,15	NA
6	-	Falhas focais	7,15	-
7	-	Falhas focais	2,50	-
8	-	Falhas focais	5,00	-
9	-	Falhas focais	8,25	-
10	-	Falhas focais	8,40	-
11	-	Falhas focais	11,00	-
12	+	NA	4,30	+
13	+	NA	4,75	-
14	+	NA	6,10	+
15	+	Normal	10,25	-
16	+	Falhas focais	8,30	-
17	+	Falhas focais	10,15	+
18	+	Falhas focais	13,00	+

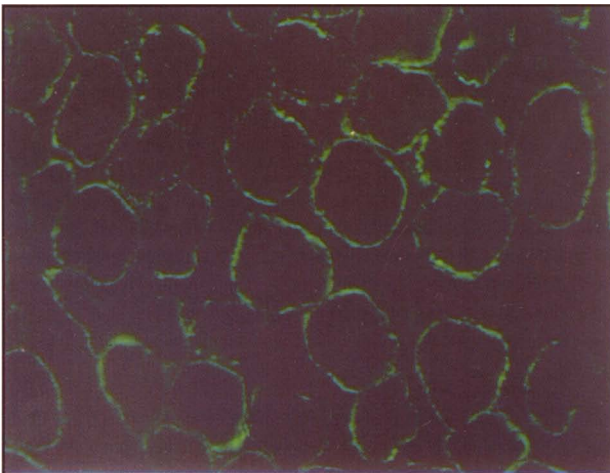
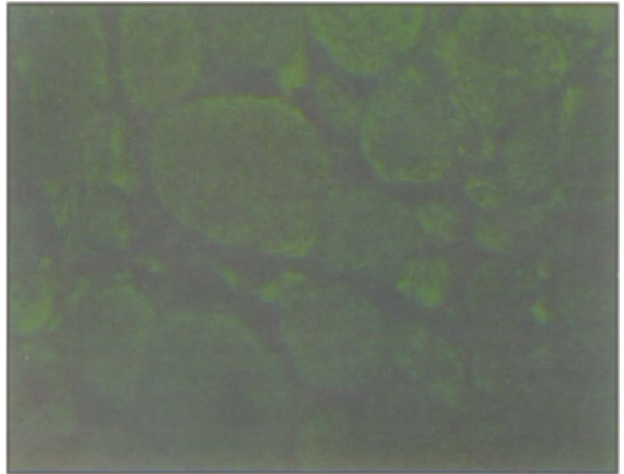
+, presente/positivo; -, ausente/deficiente; NA, não avaliado. A idade na última avaliação do paciente está expressa em anos.

As biópsias musculares foram processadas através de técnicas a fresco e histoquímica sendo coradas com hematoxilina-eosina, tricromo de Gomori modificado, oil red O, PAS, cresil violeta, ATPase pH 9,4, 4,3 e 4,6, NADH-tetrazolium redutase, miofosforilase, esterase não-específica, desidrogenase succínica e fosfatases alcalina e ácida. O diagnóstico anátomo-patológico foi miopatia ativa em um caso, miopatia crônica em sete, miopatia crônica ativa em oito, miopatia crônica em estágio final em um e músculo em estágio final em um caso.



*Fig 1. Imuno-histoquímica para merosina do Caso 13 (merosina-positiva). Aumento de 464X.*

*Fig 2. Imuno-histoquímica para merosina do Caso 3 (merosina-deficiente). Aumento de 464X.*



*Fig 3. Imuno-histoquímica para distrofina com falhas focais múltiplas e pequenas (rosário). Aumento de 464X.*

