

**CENTRO UNIVERSITÁRIO SÃO CAMILO**  
**Curso de Biomedicina**

**Giane Chaim Jorge**

**ESTUDO DA ATROFIA MUSCULAR ESPINHAL -  
RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA ENTRE *SMN1* E *SMN2*,  
DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO**

**São Paulo**

**2017**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Padre Inocente Radrizzani**

Jorge, Giane Chaim

Estudo da Atrofia muscular espinhal – Recombinação homóloga entre smn1 e smn2, diagnóstico e tratamento / Giane Chaim Jorge. -- São Paulo: Centro Universitário São Camilo, 2017.

44 p.

Orientação de Fabio Mitsuo Lima

Trabalho de Conclusão de Curso de Biomedicina (Graduação),  
Centro Universitário São Camilo, 2017.

1. Atrofia muscular espinhal - diagnóstico 2. Genes  
3. Recombinação homóloga 4. Terapêutica I. Lima, Fabio Mitsuo II.  
Centro Universitário São Camilo III. Título

CDD: 573.21

**Giane Chaim Jorge – RA: SPG000744**

**Estudo da Atrofia Muscular Espinhal - Recombinação  
homóloga entre *SMN1* e *SMN2*, diagnóstico e tratamento**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Biomedicina do Centro Universitário São Camilo, orientado pelo Prof. Dr. Fabio Mitsuo Lima, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

**São Paulo**

**2017**

**Giane Chaim Jorge**

**ESTUDO DA ATROFIA MUSCULAR ESPINHAL -  
RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA ENTRE *SMN1* E *SMN2*,  
DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO**

São Paulo, 31 de outubro de 2017

---

Professor Orientador – Prof. Dr. Fabio Mitsuo Lima

---

Professor Examinador – Prof<sup>a</sup>. Dra. Luciana Pugliese

Jorge, G.C. Recombinação Homóloga entre *SMN1* e *SMN2* – Estudo da Atrofia Muscular Espinhal. 2017. 45f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Biomedicina). São Paulo: Centro Universitário São Camilo; 2017.

Atrofia Muscular Espinhal (AME) é uma doença neuromuscular transmitida pelo padrão de herança autossômico recessivo, com incidência estimada em aproximadamente 1 em cada 10.000 nascidos vivos (1:10.000), apresentando fenótipo variável entre os pacientes. O *locus* do gene associado à doença está no cromossomo 5, especificamente na região 5q11.2-q13.3, uma região duplicada e invertida que contém o gene *SMN1* (gene de sobrevivência do neurônio motor) diretamente relacionado à doença, e o pseudogene *SMN2*. O gene *SMN1*, em condições normais, codifica a proteína SMN presente em dendritos e axônios, atuante no metabolismo de RNA. Mutações neste gene resultam em uma proteína SMN truncada, responsável pelo fenótipo de AME. Essa perda de função pode ser parcialmente compensada pelo *SMN2*, que também produz a proteína SMN, porém de forma menos estável. Nessa região também podemos encontrar o gene *NAIP* fortemente relacionado com a forma severa da doença quando se encontra deletado. Em 2017, foi aprovado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) um medicamento específico para a AME, sendo uma doença em evidência e de interesse público. Sendo assim, este trabalho visa realizar levantamento bibliográfico em bases de dados e bibliotecas científicas, sintetizando, analisando e discutindo as publicações mais recentes e relevantes sobre a Atrofia Muscular Espinhal e a relação com os genes *SMN1*, *SMN2* e *NAIP*. Contemplando os diagnósticos clínicos e moleculares da doença bem como sua interação celular, tratamento e proteína produzida espera-se elucidar o mecanismo gênico que acarreta a doença para melhor caracterização do fenótipo clínico da AME.

Palavras chaves: atrofia muscular espinal – diagnóstico, genes, recombinação homóloga, terapêutica.

Jorge, G.C. Homologous Recombination between *SMN1* and *SMN2* - Study of Spinal Muscular Atrophy.2017. 45f. Term paper (Graduate program in biomedicine). São Paulo: Centro Universitário São Camilo; 2017.

Spinal Muscular Atrophy (SMA) is a neuromuscular disease transmitted by the autosomal recessive inheritance pattern, with an estimated incidence of approximately 1 in 10,000 live births (1: 10,000), showing a variable phenotype among the patients. The *locus* of the gene associated with the disease is on chromosome 5, specifically in the region 5q11.2-q13.3, a duplicate and inverted region containing the *SMN1* gene (Survival Motor Neuron gene) directly related to the disease, and the pseudogene *SMN2*. The *SMN1* gene, under normal conditions, encodes the SMN protein present in dendrites and axons, acting on RNA metabolism. Mutations in this gene result in a truncated SMN protein, responsible for the SMA phenotype. This loss of function may be partially offset by *SMN2*, which also produces the SMN protein, but in a less stable form. In this region we can also find the *NAIP* gene strongly related to the severe form of the disease when it is deleted. In 2017, a specific medicine for the SMA was approved by the Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), being a disease in evidence and of public interest. Thus, this work aims to carry out a bibliographic survey in databases and scientific libraries, synthesizing, analyzing and discussing the most recent and relevant publications on Spinal Muscular Atrophy and the relationship with the *SMN1*, *SMN2* and *NAIP* genes. Beholding the disease's clinical and molecular diagnoses as well as their cellular interaction, treatment and produced protein; it is expected to elucidate the gene mechanism entailing the disease to better describe SMA's clinical phenotype.

Keywords: spinal muscular atrophy - diagnosis, genes, homologous recombination, therapy.

## SUMÁRIO

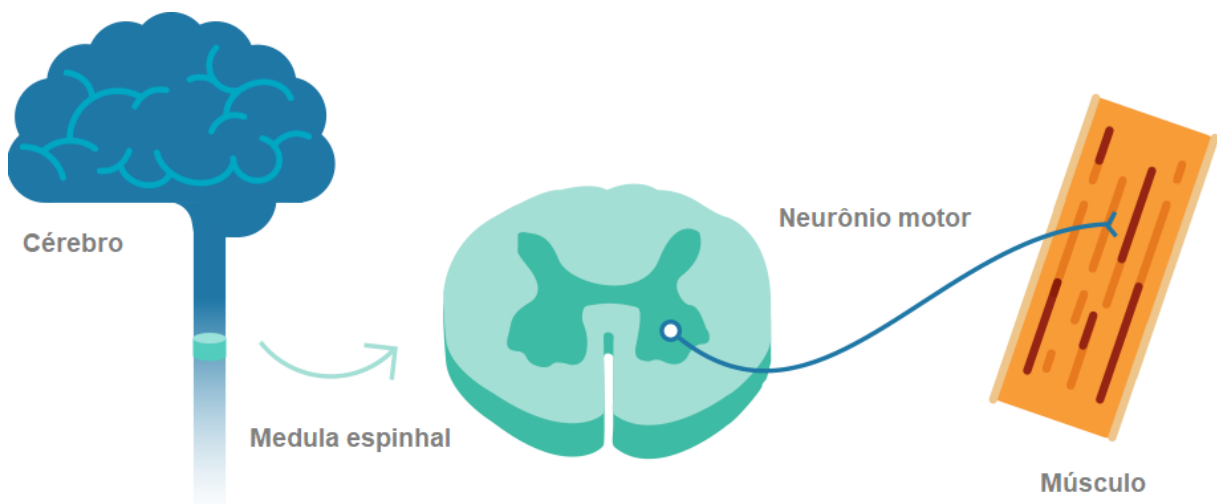
1. INTRODUÇÃO .....	6
1.1 Histórico .....	6
1.2 Bases moleculares da AME .....	7
1.3 Principais sintomas .....	7
2. OBJETIVOS .....	9
3. MATERIAS E MÉTODOS .....	10
4. DESENVOLVIMENTO .....	11
4.1 Classificação da AME .....	11
4.1.1 AME tipo I .....	11
4.1.2 AME tipo II .....	11
4.1.3 AME tipo III .....	12
4.1.4 AME tipo IV .....	12
4.2 Recombinação homóloga .....	13
4.3 Genes associados à AME .....	18
4.3.1 <i>SMN1</i> e <i>SMN2</i> .....	19
4.3.2 <i>NAIP</i> .....	22
4.4 Proteína SMN .....	24
4.5 Diagnóstico .....	26
4.5.1 Clínico-laboratorial .....	26
4.5.2 Molecular .....	27
4.5.2.1 MLPA .....	28
4.5.2.2 PCR-RFLP .....	30
4.6 Tratamento .....	33
5. CONCLUSÃO .....	37
REFERÊNCIAS .....	38

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Histórico

Atrofia muscular espinhal (AME) é uma neuropatia transmitida pelo padrão de herança autossômico recessivo, evidenciada pela atrofia muscular secundária nos músculos voluntários próximos de pernas, braços e eventualmente de todo o tronco, com perda progressiva dos movimentos que ocorre devido à degeneração dos neurônios motores presentes no corno anterior da medula espinhal, responsáveis pela interação entre medula espinhal e os músculos do corpo (motoneurônios  $\alpha$ ) (Figura 1) (Araújo et al, 2005; Baioni e Ambiel, 2010).

Figura 1 - Representação da transmissão dos impulsos nervosos do cérebro para os neurônios motores chegando nas fibras musculares. Os neurônios motores se localizam no corno Anterior da medula espinhal e são diretamente afetados no AME.



Modificado de: Together in SMA (2017).

O primeiro relato da forma mais grave da AME atribui-se a Werdnig e Hoffmann em artigos publicados nos anos de 1891 e 1893. Neste último, referem-se 7 casos da doença em 4 famílias diferentes (Kostova et al, 2007). A descrição da forma leve surgiu como resultado dos esforços de Kugelberg e Welander para caracterizar e diferenciar a atrofia muscular espinhal da distrofia muscular. O artigo original foi publicado em 1956 no jornal americano Archives of Neurology and Psychiatry (Chicago), expondo 12 casos de atrofia muscular espinhal (Kostova et al, 2007). Em 1960, Dubowitz começou a explicar a forma

intermediária da doença estudando pacientes de uma ala do *Queen Mary's Hospital for Children* com distrofia muscular (Kostova et al, 2007).

## 1.2 Bases Moleculares da AME

A AME é uma doença ligada ao cromossomo 5 correlacionada com o gene codificante da proteína de sobrevivência do neurônio motor (SMN). É a principal doença autossômica recessiva fatal depois da fibrose cística e sua incidência é de aproximadamente 1 a cada 10.000 nascidos vivos (Araújo et al, 2005; Baioni e Ambiel, 2010). A frequência de indivíduos portadores (que apresentam alelos diferentes entre si – chamados de heterozigotos) da doença é de 1:40 a 1:60 indivíduos (Baioni e Ambiel, 2010).

Em 1995, Lefebvre e colaboradores identificaram o gene *SMN1* como associado à AME. Esse gene, localizado na porção telomérica de 5q13 (Baioni e Ambiel, 2010), possui 8 éxons (1, 2a, 2b, 3, 4, 5, 6, 7 e 8) correspondendo a aproximadamente 20kb de extensão (Bürglen et al, 1996). Em condições normais, esse gene é responsável pela codificação da proteína SMN (Baioni e Ambiel, 2010). A ausência desse gene acarreta em AME, e pode ser causada por uma deleção ou por uma mutação de ponto que acarreta na conversão de *SMN1* para *SMN2* (Baioni e Ambiel, 2010).

## 1.3 Principais Sintomas

Os principais sintomas apresentados pelos pacientes são fraqueza muscular e perda progressiva do movimento (atrofia simétrica), pois apenas a motricidade tem a função prejudicada (Baioni e Ambiel, 2010). Com o comprometimento da ligação entre os neurônios motores e os músculos, os músculos voluntários proximais de pernas, braços, e eventualmente músculos do tronco utilizados em atividades como engatinhar, andar, sentar-se e mover a cabeça, se atrofiam durante a progressão da doença e agravam os sintomas clínicos do paciente (Wirth et al, 2006).

Uma diferença entre a atrofia e a distrofia é o local de acometimento. A distrofia é causada pela degeneração das células musculares, já a atrofia ocorre devido ao mesmo processo, degeneração, porém ela acomete as células nervosas, como evidenciado na Tabela 1.

Tabela 1 - Principais diferenças entre a atrofia muscular espinhal e a distrofia muscular.

