

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

**ANÁLISE MOLECULAR DOS GENES SMN1 E SMN2 EM
PACIENTES COM SUSPEITA CLÍNICA DE ATROFIA
MUSCULAR ESPINAL**

FERNANDA MARQUES DE SOUZA GODINHO

Porto Alegre, abril de 2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

**ANÁLISE MOLECULAR DOS GENES SMN1 E SMN2 EM
PACIENTES COM SUSPEITA CLÍNICA DE ATROFIA
MUSCULAR ESPINAL**

FERNANDA MARQUES DE SOUZA GODINHO

Orientadora

Prof.^a Dr.^a Maria Luiza Saraiva Pereira

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

Porto Alegre, abril de 2010

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Maria Luiza Saraiva-Pereira, pela orientação, dedicação e pelos ensinamentos que foram muito importantes para o meu crescimento profissional e científico.

Aos pacientes e seus familiares por proverem amostras biológicas para este estudo.

Aos amigos do Laboratório de Identificação Genética, pelo aprendizado, incentivo e pelos momentos de alegria e descontração.

Aos meus pais, Paulo e Rejane, pelo amor, preocupação e constante apoio para tornar meus sonhos possíveis.

Ao meu namorado, Carlos Eduardo, pela compreensão, pelo carinho e pelo apoio na conclusão deste trabalho.

Aos meus amigos, pela amizade incondicional e verdadeira.

Às Instituições que forneceram o apoio financeiro e cultural: CNPq, CAPES, FAPERGS, UFRGS e HCPA.

A todos, que de alguma forma, contribuíram para a realização e conclusão deste trabalho.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	ii
SUMÁRIO	iii
PARTE I	v
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Atrofia muscular espinal	1
<i>1.1.1. Breve histórico da AME</i>	1
<i>1.1.2. Manifestações clínicas</i>	2
<i>1.1.3. Formas clínicas</i>	2
1.2. Genética molecular da AME	4
<i>1.2.1. Gene SMN</i>	5
<i>1.2.2. Correlação genótipo-fenótipo</i>	8
<i>1.2.3. Splicing alternativo</i>	9
<i>1.2.4. A proteína SMN</i>	10
<i>1.2.5. Modelos animais</i>	12
1.3. Diagnóstico molecular da AME	14
<i>1.3.1. Análise da ausência de SMN1 em homozigose</i>	14
<i>1.3.2. Análise quantitativa dos genes SMN</i>	15
<i>1.3.3. Análise das mutações de ponto</i>	16
1.4. Perspectivas terapêuticas para AME	16
1.5. Justificativa	18
2. OBJETIVOS	19

2.1. Objetivo geral	19
2.2. Objetivos específicos.....	19
PARTE II	20
CAPÍTULO I	21
PARTE III	44
DISCUSSÃO	45
CONCLUSÕES	48
REFERÊNCIAS	49
ANEXOS	57
Instruções para a submissão de manuscrito para a revista <i>BMC Medical Genetics</i>	57

PARTE I

RESUMO

A atrofia muscular espinal (AME) é uma das doenças de herança autossômica recessiva mais frequentes, com uma incidência estimada de 1 em cada 10.000 nascidos vivos. A AME se caracteriza por degeneração de neurônios motores na medula espinal, causando fraqueza progressiva de membros e tronco, seguida de atrofia muscular. Os pacientes são classificados em AME tipo I, AME tipo II e AME tipo III, baseado na idade de início dos sintomas e na evolução clínica. As três formas clínicas são causadas por alterações no gene de sobrevivência do neurônio motor (SMN1), que apresenta uma cópia homóloga (SMN2). Em torno de 95% dos pacientes com AME são homozigotos para ausência do exon 7 do gene SMN1, devido a uma deleção desse gene ou à uma conversão para SMN2. A ausência de SMN2 não tem consequências clínicas e é encontrada em aproximadamente 5% dos indivíduos normais, mas o número de cópias de SMN2 modula o fenótipo de pacientes com AME. Devido a este espectro uniforme de mutação, a análise molecular realizada mais frequentemente é a detecção de deleções e conversões dos éxons 7 e/ou 8 dos genes SMN1 e SMN2 nos pacientes com suspeita clínica de AME. Neste trabalho, um protocolo baseado no sistema *TaqMan*[®] foi desenvolvido e comparado com a metodologia de PCR-RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) utilizada no laboratório, avaliando o potencial de aplicação no diagnóstico molecular de pacientes com AME. Amostras de DNA de 100 indivíduos com suspeita clínica de AME foram analisadas pelos dois métodos. Amostras suspeitas de apresentar conversão foram analisadas por sequenciamento direto de DNA. Homozigotos para a ausência do exon 7 do gene SMN1 foram identificados em 58 casos (58%), sendo a maioria devido à deleção desse gene. Destes pacientes, 56 foram classificados, de acordo com os critérios diagnósticos revisados para AME, e distribuídos da seguinte forma: 26 (46,4%) do tipo I, 16 (28,6%) tipo II e 14 (25,0%) tipo III. Oito casos de conversão do gene SMN1 para SMN2 foram encontradas entre os pacientes e a distribuição desses casos entre as três formas clínicas foi a seguinte: 4 pacientes do tipo III, 3 do tipo II e 1 do tipo I. Cinco casos de homozigotos para ausência do gene SMN2 foram identificados entre os demais indivíduos. A comparação do método PCR-RFLP com o método baseado no sistema *TaqMan*[®] descrito neste estudo mostrou que ambos foram específicos e precisos para essas análises. No entanto, o ensaio *TaqMan*[®] foi mais sensível e mais rápido e parece ser um método adequado para o diagnóstico de AME.

ABSTRACT

Spinal muscular atrophy (SMA) is one of the most frequent autosomal recessive disorder with an estimated incidence of 1 case in each 10,000 live-births. SMA is characterized by degeneration of motor neurons in the spinal cord, causing progressive weakness of the limbs and trunk, followed by muscle atrophy. Patients have been classified in type I–III SMA based on age at onset and clinical course. All three types of SMA are caused by alterations in the survival motor neuron gene (SMN1) that also have a homologous copy named SMN2. About 95% of SMA patients show homozygous absence of SMN1 exon 7 due a deletion of this gene or a conversion into SMN2. The absence of SMN2 is found in about 5% of individuals with no clinical phenotype, but number of SMN2 copies modulates the phenotype of SMA patients. Considering this uniform mutation spectrum, direct molecular genetic testing consists basically of detecting deletions and conversions of exons 7 and 8 of these genes in SMA patients. In this work, we develop a real time PCR TaqMan[®] method and compared with the most commonly used PCR restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) assay, evaluating the potential application of molecular diagnosis of SMA patients. DNA samples from 100 individuals with clinical features of SMA were analyzed by both methods. Besides, patients DNA samples carrying a conversion event were analysed by direct DNA sequencing. Homozygous for SMN1 exon 7 absence were identified in 58 cases (58%) being the majority due to gene deletion and eight cases of gene conversion. From those, 56 were classified, according to the revised diagnostic criteria, and distributed as follows: 26 (46.4%) SMA type I, 16 (28.6%) SMA type II and 14 (25.0%) SMA type III. In addition, gene conversion was observed in 4 SMA type I patients, 3 SMA type II and 1 SMA type III patient. Among the remaining individuals five samples were found to be homozygous for absence of SMN2 gene. Comparing PCR-RFLP method and the method based on the TaqMan[®] system describe in this study, we verify that both were precise and specific for these analyses. However, the TaqMan[®] assay was faster and more sensitive than PCR-RFLP and was shown to be a suitable method for the diagnosis of SMA.

LISTA DE ABREVIATURAS

AME	atrofia muscular espinal
C	citossina
DMSO	dimetilsulfóxido (<i>dimethylsulfoxide</i>)
DNA	ácido desoxirribonucléico (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético (<i>ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
ENMG	eletroneuromiografia
ESSE	amplificador de splicing exônico (<i>exonic splicing enhancer</i>)
ESS	silenciador de splicing exônico (<i>exonic splicing silencer</i>)
gems	gêmeos de corpos enovelados (<i>gemini of coiled bodies</i>)
HDCAi	inibidores de histonas desacetilases (<i>histone deacetylase inhibitors</i>)
hnRNP	ribonucleoproteínas nucleares heterogêneas (<i>heterogeneous nuclear ribonucleoprotein</i>)
kb	quilobase
kDa	quilo Dalton
MLPA	amplificação multiplex por sondas de ligação (<i>multiplex ligation-dependent probe amplification</i>)
mRNA	RNA mensageiro
OMIM	<i>online mendelian inheritance in man</i>
PB	pares de bases
PCR	reação em cadeia da polimerase (<i>polymerase chain reaction</i>)
SAHA	ácido hidroxâmico suberoilânida (<i>suberoylanilide hydroxamic acid</i>)
SF2/ASF	fator de splicing 2/fator de splicing alternativo (<i>splicing factor 2/alternative splicing factor</i>)
SMN	gene de sobrevivência do neurônio motor (<i>survival of motor neuron</i>)
snRNP	ribonucleoproteínas nucleares pequenas (<i>small nuclear ribonucleoproteins</i>)
SSCP	polimorfismo conformacional de fita simples (<i>single-strand conformation polymorfism</i>)

RFLP	polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (<i>restriction fragment length polymorfism</i>)
RNA	ácido ribonucléico (<i>ribonucleic acid</i>)
T	timina

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Critérios de classificação para AME.....	3
--	---

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mapa genético do <i>locus</i> da AME.....	5
Figura 2 – Diferenças nucleotídicas entre as cópias SMN1 e SMN2.....	6

1. INTRODUÇÃO

1.1. Atrofia muscular espinal

A atrofia muscular espinal (AME), principal causa genética de morte infantil, é uma doença de herança autossômica recessiva decorrente da degeneração dos neurônios motores da medula espinal (Lunn e Wang, 2008). A AME está entre as doenças autossômicas recessivas mais comuns, afetando aproximadamente 1 em 10.000 nascidos vivos e com uma frequência de portadores de aproximadamente 1:50 (Ogino e Wilson, 2002).

1.1.1. Breve histórico da AME

A AME infantil (a forma mais grave da doença) foi descrita pela primeira vez por Werdnig e Hoffmann em trabalhos publicados em 1891 e 1893 (Kostova *et al.*, 2007). Neste último, Hoffman descreve sete casos da doença em quatro famílias diferentes. A descrição da forma branda de AME foi resultado de estudos de Kugelberg e Welander que buscaram diferenciar pacientes com AME de pacientes com distrofia muscular. Este trabalho foi publicado em 1956 e descrevia 12 casos de AME (Kugelberg e Welander, 1956). A definição de uma terceira forma clínica de AME, intermediária às duas outras já conhecidas, foi feita por Dubowitz em 1960. Neste trabalho, pacientes com a forma intermediária de AME foram observados em uma ala para pacientes com distrofia muscular no *Queen Mary's Hospital for Children* (Kostova *et al.*, 2007).

1.1.2. Manifestações clínicas

Os aspectos clínicos da doença são causados basicamente pela perda progressiva dos neurônios motores no corno anterior da medula espinal. A lesão ocasiona fraqueza simétrica e atrofia dos músculos voluntários proximais das pernas, braços e, eventualmente, de todo o tronco durante a progressão da doença (Wirth *et al.*, 2006a). Os músculos proximais são mais afetados que os distais e os membros inferiores são mais fracos que os superiores (Zerres e Davies, 1999). A gravidade fenotípica da AME é bastante variável e o curso da doença é diferente do quadro de progressão constante visto em outras doenças dos neurônios motores (Kostova *et al.*, 2007).

A eletroneuromiografia (ENMG) de pacientes com AME mostra um padrão de denervação sem envolvimento sensorial ou sem diminuição marcante da velocidade de condução nervosa (Wirth *et al.*, 2006a). A histopatologia dos músculos esqueléticos de pacientes mostra fibras atroficas com ilhas de fibras hipertróficas (Lunn e Wang, 2008). A histopatologia da medula espinal mostra perda grave dos neurônios motores na região do corno anterior (Lunn e Wang, 2008).

1.1.3. Formas clínicas

A AME foi previamente dividida em três formas clínicas: aguda ou doença de Werdnig-Hoffmann (AME tipo I), intermediária ou crônica (AME tipo II) e juvenil ou doença de Kugelberg-Welander (AME tipo III). Os critérios para essa classificação estão baseados na

idade de início da manifestação dos sintomas, no curso da doença e na expectativa de vida dos pacientes (tabela 1) (Zerres e Davies, 1999).

Tabela 1: Critérios de classificação para AME

Tipo	OMIM ¹	Idade de início	Mais alta função alcançada	Expectativa de vida
tipo I	253300	0 a 6 meses	não senta	até 2 anos
tipo II	253550	7 a 18 meses	senta, não fica em pé	adolescência ou adulto
tipo III	253400	acima dos 18 meses	fica em pé e caminha	normal

¹<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/query?db=OMIM>.

A AME tipo I é a forma mais comum e mais grave de AME. Os pacientes com essa forma clínica começam a manifestar os sintomas (hipotonia, paralisia flácida simétrica, ausência de controle do movimento da cabeça, tronco superior em “forma de sino” e fasciculações da língua) antes dos 6 meses de idade (Lunn e Wang, 2008). Esses pacientes não são capazes de sentar sem suporte e morrem até os 2 anos de idade (Zerres e Davies, 1999). A morte geralmente é decorrente de dificuldades de respiração e de alimentação ou devido à infecções respiratórias (Lunn e Wang, 2008).

A AME tipo II é a forma intermediária, com progressão mais lenta do que a AME tipo I e com prognóstico variável (Panozzo *et al.*, 2001). O início dos sintomas ocorre entre 7 e 18 meses (Zerres e Davies, 1999). Os pacientes são capazes de manter-se sentados sem auxílio e alguns deles são capazes de, com suporte nas pernas, ficar de pé (Lunn e Wang, 2008). Tremores das mãos são comuns. A expectativa de vida também é variável e alguns pacientes

atingem a adolescência e a vida adulta (Zerres e Davies, 1999). Insuficiência respiratória é uma causa de morte frequente (Lunn e Wang, 2008).

Pacientes com o tipo III mostram grande heterogeneidade de sintomas (Farrar *et al.*, 2009). Eles geralmente conseguem caminhar sozinhos. Alguns necessitam o uso de cadeira de rodas na infância, enquanto outros caminham e têm uma vida adulta produtiva com fraqueza muscular mínima (Lunn e Wang, 2008). Os sintomas na AME tipo III se manifestam depois dos 18 meses e a expectativa de vida é normal (Zerres e Davies, 1999).

