

DIFICULDADES DIAGNÓSTICAS NA ATROFIA MUSCULAR ESPINHAL

Alexandra Prufer de Q-C. Araújo¹, Vivianne Galante Ramos², Pedro Hernán Cabello³

RESUMO - Objetivo: Descrever o perfil clínico e laboratorial de pacientes com atrofia muscular espinhal (AME) com deleção no gene da proteína sobrevivência do neurônio motor (SMN). **Método:** Estudo descritivo de uma série de casos confirmados pela presença da deleção no gene SMN. Determinação da frequência da positividade dos critérios clínicos e laboratoriais revisados. **Resultados:** Foram incluídos no estudo 22 casos. Em todos havia paresia simétrica, sendo a localização difusa predominante nos casos de início antes de 6 meses (75 %), enquanto nos demais havia predominância de localização proximal e/ou em membros inferiores (67 %). Fasciculações e atrofia foram frequentes (82 %). Os exames complementares tiveram resultados variáveis, sendo a positividade da eletroneuromiografia (ENMG) de 57 % e da biópsia muscular de 58 %. **Conclusão:** A presença de deleção no gene SMN pode ajudar a confirmar o diagnóstico de casos indefinidos.

PALAVRAS-CHAVE: atrofia muscular espinhal, diagnóstico, eletroneuromiografia, biópsia, técnicas genéticas.

Spinal muscular atrophy diagnostic difficulties

ABSTRACT - Objective: To describe the clinical findings of patients with spinal muscular atrophy (SMA) with survival motor neuron (SMN) gene deletion. **Method:** Descriptive study of SMA cases confirmed with the deletion of the SMN gene. Frequency determination of positive clinical and laboratory revised diagnostic criteria. **Results:** All of the 22 included patients had symmetrical muscle weakness, which was diffuse in those with onset of symptoms up to 6 months of age (75 %), and either proximal or predominant in lower limbs in the remaining group (67 %). Fasciculations and atrophy were both frequent findings (82 %). Laboratory tests findings were variable, with a positivity of 57 % for electrophysiology and of 58 % for muscle biopsy. **Conclusion:** The presence of a deletion in the SMN gene can help to confirm this diagnosis in unclear presentations.

KEY WORDS: spinal muscular atrophy, diagnosis, electromyography, biopsy, genetic techniques.

A atrofia muscular espinhal (AME) tem origem genética e caracteriza-se pela atrofia muscular secundária à degeneração de neurônios motores localizados no corno anterior da medula espinhal. Doença autossômica recessiva ligada ao cromossoma 5, relacionada ao gene da proteína de sobrevivência do neurônio motor (SMN), a principal desordem autossômica recessiva fatal depois da fibrose cística (1:6000), afeta aproximadamente 1 em 10000 nascimentos. O diagnóstico da AME é dado pelo quadro clínico, pelos resultados da eletroneuromiografia (ENMG), da biópsia muscular e da investigação genética. Hipotonia, paresia, arreflexia, amiotrofia e miofasciculação constituem os sinais clínicos da AME, que pode ser subdividida em três grupos de acordo com a idade de início e evolução.

O mapeamento do gene em 1990 no cromossomo 5q13¹ e a identificação do gene SMN em 1995² constituíram passo importante para aperfeiçoar o diagnóstico desta doença. O locus do SMN consiste de dois genes homólogos, uma cópia centromérica (SMN^C) e uma cópia telomérica (SMN^T). Na presença de deleção de alguns exons do gene telomérico, situação em que a doença se expressa, a quantidade do gene centromérico é o fator determinante da gravidade do quadro. A partir da definição genético-molecular da doença, passou-se a utilizar mais este parâmetro no diagnóstico desta doença neuromuscular, sendo em 1999 os critérios de diagnóstico revistos³. A presença da deleção no gene SMN em indivíduos com fraqueza muscular simétrica de tronco e membros elimina a necessidade de outros exames complementares.

Departamento de Genética do Instituto Oswaldo Cruz (IOC) Rio de Janeiro RJ, Brasil, Serviço de Neurologia do Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro RJ, Brasil: ¹PhD, Professora Adjunta de Neuropediatria da UFRJ; ²MSc, Bióloga do Departamento de Genética do IOC; ³PhD, Chefe do Laboratório de Genética Humana do Departamento de Genética do IOC.

Recebido 1 Março 2004, recebido na forma final 12 Julho 2004. Aceito 9 Setembro 2004.

