

**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

**Facultades de Ciencias Exactas y Naturales,  
Farmacia y Bioquímica, y Medicina**

**TESIS DE MAESTRIA EN  
BIOLOGIA MOLECULAR MÉDICA**

***“Influencia del número de copias del gen SMN2 y de la delección  
del gen NAIP en el fenotipo de la Atrofia Muscular Espinal”***

***María Sofía Medrano***

**2013**

**Trabajo de Tesis de Maestría para optar al título de Magister de la Universidad de Buenos Aires en Biología Molecular Médica por:**

**María Sofía Medrano**

Director de Tesis:

**Dra. Lilien Chertkoff**

Co-director de Tesis:

**Dra. María Soledad Monges**

Este trabajo fue realizado:

En el Laboratorio de Biología Molecular-Servicio de Genética. Hospital de Pediatría “Prof. Dr Juan P Garrahan”.

## *Agradecimientos*

- *En primer lugar quisiera agradecer a la Dra. Lilien Chertkoff, mi directora de Tesis, por confiar en mí, guiarme y compartir conmigo todos sus valiosos conocimientos durante este proyecto de investigación. Por su generosidad y calidez humana.*
- *A la Dra. Soledad Monges, mi co-directora de Tesis, por enseñarme los diversos aspectos de esta patología compleja y por su colaboración durante la realización del trabajo así como también por sus valiosos aportes.*
- *A los integrantes del Grupo Interdisciplinario de Atención de Pacientes Neuromusculares del Hospital de Pediatría J. P. Garrahan, sin los cuales hubiera sido imposible llevar a cabo el trabajo.*
- *Al Dr. Eduardo Tizzano, por su valiosa colaboración y aporte científico en este proyecto.*
- *A mis compañeros, Pablo, Verónica, Eugenia, Carolina, Mara, Bárbara y Abel por ayudarme siempre. Por sus consejos, su paciencia, su buena onda, predisposición y colaboración.*
- *A Patricia, Cristina, Natalia y Norita que me ofrecieron siempre su ayuda desinteresadamente.*
- *Al Hospital Garrahan, y en particular al Servicio de Genética, por permitirme llevar a cabo este trabajo.*
- *A mis hermanos, con quienes compartí momentos inolvidables de mi vida.*
- *A mis padres, por confiar siempre en mí, apoyarme y darme ganas de seguir creciendo todos los días. Por estar siempre presentes y ser un ejemplo de vida.*
- *A mi marido, por acompañarme, por su paciencia y su amor.*

## Contenido

<i>Resumen</i> .....	2
<i>Abstract</i> .....	5
<i>INTRODUCCIÓN</i> .....	8
<i>OBJETIVOS</i> .....	20
<i>POBLACIÓN DE ESTUDIO</i> .....	22
<i>METODOLOGÍA</i> .....	23
<i>RESULTADOS</i> .....	31
<i>DISCUSIÓN</i> .....	43
<i>CONCLUSIONES</i> .....	51
<i>BIBLIOGRAFÍA</i> .....	54
ANEXO 1. Fichas de Evaluación Clínica-Neurológica	
ANEXO 2. Aprobación del Comité de Ética del Hospital J. P. Garrahan	
ANEXO 3. Información clínico-molecular de pacientes AME I, AME II y AME III	

## Resumen

La Atrofia Muscular Espinal (AME) es una de las enfermedades autosómicas recesivas más frecuentes, y es causada por mutaciones en el gen *SMN1*. Esta enfermedad neuromuscular se caracteriza por degeneración de las motoneuronas del asta anterior de la medula espinal resultando en atrofia y debilidad muscular progresiva. Existen 4 formas clínicas de presentación desde la manifestación neonatal severa a la forma del adulto con mínima debilidad. La severidad de la enfermedad se ha correlacionado con el número de copias del gen *SMN2*, altamente homólogo y cercano a *SMN1*. El gen *SMN2*, a diferencia de *SMN1*, produce sólo un 10%-15% de proteína SMN activa. Actualmente se están desarrollando estudios de investigación clínicos con medicamentos que estimulan una mayor síntesis de proteína activa a partir de *SMN2*, entre ellos ácido valproico (VPA) y 4-fenilbutirato. Otro gen cercano a *SMN1*, denominado *NAIP*, se encuentra deletado en la mayoría de los pacientes con AME severa.

### Objetivos

El objetivo principal de este trabajo fue evaluar la influencia del número de copias del gen *SMN2* y la ausencia del gen *NAIP*, en el fenotipo AME en niños diagnosticados en el Hospital de Pediatría J. P. Garrahan. Para ello:

- Se determinó el número de copias del gen *SMN2* mediante dos metodologías semicuantitativas de biología molecular
- Se estableció la presencia o ausencia del gen *NAIP*
- Se realizó un estudio de correlación Genotipo-Fenotipo en los niños con AME de nuestra población

## **Pacientes y Métodos**

Se estudiaron 144 niños con diagnóstico de AME; los mismos fueron categorizados de acuerdo a los criterios establecidos por el Consenso Internacional de AME “*Consensus Statement for Standard of Care in Spinal Muscular Atrophy, 2007*”. El número de copias del gen *SMN2* se determinó mediante MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) y PCR a tiempo real. La ausencia del gen *NAIP* se determinó mediante la metodología de MLPA.

## **Resultados**

El número de copias del gen *SMN2* pudo ser determinado mediante MLPA en la totalidad de los pacientes. Con la PCR a tiempo real se pudo establecer en 119/144 pacientes. Los resultados obtenidos por ambas técnicas fueron equivalentes en el 95% de los casos.

Todos los niños con AME tipo I presentaron 2 copias, mientras que más del 98% de los pacientes con AME tipo II y III mostraron entre 3 y 4 copias de *SMN2*. Sólo en el grupo AME tipo III se observaron 4 copias de *SMN2*, siendo éstas más frecuente en los pacientes con el subtipo IIIb.

El gen *NAIP* estuvo ausente en el 73,2% de los niños con AME tipo I y presente en más del 85% de los pacientes con AME tipo II y III.

## **Conclusiones**

La metodología de MLPA resultó ser más robusta que la PCR a tiempo real y brinda mayor información acerca de la región AME.

El número de copias del gen *SMN2* y la ausencia del gen *NAIP* mostraron ser modificadores del fenotipo clínico de AME en la población estudiada. Estos biomarcadores no alcanzan a explicar la totalidad de los casos, sugiriendo la existencia

de otros factores modificadores que aún no se conocen y deberán ser revelados en futuras investigaciones.

El presente proyecto contribuyó a la incorporación de una nueva metodología que aumenta la sensibilidad diagnóstica (superando el 95%) y que permite la detección de portadores en el grupo familiar.

## Abstract

Spinal Muscular Atrophy (SMA) is one of the most common autosomal recessive illnesses, caused by mutations of the *SMN1* gene. SMA is characterized by symmetric proximal muscle weakness secondary to degeneration of the anterior horn cells of the spinal cord. SMA is clinically subdivided into four types, ranging from the severe neonatal presentation to the adult form with minimum weakness. Phenotypic variability has been associated with the number of copies of *SMN2*, a gene that is highly homologous and close to *SMN1*. Unlike *SMN1*, the *SMN2* gene produces only 10%-15% of functional protein. Currently several clinic research studies are being developed with drugs that stimulate increased synthesis of functional SMN protein from *SMN2*, including valproic acid (VPA) and 4-phenylbutyrate. Another gene close to *SMN1*, called *NAIP*, is deleted in most patients with severe SMA.

### Objectives

The main objective of this work was to evaluate the influence of the *SMN2* copy number and absence of *NAIP* gene, in SMA phenotype in children diagnosed at the Pediatric Hospital J.P Garrahan. For this purpose:

- *SMN2* copy number was determined through two semiquantitative molecular biology methodologies.
- Presence or absence of *NAIP* gene was established.
- A genotype-phenotype correlation study was conducted in SMA children of our population.

### Patients and Methodology

We studied 144 children diagnosed with SMA; these were categorized according to the criteria established by the “*Consensus Statement for Standard of Care in Spinal*



*Muscular Atrophy, 2007*". The number of copies of the SMN2 gene was determined by MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) and Real Time PCR. The absence of NAIP gene was established by MLPA.

## **Results**

The SMN2 copy number could be determined in all patients by MLPA. With the real time PCR it could be established in 119/144 patients. The results obtained by both techniques were equivalent in 95% of cases.

All children with SMA type I had 2 copies of SMN2, while over 98% of patients with SMA type II and III showed between 3 and 4 SMN2 copies. Only in the group of patients with SMA type III were observed 4 copies of SMN2, being these more frequent in patients with the subtype IIIb.

The NAIP gene was absent in 73,2% of children with SMA type I and present in more than 85% of patients with SMA type II and III.

## **Conclusions**

The MLPA methodology proved to be more robust than the real-time PCR and provides more information about the SMA region.

The number of copies of SMN2 and the absence of NAIP gene showed to be modifiers of the clinical phenotype of SMA in the study population. These biomarkers do not explain all cases, suggesting the existence of other modifying factors that are still unknown and should be disclosed in future research.

This project contributed to the incorporation of a new methodology that increases the diagnostic sensitivity (exceeding 95%) and allows the detection of carriers in the family group.

## ***INTRODUCCIÓN***

---

La Atrofia Muscular Espinal (AME) es una enfermedad neurodegenerativa, que fue descrita por primera vez en la segunda mitad del siglo XIX por el neurólogo austríaco Guido Werdnig (1844-1919) y el alemán Johann Hoffmann (1850-1919). Desde 1995, gracias a la identificación del gen causante de la patología por el grupo de la Dra. Judith Melki, se ha avanzado en el conocimiento de las bases moleculares de la AME.

La AME es considerada una de las principales causas de mortalidad infantil genéticamente determinada, es de herencia autosómica recesiva e involucra al gen *SMN1* (*Survival Motor Neuron 1*, OMIM #600354), ubicado en el brazo largo del cromosoma 5 (5q13). La incidencia aproximada es de 1/6.000 a 1/10.000 nacimientos y la frecuencia de portadores en la población general es de aproximadamente 1/40. Se caracteriza por degeneración de las motoneuronas del asta anterior de la médula espinal, con debilidad proximal simétrica y atrofia progresiva de los grupos musculares.

El Consorcio Internacional que establece los niveles de cuidados adecuados en niños con AME, "*Consensus Statement for Standard of Care in Spinal Muscular Atrophy, 2007*", define cuatro subtipos clínicos, de acuerdo con la edad de presentación, logros motores alcanzados y severidad del curso clínico:

Tipo I (Enfermedad de Werdnig-Hoffmann, MIM #253300): es la forma más severa, con debilidad muscular generalizada e hipotonía, que comienza antes de los 6 meses de vida. Los niños no logran sentarse y en general fallecen antes de los 2 años de vida.

Tipo II (Forma Intermedia, MIM #253550): el inicio de los síntomas es entre los 7 y 18 meses, los niños se sientan pero no logran caminar de forma independiente. Generalmente superan los 4 años de vida.

Tipo III (Kugelberg-Welander, MIM #253400): se presenta después de los 18 meses de vida, los pacientes logran caminar de forma independiente y luego presentan debilidad. A su vez, los niños que comienzan con síntomas antes de los 3 años de vida son clasificados como IIIa, y si el comienzo es posterior a los 3 años serán IIIb. Existe una importante diferencia en cuanto al mantenimiento de la capacidad de deambular entre los subtipos IIIa y IIIb. Mientras sólo un 44% de los pacientes tipo IIIa es capaz de caminar a los 20 años de edad, esta capacidad se mantiene en el 90% de los niños con el cuadro IIIb (Wirth *et al.*, 2006).

Tipo IV (Forma del Adulto, MIM #271150): de inicio entre la segunda y tercera década de vida, su expectativa de vida es igual a la de la población normal.

Aproximadamente, el 60% de los pacientes con Atrofia Muscular Espinal presentan AME tipo I, mientras que, el resto presenta AME tipo II ó III siendo la AME tipo II algo más frecuente (Ogino *et al.*, 2002).

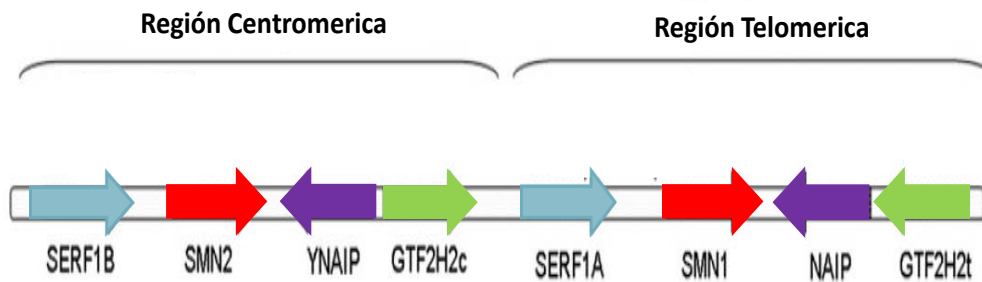
Independientemente del fenotipo clínico, la delección homocigota del gen *SMN1* es responsable de la patología en el 95% de los pacientes con AME, de los cuales, el 90% presenta delección de los exones 7 y 8 del gen *SMN1* y un 5% presenta sólo delección del exón 7. Los individuos que representan el 5% restante son, en general, compuestos heterocigotos que pueden presentar mutaciones puntuales en un alelo y una delección en el otro (Fedkottter *et al.*, 2002).

La delección del gen *SMN1* conduce a la ausencia de proteína SMN, lo que hace a las neuronas motoras más sensibles y proclives a su degeneración y muerte. El gen *SMN1*, también denominado *SMNtel*, se ubica en una región cromosómica compleja, duplicada e invertida, denominada locus AME de alrededor de 500 kb (Figura 1a). En esta región se encuentran duplicados al menos 4 genes, *Survival Motor Neuron gene (SMN)*, *Baculoviral Inhibitory Apoptosis Protein -IAP- repeat-containing 1 gene (BIRC1)* también denominado *Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein (NAIP)*, *Small EDRK-rich factor 1 gene (SERF1)* y *General Transcription Factor IIH gene (GTF2H2)*. Cada uno de ellos presenta una copia telomérica y una centromérica; la copia centromérica del gen *SMN1* es el gen *SMN2* ó *SMNcen* (OMIM #601627).

