

ATROFIA MUSCULAR ESPINAL:

Contribuciones para el conocimiento,
prevención y tratamiento de la enfermedad
y para la organización de familias

PREMIO REINA SOFÍA 2006
DE PREVENCIÓN DE LA DISCAPACIDAD

DOCUMENTOS • 70/2007



MINISTERIO
DE TRABAJO
Y ASUNTOS SOCIALES

REAL PATRONATO
SOBRE DISCAPACIDAD

PREMIO REINA SOFÍA 2006,
DE PREVENCIÓN DE LA DISCAPACIDAD

ATROFIA MUSCULAR ESPINAL:

Contribuciones para el conocimiento,
prevención y tratamiento de la enfermedad
y para la organización de familias

EDUARDO F. TIZZANO

Servicio de Genética del Hospital de la Santa Cruz y San Pablo
Instituto de Investigación del Hospital de la Santa Cruz y San Pablo
Barcelona

REAL PATRONATO SOBRE DISCAPACIDAD

ATROFIA MUSCULAR ESPINAL:

Contribuciones para el conocimiento, prevención y tratamiento de la enfermedad y para la organización de familias.

Memoria de la labor de investigación galardonada con la dotación para la candidatura de España de los Premios Reina Sofía 2006, de Prevención de la Discapacidad.

AUTOR: EDUARDO F. TIZZANO. Servicio de Genética del Hospital de la Santa Cruz y San Pablo. Instituto de Investigación del Hospital de la Santa Cruz y San Pablo. Avda. Padre Claret, 167. 08025 Barcelona.
etizzano@santpau.es

DOCUMENTOS 70/2007.

EDITA: Real Patronato sobre Discapacidad.

CUIDADO DE LA EDICIÓN Y DISTRIBUCIÓN: Centro Español de Documentación sobre Discapacidad.
Serrano, 140. 28006 Madrid.

Tel. 917 452 449/46. Fax. 914 115 502.

www.cedd.net - cedd@furnet.es

IMPRIME: Grafo, S.A.

Primera edición : Marzo de 2007, 700 ejemplares.

NIPO : 214-07-011-5.

Depósito Legal : BI-506-07.

Índice

PRÓLOGO	5
1. PRESENTACIÓN DE LA MEMORIA y AGRADECIMIENTOS	7
2. RESUMEN DEL TRABAJO REALIZADO	9
3. INTRODUCCIÓN AL TEMA	11
3.1. El gen SMN1	12
3.2. La proteína SMN	13
3.3. La influencia del gen SMN2	14
3.4. Diagnóstico de afectados, de portadores y prenatal	16
3.5. Marcadores biológicos y ensayos terapéuticos de AME	17
3.6. Terapéutica combinada.	19
4. LA ATROFIA MUSCULAR ESPINAL: OBJETIVOS DE LA LABOR REALIZADA Y RESULTADOS OBTENIDOS	22
5. EL FUTURO: LA ATENCIÓN INTEGRAL DEL AFECTADO Y SU FAMILIA Y EL CAMINO HACIA EL TRATAMIENTO	44
7. BIBLIOGRAFÍA	45

Prólogo

El Real Patronato sobre Discapacidad tiene la satisfacción de editar el trabajo galardonado con el Premio Reina Sofía 2006, de Prevención de la Discapacidad, para la candidatura española, que ha recaído en la persona del Doctor Eduardo Tizzano.

Los trabajos llevados a cabo por este investigador son de la mayor relevancia. El Doctor Tizzano, junto a su equipo del Hospital de la Santa Cruz y San Pablo de Barcelona, viene desarrollando su labor desde hace más de veinte años con el fin de identificar el gen causante de la atrofia muscular espinal (AME), para su mejor conocimiento y para posibilitar su prevención, diagnóstico y tratamiento. De hecho, el Servicio de Genética de este Hospital es centro de referencia para los estudios genéticos de la AME y están registradas hasta la fecha 850 familias con enfermedad de neurona motora procedentes de distintas regiones de España.

Esta enfermedad neurodegenerativa está considerada como una de las enfermedades “raras” más frecuentes y una de las más devastadoras que se conocen. La incidencia de las formas crónicas es de aproximadamente 1 en 10.000, siendo el segundo trastorno neuromuscular más frecuente de la edad pediátrica. La frecuencia de portadores en la población general es de aproximadamente 1 en 40-50 y se estima que existen más de mil familias afectadas con esta enfermedad en España.

Además de los trabajos de investigación, el Doctor Tizzano mantiene una relación permanente con la Asociación Española de Enfermedades Neuromusculares (ASEM), entidad que aglutina a pacientes y familiares. Gracias a esta colaboración se han cumplido muchos de los objetivos propuestos, como el de dar a conocer la enfermedad y su incidencia en las personas que la padecen, así como el refuerzo de la comunicación entre las familias de las personas afectadas.

El Real Patronato sobre Discapacidad, al publicar este trabajo, reitera su decidido apoyo a todas aquellas tareas investigadoras que los profesionales españoles e iberoamericanos vienen realizando durante las últimas décadas en favor de las personas con discapacidad y sus familias.

M^a AMPARO VALCARCE GARCÍA

Secretaria de Estado de Servicios Sociales, Familias y Discapacidad
Secretaria General del Real Patronato sobre Discapacidad

1. Presentación de la memoria y agradecimientos

Esta memoria es el fruto de más de una década de atención, investigación y experiencia en la atrofia muscular espinal (AME), una enfermedad de las neuronas motoras de la médula espinal. Casi todo el mundo conoce la poliomielitis, producida por el ataque de un virus a las neuronas motoras de la médula espinal. Los avances científicos han erradicado prácticamente la poliomielitis en nuestros niños y hoy en día constituye una enfermedad del pasado gracias a la vacunación. Si tuviéramos que describir la AME en pocas palabras la definiríamos como una poliomielitis mucho más agresiva que afecta a todo el cuerpo (a diferencia de la polio que es localizada) y a causa de un gen que está ausente o no funciona como corresponde. A diferencia de la polio, esta enfermedad genética está lejos de ser erradicada. Con una incidencia aproximada de 1/6000 a 1/10000 nacimientos, y una frecuencia de portadores de 1/40-1/60, la AME es considerada una de las principales causas hereditarias de mortalidad infantil. La AME presenta un patrón de herencia autosómico recesivo, es decir se necesitan dos copias del gen alterado para que se manifieste. Ese gen es el Survival Motor Neuron 1 (SMN1) localizado en el brazo largo del cromosoma 5 (5q13). La AME es siempre grave e invalidante y se clasifica en tres grupos (tipo I o aguda, tipo II o intermedia y tipo III o crónica) de acuerdo con las manifestaciones clínicas, la edad de aparición de las mismas y su evolución.

Su descripción clínica ocurrió en la segunda mitad del siglo XIX por el neurólogo austríaco Guido Werdnig (1844-1919) y el alemán Johann Hoffmann (1850-1919), y durante estos casi 150 años se la ha considerado una enfermedad de evolución fatal, sin tratamiento ni esperanzas de curación para los afectados que la padecían. Desde 1995, gracias a la identificación del gen causante por el grupo de la Dra. Judith Melki, del Hospital Necker Enfants Malades de Paris, se ha avanzado mucho en las bases moleculares y conocimientos de la AME y, por primera vez, aparecen expectativas razonables de un posible tratamiento que aunque no cure inicialmente el problema, al menos detenga el proceso de degeneración y muerte de las neuronas motoras.

La patología molecular del gen SMN1 observada en los afectados incluye mayoritariamente la ausencia total del gen -deleciones y conversiones génicas-, habiéndose descrito también mutaciones puntuales. Existe un gen homólogo al SMN1, el SMN2 que está presente en todos los pacientes y que expresa fundamentalmente una RNA mensajero y proteína incompletos (conocido como Delta 7 dado que le falta el exón 7). El número de copias de este gen en cada paciente está en relación con la gravedad de la enfermedad: cuantas más copias, los pacientes tienen en general

menor gravedad. Es posible que se pueda actuar en el gen SMN2 con medios farmacológicos para modificar o aumentar su expresión. Nuestros esfuerzos van encaminados en esa dirección.

A modo de reconocimiento se debe mencionar aquí el apoyo institucional del Hospital de la Santa Cruz y San Pablo y del Instituto de Investigación de dicho Hospital, y especialmente las ayudas del FIS y La Marató TV3, y de los premios Ordesa y Ferrer Salat que han servido para ayudar a la consolidación paulatina del trabajo del grupo AME. Eduardo Tizzano, responsable de las líneas de investigación de AME, del asesoramiento genético y del diagnóstico molecular agradece a Montserrat Baiget, Directora del Servicio, por su apoyo y guía incondicional en todos estos años, y a María Jesús Barceló, técnica del grupo, por su imprescindible labor y tesón. A Laura Alias (becaria financiada por FUNDAME) por su entusiasmo y dedicación. Con Eva Also, recientemente incorporada por el FIS como becaria predoctoral, completan el grupo actual de AME. También quiero agradecer a Elena Bussaglia, Carolina Soler e Ivón Cuscó que han realizado sus respectivas tesis doctorales en el grupo; a Eva López, que ha sido becaria postdoctoral y a Marta Estapé, afectada de AME tipo III que colaboró en el aspecto bioinformático como parte de sus prácticas de la carrera de Biología. Lamentablemente Marta falleció de insuficiencia respiratoria como complicación de su enfermedad en mayo de 2003. Asimismo un agradecimiento especial a todos los compañeros integrantes del Servicio de Genética del Hospital de San Pablo por toda la colaboración recibida y los años de trabajo compartidos.

Cabe mencionar aquí a todos los Centros Hospitalarios y de Rehabilitación, neurólogos, pediatras, obstetras y genetistas de España que han colaborado estrechamente por la confianza depositada en nuestro grupo. Un número de ellos figuran como autores o en los agradecimientos de las publicaciones científicas. Finalmente quiero agradecer a la Asociación Española de Enfermedades Musculares (ASEM), que representa a los pacientes neuromusculares de toda España y el apoyo de FUNDAME, formada por el grupo de padres, familiares y afectados de AME, por su entusiasmo y energía y por darnos motivo permanente para seguir el camino que emprendimos muchos años atrás.

2. Resumen del trabajo realizado

A partir de 1990, el grupo AME del Servicio de Genética del Hospital de la Santa Cruz y San Pablo ha colaborado estrechamente con distintos centros neurológicos en el seguimiento de más de 850 familias con afectados de AME para diagnóstico molecular y asesoramiento genético. El Servicio es un centro para diagnóstico prenatal y de portadores de toda España. En total se han realizado más de 3.000 estudios moleculares en pacientes y familiares (diagnóstico de afectados y de portadores) y alrededor de 250 diagnósticos prenatales en parejas con alto riesgo de recurrencia. Además del estudio de las bases moleculares de la AME, nuestra línea de investigación ha sido pionera en estudios durante el desarrollo humano que incluyen la expresión del gen SMN y la muerte neuronal fetal, y estudios del papel normal del gen y su relación tanto en la patogénesis como en la expresión fenotípica de la enfermedad. Con el apoyo del Fondo de Investigación Sanitaria y de la Marató de TV3, se han podido realizar trabajos en la patología molecular del gen SMN, delineando formas de afectación mínima de la enfermedad (1996/97), la expresión del gen SMN en el sistema nervioso (1998/99), el estudio de los mecanismos de enfermedad, la muerte neuronal, los genes modificadores y la detección de heterocigotos (2000/2005), reflejados en tesis doctorales y las publicaciones documentadas en esta memoria.

El grupo colabora con distintos investigadores tanto a nivel nacional como internacional y coordina una red temática de investigación AME (AGAUR XT 018) que incluye más de 10 centros de investigación y atención de pacientes del ámbito nacional. Participa activamente de las reuniones científicas anuales de *Families of SMA* (FSMA, EEUU), organización que recauda fondos para investigación y que fomenta la relación entre familiares y científicos.

En el ámbito nacional ha colaborado en la difusión e información sobre la enfermedad, tanto a profesionales como a pacientes y familiares, participando activamente en la organización, junto a la Asociación de Enfermedades Musculares (ASEM) y el grupo de padres AME en las I, II, III, IV y V Jornadas Médico-Informativas sobre la AME (2000-2005), que impulsan el registro nacional de pacientes, la coordinación de los profesionales que intervienen en la AME y la creación de grupos de apoyo. Ha organizado el primer Simposium Internacional sobre atrofia muscular espinal en Barcelona en mayo de 2005 a 10 años de la identificación del gen SMN por la Dra. Judith Melki en el que además participaron otros investigadores europeos.

Eduardo Tizzano ha participado como Investigador Principal del primer ensayo clínico de AME realizado en España (en estrecha colaboración con el Hospital Sant Joan de Deu) como parte del

proyecto europeo EUROSMART cuya finalidad fue validar medidas de seguimiento y marcadores biológicos en un grupo de pacientes con AME. Esta colaboración en el ámbito europeo está en fase de análisis de resultados definitivos y es uno de los primeros pasos hacia la terapia de la enfermedad.

3. Introducción al tema

La atrofia muscular espinal es una de las enfermedades “raras” más frecuentes y una de las más devastadoras que se conocen.