Dentre os pacientes com AME, aproximadamente 60% são classificados como tipo I e a segunda forma mais frequente é o tipo II (Ogino e Wilson, 2002).

1.2. Genética molecular da AME

O *locus* das AME foi localizado no cromossomo 5q11.2-q13.3 (Brzustowicz, *et al.*, 1990; Melki, *et al.*, 1990). O gene encontra-se em uma região genômica complexa contendo múltiplas cópias de sequências repetitivas, pseudogenes e sequências do tipo retrotransposons (Panozzo *et al.*, 2001). Rearranjos *de novo* também foram identificados em pelo menos 2% dos pacientes com AME, o que pode ser explicado pela instabilidade da região (Melki *et al.*, 1994; Wirt *et al.*, 1997). Estas ocorrências de mutações *de novo* podem explicar o menor risco de recorrência que o esperado de 25% (Panozzo *et al.*, 2001).

Caracterizações subsequentes do *locus* de AME revelaram um segmento cromossômico duplicado e invertido (figura 1), cada elemento (com tamanho por volta de 500 kb) contendo 4 genes, entre eles o gene de sobrevivência do neurônio motor (*survival of motor neuron* - SMN) (Lefebvre *et al.*, 1995).

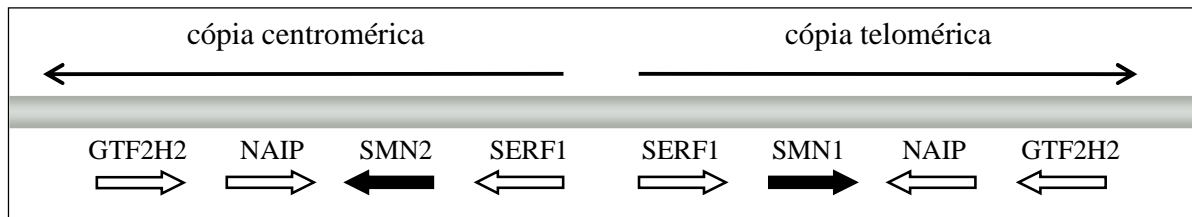


Figura 1: Mapa genético do locus da AME. As cópias do gene SMN estão localizadas em um segmento cromossômico duplicado e invertido no cromossomo 5q11.2-q13.3. SMN1 está localizado na cópia telomérica, enquanto SMN2 está localizado na cópia centromérica. Outros genes, vizinhos às cópias SMN estão representados. As flechas na parte inferior indicam a direção de transcrição de cada gene.

1.2.1. Gene SMN

O gene SMN foi identificado como o gene associado à AME (Lefebvre *et al.*, 1995). O gene está dividido em 9 éxons (1, 2a, 2b, 3 a 8) e compreende uma região de aproximadamente 20 kb (Burglen *et al.*, 1996). Um códon de parada, localizado no final do éxon 7, encerra a região codificadora de 1,7 kb (Burglen *et al.*, 1996). Este gene apresenta duas cópias homólogas: uma telomérica (SMN1, OMIM 600354) e outra centromérica (SMN2, OMIM 601627). As duas cópias homólogas diferenciam-se em apenas cinco trocas de bases na região 3', sendo uma localizada no intron 6, uma no éxon 7, duas no intron 7 e uma no éxon 8 (figura 2). Os dois genes são transcritos e, apesar de uma das trocas de bases estar localizada dentro da região codificadora, nenhuma altera o aminoácido codificado (Lefebvre *et al.*, 1995; Burglen *et al.*, 1996). Estas trocas de bases podem ser utilizadas para diferenciá-los em análises moleculares (Wirth, 2000).

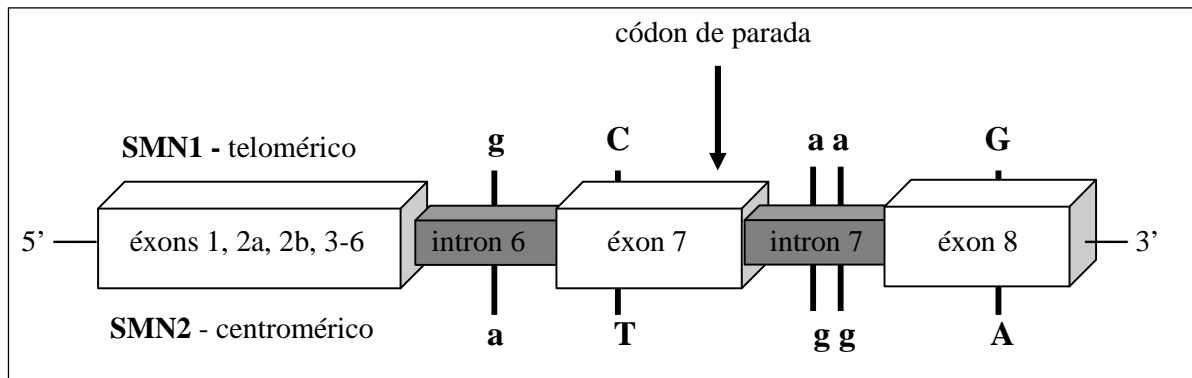


Figura 2: Diferenças nucleotídicas encontradas entre as cópias SMN1 e SMN2. As trocas de bases que diferenciam as cópias SMN1 e SMN2 estão indicadas. A flecha indica a posição do códon de parada.

A causa das três formas clínicas de AME está relacionada diretamente com alterações no gene SMN1, apesar de terem sido encontradas deleções em todos os genes localizados no *locus* da AME (Lefebvre *et al.*, 1998). Em torno de 95% dos pacientes com AME são homocigotos para ausência do éxon 7 do gene SMN1, causada principalmente por deleção desse gene (Cobben *et al.*, 1995; Hahnen *et al.*, 1995; Rodrigues *et al.*, 1995; Velasco *et al.*, 1996; Simard *et al.*, 1997). Os outros pacientes apresentam ausência do gene SMN1 em um alelo e uma mutação de ponto no outro alelo ou, mais raramente, mutações de ponto nos dois alelos (Wirth *et al.*, 1999; Wirth, 2000; Sun *et al.*, 2005). Cerca de 40 mutações raras já foram identificadas até o momento, sendo que a grande maioria são mutações de sentido trocado, que alteram a função da proteína SMN (Lorson *et al.*, 1998; Buhler *et al.*, 1999; Sun *et al.*, 2005).

Entre esses pacientes homocigotos para ausência do gene SMN1, cerca de 90% apresentam ausência dos éxons 7 e 8, enquanto que cerca de 10% apresentam ausência apenas do éxon 7 (Wirth, 2000). A base molecular para esse último fenômeno é a conversão gênica,

um mecanismo mutacional comum na região da AME que causa a conversão do gene SMN1 para SMN2 ou vice-versa (Hahnen *et al.*, 1996; van der Steege *et al.*, 1996; Burghes, 1997). A região da conversão pode abranger o gene SMN inteiro ou apenas uma parte dele (Bussaglia *et al.*, 1995; Hahnen *et al.*, 1996).

A ausência do gene SMN2 não tem consequências clínicas e é encontrada em aproximadamente 5% dos indivíduos normais (Panozzo *et al.*, 2001). Porém, o número de cópias SMN2 modula o fenótipo de pacientes com AME, visto que os níveis do seu produto estão inversamente correlacionados com a gravidade clínica da doença (Prior *et al.*, 2004; Wirth *et al.*, 2006b). Pacientes com formas mais brandas de AME apresentam um número maior de cópias do gene SMN2, como resultado de eventos de conversão gênica. Até o momento, não existem relatos de deleção dos dois alelos dos genes SMN1 e SMN2, sugerindo que esse genótipo resultaria em um feto não viável (Panozzo *et al.*, 2001).

Estudos moleculares em famílias com AME revelaram dois tipos de ocorrências incomuns. A primeira são os eventos de mutação *de novo* em SMN1, encontrados em aproximadamente 2% dos casos de AME, uma taxa elevada quando comparada com a de outras doenças autossômicas recessivas (Wirth *et al.*, 1997). Essa elevada taxa de mutações *de novo* em SMN1 pode explicar a alta frequência de portadores na população em geral, apesar da letalidade da doença. As mutações *de novo* são, provavelmente, resultados do grande número de seqüências repetidas em todo o *locus* da AME, o que predispõe esta região a cruzamentos desiguais e eventos de recombinação. A segunda ocorrência incomum é a possibilidade de variação do número de cópias do gene SMN1 em um cromossomo. Cerca de 4% da população normal apresenta três cópias de SMN1 (McAndrew *et al.*, 1997). Portanto, um portador pode apresentar um cromossomo com duas cópias do gene SMN1 e o outro

cromossomo sem o gene SMN1 (Mailman *et al.*, 2001). A ocorrência de dois genes SMN1 em um único cromossomo tem graves implicações do aconselhamento genético, pois, em testes para dosagem de SMN1, um portador com dois genes SMN1 em um único cromossomo tem o mesmo resultado que outro indivíduo não portador que apresenta um gene SMN1 em cada cromossomo (Wirth *et al.*, 1997).

1.2.2. Correlação genótipo-fenótipo

Vários estudos mostraram que o número de cópias de SMN2 influencia a gravidade da AME (Campbell *et al.*, 1997; Feldkotter *et al.*, 2002; Wirth *et al.*, 2006b). Indivíduos normais apresentam até três cópias do gene SMN2 e cerca de 5 à 10% desses indivíduos não têm nenhuma cópia deste gene. Uma ou duas cópias de SMN2 foram encontradas em 95% dos pacientes com AME tipo I, enquanto que 100% dos pacientes com o tipo III apresentavam três ou mais cópias do gene (Mailman *et al.*, 2001). Além disso, três casos raros de indivíduos assintomáticos e homocigotos para a ausência do gene SMN1, mas com cinco cópias do gene SMN2 foram descritos (Prior *et al.*, 2004). Estes casos ilustram o potencial terapêutico do aumento do número de cópias e, conseqüentemente, da expressão do gene SMN2 na diminuição da gravidade da doença. A ocorrência de um número maior de cópias do gene SMN2 é resultado de eventos de conversão gênica do gene SMN1 para o gene SMN2 (Burghes, 1997). Assim, a maioria dos pacientes com AME tipo I apresenta deleções reais do gene SMN1, enquanto a maioria dos pacientes com AME tipo II ou III não apresenta o gene SMN1 devido à conversão para SMN2. Esses resultados também foram descritos em modelos animais (Hsieh-Li *et al.*, 2000; Monani *et al.*, 2000).

1.2.3. *Splicing alternativo*

A troca de uma C por uma T na posição +6 do éxon 7 (c.840C>T) não resulta na troca do aminoácido codificado, entretanto, interfere no *splicing* correto do éxon 7. Essa troca é responsável por um *splicing* alternativo, específico para o gene SMN2, que resulta na perda do éxon 7 (Lorson *et al.*, 1999). A proteína truncada resultante não é funcional e é degradada rapidamente (Chang *et al.*, 2004; Vitte *et al.*, 2007). Contrapondo-se ao gene SMN1, que produz somente transcritos intactos, o gene SMN2 produz 10% de transcritos intactos e 90% de transcritos que perderam o éxon 7 (Wirth *et al.*, 2006a).

Dois modelos foram propostos para explicar o efeito inibitório da troca c.840C>T na inclusão do éxon 7 em transcritos do gene SMN2. O primeiro propõe que essa troca seja resultante da interrupção de um amplificador de *splicing* exônico (*exonic splicing enhancer* – ESE), uma sequência do DNA que promove a inclusão do éxon 7 através do seu reconhecimento pelo fator de *splicing* 2 ou fator de *splicing* alternativo (*splicing factor 2 or alternative splicing factor* - SF2/ASF) (Cartegni e Krainer, 2002). A interrupção do ESE inibe o recrutamento do SF2/ASF, impedindo o reconhecimento do sítio de *splicing* a jusante do éxon 7 e a montagem do spliceossomo, o que resulta na exclusão do éxon 7 do transcrito (Cartegni *et al.*, 2006). A segunda hipótese é geração um silenciador de *splicing* exônico (*exonic splicing silencer* - ESS) (Kashima e Manley, 2003). Este ESS inibe a inclusão do éxon 7 por ligação de ribonucleoproteínas nucleares heterogêneas A1 (*heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1* – hnRNP A1), que impedem estericamente a formação do spliceossomo neste sítio. Esses modelos não excluem um ao outro e podem ocorrer simultaneamente (Sumner, 2007). Entretanto, o mecanismo exato que determina a inclusão ou exclusão do éxon

7 durante o *splicing* do pré-mRNA ainda não está completamente definido (Lunn e Wang, 2008).

O *splicing* dos transcritos do gene SMN2 pode ser dito tecido-específico, considerando-se que ele depende da concentração de diferentes fatores de *splicing* nos diferentes tipos celulares. O padrão de *splicing* em neurônios motores ainda é desconhecido (Sumner, 2007).

1.2.4. A proteína SMN

A proteína SMN, formada por 294 aminoácidos e com um peso molecular de 38 kDa, é o produto do gene SMN1 e, em menores níveis, do gene SMN2 (Ogino e Wilson, 2004). Ela é expressa em todos os tecidos somáticos e é altamente conservada desde levedura até os seres humanos (Lunn e Wang, 2008). A proteína SMN está presente no citoplasma e no núcleo das células. No núcleo, elas estão localizadas em estruturas chamadas gêmeos de corpos enovelados (*gemini of coiled bodies – gems*), que são observadas próximas ou completamente sobrepostas aos corpos de Cajal (Liu e Dreyfuss, 1996). O número de *gems* em células de pacientes com AME, assim como o número de cópias do gene SMN2, está inversamente correlacionado com a gravidade da doença (Patrizi *et al.*, 1999).

O complexo SMN interage com várias proteínas de complexos ribonucleoprotéicos diversos, os quais estão envolvidos em aspectos distintos do processamento do RNA. O complexo SMN pode, então, ter um papel em vários aspectos do metabolismo do RNA, incluindo o *splicing* do pré-RNA, a transcrição e o metabolismo do RNA ribossômico (Sumner, 2007). Atualmente, a função do complexo SMN melhor caracterizada é a montagem

e a regulação da estabilidade de uma classe específica de complexos RNA-proteína, as ribonucleoproteínas nucleares pequenas (*small nuclear ribonucleoproteins* – snRNP) (Pellizzoni *et al.*, 1998; Yong *et al.*, 2004). As snRNP são componentes essenciais do espliceossomo, um grande complexo RNA-proteína que catalisa o *splicing* do pré-mRNA (pré RNA mensageiro) em todas as células (Will e Luhrmann, 2001).