Los genes *SMN1* y *SMN2* poseen 9 exones (1, 2a, 2b, y 3-8), y el codón de *stop* se encuentra cerca del final del exón 7 (Figura 1b). Se diferencian únicamente por 5 nucleótidos situados en el extremo 3' del gen (Figura 1c). La transición c.840 C>T situada en el exón 7 del gen *SMN2* interrumpe una secuencia *ESE (Exonic Splicing Enhancer)* y crea una secuencia *ESS (Exonic Splicing Silencer)*. Como consecuencia de estos cambios se producen, por *splicing* alternativo, transcriptos del gen *SMN2* sin el exón 7 (*SMN2 $\Delta$ 7*) que originan una proteína trunca e inestable que se degrada rápidamente. Por este motivo, el gen *SMN2* genera sólo un 5-10% de la proteína funcional total respecto a la que produce el gen *SMN1* (Bürglen *et al.*, 1996; Lefebvre *et al.*, 1997). Los transcriptos completos, es decir, los que incluyen al exón 7, son denominados *FL-SMN1 (Full lenght-SMN1)* y *FL-SMN2 (Full lenght-SMN2)*. (Figura 2)

**Figura 1: Esquema del locus AME.** (a) Representación de los genes duplicados en el locus AME, con sus copias centromérica y telomérica. (b) Esquema de los genes *SMN1* y *SMN2*. (c) Ampliación de la secuencia nucleotídica desde el intrón 6 hasta el exón 8, donde se señalan los cambios entre los genes *SMN1* y *SMN2*. (Figura adaptada de Alias *et al.*, 2011)

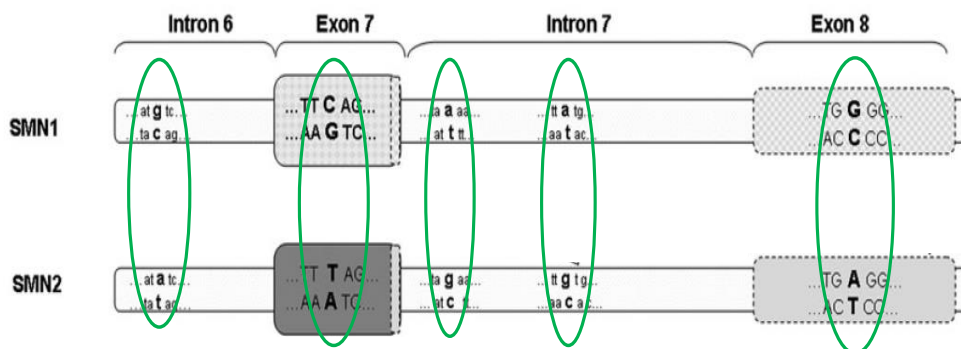
**a) Organización del Locus AME (5q13):**



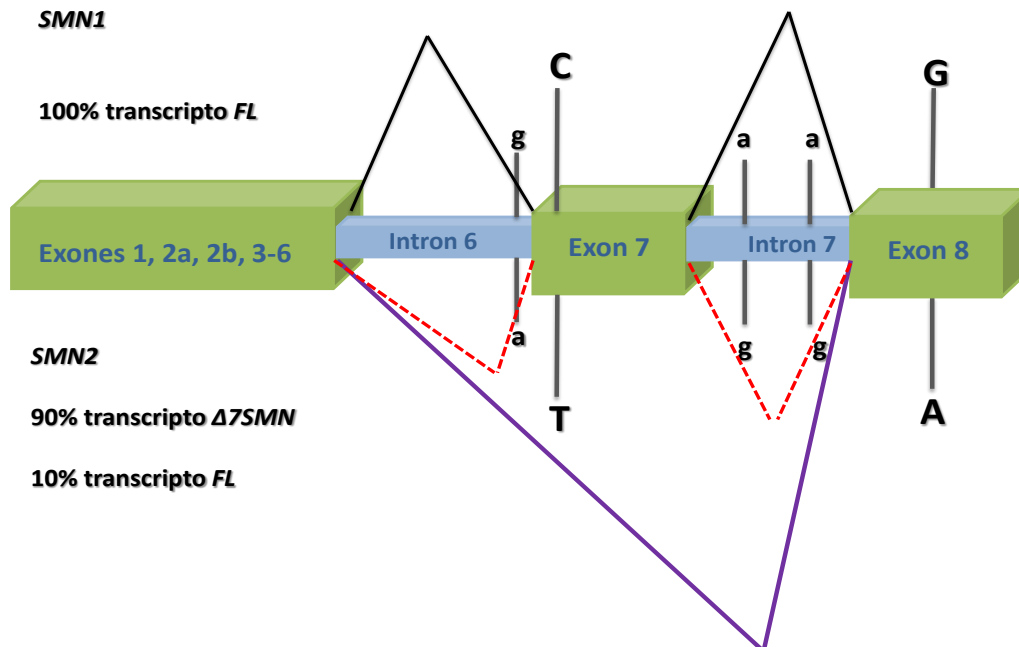
**b) Esquema de los genes *SMN1* y *SMN2*:**



**c) Cambios nucleotídicos que permiten diferenciar los genes *SMN1* y *SMN2*:**



**Figura 2:** Cambios en el patrón de *splicing* de los genes *SMN1* y *SMN2*. El gen *SMN1* produce un 100% de transcritos completos (*FL-SMN1*). La transición c.840 C>T en el gen *SMN2* conduce al *splicing* anómalo del exón 7 (*SMN2 $\Delta$ 7*) en aproximadamente el 90% de los transcritos. (Figura adaptada de Wirth *et al.*, 2006)



Los genes *SMN1* y *SMN2* se expresan de forma ubicua y las proteínas SMN codificadas por los transcritos *FL-SMN1* y *FL-SMN2* son idénticas (294 aminoácidos, 38 kDa). La proteína SMN no tiene homología con ninguna conocida y se ha detectado su presencia tanto en el núcleo como en el citoplasma. En el núcleo, forma parte de unas estructuras nucleares llamadas “*gems*”, en asociación con los “cuerpos espiralados” ó “retorcidos”, descritos por Ramon y Cajal en 1903 (*coiled bodies* o Cuerpos de Cajal). Además, participa de un complejo multiproteico implicado en la biogénesis de partículas UsnRNPs (*Uridine rich small nuclear Ribonucleoproteins*), en el mecanismo de *splicing* durante la maduración del pre-ARNm y en procesos de transcripción en general. Otras proteínas que forman parte de este complejo son *Gemin2*, *Gemin3*, *Gemin4*, *Gemin5*, *Gemin6* y *Gemin7*.

Se postula que la proteína SMN participa en al menos dos procesos celulares básicos: a nivel nuclear, en la modificación de los transcritos primarios o pre-ARNm a partir del ensamblaje de las *snRNPs* (*small nuclear Ribonucleoproteins*) y, en el citoplasma, como modulador en la regeneración y reciclaje de dichas *snRNPs* una vez que ha ocurrido el fenómeno de *splicing* (Paushkin *et al.*, 2002). Siendo la proteína SMN una proteína de expresión ubicua que cumple una función tan básica, todavía no se ha podido esclarecer por qué las neuronas motoras son más susceptibles a su disminución que otros tipos celulares. Se ha encontrado que las motoneuronas tienen un mayor nivel de transcripción respecto a otros tipos celulares y, posiblemente tengan, mayores requerimientos de proteína SMN. Por otro lado, la alteración del gen *SMN1* en otros tipos celulares y estructuras donde también se expresa, podría ser compensada por factores genéticos o celulares que aún se desconocen (Tizzano *et al.*, 2006).

Como se mencionó previamente, el 95% de los pacientes con AME, independientemente del fenotipo clínico, presenta delección homocigota del gen *SMN1*. Dada la gran variabilidad fenotípica de esta enfermedad, ha generado especial interés la búsqueda de variaciones genómicas que puedan explicar estas diferencias. Al estar ausente el gen *SMN1*, la única fuente posible de proteína funcional SMN es el gen *SMN2* y la severidad de la enfermedad se correlacionaría con los niveles de proteína funcional. En 1997, dos investigadores, Lefebvre y Coover, utilizando técnicas de Inmunohistoquímica y *Western Blot*, mostraron que los niveles de proteína SMN en cultivo de fibroblastos y de músculo de los pacientes con AME se encontraban disminuidos respecto de individuos normales y, a su vez, observaron una tendencia hacia una menor detección de proteína SMN cuanto más severo era el cuadro clínico



(Coover *et al.*, 1997; Lefebvre *et al.*, 1997). Posteriormente, el análisis de expresión de transcritos *FL-SMN2* versus *SMN2Δ7* en cultivos de fibroblastos de pacientes con AME tipo I, II y III mostró que las proporciones de los mismos variaban según el fenotipo de AME detectándose, en general, mayores niveles de transcritos *FL-SMN2* en aquellos pacientes cuyo cuadro clínico era de menor severidad (Helmken *et al.*, 2003).

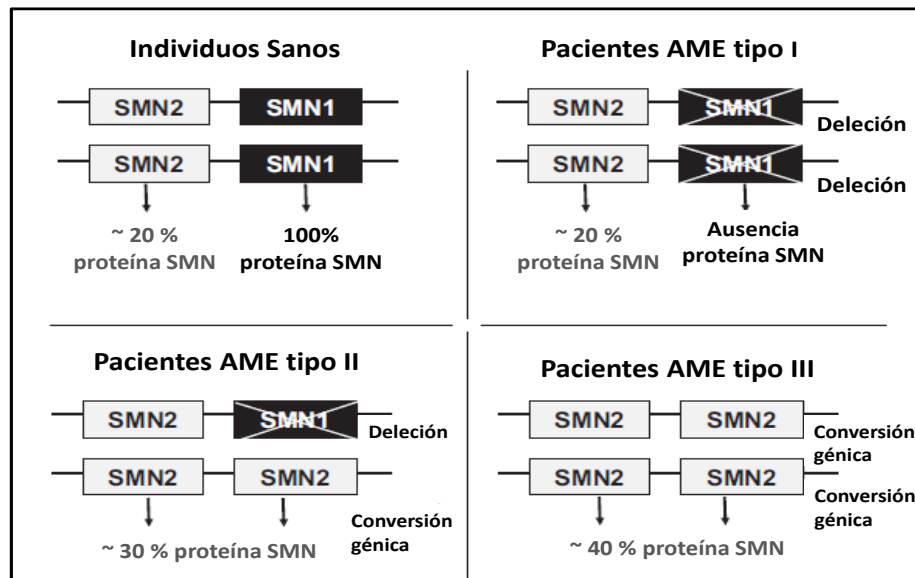
El número de copias del gen *SMN2* puede variar de 1 a 5 entre los distintos individuos afectados. Cuanto mayor sea su número, mayor será el nivel de proteína funcional y en consecuencia, se espera que el fenotipo sea menos severo. En general, los pacientes con AME tipo I tendrían una o dos copias del gen *SMN2*, mientras que, los pacientes con AME tipo II y III tendrían de 3 a 5 copias (Fedkottter *et al.*, 2002; Wirth *et al.*, 2006). No se ha encontrado ningún paciente con delección concomitante de los genes *SMN1* y *SMN2*, lo que sugiere que la delección de ambos genes sería letal “in útero” (Taylor *et al.*, 1998). Por otra parte, alrededor del 5% de la población general puede tener delección homocigota del gen *SMN2*.

En pacientes con AME, la presencia de 2 copias del gen *SMN2* sería consecuencia de una delección genuina de ambas copias del gen *SMN1*; la presencia de 3 copias correspondería a un alelo con delección y uno con conversión génica (reemplazo del gen telomérico -*SMN1*- por el centromérico-*SMN2*-) mientras que, la presencia de 4 copias del gen *SMN2*, sería el resultado de dos alelos en los que ha ocurrido una conversión génica. Estas conversiones, provendrían de intercambios desiguales entre cromosomas homólogos durante los eventos de recombinación en meiosis y

explicarían la presencia de más de dos copias del gen *SMN2* por genoma diploide.

(Figura 3)

**Figura 3: Deleciones y Conversiones:** se muestran los diferentes mecanismos moleculares propuestos para los diferentes números de copias del gen *SMN2* en los tres fenotipos de AME y los probables niveles de proteína funcional remanentes en cada caso. (Figura adaptada de Wirth *et al.*, 2006)



Si bien el modelo del número de copias de *SMN2* puede aplicarse a la mayoría de los casos, la correlación no es absoluta; existen pacientes con dos ó tres copias del gen *SMN2* que pueden tener la forma de AME tipo I, II ó III. Asimismo, se han descrito familias en donde niños con el mismo número de copias del gen *SMN2* presentan diferente fenotipo clínico. Esto sugiere que el gen *SMN2* no sería el único factor que influye en la severidad del cuadro clínico.

En la misma zona del cromosoma 5, adyacente al gen *SMN1*, se encuentra el gen *NAIP* (*Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein*) actualmente denominado *BIRC1*. Originalmente se pensó en este gen como responsable de la patología porque se encontraba deletado en 2/3 de los pacientes con formas severas de AME y por su

homología con proteínas denominadas “*Baculoviral Apoptosis Inhibitory Proteins*”, relacionadas con la inhibición de apoptosis celular. Años más tarde, cuando se demostró que el gen *SMN1* era el responsable de la AME, se propuso que el gen *NAIP* podría ser un gen modificador del fenotipo. Entre las funciones adjudicadas al gen *NAIP* se encuentran la inhibición de la caspasa 3 (una proteasa pro-apoptótica de neuronas y motoneuronas) y la participación en la diferenciación y supervivencia de motoneuronas (Gotz *et al.*, 2000; Perrelet *et al.*, 2000).

Como se mencionó previamente, la ausencia del gen *NAIP* se ha visto más frecuentemente en los AME tipo I, sin embargo, no todos los grupos investigadores han hallado la misma correlación (Kesari *et al.*, 2005).

Para establecer con mayor precisión la verdadera influencia de los genes *SMN2* y *NAIP* en el desarrollo y evolución de esta patología, se hace necesario realizar un mayor número de estudios de correlación genotipo-fenotipo en diferentes poblaciones.

En los últimos años, la comprensión de las bases genéticas de esta compleja enfermedad neuromuscular ha permitido el desarrollo de potenciales estrategias terapéuticas. Varias de las terapias en investigación se basan en incrementar los niveles de proteína SMN funcional interviniendo sobre la expresión del gen *SMN2*. Los mecanismos involucrados incluyen: a) la activación transcripcional del gen *SMN2* actuando sobre el promotor, mediante inhibidores de deacetilasas de histonas o compuestos que regulen la metilación del ADN (butirato de sodio, ácido valproico ó 5-aza-2´deoxycytidina); b) la promoción del correcto *splicing* del pre-ARNm de *SMN2*, mediante inhibidores de deacetilasas de histonas, pequeñas moléculas de ARN

antisentido y otras sustancias como aclarubicina y vanadato sódico; c) la estabilización de la proteína SMN y activación de su traducción utilizando fosfatasa y d) la supresión del codón *stop* en *SMN2* para elongar la proteína y mejorar su estabilidad, mediante la administración de aminoglucósidos.

Mientras estos estudios se van desarrollando, es necesario definir parámetros de seguimiento clínico y marcadores biológicos que permitan, en un futuro, contar con herramientas adecuadas para estratificar a los pacientes y medir la evolución de los mismos. Es por esto que marcadores biológicos como el número de copias del gen *SMN2* y la delección del gen *NAIP*, cobrarían real importancia si su variabilidad a escala molecular pudiera ser utilizada en la práctica clínica.

Para establecer el número de copias del gen *SMN2* y detectar la presencia ó ausencia del gen *NAIP*, existen diferentes metodologías cuantitativas de biología molecular, entre ellas, las técnicas de MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) y PCR a tiempo real.

La metodología de MLPA permite detectar cambios en el número de copias de diferentes secuencias de ADN. Este método se basa en la hibridación del ADN con dos sondas adyacentes complementarias a la región de interés, la subsecuente unión de las mismas mediante una ADN-ligasa y, finalmente, la amplificación por PCR del producto ligado. El número de sondas ligadas y amplificadas sería una medida del número de secuencias blanco presentes en la muestra.

La técnica de PCR a tiempo real permite monitorear el progreso de la reacción de PCR mientras ésta ocurre. En esta metodología, las reacciones se caracterizan por el número de ciclos en que la amplificación de una secuencia blanco puede ser detectada

(*Ct = Cycle threshold* ó ciclo umbral). Entonces, cuanto mayor sea el número de secuencias de interés en la muestra de partida, más rápidamente se verá un incremento de la señal de fluorescencia.