Aspectos Clínicos	Atrofia Muscular Espinhal	Distrofia Muscular
Sintomas	Fraqueza	Fraqueza
Sinais	Atrofia dos músculos, falta de reflexos profundos, miofasciculações, movimentos involuntários rápidos e discretos dos músculos, como tremores	Pseudo-hipertrofia da panturrilha, reflexos profundos podem estar normais, diminuídos ou ausentes, de acordo com o grau de fraqueza muscular
Exames complementares	Enzimas musculares normais ou reduzidas, eletroencefalografia neurogênica, biópsia muscular com aspecto atrofico	Enzimas musculares muito elevadas, eletroencefalografia miopática, biópsia muscular com aspecto distrófico
Diagnóstico definitivo	Genético com deleção do gene <i>SMN1</i> localizado no cromossomo 5	Genético com deleção do gene da distrofina no cromossomo x ou pela demonstração da ausência ou deficiência da distrofina na biópsia (aqui nos referimos apenas às distrofias de Duchenne e Becker, as mais comuns)
Mecanismo da doença	Degeneração das células nervosas localizadas no corno anterior da medula espinhal	Degeneração das células musculares
Herança genética	Autossômica recessiva (a doença pode se manifestar tanto em meninos quanto em meninas, os pais são ambos portadores e têm risco de 25% em cada gestação de ter ter filhos com a doença)	Ligada ao cromossomo X (a doença aparece em meninos, as mães são portadoras e têm risco de 50% de ter filhos homens com a doença, sendo o mesmo risco para que suas filhas sejam portadoras)
Complicações mais comuns	Problemas respiratórios, escoliose, contraturas	Problemas respiratórios, cardíacos, escoliose e contraturas
Evolução natural da doença	É uma doença progressiva, de acordo com o tipo da AME, a degeneração é mais ou menos rápida	É uma doença progressiva; de acordo com a forma da distrofia( Duchenne, Becker, etc.), a degeneração é mais ou menos rápida

AME = atrofia muscular espinhal; SMN = sobrevivência do motoneurônio

Modificado de: Baioni e Ambiel (2010).

De acordo com a idade de surgimento e os sintomas, a AME pode ser classificada em quatro tipos: I, II, III e IV.

## 2. OBJETIVOS

Realizar levantamento bibliográfico em bases de dados e bibliotecas científicas, sintetizando, analisando e discutindo as informações mais recentes sobre os genes relacionados à Atrofia Muscular Espinhal. Assim como elucidar o mecanismo gênico que a acarreta, os genes correlacionados, a importância da proteína produzida, sua interação celular e possíveis diagnósticos, tanto clínico como molecular além do tratamento para a doença.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste trabalho de revisão bibliográfica foram utilizadas as bases de dados Google Acadêmico e PubMed, com busca no período de 1990 a 2017. Dentre os resultados encontrados – mediante descritores SMN, *SMN1*, *SMN2*, *NAIP*, atrofia muscular espinhal, diagnóstico AME, conversão gênica, via ubiquitina proteassoma e seus correspondentes em inglês – foram selecionados e consultados cerca de 50 documentos.

## 4. DESENVOLVIMENTO

### 4.4 Classificação da AME

#### 4.4.1 AME tipo I

Também conhecida como AME severa ou AME infantil ou doença de Werdnig-Hoffmann, a AME do tipo I acomete crianças prejudicando suas funções motoras de controle da cabeça (Wang et al, 2007). Apresentam um grito fraco, tosse e não adquirem a capacidade de sentar-se de forma independente (sem apoio). Com a idade de início da doença de 0 a 6 meses, a maioria desses pacientes não chegam ao seu segundo ano de vida sem uma gestão adequada de intervenções pulmonares não invasivas e nutricionais, como sonda de gastrostomia (já que sem a devida assistência, as complicações respiratórias e a disfunção bulbar são as maiores associadas de mortes nesses pacientes) (Oskoui et al, 2007; Russman, 2007; Wang et al, 2007).

As funções de deglutição, alimentação e manejo de secreção oral são afetadas antecipadamente ao primeiro ano de vida. O músculo da língua pode se atrofiar e apresentar fasciculação. A fraqueza e hipotonia nos membros e troncos podem ser acompanhadas de fraqueza muscular intercostal e, devido a preservação inicial do diafragma, as crianças apresentam o tronco superior em forma de sino com o colapso da parede torácica e protrusão abdominal, além de respiração paradoxal característica (Wang et al, 2007).

#### 4.4.2 AME tipo II

A Atrofia muscular espinhal do tipo II geralmente é sintomática em idades entre 6 e 18 meses, mas pode se manifestar mais cedo. Esses pacientes apresentam atraso motor caracterizado pela incapacidade de andarem sozinhos, contudo, podem ficar em pé com algum suporte, se sentar sozinhos ou se manterem apoiados quando posicionados. Em algumas crianças, a fraqueza bulbar associada à dificuldade de deglutição pode acarretar em baixo ganho de peso (Wang et al, 2007). Ademais, essas crianças podem desenvolver tremores finos, designados de miofasciculações, quando os dedos estão estendidos ou ao tentar apertos de mão. Apresentam dificuldades para tossir, bem como, limpar a

secreção oriunda da traqueia e serem acometidos por cifoescoliose e contraturas com o passar dos anos (Baioni e Ambiel, 2010). A expectativa de vida desses pacientes varia de 10 a 40 anos (Russman, 2007).

#### 4.4.3 AME tipo III

A AME do tipo III, igualmente nomeada de doença Kugelberg-Welander ou Atrofia muscular espinhal juvenil, apresenta surgimento dos sintomas a partir dos 18 meses de idade, entretanto, a idade de início pode variar muito (Russman, 2007). Segundo Wirth e colaboradores (2006), existem dois tipos de AME do tipo III, a e b. A AME do tipo IIIa é designada quando os sintomas aparecem até os 3 anos de idade e os indivíduos afetados possuem a habilidade de andar até os 20 anos de idade. A AME tipo IIIb se desenvolve depois dos 3 anos de idade e o paciente não perde a capacidade de andar, conservando-a por toda a vida.

Alteração nas funções como deglutição, tosse e hipoventilação noturna são menos comuns quando comparadas com a AME tipo II, porém não são descartadas, podendo acometer esses pacientes, assim como as chances de desenvolver escoliose aumentam com o perpassar da idade do paciente. A expectativa de vida em AME do tipo III é indefinida (Wang et al, 2007).

#### 4.4.4 AME tipo IV

Na AME do tipo IV não é observado um consenso em relação à idade de acometimento. Wang e colaboradores (2007) reportam que a fraqueza se inicia geralmente na segunda ou na terceira década da vida com um comprometimento motor suave e sem problemas respiratórios ou gastrointestinais. Já Russman (2007) descreve que o aparecimento se dá por volta dos 10 anos de idade e está associado com uma esperança de vida normal. Ambos relatam que o paciente consegue andar normalmente, sem comprometimento.

Sendo assim, é necessário caracterizar molecularmente os diferentes tipos de AME para garantir um diagnóstico inequívoco e terapias mais precisas, visando garantir melhores condições para os pacientes.

## 4.2 Recombinação Homóloga

A AME, como dito anteriormente, ocorre por uma deleção bialélica do gene *SMN1* ou por uma mutação de ponto que acarreta em uma mudança na sequência de nucleotídeos, levando à uma mudança do *SMN1* em *SMN2*. Esse mecanismo é denominado conversão gênica. A conversão gênica é um processo no qual uma sequência gênica é copiada e substituída para outra região homóloga e pode ser proveniente de cromossomos homólogos, cromátides-irmãs ou de origem ectópica, sem que haja necessidade de *crossing over* (Watson et al, 2015).

Há duas formas por meio das quais pode ocorrer a conversão gênica: amplificação da fita simples que invade a dupla-hélice e altera a informação genética inicial; ou reparo das bases malpareadas que são reconhecidas e removidas com posterior correção dessa região (Watson et al, 2015).

Sabendo-se que o reparo é aleatório, qualquer uma das fitas pode ser corrigida, podendo haver troca da informação genética contida na fita molde. A sequência, agora, pode codificar tanto a informação A como a informação a, dependerá exclusivamente de qual fita foi corrigida (Watson et al, 2015).

Esse mecanismo é uma das formas pela qual ocorre a recombinação homóloga.

Acredita-se que a recombinação homóloga envolve as seguintes etapas:

A) Alinhamento de duas moléculas de DNA homólogas (parentais)

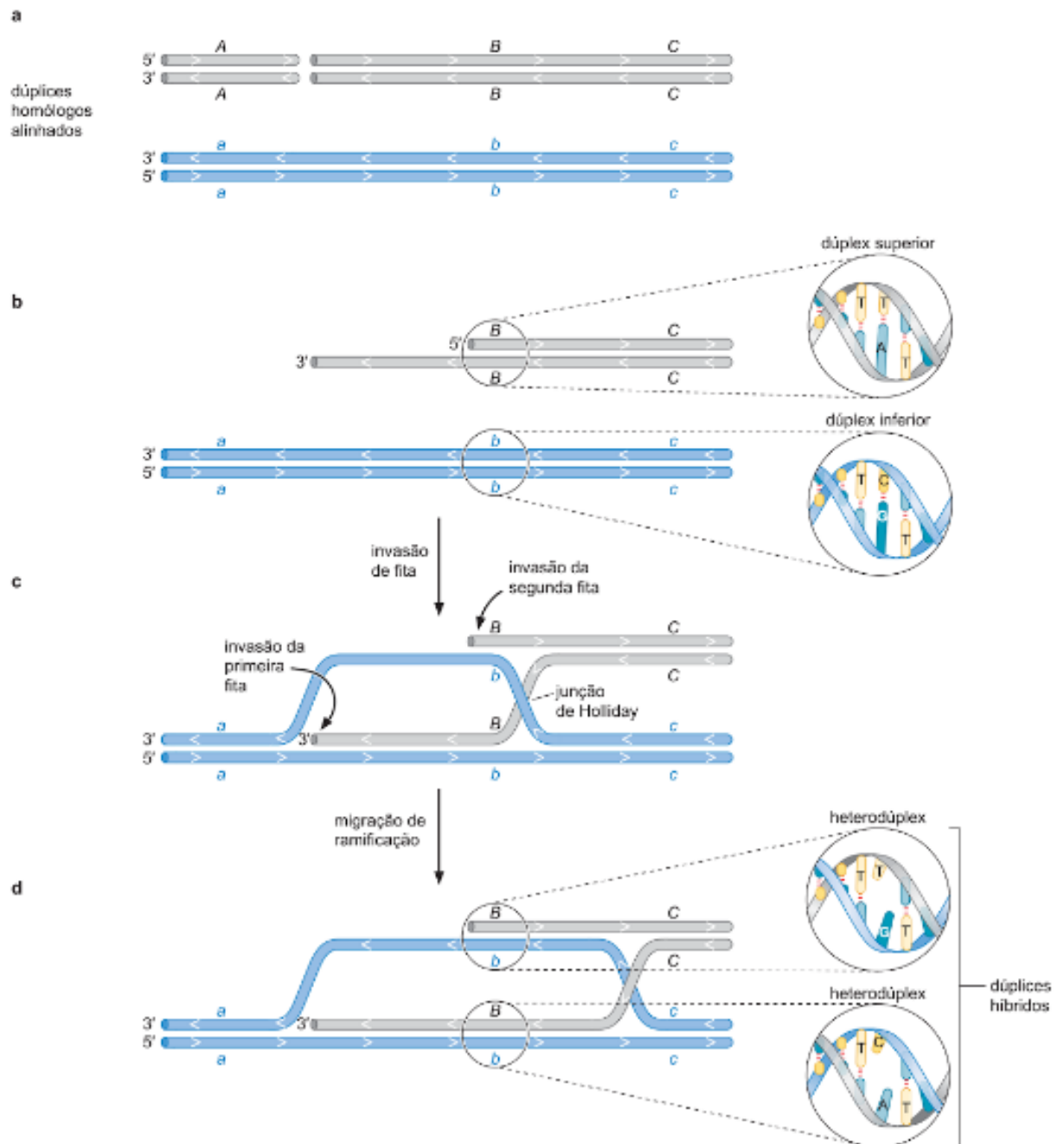
B) Quebra de uma fita dupla (DSB - do inglês *double-strand break*) é feita em uma molécula de DNA parental. As exonucleases expõem as extremidades 5' das fitas clivadas, deixando saliências 3' de fitas simples. As extremidades de fita simples são estabilizadas por ligação cooperativa de Rad51 ou proteínas relacionadas.

C) Consequentemente, a fita simples invade a dupla-hélice complementar, inicialmente formando uma tripla hélice, mas por fim deslocando uma das fitas complementares originais, processo chamado de invasão de fita. A síntese de DNA estende a fita invasora por aproximadamente um quilobase após haver pareamento de bases. As fitas complementares deslocadas da

molécula cortada são estendidas por síntese de DNA, que frequentemente apresenta bases malpareadas, este DNA novo é chamado de heterodúplex de DNA.

D) As duas junções que ligam as duas duplas-hélices são chamadas de junções de Holliday e são resolvidas cortando duas fitas (resolução) e ligando as terminações ao oposto complementar (Figura 2) (Strachan e Andrew, 2013).