La atrofia muscular espinal (AME) es una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por la afectación de las células del asta anterior de la médula espinal, con debilidad proximal y simétrica y atrofia progresiva de los grupos musculares. El nivel de afectación de esas neuronas no es similar en todos los pacientes y se clasifica generalmente en tres grupos sobre la base de la gravedad de los síntomas, la edad de aparición y la evolución. Cuando el cuadro clínico es muy grave se manifiesta a partir del nacimiento o a las pocas semanas de vida e inclusive muchas madres notan disminución de los movimientos fetales durante el embarazo. Los bebés afectados tienen una marcada disminución de los movimientos musculares y del tono muscular y nunca llegan a sentarse porque el tronco no alcanza a desarrollar la suficiente fuerza. Lo mismo les ocurre a los músculos respiratorios intercostales y éste es el motivo de que las complicaciones importantes sean de tipo respiratorio y tengan un desenlace fatal (en general antes de los dos años de edad) en estos pacientes. También existen movimientos anormales de la lengua (fasciculaciones), trastornos de deglución y de la alimentación. A esta forma grave de evolución se la conoce como AME tipo I o enfermedad de Werdnig-Hoffmann. Existen además otras dos formas menos graves y que se diferencian por la edad de comienzo de las manifestaciones clínicas y la evolución de la fuerza muscular que puedan desarrollar los pacientes.

En la AME tipo II o forma intermedia los síntomas aparecen un poco más tarde que en la tipo I, aunque siempre antes de los 18-24 meses. Los niños con esta forma llegan a sentarse y hasta en algún momento ponerse de pie aunque siempre con ayuda. Sin embargo no llegan a deambular por sus propios medios y dependen de la silla de ruedas para moverse. La deformidad del tórax por la debilidad muscular da una desviación de la columna (escoliosis), que a veces es muy importante y se necesita corregir con cirugía. Muchos de estos pacientes dependen de oxígeno suplementario o de ayudarse con máscaras de presión positiva.

La AME tipo III o enfermedad de Kugelberg-Welander comienza a manifestarse después de los 18-24 meses e inclusive puede comenzar en la adolescencia o en etapas tempranas de la vida adulta. Los pacientes pueden sentarse y deambular por sus propios medios y posteriormente la debilidad se va haciendo más pronunciada. Algunos casos se estabilizan pero otros llegan a la edad adulta sin poder andar.

Existe una forma de aparición tardía, mas allá de los 30 años y es la AME tipo IV caracterizada por un proceso de evolución más lento, que indica los múltiples factores que pueden influenciar un mismo problema genético. Para las familias que la sufren, ésta es una enfermedad devastadora: sus hijos tienen un cociente intelectual normal, inclusive a menudo es superior al término medio y la debilidad muscular los deteriora progresivamente y sufren las complicaciones mencionadas. La incidencia de la forma grave tipo I es de aproximadamente 1 de cada 6.000, constituyendo uno de los trastornos autosómicos recesivos letales más frecuente en la infancia. La incidencia de las formas crónicas es de aproximadamente 1 en 10.000, siendo entonces el segundo trastorno neuromuscular más frecuente de la edad pediátrica (Pearn, 1980). La frecuencia de portadores en la población general es de aproximadamente 1 en 40-50 y se estima que existen más de mil familias afectadas con esta enfermedad en la población española. De acuerdo con las cifras expuestas anteriormente, se calcula que en España nacen de 60 a 80 casos nuevos por año, de los cuales la mitad tendrá la forma grave tipo I y fallecerá antes de los dos años de vida y que existen aproximadamente de 800.000 a 1.000.000 de portadores de la enfermedad.

3.1. EL GEN SMN1

La identificación del gen SMN como determinante de la AME ha abierto nuevas perspectivas para un mejor conocimiento de su fisiopatología.

El gen responsable de esta enfermedad se identificó en 1995 y se lo denominó "survival motor neuron" (SMN) (LEFEBVRE . Y COLS., 1995). Dicho gen está duplicado, existiendo una versión telomérica (SMN1) y otra centromérica (SMN2) separadas por unas 500 kb en el locus AME localizado en el brazo largo del cromosoma 5 (5q13). El gen SMN1 está delecionado o interrumpido en más del 90% de los pacientes cualquiera que sea la forma clínica (**Figura 1**). En aquellos casos sin deleción homocigota, en la población española se ha detectado una mutación recurrente presente en el 3% de los afectados y que es una deleción de cuatro pares de bases (delA-GAG) en el exón 3 (BUSSAGLIA Y COLS., 1995; CUSCÓ Y COLS., 2003). Existen también otras mutaciones puntuales descritas (WIRTH, 2000; MARTÍN Y COLS., 2002). Los estudios de expresión del gen SMN en el desarrollo humano indican niveles importantes de RNAm en neuroblastos y en el período postnatal en las neuronas motoras de la médula espinal. También se observó expresión en células sensitivas y neuronas de otros órganos como bulbo, tálamo, cerebelo y corteza cerebral. Esta amplia gama de expresión en poblaciones neuronales contrasta con la ausencia de patología y manifestaciones clínicas en relación con estas estructuras. Es evidente que las neuronas motoras espinales deben tener una mayor sensibilidad a la ausencia o disfunción del gen SMN (FRANCIS Y COLS., 1998; TIZZANO Y COLS., 1998).

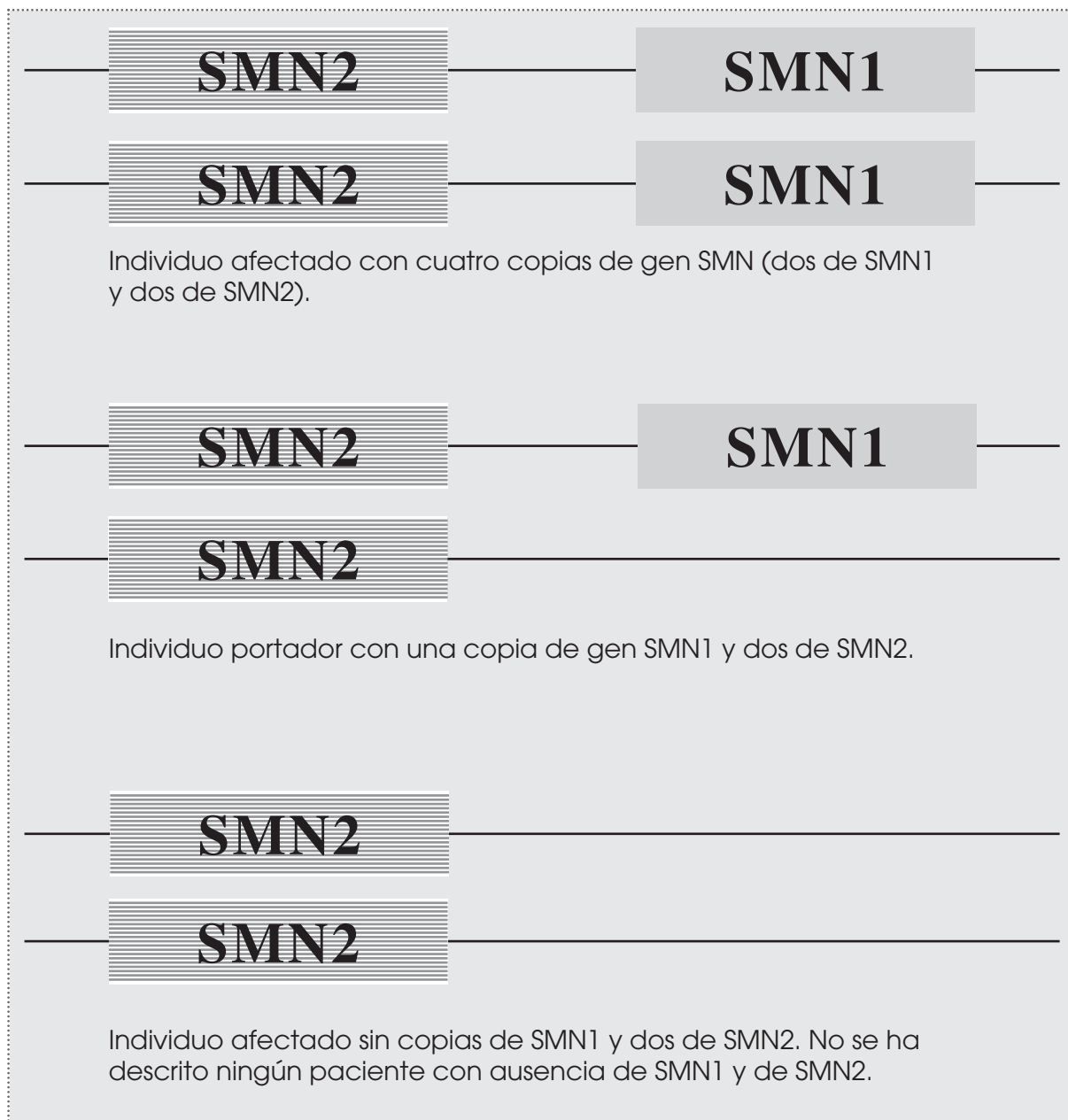


FIGURA 1. Los genes SMN.

3.2. LA PROTEÍNA SMN

La proteína SMN parece estar involucrada en varias funciones esenciales para la célula (metabolismo del RNA, splicing) y otras que tienen que ver más específicamente con la supervivencia de las neuronas motoras (apoptosis, transporte axonal).

Los genes SMN codifican para una proteína idéntica de 38 kiloDaltons, (LEFEBVRE Y COLS., COOVERT Y COLS., LIU Y COLS., 1997). Esta proteína no presenta homología con las hasta hoy descritas y existe evidencia de que su función está relacionada con el metabolismo del ARN. Mediante estu-

dios inmunohistoquímicos, la proteína SMN se ha localizado en el citoplasma y en el núcleo. En este último forma unas estructuras nucleares llamadas "gems", en asociación con los cuerpos "espiralados" o "retorcidos" descritos por Ramón y Cajal en 1903 (*coiled bodies* o cuerpos de Cajal). Asimismo, la proteína SMN interactúa con una nueva proteína denominada Gemin 2 o SIP1 (por "SMN interacting protein 1") y ambas se relacionan con las proteínas snRNP ("small nuclear ribonuclear proteins") que participan en la reacción del *splicing* (LIU Q. Y COLS., 1997). Además de esta primera, se han descrito varias proteínas Gemin que forman parte del complejo SMN (Gemin 3-Gemin 8) y algunas de ellas parecen ser esenciales para su funcionamiento (OTTER Y COLS., 2006). Se postula que la proteína SMN participa en al menos dos procesos celulares básicos: a nivel nuclear, en la modificación del transcrito primario o pre-RNA mensajero a partir del ensamblaje de las snRNP y en el citoplasma, como modulador en la regeneración y reciclaje de dichas snRNP, una vez que ha ocurrido el fenómeno del *splicing* (PAUSHKIN Y COLS., 2002). La pregunta que surge es por qué siendo una función tan básica sólo las neuronas motoras del asta anterior de la médula son las afectadas y manifiestan la enfermedad. Las neuronas motoras tienen un mayor nivel de transcripción que otros tipos celulares y, posiblemente, tengan mayor necesidad de proteína SMN, mientras que la alteración del gen SMN en otras estructuras donde se expresa podría ser compensado por factores genéticos o celulares hoy todavía desconocidos. Recientemente se ha establecido que durante el desarrollo de la enfermedad, en el período fetal existe un aumento de la muerte neuronal programada en la médula espinal cuando se la compara con controles (SOLER-BOTIJA Y COLS., 2002, FIDZIANSKA Y COLS., 2002) y que en las neuronas motoras AME habría una disregulación de proteínas involucradas en la apoptosis como Bcl-2 y Bcl-X (SOLER-BOTIJA Y COLS., 2003). Esta hipótesis está a favor de los experimentos de KERR Y COLS. (2000) en modelos neuronales *in vitro*, donde el SMN modularía la apoptosis. Esto hace pensar que las neuronas motoras de la AME tienen una mayor sensibilidad a consecuencia de la menor cantidad de proteína SMN. Asimismo existen evidencias que asocian al SMN con el transporte axonal (LA BELLA Y COLS., 2000; FAN Y SIMARD, 2002; ROSSOLL Y COLS., 2002)

3.3. LA INFLUENCIA DEL GEN SMN2

Todos los pacientes con AME tienen al menos una copia del gen SMN2 cuya función no evita la aparición de la enfermedad pero, por regla general, cuantas más copias tiene un paciente, el fenotipo es menos grave.

La diferencia crítica entre el gen SMN1 y el SMN2 es un cambio único de nucleótido en el exón 7, que hace que el gen SMN1 genere el transcrito completo mientras que, en la gran mayoría de casos, el transcrito correspondiente al gen SMN2 carezca del exón 7 (**Figura 2**) (LORSON Y ANDROPHY, 2000). Aún no está totalmente comprobado que la exclusión del exón 7 sea por la falta de reconocimiento como exón al inhibirse un ESE (exonic splicing enhancer) (CARTEGNI Y KRAINER, 2002) o por potenciarse un ESS (exonic splicing silencer) (*Kashima y Manley, 2003*).