A deficiência de uma proteína que desempenha uma função necessária para todas as células, mas ocasiona, especificamente, a degeneração de neurônios motores é uma questão que ainda não foi esclarecida. A busca de uma função adicional para a proteína SMN, restrita aos neurônios motores, demonstrou que a proteína SMN está presente em dendritos e axônios, sugerindo um papel no transporte do RNA através dos axônios (Bechade *et al.*, 1999; Pagliardini *et al.*, 2000). Um estudo com cultura de células neuronais observou que a proteína é localizada em grânulos nos axônios e no cone de crescimento de neurônios motores, e que grânulos contendo SMN exibiam movimentos bidirecionais rápidos (Zhang *et al.*, 2003). A principal descoberta que corrobora a hipótese de um papel da proteína no transporte axonal de mRNA (RNA mensageiro) é a sua interação com hnRNP, que ligam-se à região 3' não traduzida do mRNA da β -actina (Rossoll *et al.*, 2003). Essa interação é necessária para o transporte eficiente de mRNA da β -actina e o crescimento dos cones dos neurônios motores (Sumner, 2007). Neurônios motores isolados de camundongos deficientes em SMN apresentaram axônios curtos e cones de crescimento menores, ambos os quais eram deficientes em mRNA da β -actina (Rossoll *et al.*, 2003). Um modelo de *zebrafish* deficiente na proteína SMN apresentou um déficit específico no crescimento axonal de neurônios motores (McWhorter *et al.*, 2003).

A proteína truncada é detectada raramente em células ou tecidos derivados de pacientes ou de modelos animais de AME, indicando que ela é altamente instável (Sumner, 2007). Essa instabilidade é provavelmente causada pela habilidade diminuída da proteína de oligomerização e associação com seus parceiros de ligação (Lorson *et al.*, 1998; Cifuentes-Diaz *et al.*, 2001). A instabilidade da proteína truncada produzida pelo gene SMN2 pode ser explicada pelo fato que o éxon 7 da proteína SMN codifica domínios que são importantes para a oligomerização e que a excisão ou mutação deste éxon produz uma proteína sem a capacidade de oligomerizar-se, tornando-se alvo de degradação (Kostova *et al.*, 2007). Entretanto, essa proteína parece reter alguma funcionalidade e melhorar o fenótipo em modelos de camundongos com AME, quando expressa em níveis elevados (Le *et al.*, 2005).

Os níveis da proteína SMN são regulados durante o desenvolvimento, apresentando altos níveis de expressão no período embrionário e uma diminuição destes níveis no período pós-natal (La Bella *et al.*, 1998; Monani *et al.*, 2000; Jablonka *et al.*, 2001). Possivelmente, o processo da doença começa quando os níveis de SMN baixam a uma quantidade mínima crítica e a gravidade das manifestações da doença depende, em parte, da época de início desse decréscimo no desenvolvimento (Sumner, 2007).

1.2.5. Modelos animais

Grande parte do conhecimento atual sobre AME foi obtido através de estudos em modelos animais. Vários organismos são usados como modelos animais para AME, sendo que todos têm apenas um gene SMN, que é equivalente ao SMN1 em seres humanos (Rochette *et al.*, 2001; Burghes e Beattie, 2009). Em todos os organismos, a perda do SMN leva à

letalidade ainda no período embrionário. A situação genética que ocorre em pacientes com AME foi reproduzida em camundongos transgênicos através da introdução do gene SMN2 humano em animais sem o gene SMN. Quando o número de cópias SMN2 é baixo (dois), os camundongos desenvolvem a doença, ao passo que um número elevado de cópias SMN2 (oito) resulta em fenótipo normal (Hsieh-Li *et al.*, 2000; Monani *et al.*, 2000). A expressão do transcrito SMN intacto em neurônios de camundongos tem um impacto substancial na atenuação do fenótipo grave de AME. Um estudo interessante demonstrou que um pequeno aumento da expressão neuronal de SMN diminui o dano às células do neurônio motor em camundongos com AME e estende a sua sobrevivência (Gavrilina *et al.*, 2008). Por outro lado, altos níveis de expressão de SMN em músculos esqueléticos isoladamente não resultam em nenhuma melhora do fenótipo de camundongos doentes (Gavrilina *et al.*, 2008).

Uma gama de fenótipos podem ser obtidos através do controle dos níveis de SMN ou através da introdução de transgenes adicionais em camundongos (DiDonato *et al.*, 2001; Le *et al.*, 2005; Chang *et al.*, 2008; Gavrilina *et al.*, 2008). A introdução de oito cópias de SMN2 recupera completamente camundongos com AME, duas cópias resultam em camundongos doentes que morrem aos cinco dias de idade (Hsieh-Li *et al.*, 2000; Monani *et al.*, 2000) e a introdução de apenas uma cópia é letal ainda no período embrionário (McGovern *et al.*, 2008). Desta forma, estes dados demonstram que pequenas mudanças nos níveis de SMN podem ter um forte impacto sobre o fenótipo (Gavrilina *et al.*, 2008).

1.3. Diagnóstico molecular da AME

O diagnóstico molecular de aproximadamente 95% dos pacientes com AME é realizado pela análise da ausência do éxon 7 do gene SMN1. Os pacientes restantes apresentam mutações de ponto raras e mais difíceis de identificar. Uma análise quantitativa dos genes SMN1 e SMN2 permite a detecção de portadores e outros rearranjos nesta região.

1.3.1. Análise da ausência de SMN1 em homozigose

Deleções em homozigose dos éxons 7 e 8 de SMN1 podem ser detectadas por vários métodos, sendo que os dois principais são PCR-SSCP (*polymerase chain reaction - single-strand conformation polymorfism*) e PCR-RFLP (*polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorfism*).

A análise por PCR-SSCP (Matthijs *et al.*, 1996) tem a vantagem conseguir detectar mutações de ponto no fragmento amplificado da mesma forma que as deleções, porém o método também detecta polimorfismos neutros. Em torno de 4% de membros assintomáticos de famílias de pacientes com AME apresentam uma variante polimórfica do éxon 7 do gene SMN1 que apresenta o mesmo padrão de uma deleção em homozigose no gel de SSCP (Wang *et al.*, 1996). Atualmente, esse método foi praticamente substituído por PCR-RFLP, mas continua sendo utilizado para indivíduos que não apresentam ausência de ambas as cópias de SMN1 (Ogino e Wilson, 2004).

O método laboratorial mais usado para confirmar o diagnóstico de AME é o ensaio qualitativo de PCR-RFLP, que detecta a ausência em homozigose de SMN1 (van der Steege *et*

al., 1995). Esse método se baseia na separação dos genes SMN1 e SMN2 através das trocas de bases nos éxons 7 e 8. O tratamento do éxon 7 com a endonuclease de restrição *Dra* I atua somente sobre os produtos de PCR do gene SMN2, devido a um sítio de restrição gerado pela amplificação com o *primer* reverso (van der Steege *et al.*, 1995). O tratamento do éxon 8 com a enzima *Dde* I também atua sobre o produto de amplificação do gene SMN2, produzindo fragmentos menores do amplicon pela presença de um sítio de reconhecimento dessa enzima (Scheffer *et al.*, 2001).

1.3.2. Análise quantitativa dos genes SMN

A análise qualitativa para a detecção de deleções e conversões do gene SMN1 não permite diferenciar indivíduos portadores, com apenas uma cópia do gene SMN1, de indivíduos com duas ou mais cópias desse gene. Porém, uma análise quantitativa, além da identificação de portadores, possibilita a identificação de eventos de conversão gênica, a quantificação do número de cópias do gene SMN2 e, conseqüentemente, uma correlação com a gravidade da doença. Vários métodos já foram utilizados para essa análise quantitativa, por exemplo, análise por PCR-RFLP quantitativa competitiva (McAndrew *et al.*, 1997), análise por PCR quantitativo em tempo real (Feldkotter *et al.*, 2002; Anhuf *et al.*, 2003; Gomez-Curet *et al.*, 2007) e análise por amplificação multiplex por sondas de ligação (*multiplex ligation-dependent probe amplification* – MLPA) (Arkblad *et al.*, 2006; Scarciolla *et al.*, 2006; Zapletalova *et al.*, 2007).

1.3.3. Análise das mutações de ponto

A análise de mutações de ponto não é uma rotina comum oferecida em laboratórios (Ogino e Wilson, 2004). Mutações de ponto no gene SMN1 são responsáveis por AME na minoria dos pacientes. O cálculo de uma frequência global dessas mutações raras, baseado em dados da literatura, é difícil de ser realizado pelo fato de que as mutações já identificadas não englobam o número total de pacientes clinicamente bem caracterizados com AME. Homozigotos para a ausência do gene SMN1 foram identificadas em 92% de 525 pacientes com AME, enquanto 3,4% apresentavam mutações de ponto e 4,6% não tiveram nenhuma mutação identificada (Wirth *et al.*, 1999). Além disso, as mutações identificadas estão distribuídas em todo o gene (Wirth, 2000; Ogino e Wilson, 2004), o que implica na necessidade do sequenciamento direto de DNA do gene completo, tornando o procedimento caro e trabalhoso.

1.4. Estratégias terapêuticas para AME

Atualmente, não existe tratamento para pacientes com AME. O manejo clínico consiste no tratamento ativo de infecções respiratórias e prevenção de deformidades do tronco através do uso de suporte ou fusão espinal (DiDonato *et al.*, 2003). Entretanto, a elucidação dos mecanismos moleculares da AME e das bases moleculares do *splicing* alternativo do éxon 7 do gene SMN2 está possibilitando o desenvolvimento de abordagens terapêuticas através da modulação da regulação do *splicing*, da transcrição e/ou da tradução (Wirth *et al.*, 2006a).

Várias estratégias foram consideradas até o momento:

(a) Elevação dos níveis endógenos de proteína intacta gerada por SMN2 através da:

- Ativação da transcrição do gene SMN2 via promotor
 - ✓ Inibidores de histonas desacetilases (HDACi): butirato de sódio, ácido valpróico, fenilbutirato, ácido hidroxâmico suberoilânilida (*suberoylanilide hydroxamic acid* – SAHA), M344 (um novo HCACi sintetizado) (Chang *et al.*, 2001; Brichta *et al.*, 2003; Andreassi *et al.*, 2004; Hahnen *et al.*, 2006; Riessland *et al.*, 2006).
 - ✓ Componentes que regulam a metilação do DNA do promotor do gene SMN2: ácido valpróico (Detich *et al.*, 2003).
 - ✓ Outras substâncias: interferon (Baron-Delage *et al.*, 2000), indoprofeno (Lunn *et al.*, 2004), hidroxiuréia (Grzeschik *et al.*, 2005).
- Restauração do correto *splicing* do pré-mRNA do gene SMN2
 - ✓ Com HDACi: butirato de sódio, ácido valpróico, SAHA, M344 (Chang *et al.*, 2001; Brichta *et al.*, 2003; Hahnen *et al.*, 2006; Riessland *et al.*, 2006).
 - ✓ Pequenas moléculas de RNA anti-senso (Skordis *et al.*, 2003; Singh *et al.*, 2006).
- Ativação da tradução e estabilização da proteína SMN ativa através de fosfatases e cinases (Grimmler *et al.*, 2005) ou fatores modificadores de AME (Helmken *et al.*, 2003).
- Supressão do códon de parada em SMN2 com aminoglicosídeos para alongar a proteína truncada e melhorar sua estabilidade (Wolstencroft *et al.*, 2005; Mattis *et al.*, 2006).

(b) Compensação da deficiência de proteína SMN por terapia com células tronco (Kerr *et al.*, 2000) e terapia gênica (DiDonato *et al.*, 2003)

(c) Melhora da viabilidade de neurônios motores através de caminhos alternativos, como fatores neurotróficos (Lesbordes *et al.*, 2003), compostos neuroprotetores (Haddad *et al.*, 2003) e exercícios regulares (Grondard *et al.*, 2005).

A descoberta de substâncias químicas que têm, de fato, a capacidade de efetuar uma das estratégias mencionadas acima parece promissora. Entretanto, a maioria dos compostos identificados até o momento não são apropriados para terapia para AME por longos períodos devido às suas propriedades farmacológicas desfavoráveis, incluindo toxicidade e outros efeitos indesejados (Wirth *et al.*, 2006b).

1.5. Justificativa

A AME é estimada como a segunda doença genética de herança autossômica recessiva mais frequente, ficando atrás apenas da fibrose cística. Além disso, ela é a principal causa genética de morte infantil. A análise molecular para a detecção de deleções e conversões no gene SMN1, situação que ocorre na grande maioria dos pacientes com AME, é uma forma efetiva para confirmar o diagnóstico em pacientes com suspeita clínica da doença. A metodologia geralmente empregada para isso é a análise por PCR-RFLP. Apesar do método PCR-RFLP ser específico e preciso para o diagnóstico molecular de AME, ele envolve várias etapas em sequência, o que torna essa metodologia trabalhosa e demorada. Além disso, este método necessita uma maior quantidade de amostra, o que pode ser um problema, considerando que grande parte dos pacientes são crianças recém-nascidas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Desenvolver um protocolo, baseado no sistema *TaqMan*[®], para analisar os genes SMN1 e SMN2 de pacientes com suspeita clínica de AME e compará-lo com a metodologia de PCR-RFLP.

2.2. Objetivos específicos

- Introduzir uma metodologia por PCR em tempo real baseada no sistema *TaqMan*[®] para a amplificação e detecção dos genes SMN1 e SMN2;
- Analisar as amostras de pacientes com suspeita clínica de AME pela nova metodologia e pela técnica de PCR-RFLP;
- Comparar os resultados obtidos nas duas metodologias e verificar a precisão da técnica desenvolvida.
- Identificar pacientes com AME homozigotos para a ausência do gene SMN1 na amostra analisada e estimar a frequência de eventos de conversão gênica nesses pacientes por sequenciamento direto de DNA;
- Verificar, através de dados clínicos disponíveis, a distribuição dos pacientes identificados e a ocorrência de conversão entre as três formas clínicas de AME.

PARTE II

CAPÍTULO I

Os resultados do presente trabalho estão apresentados a seguir na forma de um manuscrito que será submetido para publicação na revista *BMC Medical Genetics*, cujas instruções se encontram em anexo.

Development and application of a protocol based on TaqMan[®] real time PCR for the molecular diagnosis of spinal muscular atrophy patients.

