

Disferlinopatias: Heterogeneidade Clínica e Genética em oito doentes

L. Negrão¹, A. Geraldo¹, O. Rebelo¹, A. Marques¹, R. Santos²

¹ Consulta Externa de Doenças Neuromusculares do Serviço de Neurologia, HUC, Coimbra; ² Unidade de Genética Molecular do Instituto de Genética Médica Jacinto Magalhães, Porto

Introdução: A disferlina é uma proteína da membrana plasmática muscular e o gene da disferlina localiza-se no cromossoma 2p13. Três fenótipos distintos estão descritos secundários à sua ausência ou expressão reduzida, nomeadamente a Distrofia Muscular das Cinturas 2B (DMC 2B), a Miopatia de Miyoshi (MM) e a Miopatia Distal do Compartimento Anterior (MDCA).

Objectivos: Apresentar as características clínicas, laboratoriais e evolução clínica de oito doentes com doença muscular devida a uma deficiência da proteína disferlina.

Material e Métodos: Análise dos processos clínicos de oito doentes com sinais e/ou sintomas clínicos secundários a um defeito da proteína disferlina, confirmado por técnicas de imunohistoquímica e/ou genética molecular.

Resultados: Os oito doentes dividem-se em número igual por ambos os sexos. O tempo médio de evolução desde os primeiros sintomas até à actualidade é de $10,2 \pm 6,5$ anos (2-24 anos) e a idade média actual é de $29,5 \pm 9,1$ anos (20-49 anos). Na observação clínica inicial, um doente apresentava sintomas de fatigabilidade muscular (EF), o fenótipo DMC 2B observava-se em cinco doentes e o fenótipo MM em dois doentes. Actualmente, quatro doentes apresentam agravamento com generalização da fraqueza muscular (3 DMC 2B e 1 MM) e os restantes mantêm a gravidade do quadro clínico inicial (2 DMC 2B, 1 MM e 1 EF).

Os valores séricos de CK estavam elevados em todos os doentes, identificou-se um padrão do tipo distrófico em sete biopsias musculares, o estudo com anticorpo anti-disferlina foi positivo nos cinco doentes em que foi utilizado e mutações patogénicas no gene da disferlina confirmaram-se em sete doentes, observando-se a mesma mutação em três doentes, dois com o fenótipo DMC 2B e um com o fenótipo MM.

Conclusão: O conjunto de doentes apresentados demonstra a reconhecida heterogeneidade, clínica e genética, das doenças musculares associadas a um defeito da disferlina, salientando-se também a variabilidade da gravidade e evolução clínicas.

Palavras-chave:

Disferlinopatia; Disferlina; Miopatia de Miyoshi; Distrofia Muscular das Cinturas 2B

Título de cabeçalho: Disferlinopatia

Dysferlinopathies: Clinical and Genetic Heterogeneity in eight patients

L. Negrão¹, A. Geraldo¹, O. Rebelo¹, A. Marques¹, R. Santos²

¹Neuromuscular Outpatient Clinic, Neurology Department, Coimbra University Hospitals, Coimbra; ² Molecular Genetics Unity of the Instituto de Genética Médica Jacinto Magalhães, Porto

Introduction: Dysferlin is a protein of the muscle membrane and the dysferlin gene maps to chromosome 2p13. Three distinct phenotypes have been described secondary to its absence or reduced expression, namely, Limb-Girdle Muscular Dystrophy type 2B (LGMD 2B), Miyoshi Myopathy (MM) and Distal Anterior Compartment Myopathy (DAMT).

Objectives: To present both clinical and laboratory characteristics as well as the clinical evolution of eight patients, due to a deficiency of the dysferlin protein.

Patients and Methods: Analysis of the clinical files of eight patients with signs and/or clinical symptoms secondary to a deficiency of the dysferlin protein.

Results: The eight patients are divided in equal number by each sex. The mean time since the first symptoms until now is $10,2 \pm 6,5$ years (2-24 years) and actual mean age is $29,5 \pm 9,1$ years (20-49 years). In the first clinical examination, one patient presented only complaints of easy fatigability (EF), the phenotype LGMD 2B was identified in five patients and the phenotype MM in two patients. Actually, four patients present generalization of muscle weakness (3 LGMD 2B, 1 MM) and the others keep the same clinical picture (2 LGMD 2B, 1MM, 1 EF).