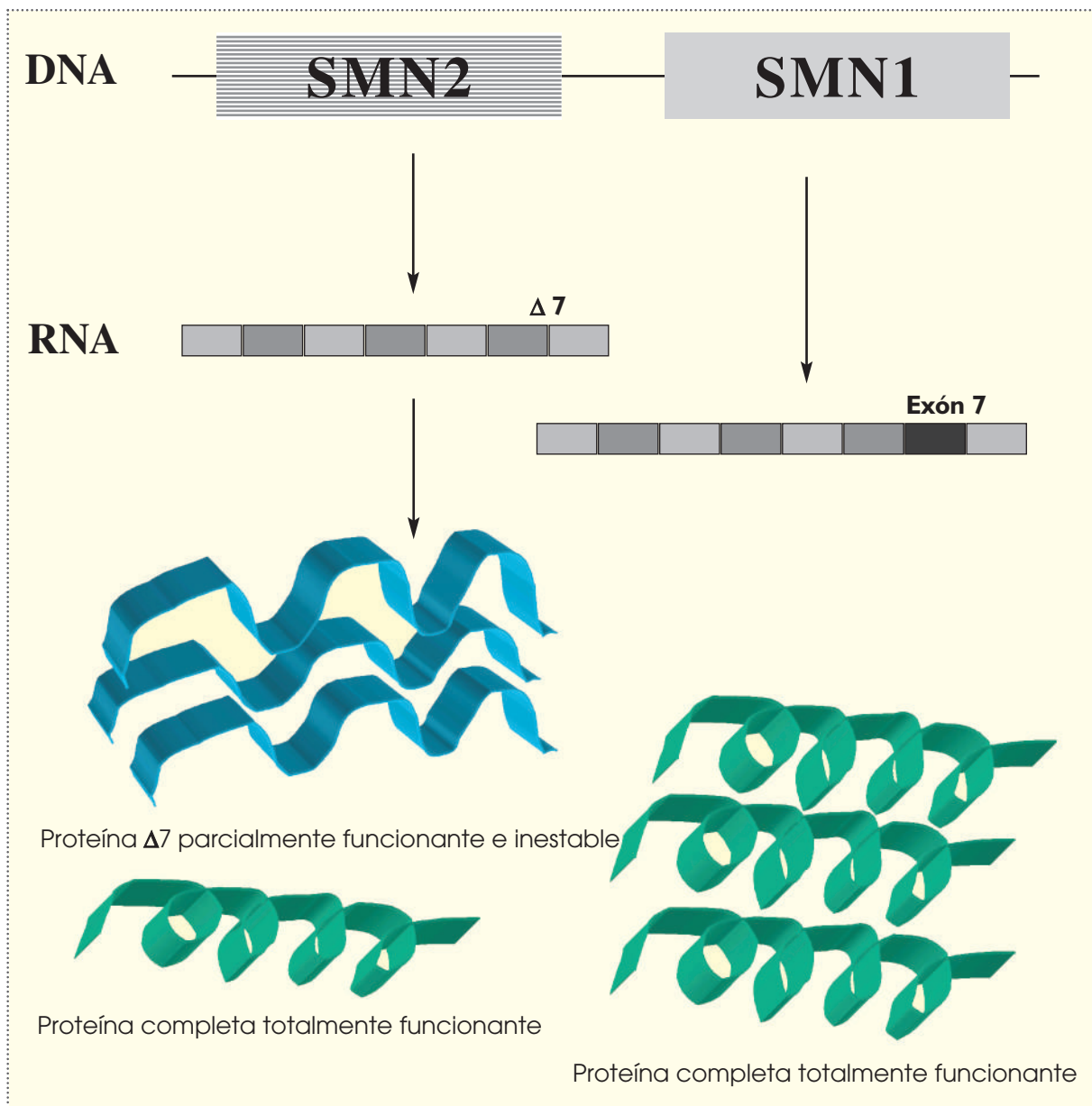


FIGURA 2. Transcripción de los genes SMN1 y SMN2. La gran mayoría de proteína completa proviene del gen SMN1, aunque el gen SMN2 es capaz de producir la suficiente como para vivir, pero insuficiente para las neuronas motoras y no evita la enfermedad.

La ausencia del gen SMN1 se ha visto asociada a un amplio espectro de manifestaciones incluyendo casos de forma tipo I congénita grave (conocidas como AME tipo 0), hasta hermanos asintomáticos o mínimamente afectados de pacientes con AME de la forma crónica (tipo II o III). La influencia que el gen SMN2 podría tener en el fenotipo final, ya había sido contemplada por LEFEBVRE Y COLS., en el trabajo original de identificación del gen: se observó que los pacientes con AME tipo III mostraban una mayor intensidad en la banda que correspondía al gen SMN2 (o centromérico en el artículo) cuando se los comparaba con el tipo I. Estudios posteriores indicaron que una de las diferencias más importante entre los tres tipos de AME resultó ser el número de copias del gen SMN2. Los pacientes con AME tipo I serían la consecuencia de deleciones y los pacientes con AME tipo III de conversiones del gen SMN1 en gen SMN2 (VELASCO Y COLS., 1996; BURGHESE,

1997). En general, los pacientes con AME tipo I tendrían una o dos copias de gen SMN2 mientras que los pacientes con tipo II y III tendrían de 3 a 5 copias (LEFEBVRE Y COLS., 1995, FELDKÖTTER Y COLS., 2002). Asimismo, se ha observado que los genes híbridos SMN1-SMN2 (presentes en un 5-10% de los casos) también se asocian a los tres tipos de AME. Dichas conversiones representan el reemplazo del gen telomérico por el centromérico y se postula que los pacientes con tipo I tendrían alelos con deleciones genuinas, los de tipo III alelos con conversiones gènicas y los de tipo II un alelo con deleción genuina y otro con conversión gènica (CUSCÓ Y COLS., 2001). Sin embargo hay casos que no se ajustan a estas observaciones. La secuencia del gen SMN2 predice una proteína SMN similar a la del SMN1 y en ausencia de este último gen se ha detectado proteína de SMN2 en pacientes con AME aunque en menor cantidad (LEFEBVRE Y COLS., COOVERT Y COLS., 1997). No existe ningún paciente en el que se haya detectado deleción de ambos genes concomitantemente puesto que la deleción de ambos debe ser letal *in utero* (TAYLOR Y COLS., 1998), aunque el 10% de la población general española puede tener deleción homocigota del gen SMN2 (ROJAS Y COLS., 2002).

Aunque el modelo del número de copias SMN2 puede aplicarse a la mayoría de los casos, no siempre igual número de copias puede correlacionarse con el mismo fenotipo, ni tampoco se ha podido establecer una correlación absoluta en los casos de variabilidad intrafamiliar. De todas estas observaciones se concluye que la AME es la consecuencia de una disminución o carencia efectiva de proteína SMN completa (o full-length; FL) y que su gravedad está influenciada fundamentalmente por la complementación del gen SMN2, aunque existen otros factores modificadores que aún no se conocen. Es necesario encontrar el nexo entre la función celular *in vitro* de la proteína SMN y la fisiopatología de la enfermedad, especialmente explicar porqué las neuronas motoras son las casi exclusivamente involucradas en la enfermedad.

3.4. DIAGNÓSTICO DE AFECTADOS, DE PORTADORES Y PRENATAL

La confirmación del diagnóstico por métodos moleculares ha mejorado sensiblemente el asesoramiento genético de la enfermedad.

El hecho de que más del 90% de los casos de AME presenten deleción del gen SMN1 hace del análisis molecular el método de elección para confirmar el diagnóstico ante una sospecha clínica de AME.

El estudio de los portadores pertenecientes a familias con afectados se realiza, habitualmente, utilizando una estrategia indirecta y es necesario disponer de muestra de ADN del afectado a fin de identificar los haplotipos de riesgo que segregan con la enfermedad. El análisis de los marcadores C212 y C272, que están localizados en el extremo 5' del gen SMN, permite realizar un diagnóstico probabilístico pero altamente fiable. Incluso en algunas familias en las que el afectado ha fallecido, es posible efectuar el diagnóstico genotípico gracias a la amplificación de ADN procedente de las tarjetas del test de Guthrie y de bloques o secciones de tejidos de material de biopsias o autopsias.

La detección de una deleción homocigota del gen SMN1 confirma el diagnóstico de AME. Sin embargo, dicha deleción se ha observado en una amplia gama de fenotipos, desde la grave afectación congénita hasta individuos prácticamente asintomáticos (TIZZANO Y BAIGET, 2000). Ya se comentó previamente que algunas deleciones serían en realidad conversiones génicas, asociadas a mayor número de genes SMN2. Es evidente, por lo tanto, que no existe una correlación entre la ausencia de SMN1 y un fenotipo determinado. Incluso existe variación intrafamiliar, especialmente en las formas crónicas (Tipo II y III), habiéndose descrito hermanos asintomáticos con una deleción similar del gen SMN1 a la de los afectados de AME (BUSSAGLIA Y COLS., 1997; CUSCÓ Y COLS., 2006).

Para el diagnóstico directo de portadores se plantea la utilización de métodos cuantitativos capaces de medir si existe en la muestra problema, una o dos copias del gen SMN1. Los estudios cuantitativos del gen SMN (método cuantitativo a PCR real) permiten evaluar la dosis génica del gen SMN1 (número de copias) y ha sido aplicado al estudio de esta enfermedad en diversas líneas de trabajo e investigación: para determinar la frecuencia de portadores de la AME en la población española general; para los pacientes clínicamente afectados pero sin deleción homocigota (en los que fue posible identificar mutaciones puntuales); para el diagnóstico de esta enfermedad en los casos donde el afectado había fallecido y no se disponía de DNA; en el estudio de cónyuges de portadores de la enfermedad, en los casos de inseminación artificial y en el estudio de otros familiares de pacientes con AME (CUSCÓ Y COLS., 2002b).

El diagnóstico prenatal de afectado de AME se efectúa evidenciando en la muestra de ADN fetal la existencia de la deleción homocigota del gen SMN1. El estudio adicional de los marcadores C212 y C272 indica si se trata de un portador heterocigoto, a la vez que confirma que efectivamente se analiza muestra fetal y no la materna.

Al ser el locus AME una región génica con zonas repetidas propensa a la recombinación, la incidencia de mutaciones de *novo* en los padres puede ser del 1 al 2% de los casos y aunque el hecho de hallar en una familia una deleción de *novo* modificaría el riesgo de recurrencia a cifras menores, estos casos pueden ser el resultado de mosaicismo germinal, por lo que es igualmente aconsejable realizar diagnóstico prenatal (WIRTH Y COLS., 1999).

3.5. MARCADORES BIOLÓGICOS y ENSAYOS TERAPÉUTICOS DE AME

El tratamiento farmacológico del gen SMN2 es uno de los pilares para hallar una terapia.

A partir de la identificación del gen SMN y de los estudios moleculares y celulares se plantean posibles alternativas terapéuticas con tal de mejorar, estabilizar e incluso curar la AME. La estrategia más directa sería el remplazo del gen SMN1 defectuoso en los pacientes AME. Se propuso la utilización de vectores virales capaces de transfectar las neuronas motoras *in vivo*, para transferir el gen SMN1 a la médula espinal. Estos vectores podían ser derivados del lentivirus (HOTTINGER Y

COLS., 2000), adenovirus (AKLI Y COLS., 1993; DiDONATO Y COLS., 2003), virus asociado a adenovirus (AAV) (AZZOUZ Y COLS., 2000), herpesvirus (KEIR Y COLS., 1995) o poliovirus (BLESDSOE Y COLS., 2000). Todos ellos, dejando de lado sus limitaciones particulares de citotoxicidad, inmunogenicidad, bioseguridad y estabilidad de la expresión genética, presentaban un problema común que era la limitación de la difusión de aquellos vectores. Cuando se inyectaban en el parénquima del sistema nervioso central sólo difundían a unos pocos milímetros y cuando se inyectaban al músculo periférico sólo se daba la infección de un solo conjunto motor. Por tanto, y para poder transferir el gen SMN1 mediante virus, se tendrían que identificar las subpoblaciones de neuronas motoras más sensibles al proceso degenerativo críticas para la supervivencia del individuo. Mediante la utilización de vectores virales (LESBORDES Y COLS., 2003) han evaluado el efecto del factor neurotrófico cardiotrophin 1 sobre la protección de las neuronas motoras en el modelo neuronal del ratón AME, observando una disminución en la progresión de la enfermedad.

A partir de la observación, tanto en los pacientes AME como en los modelos animales, de una importante correlación de la gravedad de la enfermedad con el número de copias y los niveles de expresión de SMN2, apareció un interés terapéutico basado en la activación farmacológica de la expresión del gen SMN2, que está presente en todos los afectados de AME. Diversos grupos han probado el efecto de diferentes moléculas sobre la activación de la expresión del gen SMN2. El promotor del gen SMN2 contiene diferentes lugares de unión para factores de transcripción implicados en la diferenciación y la supervivencia neuronal, como AP-2, E2F-1, GATA-2, HNF-3, N-Oct-3, YY e INF (ECHANIZ-LAGUNA Y COLS., 1999; MONANI Y COLS., 1999). Se ha monitorizado la actividad del promotor del gen SMN2 mediante el estudio de ciertos genes (*reporters*) o mediante la observación del número de gems, en líneas de células neuronales o cultivos primarios de neuronas motoras (ZHANG Y COLS., 2001). Se ha demostrado también que la presencia de INF- β y INF γ induce la expresión del gen SMN2 en cultivos primarios de fibroblastos de pacientes AME (BARON-DELAGE Y COLS., 2000).

Otra estrategia es la identificación de moléculas con la capacidad de restablecer el patrón correcto de *splicing* del gen SMN2. HOFMANN Y COLS., 2000, describen un factor de *splicing* de la familia de las proteínas SR-like (proteínas ricas en serinas y argininas) llamado Htra2-B1, que reconoce específicamente la secuencia ESE (*exonic splicing enhancer*) del exón 7 del gen SMN2, y promueve su inclusión en el transcrito, estimulando la expresión de la forma completa (FL) del gen. Demuestran que el procesamiento del mRNA del gen SMN se puede modular *in vivo* y eso permitiría un posible tratamiento ya que todos los pacientes AME retienen por lo menos una copia del gen SMN2 (HOFMANN Y COLS., 2000; HOFMANN Y WIRTH, 2002).