As biópsias foram posteriormente armazenadas em nitrogênio líquido a  $-170^{\circ}\text{C}$  até serem utilizadas para estudo imuno-histoquímico. A detecção da merosina por método imuno-histoquímico foi realizada em cortes histológicos de espessura de 4 micra incubados com anticorpos monoclonais anti-merosina humana (fragmento de 80 kD da cadeia M ou  $\alpha_2$ , Chemicon, Temecula, CA, USA) diluídos 1:1000 em solução tampão de cloreto de sódio e fosfato de sódio. Em seguida, os cortes foram incubados com imunoglobulina biotilnilada IgG anti-ovelha, fluoresceína-estreptavidina e examinados em microscópio para imunofluorescência equipado com epiluminação. Em 15 pacientes também foi realizado estudo imuno-histoquímico para distrofina (terminal carboxi), utilizando-se anticorpos monoclonais (Chemicon, Temecula, CA, USA)<sup>41</sup>.

Como controle para a técnica de imuno-histoquímica para merosina foram estudadas as biópsias musculares de dois pacientes com distrofia muscular das cinturas pélvica e escapular, um com distrofia miotônica e um com feocromocitoma e acidente vascular encefálico.

Análises estatísticas foram realizadas com o auxílio de computador, sendo analisadas as possíveis relações dos dados através dos testes do qui-quadrado, exato de Fischer e do *t* de Student. Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas se  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

Dos 18 pacientes com distrofia muscular congênita avaliados através de imuno-histoquímica para merosina, 11 eram MD e sete MP (Figs. 1 e 2; Tabela 3). Nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos foi encontrada em relação aos sintomas avaliados e à distribuição por sexo e idade. Dos 11 pacientes MD, nove não atingiram capacidade de deambulação e dois pacientes não apresentavam idade suficiente para serem avaliados (Casos 2 e 5). Em relação aos sete pacientes MP, quatro apresentavam capacidade de deambulação (Tabela 3). A diferença para esse parâmetro foi estatisticamente significativa (teste exato de Fischer,  $p=0,02$ ). Em relação ao estudo imuno-histoquímico para distrofina, todos os pacientes MD apresentavam falhas focais múltiplas e pequenas em forma de rosário (Fig 3). Dos pacientes MP, três apresentavam falhas focais múltiplas e um apresentava padrão normal na imuno-histoquímica para distrofina (Tabela 3).

Na média, a creatinoquinase apresentou-se mais elevada no grupo MD que no grupo MP. Essa diferença não foi estatisticamente significativa. As outras enzimas musculares, com exceção da aldolase, também estavam mais aumentadas nos pacientes MD que nos MP, mas também não foi encontrada diferença estatisticamente significativa.

Dez pacientes do grupo MD apresentaram eletromiografia com padrão miopático e um padrão normal. No grupo MP, quatro apresentaram EMG miopática e um limítrofe para miopática. Os três pacientes com alteração no estudo da condução nervosa motora eram do grupo MD, enquanto os pacientes do grupo MP apresentaram exames normais.

Entre 69 parâmetros de biópsia muscular avaliados, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos MP e MD.

## DISCUSSÃO

Tomé et al. foram os primeiros a relatar ausência da cadeia  $\alpha_2$  da merosina em 13 de 20 pacientes com DMC da forma clássica ou ocidental, levando à subdivisão desses pacientes em DMC merosina-deficiente (DMC-MD) e DMC merosina-positiva (DMC-MP)<sup>35</sup>. Posteriormente, o locus gênico da cadeia  $\alpha_2$  da merosina foi identificado no cromossomo 6q2, permitindo a caracterização da anormalidade também a nível genético.<sup>10</sup> Mais recentemente, mutações em ponto e deleções foram encontradas em pacientes com DMC-MD, embora a estrutura exata do gene ainda não seja totalmente conhecida<sup>9,28</sup>. A deficiência de merosina encontrada em pacientes com DMC de Fukuyama é considerada de causa secundária<sup>7,39</sup> já que o locus gênico relacionado à forma Fukuyama é o 9q31-33<sup>34</sup>.