The CK levels were elevated in all patients, a muscular dystrophic pattern was identified in seven biopsies, the study with the use of anti-dysferlin antibody was positive in the five patients it was tested and pathogenic mutations of the dysferlin gene were confirmed in 7 patients, being the same mutation in 3 patients, 2 with LGMD 2B phenotype and the other with MM phenotype.

Conclusions: This group of patients are elucidative about the recognized clinical and genetic heterogeneity of muscle diseases associated to dysferlin deficiency. It's also noteworthy the variability in the initial clinical picture and evolution.

Keywords: Dysferlin; Miyoshi myopathy; Limb-Girdle Muscular Dystrophy type 2B

Running title: Dysferlinopathy

Introdução

A disferlina é uma proteína da membrana plasmática de 237kDa, associada aos fenómenos de fusão e reparação da membrana plasmática induzidos pelo cálcio (1).

O gene da disferlina foi mapeado no cromossoma 2p13 (2,3) e a sua ausência ou expressão reduzida na membrana plasmática está associada a diferentes doenças musculares, nomeadamente a Distrofia Muscular das Cinturas tipo 2B e a Miopatia de Miyoshi (MM). Mais recentemente, ÍIIa et al. (4) descreveu um outro fenótipo, mais raro que os anteriores, em que o défice motor inicial localizava-se nos músculos do compartimento anterior das pernas. As três doenças musculares são consideradas doenças alélicas (5).

Esta heterogeneidade clínica associada à mesma mutação não tem uma explicação científica definida. É também reconhecida a existência de doença muscular não associada a mutações no gene da disferlina, sugerindo-se a possibilidade de mutações patogénicas no cromossoma 10 apresentarem potencial para provocar doença semelhante à que se observa na doença muscular associada a mutações no cromossoma 2, nomeadamente nos casos clínicos com fenótipo MM (6).

Os fenótipos descritos apresentam graus de incapacidade inicial e evolução variáveis, com diferentes tempos até atingir a perda da marcha autónoma, tendo alguns autores procurado explicar esta diversidade pelo tipo e localização da mutação no gene da disferlina (7).

O diagnóstico das disferlinopatias é baseado nas características clínicas, na marcada elevação sérica da CK e num modo de transmissão autossómico recessivo. É importante para o diagnóstico a ausência de marcação da disferlina no estudo imunohistoquímico em material de biopsia muscular com anticorpo anti-disferlina (8) e a presença de mutações patogénicas no gene da disferlina.

No presente trabalho, apresenta-se um conjunto de oito doentes com disferlinopatia, salientando-se as características clínicas, laboratoriais e evolução clínica.

Metodologia

Foram analisados os processos clínicos de oito doentes com sinais e/ou sintomas de doença muscular, em que se confirmou a deficiência de disferlina por meio de anticorpo anti-disferlina e/ou pela identificação de mutações patogénicas no gene da disferlina.

A informação clínica recolhida incluiu: sexo, naturalidade, antecedentes de consanguinidade parental, história familiar para doença muscular semelhante, idade dos primeiros sintomas, idade da primeira e última observação neurológica, tempo de evolução da doença desde os primeiros sintomas até à última observação, hipertrofia/atrofia dos músculos das pernas, perda da marcha autónoma, deformidades esqueléticas/retracção do tendão de Aquiles e foi feita a análise comparativa entre a 1ª observação clínica e a actual dos seguintes parâmetros: predomínio da fraqueza e atrofia musculares nos membros inferiores, capacidade de marcha autónoma e corrida, elevação do chão e presença de fraqueza muscular nos membros superiores, em particular a nível da cintura escapular e braço.

Os exames complementares de diagnósticos realizados em todos os doentes incluíram: determinação sérica da creatina cinase, estudo neurofisiológico, incluindo exame muscular com eléctrodo-agulha e estudos de condução nervosa motora e sensitiva, electrocardiograma, ecocardiografia e provas ventilatórias.

Todos os doentes realizaram biopsia muscular, seis no músculo Deltóide, um no músculo Vasto Interno e outro no músculo Tibial Anterior. Os fragmentos de biopsia muscular dos oito doentes foram congelados em isopentano arrefecido em azoto líquido e armazenados a -70°C . Foram efectuados cortes de congelação transversais de 8μ de espessura e corados por técnicas de rotina nomeadamente, histoquímica (H/E, PAS, Red-oil e Tricrómio de Gomori) e histoenzimologia (NADH-TR, SDH, ATPase pH4.35 e pH9,4). O estudo imunohistoquímico foi efectuado em cortes de congelação transversais a 4μ de espessura aos quais foram aplicados anticorpos anti-distrofina (Dys1, Dys2 e Dys3 – Novocastra), anti-sarcoglicanos (α , β , δ , γ - Novocastra) e anti-merosina. O estudo imunohistoquímico com anticorpos anti-disferlina (Novocastra) foi efectuado em cinco doentes.