Recientemente se han descrito diferentes estudios del efecto que podrían tener pequeñas moléculas en la inclusión del exón 7 en el mRNA del gen SMN2. Se han hecho estudios del efecto del butirato de sodio en linfoblastos de pacientes AME y se ha visto que éstos provocan un aumento de niveles de proteína SMNFL porque se incluye el exón 7. Estudios *in vivo* en modelos animales demuestran un aumento de la expresión de la proteína SMN-FL en las neuronas motoras de la médula espinal y una mejora de síntomas clínicos (CHANG Y COLS., 2001). La aclarubicina es un agente

anticancerígeno, que presenta también la capacidad de aumentar la inclusión del exón 7 en los transcritos del gen SMN2. ANDREASSI Y COLS., 2001, han demostrado estos efectos tanto en fibroblastos de pacientes AME tipo I y en líneas celulares de neuronas motoras (NSC34), donde ven que el tratamiento con aclarubicina provoca un aumento de la cantidad de proteína SMN y la recuperación del número de gems. Todos estos resultados indican que la recuperación de la expresión del transcrito completo (FL) a partir de la estimulación del gen SMN2 puede ser un buen camino para la terapia de los pacientes con AME. Aún y así, es importante definir cuál es el momento idóneo en el cual la presencia del transcrito completo podría recuperar o mantener las neuronas motoras sin afectación.

3.6. TERAPÉUTICA COMBINADA (Figura 3)

¿Será la AME una de las primeras enfermedades monogénicas hereditarias que se cure con medios farmacológicos?

En la AME no existe aún tratamiento curativo y no hay consenso entre los investigadores de una fármaco de elección para su tratamiento sintomático. En febrero de 2001 se realizó un *Workshop* de tratamiento de la AME en el que se comunicaron los resultados de algunos ensayos pilotos en grupos de pacientes realizados en distintos países. Por ejemplo, en EEUU se administró gabapentina en adultos AME de 18 a 60 años sin hallarse ningún beneficio. Sin embargo, el estudio europeo, que incluía pacientes de entre 5 y 60 años, pareció dar mejores resultados en cuanto a la mejoría de la función motora (MERLINI Y COLS., 2003). Los agonistas β_2 parecen tener un impacto positivo en los músculos de individuos normales, aunque la respuesta varía de músculo en músculo y parece que no es consistente (DUPONT-VERSTEEGDEN Y COLS., 1995; KISSEL Y COLS., 1998). Un estudio piloto en AME con el agonista β_2 salbutamol mostró algún incremento de la fuerza muscular, pero la puntuación motora funcional de estos pacientes no cambió en absoluto. Es posible que este tipo de fármacos pueda ser de algún beneficio, dado que se ha detectado un efecto neuro protector (SIGNORILE Y COLS., 1995) y se han obtenido resultados interesantes, aunque no concluyentes, en pacientes con distrofia fascioescapulohumeral y pacientes con daño medular por traumatismo (KISSEL Y COLS., 1995; TARNOPOLSKY Y COLS., 2001). Asimismo, parece aumentar la cantidad de transcrito completo *in vitro* (BRAHE Y COLS., comunicación 10th FSMA Research Meeting, 2006). El albuterol, que es otro agonista de los receptores β_2 , se ha visto que parece influenciar la fuerza muscular de algunos pacientes con AME (KINALI Y COLS., 2002) y se administra en algunos protocolos de pacientes ambulatorios.

Otro posible agente farmacológico es la creatina que se administra como suplemento dietético y se ha ensayado en enfermedades neuromusculares y la esclerosis lateral amiotrófica (TARNOPOLSKY Y COLS., 1995). Se postula que la creatina podría ejercer un efecto energizante en la célula. Los datos que se disponen del ensayo realizado en pacientes con AME indican que los resultados no son concluyentes.



FIGURA 3. Las terapias posibles de la AME.

En todos los casos los parámetros evaluados han sido diferentes, lo que indica la necesidad de estandarizar las pruebas de seguimiento a fin de que los ensayos puedan reproducirse en otras poblaciones de pacientes y las conclusiones sean más robustas. La carnitina es un compuesto de amino cuaternario presente en todos los tejidos y es un cofactor esencial para el transporte de ácidos grasos de cadena larga a través de la membrana mitocondrial para su utilización energética. La carnitina está presente en la dieta y también es sintetizada a partir de los aminoácidos lisina y metionina en el hígado. La carnitina se excreta por riñón como carnitina libre (BREMER Y COLS., 1983). Los trastornos del metabolismo de la carnitina están involucrados con problemas de la cadena energética mitocondrial y algunas metabolopatías cursan con pérdida de carnitina. Su administración puede ser efectiva en trastornos neurodegenerativos en relación con el glutamato (WINTER Y

COLS., 1992). Además de su efecto neuroprotector, uno de los aspectos más interesantes de esta sustancia es que está disminuida en el músculo denervado y que esto podría ser secundario a algún defecto oxidativo del metabolismo muscular asociado con la AME (TEIN Y COLS., 1995).

Otros agentes neuroprotectores que están siendo evaluados incluyen la gabapentina y el riluzol. Se piensa que actúan inhibiendo la liberación presináptica de glutamato, que sería un neurotransmisor excitatorio que produce la muerte neuronal. Este mecanismo de excitotoxicidad parece estar involucrado en la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), y en otras enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer y el Parkinson. Tanto en un modelo animal de la AME (HADDAD Y COLS., 2003) como en un grupo de pacientes con la forma grave (RUSSMAN Y COLS., 2003) se ha visto que parece haber un aumento de la supervivencia en aquellos tratados con Riluzol, aunque es necesario ampliar el número de pacientes para confirmar este posible efecto. Un ensayo doble ciego placebo en 120 pacientes italianos con gabapentina sugiere que podría haber algún efecto en el incremento de la fuerza muscular (MERLINI Y COLS., 2003).

Con respecto a los compuestos que pueden afectar el gen SMN2, tanto el fenilbutirato, un antihiperamonémico usado en los trastornos del ciclo de la urea, como el ácido valproico, un antiepiléptico, parecen afectar a la transcripción del gen SMN2 (ANDREASSI Y COLS., BRICHTA Y COLS., SUMNER Y COLS., 2003). Estos compuestos actúan inhibiendo las histona-deacetilasas (HDACs). Como su nombre lo indica las HDACs son enzimas que deacetilan las histonas que recubren el DNA (forman parte de la estructura conocido como "scaffold" o andamiaje del DNA). A consecuencia de esa inhibición, las histonas se hiperacetilan, dejando el DNA al descubierto, lo que permite el acceso de los factores de transcripción. Aproximadamente un 2% de los genes son regulados por las HDACs y esto podría ser la explicación de los importantes efectos adversos que pueden aparecer con estos compuestos.

Otro compuesto que podría ser probado es la hidroxurea, utilizado en el tratamiento de las hemoglobinopatías (sickle-cell disease y talasemias) por aumentar la transcripción en reticulocitos de la hemoglobina fetal. Investigadores taiwaneses han comenzado estudios en la AME en esta dirección (CHANG Y COLS., 2002). La hidroxurea también sincroniza el ciclo celular en cultivo, por lo tanto es posible combinar estos tratamientos para ver cual de ellos es el más adecuado por los resultados *in vitro* para extrapolar a los ensayos clínicos. Por el momento éstas son terapias potenciales dado que su efecto (producir más SMN completo a partir del gen SMN2) ha sido en contacto directo con fibroblastos de pacientes en cultivo (ANDREASSI Y COLS., BRICHTA Y COLS., SUMNER Y COLS., 2003). Tampoco se sabe su efectividad al nivel de la médula espinal que es donde obviamente se espera el efecto. Es por eso que los marcadores biológicos cobran una importancia fundamental, dado que sus cambios a escala molecular pueden ser utilizados en el seguimiento de los pacientes y compararlos con los efectos observables en la fuerza muscular, la función motora y los cambios electromiográficos (BROMBERG Y SWOBODA, 2002; IANNA CONNE Y COLS., 2003; MERLINI Y COLS., 2003).

4. La atrofia muscular espinal: objetivos del estudio y resultados obtenidos

El trabajo realizado durante la última década se puede resumir en 5 objetivos principales que se irán explicando y justificando uno a uno en esta memoria:

- **Objetivo 1.** Estudiar la patología molecular de la AME para el diagnóstico de afectados, diagnóstico de portadores y ofrecer el asesoramiento genético adecuado.
- **Objetivo 2.** Estudiar a los pacientes "especiales" de AME para mejor conocimiento de la fisiopatología de la enfermedad.
- **Objetivo 3.** Estudiar la AME durante el desarrollo humano para descubrir el mecanismo de la enfermedad e identificar dianas para tratamiento presintomático.
- **Objetivo 4.** Organizar y colaborar con las familias y grupos de padres en la difusión e información sobre la enfermedad, impulsar el registro nacional de pacientes, la coordinación de los profesionales que intervienen en la AME y la creación de grupos de apoyo.
- **Objetivo 5.** Participar con grupos de investigación internacionales en la validación de medidas de seguimiento y marcadores biológicos para aplicar en ensayos clínicos.

– **OBJETIVO I. Estudiar la patología molecular de la AME para el diagnóstico de afectados, diagnóstico de portadores y ofrecer asesoramiento genético.**

DIAGNÓSTICO DE AFECTADOS

El Servicio de Genética del Hospital de San Pablo es centro de referencia para los estudios genéticos de AME y están registradas hasta la fecha 850 familias con enfermedad de neurona motora procedentes de distintas regiones de España (*Tabla 1*). En todas ellas, los afectados presentaban signos de debilidad muscular e invalidez de miembros compatible con el diagnóstico de AME.

La realización del estudio genético en todos estos pacientes ha permitido confirmar el diagnóstico de AME por delección homocigota del gen SMN1 en 475 de ellos (23 familias tenían el afectado fallecido y el diagnóstico se confirmó en sus padres por estudio cuantitativo, ver más adelante). En otros 21 casos, se detectaron mutaciones puntuales en dicho gen que también confirmaron el diagnóstico. Dichos casos se detallan en el objetivo 2, (el estudio de las casos especiales de AME). De los casos restantes, 28 presentaban delección homocigota del gen complementario SMN2. Como dicha delección está presente en aproximadamente un 10% de la población general asintomática, no ha sido posible implicarla directamente como la causa de la enfermedad en dichos pacientes. Sin embargo, el papel de la ausencia del gen SMN2 en síndromes motores está en estudio, y nuestro grupo ha contribuido al respecto con dos publicaciones en la revista *Neurology* (ROJAS Y COLS., 2002; GÁMEZ Y COLS., 2002). Son necesarias más investigaciones para determinar si la delección del gen SMN2 en esos casos es una coincidencia como podría ocurrir en algún caso de la población general o si dicha delección es un factor predisponente (aunque no categórico) a padecer un cuadro clínico similar. Hemos determinado que los 321 casos restantes no serían causados por alteraciones categóricas en el gen SMN1 o la ausencia del gen 2 como factor predisponente. El contacto con los distintos médicos que referían a los pacientes permitió ayudar a la búsqueda de otras causas como responsables de la clínica de esos pacientes. En la gran mayoría de ellos se debieron a otros trastornos neuromusculares que se podían asemejar o confundir con la AME.

De los casos con ausencia del gen SMN1, aproximadamente un 5% eran la consecuencia de genes híbridos resultantes de la unión del gen SMN1 y SMN2.

Tabla 1. Resultados del estudio del gen SMN1 y SMN2 en 850 pacientes con debilidad muscular compatible con AME. Los casos con alteración en el gen SMN1 se consideran casos genuinos de AME, los del gen SMN2 como en estudio como factor de predisposición y los que no tienen alteración se descarta AME.

Ausencia gen SMN1	475
Mutaciones puntuales gen SMN1	21
Ausencia gen SMN2	33
Ninguna alteración genes SMN	321
Total pacientes estudiados	850

La importancia del estudio de dichos genes radica en que demuestran la inestabilidad de la zona que alberga el los genes SMN, lo que justifica la aparición de mutaciones de *novo*. La incidencia de mutaciones de *novo* en los padres puede ser del 1 al 2% de los casos y aunque el hecho de hallar en una familia una deleción de *novo* modificaría el riesgo de recurrencia a cifras menores. Nuestro grupo ha publicado un estudio sobre los genes híbridos en los pacientes españoles de AME donde se demuestra que los pacientes homocigotos para dichos genes tienen un fenotipo menos grave que aquéllos con un híbrido y una deleción (CUSCÓ Y COLS., 2001).

DIAGNÓSTICO DE PORTADORES

El estudio de los portadores pertenecientes a familias con afectados se realizó, inicialmente, utilizando una estrategia indirecta siendo necesario disponer de muestra de ADN del afectado a fin de identificar los haplotipos de riesgo que segregan con la enfermedad. El análisis de los marcadores C212 y C272, que están localizados en el extremo 5' del gen SMN, permite realizar un diagnóstico probabilístico pero altamente fiable. Incluso en algunas familias en las que el afectado había fallecido, fue posible efectuar el diagnóstico genotípico gracias a la amplificación de ADN procedente de las tarjetas de papel cromatográfico (usado en el cribaje neonatal) y de bloques o secciones de tejidos de material de biopsias o autopsias.

Ante la necesidad de establecer un diagnóstico directo de portadores nuestro grupo se planteó la utilización de métodos cuantitativos capaces de medir si existe, en la muestra problema, una o dos copias del gen SMN. Los datos preliminares indicaban que el diagnóstico directo ofrece una sensibilidad y especificidad superiores al 90%. Una ventaja adicional del método cuantitativo era su aplicación al diagnóstico de portadores de AME de individuos de la población general. Los objetivos de implementar dicho método eran:

- a) determinar por primera vez la frecuencia real de los portadores de una sola dosis del gen SMN1 en la población general española,
- b) aplicarlo en el diagnóstico de portadores y asesoramiento genético de distintas situaciones familiares de pacientes con Atrofia Muscular Espinal, haciendo énfasis en la indicación de posteriores estudios prenatales. Las distintas situaciones donde el análisis cuantitativo estaría indicado son:
 - b.1 . Confirmar que los padres de un paciente afectado son portadores de la enfermedad.
 - b.2. Estudio de parejas de portadores conocidos.
 - b. 3. Estudio de donantes de semen, para los casos de inseminación artificial.
 - b. 4. Estudio de familiares (hermanos, tíos, primos y abuelos de afectados).