A proporção de pacientes MD encontrada nos diversos estudos tem sido bastante variável<sup>3,19,26,28,29,30,35,38</sup>. Enquanto North et al. encontraram apenas um caso MD em uma série de 12 pacientes<sup>26</sup>, mais de 60% dos pacientes de outro estudo eram MD<sup>35</sup>. Essa discrepância de resultados

pode ser devida a vícios de seleção dos pacientes ou, mais provavelmente, ao pequeno número de pacientes estudados em cada trabalho. Nossos achados são semelhantes aos de Tomé et al. e Vainzof et al., que encontraram predomínio discreto de pacientes MD<sup>35,38</sup>. No Japão, a incidência de casos MD parece ser relativamente menor que nos países ocidentais<sup>8,14</sup>. Kobayashi et al. examinaram 4434 biópsias musculares e encontraram 50 casos de DMC-MP e apenas três casos de DMC-MD<sup>14</sup>.

A merosina (laminina-2) é proteína trimérica da família das lamininas, constituída das cadeias  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$  e  $\gamma_1$ , encontrada na lâmina basal dos músculos esqueléticos, células de Schwann e trofoblastos<sup>15,42</sup>. A merosina tem diversas funções biológicas que incluem a mediação da ligação entre as células e a promoção da migração das células de Schwann<sup>15,42</sup>. No músculo esquelético a merosina liga-se ao alfa-distroglican, uma glicoproteína extracelular associada à distrofina, que por sua vez se liga à actina do subesqueleto sarcolemal pelo complexo de glicoproteínas relacionado à distrofina<sup>32</sup>. A patogênese da doença ainda não é conhecida, mas acredita-se que a ausência de merosina possa afetar as ligações entre as diversas moléculas, levando à degeneração muscular<sup>25,37</sup>.

Hipotonia muscular congênita, fraqueza muscular e atraso do desenvolvimento motor constituem os sintomas cardinais da DMC clássica ou ocidental. Retrações tendinosas podem ocorrer já ao nascimento ou, mais comumente, desenvolvem-se com a progressão da doença. Deformidades dos pés, cifoescoliose e epilepsia também podem ocorrer, mas o desenvolvimento intelectual desses pacientes geralmente é normal<sup>16,20,27,38</sup>. Como em outros estudos, não encontramos qualquer sinal ou sintoma clínico que permita a diferenciação entre os casos MD e MP<sup>29,38</sup>.

Os pacientes MD têm prognóstico pior em relação ao desenvolvimento motor, especialmente a capacidade de atingir a deambulação sem auxílio<sup>29,38</sup>. Assim como em outros estudos,<sup>3,38</sup> nenhum dos nossos pacientes MD atingiu deambulação, embora dois casos necessitem de tempo de acompanhamento maior para avaliação adequada.

Como em outros estudos o nível de creatinoquinase apresentou-se mais elevado no grupo MD, embora nenhum estudo tenha encontrado diferença estatisticamente significativa<sup>29,38</sup>. A avaliação num estágio mais avançado da doença pode ter sido a responsável pelos valores normais ou pouco aumentados das enzimas encontrados em alguns pacientes MD. Assim como na distrofia muscular de Duchenne, com a evolução da doença, pela perda da massa muscular, deve haver redução progressiva nos níveis séricos das enzimas musculares<sup>40</sup>.

Eletromiografia de agulha geralmente mostra um padrão de envolvimento muscular primário, com potenciais de baixa amplitude e curta duração<sup>16,19,27</sup>. Diminuição da velocidade de condução nervosa (VCN) motora, como ocorreu em dois dos nossos casos, tem sido relatada em pacientes MD<sup>24,31</sup>. Shorer et al. encontraram diminuição da VCN motora em oito dos dez pacientes MD estudados<sup>31</sup>. O mecanismo que leva a essa redução da VCN motora é possivelmente uma deficiência no processo fisiológico de mielinização dos nervos que ocorre nos primeiros meses de vida<sup>24,31</sup>. Em relação ao estudo da condução nervosa sensitiva, todos os trabalhos também têm encontrado resultados normais<sup>24,31</sup>.