Hasta el presente, en Argentina, no se han realizado estudios de correlación genotipo-fenotipo para esta patología. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue correlacionar el número de copias del gen *SMN2* y la ausencia del gen *NAIP* con los rasgos clínicos de la Atrofia Muscular Espinal, en niños diagnosticados en el Hospital Nacional de Pediatría J. P. Garrahan, con el fin de obtener una mejor caracterización de los mismos.

## **OBJETIVOS**

El objetivo principal de este trabajo fue evaluar la influencia del número de copias del gen *SMN2* y la ausencia del gen *NAIP*, en el fenotipo de niños con Atrofia Muscular Espinal.

Para ello,

- 1) Se determinó el número de copias del gen *SMN2* mediante dos metodologías semi-cuantitativas diferentes: MLPA y PCR a tiempo real
- 2) Se estableció la presencia o ausencia del gen *NAIP* por MLPA
- 3) Se correlacionó el genotipo de los niños con AME con los diferentes grados de severidad según el Consorcio Internacional para la atención de niños con AME *“Consensus Statement for Standard of Care in Spinal Muscular Atrophy, 2007”*

## ***POBLACIÓN DE ESTUDIO Y METODOLOGÍA***

---

---



Se estudiaron 144 pacientes con Atrofia Muscular Espinal.

Los criterios de inclusión fueron:

- Resultado positivo de la Prueba Diagnóstica para AME (*Van der Steege,1995*) realizada en el Laboratorio de Biología Molecular -Servicio de Genética- del Hospital de Pediatría “Prof. Dr. Juan P. Garrahan” desde Noviembre de 1998 hasta Junio de 2012
- Evaluación Neurológica: se completó una ficha con datos clínicos (ANEXO 1) que permitió establecer el subtipo de AME; la misma fue completada, durante la consulta, por los médicos del Grupo de Atención de Pacientes Neuromusculares del Hospital de Pediatría “Prof. Dr. Juan P. Garrahan”. En aquellos pacientes que no se encuentran actualmente en seguimiento se llevó a cabo una revisión de las historias clínicas para poder establecer el subtipo AME.

El presente proyecto cuenta con la aprobación del Comité de Ética del Hospital Garrahan (ANEXO 2)

**Preparación del ADN:**

Se obtuvo ADN genómico de todos los pacientes a partir de leucocitos de sangre periférica mediante la técnica convencional de precipitación salina (*Sambrook et al., 1989*).

**MLPA (Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification)**

La técnica de MLPA fue llevada a cabo siguiendo las indicaciones del fabricante (*MRC Holland, Amsterdam, The Netherlands*), usando los kits P021-A1 y P021-A2. El protocolo general es el siguiente: 1) Desnaturalización del ADN: 98°C 5min, luego 25°C. 2) Hibridización: 95°C 1min, 60°C 16-20hs 3) Reacción de Ligación: 54°C 15min; 98°C 5min y luego 15°C 4) Reacción de PCR: 35 ciclos de 95°C 30s, 60°C 30s, 72°C 60s y una reacción de extensión a 72°C por 20 min.

La mezcla P021 posee 16 sondas específicas para la región AME (5q12.2-5q13.3) y 21 sondas controles distribuidas a lo largo de diferentes autosomas. Las sondas correspondientes a la región AME son:

- 4 sondas para detectar regiones comunes de los genes *SMN1* y *SMN2* (exones 1, 4, 6 y 8)
- 2 sondas para detectar el cambio C>T en el exón 7 (sonda C para el gen *SMN1* y T para el gen *SMN2*)
- 2 sondas para detectar el cambio G>A en el exón 8 (sonda G para el gen *SMN1* y A para el gen *SMN2*)
- 2 sondas para el gen *NAIP* (actualmente denominado *BIRC1*), 3 para el gen *GTF2H2*, 1 para el gen *SERF1B*, 1 para el gen *CDH6* y 1 para el gen *RAD17*.

Los productos amplificados son separados luego, por electroforesis capilar en un secuenciador automático (ABI3130) y analizados utilizando el *software Coffalyzer 2.0* de *MRC Holland*.

### ***Interpretación de resultados***

El análisis llevado a cabo por el *software* consiste en normalizar las señales intra-muestra y compararlas con muestras de referencia (controles normales con 2 copias de *SMN1* y 2 copias de *SMN2*) previamente normalizadas. Para la normalización de las señales se lleva a cabo un cociente entre el área bajo la curva de cada una de las señales obtenidas y el promedio de las áreas de todas las señales. La relación entre la muestra en estudio y las muestras de referencia (*ratio* ó razón) para cada una de las regiones amplificadas, permitirá conocer el número de copias de cada región. Las sondas con *ratios* entre 0,7-1,3 son consideradas normales, los *ratios* < 0,7 indican delección heterocigota, los > 1,3 indican ganancia y un *ratio* igual a 0 (cero) indica ausencia de amplificación la sonda (delección homocigota).

De acuerdo con estos valores, la obtención de un *ratio* normal indica la presencia de 2 copias del gen o región en estudio, excepto para las sondas correspondientes a los exones comunes de los genes *SMN1* y *SMN2* (exones 1, 4, 6 y 8) que cuando resultan normales corresponden a 4 copias (2 *SMN1* + 2 *SMN2*). (Tabla 1)

En el caso particular de las sondas específicas para los exones 7 y 8 del gen *SMN2*, un *ratio* <0,7 indica la presencia de 1 sola copia, *ratios* de 0,7-1,3 indican la presencia de 2 copias, *ratios* de 1,3 -1,6 corresponden a 3 copias y valores >1,6 a 4 copias del gen *SMN2*. (Tabla 2)

**Tabla 1:** Interpretación de los *ratios* obtenidos del programa *Coffalyzer 2.0* de *MRC Holland*.

<b>RATIO</b>	<b>INTERPRETACIÓN</b>
<b>0</b>	<b>Delección homocigota (0 copias)</b>
<b>&lt; 0,70</b>	<b>Delección heterocigota (1 copia)</b>
<b>0,7-1,3</b>	<b>Normal (2 copias)</b> <b>Excepto para las sondas correspondientes a exones comunes de SMN1 y SMN2 (4 copias)</b>
<b>&gt; 1,3</b>	<b>Duplicación (+ 2 copias)</b>

**Tabla 2:** Interpretación de los *ratios* obtenidos del programa *Coffalyzer 2.0* de *MRC Holland* para los exones 7 y 8 del gen *SMN2*.

<b>RATIO</b>	<b>Exones 7 y 8 SMN2</b>
<b>&lt; 0,70</b>	<b>1 copia</b>
<b>0,7-1,3</b>	<b>2 copias</b>
<b>1,3 -1,6</b>	<b>3 copias</b>
<b>&gt; 1,6</b>	<b>4 copias</b>

***Interpretación de resultados en pacientes AME***

En los pacientes con AME, se observa ausencia de las sondas correspondientes a los exones 7 y 8 del gen *SMN1* o sólo la ausencia de la sonda correspondiente al exón 7. El análisis de los *ratios* correspondientes a los exones comunes permite distinguir entre delecciones del gen *SMN1* y conversiones de *SMN1* en *SMN2*: a) Una delección homocigota del gen *SMN1* se verá como delección de los exones comunes y valores normales de los exones 7 y 8 del gen *SMN2* (genotipo: 0 *SMN1* -2 *SMN2*); b) cuando se

observa delección de exones comunes junto con una ganancia en los exones 7 y 8 del gen *SMN2* estamos en presencia de un alelo con delección y uno con conversión génica (genotipo 0 *SMN1* - 3 *SMN2*); c) si se observan valores normales en las sondas de los exones comunes y ganancia en los exones 7 y 8 del gen *SMN2*, ha ocurrido una conversión homocigota de *SMN1* en *SMN2* (genotipo 0 *SMN1* - 4 *SMN2*).

Las sondas correspondientes al gen *NAIP (BIRC1)* se analizaron de acuerdo a su presencia ó ausencia (*ratio* = cero).

### **PCR a tiempo real**

Para llevar a cabo la cuantificación del gen *SMN2*, se utilizó el gen de Albúmina (Refseq. NM\_000477.5) de la línea celular humana MT-2 como gen de referencia (2 copias por genoma diploide). El ADN fue amplificado en el equipo *1000 Thermal Cycler/CFX96 Real Time System* (BIO-RAD) y como sistema de detección se utilizó *SYBR Green*, un fluorocromo que se une con elevada especificidad al ADN de doble cadena y permite detectar el producto de PCR a medida que se va acumulando durante la reacción, dado que fluoresce cuando está intercalado en la doble hélice.

Para la amplificación del gen *SMN2* se utilizaron los *primers* descritos por *Feldkotter y colaboradores, 2002*. Éstos *primers* fueron diseñados para hibridizar específicamente con el exón 7 del gen *SMN2* aprovechando las diferencias nucleotídicas con el gen *SMN1* en las posiciones **+ 6 del exón 7** y **+ 214 del intrón 7**. Las secuencias son: *Primer Forward* “*cenSMNex7forw* (5-TTTATTTTCCTTACAGGGTTTTA-3)” y *Primer Reverse* “*cenSMNint7rev* (5-GTGAAAGTATGTTTCTTCCACgCA-3)”.

Para la amplificación del gen de Albúmina (exón 12) se utilizaron los *primers* descritos por *Pongers y colaboradores, 2006*. Las secuencias son: *Primer Forward Albúmina* (5'TGAAACATACGTTCCCAAAGAGTTT3') y *Primer Reverse Albúmina* (5'CTCTCCTTCTCAGAAAGTGTGCATAT3').

La PCR se llevó a cabo en un volumen final de 25  $\mu$ l, conteniendo 12,5  $\mu$ l de *iQ SYBR Green Supermix* (BioRad), 0,75  $\mu$ l de una solución 10  $\mu$ M de *Primer Forward y Reverse* (SMN2 ó Albúmina), 6  $\mu$ l de agua y 5  $\mu$ l de ADN. Las condiciones de ciclado fueron: 95°C 3min, seguido por 40 ciclos de 95°C 30s, 57°C 25s y 60°C 30s. Se programó el equipo para que detecte la fluorescencia emitida al final de cada ciclo. Luego del ciclado, el equipo realiza una *Curva de desnaturalización* (95°C 10s, 55°C 5s y 95°C 10s), mediante la cual se detecta la temperatura de *melting* del producto amplificado durante la reacción de PCR. Se debe observar una única temperatura de *melting* si la amplificación ha sido específica.

En cada serie de amplificación, se prepararon dos curvas de concentración, una para el gen *SMN2* y una para el gen de la albúmina, a partir de diluciones seriadas de ADN de la línea celular humana MT2 (que posee 2 copias del gen *SMN2* y 2 copias del gen de albúmina). La muestra a partir de la cual se prepararon los cinco puntos de la curva fue medida con el equipo *Nanodrop*, correspondiendo a 20ng/ $\mu$ l; las diluciones fueron seriadas (1/5) quedando en cada punto: 100 ng, 20 ng, 4 ng, 0,80 ng y 0,16 ng de ADN. Para cada serie, se utilizó además, un control negativo (muestra con delección homocigota del gen *SMN2*), un blanco de reacción (agua en lugar de ADN) y un control positivo (muestra de ADN de un control normal). Cada punto de las curvas se amplificó por triplicado al igual que todas las muestras y los controles.

El análisis de los resultados se llevó a cabo utilizando el *software* comercial de BioRad, *CFX Manager Software v2.1*. Se consideraron válidos aquellos experimentos en los cuales ambas curvas patrón tuvieron una eficiencia entre 90% y 110% y un  $R^2 > 0,980$ .

Para determinar el número de copias del gen *SMN2*, se utilizaron los valores de *SQ mean* (*Starting Quantity mean* ó cantidad promedio de ADN inicial) obtenidos del *software*. El cálculo consiste en realizar un cociente entre la cantidad de ADN detectada para el gen *SMN2* y para el gen de albúmina, y luego multiplicarlo por 2 dado que hay dos copias del gen de albúmina por genoma diploide:

$$\text{N}^\circ \text{ Copias } SMN2 = 2 \times [SQ \text{ mean } (SMN2)/SQ \text{ mean } (Alb.)]$$

### **Correlación Genotipo-Fenotipo**

Para determinar el fenotipo de la Atrofia Muscular Espinal, se consideró la clasificación fenotípica descrita en el Consenso Internacional "*Consensus Statement for Standard of Care in Spinal Muscular Atrophy, 2007*", basada en la edad de inicio de los síntomas y logros motores alcanzados por los pacientes. Estos datos fueron registrados por médicos del Grupo de Atención de Pacientes Neuromusculares del Hospital de Pediatría Prof. Dr. Juan P. Garrahan durante la consulta.

Las características clínicas más relevantes consideradas para la clasificación de los pacientes fueron:

**AME tipo I:**

- Aparición de hipotonía y debilidad muscular antes de los 6 meses de vida
- Logro motor: no alcanzan sedestación sin apoyo

**AME tipo II:**

- Comienzo de la debilidad muscular entre los 6 y los 18 meses de vida
- Logro motor: pueden sentarse sin apoyo, algunos pacientes logran bipedestación con apoyo pero no caminar de forma independiente

**AME tipo III:**

- Los síntomas aparecen, en general, luego de los 18 meses de vida. A su vez, este grupo se subclasifica en: IIIa si el comienzo de los síntomas es previo a los 3 años de vida y IIIb cuando la aparición es posterior a los 3 años
- Logro Motor: logran adquirir la marcha independiente. Luego, la debilidad muscular puede presentarse asociada a caídas frecuentes, dificultad para levantarse del piso, dificultad para subir ó bajar escaleras, y/ó marcha basculante

**Análisis Estadístico**

El número de copias del gen *SMN2* y la presencia/ausencia del gen *NAIP* en los subtipos clínicos de los pacientes con AME se comparó aplicando el Test de  $\chi^2$  o Test exacto de Fisher según correspondiera. Un valor de  $p < 0.05$  indicó una diferencia significativa.



## **RESULTADOS**

**I. Caracterización de la población con Atrofia Muscular Espinal**

De los 144 pacientes con Atrofia Muscular Espinal estudiados, el 92,4% presentaba delección homocigota de los exones 7 y 8 del gen *SMN1*, y el 7,6% presentaba sólo delección del exón 7 del gen.

La distribución de los pacientes de acuerdo a su fenotipo clínico fue la siguiente: 56 correspondieron a AME tipo I, 58 a AME tipo II y 30 a AME tipo III. El grupo de pacientes con AME tipo III pudo ser dividido, además, en tipo IIIa (17 pacientes) y IIIb (13 pacientes). Las características clínicas (edad de aparición de síntomas y logros motores) como así también los síntomas iniciales que motivaron la consulta se muestran en la tabla 1.