Para el estudio de la frecuencia de portadores (de una sola dosis del gen SMN1) en la población española, se seleccionaron al azar 200 individuos de la población general (100 mujeres y 100 varones) sin enfermedad aparente.

Para el estudio de las indicaciones del método cuantitativo se analizaron un total de 410 individuos afectados de AME y 123 familiares de pacientes. Los resultados de estas investigaciones han sido publicados en tres trabajos (*Fertility & Sterility*, *BJOG*, *Human Mutation*) que se referencian al final de este apartado.

A . FRECUENCIA DE PORTADORES EN LA POBLACIÓN ESPAÑOLA

Se analizaron las dosis génicas del gen SMN1 mediante el método cuantitativo de un total de 200 individuos de la población general.

Ciento ochenta y nueve (189) presentaron un valor normalizado de doble dosis, cinco (5) un valor compatible con 3 dosis, uno (1) compatible con valores de cuatro dosis y cuatro (4) de dosis única. De acuerdo con este último valor, la frecuencia de portadores es de 2 de cada 100 ó 1/50.

B. APLICACIONES DEL MÉTODO

En este trabajo se ha validado el método cuantitativo a PCR real utilizando el sistema LightCycler para la determinación del número de copias del gen SMN1. Para esta validación se han estudiado 123 familiares de pacientes afectados. Sesenta y siete (67) eran padres de más de un niño o niña afectado de AME, considerados entonces portadores obligados. Los restantes cincuenta y seis (56) eran hermanos no afectados o familiares que no habían heredado el haplotipo de riesgo con los marcadores C212 y C272. En 63 de los 67 padres, se obtuvo el valor esperado de una copia. Cuatro de ellos presentaron dos copias. Como la delección en estos padres ha sido transmitida más de una vez a sus hijos, la explicación más probable es que estos padres tuvieran dos copias del gen SMN1 en un cromosoma y ninguna en el otro (dos copias de SMN1 en *cis*). Este fenómeno hemos determinado que ocurre aproximadamente en un 4% de los portadores, lo que hace que el método tenga una sensibilidad algo menor al 100%. De los 56 no portadores, todos presentaron dos dosis de gen SMN1. Estos resultados indican una sensibilidad del 96% y una especificidad del 100%. Este método permite modificar el riesgo final de una pareja formada por un portador (probabilidad 1) y un individuo de la población general (probabilidad 1/50), de tener un hijo afectado de AME, pasando el riesgo a priori de 1/200 ($1/4 \times 1/50$) a un riesgo final de 1/5000 en el caso que se halle dosis doble de gen ($1/4 \times 1/1250$) de casi 1 en 4 si fuera una dosis.

Este método se ha podido aplicar en el asesoramiento genético en nuestras familias con riesgo de sufrir Atrofia Muscular Espinal (**Figura 4**). Al menos existen 3 situaciones en las que la aplicación del método cuantitativo puede ser muy útil: 1) Cuando una portadora o portador conocido cambia su pareja por separación, viudez, etc. es posible determinar en su nueva pareja si el riesgo a priori de 1/50 pasa a ser bajo (1/1250) o muy alto (aproximadamente 1); 2) Cuando una portadora o portador conocido se somete a una reproducción asistida por semen de donante o donación de óvulos; 3) Para el diagnóstico de portadores en padres cuyo hijo ha fallecido. Siendo la AME una enfermedad grave y de evolución tórpida, muchas familias tienen el antecedente de uno o más

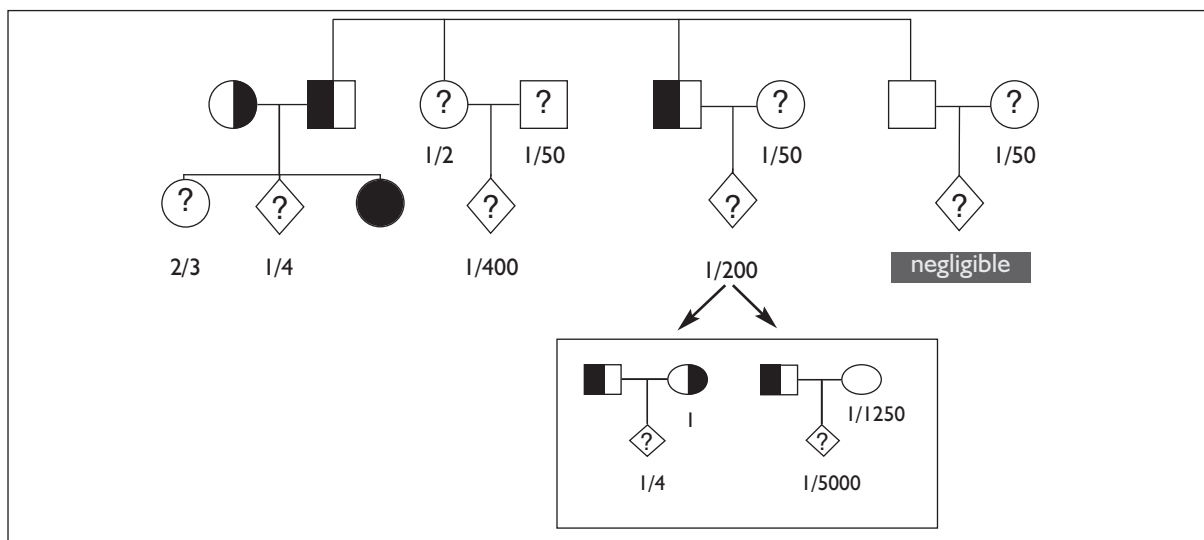


Figura 4. Genealogía representativa de las aplicaciones del análisis cuantitativo realizado en nuestro laboratorio para el correcto asesoramiento genético. De los cuatro hermanos representados, el 1º es portador y tiene a su hija afectada. Es posible estudiar a su otra hija (2/3 de ser portadora) o el embarazo actual de su mujer (1/4 de que sea afectado). La 2ª hermana debe hacerse estudio molecular para saber si es portadora. El 3º ya tiene estudio molecular que determinó que es portador y se debe estudiar a su esposa para verificar si tiene una o dos copias del gen SMN1. Finalmente en el 4º hermano el estudio determinó que no es portador. Las cifras representan el riesgo de tener un hijo/a afectado (salvo 2/3 que representa el riesgo de ser portador). El estudio cuantitativo que se desarrolló como parte del objetivo 1 es fundamental para definir el riesgo de 1/200 a cifras más categóricas de alto riesgo (1/4) o menos riesgo (1/1250) (recuadro).

hijos fallecidos con el diagnóstico neurológico de AME pero sin confirmación molecular. En estos casos, el hecho de hallar ambos padres con una sola copia de SMN1, confirmaría que la AME de ese hijo fallecido correspondía desde el punto de vista molecular con una delección homocigota de dicho gen. Por extensión, los hermanos de esos casos fallecidos también pueden estudiarse.

En nuestra experiencia, se han estudiado 21 familias con afectado fallecido sin disponerse de ADN para estudio. En 19 se confirmó que ambos padres eran portadores y se pudo extender el diagnóstico a los hermanos, a otros miembros de la familia y al diagnóstico prenatal. Los otros dos casos en que los padres tenían dosis doble, podrían corresponder a otras patologías que pueden confundirse con la AME.

Con respecto a las parejas con riesgo de 1/200 (es decir un portador/a y un individuo de la población general) hasta el momento un total de 90 parejas consultaron para realizar el estudio cuantitativo en el portador posible. De estos 90 consultantes, 89 tuvieron dosis doble. En estos casos, para completar el análisis se estudió una posible mutación puntual en el exón 3, que ocurre en el 3% de los casos de AME de la población española sin delección homocigota (ver apartado estudio de casos especiales). Por lo tanto el riesgo residual en estos casos sería el del falso negativo, es decir, la posibilidad de que alguno de estos consultantes tuviera los dos genes SMN1 en cis y ninguno en el otro alelo. El cálculo Bayesiano da como resultado una probabilidad de 1/1250 de ser portador con dosis doble (**Tabla 2**). A partir de estos valores de riesgo finales la pareja puede tomar una decisión más concreta ante la posibilidad de realizar un diagnóstico

TABLA 2. Cálculos Bayesianos del método de análisis cuantitativo, para calcular el riesgo final de ser portador o no portador según el resultado obtenido.

Si un portador en estudio da un valor de dos copias:

	Portador	No portador
a) A priori	1/50	49/50
b) Condicional	4/100	100/100
c) Joint (a x b)	4/5000	4900/5000
d) Posterior (cNP/cNP+cP)	$0.0008/(0.0008)+0.98$	$0.98/(0.98)+0.0012$
Aproximadamente 0.999 de no ser portador		
Aproximadamente 0.0008 de ser portador ó 1/1250		

Si un portador en estudio da un valor de una copia:

	Portador	No portador
a) A priori	1/50	49/50
b) Condicional	96/100	0/100
c) Joint (a x b)	96/5000	0/5000
d) Posterior (cP/cP+cNP)	$0.019/(0.019)+0$	
Aproximadamente 1 de ser portador		

prenatal. La aplicación de este método tiene una importancia en el campo del asesoramiento genético, tanto por la detección del estado de portadores de familiares y de la población general, como por el establecimiento del riesgo de una pareja de tener un hijo con AME, ya que nos permite ser más precisos en la probabilidad final. Las parejas que más beneficio pueden obtener de esta técnica son las que están formadas por un portador/a y un individuo de la población general. Como ya dijimos en el caso de que los dos miembros de la pareja sean portadores, el riesgo de tener un hijo afectado será de 1 en 4 y, por el contrario, si sólo uno de ellos resulta ser portador el riesgo pasará a ser de 1/5000.

Hay que tener presente que estos cálculos no incluyen los fenómenos de mutaciones puntuales ni los casos de *novó*. En la población española las mutaciones que afecten al exón 3 son las más recurrentes, y es por eso que cuando se hace el diagnóstico de portadores este exón también se estudia. De esta forma, el riesgo residual es prácticamente muy pequeño.

Uno de los casos diagnosticados en el laboratorio corresponde a una niña nacida después de una reproducción asistida con semen de donante y que presenta la deleción homocigota del gen SMN1. Se informó al laboratorio de reproducción asistida para destruir las muestras de ese donante. En el segundo embarazo, y después de otra reproducción asistida (esta vez con un donante diferente y de diferente región geográfica) se hace el estudio prenatal para determinar el estado del feto, que resulta ser afectada con la deleción homocigota del gen SMN1. El estudio cuantitativo de las muestras de DNA de la madre y del segundo donante evidencian que son portadores de la deleción. Si se hubiera determinado antes de hacer la inseminación artificial, se habría podido evitar

la aparición de un nuevo caso de la enfermedad en esta familia. Esto claramente justificaría el cribaje de los donantes de gametas, sobre todo en aquellos casos en que el receptor es un portador conocido, como se indica en la publicación *Fertility & Sterility* al final de este apartado.

A partir de todos estos estudios, hasta la fecha hemos estudiado un total de 1048 familiares de pacientes afectados con riesgo de ser portador y 90 individuos de parejas con riesgo de 1/200, formadas por un portador diagnosticado por métodos moleculares y un individuo de la población general (*Tabla 3*).

TABLA 3. Estudios cuantitativos en familiares de pacientes con AME.

	Total	Portadores 1 copia	Nº portadores 2 copias
Familiares a riesgo	1.048	496	552
Portadores posibles de parejas	90	1	89

PUBLICACIONES DE LOS RESULTADOS DEL OBJETIVO I

Atrofia muscular espinal de la infancia: patología molecular y expresión del gen SMN. TIZZANO, E.; BUS-SAGLIA, E.; BARCELÓ, M.J.; SOLER, C.; BADELL, I., y BAIGET, M. *Anales Españoles de Pediatría*, sup 115. (Premio Ordesa de Investigación Pediátrica) (1998).

Las bases moleculares de la atrofia muscular espinal: el gen SMN. TIZZANO, E.; BAIGET, M. *Neurología* 15:393-400 (2000).

Characterization of SMN hybrid genes in Spanish SMA patients: de novo, homozygous and compound heterozygous cases. CUSCÓ, I.; MARTÍN, Y.; BARCELÓ, M.J.; DEL RÍO, E.; HERNÁNDEZ-CHICO, C.; BUSSAGLI, E.; BAIGET, M.; TIZZANO, E. *Human Genetics* 108: 222-229 (2001).

Should gamete donors be tested for SMA? TIZZANO, E.; CUSCÓ, I.; BARCELÓ, M.J.; PARRA, J.; BAIGET, M. *Fertility and Sterility* 77: 409-411 (2002).

The absence of the SMN2 gene may play a role in multifocal motor neuropathy. ROJAS, R.; TIZZANO, E.; CUSCÓ, I.; GALLARDO, E.; BARCELÓ, M.J.; DE ANDRÉS, I.; LARRODÉ, P.; MARTÍ-MASSÓ, J.F.; MARTÍNEZ-MATOS, J.A.;

POVEDANO, M.; RALLO, B.; SERRANO, S.; BAIGET, M.; ILLA, I. *Neurology* 59: 1.112-1.113 (2002).

Prenatal diagnosis for risk of spinal muscular atrophy. CUSCÓ, I.; BARCELÓ, M.J.; SOLER, C.; PARRA, J.; BAIGET, M.; TIZZANO, E. *British Journal of Obstetrics and Gynecology* 109: 1.244-1.249 (2002).