Fernanda Marques de Souza Godinho^{1,2}, Hugo Bock^{1,2}, Maria Luiza Saraiva-Pereira^{1,2,§}

¹Laboratório de Identificação Genética, Centro de Pesquisa Experimental e Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil;

²Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil;

[§]Corresponding author

Email addresses:

FMSG: fernandamsg@yahoo.com.br

HB: hugohu2@yahoo.com.br

MLSP: mlpereira@hcpa.ufrgs.br

ABSTRACT

Background: Spinal muscular atrophy (SMA) is an autosomal recessive hereditary disorder caused by alterations of the survival of motor neuron I (*SMN1*). SMA patients are classified in type I–III SMA based on the severity of symptoms and age of onset. About 95% of SMA cases are caused by homozygous absence of the *SMN1*, due a deletion or a conversion into *SMN2*. PCR-based methods have been widely used in genetic testing for SMA. In this work, we develop a TaqMan[®] real time PCR method and compared with the most commonly used PCR restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) assay, in order to evaluate the potential application of the new protocol in direct DNA testing.

Methods: DNA samples of 100 individuals with clinical suspicious of SMA were analyzed by PCR-RFLP and TaqMan[®] real time PCR assay.

Results: We identified 58 patients (58%) that are homozygous for the absence of *SMN1* exon 7, being most cases due to gene deletion and eight cases due to gene conversion. We classified 56 confirmed SMA patients according to the revised diagnostic criteria for SMA and found that 26 (46.4 %) type I SMA patients, 16 (28.6 %) type II SMA patients, and 14 (25.0 %) type III SMA patients. Additionally, we observed 8 cases of gene conversion that were 4 cases of type I, 3 cases of type II and 1 case of type I SMA patients. Among the remaining individuals we detected 5 homozygous samples for absence of *SMN2* gene.

Conclusion: Protocol described here is precise and specific when comparing to PCR-RFLP. However the TaqMan[®] assay was faster and more sensitive and was shown to be suitable for the diagnosis of SMA.

BACKGROUND

Spinal muscular atrophy (SMA) is a genetic disorder characterized by symmetric proximal muscle weakness due to a degeneration of the anterior horn cells of the spinal cord [1]. SMA is an autosomal recessive disease with a prevalence of 1 in 10,000 and a carrier incidence of 1 in 50 [2]. SMA is classified into three clinical types [3, 4]. Type I [Werdnig-Hoffman disease, Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) 253300], the most severe form, is characterized by muscle weakness and hypotonia within the first days/months of life, resulting in death before the age of 2 years. Type II (OMIM 253550) is characterized by proximal muscle weakness with onset before the age of 18 months, inability to walk, and variable survival. Type III (Kugelberg–Welander disease, OMIM 253400) shows proximal muscle weakness after the age of 18 months with survival to the adulthood.

The genomic locus of the disease is at 5q11.2-q13.3 within a region characterized by a large inverted duplication of 500 kb element [5]. Included in this region is the SMA-determining gene, the survival motor neuron gene (*SMN*), which is also duplicated and both copies are expressed [6]. The two *SMN* are highly homologous and differ by a few nucleotides changes within their 3' regions. These differences in exons 7 and 8 are used to distinguish the telomeric (*SMN1*, OMIM 600354) from the centromeric *SMN* copy (*SMN2*, OMIM 601627) in DNA analysis [7]. Despite the high homology between these two genes, just *SMN1* is required for the survival of motor neurons. In about 95% of patients, the pathogenic mutation consists of homozygous functional absence of exon 7 and 8, or only exon 7, of the *SMN1* gene due to deletion or conversion to *SMN2*, respectively [5, 8-12]. The remaining cases are compound heterozygotes for a deletion/conversion of one *SMN1* allele and a small intragenic mutation of

the other allele, or more rarely, intragenic mutations in both alleles [13]. *SMN2* is present in all patients but is unable to fully compensate for loss of *SMN1*. A transition 840C>T in exon 7 leads to exon skipping [14, 15]. As a result, most transcripts from *SMN2* lack exon 7, and the resultant truncated protein appears biochemically unstable and is rapidly degraded *in vivo* [16, 17]. *SMN2* is unrelated to the disease and deletion of both *SMN2* alleles occurs in about 5–10% of unaffected individuals [18]. Nevertheless, *SMN2* is considered a disease-modifying gene because its copy number relates with the disease severity and survival of affected patients [12, 13, 19, 20].

Direct DNA testing for detecting homozygous *SMN1* loss is an effective method for molecular diagnosis of SMA patients and has been widely used for confirmation of clinical diagnosis. Because the vast majority of symptomatic SMA patients are homozygous for *SMN1* exon 7 deletion/conversion, almost all genetic tests for SMA are designed to identify the homozygous absence of *SMN1* exon 7. Although single-strand conformation polymorphism (SSCP) [21] and sequencing can be employed, the polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) assay is currently one of the most commonly used methods [22]. This test is well established and is routinely performed in our laboratory. In this study, we develop a method based on real time TaqMan[®] PCR technology for the detection of SMA patients that are homozygous for *SMN1* gene absence. This method was based upon the fact that *SMN1* exon 7 differs from *SMN2* exon 7 by a single nucleotide change, and specific probes will only detect *SMN1* or *SMN2* sequence. We compared this test with the PCR-RFLP method and evaluate benefits and drawbacks such as specificity, sensitivity, and sample processing time.

METHODS

Subjects and DNA samples

We included in our study 100 unrelated individuals referred to Medical Genetics Service of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) for genetic investigation due to clinical features of SMA. Majority of cases (80) were born in Rio Grande do Sul state while 18 were from other states of Brazil and two were from Bolivia. The study was approved by the ethic committee of HCPA.

Genomic DNA were isolated from peripheral blood by the salting-out procedure [23]. DNA concentration was estimated by Quant-iT™ ds DNA BR Assay kit (Invitrogen, Carlsbad, USA) in the Qubit (Invitrogen, Carlsbad, USA). DNA was then diluted to 50 ng/μl and 10 ng/μl in water. Controls' samples were also used throughout the study. These samples were (1) a individual with the presence of both *SMN* genes, (2) a homozygous for the absence of the *SMN2* gene, and (3) a homozygous for the absence of the *SMN1* gene.

PCR-RFLP analysis

The presence or absence of exons 7 and 8 of *SMN1* and *SMN2* genes of DNA samples was firstly determined by PCR-RFLP analysis as previously described [22]. PCR amplification of exons 7 and 8 of *SMN* genes was carried out in a total volume of 25 μl containing 200 μM of each dNTP, 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 800 nM of each

primer, 1,5 mM MgCl₂, 1,25 U *Taq* DNA polymerase, 100 ng of genomic DNA. In the PCR amplification of exon 8, 4% (v/v) of dimethylsulfoxide (DMSO) was also added in the analysis. Amplification conditions were initial denaturation at 94°C for 10 minutes, then 32 cycles of denaturation at 94°C for 1 minute, annealing at 57°C (exon 7)/58°C (exon 8) for 1 minute and extension at 72°C for 1 minute, followed by a final extension at 72°C for 10 minutes. Exon 7 was amplified with a forward intron 6 primer named R111 [5] and a mismatched reverse exon 7 primer named *X7-Dra* [22], that creates a *Dra* I restriction site in the *SMN2* product. Exon 8 was amplified with a forward primer named 541C960 and a reverse primer named 541C1120 [5]. Both PCR products were subsequently digested with *Dde* I that produce smaller fragments when acting on *SMN2* product. The digestion reactions were performed with 10 units of restriction enzymes, *Dra* I for the exon 7 and *Dde* I for the exon 8, at 37°C for at least 2 hours. Digested PCR products were analyzed by electrophoresis in a 3% (w/v) agarose gel and visualized by ethidium bromide staining under UV light.

TaqMan[®] analysis

Probes and primers were designed using the Primer Express[®] Software v.3.0 (Applied Biosystems, Foster City, USA). *SMN1* and *SMN2* specific probes were labeled with 6FAM[™] and NED[™] fluorescein dye at the 5' end respectively using the position +6 in exon 7 as the target nucleotide. Both probes contain a minor groove binder (MGB) and a nonfluorescent quencher (NFQ) at the 3' end. Sequences of primers and probes are shown in table 1.

PCR was carried out in the 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, USA) using a 96-well format. PCR reaction for detection of *SMN1* exon 7 was performed in a total volume of 12 μ l, containing 6 μ l of TaqMan[®] Genotyping PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, USA), 900 nM of each primer, 250 nM of *SMN1*ex7 probe, 0,3 μ l of Eukaryotic 18S rRNA TaqMan[®] Endogenous Control (VIC[®]/MGB Probe, Primer Limited; Applied Biosystems, Foster City, USA) and 20 ng of genomic DNA. Amplification was performed as follows: activation of AmpErase[®] UNG function at 50°C for 2 min, AmpliTaq Gold[®] activation at 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of melt at 95°C for 15 s, and annealing/extension at 62 °C for 1 min. For *SMN2* exon 7, we used *SMN2*ex7-anti probe and same amplification conditions, except for an annealing/extension temperature of 60°C.

DNA samples of homozygous patients for *SMN1* or *SMN2* deletions were analyzed for the respective probes in order to estimate the influence of cross hybridizations between the *SMN1* and *SMN2* genes and respective probes. In order to monitor PCR efficiency we added an internal control in each well. This control was Eukaryotic 18S rRNA gene (Part No. 4319413E) (Applied Biosystems, Foster City, USA) and amplification was also monitored. Amplification data were analyzed using the Sequence Detection Software v.1.4.0 (Applied Biosystems, Foster City, USA).

Direct DNA sequencing

Controls' samples with different genotypes detected by PCR-RFLP (in the previous analysis) were submitted to PCR amplification and direct DNA sequencing to validate our protocols. In addition, we confirmed samples from SMA patients showing a conversion profile, with absence only of the *SMN1* exon 7 and not the *SMN1* exon 8, by direct DNA sequencing.

Exon 7 and exon 8 of *SMN* genes were amplified using same primers used in PCR-RFLP analysis. Amplification conditions used were also the same except for primer concentration that was 600 nM of each primer instead of 800 nM, and DNA quantity, 50 ng instead of 100 ng. Following PCR amplification, samples were purified using 2.5 U of Exonuclease I (USB Corporation, Cleveland, USA) and 0.25 U of Shrimp Alkaline Phosphatase (USB Corporation, Cleveland, USA) at 37°C for 30 minutes and 80°C for 15 minutes. Purified amplicons were sequenced with BigDye[®] Terminator v.3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, USA) according to manufacturer's recommendations. Sequencing products were purified by ethanol/ethylenediamine tetracetic acid (EDTA) precipitation, resuspended in formamide solution, separated by capillary electrophoresis in the ABI Prism 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, USA) and analyzed with Sequencing Analysis Software v.5.3.1 (Applied Biosystems, Foster City, USA).

RESULTS

TaqMan[®] analysis

The proposed TaqMan[®] analysis was introduced and applied to a series of DNA samples from patients with clinical features of SMA. The simultaneous amplification in each of the internal control prevented the occurrence of false positives. The standardization was performed through control DNA samples of each profile detect in PCR-RFLP analysis. Controls were submitted to direct DNA sequencing, the gold standard in confirming nucleotide sequence, to confirm genotypes (data not shown). Control DNA samples were used for the establishment of each TaqMan[®] assay. Besides, the method purpose here was compared to results of previously applied PCR-RFLP analysis and a full concordance was observed.

TaqMan[®] analysis *versus* PCR-RFLP

After establishment of the TaqMan[®] assay and analysis of all samples by both procedures, we evaluated the two methods according to some aspects. The complexity of the procedures was considering taking into account different protocol steps and duration of each procedure was estimated. We found that both methods are accurate and reproducible for detection of homozygous *SMN1* loss and molecular diagnosis of the vast majority of SMA patients. After the optimization step, TaqMan[®] analysis was considerably faster than PCR-RFLP analysis. Another advantage of the TaqMan[®] assay was the higher sensitivity achieved

by the technique that allows the use of a smaller DNA quantity, 20 ng instead of 100 ng required by PCR-RFLP. The PCR-RFLP analysis requires a larger number of steps and therefore greater sample manipulation. After amplification, PCR products are analyzed by electrophoresis, followed by RFLP and another step of resolving generated fragments again by electrophoresis. This means that a result is hard to be produced within a day while the TaqMan[®] assay is able produce a result within 3 or 4 hours.

Analysis of *SMN* genes in DNA samples

We analyzed 100 DNA samples by both methods (table 2) and found 58 (58.0%) homozygous for absence of *SMN1* exon 7. Besides the detection of SMA patients through the analysis of exon 7 in this work we also evaluated exon 8 of the *SMN* genes by PCR-RFLP analysis. Analysis of exon 8 demonstrated the presence of this exon in *SMN1* in 8 of the confirmed SMA patients (13.8%), indicating the occurrence of gene conversion events in these patients. One of these patients shows a homozygous deletion of *SMN2* exon 8. Moreover, we found 5 individuals among the 42 remaining individuals with complete deletion of the *SMN2* gene. A representation of the result obtained in each method is illustrated in figures 1 and 2.

We classify 56 confirmed SMA patients according to the revised diagnostic criteria for SMA advocated by the European Neuro Muscular Centre (ENMC) [3, 4], which depend upon age of onset and achievable motor milestones. Two patients could not be classified due to lack of clinical information. We have then found 26 (46.4%) type I SMA patients, 16 (28.6%) type II SMA patients and 14 (25.0%) type III SMA patients. Additionally, we observed 8 cases of gene conversion (4 SMA type III, 3 SMA type II and 1 SMA type I patient).

DISCUSSION

Molecular analysis to detect the absence of *SMN1* has been proven to be a specific tool for diagnosis of SMA patients [2, 7, 8, 10, 11, 21]. PCR-RFLP assay is still currently one of the most commonly used methods in the genetic testing for SMA [22]. This approach was proven to be highly specific and sensitive previously [24]. In this study, we present the development and implementation of a protocol based on the real time TaqMan[®] PCR for the molecular diagnosis of SMA. Final PCR products are both *SMN1* and *SMN2* genes, but probes only detect *SMN1* exon 7 or *SMN2* exon 7 in each assay, due to a single nucleotide difference between *SMN1* exon 7 and *SMN2* exon 7. In case of a homozygous absence of *SMN1* or *SMN2*, no PCR product would be generated in their respective assay.

Comparing PCR-RFLP and TaqMan[®] methods, we found that the last one is considerably faster and requires smaller DNA amounts than PCR-RFLP. These aspects become particularly relevant in the diagnosis of patients with SMA type I, which is frequently investigated in newborns. An assay more analytically sensitive of these patients is required when the available DNA quantity is small. TaqMan[®] assay provides a simple and fast diagnosis in urgent cases. PCR-RFLP method consists of multi-step protocol that is more time-consuming.