**Tabla1:** Características clínicas de la serie de pacientes analizados según el fenotipo clínico de AME.

	AME TIPO I (56 pacientes)	AME TIPO II (58 pacientes)	AME TIPO III (30 pacientes)
<b>SÍNTOMA INICIAL</b>	<b>Hipotonía 85,50%</b>	<b>Falta de adquisición de la marcha 27,60 %</b>	<b>Caídas Frecuentes 35,70 %</b>
	Reducción Actividad Motora + Hipotonía 5,5%	<b>Retardo Madurativo 25,90 %</b>	<b>Debilidad 21,4%</b>
	Reducción Actividad Motora 7,30 %	<b>Hipotonía 19,0 %</b>	<b>Marcha Basculante 17,9 %</b>
	Pérdida control cefálico + Hipotonía 1,80 %	Retardo Madurativo + Hipotonía 13,8%	Caídas Frecuentes + Debilidad 7,10 %
		Retardo Madurativo + Falta de Adquisición de la marcha 8,60 %	Caídas Frecuentes + Marcha Basculante 7,10%
		Falta de adquisición de la marcha + Hipotonía 3,40 %	
<b>EDAD DE APARICIÓN DE SÍNTOMAS</b>	media 2 meses rango: nacimiento a 5 meses moda 3 meses	media 11,3 meses rango: 5-24 meses moda 12 meses	media 45,3 meses rango: 12 - 180 meses moda 18 meses
<b>LOGROS MOTORES ALCANZADOS/ EDAD</b>	Sostén Cefálico Parcial 3,6% ( 2 pacientes)	Sedestación: media 9,2 meses rango: 5 - 42 meses moda 6 meses  Bipedestación con Apoyo: 24,5%	Adquisición de la marcha:  media 15 meses rango: 10 - 32 meses moda 12 meses

II. Determinación del número de copias del gen SMN2 por MLPA y PCR a tiempo real

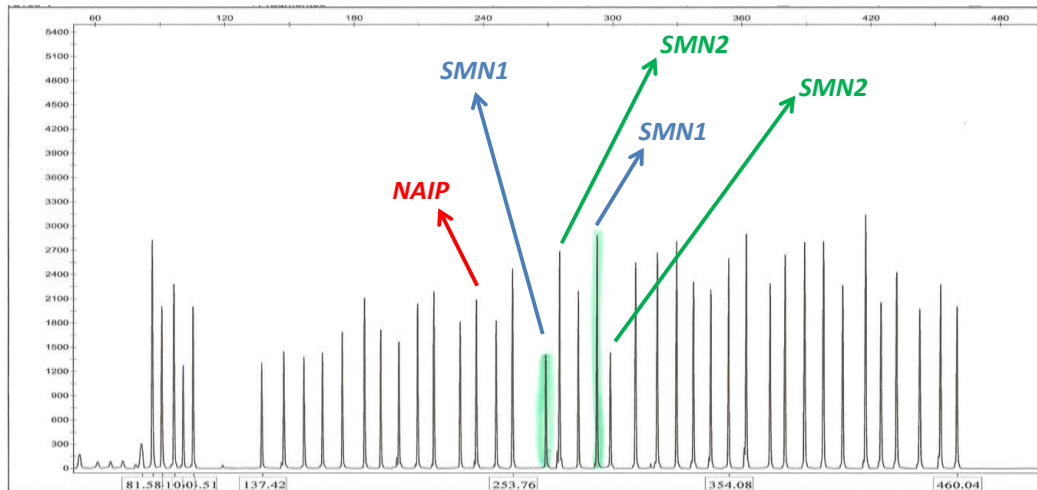
a) MLPA

La distribución del número de copias en los 144 pacientes analizados fue la siguiente: 57 pacientes tuvieron 2 copias de *SMN2*, 79 presentaron 3 copias y sólo 8 pacientes presentaron 4 copias de *SMN2*.

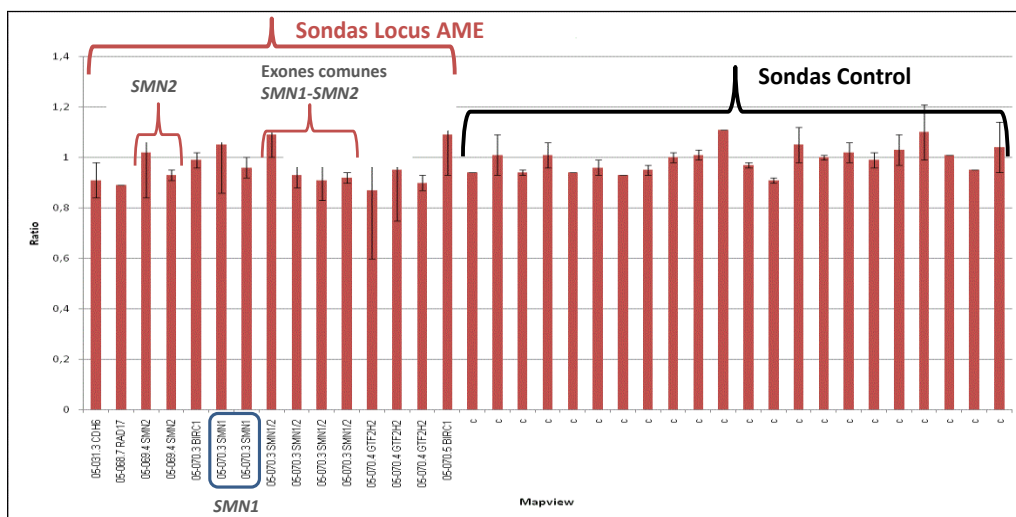
Las Figuras 1, 2 y 3 muestran electroferogramas de diferentes ensayos de MLPA y sus correspondientes histogramas (obtenidos a partir de los *ratios* calculados por el *software*) que permitieron reconocer los diferentes genotipos de AME. En la Figura 1b se observan los *ratios* correspondientes a un individuo normal con valores entre 0,8 y 1. En la Figura 2b se destaca la ausencia de las barras correspondientes a los genes *SMN1* y *NAIP* en el histograma, así como también los *ratios* que indican la presencia de dos copias de *SMN2*. Por último, en la Figura 3b se señala el *ratio* >1,3 obtenido para un paciente AME con 4 copias del gen *SMN2*, presencia del gen *NAIP* y ausencia de las barras correspondientes al gen *SMN1*.

**Figura 1:** Individuo Normal

a) Electroferograma de MLPA correspondiente a un **individuo normal** con 2 copias de *SMN1* y 2 copias de *SMN2*. Se resaltan las señales correspondientes a los genes *SMN1*, *SMN2* y *NAIP*.

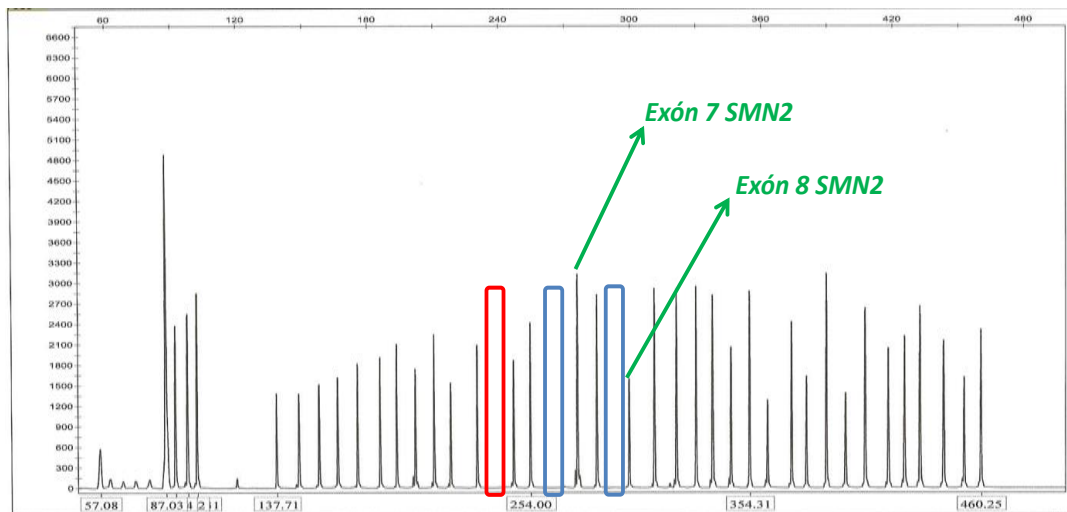


b) Histograma correspondiente al electroferograma anterior. Se señalan las barras correspondientes a las sondas de la región AME y las sondas control.

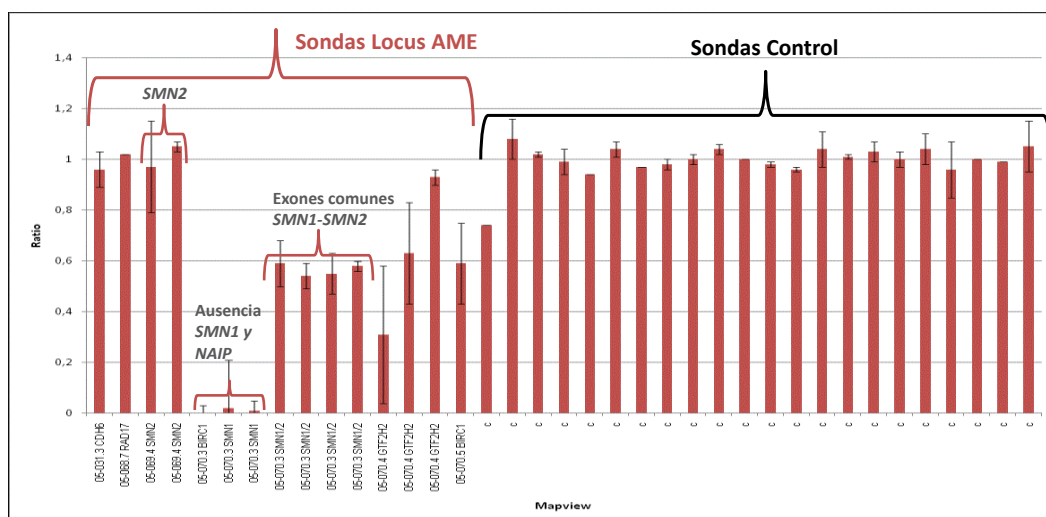


**Figura 2:** Paciente con AME tipo I

a) Electroferograma de MLPA correspondiente a un **niño con AME tipo I**, con delección homocigota del gen *SMN1*, 2 copias de *SMN2*, y ausencia del gen *NAIP*. Los recuadros en color celeste indican la ausencia de las señales correspondientes a los exones 7 y 8 del gen *SMN1* y el recuadro rojo la ausencia del gen *NAIP*. Las flechas en verde indican las señales correspondientes a los exones 7 y 8 del gen *SMN2*

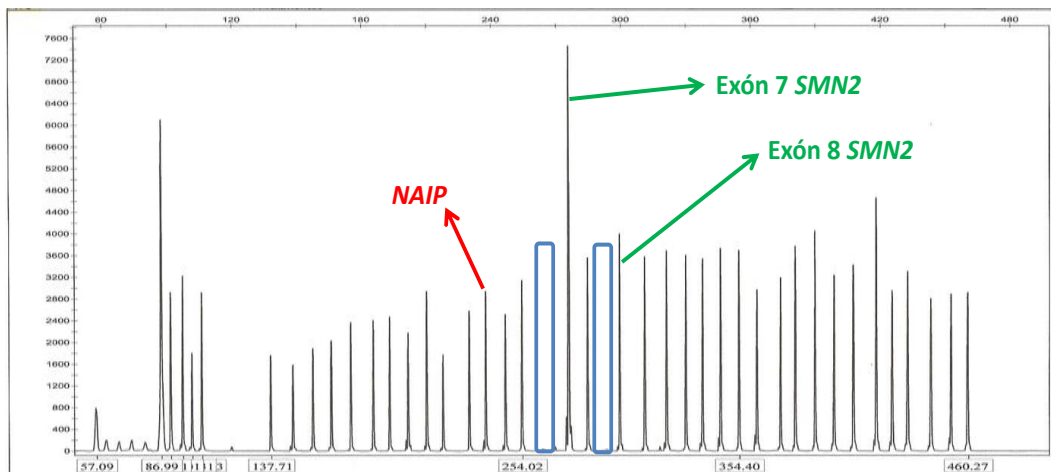


b) Histograma correspondiente al electroferograma 2a. Se señalan las barras correspondientes a la región AME y sondas control.

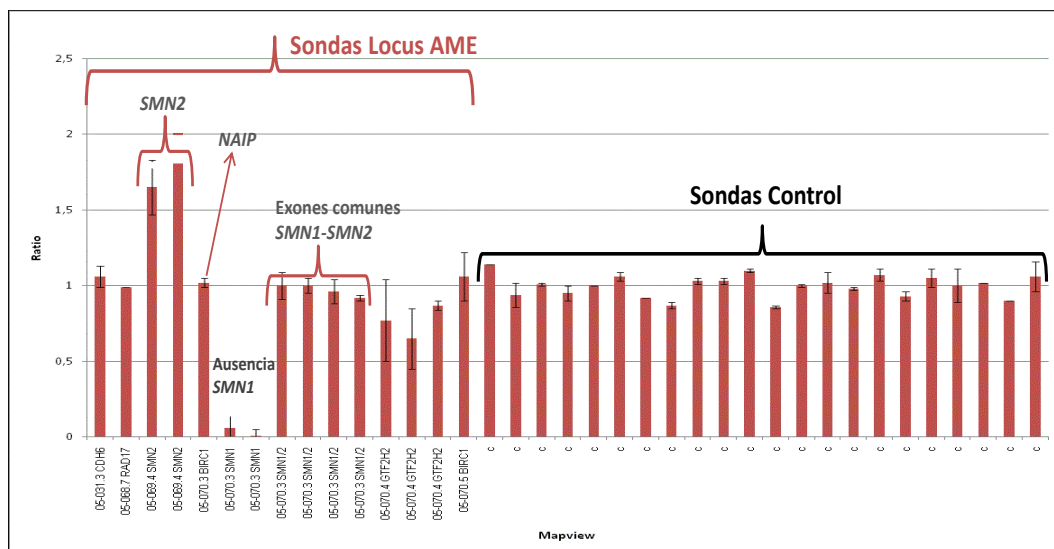


**Figura 3:** Paciente con AME tipo III

a) Electroferograma de MLPA correspondiente a un niño con AME tipo III, con delección homocigota del gen *SMN1*, 4 copias de *SMN2*, y presencia del gen *NAIP*. Los recuadros en color celeste indican la ausencia de las señales correspondientes a los exones 7 y 8 del gen *SMN1*. Las flechas en verde indican las señales correspondientes a los exones 7 y 8 del gen *SMN2* y la flecha roja corresponde al gen *NAIP*.



b) Histograma correspondiente al electroferograma 3a. Se señalan las barras correspondientes a la región AME y sondas control.



**b) PCR a tiempo real**

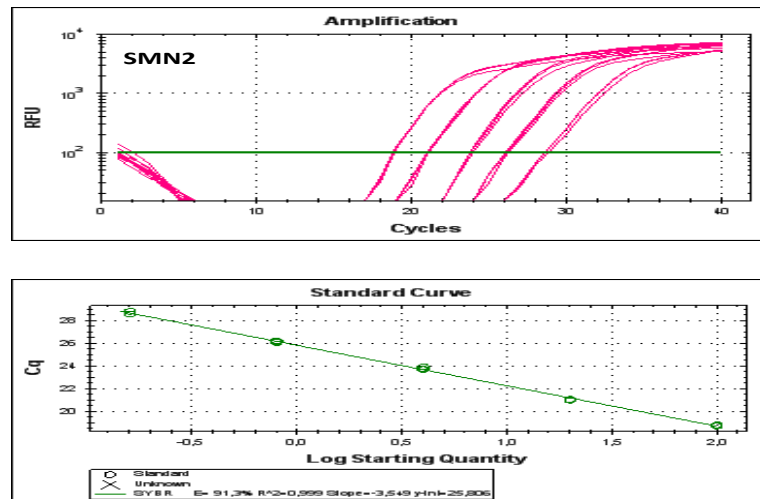
Mediante la PCR a tiempo real se logró cuantificar el gen *SMN2* en 119 de los 144 pacientes con AME previamente estudiados por MLPA. Los resultados fueron equivalentes en el 95% de los casos. De los 6 casos en los que se obtuvieron resultados dispares, 5 corresponden a muestras en las que por MLPA se obtuvieron 3 copias de *SMN2* y por PCR-RT sólo 2 copias mientras que, en el caso restante, se obtuvieron 3 copias por MLPA y 4 por PCR-RT.