Implementation of SMA carrier testing in genetic laboratories: comparison of two methods for quantifying the SMN1 gene. CUSCÓ, I.; BARCELÓ, M.J.; BAIGET, M.; TIZZANO, E. *Human Mutation* 20: 452-459 (2002).

Survival and respiratory decline are not related to homozygous SMN2 deletions in ALS patients. GÁMEZ, J.; BARCELÓ, M.J.; MUÑOZ, X.; CARMONA, F.; CUSCÓ, I.; BAIGET, M.; CERVERA, C.; TIZZANO, E. *Neurology* 59: 1.456-1.460 (2002).

Two independent mutations of the SMN1 gene in the same spinal muscular atrophy family branch: lessons for carrier diagnosis. BARCELÓ, M.J.; ALIAS, L.; CASSELLES, L.; ROBLES, Y.; BAIGET, M.; TIZZANO, E. *Genetics in Medicine* 8: 259-262 (2006).

– OBJETIVO 2. Estudiar a los pacientes "especiales" de AME para entender mejor la fisiopatología de la enfermedad.

En el apartado anterior se comentó que los pacientes con ausencia de gen SMN1 a consecuencia de tener genes híbridos SMN1 y SMN2 eran un tipo de paciente especial. En este apartado nos referiremos a otros pacientes "especiales" de AME: a) aquellos que no presentan la delección homocigota del gen SMN1 y por lo tanto tiene al menos una copia del gen detectable, y b) aquellos que, a pesar de tener la delección, tienen manifestaciones mínimas o son asintomáticos. En los primeros, la confirmación pasa por el diagnóstico de mutaciones puntuales, es decir, de una o pocas bases nucleotídicas que puedan hacer que el gen SMN1 no se transcriba o se traduzca correctamente. En los segundos, el estudio del número de copias del gen SMN2 puede ayudar a explicar el fenotipo que presentan.

A) DIAGNÓSTICO DE PACIENTES AFECTADOS QUE NO PRESENTAN DELECCIÓN HOMOCIGOTA DEL GEN SMN1.

Veintiún pacientes que no presentaban la delección homocigota del gen SMN1, que estaban diagnosticados clínicamente como AME, presentaban o bien una copia del gen SMN1 o bien eran de familias consanguíneas sin la delección del gen SMN1. En 10 de estas familias la mutación detectada fue una delección de 4bp en el exón 3 (c.399_402delAGAG). Esta mutación detectada en cuatro de nuestros pacientes fue publicada por nuestro grupo AME en *Nature Genetics* en 1995 en colaboración con el equipo de la Dra. Melki, descubridora del gen SMN (BUSSAGLIA Y COLS., 1995). Hasta el momento dicha mutación se ha descrito en población española, a pesar de que es la mutación puntual más frecuente (ninguna de las mutaciones puntuales descritas por otros investigadores llega a estar presente en 10 familias no relacionadas). Se ha podido observar, mediante el análisis de marcadores polimórficos, un mismo haplotipo en todos aquellos pacientes que eran procedentes del sur y del este de España, indicando un posible origen común (*Figura 5*). Esta mutación se encuentra tanto en pacientes tipo I como en casos asintomáticos incluso dentro de las mismas familias. Parece que la presencia de 2 ó 3 copias del gen SMN2 correlaciona con una mejor evolución. Los estudios de expresión muestran que los niveles del RNA FL/delta7 y de la proteína entera dependen del estado homocigoto o heterocigoto en que se encuentra la mutación. Todos estos resultados han sido publicados en *Human Mutation* (CUSCÓ Y COLS., 2003). La consideración práctica de estos resultados implica que si un paciente con sospecha clínica de AME no tiene delección homocigota del gen SMN1, no tiene mutación en el exón 3 y presenta doble dosis de gen SMN1 por estudio cuantitativo, podemos decir que no se trata de una AME y que entonces es necesario reconsiderar el diagnóstico clínico-neurológico.

De los 9 casos restantes sin delección homocigota, se ha localizado y caracterizado la mutación causante del AME en 4 casos tipo I, que retenían una única dosis del gen SMN1. Dos de estas mutaciones predicen un cambio de aminoácido (I116F, Q136E) y afectan a la región conservada del exón 3 (Dominio Tudor), que es el mismo exón alterado por la mutación c.399_402delAGAG del



FIGURA 5. Lugares de origen de las familias españolas afectadas de AME con la mutación en el exón 3 del gen SMN c.399_402delAGAG. Por apellidos y estudio de los familiares los sitios de origen eran: Granada, Córdoba, Badajoz por un lado y Valencia, Castellón, Tarragona, Teruel y Huesca por el otro. La ubicación exacta de las ciudades de la costa (Valencia, Castellón y Tarragona) está algo desviada para facilitar su visualización en el mapa. Los 15 casos pertenecientes a 10 familias tenían el mismo haplotipo lo que indica un ancestro común de la península dado que no se ha detectado esta mutación en otras poblaciones.

exón 3 previamente descrita. Estos resultados han sido publicados recientemente en la revista *Neurology* (Cuscó y cols., 2004). Considerando estos resultados, se concluye que después del exón 7 y 8, el exón 3 es el más frecuentemente alterado en la población española, lo que hace considerarlo “punto caliente” de mutaciones apoyando la importancia funcional de este dominio. Este exón codifica para un dominio Tudor, esencial para la unión de proteínas Sm de la reacción del *splicing*. Nuestros resultados destacan la importancia de este Dominio en la función de la proteína SMN dado que los dos pacientes detectados eran afectados de la forma grave. Las otras dos mutaciones afectan a la región promotora del gen SMN1 (provocando un déficit en la transcripción del gen) una de ellas directamente a través de un cambio A-T (de *novo*) y la otra a consecuencia de una deleción parcial de la región 5' del gen. En aquellos pacientes donde no se puede determinar el defecto molecular del gen SMN1, la detección de mutaciones que alteran el promotor justifica-

ría la AME causada por genes SMN1 no funcionales. Otro de los pacientes en los que se detectó la mutación es una niña con la forma tipo I con un cambio nucleotídico en el exón 4 que producía un codón stop que daba lugar a una proteína SMN mas corta e inestable. Cabe destacar que en los 4 casos de AME restantes en los que se detectó una sola copia del gen SMN1 no fue posible identificar mutaciones en la zona codificante, las regiones de unión exón-intrón o la zona promotora. Tampoco se disponía de RNA para determinar si existían defectos de transcripción. En estos pacientes, a pesar de no identificar la mutación en el otro alelo, la presencia de una delección y la clínica que presentaban hacen razonable su consideración como afectados de AME por alteración del gen SMN1.

B) PACIENTES CON AUSENCIA DEL GEN SMN1 PERO CON MANIFESTACIONES MÍNIMAS O ASINTOMÁTICOS.

La variabilidad fenotípica en la AME presenta dos alternativas de estudio. Por un lado intentar explicar el porqué un afectado de AME, aún teniendo el mismo genotipo SMN1 puede desarrollar la forma grave (tipo I), la intermedia (tipo II) o la moderada (tipo III). La otra hace referencia a las diferencias en la evolución de las manifestaciones clínicas entre parejas de hermanos afectados en una misma familia. Originalmente parte de estas familias fueron publicadas por nuestro grupo en *Neurology* (BUSSAGLIA Y COLS., 1997). Con la validación y aplicación del método cuantitativo del gen SMN2 se han podido ampliar estos estudios y aplicar a nuevas familias. Los objetivos del trabajo eran:

- 1) Determinar el número de copias del gen SMN2 y su influencia en la evolución de las distintas formas de la enfermedad (correlación genotipo-fenotipo interfamiliar).
- 2) Determinar si el número de copias del gen SMN2 está implicado en la variabilidad fenotípica que se ha descrito en las familias con las formas crónicas de la enfermedad (tipo II y tipo III)(correlación genotipo-fenotipo intrafamiliar).

Correlación genotipo-fenotipo interfamiliar. Para valorar la relación entre el número de copias del gen SMN2 y el fenotipo en nuestra población, se ha aplicado el método cuantitativo por LightCycler en el estudio de 16 pacientes tipo I, 14 tipo II, 15 tipo III observando, igual que los otros autores, una correlación importante: el 87.5% del tipo I presentan una o dos copias, el 85.6% del tipo II dos o tres copias, y los 86.7% del tipo III tres o cuatro copias. No se ha encontrado ningún caso tipo I y tipo II con 4 copias, ni ningún caso tipo III con una única copia. Aún así, la correlación nunca es absoluta y por tanto tampoco se puede hacer de manera precisa la predicción de la evolución de un paciente. Por ejemplo, en este trabajo se han encontrado casos con el mismo genotipo (compuesto heterocigoto (delección/mutación exón 3) e igual número de copias del gen SMN2 (n=3) que presentaban fenotipos del todo opuestos: pacientes con inicio en la adolescencia por un lado y otro a los 5 meses de vida. Al tratarse de pacientes de familias diferentes, este fenómeno se puede explicar en parte por el hecho de tener un fondo (o *background*) genético diferente. En el siguiente apartado se comenta el posible efecto de genes modificadores diferentes al gen SMN2.

Correlación genotipo-fenotipo intrafamiliar. En la población española estudiada se han detectado, como mínimo, 6 familias afectadas por formas crónicas que presentan una variabilidad intrafamiliar notable. Cuatro de ellas presentan la delección homocigota del gen SMN1 (Familias 1–4) y las otras dos presentan la mutación c.399_402delAGAG, una compuesto heterocigoto (delección en un alelo y la mutación en el otro) (Familia 5) y la otra en estado homocigoto (es decir en ambos alelos está la misma mutación) (Familia 6). La variabilidad engloba desde casos tipo II hasta individuos asintomáticos y no parece que se establezca ninguna relación con el sexo de los afectados. Entre los hermanos de cinco de las seis familias, se ha observado el mismo número SMN2 (**Tabla 4**):

Familia 1. El individuo F1-1 (edad actual de 28 años) presentaba un fenotipo claramente tipo III, a la edad de 2 años comenzó a manifestar la enfermedad, y a los 17 años utilizaba la silla de ruedas. Mientras que su hermana F1-2 (edad actual de 22 años), también con la delección homocigota del gen SMN1, no presentaba ninguna alteración neurológica y sólo se le detectó un incremento de los potenciales de las unidades motoras (MUP) en el estudio del electromiograma (EMG).

Familia 2. En esta familia hay dos hermanos afectados. El F2-1 (actualmente 60 años) empezó a manifestar los síntomas a los 8 años y a los 12 ya necesitaba silla de ruedas. Mientras que el F2-2 (58 años), de profesión taxista, empezó a presentar los síntomas a los 32 años, su evaluación clínica indicaba una atrofia moderada de los músculos proximales de los miembros superiores, aparte de la presencia desde la adolescencia de calambres musculares.

Familia 3. En esta familia hay un varón afectado (F3-1) de 26 años, que empezó a presentar sintomatología a los 18 meses, y desde los 12 años necesita la silla de ruedas, y su hermana (F3-2) de 33 años, que a los 18 años comenzó con caídas frecuentes y tenía dificultad para subir escaleras, pero actualmente todavía tiene la capacidad de caminar largas distancias, aunque con una marcha anormal.

Familia 4. Esta familia presenta dos hermanas afectadas. La mayor (F4-1) tiene actualmente 39 años, y hacia los 7 meses empezó a presentar síntomas clínicos compatibles con AME, con la capacidad de sentarse, pero nunca de andar. Actualmente presenta una escoliosis grave y muchos problemas respiratorios. Su hermana (F4-2) de 32 años, empezó a presentar sintomatología hacia los 12 años y desde los 25 necesita silla de ruedas.

Familia 5. Tres hermanos (un varón de 65 años, y dos mujeres de 59 y 55 años) forman parte de esta familia. El mayor comenzó paulatinamente en la infancia pero con 65 años aún mantiene la deambulación. En cambio su hermana de 59 está en silla de ruedas desde la adolescencia. Lo más sorprendente de todo es que la tercera hermana, de 55 años, tiene sólo una discretísima debilidad del psoas, por lo demás siendo totalmente asintomática.

Familia 6. Esta familia presenta la mutación c.399_402delAGAG en estado homocigoto y está formada por cuatro hermanas, dos con tipo III de comienzo temprano cuyos síntomas aparecieron antes de los 18 meses, una tipo III clásica, y una tipo IV mínimamente afectada que lleva una vida prácticamente normal y tiene dos hijas. Las dos hermanas con inicio de afectación antes de los 18 meses presentan dos copias del gen SMN2, mientras que las otras dos tienen tres copias del gen. Aunque las dos hermanas tipo III de comienzo temprano tienen menos copias del gen SMN2, el número de copias no nos explica las diferencias entre las hermanas menos afectadas. Debido a la consanguinidad de los padres en este caso, la diferencia en la afectación de las dos hermanas menos afectadas no puede ser explicada por el background genético. Todas estas observaciones se pueden interpretar como que el gen SMN1 es el gen determinante responsable de AME, que el gen SMN2 no sería el único modificador y que la presencia de otros factores modificadores localizados fuera del locus AME pueden influir en la evolución final de la enfermedad. Estos resultados se han publicado en el *Journal of Neurology* (CUSCÓ Y COLS., 2006).

PUBLICACIONES DE LOS RESULTADOS DEL OBJETIVO 2

A frame-shift deletion in the survival motor neuron gene in Spanish spinal muscular atrophy patients. BUSSAGLIA, E.; CLERMONT, O.; TIZZANO, E.F.; LEFEBVRE, S.; BÜRGLIN, L.; CRUAUD, C.; URTIZBEREA, J.; COLOMER, J.; MUNNICH, A.; BAIGET, M.; MELKI, J. *Nature Genetics* 11: 335-337, (1995).