Results obtained by TaqMan[®] assay were exactly the same as those results from conventional PCR-RFLP. Then we were able to confirmed 58 patients with SMA. In the remaining patients, occurrence of intragenic mutations cannot be ruled out once these sequence variations correspond to about 4% of patients in some studies [7, 25-27]. Using available clinical data, we were also able to divide confirmed SMA patients according to

clinical types, being type I SMA the most frequent in this sample, followed by type II and type III. SMA type I is in general the more frequent form of the disease in studies carried out worldwide [7-9, 11, 13]. We have also identified 8 cases of gene conversion, which represents 13.8% of confirmed patients. This frequency is in agreement with a previous study where conversion events were found in 12% of SMA patients [9]. As expected, these conversion events in our sample occurred in milder patients with SMA type II or type III. Conversion events were represented by 28.6% of SMA type III patients and by 18.8% from SMA type II patients. These results endorse the fact that an increase in the number of SMN2 copies, in this case resulting from conversion of SMN2 into SMN1 copies, is responsible for a less severe phenotype in SMA patients [12, 19, 28-31]. Only a case of gene conversion was detected in a SMA type I patient, but this sample has also shown homozygous deletions of *SMN2* exon 8, which may be the cause of occurring a more severe phenotype. In addition, we have found 5 homozygous individuals for the absence of *SMN2* gene.

CONCLUSIONS

We describe here a new protocol based on the TaqMan[®] system that was compared to PCR-RFLP, the most commonly used method for molecular diagnosis of SMA patients. Both methods were demonstrated to be specific and precise to the detection of homozygous samples for the absence of SMN1 gene exon 7, a situation that can be found in the great majority of SMA patients. However, the new TaqMan[®] system was shown to be simpler, faster and more sensitive than PCR-RFLP. Therefore, the procedure described here can be successfully applied to cases that limited amount of biological sample is available as well as to cases that a result is required within a short period of time.

COMPETING INTERESTS

The authors declare that they have no competing interests.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

The contributors are listed in the parentheses: study concept and design (FMSG and MLSP), acquisition of data (FMSG and HB), analysis and interpretation of data (FMSG and HB), drafting of the manuscript (FMSG), critical revision of the manuscript for important intellectual content (MLSP), obtaining of funding (MLSP) and study supervision (MLSP).

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to patients and their families for providing biological material for this study. We would also like to thank the physicians of the Medical Genetics Service of HCPA, who referred patients and provide clinical information of SMA patients. FMSG was supported by CAPES and MLSP is supported by CNPq. This research was supported by Brazilian Funding Agencies (CNPq, CAPES, FAPERGS, FIPE-HCPA).

REFERENCES

1. Wirth B, Brichta L, Hahnen E: **Spinal muscular atrophy: from gene to therapy.** *Semin Pediatr Neurol* 2006, **13**(2):121-131.
2. Ogino S, Wilson RB: **Genetic testing and risk assessment for spinal muscular atrophy (SMA).** *Hum Genet* 2002, **111**(6):477-500.
3. 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**(4):272-278.
4. Zerres K, Rudnik-Schoneborn S: **Natural history in proximal spinal muscular atrophy. Clinical analysis of 445 patients and suggestions for a modification of existing classifications.** *Arch Neurol* 1995, **52**(5):518-523.
5. Lefebvre S, Burglen L, Reboullet S, Clermont O, Burlet P, Viollet L, Benichou B, Cruaud C, Millasseau P, Zeviani M *et al*: **Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene.** *Cell* 1995, **80**(1):155-165.
6. Burglen L, Lefebvre S, Clermont O, Burlet P, Viollet L, Cruaud C, Munnich A, Melki J: **Structure and organization of the human survival motor neurone (SMN) gene.** *Genomics* 1996, **32**(3):479-482.
7. Wirth B: **An update of the mutation spectrum of the survival motor neuron gene (SMN1) in autosomal recessive spinal muscular atrophy (SMA).** *Hum Mutat* 2000, **15**(3):228-237.
8. Cobben JM, van der Steege G, Grootsholten P, de Visser M, Scheffer H, Buys CH: **Deletions of the survival motor neuron gene in unaffected siblings of patients with spinal muscular atrophy.** *Am J Hum Genet* 1995, **57**(4):805-808.
9. Hahnen E, Forkert R, Marke C, Rudnik-Schoneborn S, Schonling J, Zerres K, Wirth B: **Molecular analysis of candidate genes on chromosome 5q13 in autosomal recessive spinal muscular atrophy: evidence of homozygous deletions of the SMN gene in unaffected individuals.** *Hum Mol Genet* 1995, **4**(10):1927-1933.
10. Simard LR, Rochette C, Semionov A, Morgan K, Vanasse M: **SMN(T) and NAIP mutations in Canadian families with spinal muscular atrophy (SMA): genotype/phenotype correlations with disease severity.** *Am J Med Genet* 1997, **72**(1):51-58.
11. Velasco E, Valero C, Valero A, Moreno F, Hernandez-Chico C: **Molecular analysis of the SMN and NAIP genes in Spanish spinal muscular atrophy (SMA) families and correlation between number of copies of cBCD541 and SMA phenotype.** *Hum Mol Genet* 1996, **5**(2):257-263.
12. Burghes AH: **When is a deletion not a deletion? When it is converted.** *Am J Hum Genet* 1997, **61**(1):9-15.
13. Wirth B, Herz M, Wetter A, Moskau S, Hahnen E, Rudnik-Schoneborn S, Wienker T, Zerres K: **Quantitative analysis of survival motor neuron copies: identification of subtle SMN1 mutations in patients with spinal muscular atrophy, genotype-**

- phenotype correlation, and implications for genetic counseling.** *Am J Hum Genet* 1999, **64**(5):1340-1356.
14. Cartegni L, Hastings ML, Calarco JA, de Stanchina E, Krainer AR: **Determinants of exon 7 splicing in the spinal muscular atrophy genes, SMN1 and SMN2.** *Am J Hum Genet* 2006, **78**(1):63-77.
 15. Lorson CL, Hahnen E, Androphy EJ, Wirth B: **A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, **96**(11):6307-6311.
 16. Chang HC, Hung WC, Chuang YJ, Jong YJ: **Degradation of survival motor neuron (SMN) protein is mediated via the ubiquitin/proteasome pathway.** *Neurochem Int* 2004, **45**(7):1107-1112.
 17. Vitte J, Fassier C, Tiziano FD, Dalard C, Soave S, Roblot N, Brahe C, Saugier-Weber P, Bonnefont JP, Melki J: **Refined characterization of the expression and stability of the SMN gene products.** *Am J Pathol* 2007, **171**(4):1269-1280.
 18. Gerard B, Ginet N, Matthijs G, Evrard P, Baumann C, Da Silva F, Gerard-Blanluet M, Mayer M, Grandchamp B, Elion J: **Genotype determination at the survival motor neuron locus in a normal population and SMA carriers using competitive PCR and primer extension.** *Hum Mutat* 2000, **16**(3):253-263.
 19. Feldkotter M, Schwarzer V, Wirth R, Wienker TF, Wirth B: **Quantitative analyses of SMN1 and SMN2 based on real-time lightCycler PCR: fast and highly reliable carrier testing and prediction of severity of spinal muscular atrophy.** *Am J Hum Genet* 2002, **70**(2):358-368.
 20. McAndrew PE, Parsons DW, Simard LR, Rochette C, Ray PN, Mendell JR, Prior TW, Burghes AH: **Identification of proximal spinal muscular atrophy carriers and patients by analysis of SMNT and SMNC gene copy number.** *Am J Hum Genet* 1997, **60**(6):1411-1422.
 21. Semprini S, Tacconelli A, Capon F, Brancati F, Dallapiccola B, Novelli G: **A single strand conformation polymorphism-based carrier test for spinal muscular atrophy.** *Genet Test* 2001, **5**(1):33-37.
 22. van der Steege G, Grootscholten PM, van der Vlies P, Draaijers TG, Osinga J, Cobben JM, Scheffer H, Buys CH: **PCR-based DNA test to confirm clinical diagnosis of autosomal recessive spinal muscular atrophy.** *Lancet* 1995, **345**(8955):985-986.
 23. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF: **A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells.** *Nucleic Acids Res* 1988, **16**(3):1215.
 24. Xu R, Ogino S, Lip V, Fang H, Wu BL: **Comparison of PCR-RFLP with allele-specific PCR in genetic testing for spinal muscular atrophy.** *Genet Test* 2003, **7**(4):277-281.
 25. Sun Y, Grimmer M, Schwarzer V, Schoenen F, Fischer U, Wirth B: **Molecular and functional analysis of intragenic SMN1 mutations in patients with spinal muscular atrophy.** *Hum Mutat* 2005, **25**(1):64-71.
 26. Ogino S, Wilson RB: **Spinal muscular atrophy: molecular genetics and diagnostics.** *Expert Rev Mol Diagn* 2004, **4**(1):15-29.
 27. Zapletalova E, Hedvicakova P, Kozak L, Vondracek P, Gaillyova R, Marikova T, Kalina Z, Juttnerova V, Fajkus J, Fajkusova L: **Analysis of point mutations in the**

- SMN1 gene in SMA patients bearing a single SMN1 copy.** *Neuromuscul Disord* 2007, **17**(6):476-481.
28. Prior TW, Swoboda KJ, Scott HD, Hejmanowski AQ: **Homozygous SMN1 deletions in unaffected family members and modification of the phenotype by SMN2.** *Am J Med Genet A* 2004, **130A**(3):307-310.
29. Watihayati MS, Fatemeh H, Marini M, Atif AB, Zahiruddin WM, Sasongko TH, Tang TH, Zabidi-Hussin ZA, Nishio H, Zilfalil BA: **Combination of SMN2 copy number and NAIP deletion predicts disease severity in spinal muscular atrophy.** *Brain Dev* 2009, **31**(1):42-45.
30. Wirth B, Brichta L, Schrank B, Lochmuller H, Blick S, Baasner A, Heller R: **Mildly affected patients with spinal muscular atrophy are partially protected by an increased SMN2 copy number.** *Hum Genet* 2006, **119**(4):422-428.
31. Hahnen E, Schonling J, Rudnik-Schoneborn S, Zerres K, Wirth B: **Hybrid survival motor neuron genes in patients with autosomal recessive spinal muscular atrophy: new insights into molecular mechanisms responsible for the disease.** *Am J Hum Genet* 1996, **59**(5):1057-1065.

FIGURE LEGENDS

Figure 1 - PCR-RFLP analysis of exons 7 and 8. Products were resolved by electrophoresis in 3% (w/v) agarose gel. A) Exon 7 - Lane 1: absence of *SMN1* (indicative of SMA), lanes 2 and 4: presence of exon 7 in at least one allele of the *SMN1* and *SMN2* genes, lane 3: absence of *SMN2*, lane 5: 100 bp molecular marker. B) Exon 8 - Lane 1: 100 bp molecular marker, lane 2: absence of *SMN1*, lanes 3 and 5: presence of exon 8 in at least one allele of *SMN1* and *SMN2* genes, lane 4: absence of *SMN2*.

Figure 2 - TaqMan[®] assay of *SMN1* gene. The sample 1 is a DNA sample of an individual with the *SMN1* gene present, which show *SMN1* and internal control 18S amplification. The sample 2 is a DNA sample of a patient with the *SMN1* absent (indicative of SMA), which only show the amplification of the internal control 18S. The other lines without amplification represent the negative control.

TABLES

Table 1. Primers and probes used for *SMN1* and *SMN2* detection by TaqMan[®] analysis

Component	Sequence (5' > 3')	Position
Primers		
<i>SMNex7-F</i>	AAT GCT TTT TAA CAT CCA TAT AAA GC	nt 117-142
<i>SMNex7-R</i>	CTT AAT TTA AGG AAT GTG AGC ACC	nt 237-260
Probes		
<i>SMN1ex7</i>	6FAM-CAG GGT TTC* AGA CAA A-MGB-NFQ	nt 206-221
<i>SMN2ex7-anti</i>	NED-ATT TTG TCT A*AA ACC C-MGB-NFQ	nt 208-223

* denotes specific nucleotides that identify *SMN1* or *SMN2* alleles.

Table 2. Analysis of SMN genes in DNA samples

Clinical subtype			NC	RP	SMN1		SMN2		Total
I	II	III			exon 7	exon 8	exon 7	exon 8	
n = 26 (%)	n = 16 (%)	n = 14 (%)	n = 2 (%)	n = 42 (%)					n = 100 (%)
25 (96.2)	13 (81.2)	10 (71.4)	2 (100)	-	A	A	P	P	50 (50)
0	3 (18.8)	4 (28.6)	0	-	A	P	P	P	7 (7)
1 (3.8)	0	0	0	-	A	P	P	A	1 (1)
-	-	-	-	5 (11.9)	P	P	A	A	5 (5)
-	-	-	-	37 (88.1)	P	P	P	P	37 (37)

NC = samples of patients not classified due to lack of clinical information; RP = samples of remained patients - SMA not confirmed;