No estudo de genética molecular procedeu-se à sequenciação sistemática dos 55 fragmentos que abrangem as regiões exónicas e junções exão-intrão do gene *DYSF* localizado no cromossoma 2.

Resultados

A- Características demográficas e clínicas

Os doentes incluídos neste estudo dividem-se em número igual por ambos os sexos (Tabela 1). A idade média dos primeiros sintomas foi de $19,2 \pm 2,9$ anos, a idade média da primeira observação clínica foi de $24,5 \pm 6,5$ e o tempo médio de evolução da doença, desde os primeiros sintomas até à actualidade foi de $10,2 \pm 6,5$ anos.

Seis doentes têm a sua naturalidade na região oeste de Portugal (eixo Leiria-Alcobaça-Caldas da Rainha), antecedentes de consanguinidade parental identificaram-se em seis doentes e só um doente apresentava história familiar positiva para doença semelhante (irmã com 55 anos, com perda da marcha autónoma – informação pessoal). Em todos os doentes observavam-se retracção bilateral do tendão de Aquiles com dificuldade na dorsiflexão máxima do pé, atrofia dos músculos do compartimento posterior das pernas (Fig. 1), independentemente do fenótipo clínico predominante e hipertrofia do músculo Pedioso. A atrofia/fraqueza muscular era simétrica, predominando nos músculos da cintura pélvica nos cinco doentes com DMC 2B e exclusivamente nos músculos do compartimento posterior das pernas nos doentes com MM (Tabela 1). O doente nº 6 observado inicialmente para esclarecimento de elevação dos valores séricos de CK, encontrava-se assintomático. Actualmente apresenta fatigabilidade ligeira no exercício muscular prolongado, não incapacitante, com exame neurológico normal. Nos outros sete doentes (Tabela 2), os sintomas iniciais referiam-se à dificuldade na subida de escadas e impossibilidade de corrida e elevação do chão, com utilização da manobra de Gowers em cinco doentes. Na 1ª observação clínica, só o doente nº 8 mostrava fraqueza muscular da cintura escapular.

Tabela 1

Doente	Sexo	Idade actual	Idade 1os. sintomas	Idade 1ª observação	Naturalidade	Consanguinidade parental	História familiar	Fenótipo
1	M	33	21	24	Leiria	1º grau	--	DMC 2B
2	M	30	20	24	Leiria	2º grau	--	DMC 2B
3	F	29	17	21	C. Rainha	1º grau	--	MM
4	F	30	20	25	Alcobaça	2º grau	--	DMC 2B
5	M	23	16	21	Ourém	--	--	MM
6	F	22	18	22	C. Rainha	2º grau	--	--
7	F	49	25	40	Águeda	1º grau	+	DMC 2B
8	M	20	17	19	Guarda	--	--	DMC 2B

Funcionalmente (Tabela 2), a marcha realizava-se com apoio em dois doentes e a elevação do chão com recurso à manobra de Gowers observava-se em cinco doentes, necessitando de suporte externo os doentes nº 7 e 8. Actualmente, verifica-se um agravamento da fraqueza muscular, mais acentuada nas áreas inicialmente envolvidas nos doentes nº 1, 2, 3, 4, 5 e generalizando-se, envolvendo os músculos proximais dos membros inferiores nos doentes nº 3 e 5 e dos membros superiores nos doentes nº 1, 2 e 4. Um doente necessita de apoio permanente para a marcha, quatro doentes de apoio ocasional e outro de apoio frequente e a elevação do chão faz-se com a necessidade de suporte externo em quatro doentes e é impossível em dois doentes. Os doentes nº 7 e 8, que apresentam os tempos de evolução da doença mais longa e curta, respectivamente, mantêm a mesma distribuição e gravidade da fraqueza muscular registada na 1ª observação. De salientar a exclusividade do envolvimento muscular nos membros inferiores no primeiro doente, com atrofia significativa do músculo quadricipite (Fig. 2) e a presença de fraqueza muscular generalizada, membros superiores e inferiores no doente nº 8 (fig. 3).