Cramps and minimal EMG abnormalities as pre-clinical manifestations of SMA patients with homozygous deletions of the SMN gene. BUSSAGLIA, E.; TIZZANO, E.; ILLA, I.; CERVERA, C.; BAIGET, M. *Neurology*, 48:1.443-1.445 (1997).

Importancia del diagnóstico genético en un caso atípico de atrofia muscular espinal tipo I. LOUREIRO, B.; JUSTA, M.L.; RITE, S.; MARCO, A.; CALVO, M.T.; BAIGET, M.; TIZZANO, E.; LÓPEZ PISÓN, J. *Anales Españoles de Pediatría*, 48: 644-646 (1998).

A genetic and phenotypic analysis in Spanish spinal muscular atrophy patients with C.399_402del AGAG, the most frequently found subtle mutation in the SMN1 gene. CUSCÓ, I.; LÓPEZ, E.; SOLER, C.; BAIGET, M.;

TIZZANO, E.F. *Human Mutation*, 22: 136-143 (2003).

Detection of novel mutations in the SMN Tudor domain in type I SMA patients. CUSCÓ, I.; BARCELÓ, M.J.; DEL RÍO, E.; BAIGET, M.; TIZZANO, E.F. *Neurology* 63: 146-149 (2004).

SMN2 copy number predicts acute or chronic SMA but does not account for intrafamilial variability in siblings. CUSCÓ, I.; BARCELÓ, M.J.; ILLA, I.; CERVERA, C.; POU, A.; IZQUIERDO, G.; BAIGET, M.; TIZZANO, E.F. *Journal of Neurology* 253:21-25 (2006).

TESIS DOCTORAL DESARROLLADA A PARTIR DE LOS OBJETIVOS 1 Y 2:

“CARACTERIZACIÓN DE LOS GENES SMN1 Y SMN2 EN PACIENTES CON ATROFIA MUSCULAR ESPINAL : GENES HÍBRIDOS, DOSIS GÉNICA Y MUTACIONES PUNTUALES”.

Presentada por: IVON CUSCÓ. SEPTIEMBRE 2003.

Director: EDUARDO TIZZANO

CALIFICACIÓN: Cum Laude.

Universidad de Barcelona.

– **OBJETIVO 3. Estudiar la AME durante el desarrollo humano para descubrir el mecanismo de la enfermedad e identificar dianas para tratamiento presintomático.**

Los sistemas experimentales de estudio, como la detección de RNA mensajero por hibridación *in situ* y de proteína por inmunoblot e inmunohistoquímica para definir el patrón de expresión tiempo-espacial durante el desarrollo humano, pueden contribuir significativamente a determinar las posibles funciones del gen SMN y su proteína, así como la patogenia de la AME. Es importante determinar si la muerte y degeneración neuronal descrita en la AME son la consecuencia de fenómenos apoptóticos y si puede haber involucrados otros mecanismos que llevan a la degeneración de la motoneurona en el desarrollo humano.

Tradicionalmente, la mayoría de hallazgos neuropatológicos en la AME han correspondido a material de autopsia y son hallazgos postmortem, una vez que se ha establecido la enfermedad (CRAWFORD Y PARDO, 1996). Nuestra hipótesis consistió en estudiar la AME durante el desarrollo humano, como un proceso activo en desarrollo y no en fase terminal. Salvo los casos de AME congénita, siempre hay un período de latencia entre el nacimiento y la aparición de la debilidad muscular y la arreflexia. Lo que ocurre durante ese período de latencia es desconocido, dado que no existe el diagnóstico presintomático de la enfermedad.

EXPRESIÓN DE LOS GENES SMN1 Y SMN2

Nuestro grupo ha determinado el patrón de expresión del gen SMN durante el desarrollo humano en el sistema nervioso central por medio de análisis del ARNm por hibridación *in situ* (TIZZANO Y COLS., 1998). En la médula espinal se observó expresión significativa a partir del período fetal en los neuroblastos del asta anterior (precursores de las neuronas) y luego, en el período neonatal, infancia y vida adulta en las neuronas motoras del asta anterior. Asimismo, se observó expresión en las neuronas de los ganglios de las raíces dorsales y en algunas neuronas sensitivas del asta posterior. A partir de la vida fetal, también se observó expresión en el epitelio del canal central medular. En bulbo, la expresión se detectó en las neuronas del núcleo del hipogloso (par XII) y espinal (par XI) así como en las neuronas de la oliva bulbar. En corteza cerebral, la expresión fue observada en la capa de células piramidales y en cerebelo en las células de Purkinje y las células de la capa granulosa. En la médula espinal, el órgano blanco de la enfermedad, se constata que las muestras pertenecientes al período fetal ya expresan el gen en las células primordiales del epitelio neural. Estas células luego migran hacia el asta anterior para convertirse en neuroblastos, que son los precursores de las futuras neuronas motoras. En todos estos estadios analizados se detectó un nivel significativo de expresión, indicando que el gen SMN debe cumplir un importante papel en el desarrollo de dichas neuronas. La expresión se detectó también en las neuronas sensitivas pertenecientes al asta posterior y a las raíces de los ganglios dorsales, lo que sugiere también que el gen puede verse implicado con el desarrollo y mantenimiento de dichas neuronas. Cuando se intenta correlacionar los hallazgos de la expresión con la patología y las manifestaciones clínicas descritas en los pa-

cientes con AME, se observa que existe una clara asociación cuando nos referimos a las neuronas motoras y los núcleos bulbares. En ellos existe pérdida y degeneración que se correlaciona con el curso de la atrofia muscular neurogénica, debilidad muscular, fasciculaciones y temblores en los pacientes con AME. A nivel sensitivo, en las neuronas de los ganglios dorsales existe patología descrita similar a la de las neuronas motoras, pero no se han comunicado manifestaciones clínicas de tipo sensitivo en estos pacientes. Algo similar ocurre en el cerebro, donde se ha descrito un incremento difuso en el número de astrocitos y microglia, y en el cerebelo, con una leve disminución en el número de células de Purkinje. Finalmente, es importante señalar que aunque se detectó expresión en el epitelio endotelial, no se ha descrito en los pacientes con AME patología en dichas células, así como tampoco alteraciones en la circulación, composición o cantidad de líquido cefalorraquídeo.

En conjunto, los resultados de nuestro estudio indican que las neuronas motoras y núcleos bulbares deben ser más sensibles a la ausencia o disfunción del gen SMN y que dicha alteración en las otras estructuras donde el gen se expresa podría ser compensada por otros mecanismos o factores genéticos o celulares. Estos estudios se ampliaron luego con el estudio de muestras fetales afectadas de AME y el análisis de proteína SMN por Inmunoblot e inmunohistoquímica.

La conclusión es que existe una correlación incompleta al nivel de la expresión del gen SMN, la anatomía patológica y las manifestaciones clínicas de la enfermedad. A partir de estos resultados se planteó el interrogante a resolver: por qué a pesar de que el gen se expresa en tantos grupos neuronales, solamente la patología y las manifestaciones clínicas de la enfermedad ocurren en las neuronas motoras del asta anterior. El siguiente paso fue la comparación de la expresión con células y tejidos AME donde está ausente el gen SMN1 y presente el gen SMN2. Estos experimentos indican que existe una expresión disminuida de SMN2 en la médula espinal y el músculo y que en otros tejidos no afectados por la AME, el gen SMN2 expresa niveles similares de proteína a los controles (que tienen el gen SMN1). Estos resultados por primera vez demuestran en el modelo humano de la enfermedad que: 1) el gen SMN2 ya está sobreexpresado en los pacientes con AME para compensar la enfermedad, especialmente en los tejidos que no hay patología, 2) la proteína incompleta (Delta 7) que expresa el gen SMN2 de los pacientes podría ser dañina en vez de protectora en la médula espinal, dado que en condiciones normales, casi no se detecta en la médula espinal. Allí el gen SMN1 tiene una expresión jerarquizada que se ve alterada en la AME. Los resultados de este trabajo se han publicado en *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* (SOLER Y COLS., 2005) con el título en inglés *Implications of fetal SMN2 expression in type I SMA pathogenesis: protection or pathological gain of function?*

ESTUDIO DE LA MUERTE NEURONAL PROGRAMADA

La muerte neuronal programada (también conocida como apoptosis) ocurre de manera normal durante el desarrollo humano. Sin embargo, es un proceso limitado que resulta en beneficio para la formación y distribución de células y espacio a lo largo de la médula espinal. Por estudio del pa-

trón de fragmentación del DNA de la médula espinal durante el desarrollo, se ha determinado que en los afectados de AME con la forma tipo I, existe un aumento significativo de la muerte neuronal programada. Sin embargo, dicho aumento no se ve reflejado en la morfología de los neuroblastos y neuronas motoras del período fetal (*Figura 6*). Los cambios típicos de la enfermedad descritos originalmente sólo se han detectado después del nacimiento.

De estos hallazgos se determina que el mecanismo patogénético de la AME tipo I es la consecuencia de al menos dos procesos: a) un aumento de la sensibilidad de las neuronas del asta anterior a la muerte neuronal programada, debida a la ausencia de SMN1; esto lleva a que el número de neuronas motoras esté disminuído hasta casi el 60% comparado con los controles a lo largo del desarrollo, y b) cambios degenerativos en la motoneurona que aparecen en etapas posteriores y que no están asociados inicialmente con la muerte neuronal programada. Nuestro grupo ha sido pionero en este estudio y por primera vez se ha demostrado que la muerte neuronal es un proceso temprano y que la neurodegeneración es un proceso tardío. Nuestra teoría es que la AME es una enfermedad del desarrollo y que los procesos para prevenirla deben orientarse al tratamiento de la muerte neuronal. El evitar o detener la neurodegeneración sería un tratamiento tardío, cuando la enfermedad ya está en curso. Estos resultados se publicaron en una de las mejores revistas de neurociencias: *Brain*, (julio de 2002). En octubre de 2002 otro grupo de investigadores corroboró nuestros hallazgos, confirmando que la teoría planteada y los resultados eran apropiados (FIDIZANKA Y RAFAELOSKA, 2002).

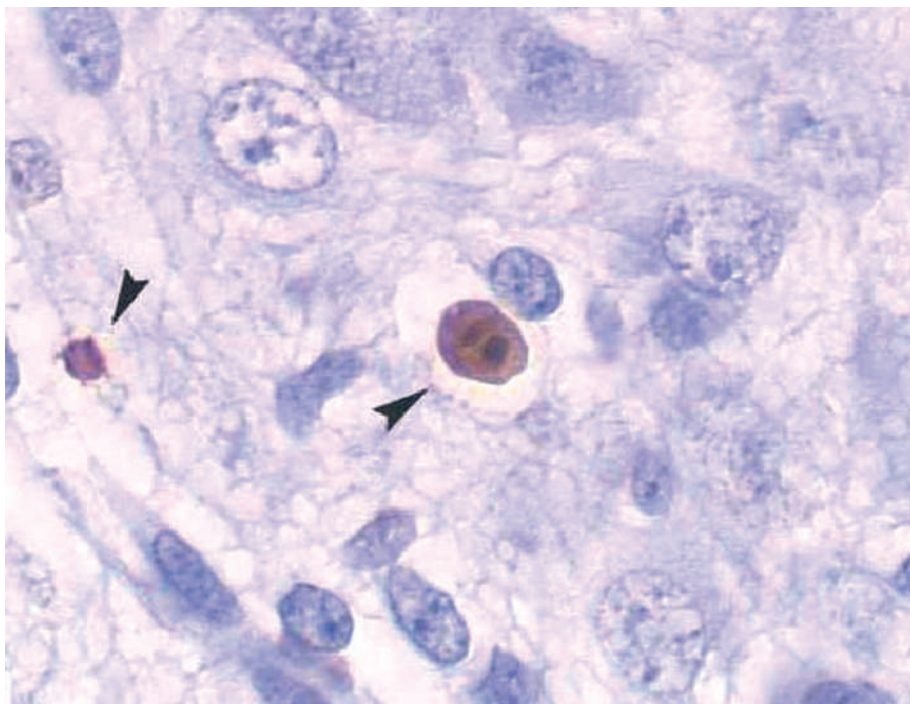


FIGURA 6. Se trata del asta anterior de la médula espinal en la atrofia muscular espinal a las 15 semanas del desarrollo. Las flechas señalan dos células con aumento de la fragmentación del DNA por medio de la técnica de TUNEL. Los núcleos grandes, claros y con nucléolo marcado corresponden a neuronas motoras. Es la primera vez que se demostró un aumento de la muerte celular programada en la AME durante el desarrollo, antes de que aparezcan las manifestaciones de la enfermedad y abre las puertas para el tratamiento presintomático. El estudio completo fue publicado en la revista *Brain* en julio de 2002 (*BRAIN* 125:1624-1634, 2002).

A partir de estos hallazgos el siguiente paso fue analizar la expresión de dos proteínas relacionadas con la apoptosis: Bcl-2 y Bcl-X. La primera tenía particular interés dado que se había comunicado previamente una interacción entre Bcl-2 y SMN (IWAHASHI Y COLS., *Nature* 1997). Los resultados indican que la expresión de Bcl-2 está disminuida en la médula espinal prenatal de AME y la de Bcl-X, que normalmente reemplaza a aquél en el desarrollo, se encuentra irregular y retrasada. Estos resultados confirman la posible implicación de estas proteínas a consecuencia de la ausencia del gen SMN1 y se publicaron en 2003 en el *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*.