Dra. Alexandra Prufer de Q-C. Araújo - Avenida das Américas 700 bloco 3 sala 202 - 22640-100 Rio de Janeiro RJ - Brasil.

No Brasil, o acesso ainda é restrito ao método de diagnóstico genético-molecular, tornando os critérios adicionais, clínicos e laboratoriais necessários em muitos centros.

Descrevemos uma série de casos de AME confirmados pela presença da deleção no gene SMN enfocando a positividade dos critérios clínico-laboratoriais vigentes.

MÉTODO

Trata-se de estudo descritivo transversal baseado em uma amostra de conveniência, parte de uma tese de mestrado do Curso de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz. Todos os pacientes que participaram, ou seus responsáveis legais, assinaram termo de consentimento livre e esclarecido e o projeto foi aprovado pelo CEP do IPPMG e pelo CONEP.

O critério de inclusão para o estudo foi a presença de deleção no gene SMN em pacientes com suspeita clínica de AME. A extração do DNA foi feita a partir da camada de leucócitos de uma alíquota de aproximadamente 5 ml de sangue periférico, seguindo o protocolo adaptado de Lahiri e Nurnberger⁴. Para a amplificação dos éxons 7 e 8 do gene SMN foi utilizada a técnica de "Nested" de reação em cadeia da polimerase (PCR) a qual consiste na reamplificação do produto primário, que aumenta a sensibilidade e protege contra a contaminação que pode prejudicar o diagnóstico⁵. Para cada reação de PCR foi preparada uma solução de 40 µl contendo: 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 1 µg de DNA genômico, 200 µM de dNTPs; 1 µM de cada iniciador; 0,03 IU/µl de Taq DNA Polimerase. O programa de amplificação referente à primeira etapa da PCR consistiu em uma desnaturação inicial a 96°C por 8 minutos, seguido por 4 ciclos de desnaturação a 96°C por 3 minutos, 1 minuto de pareamento a 52°C, 2 minutos de extensão a 72°C, seguido por 28 ciclos com o tempo de desnaturação diminuído para 1 minuto e extensão final de 59 minutos a 72°C. Na primeira etapa foram utilizados os seguintes primers: R111FO, X7RO, SMX8FO, SMX8RO, AMXY1, AMXY2, DYZy1.1, DYZy1.2. Para a segunda etapa da PCR foram utilizados os primers R111 e X7DRA para o éxon 7 do gene SMN e os primers 541C960 e 541C1120 para o éxon 8 do gene SMN. As condições de amplificação para o éxon 7 foram: 5 minutos de desnaturação inicial a 94°C, seguido de 33 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, 1 minuto de pareamento a 56°C, 1 minuto de extensão a 72°C e extensão final de 5 minutos a 72°C. As condições para o éxon 8 foram: desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C, 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, pareamento a 59°C por 1 minuto, extensão por 1 minuto a 72°C, extensão final por 5 minutos a 72°C. Posteriormente o produto de PCR foi analisado em gel de poliacrilamida a 12%, após a digestão com endonucleases de restrição específicas, Dra I (0,25 µl de Dra I; 2,5 µl de tampão; 7,25 µl de água e 15 µl do produto amplificado) para o

éxon 7 e Dde I (0,5 µl de Dde I; 2,5 µl de tampão; 7,0 µl de água e 15 µl do produto amplificado) para o éxon 8 com um período de incubação de 1 hora a 37°C.

Realizou-se também a pesquisa de deleção nos éxons 5 e 6 do gene da proteína de inibição da apoptose neuronal (NAIP). Para a amplificação por PCR utilizaram-se os primers 1863 (5' CTC TCA GCC TGC TCT TCA GAT 3'), 1864 (5' AAA GCC TCT GAC GAG AGG ATC 3'), 1857 (5' CAT TTG GCA TGT TCC TTC CAA G 3') e 1910 (5' TGC CAC TGC CAG GCA ATC TAA 3'). Foram realizados 30 ciclos a 94°C por 60 segundos, 60°C por 60 segundos e 72°C a 90 segundos⁶.

Dados referentes aos critérios diagnósticos revisados para AME³ foram verificados em consulta destes pacientes. Incluem-se nestes critérios:

1. Critérios clínicos:

Idade de início: AME tipo 1 de início entre o período prenatal até 6 meses de vida; AME tipo 2 início antes dos 18 meses; AME tipo 3 início após.