La Figura 4 muestra las curvas de calibración para los genes de albúmina y *SMN2* correspondientes a un ensayo de PCR real time en el cual se amplificaban, 18 muestras en promedio. En la Figura 5, se pueden observar las Curvas de *Melting* post-PCR de los genes *SMN2* y albúmina para todas las muestras amplificadas en un ensayo. La presencia de una sola señal en cada uno de los gráficos demuestra, que tanto la amplificación del gen de Albúmina como la del gen *SMN2* fueron específicas en el ensayo.

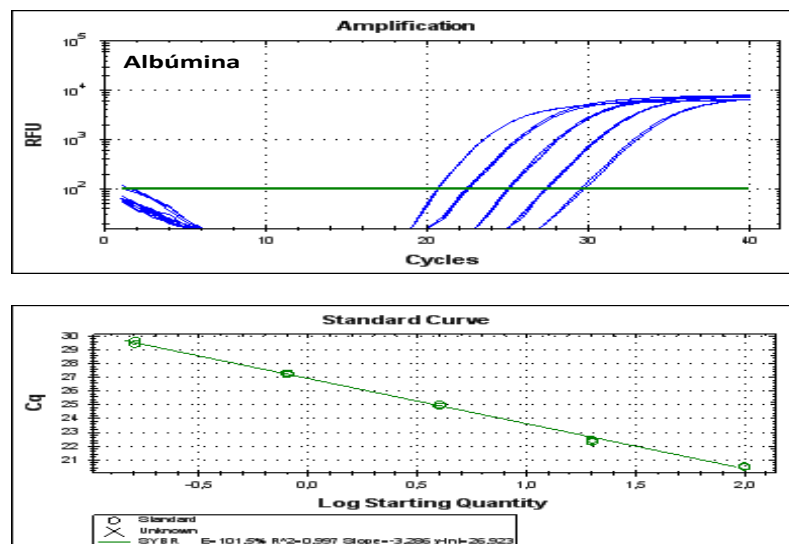


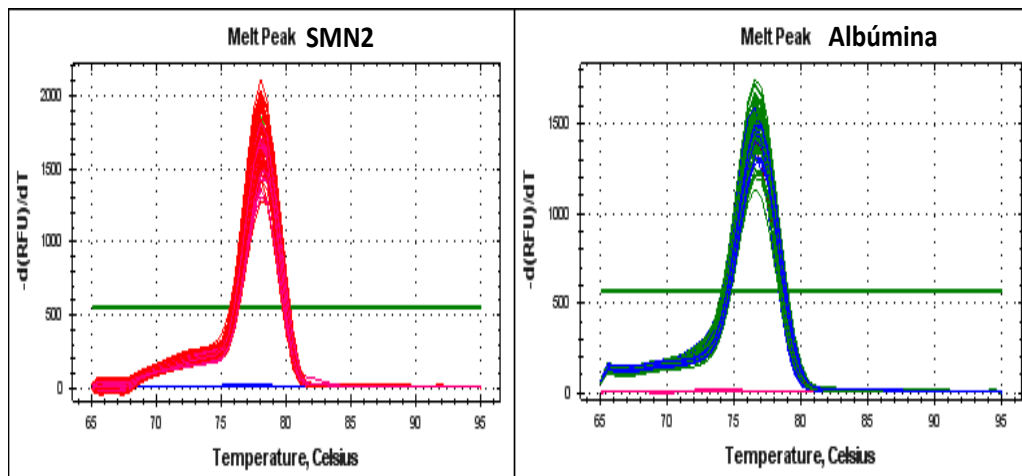
**Figura 4:** Curvas Patrón de PCR *real time*.

a) Curva de Calibración correspondiente al **gen SMN2**. En el panel superior se observa la amplificación de cada uno de los cinco puntos de la curva expresado en unidades relativas de fluorescencia (RFU) vs el número de ciclos. En el panel inferior se muestra la recta patrón del número de ciclos ( $Cq$ ) vs el logaritmo de la concentración inicial de ADN (Log SQ) que permitirá conocer los valores de concentración inicial de ADN para el gen *SMN2* en el ensayo correspondiente.



b) Curva de Calibración correspondiente al **gen de albúmina**. En el panel superior se observa la amplificación de cada uno de los cinco puntos de la curva expresado en unidades relativas de fluorescencia (RFU) vs el número de ciclos. En el panel inferior se muestra la recta patrón del número de ciclos ( $Cq$ ) vs el logaritmo de la concentración inicial de ADN (Log SQ) que permitirá conocer los valores de concentración inicial de ADN para el gen de albúmina en el ensayo correspondiente.



**Figura 5:** Curvas de *Melting* Post-PCR.

### **Determinación de la Presencia/Ausencia del gen *NAIP* por MLPA**

El gen *NAIP* fue estudiado por MLPA en los mismos 144 casos en los que se determinó el número de copias de *SMN2*. Se encontró que el 32,6 % de los pacientes presentaba ausencia del gen.

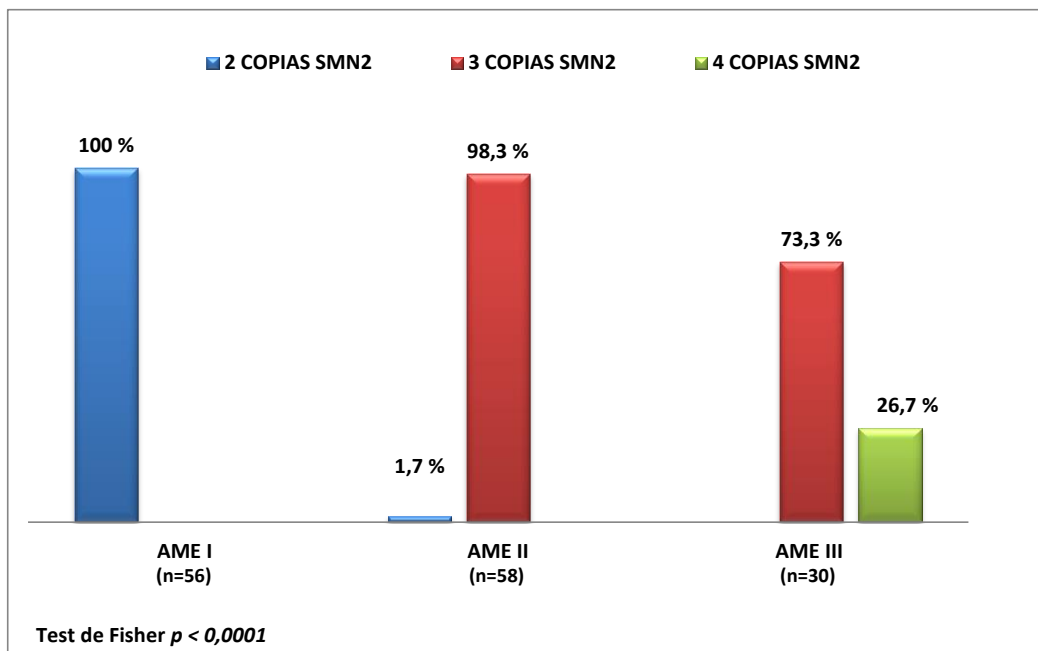
### **Correlación Genotipo-Fenotipo**

La correlación genotipo-fenotipo de AME se llevó a cabo considerando todos los pacientes estudiados por MLPA, dado que se la consideró la técnica de referencia. Como se mencionó anteriormente, los 144 pacientes se clasificaron en: 56 AME tipo I, 58 AME tipo II y 30 AME tipo III (17 AME IIIa y 13 IIIb).

La correlación entre el número de copias de *SMN2* y fenotipo clínico de AME, se puede observar en la Figura 6. Todos los pacientes con la forma más severa, AME tipo I, presentaron sólo 2 copias de *SMN2* mientras que, los pacientes con las formas más leves, AME tipo II y AME tipo III, mostraron en su mayoría entre 3 y 4 copias. Cabe

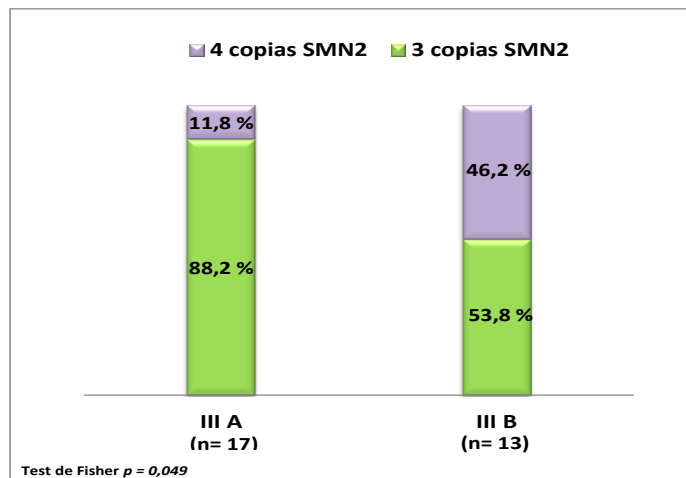
destacar que sólo en el grupo correspondiente a los AME tipo III se observaron pacientes con 4 copias de *SMN2*.

**Figura 6:** Distribución del número de copias de *SMN2* según el fenotipo de AME



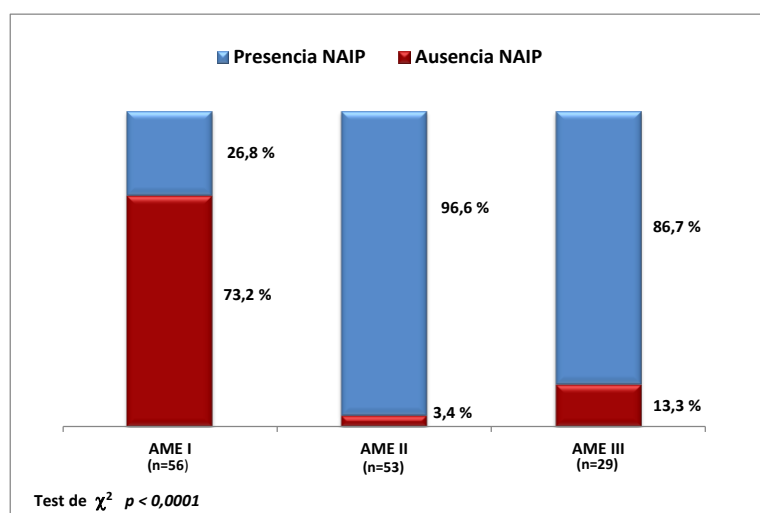
El grupo de pacientes con AME tipo III fue luego dividido en IIIa y IIIb, para evaluar si existían diferencias en cuanto al número de copias de *SMN2* entre cada subgrupo. Al realizar la comparación, observamos que en el fenotipo AME IIIb había una mayor proporción de pacientes con 4 copias de *SMN2* ( $p=0,049$ ). Estos resultados se pueden observar en la Figura 7.

**Figura 7:** Distribución del número de copias del gen *SMN2* en los subgrupos IIIa y IIIb



Por otra parte, el análisis de la presencia o ausencia del gen *NAIP* según el fenotipo AME, mostró que la ausencia del mismo es significativamente más frecuente en la forma más severa de AME que en los subtipos AME II y III (Figura 8). Por otra parte, los 3 pacientes con AME tipo III que presentaron ausencia de NAIP pertenecían al subgrupo más severo (IIIa).

**Figura 8:** Distribución de la presencia/ausencia del gen *NAIP* según el fenotipo de AME



*Los datos clínicos y moleculares de cada uno de los pacientes estudiados se encuentran en el ANEXO 3.*

## ***DISCUSIÓN***

---

**Cuantificación del gen SMN2:**

La técnica de MLPA es actualmente considerada la técnica de elección para determinar el número de copias del gen *SMN2* dado que, además de poder llevar a cabo en una misma reacción la cuantificación simultánea de los genes *SMN1* y *SMN2*, posee sondas para exones comunes de ambos genes y también sondas control por fuera de la región de AME, haciendo de éste un sistema con gran exactitud para la medición.

El objetivo de determinar el número de copias de *SMN2* mediante dos técnicas cuantitativas diferentes fue poder realizar una comparación entre una técnica validada internacionalmente como es la de MLPA y una PCR a tiempo real que se puso a punto en nuestro laboratorio.

Se obtuvo una muy buena correlación de los resultados entre ambas técnicas, siendo éstos coincidentes en el 95% de los casos. Sin embargo, la puesta a punto de la PCR a tiempo real fue más dificultosa, la técnica resultó menos robusta y más dependiente del operador que la de MLPA. Asimismo, la técnica de PCR-RT resultó más exigente en cuanto a la integridad del ADN genómico, puesto que no se pudo determinar el número de copias de *SMN2* en 25 de los 144 pacientes (17,4%) previamente estudiados por MLPA.

Para el análisis de los resultados, ambas técnicas requieren de un *software* específico, siendo el del MLPA algo más complejo dado que se deben analizar muchas regiones en forma simultánea, mientras que, en la PCR-RT sólo se realiza un cociente entre la amplificación obtenida para el gen de interés (*SMN2*) y el gen de referencia (albúmina).

En cuanto a los costos, ambas metodologías requieren de equipamiento específico para ser llevadas a cabo: un secuenciador automático para el caso de MLPA y un termociclador a tiempo real para la PCR-RT. Considerando que el laboratorio cuenta con ambos equipos, el costo de la técnica de MLPA es aproximadamente el doble que el de la PCR a tiempo real. Sin embargo, también es mayor la información que aporta acerca de la región AME ya que, como se mencionó previamente, además de cuantificar al *SMN2* permite estudiar el número de copias del gen *SMN1* y regiones adyacentes en forma simultánea. De este modo, en una sola reacción también se puede evaluar la extensión de la deleción y establecer si se trata de una deleción “verdadera” ó de una conversión génica, lo cual permite realizar una valoración más global del genotipo de los pacientes.

En cuanto a los casos en los que se obtuvieron resultados diferentes entre ambas técnicas, en la mayoría de ellos el número de copias resultó menor por la técnica de PCR-RT, probablemente debido a una mala calidad ó integridad del ADN provocando una amplificación ineficiente del gen (Alías *et al.*, 2011). Aunque menos probable, las diferencias también podrían deberse a variaciones en la secuencia del ADN genómico donde deben aparearse los *primers* de la PCR-RT ó, en el caso del MLPA, donde deberían hibridar las sondas de MLPA. La posibilidad de repetir las determinaciones en nuevas muestras de ADN permitiría corroborar la primera hipótesis y, en caso de que estas diferencias se mantuvieran, se podría secuenciar el gen *SMN2* en búsqueda de variaciones en su secuencia de ADN que darían lugar a las diferencias observadas.