Tabela 2

Doente	1ª observação	Marcha	Corrida	Manobra Gowers	Exame actual	Marcha	Corrida	Elevação Chão
1		Sem apoio	Não	+		Apoio permanente	Não	Não
2		Sem apoio	Não	+		Apoio +	Não	C/ Suporte
3		Sem apoio	Não	--		Apoio+	Não	C/ Suporte
4		Sem apoio	Não	+		Apoio+	Não	C/ Suporte
5		Sem apoio	Não	--		Sem apoio	Não	Sim
6		Sem apoio	Sim	--		Sem apoio	Sim	Sim
7		Apoio++	Não	Suporte		Apoio++	Não	Não
8		Apoio+	Não	Suporte		Apoio+	Não	C/ Suporte

++frequente; +ocasional; C/Suporte: apoio externo para elevação (mesa, por ex.)

B- Exames Complementares de Diagnóstico (Tabela 3 e 4).

Todos os doentes apresentavam significativa elevação dos valores séricos de CK. A avaliação da função cardio-respiratória e o estudo de condução nervosa motora e sensitiva eram normais em todos os doentes (Tabela 3). O exame muscular com eléctrodo-agulha revelava um padrão miopático nos músculos clinicamente envolvidos, excepto no doente nº 6, que foi considerado normal.

O estudo histológico apresentava características gerais do tipo distrófico em sete doentes, considerado severo em cinco e moderado em dois doentes. Na biopsia do doente nº 1 estavam

presentes infiltrados inflamatórios perivasculars, que justificaram a instituição de terapêutica imunossupressora e imunomoduladora e em quatro biopsias observavam-se vacúolos bordejados (doentes nº 1, 2, 5 e 7). A distrofina, os diferentes componentes do complexo sarcoglicano, a emerina e a merosina apresentavam normal localização sarcolémica. A disferlina estava ausente em cinco doentes. Nos doentes 1, 2 e 4 não foi testada a presença de disferlina com anticorpo anti-disferlina, uma vez que a investigação diagnóstica foi realizada anteriormente à sua disponibilização no Laboratório de Neuropatologia.

Tabela 3

Doente	CK (IU/L)	EMG	CNM/S	ECG/EcoC	P. Ventilatórias	Biópsia Muscular
1	7,300	Miopático	Normal	Normal	Normal	Padrão distrófico severo
2	6,923	Miopático	Normal	Normal	Normal	Padrão distrófico severo
3	4,231	Miopático	Normal	Normal	Normal	Padrão distrófico severo
4	6,553	Miopático	Normal	Normal	Normal	Padrão distrófico severo
5	13,150	Miopático	Normal	Normal	Normal	Padrão distrófico moderado
6	3,210	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
7	2,695	Miopático	Normal	Normal	Normal	Padrão distrófico severo
8	9,791	Miopático	Normal	Normal	Normal	Padrão distrófico moderado

Tabela 4

Doente	Anticorpos anti-disferlina	Exão	Mutação	Substituição nucleotídeo
1	--	12	1168 G>A Homozigotia	Asp390Lys
2	--	49	5509 G>A Homozigotia	Asp1837Asn
3	Positivo	--	--	
4	--	49	5509 G>A Homozigotia	Asp1837Asn
5	Positivo	49	5509 G>A Homozigotia	Asp1837Asn
6	Positivo	29 52	29: 3115 C>T; 52: 5813_5821 DupCAGCCAAGA	Arg1039Trp Thr1938_1940Lysdup
7	Positivo	53	c.5979dupA	Glu1994Arfs
8	Positivo			

Discussão

As disferlinopatias são doenças musculares crônicas de transmissão autossômica recessiva, secundárias a um defeito da proteína membranar disferlina. Descrita inicialmente por Miyoshi et al. (9) em 17 doentes com o fenótipo MM, sob a designação de Distrofia Muscular Distal autossômica recessiva, foi mais tarde reconhecida a mesma etiologia em doentes com fraqueza muscular proximal crônica e classificada como Distrofia Muscular das Cinturas, tipo 2B (4). Mais recentemente, Iliá et al. (5) apresentaram uma família com o início da doença no compartimento anterior das pernas, designada por Miopatia Distal do Compartimento Anterior, sendo este fenótipo muito mais raro que os dois anteriores.