A biópsia muscular de pacientes com DMC apresenta um padrão distrófico, com proliferação de tecido conjuntivo, infiltração de tecido adiposo, redução no número de fibras musculares e grande variabilidade no diâmetro das fibras. Necrose, fagocitose e regeneração também podem ser encontradas em graus variáveis<sup>2,6,18,36,41</sup>.

A avaliação da distrofina, proteína responsável pela patogênese da distrofia muscular de Duchenne (DMD), pode ser realizada na diferenciação entre DMC e DMD em pacientes do sexo masculino<sup>13</sup>. Na DMD, a distrofina está praticamente ausente em todas as fibras musculares.<sup>11</sup> Na DMC, as alterações da distrofina, mais comumente falhas focais na imuno-histoquímica, são de causa secundária. Trabalhos têm mostrado uma grande variabilidade na proporção de pacientes com DMC que apresentam estudo imuno-histoquímico para distrofina alterado, provavelmente devido a diferenças de metodologia<sup>1,12,18,21,41</sup>.

Pacientes MD, embora apresentem desenvolvimento intelectual normal, podem apresentar alterações na substância branca encefálica na ressonância magnética semelhantes à leucodistrofia, que atingem mais os lobos anteriores e geralmente preservam o corpo caloso, tronco cerebral, cápsula interna e cerebelo<sup>17,22,24,29,33,38</sup>. Essas alterações na substância branca também podem ser demonstradas através de potenciais evocados somato-sensoriais<sup>23</sup>. A patogênese e a repercussão clínica dessas alterações no sistema nervoso central ainda não são bem compreendidas, mas tanto a ressonância magnética quanto os potenciais evocados somato-sensoriais podem ser úteis na diferenciação dos pacientes MD dos MP<sup>22,24</sup>.

A descoberta de que uma porcentagem de pacientes com DMC clássica ou ocidental apresenta deficiência de merosina<sup>35</sup> e a posterior localização do locus gênico da proteína<sup>10</sup> permitiram a caracterização a nível molecular de um subtipo de DMC, a DMC-MD. Esses resultados sugerem que nenhuma característica clínica, laboratorial, eletrofisiológica ou histológica permite a diferenciação entre os pacientes MD e MP, sendo que para isso é necessária a realização de imunohistoquímica ou western blot<sup>38</sup>. Além disso, este estudo indica que não existe relação entre a ausência de merosina e as alterações histológicas encontradas na biópsia muscular. Do ponto de vista prático, a diferenciação entre os casos de DMC-MD e DMC-MP serve para fins de prognóstico, pois os DMC-MP chegam a deambular.