Paresia muscular: Simétrica - De tronco e membros, com predomínio proximal, ou de membros inferiores sobre superiores.

Atrofia.

Fasciculação.

2. Critérios laboratoriais:

Dosagem sérica de creatinofosfoquinase abaixo de 5 vezes o valor superior normal.

ENMG com presença de atividade espontânea anormal, alteração da duração e amplitude do potencial de ação da unidade motora.

Biopsia muscular com atrofia em grupo, hipertrofia de fibras tipo I ou agrupamento por tipo de fibra.

O dados referentes ao início dos sintomas foram obtidos por história e categorizados em: início antes dos 6 meses, entre 6 e 18 meses, após 18 meses de vida. Classificou-se a paresia em difusa, ou com predomínio proximal e/ou em membros inferiores. Foram considerados achados compatíveis com o diagnóstico de AME nos exames complementares aqueles listados nos critérios diagnósticos revisados³, sendo outros resultados classificados como inconclusivos, a menos que o exame estivesse normal. Os resultados das dosagens enzimáticas, ENMG e biópsia muscular, obtidos do prontuário, poderiam ter sido feitos na UFRJ ou fora dela. Não foram repetidos exames, nem solicitados aos pacientes que não os tinham realizado, por não haver justificativa ética na realização de exames invasivos, mediante diagnóstico já confirmado.

RESULTADOS

Foram considerados elegíveis para este estudo 30 pacientes que, em função do quadro clínico, foram avaliados para a presença de deleção nos genes SMN e NAIP, e incluídos 22 com deleção no gene da SMN. Apresentaram deleção no gene NAIP todos

os casos com tipo 1 de AME, 1/3 dos casos do tipo 2 e 15 % dos casos com tipo 3. Os resultados detalhados do estudo molecular encontram-se em outro artigo enviado para publicação.

A distribuição dos casos quanto ao sexo foi semelhante (59 % do sexo feminino). Encontramos em nossa amostra uma família com 3 casos (mãe e dois filhos) e nenhum caso com história de consanguinidade.

A distribuição dos casos quanto à idade de início dos sintomas encontra-se na Tabela 1. A paresia, sempre simétrica, apresentou localização difusa em 3 dos 4 casos de início antes de 6 meses (75 %), en-

Tabela 1. Distribuição dos pacientes com AME de acordo com características clínicas.

Característica	Número de casos (%)
Idade de início	
Antes de 6 meses de vida	4 (18 %)
Entre 6 e 18 meses	11 (50 %)
Após 18 meses de vida	7 (32 %)
Localização da paresia de tronco e membros	
Difusa	9 (41 %)
Com predomínio proximal em membros inferiores	12 (55 %)
Fasciculação de língua ou movimentos espontâneos dos dedos	18 (82 %)

Tabela 2. Distribuição dos pacientes com AME de acordo com as características dos exames complementares.

Exame	Número de casos (%)
Creatinofosfoquinase	
Normal	11
Até 5 vezes o valor normal	2
Mais que 5 vezes o valor normal	0
ENMG	
Normal*1	5 (36 %)
Compatível*2	8 (57 %)
Inconclusivo*3	1 (7 %)
Histopatologia	
Normal	0
Compatível*4	7 (58 %)
Inconclusivo*5	5 (42 %)

*1 = tipo 2, 3 casos; tipo 3, 2 casos. *2 = tipo 1, 1 caso; tipo 2, 3 casos, tipo 3, 4 casos. *3 = tipo 2. *4 = tipo 2, 5 casos; tipo 3, 2 casos. *5 = tipo 1, 1 caso; tipo 2, 1 caso; tipo 3, 3 casos.

quanto que nos de início após esta idade havia predominância de localização proximal e/ou em membros inferiores (67 %). Fasciculações em língua (8 casos) ou movimentos espontâneos em dedos (4 casos), assim como ambos os achados (4 casos), foram encontrados na maioria. Estes sinais foram observados com frequência semelhante, independente da idade de início dos sintomas até 6 meses, entre 6 e 18 meses ou depois de 18 meses (75 %, 91 % e 71 %). Atrofia muscular era evidente em 18 casos (82 %) e em 12 destes sob forma difusa. Nos 4 casos em que não se observou sinal de atrofia, o tempo de doença (diferença entre a idade na consulta e idade de início dos sintomas) era de cerca de dois anos, enquanto naqueles em que este sinal estava presente este tempo era de mais de 8 anos em média. Apenas em dois casos os reflexos profundos foram considerados normais, ambos com paresia proximal de pequena monta. Nenhum dos 22 casos apresentava alterações ao exame da sensibilidade.