A heterogeneidade clínica secundária a mutações patogénicas idênticas no gene da disferlina e presente neste grupo de doentes, não tem actualmente uma explicação evidente. Factores genéticos modificadores da expressão clínica e factores externos, como a actividade física, são as explicações mais frequentemente consideradas (10). Apesar deste fenómeno de heterogeneidade clínica, reconhece-se alguma uniformidade das características clínicas e laboratoriais diagnósticas nos três fenótipos e que também se identificam nestes doentes. A doença transmite-se de modo

autossômico recessivo (incluindo os casos esporádicos), a idade de início situa-se entre os 15 e 25 anos de idade, a progressão é lenta, os valores séricos de CK são elevados, o exame muscular com eléctrodo-agulha revela um padrão miopático e a histologia muscular um padrão geral distrófico. Estas características clínico-laboratoriais gerais não excluem alguma diversidade nas características clínicas, nomeadamente em relação à gravidade da fraqueza muscular inicial, sua distribuição e evolução clínicas até a perda da marcha autónoma (11,12). Os casos clínicos que apresentamos são bem elucidativos. O doente mais jovem (nº8), com menos tempo de evolução da doença, apresenta generalização da fraqueza muscular desde a primeira observação, com envolvimento dos músculos das cinturas escapular e pélvica, enquanto o doente nº 7, que apresenta o tempo de evolução da doença mais longo, mantém a fraqueza muscular limitada aos membros inferiores. Os doentes nºs 1, 2 e 4, também com o fenótipo DMC 2B podem considerar-se casos clínicos típicos, com uma generalização “natural” da fraqueza muscular, envolvendo a cintura escapular em média 10 anos após os sintomas iniciais nos membros inferiores. A mesma situação observa-se nos dois doentes com o fenótipo MM, com a fraqueza muscular evoluindo proximalmente de forma lenta, num período superior a 5 anos. É habitual a existência de valores elevados de CK precedendo alguns anos o desenvolvimento de fraqueza muscular (13). Estão descritos casos clínicos em que o início da fraqueza muscular ocorre mais tardiamente do que é habitual, nas 4 e 5ª décadas da vida (12). Embora ainda dentro do grupo etário típico, o doente nº 6 parece situar-se no grupo de doentes com o início da doença em idade mais avançada.

Alguns aspectos clínicos particulares das disferlinopatias estavam presentes neste conjunto de doentes, nomeadamente, a retracção do tendão de Aquiles, com limitação significativa da dorsiflexão activa do pé, a hipertrofia do músculo Pedioso e a ausência de fraqueza dos músculos cervico-faciais e fixadores da omoplata. Em todos os doentes com o fenótipo DMC 2B, observava-se atrofia e fraqueza musculares dos músculos do compartimento posterior das pernas e em menor grau do compartimento anterior, sendo no entanto menos acentuada que a existente a nível da cintura pélvica, mas contribuindo para incapacidade motora global dos doentes.

Caracteristicamente a função cardíaca e respiratória é normal, constituindo informação importante para o diagnóstico diferencial com outras distrofias musculares de transmissão autossômica recessiva. O padrão distrófico é o habitualmente descrito nas disferlinopatias, sendo a gravidade das alterações dependentes do tempo de evolução da doença e do atingimento do músculo analisado. A presença de infiltrado inflamatório nas biopsias musculares foi salientado por Rowin et al. (14) e em casos pontuais, tem originado erros diagnósticos e justificado a instituição de terapêutica imunossupressora e imunomoduladora (15), como aconteceu no doente nº 1. Embora pouco comum, a presença de vacúolos bordejados (Fig. 4) tem sido referido por vários autores (16). Podendo originar dúvidas diagnósticas, nomeadamente com a Miopatia Distal Anterior, tipo Nonaka (17), as outras características clínicas e laboratoriais típicas das disferlinopatias orientam no diagnóstico correcto.

O gene da disferlina foi inicialmente mapeado por Bashir et al. (4) em doentes com distrofia muscular das cinturas autossômica recessiva no cromossoma 2p13 e mais tarde Bejaoui et al. (3) mapeou o mesmo locus genético em doentes com MM. Liu et al (5) reconheceu a existência mutações idênticas no gene da disferlina em doentes com fenótipos distintos. No entanto, Linsen et col. não identificou mutações patogénicas no gene da disferlina em doentes com DMC,

sugerindo a existência de mutações noutra(s) cromossoma(s) responsáveis pela doença muscular. Esta heterogeneidade genética está presente neste grupo de doentes, evidenciada pela ausência de identificação de mutações patogénicas no gene da disferlina no doente nº 4, mas com ausência de imunoreactividade para o anticorpo anti-disferlina. A possibilidade de fenótipos distintos associados à mesma mutação também se verifica neste grupo, com a mutação 5509 G>A ocorrendo em simultâneo nos doentes 2, 4 e 5, os dois primeiros com o fenótipo DMC e o terceiro com o fenótipo MM, não existindo ainda explicação para este fenómeno. A imunoreactividade positiva com anticorpo anti-disferlina no material de biópsia muscular, é independente do tipo de mutação e da localização cromossómica, parecendo por isso ser o meio complementar de diagnóstico mais fiável para confirmar o diagnóstico clínico.