A = absent; P = present

Figure 1

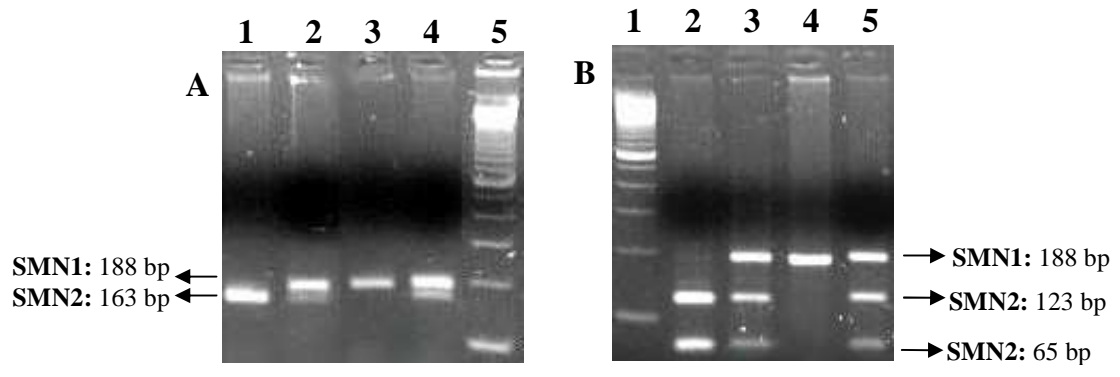
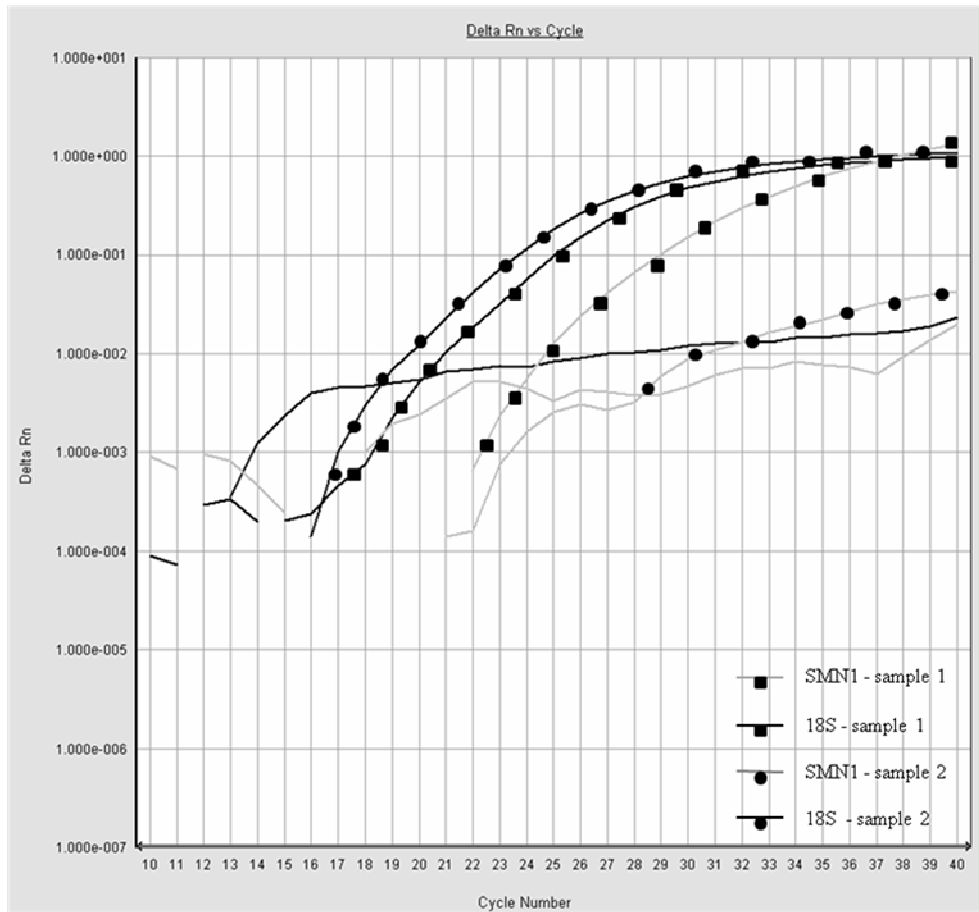


Figure 2



PARTE III

DISCUSSÃO

Análises moleculares que identificam amostras homozigotas para ausência do éxon 7 do gene SMN1, situação ocorre em cerca de 95% dos pacientes com AME, são eficazes e específicos para a confirmação do diagnóstico clínico desses pacientes com AME (Cobben *et al.*, 1995; Velasco *et al.*, 1996; Simard *et al.*, 1997; Wirth, 2000; Semprini *et al.*, 2001; Ogino e Wilson, 2002). A análise por PCR-RFLP, desenvolvida em 1995, é atualmente um dos métodos mais usados nos testes moleculares para a identificação de pacientes com AME (van der Steege *et al.*, 1995). O teste mostrou-se eficiente em um estudo que avaliou sua especificidade e sensibilidade (Xu *et al.*, 2003). O nosso estudo descreveu o estabelecimento de um protocolo baseado no sistema *TaqMan*[®] por PCR em tempo real para o diagnóstico molecular da AME. Nesse método, os produtos finais obtidos da reação de PCR são amplicons tanto do gene SMN1 quanto do SMN2, mas as sondas fluorescentes só se ligam e detectam o éxon 7 de um deles (SMN1 ou SMN2) em cada ensaio. Essa especificidade da sonda se deve à troca de um nucleotídeo nesse éxon que diferencia esses genes. A ocorrência de eventos de deleção ou conversão nos 2 alelos de algum dos genes foi observada nas amostras quando nenhum produto de PCR era detectado em seu respectivo ensaio.

Comparando a metodologia PCR-RFLP, que já estava estabelecida, com a metodologia usando o sistema *TaqMan*[®], padronizada nesse estudo, verificamos que a última é mais rápida e exige uma quantidade menor de DNA do que a análise por PCR-RFLP. Estes aspectos tornam-se particularmente relevantes no diagnóstico de pacientes com AME tipo I, que se manifesta em recém-nascidos. Um ensaio analítico mais sensível é necessário para esses pacientes quando a quantidade de DNA disponível é pequena. O ensaio *TaqMan*[®]

fornece um diagnóstico simples e rápido em casos urgentes. O método de PCR-RFLP consiste em um protocolo mais complexo com um número maior de etapas, um tempo maior de processamento e maior manipulação da amostra. Além disso, este método requer uma etapa de digestão enzimática, e a digestão incompleta dos produtos de PCR pode resultar em resultados falso-negativos.

Nesse estudo 100 amostras de indivíduos que apresentavam sintomas e suspeita clínica de AME foram analisados por ambos os métodos. Os resultados obtidos pelo método *TaqMan*[®] foram iguais aos resultados obtidos pela análise convencional por PCR-RFLP. Entre os 100 indivíduos, 58 foram identificados como homocigotos para ausência do éxon 7 do gene SMN1, confirmando a suspeita clínica inicial. Nos pacientes restantes, ainda existe a possibilidade de ocorrência de mutações de ponto, o que corresponde a cerca de 4% dos pacientes em alguns estudos (Wirth, 2000; Ogino e Wilson, 2004; Sun *et al.*, 2005; Zapletalova *et al.*, 2007). A partir dos dados clínicos disponíveis, os pacientes confirmados com AME foram classificados nas três formas clínicas descritas nesse trabalho. Conforme esperado, pacientes do tipo I foram mais frequentemente encontrados na amostra estudada, seguido por pacientes tipo II e pacientes com o tipo III da doença foram menos frequente. A AME tipo I também foi a forma clínica mais encontrada em outros estudos (Cobben *et al.*, 1995; Hahnen *et al.*, 1995; Velasco *et al.*, 1996; Wirth *et al.*, 1999; Wirth, 2000).

Oito casos de conversão gênica de SMN1 para SMN2 foram encontrados entre os pacientes, o que representa 13,8% dos casos confirmados. Esta frequência está de acordo com um estudo anterior que encontrou essa situação em 12,0% dos pacientes com AME (Hahnen *et al.*, 1995). Como esperado, os eventos de conversão gênica ocorreram em pacientes com fenótipos menos graves na nossa amostra, classificados como tipos II e III. Entre os pacientes

com AME tipo III estudados, 28,6% apresentaram o evento de conversão e entre os pacientes com AME tipo II, o evento ocorreu em 18,8% dos pacientes. Estes resultados reafirmam o fato de que um aumento do número de cópias do gene SMN2, neste caso decorrente da conversão de cópias SMN1 para SMN2, é responsável por um fenótipo menos grave em pacientes com AME (Hahnen *et al.*, 1996; Burghes, 1997; Feldkotter *et al.*, 2002; Prior *et al.*, 2004; Wirth *et al.*, 2006b; Watihayati *et al.*, 2009). Apenas um caso de conversão gênica foi detectado em um paciente com AME tipo I. Porém, esta amostra apresentou também uma deleção do éxon 8 do gene SMN2, o que pode ser a causa desse fenótipo mais grave, apesar da ocorrência da conversão. Além disso, foram encontrados na amostra estudada cinco indivíduos homocigotos para ausência do gene SMN2.

CONCLUSÕES

As conclusões obtidas através deste estudo foram:

- ✓ O método de PCR em tempo real baseado no sistema *TaqMan*[®] mostrou-se adequado para detecção de homozigotos para a ausência do éxon 7 do gene SMN1, situação que ocorre na grande maioria dos pacientes com AME;
- ✓ A comparação das metodologias empregadas neste estudo mostrou que tanto a análise por RFLP quanto a análise por PCR em tempo real foram específicas e precisas na detecção de pacientes com AME, porém a segunda mostrou-se mais simples, rápida e sensível.
- ✓ Homozigotos para a ausência do éxon 7 do gene SMN1 foi identificado em 58 casos entre os 100 indivíduos analisados, confirmando a suspeita clínica inicial nesses pacientes.
- ✓ A AME tipo I foi a forma clínica mais frequente (46,5%) na nossa amostra 26 pacientes.
- ✓ Oito casos de conversão gênica de SMN1 para SMN2 foram identificados, sendo que a distribuição deles entre as formas clínicas foi a seguinte: 4 em pacientes com AME tipo III, 3 em pacientes com AME tipo II e em 1 paciente com AME tipo I.
- ✓ Homozigotos para a ausência do gene SMN2 foram detectados em 5 casos.

REFERÊNCIAS

- Andreassi C, Angelozzi C, Tiziano FD, Vitali T, De Vincenzi E, Boninsegna A, Villanova M, Bertini E, Pini A, Neri G, Brahe C (2004) Phenylbutyrate increases SMN expression in vitro: relevance for treatment of spinal muscular atrophy. *Eur J Hum Genet* 12(1):59-65.
- Anhuf D, Eggermann T, Rudnik-Schoneborn S, Zerres K (2003) Determination of SMN1 and SMN2 copy number using TaqMan technology. *Hum Mutat* 22(1):74-8.
- Arkblad EL, Darin N, Berg K, Kimber E, Brandberg G, Lindberg C, Holmberg E, Tulinius M, Nordling M (2006) Multiplex ligation-dependent probe amplification improves diagnostics in spinal muscular atrophy. *Neuromuscul Disord* 16(12):830-8.
- Baron-Delage S, Abadie A, Echaniz-Laguna A, Melki J, Beretta L (2000) Interferons and IRF-1 induce expression of the survival motor neuron (SMN) genes. *Mol Med* 6(11):957-68.
- Bechade C, Rostaing P, Cisterni C, Kalisch R, La Bella V, Pettmann B, Triller A (1999) Subcellular distribution of survival motor neuron (SMN) protein: possible involvement in nucleocytoplasmic and dendritic transport. *Eur J Neurosci* 11(1):293-304.
- Brichta L, Hofmann Y, Hahnen E, Siebzehrubl FA, Raschke H, Blumcke I, Eyupoglu IY, Wirth B (2003) Valproic acid increases the SMN2 protein level: a well-known drug as a potential therapy for spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 12(19):2481-9.
- Buhler D, Raker V, Luhrmann R, Fischer U (1999) Essential role for the tudor domain of SMN in spliceosomal U snRNP assembly: implications for spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 8(13):2351-7.
- Burghes AH (1997) When is a deletion not a deletion? When it is converted. *Am J Hum Genet* 61(1):9-15.
- Burghes AH, Beattie CE (2009) Spinal muscular atrophy: why do low levels of survival motor neuron protein make motor neurons sick? *Nat Rev Neurosci* 10(8):597-609.
- Burglen L, Lefebvre S, Clermont O, Burlet P, Viollet L, Cruaud C, Munnich A, Melki J (1996) Structure and organization of the human survival motor neurone (SMN) gene. *Genomics* 32(3):479-82.
- Bussaglia E, Clermont O, Tizzano E, Lefebvre S, Burglen L, Cruaud C, Urtizberea JA, Colomer J, Munnich A, Baiget M, Melki J (1995) A frame-shift deletion in the survival motor neuron gene in Spanish spinal muscular atrophy patients. *Nat Genet* 11(3):335-7.
- Campbell L, Potter A, Ignatius J, Dubowitz V, Davies K (1997) Genomic variation and gene conversion in spinal muscular atrophy: implications for disease process and clinical phenotype. *Am J Hum Genet* 61(1):40-50.
- Cartegni L, Hastings ML, Calarco JA, de Stanchina E, Krainer AR (2006) Determinants of exon 7 splicing in the spinal muscular atrophy genes, SMN1 and SMN2. *Am J Hum Genet* 78(1):63-77.

- Cartegni L, Krainer AR (2002) Disruption of an SF2/ASF-dependent exonic splicing enhancer in SMN2 causes spinal muscular atrophy in the absence of SMN1. *Nat Genet* 30(4):377-84.
- Chang HC, Dimlich DN, Yokokura T, Mukherjee A, Kankel MW, Sen A, Sridhar V, Fulga TA, Hart AC, Van Vactor D, Artavanis-Tsakonas S (2008) Modeling spinal muscular atrophy in *Drosophila*. *PLoS One* 3(9):e3209.
- Chang HC, Hung WC, Chuang YJ, Jong YJ (2004) Degradation of survival motor neuron (SMN) protein is mediated via the ubiquitin/proteasome pathway. *Neurochem Int* 45(7):1107-12.
- Chang JG, Hsieh-Li HM, Jong YJ, Wang NM, Tsai CH, Li H (2001) Treatment of spinal muscular atrophy by sodium butyrate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(17):9808-13.
- Cifuentes-Diaz C, Frugier T, Tiziano FD, Lacene E, Roblot N, Joshi V, Moreau MH, Melki J (2001) Deletion of murine SMN exon 7 directed to skeletal muscle leads to severe muscular dystrophy. *J Cell Biol* 152(5):1107-14.
- Cobben JM, van der Steege G, Grootsholten P, de Visser M, Scheffer H, Buys CH (1995) Deletions of the survival motor neuron gene in unaffected siblings of patients with spinal muscular atrophy. *Am J Hum Genet* 57(4):805-8.
- Detich N, Bovenzi V, Szyf M (2003) Valproate induces replication-independent active DNA demethylation. *J Biol Chem* 278(30):27586-92.
- DiDonato CJ, Lorson CL, De Repentigny Y, Simard L, Chartrand C, Androphy EJ, Kothary R (2001) Regulation of murine survival motor neuron (Smn) protein levels by modifying Smn exon 7 splicing. *Hum Mol Genet* 10(23):2727-36.
- DiDonato CJ, Parks RJ, Kothary R (2003) Development of a gene therapy strategy for the restoration of survival motor neuron protein expression: implications for spinal muscular atrophy therapy. *Hum Gene Ther* 14(2):179-88.
- Farrar MA, Johnston HM, Grattan-Smith P, Turner A, Kiernan MC (2009) Spinal muscular atrophy: molecular mechanisms. *Curr Mol Med* 9(7):851-62.
- Feldkotter M, Schwarzer V, Wirth R, Wienker TF, Wirth B (2002) Quantitative analyses of SMN1 and SMN2 based on real-time lightCycler PCR: fast and highly reliable carrier testing and prediction of severity of spinal muscular atrophy. *Am J Hum Genet* 70(2):358-68.
- Gavrilina TO, McGovern VL, Workman E, Crawford TO, Gogliotti RG, DiDonato CJ, Monani UR, Morris GE, Burghes AH (2008) Neuronal SMN expression corrects spinal muscular atrophy in severe SMA mice while muscle-specific SMN expression has no phenotypic effect. *Hum Mol Genet* 17(8):1063-75.
- Gomez-Curet I, Robinson KG, Funanage VL, Crawford TO, Scavina M, Wang W (2007) Robust quantification of the SMN gene copy number by real-time TaqMan PCR. *Neurogenetics* 8(4):271-8.