**Correlación genotipo- fenotipo AME:**

Nuestros resultados muestran que existe una asociación significativa entre el número de copias del gen *SMN2* y el fenotipo clínico de AME, siendo éste de curso más leve cuanto mayor es el número de copias del gen. Sin embargo, si bien el modelo del número de copias de *SMN2* puede aplicarse a la mayoría de los casos, no siempre igual número de copias puede correlacionarse con el mismo fenotipo sino que existe un importante solapamiento entre los diferentes grupos. Esta observación coincide con lo descrito por la mayoría de los autores (Fedkotter *et al.*, 2002; Ogino *et al.*, 2003; Wirth *et al.*, 2006).

En la población estudiada no se encontró ningún niño que presentara una única copia del gen *SMN2*, este genotipo ha sido descrito en un escaso número pacientes con formas neonatales muy severas de la enfermedad (Fedkotter *et al.*, 2002; Mailmann *et al.*, 2002; Arkblad *et al.*, 2006; Watihayati *et al.*, 2009 y Alías *et al.*, 2011). Tampoco se detectaron pacientes con más de 4 copias de *SMN2*, las que han sido detectadas en las formas más leves de AME, tipo IIIb y IV (Prior *et al.*, 2004 y 2009; Kesari *et al.*, 2005; Wirth *et al.*, 2006); esto probablemente se deba a la edad de consulta de los pacientes en nuestro hospital, que está limitado a la población pediátrica.

Del estudio de correlación dentro de cada subtipo de AME surge también, que las características clínicas muestran cierta variabilidad aun cuando los pacientes presentan un mismo genotipo. Entre los 56 pacientes con AME tipo I, dos mostraron sostén cefálico parcial, si bien la totalidad del grupo presentaba sólo 2 copias de *SMN2*.



Asimismo, sólo el 24,5% de los pacientes con AME tipo II lograron bipedestación con apoyo, a pesar de que el 98,1% de los mismos tenía 3 copias de *SMN2*. (ANEXO 3)

Por otra parte, en el grupo de niños con AME tipo III al comparar aquellos con 3 y 4 copias de *SMN2*, no observamos diferencias significativas en cuanto a la edad de inicio de los síntomas, ni en la edad de adquisición de la marcha entre los mismos. Sin embargo, al subdividir a los pacientes con AME tipo III de acuerdo a la aparición de los síntomas antes o después de los 3 años de vida, observamos que la presencia de 4 copias fue mucho más frecuente en la forma IIIb (46,2%) que en la forma IIIa (12,5%). Esta observación coincide con lo descrito por otros grupos investigadores (Prior *et al.*, 2004; Swoboda *et al.*, 2005; Wirth *et al.*, 2006).

De acuerdo a lo publicado por Swoboda *et al.* (2005) y Wirth *et al.* (2006), los pacientes con AME tipo III que presentan diferente número de copias de *SMN2* (3 ó 4), si bien pueden tener la misma edad de aparición de síntomas, aquellos con mayor número de copias mostrarían un mejor mantenimiento de la función motora en el tiempo y, así, una progresión más lenta de la enfermedad. En este trabajo, como se estudió un corte transversal de la población, este análisis no pudo realizarse. Sin embargo, dado que encontramos pacientes AME tipo III con 3 y 4 copias de *SMN2*, no podemos descartar que los mismos exhiban diferencias en la progresión de su enfermedad dentro de algunos años.

De acuerdo a los primeros estudios de correlación genotipo-fenotipo (Lefevre *et al.*, 1995; Campbell *et al.*, 1997; Cuscó *et al.*, 2001), el número esperado de copias del gen *SMN2* para los subtipos clínicos AME II y III es mayor o igual a 3. Sin embargo, en nuestra serie de pacientes detectamos un niño con AME tipo II que presentó sólo 2

copias de *SMN2*. Éstos casos son los denominados “discordantes” desde el punto de vista genético molecular ya que, al revisar las características clínicas de este paciente, no se encontraron diferencias respecto del resto del grupo de niños con AME tipo II. Varios grupos investigadores han referido casos en los que pacientes con fenotipo de AME II o III presentan un número de copias inferior al esperado (Prior *et al.*, 2009, Bernal *et al.*, 2010), esta observación apoya la hipótesis de que existen otros factores involucrados en la determinación del fenotipo y que no estaría dado únicamente por el número de copias del gen *SMN2*.

El hecho de que pacientes con el mismo número de copias de *SMN2* presenten diferente fenotipo clínico podría deberse a diferentes niveles de expresión proteica, o bien, a la presencia de otros factores o genes modificadores extrínsecos. Por muchos años se ha asumido que todas las copias de *SMN2* son equivalentes, sin embargo, actualmente se sabe que podrían existir cambios en su secuencia con un potencial efecto positivo ó negativo sobre la transcripción y/ó procesamiento post-traducciona del ARN del *SMN2*.

En los casos discordantes antes mencionados se realiza la búsqueda de la presencia de una variante de secuencia en el exón 7 del gen *SMN2* (c.859G>C), actualmente considerada un modificador fenotípico. Dicha variante nucleotídica provoca la sustitución de una arginina por una glicina en la proteína SMN, lo que conduce a un importante cambio en su estructura tridimensional y genera, además, un nuevo sitio *ESE* (*Exonic Splicing Enhancer*). Éste nuevo elemento *ESE* promueve un incremento en los niveles de proteína funcional, lo que permitiría explicar que el

fenotipo observado sea menos severo que el esperado si sólo se tuviera en cuenta en número de copias de *SMN2* (Prior *et al.*, 2009).

Con respecto al gen *NAIP*, se observó una fuerte asociación entre la ausencia de este gen y el fenotipo más severo de AME. En nuestra serie de pacientes con la forma AME tipo I se encontró que el gen *NAIP* estaba ausente en el 73,2% de los casos, similar a lo reportado por Jedrzejowska *et al.* (2009) y algo mayor a lo publicado por Velasco *et al.* (1996), Kesari *et al.* (2005) y Watihayati *et al.* (2009), quienes reportaron una frecuencia de la delección, en estos pacientes, de 67,9%, 41% y 50% respectivamente. En los pacientes con AME tipo II y III el gen *NAIP* estaba presente en más del 85% de los casos, coincidiendo con lo publicado por otros autores (Lefevre *et al.*, 1995; Velasco *et al.*, 1996; Simard *et al.*, 1997; Petit *et al.*, 2011).

De acuerdo a estos resultados, las delecciones del gen *NAIP* parecen estar asociadas con un incremento en la severidad del cuadro clínico, sin embargo, esta asociación no sería absoluta. El gen *NAIP* estuvo presente en casi el 30% de los pacientes con AME tipo I a pesar de que el cuadro clínico era muy severo y la aparición de síntomas muy temprana. Éstos hechos apoyan la hipótesis de que la mayoría de los AME tipo I poseen alelos con grandes delecciones que involucran tanto al gen *SMN1* como al *NAIP*, pero no sustenta el concepto de que el gen *NAIP* pueda ser por sí solo, un modificador del fenotipo (Simard *et al.*, 1997; Campbell *et al.*, 1997).

Estas grandes delecciones, que involucran a los genes *SMN1* y *NAIP*, resultan poco frecuentes en los pacientes con las formas más leves de la enfermedad (Roy *et al.*, 1995; Burlet *et al.*, 1996; Al Rajeh *et al.*, 1998). En nuestra serie de pacientes encontramos dos niños con AME tipo II y tres niños con AME tipo III que presentaron

ausencia de ambos genes. Los cinco niños tenían la particularidad de presentar 3 copias de *SMN2*. Si asumimos que la delección del gen *NAIP* sólo estaría indicando el mecanismo genético que conduce a la ausencia del gen *SMN1* (delección verdadera), surge el interrogante de cómo podría explicarse la presencia de 3 o más copias de *SMN2* en pacientes con ausencia del gen *NAIP*, como los que se mencionaron previamente. Podría pensarse que se produjo una delección del gen *NAIP* en un alelo en el que previamente había ocurrido una conversión de *SMN1* en *SMN2*, o bien, que tanto la conversión génica de *SMN1* en *SMN2* como la delección del gen *NAIP* ocurrieron juntas sobre el mismo cromosoma. Teniendo en cuenta la gran inestabilidad de la región AME, esta secuencia de eventos podría ser factible (Jedrzejowska *et al.*, 2009).

Por todo lo expuesto, el rol que juega el gen *NAIP* como modificador fenotípico aún se encuentra en discusión y muchos autores lo consideran un factor de confusión.

Finalmente, en los últimos años se ha logrado un gran progreso en la comprensión de las correlaciones genotipo-fenotipo de la Atrofia Muscular Espinal. Sin embargo, existe un gran número de interrogantes que aún necesitan ser clarificados. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que el número de copias del gen *SMN2* es un claro modificador del fenotipo clínico aunque no siempre absoluto. Por lo tanto, deben existir otros factores modificadores aún desconocidos que necesitan ser revelados mediante la búsqueda de nuevos marcadores y seguimiento de los pacientes a largo plazo.

## ***CONCLUSIONES***

---

En referencia a la cuantificación del gen *SMN2* los resultados obtenidos en este trabajo nos permiten concluir que la metodología de MLPA muestra ser más robusta que la PCR a tiempo real, brinda mayor información acerca de la región AME y, además, puede ser utilizada para la detección de portadores ya que, como se mencionó previamente, permite cuantificar en forma simultánea el gen *SMN1*. Asimismo, si bien ambas metodologías requieren de una adecuada puesta a punto, la de MLPA resulta más fácil de llevar a cabo y permite que cualquier operador pueda realizarla siguiendo las instrucciones del fabricante. La realización de la PCR a tiempo real, por su parte, es más laboriosa y operador dependiente.

En lo que respecta a la correlación genotipo-fenotipo, el número de copias del gen *SMN2* varió con el fenotipo clínico de AME, a mayor número de copias menor grado de severidad. Del mismo modo que en otras poblaciones AME analizadas, este patrón de comportamiento no alcanza a explicar la totalidad de los casos, ya que un mismo número de copias puede corresponderse con más de un fenotipo. Por otra parte, se reconoció también una fuerte asociación entre la ausencia del gen *NAIP* y el fenotipo más severo AME tipo I.

Además, la existencia de un espectro continuo de expresión clínica, aún dentro de cada subtipo de AME, pone de manifiesto que los genes *SMN2* y *NAIP* no serían los únicos involucrados en la variabilidad del fenotipo. Deben existir otros factores modificadores que aun se desconocen y que deberán ser objeto de futuras investigaciones.

Los resultados de este proyecto han permitido una mejor caracterización de los pacientes con AME atendidos por el Grupo Interdisciplinario de Atención para

Pacientes Neuromusculares del Hospital de Pediatría J.P. Garrahan. El mejor conocimiento de los factores que intervienen en el desarrollo de la enfermedad aporta información útil para mejorar el diagnóstico y pronóstico de estos pacientes facilitando la incorporación de conductas terapéuticas más adecuadas e individualizadas para cada niño de acuerdo al grado de severidad que manifieste.

## **BIBLIOGRAFÍA**



- Alías L, Bernal S, Fuentes-Prior P, Barcelo MJ, Also E, Martinez-Hernandez R, Rodriguez-Alvarez FJ, Martin Y, Aller E, Grau E, Pecina A, Antinolo G, Galan E, Rosa AL, Fernandez-Burriel M, Borrego S, Millan JM, Hernandez-Chico C, Baiget M, Tizzano EF. Mutation update of spinal muscular atrophy in Spain: molecular characterization of 745 unrelated patients and identification of four novel mutations in the SMN1 gene. *Hum Genet* 2009; 125:29e39.
- Alías L, Barceló MJ, Gich I, Estapé M, Parra J, Amenedo M, Baiget M, Tizzano EF. *Evidence of a segregation ratio distortion of SMN1 alleles in spinal muscular atrophy*. *European Journal of Human Genetics* (2007) 15, 1090–1093
- Alías L, Bernal S, Barceló MJ, Also-Rallo E, Martínez-Hernández R, Rodríguez-Alvarez FJ, Hernández-Chico C, Baiget M, Tizzano EF. *Accuracy of marker analysis, quantitative real-time polymerase chain reaction, and multiple ligation-dependent probe amplification to determine SMN2 copy number in patients with spinal muscular atrophy*. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2011 Sep; 15(9):587-94. Epub 2011 May 6.
- Al Rajeh S, Majumdar R, Awada A. *Molecular Analysis of the SMN and NAIP genes in Saudi spinal muscular atrophy patients*. *J Neurol Sci* 1998; 158:43-46
- Arkblad E., Niklas D., Kerstin B., Kimber E., Brandberg G., Lindberg C., Holmberg E., Tulinius M., Nordling M. *Multiplex Ligation-dependent probe amplification improves diagnostics in spinal muscular atrophy*. *Neuromuscular Disorders* 2006 Oct 16.
- Bernal S, Alías L, Barceló MJ, Also-Rallo E, Martínez-Hernández R, Gámez J, Guillén-Navarro E, Rosell J, Hernando I, Rodríguez-Alvarez FJ, Borrego S, Millán JM, Hernández-Chico C, Baiget M, Fuentes-Prior P, Tizzano EF. *The c.859G>C variant in the SMN2 gene is associated with types II and III SMA and originates from a common ancestor*. *J Med Genet*. 2010 Sep; 47(9):640-2. Epub 2010 Jun 24
- Burlet P, Btirglen L, Clermont O, Lefebvre S, Viollet L, Munnich A, Melki J. *Large scale deletions of the 5q13 region are specific to Werdnig-Hoffmann disease*. *J Med Genet* 1996;33:281-283
- Btirglen 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 Mar 15; 32(3):479-82.