## REFERÊNCIAS

1. Arikawa E, Ishihara T, Nonaka I, Sugita H, Arahata K. Immunocytochemical analysis of dystrophin in congenital muscular dystrophy. *J Neurol Sci* 1991;105:79-87.
2. Banker BQ. Congenital muscular dystrophy. In Engel AG, Banker BQ. *Myology*. New York: McGraw-Hill, 1986;1367-1382.
3. Connolly AM, Pestronk A, Planer GJ, Yue J, Mehta S, Choksi R. Congenital muscular dystrophy syndromes distinguished by alkaline and acid phosphatase, merosin, and dystrophin staining. *Neurology* 1996;46:810-814.
4. Dubowitz V. Workshop Report: 22nd ENMC sponsored workshop on congenital muscular dystrophy held in Baar, the Netherlands, 14-16 may 1993. *Neuromusc Disord* 1994;4:75-81.
5. Dubowitz V. Workshop Report: 41st ENMC international workshop on congenital muscular dystrophy. 8-10 march 1996, Naarden, The Netherlands. *Neuromusc Disord* 1996;6:295-306.
6. Fardeau M. Congenital myopathies. In Mastaglia FL, Walton JN. *Skeletal muscle pathology*. Ed 2. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1992:237-281.
7. Hayashi YK, Engvall E, Arikawa-Hirasawa E, et al. Abnormal localization of laminin subunits in muscular dystrophies. *J Neurol Sci* 1993;119:53-64.
8. Hayashi YK, Koga R, Tsukahara T, et al. Deficiency of laminin  $\alpha 2$ -chain mRNA in muscle in a patient with merosin-negative congenital muscular dystrophy. *Muscle Nerve* 1995;18:1027-1030.
9. Helbling-Leclerc A, Zhang X, Topaloglu H, et al. Mutations in the laminin  $\alpha 2$ -chain gene (LAMA2) cause merosin-deficient congenital muscular dystrophy. *Nature Genet* 1995;11:216-218.
10. Hillaire D, Leclerc A, Faure S, et al. Localization of merosin-negative congenital muscular dystrophy to chromosome 6q2 by homozygosity mapping. *Hum Mol Genet* 1994;3:1657-1661.
11. Hoffman E, Fischbeck KH, Brown RH, et al. Characterization of dystrophin in muscle biopsy specimens from patients with Duchenne's or Becker's muscular dystrophy. *N Engl J Med* 1988;318:1363-1368.
12. Jay V, Becker LE, Ackerley C. Dystrophin analysis in the diagnosis of childhood muscular dystrophy: an immunohistochemical study of 75 cases. *Pediatr Pathol* 1993;13:635-657.
13. Kyriakides T, Gabriel G, Drousiotou A, Meznanic-Petrusa M, Middleton L. Dystrophinopathy presenting as congenital muscular dystrophy. *Neuromusc Disord* 1994;4:387-392.
14. Kobayashi O, Hayashi H, Arahata K, Ozawa E, Nonaka I. Clinical and pathologic study of 50 patients with the classical (occidental) merosin-positive form. *Neurology* 1996;46:815-818.
15. Leivo I, Engvall E. Merosin, a protein specific for basement membranes of Schwann cells, striated muscle, and trophoblast, is expressed late in nerve and muscle development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:1544-1548.
16. Leyten QH, Gabreëls FJM, Renier WO, Ter Laak HJ, Sengers RCA, Mullaart RA. Congenital muscular dystrophy. *J Pediatr* 1989;115:214-221.
17. Leyten QH, Gabreëls FJM, Renier WO, et al. White matter abnormalities in congenital muscular dystrophy. *J Neurol Sci* 1995;129:162-169.
18. Leyten QH, Ter Laak HJ, Gabreëls FJM, Renier WO, Renkawek RCA, Sengers RCA. Congenital muscular dystrophy: a study on the variability of morphological changes and dystrophin distribution in muscle biopsies. *Acta Neuropathol* 1993;86:386-392.
19. Macmillan C, Holland P, Genge A, Karpati G. Merosin-deficient muscular dystrophy: estimation of prevalence in congenital muscular dystrophy. *Neurology* 1996;46 (Suppl 1):A167.
20. McMenamin JB, Becker LE, Murphy EG. Congenital muscular dystrophy: a clinicopathologic report of 24 cases. *J Pediatr* 1982;100:692-697.