- Grimmler M, Bauer L, Nousiainen M, Korner R, Meister G, Fischer U (2005) Phosphorylation regulates the activity of the SMN complex during assembly of spliceosomal U snRNPs. *EMBO Rep* 6(1):70-6.
- Grondard C, Biondi O, Armand AS, Lecolle S, Della Gaspera B, Pariset C, Li H, Gallien CL, Vidal PP, Chanoine C, Charbonnier F (2005) Regular exercise prolongs survival in a type 2 spinal muscular atrophy model mouse. *J Neurosci* 25(33):7615-22.
- Grzeschik SM, Ganta M, Prior TW, Heavlin WD, Wang CH (2005) Hydroxyurea enhances SMN2 gene expression in spinal muscular atrophy cells. *Ann Neurol* 58(2):194-202.
- Haddad H, Cifuentes-Diaz C, Miroglio A, Roblot N, Joshi V, Melki J (2003) Riluzole attenuates spinal muscular atrophy disease progression in a mouse model. *Muscle Nerve* 28(4):432-7.
- Hahnen E, Eyupoglu IY, Brichta L, Haastert K, Trankle C, Siebzehnrubl FA, Riessland M, Holker I, Claus P, Romstock J, Buslei R, Wirth B, Blumcke I (2006) In vitro and ex vivo evaluation of second-generation histone deacetylase inhibitors for the treatment of spinal muscular atrophy. *J Neurochem* 98(1):193-202.
- Hahnen E, Forkert R, Marke C, Rudnik-Schoneborn S, Schonling J, Zerres K, Wirth B (1995) Molecular analysis of candidate genes on chromosome 5q13 in autosomal recessive spinal muscular atrophy: evidence of homozygous deletions of the SMN gene in unaffected individuals. *Hum Mol Genet* 4(10):1927-33.
- Hahnen E, Schonling J, Rudnik-Schoneborn S, Zerres K, Wirth B (1996) Hybrid survival motor neuron genes in patients with autosomal recessive spinal muscular atrophy: new insights into molecular mechanisms responsible for the disease. *Am J Hum Genet* 59(5):1057-65.
- Helmken C, Hofmann Y, Schoenen F, Oprea G, Raschke H, Rudnik-Schoneborn S, Zerres K, Wirth B (2003) Evidence for a modifying pathway in SMA discordant families: reduced SMN level decreases the amount of its interacting partners and Htra2-beta1. *Hum Genet* 114(1):11-21.
- Hsieh-Li HM, Chang JG, Jong YJ, Wu MH, Wang NM, Tsai CH, Li H (2000) A mouse model for spinal muscular atrophy. *Nat Genet* 24(1):66-70.
- Jablonka S, Bandilla M, Wiese S, Buhler D, Wirth B, Sendtner M, Fischer U (2001) Co-regulation of survival of motor neuron (SMN) protein and its interactor SIP1 during development and in spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 10(5):497-505.
- Kashima T, Manley JL (2003) A negative element in SMN2 exon 7 inhibits splicing in spinal muscular atrophy. *Nat Genet* 34(4):460-3.
- Kerr DA, Nery JP, Traystman RJ, Chau BN, Hardwick JM (2000) Survival motor neuron protein modulates neuron-specific apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(24):13312-7.
- Kostova FV, Williams VC, Heemskerk J, Iannaccone S, Didonato C, Swoboda K, Maria BL (2007) Spinal muscular atrophy: classification, diagnosis, management, pathogenesis, and future research directions. *J Child Neurol* 22(8):926-45.

- Kugelberg E, Welander L (1956) Heredofamilial juvenile muscular atrophy simulating muscular dystrophy. *AMA Arch Neurol Psychiatry* 75(5):500-9.
- La Bella V, Cisterni C, Salaun D, Pettmann B (1998) Survival motor neuron (SMN) protein in rat is expressed as different molecular forms and is developmentally regulated. *Eur J Neurosci* 10(9):2913-23.
- Le TT, Pham LT, Butchbach ME, Zhang HL, Monani UR, Coover DD, Gavrilina TO, Xing L, Bassell GJ, Burghes AH (2005) SMN Δ 7, the major product of the centromeric survival motor neuron (SMN2) gene, extends survival in mice with spinal muscular atrophy and associates with full-length SMN. *Hum Mol Genet* 14(6):845-57.
- Lefebvre S, Burglen L, Frezal J, Munnich A, Melki J (1998) The role of the SMN gene in proximal spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 7(10):1531-6.
- Lefebvre S, Burglen L, Reboullet S, Clermont O, Burlet P, Viollet L, Benichou B, Cruaud C, Millasseau P, Zeviani M, Le Paslier D, Frézal J, Cohen D, Weissenbach J, Munnich A, Melki J (1995) Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell* 80(1):155-65.
- Lesbordes JC, Cifuentes-Diaz C, Miroglio A, Joshi V, Bordet T, Kahn A, Melki J (2003) Therapeutic benefits of cardiotrophin-1 gene transfer in a mouse model of spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 12(11):1233-9.
- Liu Q, Dreyfuss G (1996) A novel nuclear structure containing the survival of motor neurons protein. *EMBO J* 15(14):3555-65.
- Lorson CL, Hahnen E, Androphy EJ, Wirth B (1999) A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(11):6307-11.
- Lorson CL, Strasswimmer J, Yao JM, Baleja JD, Hahnen E, Wirth B, Le T, Burghes AH, Androphy EJ (1998) SMN oligomerization defect correlates with spinal muscular atrophy severity. *Nat Genet* 19(1):63-6.
- Lunn MR, Root DE, Martino AM, Flaherty SP, Kelley BP, Coover DD, Burghes AH, Man NT, Morris GE, Zhou J, Androphy EJ, Sumner CJ, Stockwell BR (2004) Indoprofen upregulates the survival motor neuron protein through a cyclooxygenase-independent mechanism. *Chem Biol* 11(11):1489-93.
- Lunn MR, Wang CH (2008) Spinal muscular atrophy. *Lancet* 371(9630):2120-33.
- Mailman MD, Hemingway T, Darsey RL, Glasure CE, Huang Y, Chadwick RB, Heinz JW, Papp AC, Snyder PJ, Sedra MS, Schafer RW, Abuelo DN, Reich EW, Theil KS, Burghes AH, de la Chapelle A, Prior TW (2001) Hybrids monosomal for human chromosome 5 reveal the presence of a spinal muscular atrophy (SMA) carrier with two SMN1 copies on one chromosome. *Hum Genet* 108(2):109-15.
- Matthijs G, Schollen E, Legius E, Devriendt K, Goemans N, Kayserili H, Apak MY, Cassiman JJ (1996) Unusual molecular findings in autosomal recessive spinal muscular atrophy. *J Med Genet* 33(6):469-74.

- Mattis VB, Rai R, Wang J, Chang CW, Coady T, Lorson CL (2006) Novel aminoglycosides increase SMN levels in spinal muscular atrophy fibroblasts. *Hum Genet* 120(4):589-601.
- McAndrew PE, Parsons DW, Simard LR, Rochette C, Ray PN, Mendell JR, Prior TW, Burghes AH (1997) Identification of proximal spinal muscular atrophy carriers and patients by analysis of SMNT and SMNC gene copy number. *Am J Hum Genet* 60(6):1411-22.
- McGovern VL, Gavrilina TO, Beattie CE, Burghes AH (2008) Embryonic motor axon development in the severe SMA mouse. *Hum Mol Genet* 17(18):2900-9.
- McWhorter ML, Monani UR, Burghes AH, Beattie CE (2003) Knockdown of the survival motor neuron (Smn) protein in zebrafish causes defects in motor axon outgrowth and pathfinding. *J Cell Biol* 162(5):919-31.
- Monani UR, Sendtner M, Coovert DD, Parsons DW, Andreassi C, Le TT, Jablonka S, Schrank B, Rossoll W, Prior TW, Morris GE, Burghes AH (2000) The human centromeric survival motor neuron gene (SMN2) rescues embryonic lethality in Smn(-/-) mice and results in a mouse with spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 9(3):333-9.
- Ogino S, Wilson RB (2002) Genetic testing and risk assessment for spinal muscular atrophy (SMA). *Hum Genet* 111(6):477-500.
- Ogino S, Wilson RB (2004) Spinal muscular atrophy: molecular genetics and diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn* 4(1):15-29.
- Pagliardini S, Giavazzi A, Setola V, Lizier C, Di Luca M, DeBiasi S, Battaglia G (2000) Subcellular localization and axonal transport of the survival motor neuron (SMN) protein in the developing rat spinal cord. *Hum Mol Genet* 9(1):47-56.
- Panozzo C, Frugier T, Cifuentes-Diaz C, Melki J (2001) Spinal Muscular Atrophy. In: Scriver CR BA, Sly W.S, Valle D, Childs B, Kinzler KE, Vogelstein B, (ed). *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. New York: McGraw-Hill:5833-5843.
- Patrizi AL, Tiziano F, Zappata S, Donati MA, Neri G, Brahe C (1999) SMN protein analysis in fibroblast, amniocyte and CVS cultures from spinal muscular atrophy patients and its relevance for diagnosis. *Eur J Hum Genet* 7(3):301-9.
- Pellizzoni L, Kataoka N, Charroux B, Dreyfuss G (1998) A novel function for SMN, the spinal muscular atrophy disease gene product, in pre-mRNA splicing. *Cell* 95(5):615-24.
- Prior TW, Swoboda KJ, Scott HD, Hejmanowski AQ (2004) Homozygous SMN1 deletions in unaffected family members and modification of the phenotype by SMN2. *Am J Med Genet A* 130A(3):307-10.
- Riessland M, Brichta L, Hahnen E, Wirth B (2006) The benzamide M344, a novel histone deacetylase inhibitor, significantly increases SMN2 RNA/protein levels in spinal muscular atrophy cells. *Hum Genet* 120(1):101-10.
- Rochette CF, Gilbert N, Simard LR (2001) SMN gene duplication and the emergence of the SMN2 gene occurred in distinct hominids: SMN2 is unique to Homo sapiens. *Hum Genet* 108(3):255-66.

- Rodrigues NR, Owen N, Talbot K, Ignatius J, Dubowitz V, Davies KE (1995) Deletions in the survival motor neuron gene on 5q13 in autosomal recessive spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 4(4):631-4.
- Rossoll W, Jablonka S, Andreassi C, Kroning AK, Karle K, Monani UR, Sendtner M (2003) Smn, the spinal muscular atrophy-determining gene product, modulates axon growth and localization of beta-actin mRNA in growth cones of motoneurons. *J Cell Biol* 163(4):801-12.
- Scarciolla O, Stuppia L, De Angelis MV, Murru S, Palka C, Giuliani R, Pace M, Di Muzio A, Torrente I, Morella A, Grammatico P, Giacanelli M, Rosatelli MC, Uncini A, Dallapiccola B (2006) Spinal muscular atrophy genotyping by gene dosage using multiple ligation-dependent probe amplification. *Neurogenetics* 7(4):269-76.
- Scheffer H, Cobben JM, Matthijs G, Wirth B (2001) Best practice guidelines for molecular analysis in spinal muscular atrophy. *Eur J Hum Genet* 9(7):484-91.
- Semprini S, Tacconelli A, Capon F, Brancati F, Dallapiccola B, Novelli G (2001) A single strand conformation polymorphism-based carrier test for spinal muscular atrophy. *Genet Test* 5(1):33-7.
- Simard LR, Rochette C, Semionov A, Morgan K, Vanasse M (1997) SMN(T) and NAIP mutations in Canadian families with spinal muscular atrophy (SMA): genotype/phenotype correlations with disease severity. *Am J Med Genet* 72(1):51-8.
- Singh NK, Singh NN, Androphy EJ, Singh RN (2006) Splicing of a critical exon of human Survival Motor Neuron is regulated by a unique silencer element located in the last intron. *Mol Cell Biol* 26(4):1333-46.
- Skordis LA, Dunckley MG, Yue B, Eperon IC, Muntoni F (2003) Bifunctional antisense oligonucleotides provide a trans-acting splicing enhancer that stimulates SMN2 gene expression in patient fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(7):4114-9.
- Sumner CJ (2007) Molecular mechanisms of spinal muscular atrophy. *J Child Neurol* 22(8):979-89.
- Sun Y, Grimmler M, Schwarzer V, Schoenen F, Fischer U, Wirth B (2005) Molecular and functional analysis of intragenic SMN1 mutations in patients with spinal muscular atrophy. *Hum Mutat* 25(1):64-71.
- van der Steege G, Grootsholten PM, Cobben JM, Zappata S, Scheffer H, den Dunnen JT, van Ommen GJ, Brahe C, Buys CH (1996) Apparent gene conversions involving the SMN gene in the region of the spinal muscular atrophy locus on chromosome 5. *Am J Hum Genet* 59(4):834-8.
- van der Steege G, Grootsholten PM, van der Vlies P, Draaijers TG, Osinga J, Cobben JM, Scheffer H, Buys CH (1995) PCR-based DNA test to confirm clinical diagnosis of autosomal recessive spinal muscular atrophy. *Lancet* 345(8955):985-6.