Os exames complementares realizados por estes pacientes, à exceção da dosagem de creatinofosfoquinase, tiveram resultados variáveis (tabela 2). Das 14 ENMG realizadas, apenas três o foram na UFRJ, sendo duas destas compatíveis com a suspeita diagnóstica. A maioria das 12 biópsias havia sido realizada na UFRJ (10) e dentre elas seis eram compatíveis com o diagnóstico. Um dos exames histopatológicos com laudo incompatível, externo a UFRJ, foi, após revisão na UFRJ, considerado compatível.

Em 9 casos (tipo 1, 2 casos; tipo 2, 2 casos; tipo 3 5 casos), o diagnóstico se mantinha indefinido antes da realização do estudo de genética molecular. Em 5 destes o exame físico apontava para um processo de denervação pela presença de fasciculações. Em 5 não havia sido realizada nem a ENMG nem a biópsia muscular e nos 4 restantes, estes exames haviam sido normais ou inconclusivos.

DISCUSSÃO

Através da pesquisa de deleção no gene SMN é possível confirmar 95 % dos casos dos tipos 1 e 2 e 80 % dos casos do tipo 3 da AME³. O diagnóstico genético-molecular é mais preciso, menos invasivo que a biópsia e a ENMG, porém não está disponível de forma abrangente no Brasil. Desta forma, tornam-se importantes as informações obtidas pelo exame neurológico e pelos exames ancestrais. Não dispomos de estudos comparativos entre estes exames, nem no que diz respeito a sua sensibilidade e especificidade nem quanto à análise de custo e benefício.

Os achados do exame neurológico se mostraram

mais positivos que os dos exames complementares em nosso estudo. No entanto, estes exames não foram feitos de maneira sistemática, portanto nem todos pacientes haviam se submetido a eles.

A paresia estava presente em todos os 22 casos e tanto a atrofia quanto as fasciculações ou movimentos espontâneos dos dedos foram encontradas em 82 % dos nossos casos. No exame físico, a paresia predominante proximal pode sugerir outras doenças neuromusculares, principalmente as miopatis. No entanto, a atividade muscular espontânea visível à inspeção, seja sob forma de fasciculações ou de movimentos finos das extremidades que não desaparecem com o sono, pode indicar a presença de denervação⁷. São observadas principalmente em doenças localizadas no corno anterior da medula, sendo infreqüentes em miopatis ou neuropatias axonais, podendo ser encontradas em indivíduos normais. Neuropatia motora multifocal associada a tiroidite de Hashimoto⁸, miosite por corpúsculos de inclusão⁹, neuropatia periférica hereditária¹⁰, estão entre as outras doenças que podem apresentar fasciculações dentre suas manifestações clínicas. Com exceção da última, são doenças raras e presentes em adultos. Finas e rápidas, pouco amplas, incapazes de causar movimentos de articulações, irregulares e inconstantes, em geral presentes no repouso, podem as fasciculações ser deflagradas ou intensificadas por estimulação mecânica, por fadiga e frio, e, o tecido subcutâneo abundante dificulta a sua visualização.

Atrofia muscular, apesar de fazer parte do nome desta entidade, pode não estar presente no início do quadro. A maioria dos casos com maior tempo de evolução (82 %) apresentou este sinal. Outra possível explicação para a ausência deste achado poderia ser a existência simultânea de maior tecido subcutâneo adiposo, mascarando a presença da atrofia.

Analisando-se a freqüência da positividade dos achados clínicos que constam nos critérios diagnósticos revisados para AME³, percebe-se a maior importância destes sobre os exames complementares. Esta série de casos demonstra a falta de uniformidade encontrada nos resultados dos estudos neurofisiológicos e de biópsia em crianças com AME confirmada pela presença de deleção no gene SMN. Em cerca de 1/4 dos pacientes este diagnóstico não foi confirmado pelos estudos neurofisiológicos e/ou de biópsia muscular realizados previamente ao exame de genética molecular. A positividade em nossa amostra para um resultado compatível foi pequena em

relação tanto a ENMG (57 %) quanto a biópsia muscular (58 %). Cabe ressaltar que 8 pacientes não fizeram a ENMG e 10 não foram submetidos à biópsia; no entanto, estes não foram computados no cálculo do percentual de positividade apresentado. Nem todos fizeram o exame na UFRJ, onde tanto a ENMG quanto a histopatologia e imuno-histoquímica da biópsia muscular são realizados por pessoas experientes e capacitadas. Como o estudo neste aspecto obteve os dados retrospectivamente, não foi feita uma avaliação de valor preditivo destes exames complementares, pois estaria sujeito a viés de seleção e de aferição.