Figura 2 - Modelo de Holliday para a recombinação homóloga. Cortes em apenas uma das fitas são feitos na mesma posição em ambas as moléculas parentais. As fitas cortadas são trocadas por complementariedade do pareamento de bases. Após a ligação é produzido um intermediário com as fitas entrecruzadas, chamadas de junção de Holliday.



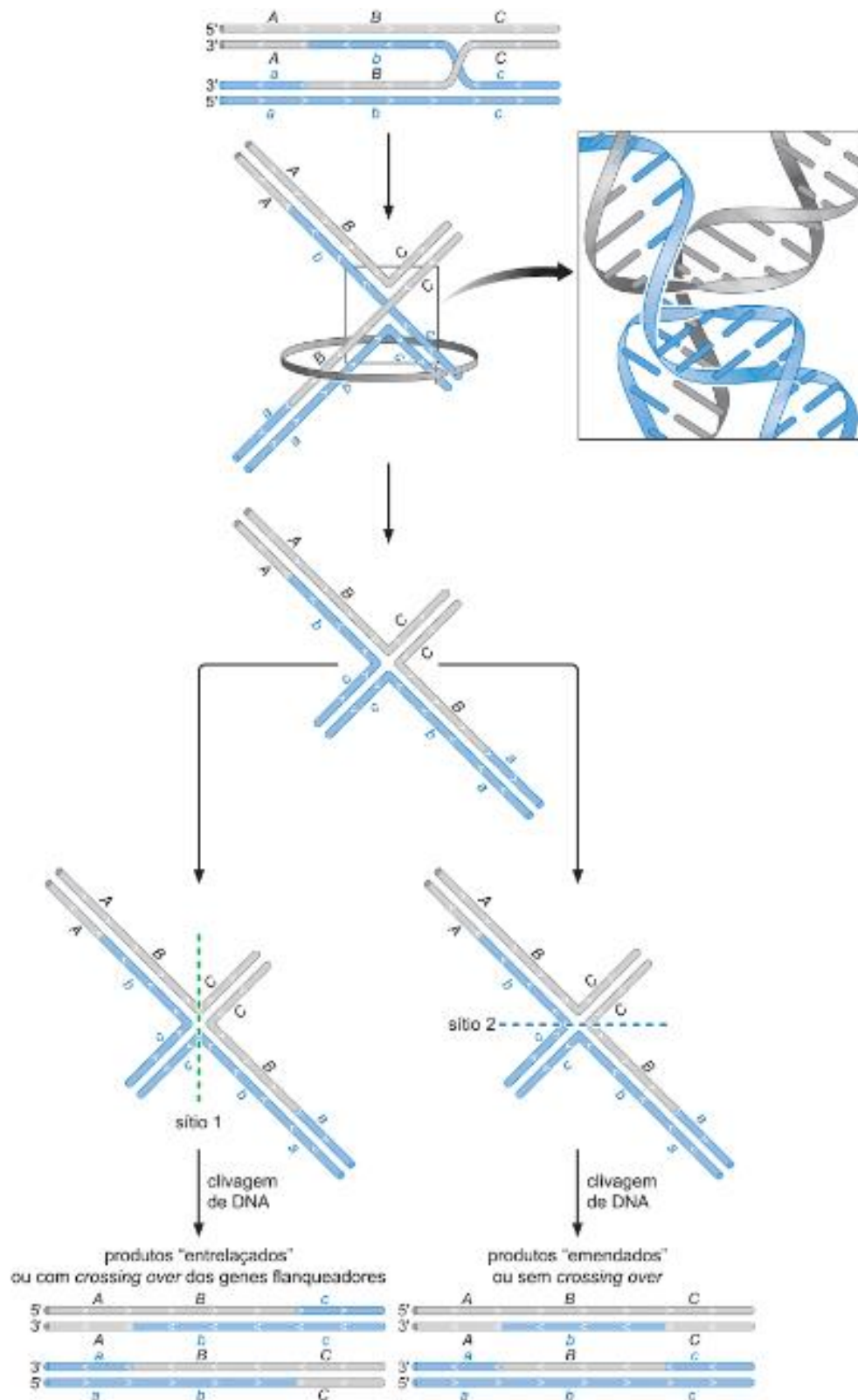
Fonte: Watson et al (2015).

Esse processo de resolução pode ser realizado de duas maneiras e dependendo do corte das fitas, as duplas-hélices resultantes são recombinantes (com crossing over) ou não recombinantes (sem crossing over) (Watson et al, 2015).

O sítio de clivagem 1, ou Junção de Holliday isomerizada, ocorre nas duas fitas de DNA compostas inteiramente por DNA de uma das duas fitas parentais. Quando essa clivagem ocorre, as fitas são ligadas e as moléculas resultantes apresentarão a estrutura de produtos “entrelaçados” após a recombinação, as duas dupla-hélices originais estarão conectadas por uma região híbrida. Assim esse tipo de recombinante pode ser chamado de produto de crossing over (Watson et al, 2015).

Entretanto, no segundo sítio de clivagem (sítio 2 ou Junção de Holliday inicial), ambas as fitas de DNA possuem regiões de sequências das duas moléculas de DNA parentais ou “emenda” de DNA híbrido. Essas moléculas são chamadas de produtos emendados ou produtos sem *crossing over* pois a recombinação não resulta no reagrupamento de outros genes adjacentes ao sítio de clivagem inicial (Figura 3) (Watson et al, 2015).

Figura 3 - Clivagem das junções de Holliday. A clivagem em um par gera os produtos “entrelaçados” ou com crossing over. A clivagem no segundo par de sítios, gera produtos “emendados” ou sem crossing over. O giro é apenas para auxiliar na visualização do processo.



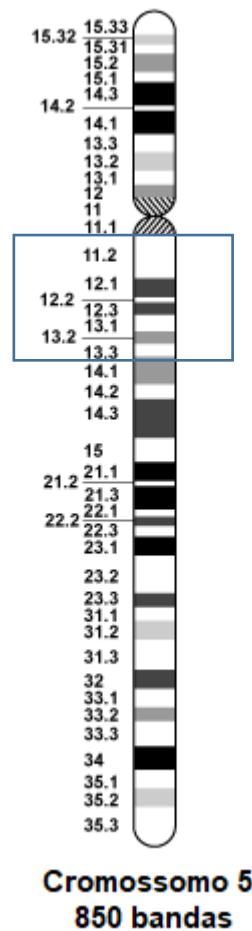
Fonte: Watson et al (2015).

Devido às constantes trocas durante a recombinação homóloga, o sítio gênico que contém os genes da AME está sujeito à quebras e alterações na sequência de nucleotídeos causadas por mal pareamento das fitas complementares.

#### 4.3 Genes associados à AME

Para que o paciente seja acometido pela AME, os erros devem ocorrer em um sítio específico. O *locus* da AME está localizado no cromossomo 5, mais precisamente em 5q11.2-q13.3 (destaque na Figura 4), um segmento cromossômico duplicado e invertido que inclui os genes *SMN1*, *SMN2*, além do *NAIP* e *H4F5* e *p44* (Brzustowicz et al, 1990; Lefebvre et al, 1995; Akutsu et al, 2002; Jedrzejowska, 2009). Porém no presente estudo, abordaremos *NAIP*, *SMN1* e *SMN2*.

Figura 4 - Região afetada está em destaque no cromossomo 5 em bandamento.



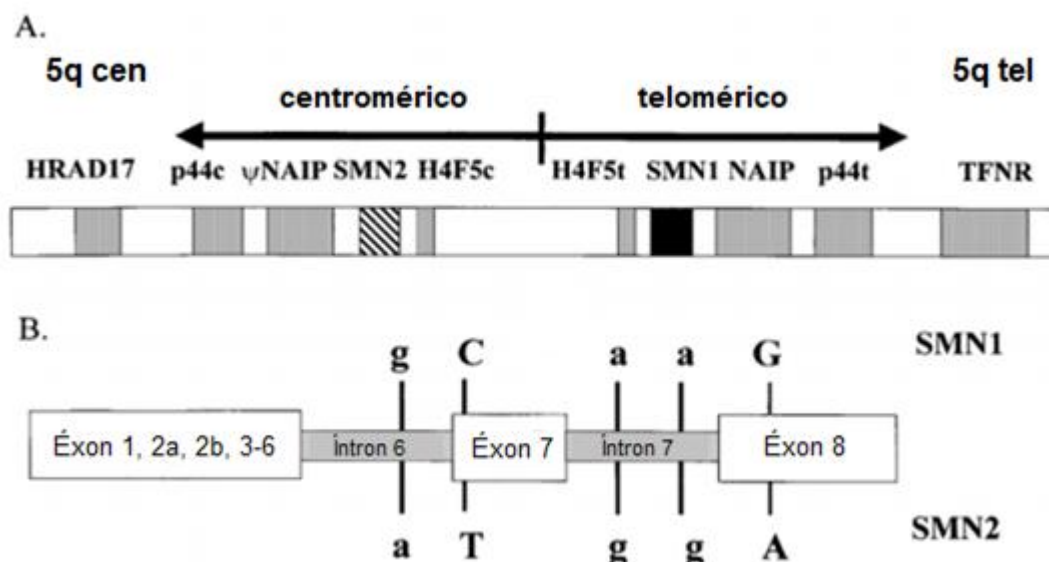
Modificado de: University of Florida (2017).

#### 4.3.1 *SMN1* e *SMN2*

O gene *SMN2*, localizado na porção centromérica do cromossomo 5 é muito semelhante ao *SMN1* (localizado na porção telomérica), sendo que as diferenças que possui são variações de 5 bases na região 3' de sua estrutura, sendo uma no íntron 6, uma no éxon 7, duas no íntron 7 e uma no éxon 8. Na região codificadora há a troca de uma citosina por uma timina e, apesar de não acarretar em alteração do aminoácido codificado por ser uma mutação de ponto sinônima, provoca *splicing* alternativo no éxon 7 do gene *SMN2*, sendo apontado

como o defeito molecular da AME (Figura 5) (Lefebvre et al, 1995; Bürglen et al, 1996; Baioni e Ambiel, 2010; Zanoteli et al, 2004; Wirth, 2000).

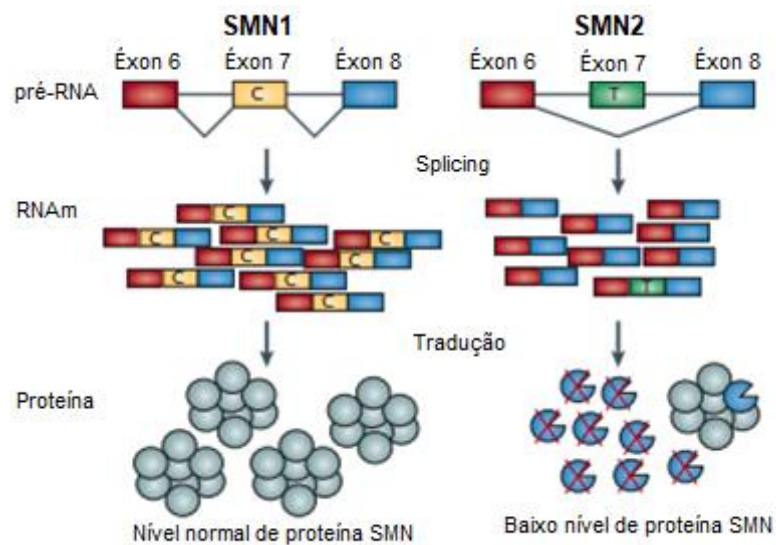
Figura 5 - A - Representação esquemática da região AME invertida e duplicada (5q13), incluindo quatro genes duplicados: *H4F5*, *SMN*, *NAIP* e *p44*. B - Localização dos nucleotídeos pelos quais *SMN1* pode ser diferenciado de *SMN2*.



Modificado de: Wirth (2000).

O gene *SMN1* é responsável pela síntese completa da proteína SMN. Já o gene *SMN2* não é capaz de sintetizá-la totalmente, sendo responsável por parte de sua produção (10 a 25% proteína funcional). O restante da produção (75%) dá origem a uma proteína truncada e instável ( $SMN\Delta7$ ), que é rapidamente degradada devido a presença de um grupo carboxi na extremidade terminal (Baioni e Ambiel, 2010; Wirth, 2000; Chang et al, 2004). O *splicing* alternativo afeta na eficácia da incorporação do éxon 7 no RNAm (perda do éxon 7), levando a produção de uma proteína menor e menos funcional (Figura 6) (Zanoteli et al, 2004; Godinho, 2010). De acordo com Wirth (2000) a porcentagem da produção das duas proteínas difere-se em 60% para o transcrito com ausência do éxon 7 e 40% para o transcrito completo. Os éxons 6 e 7 do gene *SMN* contêm um domínio responsável pela auto-oligomerização da proteína SMN e, portanto, saltos de éxons ou mutações nesta região levam a uma auto-associação reduzida. Este mecanismo explica a correlação entre o fenótipo AME e o número de cópia de *SMN2*.

