

Determinação do número de cópias dos genes *SMN1* e *SMN2* por PCR quantitativa

Denilce R. Sumita Lima, Fabiana F. da Silva, Débora Silveira, Cláudia A. de Paula, & Martin R. Whittle
Genomic Engenharia Molecular Ltda, São Paulo, SP, Brasil

XXVI Congresso Brasileiro de Genética Médica
Fortaleza, 2014

INTRODUÇÃO

Atrofia muscular espinhal (AME; *spinal muscular atrophy*; MIM #253300) é uma doença genética autossômica recessiva com incidência aproximada de 1 em cada 8000 nascimentos. Ela causa fraqueza muscular e perda progressiva do movimento devido à deterioração das células nervosas (neurônios motores) ligando a medula espinhal aos músculos do corpo. AME é classificada em quatro tipos de acordo com a idade em que os sintomas se desenvolvem e a sua gravidade. Nos casos mais graves (tipos I e II), problemas respiratórios fatais muitas vezes desenvolvem-se durante a infância. A expectativa de vida é geralmente afetada em casos mais leves (tipos III e IV). AME é causada por genes defeituosos, geralmente transmitidos a uma criança por seus pais. Os tipos mais comuns de atrofia espinhal muscular - tipos I, II e III - são causadas por uma lesão no gene *SMN1* no cromossomo 5q13.2. Em aproximadamente 97% de pacientes com AME ambas cópias dos exons 7 de *SMN1* são deletadas ou tornadas inoperantes devido à conversão gênica. Em torno de 1 em cada 45 pessoas é portadora de um gene *SMN1* defeituoso. AME tipo IV é causada por defeitos em *SMN1* bem como em alguns outros genes. O teste molecular comumente usado para detectar o *SMN1* defeituoso envolve PCR seguido de digestão enzimática: a presença de produto digerido é consistente com o diagnóstico de AME (1). Observando a falta de digestão, contudo, não distingue entre portadoras do gene mutado e indivíduos normais. Esse teste também não fornece informação sobre o gene *SMN2*. Esse gene fica adjacente e é quase idêntico ao gene *SMN1* porém, ele não possui atividade significativa em indivíduos normais. Contudo, em indivíduos afetados com AME, o número de cópias de *SMN2* influi no desenvolvimento da doença e é parcialmente responsável pela variabilidade clínica descrita acima uma vez que eles podem ser ligeiramente ativados. Por esse motivo, a quantificação do número de cópias do gene *SMN2* em indivíduos afetados com AME tem importância clínica. Desenvolvemos um ensaio molecular que precisamente quantifica o número de cópias dos genes *SMN1* e *SMN2*. O ensaio é baseado em PCR quantitativo (qPCR) e utiliza dois genes de referência além do DNA genômico de um indivíduo cujo genótipo é conhecido como calibrador. Esse ensaio serve, portanto, para identificar pacientes afetados com AME, portadoras da doença, e fornecer informação sobre o prognóstico de pacientes afetados.

MATERIAIS E MÉTODOS

Quatro pares de primers foram desenhados (Tabela 1) e usados para amplificar regiões dentro dos genes *SMN1*, *SMN2*, *CFTR* e *FVL*; os genes *CFTR* e *FVL* são usados como genes de referência em qPCR relativa, presumindo que há uma cópia de cada um desses genes por genome haplóide. Cada alvo é amplificado separadamente em triplicata, nas seguintes condições de reação: Tris-HCl pH 8,8 10 mM, 2 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 50 mM KCl, 0,15% Triton X-100, 0,2 mg/ml BSA, 0,25X Sybr Green I, 260 nM cada primer e 2,5 U of Taq DNA polimerase (Platinum), juntos com 20 ng DNA genômico em um volume final de 20 µl. Os termociclos usados foram 1 ciclo a 95°C por 5 min e 40 ciclos com 95°C por 15 seg e 66°C por 60 seg, usando o termociclador 7500 (Applied Biosystems). Os dados obtidos foram analisados usando o programa LinRegPCR (2) e tratados como descrito por D'haene *et al.* (3). Inicialmente duas amostras de DNA genômico cujo número de cópias de *SMN1* e *SMN2* é conhecido foram obtidas das Coriell Cell Repositories para padronizar o ensaio e para permitir a escolha de novos padrões locais, bem como definir a amostra que serve calibrador da qPCR relativa. Os DNAs genômicos de 138 indivíduos adultos, não aparentados e normais, aleatoriamente escolhidos da população brasileira, de forma anônima, foram submetidos a quantificação dos genes *SMN1* e *SMN2* usando o ensaio desenvolvido.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após otimização os quatro alvos amplificaram com eficiência >90%. Exemplos das curvas de amplificação dos quatro alvos são mostrados em baixo. O ensaio foi usado para quantificar o número de cópias de *SMN1* e *SMN2* em 138 indivíduos não aparentados e os dados obtidos são apresentados na Tabela 2. Embora a amostragem seja pequena, esses números são semelhantes àqueles encontrados por autores em outras populações (4,5).