De acordo com outros estudos, o valor preditivo dos estudos neurofisiológicos em lactentes com suspeita de doença neuromuscular é maior que 80 %¹¹. Especificamente em casos de AME este valor cai para 65 %¹². Uma correlação de 93 % entre os achados dos estudos neurofisiológicos com os da biópsia muscular foi observada em 15 pacientes com AME tipo 1¹³. Estes exames eram imperiosos antes do advento da análise do gene do SMN.

A ENMG é exame que possibilita a classificação abrangente das doenças neuromusculares. Subdivide-se em 3 etapas: estudo da condução neural, testes de estimulação repetitiva e miografia. A miografia se realiza através da inserção de uma agulha com eletrodo no músculo e capta-se o potencial de ação da unidade motora; esta é a etapa primordial quando diante da suspeita de uma doença do corno anterior. De forma ideal, obtém-se um registro tanto no repouso quanto durante a contração voluntária. No músculo normal não se detecta atividade no repouso, ou seja, ocorre o silêncio elétrico. Desta forma ficam claras certas limitações do exame quando realizado em crianças, devido à dificuldade de cooperação próprias de certas idades e do medo de um exame com agulha.

Os achados neurofisiológicos isoladamente são passíveis de serem encontrados em outras doenças neuromusculares. Potenciais de fibrilação são observados no repouso em casos de denervação, seja ela localizada no corno anterior, ou no percurso do nervo periférico. Algumas doenças musculares também admitem a presença de fibrilações. São encontrados ainda na AME potenciais de unidade motora de duração e amplitude aumentada, e pode haver redução da velocidade de condução motora nas formas de AME de instalação mais precoce. Estas alterações podem ser visualizadas desde o período neonatal, porém não aparecem em todos os músculos¹⁴.

Alterações histopatológicas características na AME são a presença de fibras musculares atroficas tanto tipo I quanto tipo II, hipertrofia de fibras tipo I ou agrupamento de tipo de fibras. Porém, alterações diversas podem ser encontradas nas biopsias musculares destes pacientes. Isto ocorreu em 42 % dos nossos pacientes que se submeteram a este exame, e é uma observação feita também por outros autores¹⁵⁻¹⁷. As alterações dadas como características não são observadas apenas em casos de AME, podendo ocorrer em qualquer processo de denervação ou até mesmo em outras doenças musculares¹⁸. São mais sujeitos a erros de interpretação dos achados histopatológicos os casos de AME tipo 1 e no tipo 3. No neonato, pode ser difícil de diferenciar os achados da AME com os da desproporção congênita de fibras¹⁹. Nas formas de evolução mais arrastada, a interposição de alterações miopáticas secundárias, como fibras angulares, núcleos centrais, fendas e desarranjo miofibrilar, aumentam com a evolução²⁰.

Ambos os exames complementares, a neurofisiologia e a biópsia muscular apresentam limitações para o diagnóstico de casos de AME, tanto no que concerne à definição etiológica do processo de degeneração quanto à demonstração da existência deste processo. Algumas explicações para exames com resultados diversos dos esperados são: interpretações errôneas dos achados, escolha de locais errados para a realização dos exames ou a realização dos exames em fases ou muito iniciais ou terminais da doença.

Cabe uma observação sobre a detecção da AME em uma mãe e dois de seus únicos filhos, dentre os casos aqui descritos. Um relato como este levantaria a suspeita inicial de uma doença autossômica dominante, principalmente quando inexistente a história de consangüinidade nesta família. No entanto, conforme este exemplo ilustra, tal fato é possível quando o pai for portador de um gene para a doença, heterozigoto no caso. Infelizmente, dentre as técnicas de biologia molecular atualmente disponíveis no Laboratório de Genética Humana da FIOCRUZ, não está a de análise quantitativa do gene ou da proteína de sobrevivência do neurônio motor, únicos capazes de determinar o estado de portador heterozigoto²¹.