Figura 6 - Representação da similaridade de estrutura e sequência dos genes SMN1 e SMN2. A diferença principal é uma mudança única de base nitrogenada afetando o *splicing* do éxon 7, provocando uma menor tradução da forma “normal” da proteína e acarretando em proteínas truncadas.

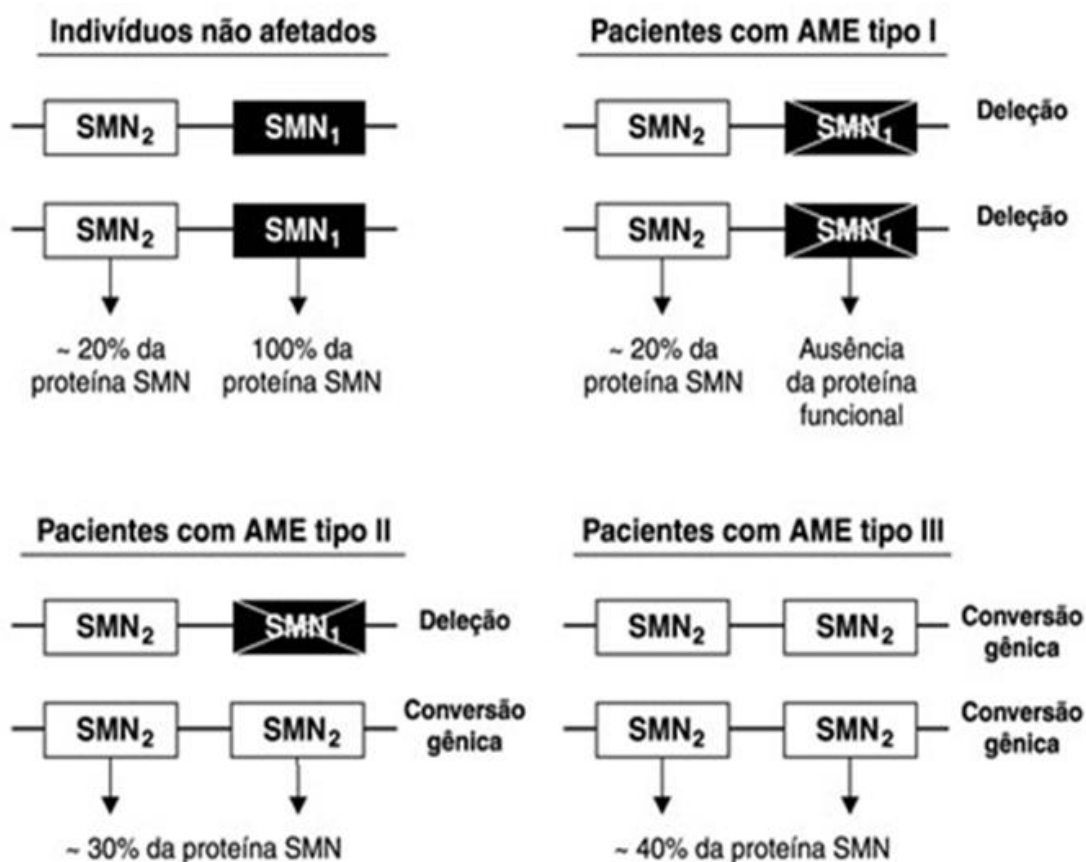


Modificado de: Burghes e Beattie, 2009.

Em consequência do aumento no número de cópias de *SMN2* (devido à eventos de conversão gênica), uma maior quantidade da proteína SMN funcional é produzida, reduzindo a gravidade da doença, gerando fenótipos mais leves (Figura 7), quando comparado aos de deleção do gene *SMN1*, que representam as formas mais graves da AME (Baioni e Ambiel, 2010; Burghes, 1997).

Não há relatos de indivíduos com ausência completa da proteína, podendo significar que esse genótipo seja incompatível com a vida, sugerindo uma essencial participação da proteína SMN durante o desenvolvimento embrionário (Panozzo et al, 2001; Kolb et al, 2007; Beattie et al, 2007) ou como moduladora de apoptose neuronal (Kerr et al, 2000).

Figura 7 - Esquema do genótipo de indivíduos não-afetados e afetados pela AME, caracterizando os pacientes tipos I, II e III, juntamente com a representatividade da quantidade sintetizada da proteína SMN, de acordo com cada genótipo.



Modificado de: Baioni e Ambiel (2010).

Cerca de 95% dos pacientes diagnosticados com AME são homocigotos para a ausência do éxon 7 do gene *SMN1*. Essa ausência pode advir de uma deleção completa desse gene, da ausência de apenas um alelo do gene e mutação de ponto no outro alelo, ou, mais raramente, de mutação de ponto nos dois alelos. 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* para a confirmação do diagnóstico da AME em pacientes com suspeita clínica (Godinho, 2010).

#### 4.3.2 NAIP

Outro gene relacionado ao fenótipo da AME é o *NAIP*. O gene *NAIP* (do inglês NLR Family Apoptosis Inhibitory Protein), contém pelo menos 16 éxons contemplando um tamanho entre 5,5 Kb até 70 Kb de DNA. A região de codificação do gene *NAIP* engloba 3696 nt e codifica uma proteína de 1232 aminoácidos e 140 kDa (Roy et al, 1995). Localiza-se próximo à *SMN*, em 5q13, e também está duplicado tendo várias cópias truncadas de *NAIP* na região. A presença desse gene pode ser detectada por PCR do éxon 5, que está presente somente no gene de comprimento total, localizada na parte telomérica da região 5q11.2-q13.3 (Rodrigues et al, 1996; Tsai et al, 2001).

A evidência de que o *NAIP* pode desempenhar um papel na patogênese da AME vem de estudos funcionais. Estudos mostraram que esse gene inibe a apoptose em células de mamíferos atuando como um regulador negativo da apoptose do neurônio motor e, quando deficiente ou ausente, contribui para um agravante do fenótipo independentemente do número de cópias de *SMN2* (Rodrigues et al, 1996; Jedrzejowska, 2009).

De acordo com Wirth e colaboradores (1997), a deleção do *NAIP* é encontrada em 45% dos pacientes com SMA de tipo I e 18% dos pacientes de tipo II e III. Já Rodrigues e colaboradores (1996) vão mais adentro e afirmam que a deleção do éxon 5 do gene *NAIP* é a responsável pelas porcentagens citadas. A incidência de deleções na cópia funcional de *NAIP* em pacientes pode ser maior do que observada, devido a presença de cópias truncadas do gene (Rodrigues et al, 1996).

Há indícios que a deleção desse gene está associada, com uma certa constância, com a forma severa da doença mais do que com formas intermediárias ou suaves da AME (Campbell et al, 1997). Em várias populações estudadas, como chineses, indianos, iranianos, japoneses e malásicos, o mesmo é notado. (Watihayati et al, 2009; Omrani et al, 2009; Dastur et al, 2006; Akutsu et al, 2002).

Há artigos que correlacionam a deleção do gene *NAIP* com a diminuição do número total de cópias de genes *SMN* em AME de tipo I e a presença do gene *NAIP* relacionada a um aumento do número de cópia *SMN2* ou retenção do número total de cópias do *SMN*, em pacientes tipo II ou III (Akutsu et al, 2002).

#### 4.4. Proteína SMN

A proteína SMN é um polipeptídeo de 294 aminoácidos expressa em todos os metazoários e em todos os tipos celulares de vertebrados (células somáticas e germinativas) (Kolb et al, 2007). Está localizada no citoplasma e também no núcleo das células, sendo que, no núcleo essa localiza-se em estruturas chamadas gêmeos de corpos enovelados (do inglês *gemini of coiled bodies – gems*). O número de *gems* é correlacionado inversamente com a gravidade da doença, assim como o número de cópias do gene *SMN2* e estão intimamente associadas aos corpos enrolados de forma nuclear (Coover et al, 1997; Godinho, 2010). Os corpos enrolados são estruturas subnucleares que se acredita ter um papel no metabolismo do RNAm. Os *gems* parecem interagir diretamente com os corpos enrolados e sofrer mudanças semelhantes em resposta a condições ambientais e metabólicas da célula. Isso sugere que *gems* funcionem em conjunto com os corpos enrolados, podendo desempenhar um papel no processamento de RNA. No momento, apenas os marcadores anti-SMN reconhecem a estrutura *gem* e sua função ainda é desconhecida (Coover et al, 1997).

A proteína formada pelos genes *SMN1* e *SMN2* é parte essencial do complexo multiproteico que reúne ribonucleoproteínas nucleares pequenas (do inglês *small ribonucleoproteins - snRNPs*), componentes indispensáveis para o mecanismo de *splicing* (remoção de introns durante a formação do RNAm final). Alguns autores correlacionam a proteína SMN com uma participação na regulação da transcrição e na expressão de alguns genes (Wirth et al, 2006; Burghes et al 2009).

Ainda não está claro como ocorre a redução da quantidade da proteína SMN nas células e, conseqüentemente, a degeneração dos motoneurônios  $\alpha$ . Isso gera a possibilidade de que a SMN tenha uma função adicional restrita a esses neurônios. Em estudos imuno-histoquímicos realizados, foi observada a presença da proteína SMN em dendritos, cones de implantação e axônios de motoneurônios, sugerindo, assim, sua importância no transporte de RNA nos axônios e manutenção da integridade de junções neuromusculares (Wirth et al, 2006; D'Amico et al, 2011).

Concentrações diminuídas da proteína SMN podem ser nocivas aos neurônios motores devido ao comprimento dos axônios e de suas interações exclusivas com músculos esqueléticos (D'Amico et al, 2011).

Concretizando as duas hipóteses principais postuladas para explicar a patogênese da SMA: (a) a SMN está envolvida na biogênese de pequenas ribonucleoproteínas nucleares (snRNPs) e em *splicing* de RNAm: assim a redução de SMN pode determinar uma perturbação geral na montagem snRNP (para quais neurônios motores podem ser mais sensíveis) e/ou o complexo SMN está envolvido na união de um ou poucos transcrições com função chave nos neurônios motores; e (b) SMN possui uma função específica do neurônio motor, independente da montagem de snRNPs, como o transporte de RNAm junto ao axônio. Ressalta-se que a função celular exata da proteína SMN permanece desconhecida (D'Amico et al, 2011).

Pesquisas com modelos animais como zebra *fish*, ratos, moscas, dentre outros, com a interrupção do gene SMN foram essenciais para expandir o conhecimento sobre os mecanismos da doença, assim como as vias moleculares e celulares da SMN. Muito recentemente, em um modelo de estudo com ratos, notaram-se mudanças morfológicas nos estágios iniciais da doença, abrangendo reflexos reduzidos do proprioceptivo relacionado com a diminuição do número e função de sinapses nos neurônios motores somáticos“ e dendritos proximais. Essas mudanças ocorrem primeiro nos neurônios motores que inervam os músculos posteriores proximais e nos neurônios motores mediais responsáveis por inervar os músculos axiais (D'Amico et al, 2011).

Nos estudos de Chang et al (2004), há evidências que ambas as proteínas formadas (SMN como SMN truncada) são degradadas pela mesma via, a via ubiquitina / proteassoma, e esse estudo apresenta que o inibidor do proteassoma pode regular o nível da proteína SMN em fibroblastos do paciente com AME. Também vale ressaltar que a exclusão do éxon 7 não afeta a localização subcelular da proteína, mas relaciona-se diretamente com a formação dos *gems*.