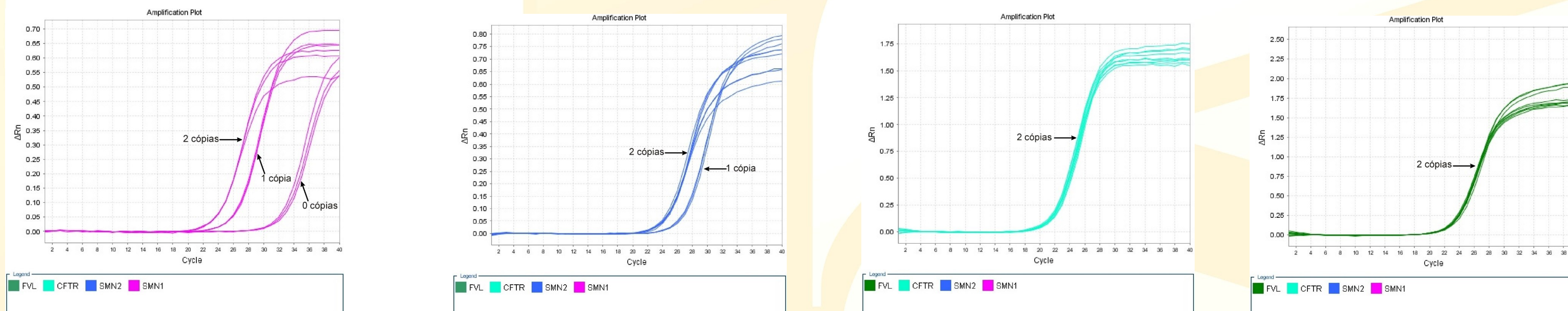


Tabela 1

SMN1-F:	CTTCCTTTATTTTCCTTACAGGGTTTCA*
SMN1-R:	GCTGGCAGACTTACTCCTTAATTTAAGG
SMN2-F:	TTTAACCTCCTTTATTTTCCTTACAGGGTTTCA*
SMN2-R:	CACCTTCATAATGCTGGCAGACTTACTCC
CFTR-F:	GTTGGCATGCTTTGACGCTTC
CFTR-R:	GTTTTCTGGATTATGCCTGGCAC
FVL-F:	TGCCAGTGTAAACAAGACCA
FVL-R:	CTTGAAGGAAATGCCCATTA

*esses primers contém bases modificadas

Tabela 2

Cópias <i>SMN1</i> : <i>SMN2</i>	Número de indivíduos	Porcentagem de indivíduos
0:2	0	0
0:3	0	0
0:4	0	0
1:0	0	0
1:1	3	2,2
1:2	0	0
1:3	0	0
1:4	0	0
2:0	6	4,3
2:1	52	37,7
2:2	62	44,2
2:3	5	3,6
3:1	6	4,3
3:2	3	2,2
3:3	1	0,7
4:0	0	0
Total	138	100