O conjunto de doentes que tem sido objecto de comunicação científica nos fóruns nacionais salientam a importância da disferlinopatia no panorama das doenças musculares em Portugal, devendo ser considerado o seu diagnóstico em todo o doente jovem que apresenta valores de CK elevados e fraqueza muscular, distal ou proximal de evolução crónica.

Bibliografia

1. Bansai D, Miyake K, Vogel SS, et al. Defective membrane repair in dysferlin-deficient muscular dystrophy. *Nature* 2003; 423:168-72.
3. Bejaoui K, Hirabayashi K, Hentati F, et al. Linkage of Miyoshi myopathy (distal autosomal recessive muscular dystrophy) locus to chromosome 2p12-14. *Neurology* 1995; 45:768-772.
4. Bashir R, Strachan T, Sharon K, et al. A gene for autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy maps to chromosome 2p. *Hum Mol Genet* 1994; 3:455-457.
5. Illa I, Serrano C, Gallardo E, Barraquer L, Lasa A, Gallano P, Bejaoui K, Brown RH. Distal anterior compartment myopathy: a new severe dystrophic phenotype linked to chromosome 2p13. *Neurology* 1998; 50A186.
5. Liu J, Aoki M, Illa I, et al. Dysferlin, a novel skeletal muscle gene, is mutated in Miyoshi myopathy and limb girdle muscular dystrophy. *Nat Gen* 1998; 20:31-36
6. Linssen WHJP, de Visser M, Notermans NC, et al. Genetic heterogeneity in Miyoshi-type distal muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 1998; 8:317-320.
7. Takahashi T, Aoki M, Tateyama M, et al. Dysferlin mutations in Japanese Miyoshi myopathy. *Neurology* 2003; 60:1799-1804.
8. Matsuda C, Aoki M, Hayashi YK, Ho MF, Arahata K, Brown RH Jr. Dysferlin is a surface membrane-associated protein that is absent in Miyoshi myopathy. *Neurology* 1999; 53:1119-1122.
9. Miyoshi K, Kawai H, Iwasa M, Kusaka K, Nishino H. Autosomal recessive distal muscular dystrophy as a new type of progressive muscular dystrophy. Seventeen cases in eight families including an autopsied case. *Brain* 1986; 109:31-54.
10. Weiler T, Bashir R, Anderson LV, et al. Identical mutation in patients with limb-girdle muscular dystrophy 2B or Miyoshi myopathy suggested a role for modifier gene(s). *Hum Mol Genet* 1999; 8:871-877.
11. Mahjneh I, Marconi G, Bushby K, Anderson LVB, Tolvanen-Mahjneh H, Somer H. Dysferlinopathy (LGMD2B): a 23-year follow-up of 10 patients homozygous for the same frameshift dysferlin mutation. *Neuromusc Disord* 2001; 11:20-26.
12. Linssen WH, Notermans NC, Van der Graaf Y, et al. Miyoshi-type distal muscular dystrophy. Clinical spectrum in 24 Dutch patients. *Brain* 1997; 120:1989-1996.
13. Brummer D, Walter MC, Palmbach M et al. Long-term MRI and clinical follow-up of symptomatic and presymptomatic carriers of dysferlin gene mutations. *Acta Myologica* 2005; XXIV:06-16.
14. Rowin J, Meriggioli MN, Cochran E, Sanders D. Prominent inflammatory changes on muscle biopsy in patients with Miyoshi myopathy. *Neuromusc Disord* 1999; 9 :417-420.

15. Barohn RJ, Miller RG, Griggs RC. Autosomal recessive distal dystrophy. *Neurology* 1991;41:1365-1370.
16. Shaibani A, Harati Y, Amato A, Ferrante M. Miyoshi myopathy with vacuoles. *Neurology* 1997; 47 (Suppl.):A195.
17. Nonaka I, Sunohara N, Ishiura S, et al. Familial distal myopathy with rimmed vacuoles and lamellar (myeloid) body formation. *J Neurol Sci* 1981; 51:141-155.