- Velasco E, Valero C, Valero A, Moreno F, Hernandez-Chico C (1996) Molecular analysis of the SMN and NAIP genes in Spanish spinal muscular atrophy (SMA) families and correlation between number of copies of cBCD541 and SMA phenotype. *Hum Mol Genet* 5(2):257-63.
- Vitte J, Fassier C, Tiziano FD, Dalard C, Soave S, Roblot N, Brahe C, Saugier-veber P, Bonnefont JP, Melki J (2007) Refined characterization of the expression and stability of the SMN gene products. *Am J Pathol* 171(4):1269-80.
- Wang CH, Xu J, Carter TA, Ross BM, Dominski MK, Bellcross CA, Penchaszadeh GK, Munsat TL, Gilliam TC (1996) Characterization of survival motor neuron (SMN2) gene deletions in asymptomatic carriers of spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 5(3):359-65.
- Watihayati MS, Fatemeh H, Marini M, Atif AB, Zahiruddin WM, Sasongko TH, Tang TH, Zabidi-Hussin ZA, Nishio H, Zilfalil BA (2009) Combination of SMN2 copy number and NAIP deletion predicts disease severity in spinal muscular atrophy. *Brain Dev* 31(1):42-5.
- Will CL, Luhrmann R (2001) Spliceosomal UsnRNP biogenesis, structure and function. *Curr Opin Cell Biol* 13(3):290-301.
- Wirth B (2000) An update of the mutation spectrum of the survival motor neuron gene (SMN1) in autosomal recessive spinal muscular atrophy (SMA). *Hum Mutat* 15(3):228-37.
- Wirth B, Brichta L, Hahnen E (2006a) Spinal muscular atrophy: from gene to therapy. *Semin Pediatr Neurol* 13(2):121-31.
- Wirth B, Brichta L, Schrank B, Lochmuller H, Blick S, Baasner A, Heller R (2006b) Mildly affected patients with spinal muscular atrophy are partially protected by an increased SMN2 copy number. *Hum Genet* 119(4):422-8.
- Wirth B, Herz M, Wetter A, Moskau S, Hahnen E, Rudnik-Schoneborn S, Wienker T, Zerres K (1999) Quantitative analysis of survival motor neuron copies: identification of subtle SMN1 mutations in patients with spinal muscular atrophy, genotype-phenotype correlation, and implications for genetic counseling. *Am J Hum Genet* 64(5):1340-56.
- Wirth B, Schmidt T, Hahnen E, Rudnik-Schoneborn S, Krawczak M, Muller-Myhsok B, Schonling J, Zerres K (1997) De novo rearrangements found in 2% of index patients with spinal muscular atrophy: mutational mechanisms, parental origin, mutation rate, and implications for genetic counseling. *Am J Hum Genet* 61(5):1102-11.
- Wolstencroft EC, Mattis V, Bajer AA, Young PJ, Lorson CL (2005) A non-sequence-specific requirement for SMN protein activity: the role of aminoglycosides in inducing elevated SMN protein levels. *Hum Mol Genet* 14(9):1199-210.
- Xu R, Ogino S, Lip V, Fang H, Wu BL (2003) Comparison of PCR-RFLP with allele-specific PCR in genetic testing for spinal muscular atrophy. *Genet Test* 7(4):277-81.
- Yong J, Wan L, Dreyfuss G (2004) Why do cells need an assembly machine for RNA-protein complexes? *Trends Cell Biol* 14(5):226-32.

- Zapletalova E, Hedvicakova P, Kozak L, Vondracek P, Gaillyova R, Marikova T, Kalina Z, Juttnerova V, Fajkus J, Fajkusova L (2007) Analysis of point mutations in the SMN1 gene in SMA patients bearing a single SMN1 copy. *Neuromuscul Disord* 17(6):476-81.
- Zerres K, Davies KE (1999) 59th ENMC International Workshop: Spinal Muscular Atrophies: recent progress and revised diagnostic criteria 17-19 April 1998, Soestduinen, The Netherlands. *Neuromuscul Disord* 9(4):272-8.
- Zhang HL, Pan F, Hong D, Shenoy SM, Singer RH, Bassell GJ (2003) Active transport of the survival motor neuron protein and the role of exon-7 in cytoplasmic localization. *J Neurosci* 23(16):6627-37.

ANEXOS

Instruções para a submissão de manuscrito para a revista *BMC Medical Genetics*.

INSTRUCTIONS FOR BMC MEDICAL GENETICS AUTHORS

Preparing main manuscript text

File formats

The following word processor file formats are acceptable for the main manuscript document:

- Microsoft Word (version 2 and above)
- Rich text format (RTF)
- Portable document format (PDF)
- TeX/LaTeX (use BioMed Central's TeX template)
- DeVice Independent format (DVI)
- Publicon Document (NB)

Users of other word processing packages should save or convert their files to RTF before uploading. Many free tools are available which ease this process.

TeX/LaTeX users: We recommend using BioMed Central's TeX template and BibTeX stylefile. If you use this standard format, you can submit your manuscript in TeX format (after you submit your TEX file, you will be prompted to submit your BBL file). If you have used another template for your manuscript, or if you do not wish to use BibTeX, then please submit your manuscript as a DVI file. We do not recommend converting to RTF.

Note that figures must be submitted as separate image files, not as part of the submitted DOC/PDF/TEX/DVI file.

Manuscript sections for Research articles

Manuscripts for Research articles submitted to *BMC Medical Genetics* should be divided into the following sections:

- Title page
- Abstract
- Background
- Methods
- Results
- Discussion
- Conclusions
- List of abbreviations used (if any)
- Competing interests
- Authors' contributions
- Authors' information (if any)
- Acknowledgements
- References
- Figure legends (if any)
- Tables and captions (if any)
- Description of additional data files (if any)

The **Accession Numbers** of any nucleic acid sequences, protein sequences or atomic

coordinates cited in the manuscript should be provided, in square brackets and include the corresponding database name; for example, [EMBL:AB026295, EMBL:AC137000, DDBJ:AE000812, GenBank:U49845, PDB:1BFM, Swiss-Prot:Q96KQ7, PIR:S66116].

The databases for which we can provide direct links are: EMBL Nucleotide Sequence Database (EMBL), DNA Data Bank of Japan (DDBJ), GenBank at the NCBI (GenBank), Protein Data Bank (PDB), Protein Information Resource (PIR) and the Swiss-Prot Protein Database (Swiss-Prot).

Title page

This should list the title of the article. The title should include the study design, for example:

A versus B in the treatment of C: a randomized controlled trial

X is a risk factor for Y: a case control study

The full names, institutional addresses, and e-mail addresses for all authors must be included on the title page. The corresponding author should also be indicated.

Abstract

The abstract of the manuscript should not exceed 350 words and must be structured into separate sections: **Background**, the context and purpose of the study; **Methods**, how the study was performed and statistical tests used; **Results**, the main findings; **Conclusions**, brief summary and potential implications. Please minimize the use of abbreviations and do not cite references in the abstract; **Trial registration**, if your research article reports the results of a controlled health care intervention, please list your trial registry, along with the unique identifying number, e.g. **Trial registration**: Current Controlled Trials ISRCTN73824458. Please note that there should be no space between the letters and numbers of your trial registration number.

Background

The background section should be written from the standpoint of researchers without specialist knowledge in that area and must clearly state - and, if helpful, illustrate - the background to the research and its aims. Reports of clinical research should, where appropriate, include a summary of a search of the literature to indicate why this study was necessary and what it aimed to contribute to the field. The section should end with a very brief statement of what is being reported in the article.

Methods

This should include the design of the study, the setting, the type of participants or materials involved, a clear description of all interventions and comparisons, and the type of analysis used, including a power calculation if appropriate.

Results and Discussion

The Results and Discussion may be combined into a single section or presented separately. Results of statistical analysis should include, where appropriate, relative and absolute risks or risk reductions, and confidence intervals. The results and discussion sections may also be

broken into subsections with short, informative headings.

Conclusions

This should state clearly the main conclusions of the research and give a clear explanation of their importance and relevance. Summary illustrations may be included.

List of abbreviations

If abbreviations are used in the text, either they should be defined in the text where first used, or a list of abbreviations can be provided, which should precede the competing interests and authors' contributions.

References

All references must be numbered consecutively, in square brackets, in the order in which they are cited in the text, followed by any in tables or legends. Reference citations should not appear in titles or headings. Each reference must have an individual reference number. Please avoid excessive referencing. If automatic numbering systems are used, the reference numbers must be finalized and the bibliography must be fully formatted before submission.

Only articles and abstracts that have been published or are in press, or are available through public e-print/preprint servers, may be cited; unpublished abstracts, unpublished data and personal communications should not be included in the reference list, but may be included in the text and referred to as "unpublished data", "unpublished observations", or "personal communications" giving the names of the involved researchers. Notes/footnotes are not allowed. Obtaining permission to quote personal communications and unpublished data from the cited author(s) is the responsibility of the author. Journal abbreviations follow Index Medicus/MEDLINE. Citations in the reference list should contain all named authors, regardless of how many there are.

Examples of the *BMC Medical Genetics* reference style are shown below. Please take care to follow the reference style precisely; references not in the correct style may be retyped, necessitating tedious proofreading.

Links

Web links and URLs should be included in the reference list. They should be provided in full, including both the title of the site and the URL, in the following format: **The Mouse Tumor Biology Database** [<http://tumor.informatics.jax.org/mtbwi/index.do>]

***BMC Medical Genetics* reference style**

Style files are available for use with popular bibliographic management software:

BibTeX

EndNote style file

Reference Manager

Article within a journal

1. Koonin EV, Altschul SF, Bork P: **BRCA1 protein products: functional motifs.** *Nat Genet* 1996, **13**:266-267.

Article within a journal supplement

2. Orengo CA, Bray JE, Hubbard T, LoConte L, Sillitoe I: **Analysis and assessment of ab initio three-dimensional prediction, secondary structure, and contacts prediction.** *Proteins* 1999, **43**(Suppl 3):149-170.

In press article

3. Kharitonov SA, Barnes PJ: **Clinical aspects of exhaled nitric oxide.** *Eur Respir J*, in press.

Published abstract

4. Zvaifler NJ, Burger JA, Marinova-Mutafchieva L, Taylor P, Maini RN: **Mesenchymal cells, stromal derived factor-1 and rheumatoid arthritis [abstract].** *Arthritis Rheum* 1999, **42**:s250.

Article within conference proceedings

5. Jones X: **Zeolites and synthetic mechanisms.** In *Proceedings of the First National Conference on Porous Sieves: 27-30 June 1996; Baltimore.* Edited by Smith Y. Stoneham: Butterworth-Heinemann; 1996:16-27.

Book chapter, or article within a book

6. Schnepf E: **From prey via endosymbiont to plastids: comparative studies in dinoflagellates.** In *Origins of Plastids. Volume 2.* 2nd edition. Edited by Lewin RA. New York: Chapman and Hall; 1993:53-76.

Whole issue of journal

7. Ponder B, Johnston S, Chodosh L (Eds): **Innovative oncology.** In *Breast Cancer Res* 1998, **10**:1-72.

Whole conference proceedings

8. Smith Y (Ed): *Proceedings of the First National Conference on Porous Sieves: 27-30 June 1996; Baltimore.* Stoneham: Butterworth-Heinemann; 1996.

Complete book

9. Margulis L: *Origin of Eukaryotic Cells.* New Haven: Yale University Press; 1970.

Monograph or book in a series

10. Hunninghake GW, Gadek JE: **The alveolar macrophage.** In *Cultured Human Cells and Tissues.* Edited by Harris TJR. New York: Academic Press; 1995:54-56. [Stoner G (Series Editor): *Methods and Perspectives in Cell Biology*, vol 1.]

Book with institutional author

11. Advisory Committee on Genetic Modification: *Annual Report.* London; 1999.

PhD thesis

12. Kohavi R: **Wrappers for performance enhancement and oblivious decision graphs.** *PhD thesis.* Stanford University, Computer Science Department; 1995.

Link / URL

13. **The Mouse Tumor Biology Database** [<http://tumor.informatics.jax.org/mtbwi/index.do>]

Preparing illustrations and figures

Figures should be provided as separate files. Each figure should comprise only a single file. There is no charge for the use of color.

Please read our figure preparation guidelines for detailed instructions on maximising the quality of your figures,

Formats

The following file formats can be accepted:

- **EPS** (preferred format for diagrams)
- **PDF** (also especially suitable for diagrams)
- **PNG** (preferred format for photos or images)
- Microsoft Word (figures must be a single page)
- PowerPoint (figures must be a single page)
- TIFF
- JPEG
- BMP
- CDX (ChemDraw)
- TGF (ISIS/Draw)

Figure legends

The legends should be included in the main manuscript text file immediately following the references, rather than being a part of the figure file. For each figure, the following information should be provided: Figure number (in sequence, using Arabic numerals - i.e. Figure 1, 2, 3 etc); short title of figure (maximum 15 words); detailed legend, up to 300 words.

Please note that it is the responsibility of the author(s) to obtain permission from the copyright holder to reproduce figures or tables that have previously been published elsewhere.

Preparing tables

Each table should be numbered in sequence using Arabic numerals (i.e. Table 1, 2, 3 etc.). Tables should also have a title that summarizes the whole table, maximum 15 words. Detailed legends may then follow, but should be concise.

Smaller tables considered to be integral to the manuscript can be pasted into the end of the document text file, in portrait format (note that tables on a landscape page must be reformatted onto a portrait page or submitted as additional files). These will be typeset and displayed in the final published form of the article. Such tables should be formatted using the 'Table object' in a word processing program to ensure that columns of data are kept aligned when the file is sent electronically for review; this will not always be the case if columns are generated by simply using tabs to separate text. Commas should not be used to indicate numerical values. Color and shading should not be used.

Larger datasets can be uploaded separately as additional files. Additional files will not be displayed in the final, published form of the article, but a link will be provided to the files as supplied by the author.

Tabular data provided as additional files can be uploaded as an Excel spreadsheet (.xls) or comma

separated values (.csv). As with all files, please use the standard file extensions.

Style and language

General

Currently, *BMC Medical Genetics* can only accept manuscripts written in English. Spelling should be US English or British English, but not a mixture.

Gene names should be in italic, but protein products should be in plain type.

There is no explicit limit on the length of articles submitted, but authors are encouraged to be concise. There is no restriction on the number of figures, tables or additional files that can be included with each article online. Figures and tables should be sequentially referenced. Authors should include all relevant supporting data with each article.

BMC Medical Genetics will not edit submitted manuscripts for style or language; reviewers may advise rejection of a manuscript if it is compromised by grammatical errors. Authors are advised to write clearly and simply, and to have their article checked by colleagues before submission. In-house copyediting will be minimal. Non-native speakers of English may choose to make use of a copyediting service.

Abbreviations

Abbreviations should be used as sparingly as possible. They can be defined when first used or a list of abbreviations can be provided preceding the acknowledgements and references.

Typography

Please use double line spacing.

Type the text unjustified, without hyphenating words at line breaks.

Use hard returns only to end headings and paragraphs, not to rearrange lines.

Capitalize only the first word, and proper nouns, in the title.

All pages should be numbered.

Use the *BMC Medical Genetics* reference format.

Footnotes to text should not be used.

Greek and other special characters may be included. If you are unable to reproduce a particular special character, please type out the name of the symbol in full.

Please ensure that all special characters used are embedded in the text, otherwise they will be lost during conversion to PDF.

Units

SI Units should be used throughout (liter and molar are permitted, however).