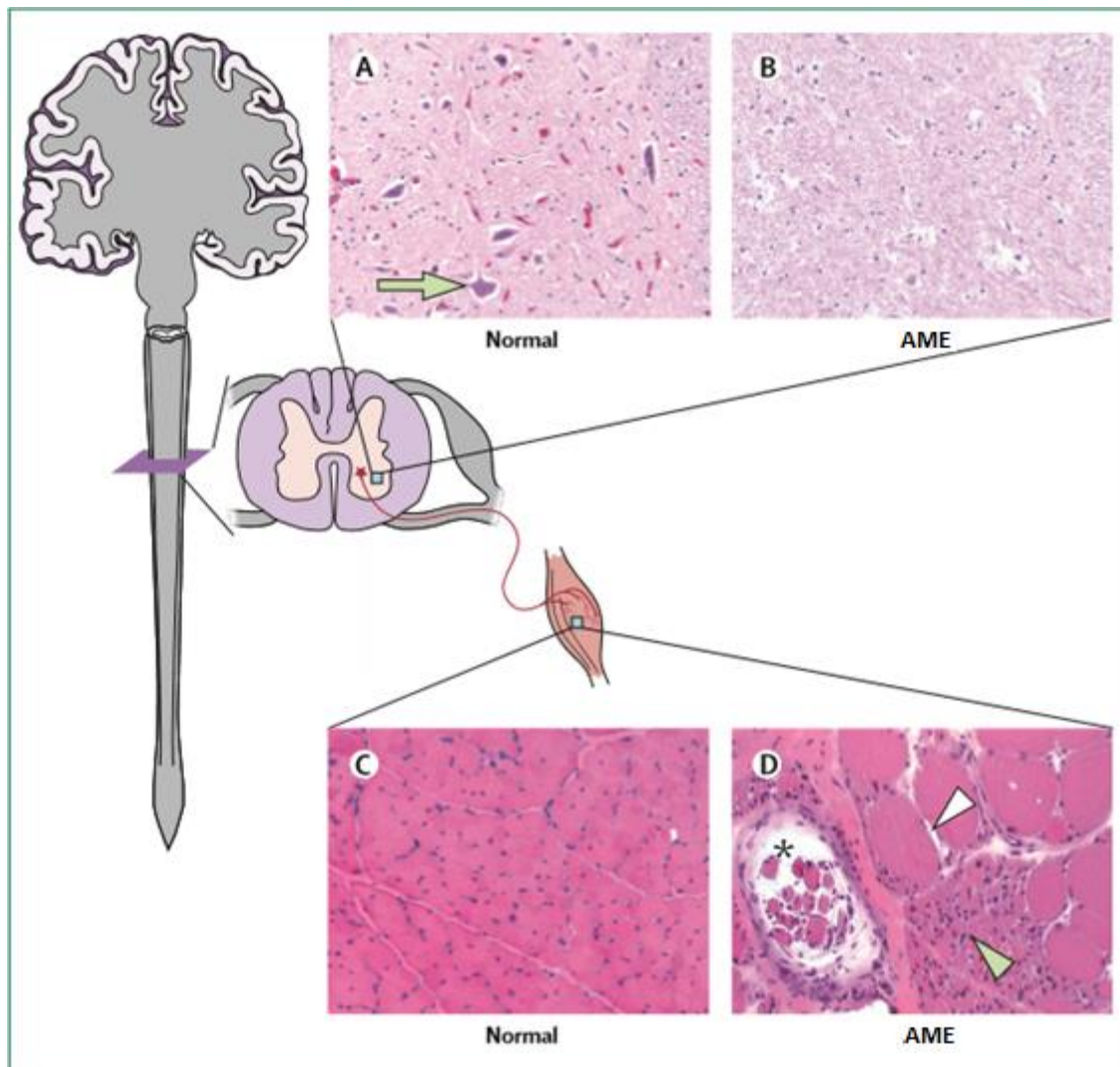
## 4.5. DIAGNÓSTICO

### 4.5.1 Clínico-laboratorial

O diagnóstico clínico-laboratorial da AME inclui dosagem sérica de creatinofosfoquinase (CPK), eletroneuromiografia (ENMG) e biópsia muscular. Os critérios laboratoriais para os exames citados são: valor de 5 vezes abaixo do superior normal para a dosagem de CPK, segundo o laboratório Álvaro, o valor de referência varia de 32,0 a 294,0 U/L, para homens e 33,0 a 211,0 U/L para mulheres (2017); presença de atividade espontânea anormal, alteração da duração e amplitude do potencial de ação da unidade motora na ENMG; e atrofia em grupo, hipertrofia de fibras tipo I ou agrupamento por tipo de fibra na biópsia muscular (Araújo et al, 2005).

A dosagem sérica da CPK pode diferenciar uma doença neurogênica, como a AME, de doenças como as distrofias, nas quais as lesões musculares fazem com que os níveis da CPK se elevem (Baioni e Ambiel, 2010). A ENMG desses pacientes apresenta um preceito de denervação sem envolvimento sensorial ou sem diminuição marcante de velocidade de condução nervosa (Wirth et al, 2006). A histopatologia dos músculos esqueléticos apresenta fibras atroficas com ilhas de fibras hipertróficas (Lunn e Wang, 2008). Na histopatologia da medula espinhal, pode-se notar a grave perda dos neurônios motores na região do corno anterior (Figura 9) (Lunn e Wang, 2008).

Figure 9 - Demonstração de um exame histopatológico de atrofia muscular espinhal: (A) demonstração dos comandos motores gerados no córtex cerebral transmitidos pelos neurônios alfa motores do cordão espinhal, indicados pelas células vermelhas e seta verde em controles normais; A região do corno anterior espinhal mostra uma ausência de neurônios em pacientes com SMA (B) comparado com controle normal (A). O músculo esquelético de um paciente portador da doença (D) mostra fibras hipertróficas (seta sem cor) cercada por um grupo atrófico (seta verde) comparado com fibras saudáveis e morfologia uniforme em um músculo infantil normal (C). Apesar das fibras musculares atróficas na AME, os fusos musculares (asterisco preto) não são afetados e se tornam mais notáveis. Todas as lâminas são coradas com hematoxilina-eosina.



Fonte: Lunn e Wang (2008).

#### 4.5.2 Molecular

A técnica de diagnóstico molecular utilizada para o estudo do diagnóstico pode ser a MLPA (do inglês, *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*)

ou o PCR- RFLP (do inglês, *Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorfism*).

#### 4.5.2.1 MLPA

Essa técnica foi desenvolvida de forma a permitir a detecção de número de cópias genômicas de diferentes regiões de interesse, diagnosticando anormalidades genéticas como aneuploidias, deleções e duplicações em um único experimento por meio da hibridação simultânea e amplificação por PCR de até 50 sondas diferentes em uma única reação (Schouten et al., 2002; Cho et al., 2009; Kozlowski et al., 2008; Shen e Wu, 2009; Jennings et al., 2011).

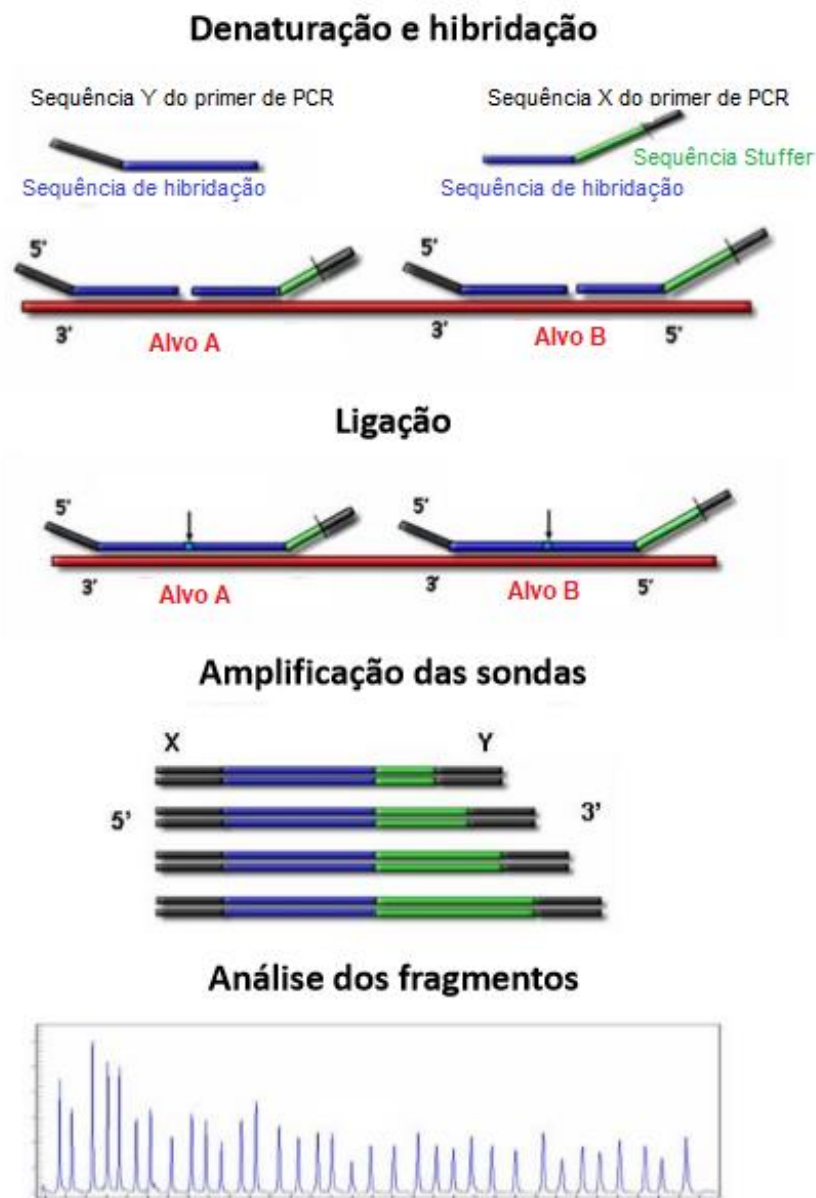
As sondas são compostas por uma sequência de complementariedade para a região de interesse (sequência de hibridização) e uma sequência de primer universal, variando de 130 a 480 nucleotídeos (Figura 10) (Kozlowski et al., 2008; Villamón et al., 2008; Shen e Wu, 2009). Além de possuírem uma sequência Stuffer (sequência não hibridizante) responsável pela distinção dos produtos amplificados, pois ela atribui tamanhos as sondas facilitando sua identificação por tamanho dando-as um tamanho único e específico, auxiliando na eletroforese capilar para sua identificação (Schouten et al, 2002).

Além de apresentar a vantagem *multiplex* para a análise de diversas regiões em uma única reação, a MLPA é um método rápido, de menor custo e menos dispendioso quando comparado as técnicas de FISH (do inglês, *Fluorescence in situ Hybridization*) e *array CGH* (do inglês, *Comparative Genome Hybridization*) (Shen e Wu, 2009; Pohovski et al., 2013; Schouten et al, 2002; Vorstman et al, 2006), além de precisar de uma pequena quantidade de DNA (20-500 ng) para detectar as possíveis deleções e/ou duplicações em um único éxon (Dutra, 2014). Essa propriedade, caracteriza alta especificidade, já que, para cada sequência a ser amplificada é preciso que as duas sondas estejam ligadas entre si (Schouten et al, 2002; Kozlowski et al, 2008; Mandal et al, 2009).

A principal limitação da técnica de MLPA é que, diferente da FISH, não conseguimos visualizar a localização cromossômica da alteração, portanto translocações não são detectadas, apenas ausência ou presença da sequência de interesse (Jennings et al, 2001). Lembrando que, apesar de conseguirmos

avaliar diversas regiões genômicas, precisamos de uma suspeita clínica para direcionar a pesquisa para um kit específico (Zanardo, 2014).

Figura 10 - Representação das etapas da técnica de MLPA: denaturação, hibridação, ligação e PCR; e análise dos fragmentos obtidos.



Modificado de: Dutra (2014).

Uma vez que a MLPA é uma técnica comparativa, são necessários controles normais extraídos do mesmo tipo tecidual para cada reação. Dessa maneira a intensidade relativa de cada pico é comparada para que deleções e/ou duplicações possam ser identificadas (González et al, 2008; Mandal et al, 2009; Rooms et al, 2011).

Atualmente, são comercializados pela empresa MCR Holland mais de 400 kits comerciais de MLPA, sendo um destes (o kit P060) específico para detecção dos éxons 7 e 8 dos genes *SMN1* e *SMN2*, para testes de portadores da atrofia muscular espinhal.

#### 4.5.2.2 PCR-RFLP

Esse método utiliza enzimas de restrição para detecção de mutações e polimorfismos localizados no material genético. As enzimas de restrição reconhecem sítios específicos na sequência do DNA, e após esse reconhecimento, o sítio é clivado gerando fragmentos de vários tamanhos que são separados e analisados por eletroforese. Os fragmentos gerados variam muito em relação ao seu tamanho e são separados por eletroforese em gel de agarose ou acrilamida (Hirata, 2010).