- Burghes AM. *When Is a Deletion Not a Deletion? When It Is Converted*. Am. J. Hum. Genet. 61:9-15, 1997
- 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*. Am J Hum Genet. 1997 Jul; 61(1):40-50.
- Coovert DD, Le TT, McAndrew PE, Strasswimmer J, Crawford TO, Mendell JR, Coulson SE, Androphy EJ, Prior TW, Burghes AH. *The survival motor neuron protein in spinal muscular atrophy*. Hum Mol Genet. 1997 Aug; 6(8):1205-14.
- Crawford TO, Paushkin SV, Kobayashi DT, Forrest SJ, Joyce CL, Finkel RS, Kaufmann P, Swoboda KJ, Tiziano D, Lomastro R, Li RH, Trachtenberg FL, Plasterer T, Chen KS. *Evaluation of SMN protein, transcript, and copy number in the biomarkers for spinal muscular atrophy (BforSMA) clinical study*. PLoS One. 2012;7(4):e33572. Epub 2012 Apr 27.
- Cuscó I, Barceló MJ, Martin EY, Hernandez-Chico C, Bussalia E, Baiget M, Tizzano EF. *Characterization of SMN hybrid genes in Spanish SMA patients: de novo, homozygous and compound heterozygous cases*. Hum Genet (2001) 108:222-229
- Cuscó I, Barceló MJ, Rojas-García R, Gamez J, Cervera C, Pou A, Izquierdo G, Baiget M, Tizzano EF. *SMN2 copy number predicts acute or chronic spinal muscular atrophy but does not account for intrafamilial variability in siblings*. J Neurol 2006; 253:21e5.
- Feldkötter 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 Feb; 70(2):358-68. Epub 2001 Dec 21
- Finkel RS, Crawford TO, Swoboda KJ, Kaufmann P, Juhasz P, Li X, Guo Y, Li RH, Trachtenberg F, Forrest SJ, Kobayashi DT, Chen KS, Joyce CL, Plasterer T. *Candidate proteins, metabolites and transcripts in the Biomarkers for Spinal Muscular Atrophy (BforSMA) clinical study*. PLoS One. 2012;7(4):e35462. Epub 2012 Apr 27.
- Friesen WJ, Massenet S, Paushkin S, Wyce A, Dreyfuss G. *SMN, the product of the spinal muscular atrophy gene, binds preferentially to dimethylarginine-containing protein targets*. Mol Cell. 2001 May;7(5):1111-7

- Goncalves-Rocha M., Oliviera J., Rodrigues L., and Santos R. *New Approaches in the Molecular Diagnosis and Population Carrier Screening for Spinal Muscular Atrophy*. Genetic Testing and Molecular biomarkers. Vol 00, number 00, 2011, pp1-8.
- Götz R, Karch C, Digby MR, Troppmair J, Rapp UR, Sendtner M. *The neuronal apoptosis inhibitory protein suppresses neuronal differentiation and apoptosis in PC12 cells*. Hum Mol Genet. 2000 Oct 12;9(17):2479-89.
- Helmken C, Hofmann Y, Schoenen F, Oprea G, Raschke H, Rudnik-Schöneborn S, Zerres K, and Wirth B. *Evidence for a modifying pathway in SMA discordant families: reduced SMN level decreases the amount of its interacting partners and Htra2-beta1*. Hum Genet. 2003 Dec; 114(1):11-21. Epub 2003 Oct 1.
- Huang CH, Chang Y, Chen CH, Kuo YS, Hwu WL, Gerdes T, Ko TM. *Copy number analysis of survival motor neuron genes by multiplex ligation-dependent probe amplification*. Genetics in Medicine. April 2007.vol 9. N 4.
- Jedrzejowska M., Milewski M., Zimowski J., Borkowska J., Kostera-Pruszczyk A., Sielska D., Jurek M. and Hausmanowa-Petrusewicz I. *Phenotypic 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. Vol 56 No. 1/2009, 103-108.
- Kashima T, Manley JL. *A negative element in SMN2 exon 7 inhibits splicing in spinal muscular atrophy*. Nat Genet. 2003 Aug; 34(4):460-3.
- Kesari A., Mohammed I., Chandak GR and Mittal B. *Genotype-Phenotype correlation of SMN locus genes in spinal muscular atrophy patients from India*. Experimental and Molecular Medicine, vol 37, Nro. 3, 147-154, June 2005
- Kyounam C, Kyunghwa R, Eunha L, Sunyoung W, Jongsoo K, Ook JY, and Sihoun H. *Correlation between Genotype and Phenotype in Korean patients with Spinal Muscular Atrophy*. Mol. Cells, vol. 11, Nro. 1, pp.21-27.
- Lefebvre S, Bürglen 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 Jan 13; 80(1):155-65.

- Lefebvre S, Burlet P, Liu Q, Bertrand S, Clermont O, Munnich A, Dreyfuss G, Melki J. *Correlation between severity and SMN protein level in spinal muscular atrophy*. Nat Genet. 1997 Jul; 16(3):265-9.
- 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; 96:6307e11.
- Lorson C.L., Rindt H. and Shababi M. *Spinal muscular atrophy: mechanisms and therapeutic strategies*. Hum Mol Genet. 2010 Apr 15; 19(R1):R111-8. Epub 2010 Apr 13
- Lunn MR, Wang CH. *Spinal muscular atrophy*. Lancet 2008; 371(9630):2120-33.
- Mailman MD, Heinz JW, Papp AC, Snyder PJ, Sedra MS, Wirth B, Burghes AH, Prior TW. *Molecular analysis of spinal muscular atrophy and modification of the phenotype by SMN2*. Genet Med. 2002 Jan-Feb; 4(1):20-6.
- Monani UR, Sendtner M, Covert DD, Parsons DW, Andreassi C, Le TT, Jablonka S, Schrank B, Rossoll W, Prior TW, Morris GE, Burghes AH. *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. 2000 Feb 12; 9(3):333-9.
- Mourelatos Z, Dostie J, Paushkin S, Sharma A, Charroux B, Abel L, Rappsilber J, Mann M, Dreyfuss G. *miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs*. Genes Dev. 2002 Mar 15;16(6):720-8
- Muller B, Melki J, Burlet P and Clerget-Darpoux F. *Proximal Spinal Muscular Atrophy (SMA) Types 11 and III in the Same Sibship Are Not Caused by Different Alleles at the SMA Locus on 5q*. Am. J. Hum. Genet. 50:892-895, 1992
- Ogino S, Wilson RB. *Genetic testing and risk assessment for spinal muscular atrophy (SMA)*. Hum Genet. 2002 Dec; 111(6):477-500. Epub 2002 Oct 3
- Ogino S, Gao S, Leonard DG, Paessler M, Wilson RB. *Inverse correlation between SMN1 and SMN2 copy numbers: evidence for gene conversion from SMN2 to SMN1*. Eur J Hum Genet (2003) 11, (3):275-7

- Ogino S, Wilson RB and Gold B. *New insights on the evolution of the SMN1 and SMN2 region: simulation and meta-analysis for allele and haplotype frequency calculations*. Eur J of Hum Genet (2004) 12, 1015–1023
- Ogino S, Wilson RB. *Spinal muscular atrophy: molecular genetics and diagnostics*. Expert Rev Mol Diagn. 2004 Jan;4(1):15-29
- Passon N., Dubsky de Wittenau G., Jurman I., Radovic S., Bregant E., Molinis C., Damante G., Lonigro R. I. *Quick MLPA test for quantification of SMN1 and SMN2 copy numbers*. Molecular and Cellular Probes 24 (2010) 310-314
- Pearn J. *Classification of spinal muscular atrophies*. Lancet. 1980 Apr 26; 1(8174):919-22.
- Perrelet D, Ferri A, MacKenzie AE, Smith GM, Korneluk RG, Liston P, Sagot Y, Terrado J, Monnier D, Kato AC. *IAP family proteins delay motoneuron cell death in vivo*. Eur J Neurosci. 2000 Jun; 12(6):2059-67.
- Petit F., Cuisset F., Rouaix-Emery N., Cances C., Sablonniere B., Bieth E., Moerman A., Sukno S., Hardy N., Holder-Espinasse M., Manouvrier-Hanu S. and Vallee L. *Insights into Genotype-Phenotype correlations in Spinal Muscular Atrophy: a retrospective study of 103 patients*. Muscle and Nerve 2011
- Pongers Willemse, M.J., Verhagen, O.J., Tibbe, G.J., Wijkhuijs, A.J., de Haas, V., Roovers, van der Schoot, C.E., van Dongen, J.J., 1998. *Real-time quantitative PCR for the detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using junctional region specific TaqMan probes*. Leukemia 12 (12), 2006–2014
- 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 Oct 15;130A(3):307-10
- Prior T., Krainer A., Hua Y., Swoboda K., Snyder P., Bridgeman S., Burghes A., and Kissel J. *A positive modifier of Spinal Muscular Atrophy in the SMN2 gene*. American Journal of Hum Genetics 85, 408-413, September 11, 2009
- Prior T. and Russman B.S. *Spinal Muscular Atrophy*. Bookshelf ID: NBK1352PMID: 20301526, 2011

- Roy N, Mahadevan MS, McLean M, Shutler G, Yaraghi Z, Farahani R, Baird S, Besner-Johnston A, Lefebvre C, Kang X, et al. *The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy*. Cell. 1995 Jan 13; 80(1):167-78.
- Saito M, Chen Y, Mizuguchi M, Igarashi T. *[Quantitative analysis of SMN2 based on real-time PCR: correlation of clinical severity and SMN2 gene dosage]* No To Hattatsu. 2005 Sep; 37(5):407-12. Japanese.
- Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T. *Molecular Cloning. A laboratory Manual*. Second Edition. E3-E4. 1989.
- Scarciolla O., Stuppia L., De Angelis M.V., Murru S., Palka C., Giuliani R., Pace M., Di Muzio A., Torrente I., Morella A., Grammatico P., Giacanelli M., Rosatelli M.C., Uncini A., Dallapiccola B. *Spinal Muscular Atrophy genotyping by gene dosage using multiple ligation-dependent probe amplification*. Neurogenetics 2006-7: 269-276.
- Scheffer H, Cobben JM, Matthijs G and Wirth B. *Best practice guidelines for molecular analysis in spinal muscular atrophy*. Eur J of Hum Genetics (2001) 9, 484 ± 491
- 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 Oct 3;72(1):51-8
- Sproule DM, Kaufmann P. *Therapeutic developments in spinal muscular atrophy*. Ther Adv Neurol Disord. 2010 May;3(3):173-85
- Sumner CJ. *Therapeutics development for spinal muscular atrophy*. NeuroRx. 2006 Apr; 3(2):235-45.
- Swoboda KJ, Prior TW, Scott CB, McNaught TP, Wride MC, Reyna SP, Bromberg MB. *Natural history of denervation in SMA: relation to age, SMN2 copy number and function*. Ann Neurol 2005; 57: 704-712
- Swoboda KJ, Scott CB, Reyna SP, Prior TW, LaSalle B, Sorenson SL, Wood J, Acsadi G, Crawford TO, Kissel JT, Krosschell KJ, D'Anjou G, Bromberg MB, Schroth MK, Chan GM, Elsheikh B, Simard LR. *Phase II open label study of*

- valproic acid in spinal muscular atrophy*. PLoS One. 2009; 4(5):e5268. Epub 2009 May 14.
- Sugarman EA, Nagan N, Zhu H, Akmaev VR, Zhou Z, Rohlfes EM, Flynn K, Hendrickson BC, Scholl T, Sirko-Osadsa DA, Allito BA. *Pan-ethnic carrier screening and prenatal diagnosis for spinal muscular atrophy: clinical laboratory analysis of >72400 specimens*. Eur J Hum Genet (2012) 20, 27-32.
  - Taylor JE, Thomas NH, Lewis CM, Abbs SJ, Rodrigues NR, Davies KE, Mathew CG. *Correlation of SMNt and SMNc gene copy number with age of onset and survival in spinal muscular atrophy*. Eur J Hum Genet. 1998 Sep-Oct; 6(5):467-74.
  - Tomaszewicz, Kang, Wu. *Detection of homozygous and heterozygous SMN deletions of spinal muscular atrophy in a single assay with multiplex ligation-dependent probe amplification*. Journal of Pekin University. Vol.37 N. 1 Feb 2005
  - Tran VK, Sasongko TH, Hong DD, Hoan NT, Dung VC, Lee MJ, Gunadi, Takeshima Y, Matsuo M, Nishio H. *SMN2 and NAIP gene dosages in Vietnamese patients with spinal muscular atrophy*. Pediatr Int. 2008 Jun;50(3):346-51
  - Velazco 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 BCD541 and SMA phenotype*. Hum Mol Genetics, 1996.Vol. 5, N 2 257-263.
  - Vezain M, Saugier-Veber P, Goïna E, Touraine R, Manel V, Toutain A, Fehrenbach S, Frebourg T, Pagani F, Tosi M, Martins A. *A rare SMN2 variant in a previously unrecognized composite splicing regulatory element induces exon 7 inclusion and reduces the clinical severity of spinal muscular atrophy*. Hum Mutat 2010;31: E1110e25.
  - Wang CH, Finkel RS, Bertini ES, Schroth M, Simonds A, Wong B, Aloysius A, Morrison L, Main M, Crawford TO, Trela A. *Consensus statement for standard of care in spinal muscular atrophy*. J Child Neurol. 2007 Aug;22(8):1027-49
  - Wang CC, Chang JG, Ferrance J, Chen HY, You CY, Chang YF, Jong YJ, Wu SM, Yeh CH. *Quantification of SMN1 and SMN2 genes by capillary electrophoresis for diagnosis of spinal muscular atrophy*. Electrophoresis 2008, 29, 2904–2911

- Watihayati MS, Zabidi-Hussin AM, Tang TH, Matsuo M, Nishio H, Zilfalil BA. *Deletion analyses of SMN1 and NAIP genes in Malaysian spinal muscular atrophy patients*. *Pediatr Int*. 2007 Feb; 49(1):11-4. Erratum in: *Pediatr Int*. 2007 Apr; 49(2):303.
- 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 Jan;31(1):42-5. Epub 2008 Oct 7.
- Wirth B, Herz M, Wetter A, Moskau S, Hahnen E, Rudnik-Schoeneborn S, Wienker T, and 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*. 64:1340–1356, 1999
- 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):228-37
- Wirth B, Brichta L, Hahnen E. *Spinal Muscular Atrophy: from gene to therapy*. *Semin Pediatr Neurol*. 2006 Jun; 13(2):121-31.
- 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 and increased SMN2 copy number*. *Hum Genet* (2006).
- Yoon S., Hoon LC., Lee KA. *Determination of SMN1 and SMN2 copy numbers in a Korean population using multiplex ligation-dependent probe amplification*. *Korean J. Lab Med* 2010;30:93-96



## **ANEXO 1: Fichas de Evolución Clínica**

### **Evaluación pacientes con AME (datos generales)**

#### **1) Datos generales**

Fecha de evaluación inicial:..... /..... /.....

Nombre y apellido:.....HC.....

Fecha de nacimiento:..... /..... /..... Edad (en meses):.....

Sexo: Fem.(1) Masc (2) Procedencia(Provincia).....

Escolaridad del niño: Apropiaada(1) no apropiada(2) último grado

Tipo: normal(1) domiciliaria (2) especial(3) no va(4)

causa.....

#### **Familia:**

Antecedentes familiares cercanos de la misma enfermedad: no(0) si(1)

Quien?.....Falleció?.....

Al cuidado de Madre y padre:.....Madre solo:..... Padre solo.....Otros Quienes?.....

#### **Datos sobre nivel socioeconómico:**

Ingreso mensual promedio en el hogar: \$.....

N° de integrantes del hogar:.....Edades: .....

**NBI (marcar la determinante):** Contesta: no(0) si(1)

Hacinamiento (+ de 3 hab/cto):

Vivienda y Condiciones sanitarias:

Asistencia escolar (niño 6-12 años sin escolarizar):

Capacidad de subsistencia (4 o + personas por mb ocupado, con no + de 3er grado):

Cobertura en Salud actual: No(1) OS(2) Prepaga(3) Pensión x discap.(4)

**Comentario:** Esta ficha es para todos los tipos de SMA. Se debe completar en la primera evaluación. Si existe alguna modificación en las consultas siguientes agregar la modificación y la fecha de la misma.

**Paciente:**..... **Consulta N°:**.....

**2) Cuadro clínico**

**Fecha de evaluación:**..... /..... /.....

**Síntoma de inicio:** Reducción actividad motora (1).....Perdida control cefálico (2).....  
diagnostico de hipotonía (3).....

**Edad de aparición:**.....

**Edad de diagnóstico(meses):**.....Fecha del estudio molecular:.....copias SMN2.....

**Antecedentes perinatológicos:** Distress respiratorio.....Deformidades miembros.....

**Control cefálico:** sí.....edad...../ no.....

**Soporte ventilatorio:** ninguno..... VNI o TQT menos de 16 hs/ día..... desde.....

VNI o TQT más de 16 hs/día.....desde.....