Relato de um caso

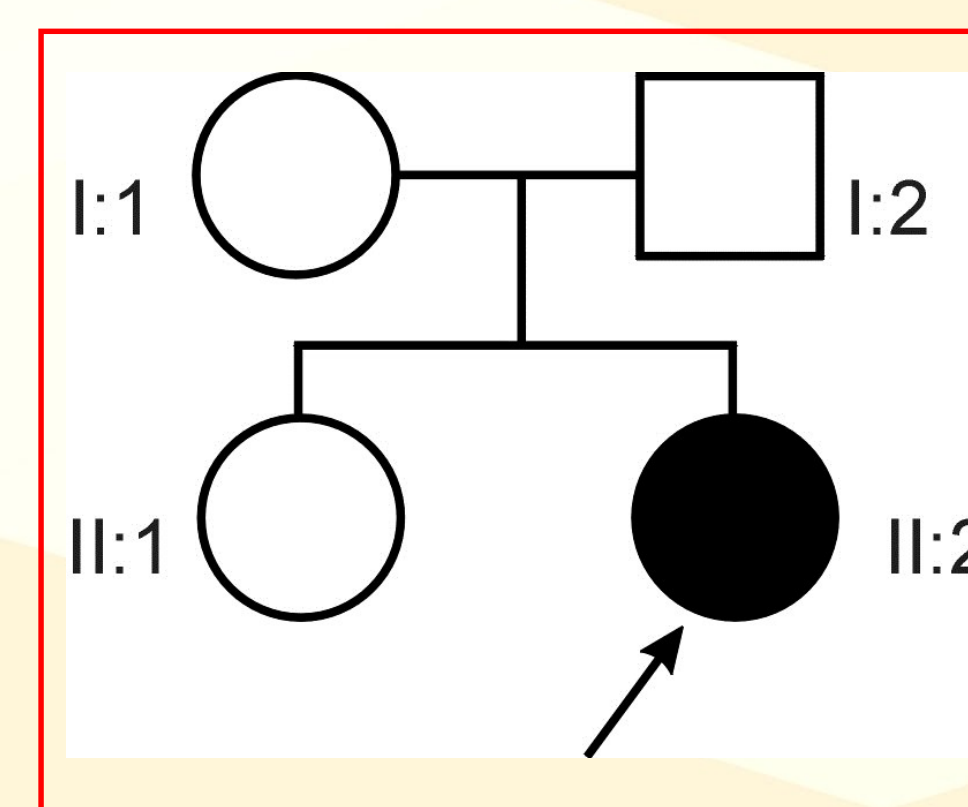
Conforme mostrado no heredograma, um casal não consanguíneo (I:1 31 anos de idade, I:2 35 anos de idade, etnias pardo) tiveram duas filhas. Filha II:1 é normal com 7 anos de idade. Filha e consulente II:2 tem 7 meses de idade nasceu em parto normal. Após 15 dias apresentou uma redução de movimentos espontâneos e hipotonia. Os exames bioquímicos eram normais exceto a triagem por 'teste de pezinho' que sugeriu deficiência de biotinidase.

O exame eletroencefalográfico mostrou acometimento motor dos miótomos pesquisados (membros superiores e inferiores), de natureza axonal que, associada à condução sensitiva normal e presença de padrão neurogênico nos eletromiogramas, sugeriu afecção pré-ganglionar dos motoneurônios (doença do neurônio motor inferior?). A biópsia muscular demonstrou atrofia seletiva de fibras do tipo II compatíveis com lesão central encefálica.

A paciente recebeu alta tomando suplementos de biotina, com o diagnóstico de uma doença neuromuscular sendo descartado. Contudo seu quadro clínico voltou a piorar e a possibilidade de ela ter AME tipo I (Werdnig-Hoffman) foi proferida.

A paciente foi encaminhada para a realização do exame molecular de *SMN1*, cujos resultados são na tabela adjacente. O pai (I.2) possui uma cópia de *SMN1*, sendo portador típico da doença. A mãe (I.1) possui duas cópias de *SMN1* e, uma vez que a paciente afetada (II.2) não possui cópias de *SMN1*, a mãe possui a configuração '2+0', tendo duas cópias de *SMN1* em um cromossomo e nenhuma cópia de *SMN1* no cromossomo homólogo. É estimado que ≥5% da população possuem essa configuração '2+0', dependendo da etnia (6). A paciente (II.2) possui duas cópias de *SMN2* o que não é favorável para o prognóstico dela.

A irmã (II.1) do consulente está sendo testado para saber se ela é normal ou portadora da doença.