21. Mendell JR, Iannaccone ST, Burrow K, et al. Dystrophin analysis in congenital muscular dystrophy. *Ann Neurol* 1990;28:270.
22. Mercuri E, Dubowitz L, Berardinelli A, et al. Minor neurological and perceptuo-motor deficits in children with congenital muscular dystrophy: correlation with brain MRI changes. *Neuropediatrics* 1995;26:156-162.
23. Mercuri E, Muntoni F, Berardinelli A, et al. Somatosensory and visual evoked potentials in congenital muscular dystrophy: correlation with MRI changes and muscle merosin status. *Neuropediatrics* 1995;26:3-7.
24. Mercuri E, Pennock J, Goodwin F, et al. Sequential study of central and peripheral nervous system involvement in an infant with merosin-deficient congenital muscular dystrophy. *Neuromusc Disord* 1996;6:425-429.
25. Minetti C, Bado M, Morreale G, Pedemonte M, Cordone G. Disruption of muscle basal lamina in congenital muscular dystrophy with merosin deficiency. *Neurology* 1996;46:1354-1358.
26. North KN, Specht LA, Sethi RK, Shapiro F, Beggs AH. Congenital muscular dystrophy with merosin deficiency. *J Child Neurol* 1996;11:291-295.
27. Parano E, Pavone L, Fiumara A, Falsaperla R, Trifiletti RR, Dobyns WB. Congenital muscular dystrophies: clinical review and proposed classification. *Pediatr Neurol* 1995;13:97-103.
28. Pegoraro E, Mancias P, Swerdlow SH, et al. Congenital muscular dystrophy with primary laminin  $\alpha 2$  (merosin) deficiency presenting as inflammatory myopathy. *Ann Neurol* 1996;40:782-791.
29. Philpot J, Sewry C, Pennocks J, Dubowitz V. Clinical phenotype in congenital muscular dystrophy: correlation with expression of merosin in skeletal muscle. *Neuromusc Disord* 1995;5:301-305.
30. Sewry CA, Philpot J, Mahony D, Wilson LA, Muntoni F, Dubowitz V. Expression of laminin subunits in congenital muscular dystrophy. *Neuromusc Disord* 1995;5:307-316.
31. Shorer Z, Philpot J, Muntoni F, Sewry C, Dubowitz V. Demyelinating peripheral neuropathy in merosin-deficient congenital muscular dystrophy. *J Child Neurol* 1995;10:472-475.
32. Sunada Y, Bernier SM, Kozak CA, Yamada Y, Campbell KP. Deficiency of merosin in dystrophic dy mice and genetic linkage of laminin M chain gene to dy locus. *J Biol Chem* 1994;269:13729-13732.
33. Sunada Y, Edgar TS, Lotz BP, Rust RS, Campbell KP. Merosin-negative congenital muscular dystrophy associated with extensive brain abnormalities. *Neurology* 1995;45:2084-2089.
34. Toda T, Segawa M, Nomura Y, T et al. Localization of a gene for Fukuyama type congenital muscular dystrophy to chromosome 9q31-33. *Nature Genet* 1993;5:283-286.
35. Tomé FMS, Evangelista T, Leclerc A, et al. Congenital muscular dystrophy with merosin deficiency. *CR Acad Sci III* 1994;317:351-357.
36. Topaloglu H, Kale G, Yalnizoglu D, et al. Analysis of "pure" congenital muscular dystrophy in thirty-eight cases: how different is the classical type I from the occidental type cerebromuscular dystrophy. *Neuropediatrics* 1994;25:94-100.
37. Vachon PH, Loechel F, Xu H, Wewer UM, Engvall E. Merosin and laminin in myogenesis; specific requirement for merosin in myotube stability and survival. *J Cell Biol* 1996;134:1483-1497.
38. Vainzof M, Marie SKN, Reed UC, et al. Deficiency of merosin (laminin M or  $\alpha 2$ ) in congenital muscular dystrophy associated with cerebral white matter alterations. *Neuropediatrics* 1995;26:293-297.
39. Voit T, Sewry CA, Meyer K, et al. Preserved merosin M-chain (or laminin- $\alpha 2$ ) expression in skeletal muscle distinguishes Walker-Warburg syndrome from Fukuyama muscular dystrophy and merosin-deficient muscular dystrophy. *Neuropediatrics* 1995;26: 148-155.
40. Werneck LC. Correlation of disability with age and serum enzymes in neuromuscular disorders. *Arq Neuropsiquiatr* 1995;53:60-68.
41. Werneck LC, Bonilla E. Immunohistochemical alterations of dystrophin in congenital muscular dystrophy. *Arq Neuropsiquiatr* 1995;53:416-423.
42. Wewer UM, Engvall E. Merosin/laminin-2 and muscular dystrophy. *Neuromusc Disord* 1996;6:409-418.