**Alimentación:** Oral..... SNG.....desde (edad en meses).....GTT.....desde (edad en meses).....

**Internaciones por complicaciones respiratorias:** sí: ..... cuantas?..... No:.....

**Falleció:** Edad(meses).....causa: dificultad respiratoria (1)..... infecciones (2) .....otras(3)....

**3) Evaluación Kinesica**

**Movilidad distal (manos y pies):** sí no

**Flexiona codos** sí no

**Logra prensión** sí no

**Escoliosis** sí no **Edad de inicio (meses)**.....

**Cifosis** sí no **Edad de inicio (meses)**.....

**Presenta deformidades:** Si:..... Torax:..... Pies..... No:.....

**4) Tratamientos**

**Realiza tratamiento kinésico motor?** sí Frecuencia: 1v/s 2v/s +de 2v/s no

**Realiza tratamiento kinésico respiratorio?** sí Frecuencia: 1v/s 2v/s +de 2v/s no

**Utiliza:** valvas largas desde..... , valvas cortas por la noche desde..... , corset desde....., cough-assist desde....., bolsa de ambu desde.....

**Recibe:** Carnitina desde (meses)....., Acido valproico desde(meses).....

**Paciente:**.....**Consulta N°:**.....

**2) Cuadro clínico**

**Fecha de evaluación:**..... /..... /.....

**Síntoma de inicio:** retardo madurativo (1) falta de adquisición de la marcha (2)  
 diagnostico de hipotonía (3) . Edad de aparición:.....

**Edad de diagnóstico(meses):**.....Fecha del estudio molecular:.....copias SMN2.....

Antecedentes perinatológicos: si No

Edad de: sedestación (meses)..... , perdida sedestación independiente(meses).....

Edad de : deambulacion con apoyo (meses)....., perdida (meses).....

Edad de: aparición de la escoliosis (meses)..... Cirugía Escoliosis (meses).....

**Soporte ventilatorio:** ninguno VNI o TQT menos de 16 hs/ día desde (meses).....

VNI o TQT más de 16 hs/día desde(meses) .....

**Alimentación:** oral SNG desde(meses)..... GTT desde(meses).....

**Internaciones por complicaciones respiratorias:** sí cuantas?..... no

**Falleció:** Edad(meses).....causa: dificultad respiratoria (1) infecciones (2) otras(3)

**3) Evaluación Kinesica**

**Eleva cabeza en decúbito dorsal?** sí no

**Sedestación independiente:** sí no

**Rolado a decúbito lateral:** sí no

**Rolado a decúbito ventral:** sí no

**Eleva cabeza en decúbito ventral? :** sí no

**Logra apoyo en antebrazos en decúbito ventral? :** sí no

**Logra apoyo en manos en decúbito ventral? :** sí no

**Logra cuadrupedia :** sí no

**Se sienta solo?:** sí no

**Sentado eleva MS 90° o más?** sí no

**Sentado logra extensión de rodillas?** sí no

**Se acuesta solo desde sentado?** sí no

**Flexiona rodillas en decúbito ventral?** sí no

**Logra bipedestación?**    sí                    sí sólo con apoyo o equipamiento                    no

**Logra deambulaci3n? (m1s de 4 pasos)**    sí                    sí sólo con apoyo o equipamiento                    no

**Alimentaci3n independiente?**    sí                    parcial                    no

**Higiene independiente?**                    sí                    parcial                    no

**Vestido independiente?**                    sí                    parcial                    no

**4) Tratamientos**

**Realiza tratamiento kinésico motor?**    sí                    **Frecuencia: 1v/s                    2v/s                    +de 2v/s                    no**

**Realiza tratamiento kinésico respiratorio?** sí    **Frecuencia: 1v/s                    2v/s                    +de 2v/s                    no**

**Utiliza:** valvas largas    desde(meses)..... , valvas cortas por la noche    desde(meses)..... ,  
corset    desde(meses)....., cough-assist    desde....., bolsa de ambu  
desde(meses).....

**Recibe:** Carnitina    desde(meses)....., Acido valproico    desde(meses).....

**Observaciones**.....  
.....  
.....  
.....

<b>SMA 3</b>
--------------

**Paciente:**..... **Consulta Nº:**.....

**2) Cuadro clínico**

**Fecha de evaluación:**..... /..... /.....

**Síntoma de inicio:** **Caídas frecuentes (1)**    **Marcha basculante (2)**    **Debilidad (3)**    .

**Edad de aparición (meses):**.....

**Edad de diagnóstico(meses):**.....**Fecha del estudio molecular:**.....**copias SMN2**.....

Antecedentes perinatológicos: sí                      No

**Edad de adquisición de la marcha independiente(meses):**.....

**Edad de pérdida de la marcha independiente(meses):**.....

**Edad de:** aparición de la escoliosis (meses)..... **Cirugía Escoliosis (meses)**.....

**Soporte ventilatorio:**    ninguno                      VNI nocturna                      desde.....

**Internaciones por complicaciones respiratorias:**    sí    cuantas....                      no

**3) Evaluación Kinesica**

**Se para solo desde el piso?**    sin Gowers o apoyo                      con Gowers o apoyo                      no logra

**e levanta desde una silla?**    sin Gowers o apoyo                      con Gowers o apoyo                      no logra

**Se para en un pie sin apoyo?**    D                      I                      no

**Camina en puntas de pie?**    sí                      no

**Camina sobre talones?**    sí                      no

**Sube escaleras?**    sin apoyo, con alternancia                                      sin apoyo, sin alternancia

con apoyo, con alternancia                                      con apoyo, sin alternancia

No logra

**Baja escaleras?**    sin apoyo, con alternancia                                      sin apoyo, sin alternancia

con apoyo, con alternancia                                      con apoyo, sin alternancia

No logra

**Corre?**    sí                      no

**Salta?**    sobre un pie                      con los dos pies                      no

**Sentado eleva MS más de 90°?**    sí                      no

<b>Alimentación independiente?</b>	sí	parcial	no
<b>Higiene independiente?</b>	sí	parcial	no
<b>Vestido independiente?</b>	sí	parcial	no

**4) Tratamientos**

**Realiza tratamiento kinésico motor?** sí      **Frecuencia:** 1v/s      2v/s      +de 2v/s      no

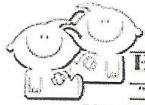
**Realiza tratamiento kinésico respiratorio?** sí      **Frecuencia:** 1v/s      2v/s      +de 2v/s      no

**Utiliza:** valvas largas      desde (meses)..... , valvas cortas por la noche desde(meses)..... , Corsét      desde(meses)....., cough-assist      desde(meses)....., bolsa de ambu      desde(meses).....

**Recibe:** Carnitina      desde (meses)....., Acido valproico      desde(meses).....

**Observaciones**.....  
 .....  
 .....  
 .....

**ANEXO 2: Aprobación del Comité de Ética del Hospital J. P. Garrahan**



HOSPITAL DE PEDIATRÍA  
S.A.M.C.

"PROF. DR. JUAN P. GARRAHAN"

Dirección Asociada de Docencia e Investigación

De: Coordinación de Investigación  
A: Dra. Lilien Chertkoff / Dra. Soledad Monges.  
Servicios Biología Molecular y Neurología.

De mi consideración:

Me es grato dirigirme a Ud. para informarle que el **Protocolo de Investigación N° 608 "Influencia del número de copias del gen SMN2 y de la delección del gen NAIP en el desarrollo y evolución de la atrofia muscular espinal"** ha sido aprobado para su desarrollo en el hospital, luego de cumplimentar el circuito evaluatorio institucional.

Asimismo, cumpla en recordarle que resulta importante, desde el punto de vista institucional, que Ud. se comprometa con **informar en forma periódica** a la Coordinación de Investigación acerca del desarrollo de su estudio (avances, dificultades, presentaciones, publicación) y, si corresponde, con el **adecuado registro en la historia clínica** del paciente de todas las actuaciones relacionadas en el marco del protocolo (fecha de inclusión, fotocopia de consentimiento, visitas, eventos adversos, fin o salida de protocolo, etc.)

Sin otro particular, deseándole éxito en su emprendimiento la saludo  
atentamente

Dra. Susana Rodríguez  
Coordinación de Investigación

Buenos Aires, 13 de julio de 2010

**ANEXO 3: Información clínico-molecular de pacientes AME I, AME II y AME III**

# Paciente AME I	copias SMN2	NAIP	Síntoma de Inicio	Edad de aparición	EDAD APARICION	Control Cefálico		
			Reducción Actividad Motora	Pérdida Control Cefálico	Hipotonía	(DIAS)	(MESES)	
713	2	A			1	60	2	NO
697	2	A			1	30	1	NO
696	2	A			1	90	3	PARCIAL
693	2	A			1	60	2	NO
689	2	A			1	90	3	NO
685	2	A			1	20	0,67	NO
630	2	A			1	35	1,17	NO
617	2	A			1	150	5	NO
613	2	A	1			90	3	NO
597	2	A			1	90	3	no
585	2	A			1	1	0	NO
540	2	A			1	30	1	NO
535	2	A			1			NO
529	2	A			1	1	0	no
526	2	A			1	90	3	no
520	2	A			1	120	4	NO
516	2	A			1	60	2	NO
496	2	A			1	75	2,5	NO
474	2	A			1	35	1,17	NO
457	2	A			1	75	2,5	NO
441	2	A	1		1	90	3	NO
435	2	A			1	1	0	no
401	2	A			1	60	2	no
391	2	A			1	30	1	NO
386	2	A			1	90	3	no
380	2	A			1	20	0,67	no
325	2	A			1	30	1	NO
295	2	A		1	1	60	2	no
276	2	A			1	25	0,83	no
275	2	A			1	30	1	no
267	2	A			1	90	3	no
257	2	A			1	90	3	no
234	2	A					0	
227	2	A			1	60	2	no
213	2	A			1	1	0	NO
135	2	A	1		1	120	4	no
114	2	A	1			90	3	no
86	2	A			1	90	3	no
56	2	A			1	90	3	PARCIAL
21	2	A			1	60	2	no
20	2	A	1			90	3	no
698	2	P	1		1	15	0,5	NO
620	2	P			1	90	3	NO
554	2	P			1	39	1,3	NO
533	2	P			1	1	0	NO
483	2	P			1	90	3	no
419	2	P			1	1	0	no
358	2	P			1	1	0	NO
355	2	P			1	90	3	no
303	2	P			1	60	2	NO
147	2	P			1	90	3	no
136	2	P			1	60	2	no
97	2	P			1	60	2	no
87	2	P	1			90	3	no
67	2	P			1	60	2	no
52	2	P			1	1	0	no



# Pte AME II	Copias SMN2	NAIP	Síntoma de Inicio			Edad de aparición (meses)	Edad de Sedestación (meses)	Edad de deambulación con apoyo (meses)
			Retardo Madurativo	Falta Adquisición de Marcha	Diagnóstico Hipotonía			
728	3	P		1		14	11	no
720	3	P			1	6	8	no
711	3	P		1		9	6	si
700	3	P	1			9	9	no
688	3	P	1			9	7	si
673	3	A			1	7	7	no
672	3	P		1		13	8	no
670	3	P		1		12	6	no
665	3	P		1		18	no	no
655	3	P	1	1		12	8	no
650	3	P	1	1		9	6	no
649	3	P	1			9	16	no
639	3	P		1		12	6	no
634	3	P		1		8	6	NO
633	2	A	1	1	1	7	6	no
606	3	P			1	6	6	no
604	3	P	1		1	20	6	si
558	3	P					12	no
556	3	P	1			10	6	NO
550	3	P		1	1	18	12	no
514	3	P		1		18	6	no
499	3	P	1			14	6	no
494	3	P	1			8	6	no
444	3	P	1		1	9	5	si
443	3	P	1		1	9	5	si
438	3	P			1	15	6	si
431	3	P		1	1	21	7	no
398	3	P			1	5	6	NO
384	3	P	1			6	6	si
377	3	P	1			16	10	no
367	3	P			1	8	6	si
364	3	P	1	1		10	5	NO
359	3	P		1		12	36	NO
332	3	P	1			10	10	NO
327	3	P			1	8	8	no
317	3	P	1		1	10	8	no
306	3	P		1		12	8	no
292	3	P		1		12	9	no
287	3	P		1		24	7	si
282	3	P	1		1	11	42	NO
254	3	P	1			13	6	NO
251	3	P		1		18	6	no
224	3	P	1	1		6	20	NO
184	3	P	1		1	12	8	no
177	3	P	1			12	6	si
176	3	P			1	12	6	si
168	3	P	1	1		14	9	si
166	3	P	1			14	6	si
151	3	P		1		15	6	no
113	3	P		1		15	6	si
111	3	P			1	5	9	no
107	3	P	1			6	7	no
106	3	P	1			8	7	no
65	3	P			1	8	?	no
55	3	P		1		10	8,5	no
53	3	P			1	7	30	no
31	3	P	1			7	6	no
22	3	P	1		1	18	12	no

# Pte AME III	Copias SMN2	NAIP	Síntoma de Inicio				Edad de aparición (meses)	Adquisición de la Marcha (meses)
			Cáidas Frecuentes	Marcha Basculante	Debilidad	Otros		
708	4	P				1	48	32
678	4	P	1				30	30
566	3	A	1				18	18
528	4	P	1		1		60	12
478	4	P	1	1			36	12
472	4	P		1			34	13
394	4	P	1				24	10
44	4	P		1			45	18
24	4	P	1				36	13
671	3	P	1	1			18	14
621	3	P	1				168	17
567	3	P		1			12	12
489	3	P		1			18	12
480	3	P	1				15	12
479	3	P	1				12	12
454	3	P		1			14	14
407	3	P			1		120	12
387	3	A	1				18	11
344	3	P			1		60	11
308	3	A	1	1	1		16	16
286	3	P			1		72	15
269	3	P					28	sin datos
214	3	P				1	120	15
206	3	A			1		24	sin datos
192	3	P	1				14	14
133	3	P	1		1		24	14
122	3	P			1		13	13
109	3	P	1				18	18
47	3	P			1		180	12
43	3	P					40	sin datos

SMA III A	SMN2	Edad de aparición (meses)	Adquisición Marcha (MESES)
472	4	34	13
394	4	24	10
566	3	18	18
671	3	18	14
567	3	12	12
489	3	18	12
480	3	15	12
479	3	12	12
454	3	14	14
387	3	18	11
308	3	16	16
206	3	24	SIN DATOS
192	3	14	14
133	3	24	14
122	3	13	13
109	3	18	18
269	3	28	SIN DATOS

SMA III B	SMN2	Edad de aparición (meses)	Adquisición Marcha (MESES)
708	4	48	12
678	4	30	12
528	4	60	12
478	4	36	12
44	4	45	18
24	4	36	13
621	3	168	17
407	3	120	12
344	3	60	11
286	3	72	15
214	3	120	15
47	3	180	12
43	3	40	SIN DATOS

#### Group Statistics

		nro de copias SMN2	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Edad de aparición (meses)	3_copias		22	46,45	52,198	11,129
	4_copias		8	39,13	11,382	4,024
Adquisición de la Marcha (meses)	3_copias		19	13,79	2,226	,511
	4_copias		8	17,50	8,652	3,059

#### Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
Edad de aparición (meses)	Equal variances assumed	7,244	,012	,390	28	,700	7,330	18,811	-31,202	45,861
	Equal variances not assumed			,619	25,541	,541	7,330	11,834	-17,017	31,676
Adquisición de la Marcha (meses)	Equal variances assumed	20,896	,000	-1,778	25	,088	-3,711	2,087	-8,009	,588
	Equal variances not assumed			-1,196	7,393	,268	-3,711	3,101	-10,966	3,544