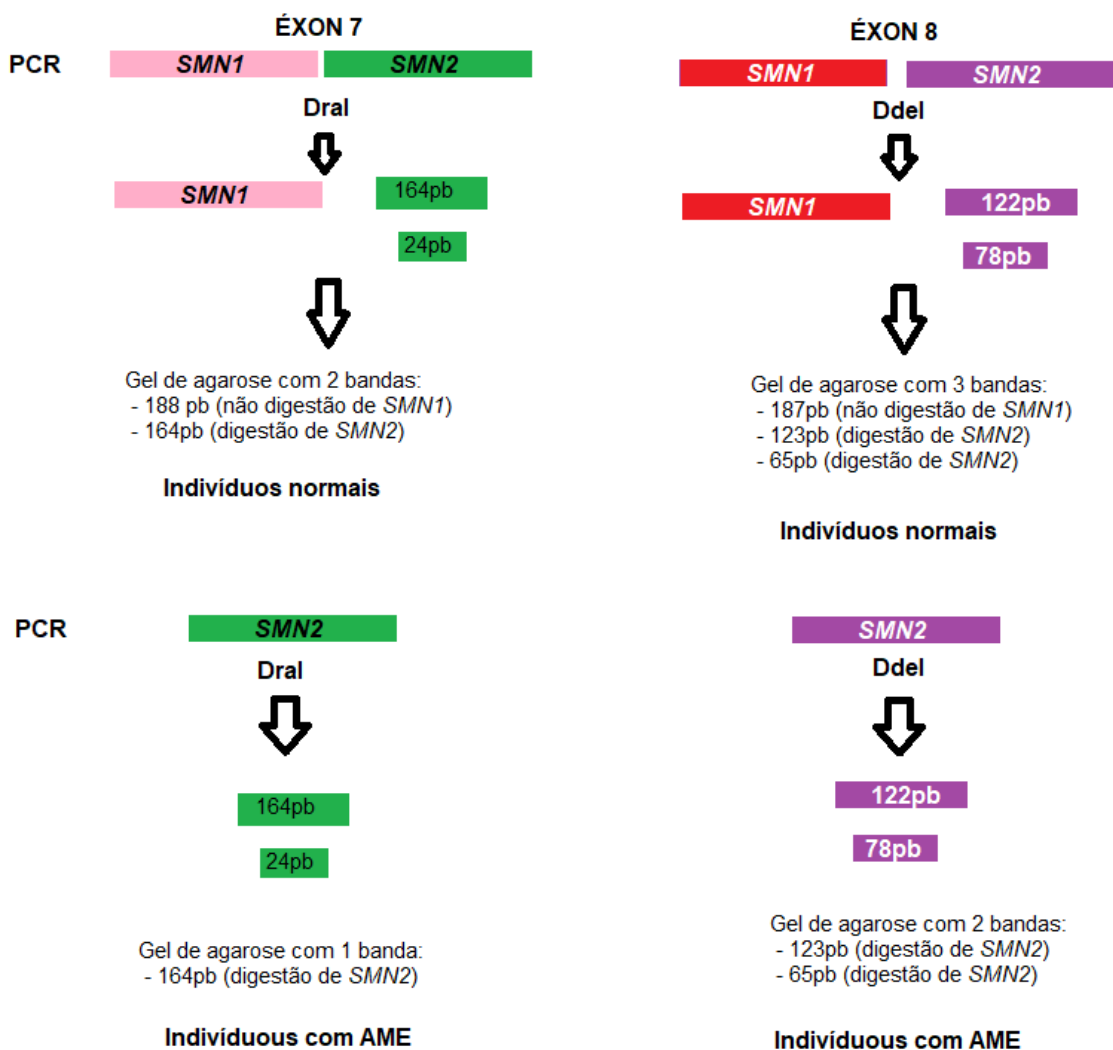
A especificidade do método é de 100% quando a enzima de restrição apropriada é utilizada. Para o controle de qualidade, amostras de DNA contendo alelos mutantes e comuns devem ser incluídos na análise. O método também deve ser ajustado para condições que não permitam que resultados falsos positivos sejam obtidos quando quantidade variável e diferentes proporções de DNA mutante e selvagem estejam sendo analisadas. Resultados questionáveis deverão ser confirmados por repetição dos testes e sequenciamento de DNA (Hirata, 2010).

De acordo com van der Steege e colaboradores (1995), esse método auxilia a separação entre os genes *SMN1* e *SMN2* devido a troca de bases nos éxons 7 e 8. A endonuclease de restrição Dral age sobre os produtos de amplificação do gene *SMN2*, devido a um sítio de restrição gerado pela amplificação com o primer reverso, no éxon 7. A enzima Ddel também atua sobre o produto da PCR do gene *SMN2* quando se trata do éxon 8 (Scheffer et al, 2001).

Após a digestão com Dral, o produto do éxon 7 do gene *SMN1* não é digerido, enquanto que o produto do éxon 7 do gene *SMN2* será digerido em dois fragmentos de 164 e 24 pares de bases. Os fragmentos migram no gel de modo que vemos apenas duas bandas com 188 e 164 pb em amostras normais em gel de agarose. Os fragmentos de restrição gerados após a digestão do éxon 8 do gene *SMN2* são de 122 e 78 pares de bases e os produtos do éxon 8 do

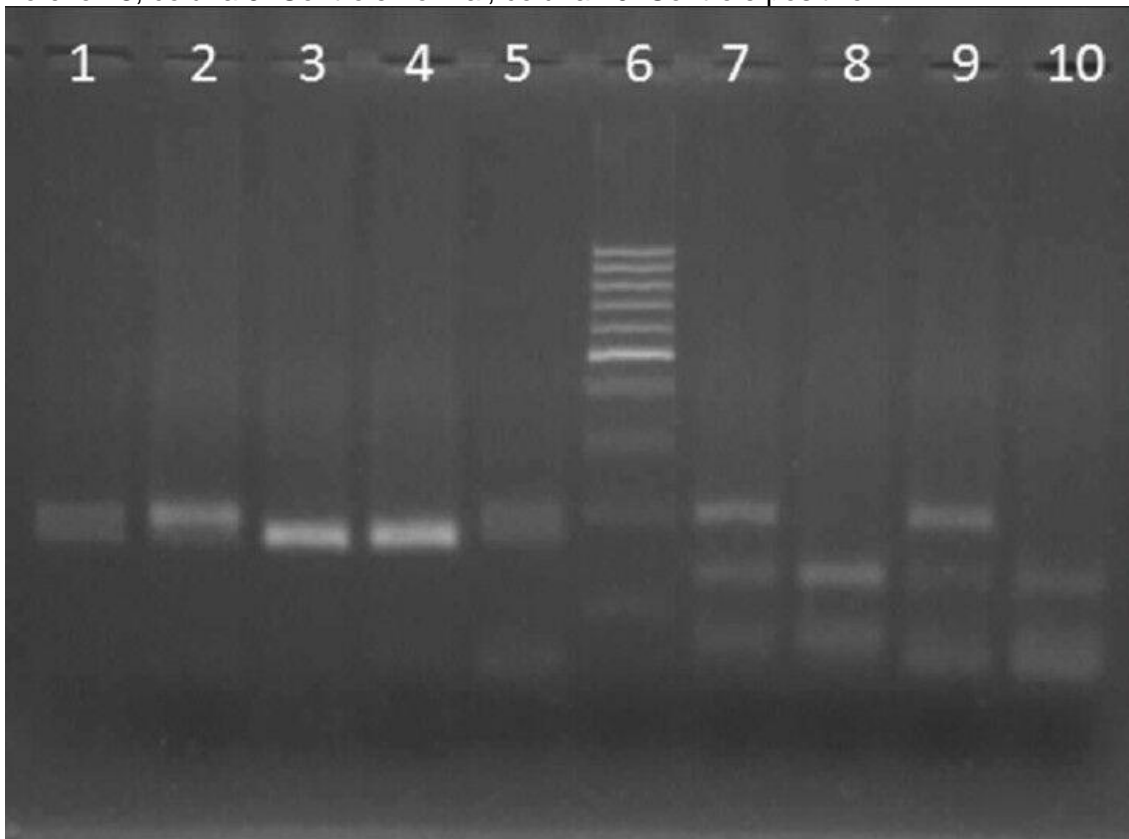
gene *SMN1* não serão digeridos. Assim, em amostras normais serão observadas três bandas de 187, 123 e 65 pb. Nas amostras dos pacientes, os alelos de *SMN1* não estão presentes, não havendo banda de 188 pb, referente ao éxon 7, e tampouco a banda de 187 pb, referente ao éxon 8. Nos indivíduos afetados somente encontra-se as bandas do gene *SMN2* digerido (Figura 11 e 12) (Sedghi et al, 2014).

Figura 11 - Representação do PCR-RFLP utilizando as enzimas de restrição *DraI* e *DdeI* para diagnóstico da AME.



Fonte: o autor.

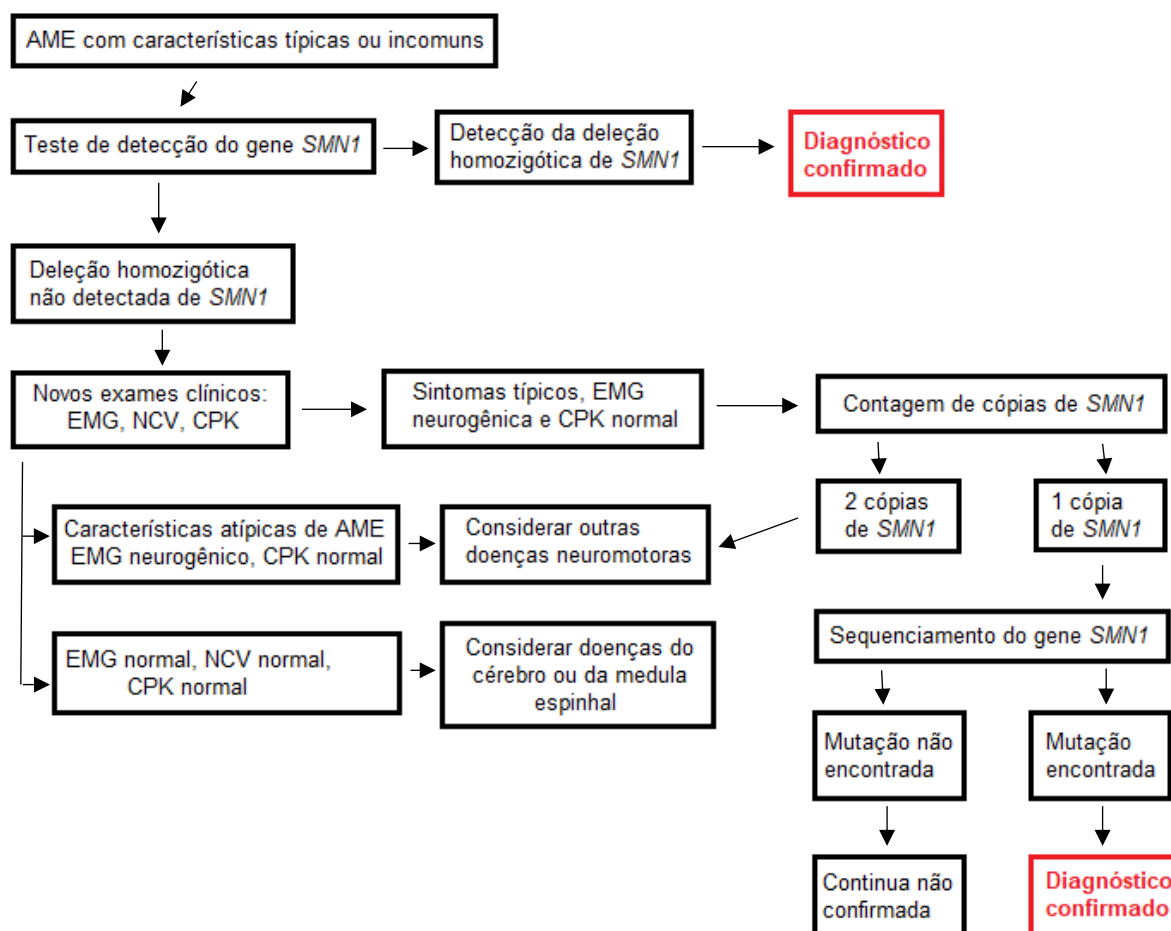
Figura 12 - Detecção de exclusão do gene *SMN 1* (éxon 7, 8) realizada por digestão do produto da reação em cadeia da polimerase com *DraI* e *DdeI*, respectivamente, em gel de agarose a 3%. Colunas 1 e 2: Diferentes pacientes sem deleção no éxon 7 do gene neurônio motor de sobrevivência1 (*SMN1*), coluna 3: Paciente com exclusão no éxon 7, coluna 4: Controle positivo e coluna 5: Controle normal, coluna 6: marcador de 100 pb; Coluna 7: Paciente sem deleção no éxon 8 de *SMN*, coluna 8: Paciente com exclusão no éxon 8, coluna 9: Controle normal, coluna 10: Controle positivo.



Fonte: Sedghi et al (2014).

Sendo assim, mediante as ferramentas apresentadas, D'Amico e colaboradores (2011) desenvolveram um fluxograma para direcionar a avaliação clínica e exames de modo a identificar inequivocamente a AME (Figura 13).

Figura 13 - Fluxo amostral de diagnóstico para a atrofia muscular espinhal. EMG (eletromiografia de agulha) e NCV (Condução Nervosa ou neurocondução) são as divisões do ENMG.



Modificado de: D'Amico et al, 2011.