O quadro clínico de fraqueza muscular simétrica com atrofia e/ou fasciculações, principalmente quando os valores de creatinofosfoquinase estiverem abaixo de

5 vezes seus valores superiores normais, deveria ser suspeito de uma AME mesmo se os exames de eletroneurofisiologia ou de biópsia muscular não forem característicos desta doença e não mostrarem outro diagnóstico específico. A pesquisa de deleção no gene SMN pode dirimir situações de dúvida diagnóstica.

REFERÊNCIAS

- Melki J, Abdelhak S, Sheth P, et al. Gene for chronic proximal spinal muscular atrophies maps to chromosome 5q. *Nature*, 1990;344:767-768.
- Lefebvre S, Burglen L, Reboullet S, et al. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell*, 1995; 80:155-165.
- Zerres K, Davies KE. 59th ENMC International Workshop: Spinal Muscular Atrophies: recent progress and revised diagnostic criteria 17-19 April 1998, Soestduinen, The Netherlands. *Neuromuscul Disord*, 1999; 9:272-278.
- Lahiri DK, Nurnberger JRJ. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res*, 1991;19:5444.
- Fallon L, Harton GL, Sisson ME, et al. Preimplantation genetic diagnosis for spinal muscular atrophy type I. *Neurology* 1999;53:1087-1090.
- Roy N, Mahadevan MS, McLean M, et al. The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy. *Cell* 1995;80:167-178.
- Fredericks EJ, Russman BS. Bedside evaluation of large motor units in childhood spinal muscular atrophy. *Neurology* 1979;29:398-400.
- Toscano A, Rodolico C, Benvenga S, et al. Multifocal motor neuropathy and asymptomatic Hashimoto's thyroiditis: first report of an association. *Neuromusc Disord* 2002;12:566-568.
- Dabby R, Lange DJ, Trojaborg W, et al. Inclusion body myositis mimicking motor neuron disease. *Arch Neurol*, 2001;58:1253-1256.
- Scheel AK, Toepfer M, Kunkel M, Finkenstaedt M, Reimers CD. Ultrasonographic assessment of the prevalence of fasciculations in lesions of the peripheral nervous system. *J Neuroimaging* 1997;7:23-27.
- Packer RJ, Brown MJ, Berman PH. The diagnostic value of electromyography in infantile hypotonia. *Am J Dis Child* 1982;136:1057-1059.
- Russel JW, Afifi AK, Ross MA. Predictive value of electromyography in diagnosis and prognosis of the hypotonic infant. *J Child Neurol* 1992;7:387-391.
- David WS, Jones HR Jr. Electromyography and biopsy correlation with suggested protocol for evaluation of the floppy infant. *Muscle Nerve* 1994;17:424-430.
- Renault F, Chartier JP, Harpey JP. Contribution of the electromyogram in the diagnosis of infantile spinal muscular atrophy in the neonatal period. *Arch Pediatr*, 1996;3:319-323.
- Vajsar J, Balslev T, Ray PN, Siegel-Bartelt J, Jay V. Congenital cytoplasmic body myopathy with survival motor neuron gene deletion or Werdnig-Hoffmann disease. *Neurology*, 1998;51:873-875.
- Kingma DW, Feeback DL, Marks WA, Bobele GB, Leech RW, Brumback RA. Selective type II muscle fiber hypertrophy in severe infantile spinal muscular atrophy. *J Child Neurol*, 1991;6:329-334.
- Buchino JJ, Bove KE, Iannaccone ST. Transient cytoplasmic bodies in muscle of three infants with Werdnig-Hoffmann disease. *Pediatr Pathol*, 1990;10:563-573.
- Pons R, Andreetta F, Wang CH, et al. Mitochondrial myopathy simulating spinal muscular atrophy. *Pediatr Neurol*, 1996;15:153-158.
- De Reuck J, van den Bossche H, DeCoster W, Hooft C. Infantile spinal muscular atrophy: unusual fibre typing and distribution in a muscle biopsy. *Eur Neurol* 1978;17:142-148.
- Mastaglia FL, Walton JN. Histological and histochemical changes in skeletal muscle from cases of chronic juvenile and early adult spinal muscular atrophy. *J Neurol Sci* 1971;12:15-44.
- Cusco I, Barcelo MJ, Baiget M, Tizzano EF. Implementation of SMA carrier testing in genetic laboratories: comparison of two methods for quantifying the SMN1 gene. *Hum Mutat*, 2002;20:452-459.