Indivíduo	Genótipos observados
I.1	2:3
I.2	1:1
II.2	0:2

AME é a segunda doença autossômica recessiva fatal mais comum após fibrose cística. O diagnóstico molecular da doença é realizado observando a deleção em homozigose do exon 7 do gene *SMN1*, com sensibilidade de aproximadamente 95%. Esse mesmo teste simples (1) não é capaz de identificar portadores da doença uma vez que a quantificação de *SMN1* é necessário para tal. Considerando, contudo, que a frequência de portadores é em torno de 1 em 45, que é semelhante a frequência de portadores em outras doenças para quais já é recomendado *screening* populacional, os argumentos a favor da detecção de portadores de AME em nível populacional permanecem fortes (7). Há vários testes descritos para a quantificação de *SMN1* descritos, baseados em MLPA (8), qPCR (9) ou DHPLC (10). O ensaio descrito nesse trabalho é simples, barato e quantifica *SMN2* simultaneamente; ele é passível à automação e portanto adequado para ser usado para a detecção de portadores em nível populacional, dentro das normas preconizadas (11). Há duas limitações no teste para portadores. Em primeiro, aproximadamente 2% de casos de AME são devidos à ocorrência de mutações novas, o que parcialmente explica a alta frequência de portadores na população apesar da alta letalidade da AME tipo I. Em segundo, o fato que pode existir mais que uma cópia de *SMN1* em um cromossomo, como ilustrado na nossa amostragem e no relato de um caso, tem implicações sérias para o aconselhamento genético dos portadores. Ou seja, o achado de duas cópias de *SMN1* em um indivíduo reduz significativamente seu risco de ser portador porém sobra um risco residual dele ser portador e ter prole afetado. Portadores silenciosos com a configuração '2+0' são mais comuns em indivíduos de etnia negra, tal que provavelmente será possível identifica-los no futuro próximo através do estudo de polimorfismos associados que geram haplótipos especiais (12). Embora a quantificação de *SMN2* não é rotineira no contexto do diagnóstico de AME e da identificação de portadores, o número de cópias de *SMN2* influi na severidade da doença em pacientes afetados (13,14). Sua maior utilidade no futuro próximo será na estratificação de pacientes afetados que irão receber as novas drogas experimentais no intuito de estimular a expressão o transcrito completo de *SMN2* e, portanto, a proteína resultante, na tentativa de contrapor a deficiência de SMN1.

REFERÊNCIAS

- van der Steege G *et al.* PCR based DNA test to confirm clinical diagnosis of autosomal recessive spinal muscular atrophy. *Lancet* **345**:985-986, 1995.
- Ruijter JM *et al.* Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res.* **37**:e45, 2009.
- D'haene B *et al.* Accurate and objective copy number profiling using real-time quantitative PCR. *Methods* **50**:262-270, 2010.
- Hedrickson BC *et al.* Differences in SMN1 allele frequencies among ethnic groups within North America. *J Med Genet.* **46**:641-644, 2009.
- Su YN *et al.* Carrier screening for spinal muscular atrophy (SMA) in 107,611 pregnant women during the period 2005-9: a prospective population-based cohort study. *PLoS ONE* **6**:e17067, 2011.
- Rudnik-Schöneborn S *et al.* Clinical utility gene card for: proximal spinal muscular atrophy. *Eur J Med Genet.* **20**:, 2012.
- Prior TW Carrier screening for spinal muscular atrophy. *Genet Med.* **10**:840-842, 2008.
- Huang CH *et al.* Copy number analysis of survival motor neuron genes by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Genet Med.* **9**:241-248, 2007.
- Feldkötter M *et al.* Quantitative analyses of *SMN1* and *SMN2* based on real-time PCR: fast and highly reliable carrier testing and prediction of severity of spinal muscular atrophy. *Am J Hum Genet.* **70**:358-368, 2002.
- Su YN *et al.* Quantitative analysis of *SMN1* and *SMN2* genes based on DHPLC: a highly efficient and reliable carrier-screening test. *Hum Mutat.* **25**:460-467, 2005.
- Prior TW *et al.* Technical standards and guidelines for spinal muscular atrophy testing. *Genet Med.* **13**:686-694, 2011.
- Luo M *et al.* An Ashkenazi Jewish *SMN1* haplotype specific to duplication alleles improves pan-ethnic carrier screening for spinal muscular atrophy. *Genet Med.* **16**:149-156, 2014.
- Gavrilov DK *et al.* Differential *SMN2* expression associated with SMA severity. *Nat Genet.* **20**:230-231, 1998.
- Wirth B *et al.* Mildly affected patients with spinal muscular atrophy are partially protected by an increased *SMN2* copy number. *Hum Genet.* **119**:422-428, 2006.