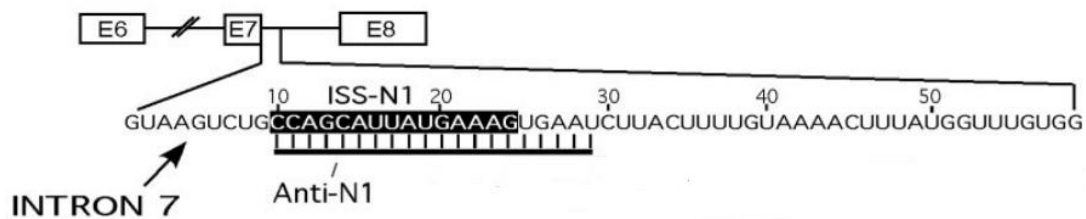
#### 4.6 Tratamento

Múltiplas abordagens foram exploradas como métodos potenciais para aumentar a produção de proteína SMN a partir de *SMN2*, incluindo o aumento da transcrição, a modulação de *splicing* de éxon 7 de *SMN2*, induzindo a leitura translacional através da transcrição de *SMNΔ7* e aumentando a estabilidade da proteína SMN. Um dos métodos mais promissores é o redirecionamento do *splicing SMN2* do éxon 7 através de oligonucleotídeos antissentido (ASOs – do inglês, anti-sense oligonucleotides), oligonucleotídeos curtos projetados para reconhecer as sequências complementares dentro de um gene de interesse. ASOs podem exercer sua influência sobre o éxon 7 de *SMN2* através de

múltiplas formas, como bloqueando a ligação de fatores de proteína de ação *trans*, causando rearranjos estruturais dentro da molécula de RNA alvo ou recrutando fatores de proteína trans-atuantes adicionais para a molécula alvo, no caso de ASOs bifuncionais (Ottesen, 2017).

No estudo promovido por Singh et al (2006) foi descoberta a região *intronic splicing silencer N1* (ISS-N1) localizada na extremidade 5' da região *suppress splice site* (ss) responsável pela exclusão do éxon 7 de *SMN2*. E os mesmos estudaram uma maneira para bloquear a leitura da região ISS-N1. Para isso, utilizaram uma abordagem baseada em oligonucleotídeos antissentido para demonstrar conclusivamente a natureza inibitória de ISS-N1. Nesta abordagem, a sequência ISS-N1 (CCAGCAUUAUGAAAG), localizada na porção não conservada do íntron 7 do gene *SMN* do ser humano, foi bloqueada pelo oligonucleotídeos antissentido Anti-N1 (Figura 14) (Singh et al, 2006).

Figura 14 - Representação do gene *SMN 2*, detalhando o íntron 7 para análise e observação do ISS-N1 e do Anti-N1.



Modificado de: Singh et al, 2006.

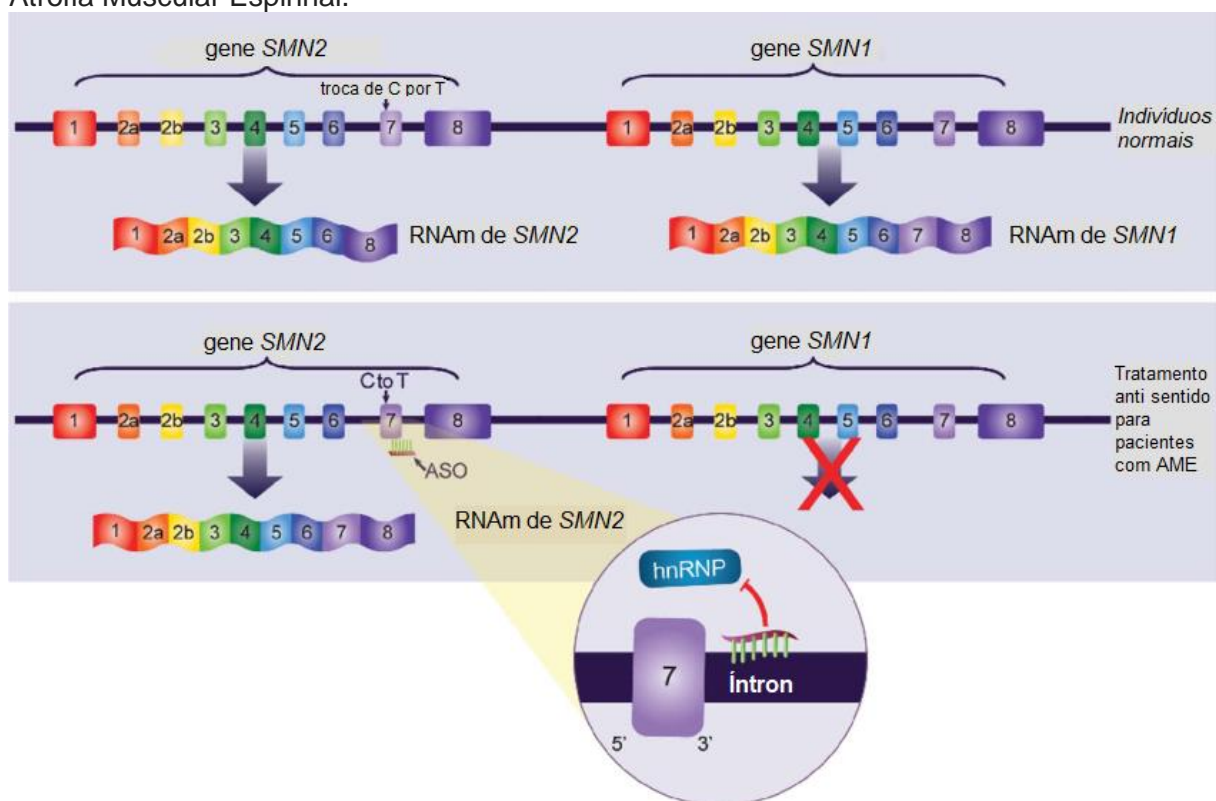
Como os pesquisadores estimavam, o Anti-N1 restaurou totalmente a inclusão do éxon 7 no gene *SMN2*, já que ISS-N1 confere um efeito inibitório muito forte na inclusão do éxon 7 de *SMN2* (Singh et al, 2006; Ottesen, 2017). O resultado foi muito específico já que não foram observados efeitos fora do alvo em *splicing* alternativo num ensaio envolvendo outros 8 genes. Contudo, os pesquisadores ainda ressaltam que o efeito positivo mediado pelo anti-N1 depende restritamente do emparelhamento da base com o alvo (Singh et al, 2006).

O bloqueio de ISS-N1 por Anti-N1 restaurando a inclusão do éxon 7 no RNAm derivado de *SMN2* demonstra a viabilidade de um oligonucleotídeo íntron interativo superar completamente o efeito inibitório de uma mutação exônica

responsável pela produção de uma proteína truncada nas células do paciente (Singh et al, 2016).

O mecanismo de ação específico para o Spinraza™ é o ASO aumentar a proporção de inclusão do éxon 7 em transcrições do ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) do *SMN2*, por ligar-se na região de silenciamento de *splicing* intrónico (ISS-N1) localizada no íntron 7 do ácido ribonucleico pré-mensageiro (pré-RNAm) do *SMN2* (Figura 15). Ao ligar-se, o ASO desloca os fatores de *splicing* que normalmente suprimiriam o mecanismo, levando à retenção do éxon 7 no RNAm do *SMN2* (Spiranza, 2017).

Figura 15 - Representação do mecanismo de ação do ASO utilizado no tratamento da Atrofia Muscular Espinhal.



Modificado de: Chiriboga et al, 2016.

Uma vez observada que a exclusão de ISS-N1 promoveu a inclusão do éxon 7 em todas as linhas celulares, incluindo células de rato, conclui-se que os fatores específicos de tecido não estão envolvidos na regulação mediada por ISS-N1 de *splicing* alternativo do éxon 7 (Singh et al, 2006).

Spiranza™ foi aprovado pelo FDA (do inglês, *Food and Drug Administration*) e pela Anvisa para o tratamento de SMA leve e grave após

mostrar-se seguro e eficaz na elevação dos níveis de proteína SMN e na redução da gravidade da doença da AME (Anvisa, 2017). A maioria dos ensaios clínicos de Spinraza™ tem focado no tratamento de bebês sintomáticos e crianças já diagnosticadas com SMA, idade em que muitas mudanças já ocorreram em neurônios motores. Um ensaio clínico em andamento está tratando bebês diagnosticados com AME que não exibiram sintomas, na tentativa de prevenir a degeneração dos neurônios motores como uma abordagem promissora e eficaz contra a AME (Ottesen, 2017; Anvisa, 2017).

O Spinraza™ possui como substância ativa a Nusinersen e é administrado em injeção intratecal devido a dificuldade dos fármacos oligonucleotídicos antisentidos atravessarem uma barreira hematoencefálica intacta quando administrados de forma sistêmica (Chiriboga et al, 2016).

## 5. CONCLUSÃO

Com o desenvolvimento do Spinraza, observa-se uma esperança para os pacientes acometidos pela AME e suas famílias de vencerem essa batalha. Além do mais, faz-se necessário explicitar a doença para que seu conhecimento se torne, cada vez mais, disseminado pela população visando o desenvolvimento de novos tratamentos. Além de propostas de novos métodos de diagnóstico, para uma investigação mais inequívoca, visando sempre, uma melhor qualidade de vida ao paciente.

Neste trabalho, percebe-se que o universo celular é muito maior e mais complexo que se imagina. Um mecanismo que poderia ser considerado simples, como a duplicação do material genético por meio da recombinação homóloga, acarreta na produção de uma proteína truncada devido a um bloqueio do *splicing* do éxon 7 do gene *SMN2*, pela troca de uma base nitrogenada nessa região gênica.

Ainda não há a elucidação da função da proteína no organismo, porém já é sabido que a diminuição da sua concentração no corno anterior da medula espinhal provoca atrofia dos músculos interligados à mesma, além de induzir a perda progressiva de movimentos de outros músculos. Com isso, sugere-se novas pesquisas para elucidar a importância da proteína e sua relação com a atrofia muscular espinhal, além do desenvolvimento de novas técnicas de diagnóstico.

## REFERÊNCIAS

Akutsu T, Nishio H, Sumino K, Takeshima Y, Tsuneishi S, Wada H et al. Molecular Genetics of Spinal Muscular Atrophy: Contribution of the NAIP Gene to Clinical Severity. *Kobe J. Med. Sci.* 2002;48:25-31.

Anvisa – Agência de Vigilância Sanitária [internet]. 2017 [atualizada em 01 set. 2017; acesso 02 set. 2017]. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/resultado-de-busca?p\\_p\\_id=101&p\\_p\\_lifecycle=0&p\\_p\\_state=maximized&p\\_p\\_mode=view&p\\_p\\_col\\_id=column-1&p\\_p\\_col\\_count=1&\\_101\\_struts\\_action=%2Fasset\\_publisher%2Fview\\_content&\\_101\\_assetEntryId=3545065&\\_101\\_type=content&\\_101\\_groupId=219201&\\_101\\_urlTitle=anvisa-concede-registro-ao-medicamento-spinraza&redirect=http%3A%2F%2Fportal.anvisa.gov.br%2Fresultado-de-busca%3Fp\\_p\\_id%3D3%26p\\_p\\_lifecycle%3D0%26p\\_p\\_state%3Dnormal%26p\\_p\\_mode%3Dview%26p\\_p\\_col\\_id%3Dcolumn-1%26p\\_p\\_col\\_count%3D1%26\\_3\\_groupId%3D0%26\\_3\\_keywords%3Dnusers%26\\_3\\_cur%3D1%26\\_3\\_struts\\_action%3D%252Fsearch%252Fsearch%26\\_3\\_format%3D%26\\_3\\_formDate%3D1441824476958&inheritRedirect=true](http://portal.anvisa.gov.br/resultado-de-busca?p_p_id=101&p_p_lifecycle=0&p_p_state=maximized&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-1&p_p_col_count=1&_101_struts_action=%2Fasset_publisher%2Fview_content&_101_assetEntryId=3545065&_101_type=content&_101_groupId=219201&_101_urlTitle=anvisa-concede-registro-ao-medicamento-spinraza&redirect=http%3A%2F%2Fportal.anvisa.gov.br%2Fresultado-de-busca%3Fp_p_id%3D3%26p_p_lifecycle%3D0%26p_p_state%3Dnormal%26p_p_mode%3Dview%26p_p_col_id%3Dcolumn-1%26p_p_col_count%3D1%26_3_groupId%3D0%26_3_keywords%3Dnusers%26_3_cur%3D1%26_3_struts_action%3D%252Fsearch%252Fsearch%26_3_format%3D%26_3_formDate%3D1441824476958&inheritRedirect=true)

Araujo AP de Q-C, Ramos VG, Cabello PH. Dificuldades diagnósticas na . *Arq. Neuro-Psiquiatr.* São Paulo. 2005;63(1):145-149.

Baioni MTC, Ambiel CR. Atrofia muscular espinhal: diagnóstico, tratamento e perspectivas futuras. *J. Pediatr.* 2010;86(4):261-270.

Beattie CE, Carrel TL, Mcwhorter ML. Fishing for a mechanism: using zebrafish to understand spinal muscular atrophy. *J Child Neurol.* 2007; 22(8):995-1003.

Biogen. Spiranza [internet]. Cambridge [atualizado maio 2017; acesso em 4 ago 2017]. Disponível em: [https://www.spinraza-hcp.com/content/dam/commercial/specialty/spinraza/hcp/en\\_us/pdf/spinraza-prescribing-information.pdf](https://www.spinraza-hcp.com/content/dam/commercial/specialty/spinraza/hcp/en_us/pdf/spinraza-prescribing-information.pdf)

Brzustowicz LM, Lehner T, Castilla LH, Penchaszadeh GK, Wilhelmsen KC, Daniels R, et al. Genetic mapping of chronic childhood-onset spinal muscular atrophy to chromosome 5q1 1.2 13.3. *Nature.* 1990;344(6266):540-541.

Burghes AH, Beattie CE. Spinal muscular atrophy: why do low levels of survival motor neuron protein make motor neurons sick?. *Nat Rev Neurosci.* 2009;10(8):597-609.

Burghes AH. When is a deletion not a deletion? When it is converted. *American journal of human genetics*. 1997;61(1):9-15.

Bürglen L, Lefebvre S, Clermont O, Burlet P, Viollet L, Cruaud C, et al. Structure and organization of the human survival motor neurone (SMN) gene. *Genomics*. 1996;32(3):479-82.

Campbell L, Potter A, Ignatius J, Dubowitz V, Davies K. Genomic Variation and Gene Conversion in Spinal Muscular Atrophy: Implications for Disease Process and Clinical Phenotype. *The American Society of Human Genetics*. 1997;61:40-50.

Chang H, Hung W, Chuang Y, Jong Y. Degradation of survival motor neuron (SMN) protein is mediated via the ubiquitin/proteasome pathway. *Neurochemistry International*. 2004;45:1107–1112.

Chiriboga CA, Swoboda KJ, Darras BT, Iannaccone ST, Montes J, De Vivo DC, et al. Results from a phase 1 study of nusinersen (ISIS-SMNRx) in children with spinal muscular atrophy. *American Academy of Neurology*. 2016;86:890–897.

Cho EH, Park BY, Cho JH, Kang YS. Comparing two diagnostic laboratory tests for several microdeletions causing mental retardation syndromes: multiplex ligation-dependent amplification vs fluorescent in situ hybridization. *The Korean journal of laboratory medicine*. 2009;29(1):71-76.

Covert DD, Le TT, McAndrew PE, Strasswimmer J, Crawford TO, Mendell JR, et al. The survival motor neuron protein in spinal muscular atrophy. *Human Molecular Genetics*. 1997;6(8):1205-1214.

D'Amico A, Mercuri E, Tiziano FD, Bertini E. Spinal muscular atrophy. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 2011;6:71-81.

Dastur RS, Gaitonde PS, Khadilkar SV, Udani VP, Nadkarni JJ. Correlation between deletion patterns of SMN and NAIP genes and the clinical features of spinal muscular atrophy in Indian patients. *Neurology India*. 2006;54(3):255-259.

Dutra RL. Investigação da variação no número de cópias genômicas (CNVs) em pacientes com anomalias congênitas e atraso de desenvolvimento neuropsicomotor (ADNPM) pela técnica de MLPA (Multiplex Ligation-dependent

Probe Amplification). São Paulo. Tese [Doutorado em Ciências] – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2014.

Gentier RJ, van Leeuwen FW. Misframed ubiquitin and impaired protein quality control: an early event in Alzheimer's disease. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2015;8(47):1-12.

Godinho FMS. Análise molecular dos genes SMN1 e SMN2 em pacientes com suspeita clínica de atrofia muscular espinal. Rio Grande do Sul. Tese [Pós graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica] – Instituto de Ciências Básicas da Saúde; 2010.

González JR, Carrasco JL, Armengol L, Villatoro S, Jover L, Yasui Y, et al. Probe-specific mixed-model approach to detect copy number differences using multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA). *BMC bioinformatics*. 2008;9(1):1-15.

Hirata MH, Tavares V, Hirata RDC. Da biologia molecular à medicina: métodos comumente utilizados em farmacogenética. *Medicina (Ribeirão Preto)* 2006;39(4):522-34.

Jędrzejowska M, Milewski M, Zimowski J, Borkowska J, Kostera-Pruszczyk A, Sielska D, et al. Phenotype modifiers of spinal muscular atrophy: the number of SMN2 gene copies, deletion in the NAIP gene and probably gender influence the course of the disease. *Acta Biochimica Polonica*. 2009;56(1):103-108. Jennings LJ, Yu M, Fitzpatrick C, Smith FA. Validation of multiplex ligation-dependent probe amplification for confirmation of array comparative genomic hybridization. *Diagn Mol Pathol*. 2011;20(3):166-74.

Kerr DA, Nery JP, Traystman RJ, Chau BN, Hardwick JM. Survival motor neuron protein modulates neuron-specific apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(24):13312-7.

Kolb SJ, Battle DJ, Dreyfuss G.. Molecular functions of the SMN complex. *J Child Neurol*. 2007;22(8):990-4.

Kostova FV, Williams VC, Heemskerk J, Iannaccone S, DiDonato C, Swoboda K, et al. Spinal Muscular Atrophy: Classification, Diagnosis, Management, Pathogenesis, and Future Research Directions. *Journal of Child Neurology*. 2007; 22(8):926-945.

Kozlowski P, Jasinska AJ, Kwiatkowski DJ. New applications and developments in the use of multiplex ligation-dependent probe amplification. *Electrophoresis*. 2008;29(23):4627-4636.

Laboratório Alvaro [internet]. [atualizado 8 jan 2011; acesso em 13 jun 2017]. Disponível em: <http://www.alvaro.com.br/laboratorio/menu-exames/CPK>

Lefebvre S, Bürglen L, Reboullet S, Clermont O, Burlet P, Viollet L, et al. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell*. 1995;80(1):155-65.

Lunn MR, Wang CH. Spinal muscular atrophy. *The Lancet*. 2008;371(9630):2120-33.

Machado J, Krinski K, Elsangedy HM, Cieslak F, Lopes G, Gomes ARS. Vias de sinalização intracelular na atrofia muscular e no treinamento resistido. *Fisioter. Mov.* 2009;22(3):383-393.

Mandal K, Boggula VR, Borkar M, Agarwal S, Phadke SR. Use of multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) in screening of subtelomeric regions in children with idiopathic mental retardation. *Indian J Pediatr*. 2009 Oct;76(10):1027-31.

Omrani O, Bonyadi M, Barzgar M. Molecular analysis of the SMN and NAIP genes in Iranian spinal muscular atrophy patients. *Pediatrics International*. 2009;51:193-196.

Oskoui M, Levy G, Garland CJ, Gray JM, O'Hagen J, De Vivo DC, et al. The changing natural history of spinal muscular atrophy type 1. *Neurology*. 2007;69(20):1931-6.

Ottesen EW. ISS-N1 makes the first FDA-approved drug for spinal muscular atrophy. *Translational Neuroscience*. 2017;8:1-6.

Panozzo C, Frugier T, Cifuentes-Diaz C, Melki J. Spinal muscular atrophy. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 2001;8:5833-5843.

Pohovski LM, Dumic KK, Odak L, Barisic I. Multiplex ligation-dependent probe amplification workflow for the detection of submicroscopic chromosomal

abnormalities in patients with developmental delay/intellectual disability. *Mol Cytogenet.* 2013;6(1):7.

Rodrigues NR, Talbot K, Davies KE. Molecular genetics of autosomal recessive spinal muscular atrophy. *Molecular Medicine.* 1996;2(4):400-404.

Rooms L, Vandeweyer G, Reyniers E, van Mol K, de Canck I, Van der Aa N, et al. Array-based MLPA to detect recurrent copy number variations in patients with idiopathic mental retardation. *Am J Med Genet A.* 2011;155A(2):343-8.

Roy N, Mahadevan MS, McLean M, Shutler G, Yaraghi Z, Farahani R, et al. The Gene for Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein Is Partially Deleted in Individuals with Spinal Muscular Atrophy. *Cell,* 1995;80:167-178.

Russman BS. Spinal muscular atrophy: clinical classification and disease heterogeneity. *Journal of child neurology.* 2007;22(8):946-51.

Scheffer H, Cobben JM, Matthijs G, Wirth B. Best practice guidelines for molecular analysis in spinal muscular atrophy. *European Journal of Human Genetics.* 2001;9:484-491.

Schouten JP1, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res.* 2002;30(12):e57.

Sedghi M, Behnam M, Fazel E, Salehi M, Ganji H, Meamar R, et al. Genotype-phenotype correlation of survival motor neuron and neuronal apoptosis inhibitory protein genes in spinal muscular atrophy patients from Iran. *Advanced Biomedical Research.* 2014;3:74.

Shen Y, Wu, B. Designing a simple multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) assay for rapid detection of copy number variants in the genome. *Journal of Genetics and Genomics.* 2009;36(4):257-265.

Singh NK, Singh NN, Androphy EJ, Singh RN. Splicing of a Critical Exon of Human Survival Motor Neuron Is Regulated by a Unique Silencer Element Located in the Last Intron. *Molecular and Cellular Biology.* 2006;26(4): 1333–1346.

Strachan T, Read A. Mapeamento Genético de Caracteres Mendelianos. In: \_\_\_\_\_. Genética Molecular Humana. 4 edição. São Paulo: Artmed Editora; 2013. p. 441-466.

Tsai C, Jong Y, Hu C, Chen C, Shih M, Chang C, et al. Molecular analysis of SMN, NAIP and P44 genes of SMA patients and their families. *Journal of the Neurological Sciences*. 2001;190:35-40.

University of Florida – The Foundation for The Gator Nation [internet]. Gainesville [atualizado 19 mar 2011; acesso 15 jan 2017] Disponível em: <https://www.peds.ufl.edu/divisions/genetics/teaching/chromosomes/5.htm>

Van der Steege G, Grootsholten PM, van der Vlies P, Draaijers TG, Osinga J, Cobben JM, et al. PCR-based DNA test to confirm clinical diagnosis of autosomal recessive spinal muscular atrophy. *The Lancet*. 1995;345:985-986.

Villamón E1, Piqueras M, Mackintosh C, Alonso J, de Alava E, Navarro S, et al. Comparison of different techniques for the detection of genetic risk-identifying chromosomal gains and losses in neuroblastoma. *Virchows Arch*. 2008;453(1):47-55.

Vorstman JAS, Jalali GR, Rappaport EF, Hacker AM, Scott C, Emanuel BS. MLPA: a rapid, reliable, and sensitive method for detection and analysis of abnormalities of 22q. *Hum Mutat*. 2006;27:814-821.

Wang CH, Finkel RS, Bertini ES, Schroth M, Simonds A, Wong B, et al. Consensus statement for standard of care in spinal muscular atrophy. *Journal of Child Neurology*. 2007;22(8):1027-49.

Watihayati MS, Fatemeh H, Marini M, Atif AB, Zahiruddin WM, Sasongko TH et al. Combination of SMN2 copy number and NAIP deletion predicts disease severity in spinal muscular atrophy. *Brain & Development*. 2009;31:42-45.

Watson JD, Baker TA, Bell SP, Gann A, Levine M, Losick R. Recombinação homóloga em nível molecular. In: \_\_\_\_\_. *Biologia Molecular do Gene*. 7 edição. São Paulo: Artmed Editora; 2015. p. 341-376.

Wirth B, Brichta L, Hahnen E. Spinal muscular atrophy: from gene to therapy. In: *Seminars in pediatric neurology*. WB Saunders. 2006;13(2):121-31.

Wirth B, Schmidt T, Hahnen E, Rudnik-Scho"neborn S, Krawczak M, Mu"ller-Myhsok B, et al. 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.* 1997;61:1102–1111.

Wirth B. An Update of the Mutation Spectrum of the Survival Motor Neuron Gene (SMN1) in Autosomal Recessive Spinal Muscular Atrophy (SMA). *Human Mutation.* 2000;15:228-237.

Zanardo EA. Avaliação de métodos citogenômicos para diagnóstico de pacientes com malformações congênitas e atraso do desenvolvimento neuropsicomotor. São Paulo. Tese [Mestrado em Ciências] – Universidade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2014.

Zanoteli E, Peres ABA, Oliveira ASB, Gabbai AA. Biologia molecular nas doenças do neurônio motor. *Rev Neurociências.* 2004;12(1):24-29.