A fin de dar una idea más amplia de la AME durante el desarrollo fetal se estudió la enzima acetilcolintransferasa (ChAT), que participa en la síntesis del neurotransmisor acetilcolina y es un marcador de función de motoneurona, especialmente cuando hace sinapsis con el músculo. Se estudió el RNA mensajero (RT-PCR) y proteína de la enzima ChAT por inmunoblot e inmunohistoquímica. Se procedió a la semicuantificación y al conteo de neuronas motoras con señal positiva o negativa. Se halló menor expresión de ChAT en médula espinal AME comparada con el control. Sin embargo, el porcentaje de neuronas motoras positivas era similar en ambos grupos. Esto quiere decir que no hay menos contacto neurona-músculo en la AME, sino que hay menos neuronas motoras. La diferencia en la cantidad de ChAT sería por el número disminuido de neuronas motoras dado que aquellas neuronas motoras remanentes en la médula AME expresan ChAT de manera similar a los controles. Sería posible entonces actuar sobre estas neuronas motoras remanentes como posibilidad terapéutica. Estos resultados se han publicado en *Neuromuscular Disorders* (SOLER Y COLS., 2005) con el título en inglés "*Choline acetyltransferase expression does not identify early pathogenic events in fetal SMA spinal cord*".

HACIA EL TRATAMIENTO PRESINTOMÁTICO

Todos estos estudios han sido pioneros para sentar las bases de un tratamiento presintomático de la enfermedad. Se ha demostrado que la enfermedad se inicia en el desarrollo humano y que hay remanente de neuronas motoras capaces de responder de forma normal antes del inicio de los síntomas. Por lo tanto, podría ser posible detenerla o retrasarla si se actúa sobre los mecanismos de apoptosis o previniendo el deterioro de esas neuronas remanentes de aspecto y función aparentemente en límites normales.

Esto plantea la alternativa de poder implementar en un futuro el cribado neonatal para la detección de la enfermedad. En muchos casos de AME hay un período de latencia entre el nacimiento y la aparición de las manifestaciones y es necesario identificar los cambios patológicos que puedan ir ocurriendo mientras la enfermedad se va desarrollando. El cribado neonatal plantea aspectos éticos que son importantes contemplar de manera profunda y valorarlos por un equipo multidisciplinario. Todavía no se cuenta con un marcador pronóstico categórico y aunque el número de copias del gen SMN2 puede ser de gran ayuda, de ninguna manera es absoluto.

Estas reflexiones sobre la posibilidad de tratamiento presintomático y cribado neonatal han sido publicadas en la revista *Neuromuscular Disorders* por el autor en un artículo colaborativo inter-

nacional sobre tratamiento de la atrofia muscular espinal: "Outcome measures and treatment of spinal muscular atrophy: 134th ENMC International Workshop". BERTINI, E.; BURGHESE, A.; BUSHBY, K.; ESTOURNET, B.; FINKEL, R.; HUGHES, R.; IANNACONE, S.; MELKI, J.; MERCURI, E.; MUNTONI, F.; VOIT, T.; REITTER, B.; SWOBODA, K.; TIZIANO, D.; TIZZANO, E.; TOPALOGLU, H.; WIRTH, B.; ZERRES, K. *Neuromuscular Disorders* 15: 802-816 (2005).

PUBLICACIONES DE LOS RESULTADOS DEL OBJETIVO 3

Cell-specific expression of the SMN gene during human development of the central nervous system: Implications for the pathogenesis of SMA. TIZANO, E.; CABOT, C.; BAIGET, M. *American Journal of Pathology* 153: 355-361 (1998).

Neuronal death is enhanced and begins during fetal development in type I spinal muscular atrophy spinal cord. SOLER, C.; FERRER, I.; GICH, I.; BAIGET, M.; TIZZANO, E.F. *Brain* 125: 1.624-1.634 (2002).

Down-regulation of Bcl2 proteins in type I SMA motor neurons during fetal development. SOLER-BOTIJA, C.; FERRER, I.; ALVAREZ, J.L.; BAIGET, M.; TIZZANO, E.F. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 62: 420-426 (2003).

Choline acetyltransferase expression in fetal SMA spinal cord. SOLER, C.; CUSCÓ, I.; LÓPEZ, E.;

FERRER, I.; CLÚA, A.; BAIGET, M.; TIZZANO, E.F. *Neuromuscular Disorders* 15: 253-258 (2005).

Implications of fetal SMN2 expression in type I SMA pathogenesis: protection or pathological gain of function? SOLER, C.; CUSCÓ, I.; LÓPEZ, E.; BARCELÓ, M.J.; BAIGET, M.; TIZZANO, E. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 64: 215-223 (2005).

TESIS DOCTORAL del objetivo 3:

La atrofia muscular espinal durante el desarrollo humano: Mecanismos de muerte celular y expresión de genes y proteínas involucradas en la enfermedad.

Presentada por: CAROLINA SOLER. Julio 2003.

Director: EDUARDO TIZZANO.

Calificación: Cum Laude.

Universidad de Barcelona

– OBJETIVO 4. Organizar y colaborar con las familias y grupos de padres la difusión e información sobre la enfermedad, impulsar el registro nacional de pacientes, la coordinación de los profesionales que intervienen en la AME y la creación de grupos de apoyo.

Este objetivo surgió de la necesidad de hacer más fluídos los canales de comunicación entre los profesionales que se dedican a la atención de pacientes y las familias de afectados. Durante muchos años, nuestro grupo AME realizó una labor docente entre disitintos profesionales e instituciones para informar de los avances científicos y transmitir la experiencia acumulada (ver más adelante “Labor docente a profesionales”). Sin embargo, la relación con los pacientes y sus familias era individual y no grupal. Era necesario avanzar hacia una nueva forma de comunicación entre los profesionales y los pacientes en la que se potenciaran los objetivos comunes para aunar esfuerzos y lograr mas eficacia en el cumplimiento de dichos objetivos. En España existe la Asociación Española de Enfermedades Neuromusculares (ASEM) que desde hace 20 años aglutina a los pacientes y sus familiares. Tiene una delegación central y 8 Federaciones en distintas comunidades autónomas. Sus objetivos son mejorar la calidad de vida de los pacientes y sus familias y relacionarse con las instituciones y administraciones para la comprensión de los problemas de los pacientes con ayudas económicas o de materiales. Nuestro grupo pertenece al Comité de Expertos de ASEM y a través del entusiasmo de algunas familias de AME con inquietudes de trabajo, comenzó a gestarse el grupo de familias AME dentro de la delegación Catalunya de ASEM. Una influencia importante ha sido la participación a partir de 1998 de nuestro grupo de investigación en las reuniones científicas de *Families of Spinal Muscular Atrophy*, de EEUU. Esta organización aglutina aproximadamente 1.000 familias de Norteamérica con afectados de AME y recauda fondos para la investigación y búsqueda de soluciones terapéuticas. Una vez al año, financia una Reunión Internacional de Investigadores donde participan casi todos los grupos que estudian esta enfermedad y donde al final se hace una reunión conjunta con las familias para información e intercambio de ideas y dar perspectivas de lo que se puede esperar en un futuro próximo. Nuestro grupo ha participado activamente en estas reuniones, donde hemos comunicado nuestros hallazgos científicos y, a su vez, se iniciaban los contactos para que el grupo de familias AME españolas participara en estas reuniones internacionales. El primer reto era organizar una reunión que convocara a nuestros pacientes y familiares. Fue así que en octubre de 2000 se realizaron las I Jornadas Médico-informativas de AME. La organización fue el esfuerzo conjunto de ASEM Catalunya (gestora de los apoyos institucionales), del grupo de padres de AME (comunicando a las familias y preparando el terreno) y el grupo AME de Genética (gestor de la parte científica y el contacto con profesionales). Los objetivos de esta reunión y de las siguientes se pueden resumir en:

- Difusión de la enfermedad y su problemática a la sociedad.
- Establecer un registro de pacientes españoles.
- Potenciar la comunicación entre las familias de afectados, generando grupos de apoyo.
- Informar de los adelantos científicos a la mayor parte del colectivo.

- Potenciar los mecanismos que cubran las necesidades específicas para obtener una mejor calidad de vida.
- Formar un grupo de familiares AME español que participe como tal en los eventos nacionales e internacionales.
- Solicitar ayudas económicas a organismos institucionales y particulares.

El encuentro fue muy emotivo y por primera vez los familiares tenían un punto en común por el que compartir el desafío permanente que es vivir con esta enfermedad. A partir de esta primera reunión, donde participaron 80 personas, la actividad ha sido permanente. Se comenzó su difusión en la prensa y la televisión (ver Listado de eventos), se organizaron encuentros entre las familias, se aprovechó un logo creado para docencia y difusión de la enfermedad para hacer camisetas e imanes (*Figura 7*), se creó una página web (www.gentesma.org), y otros grupos de pacientes y familiares afectados de otras enfermedades neuromusculares de ASEM, como los de la distrofia muscular de Duchenne y la distrofia miotónica, imitaron el ejemplo del grupo AME llevando a cabo sus reuniones. En los años siguientes se concretaron las II (2001), III (2002) IV (2003) y V (2005) reuniones AME y ya está en organización la VI (2006-7). El grupo de AME a través de ASEM se incorporó a la International Association of SMA (IASMA) y al grupo europeo de SMA (con la finalidad de establecer vínculos entre los distintos países y fomentar la aplicación de protocolos comunes) participando en reuniones europeas, como en Amsterdam (2002), Londres y París (2003) y Schaumbourg, en la reunión de FSMA de 2004. Finalmente, hay que añadir la participación en la primera y segunda reunión de familias de AME de Argentina en diciembre de 2003 y 2004, y el asesoramiento e información al grupo de familias de AME de Venezuela.

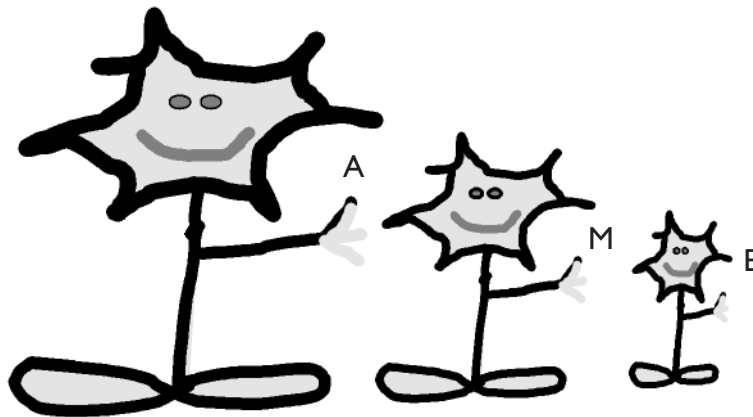


FIGURA 7. Logotipo de la AME creado inicialmente con fines docentes y que luego se estableció para los programas, afiches, notas informativas y para camisetas. Fue donado como membrete a FUNDAME en 2005.

Con la estimulación recibida de todos estos eventos el grupo de padres estableció en septiembre de 2005 una Fundación sin fines de lucro que aglutina los esfuerzos de los grupos de familias para recaudar fondos para la investigación: FUNDAME (NIF G-99075087, que figura en el registro de Fundaciones del Ministerio de Trabajo con el número 50/0153). El dibujo que se utilizó en las camisetas se ha donado a FUNDAME para ser su logotipo.

ACTIVIDADES DE CARÁCTER CIENTÍFICO-SOCIAL (OBJETIVO 4)

- * I Jornada Médico-Informativa Atrofia Espinal (octubre de 2000).
- * II Jornada Médico-Informativa Atrofia Espinal (diciembre de 2001).
- * Reunión de familiares y pacientes (Hospital Sant Pau, julio de 2002).
- * Entrevista a Marta Estapé (paciente AME III) y Dr. Eduardo Tizzano. "Una enfermedad llamada Atrofia Muscular Espinal". Diario "EL PAIS" (21 de septiembre de 2002).
- * Reportaje en TV3 programa ENTRE LINIES: Atrofia Muscular Espinal (pacientes, Marta Estapé y Carla Martí, y Dr. Eduardo Tizzano) (18 de noviembre de 2002) (**Figura 8**).
- * III Jornada Médico-Informativa AME (noviembre de 2002).
- * Inauguración página web gentesma.org (28 de mayo de 2003).
- * Entrada en IASMA (Washington, 22 de junio de 2003).
- * Reportaje TV3 "50 años del DNA" (pacientes Celia, Nuria y Teresa Contreras y Dr. Eduardo Tizzano, 2 de octubre de 2003).
- * IV Jornada Médico-Informativa AME (noviembre de 2003).
- * Participación de familias españolas y ASEM en la 8ª Reunión (Científica y de familias) de FSMA (Schaumbourg, junio de 2004).
- * Participación en reunión ASEM Valencia (taller AME (noviembre 2004) .
- * V Jornada Médico-Informativa AME y 1º Simposio Internacional AME (mayo de 2005).
- * Participación de familias españolas en la 9ª Reunión (Científica y de familias) de FSMA (Philadelphia, junio de 2005).
- * Participación en reunión ASEM Galicia (taller AME (octubre 2005) .



FIGURA 8. Fotografía de MARTA ESTAPÉ y EDUARDO TIZZANO en el reportaje televisivo ENTRE LINIES que emitió TV3 el 18 y 19 de noviembre de 2002. MARTA fallecería 6 meses más tarde, a los 26 años, de una insuficiencia respiratoria.

– OBJETIVO 5. Participar con grupos de investigación internacionales en la validación de medidas de seguimiento y marcadores biológicos para aplicar en ensayos clínicos: el primero de AME que se ha realizado en España.

A partir del descubrimiento del gen de la AME en 1995, los conocimientos sobre las bases moleculares de la enfermedad han avanzado rápidamente y se anticipa que con estos avances se podrán implementar nuevas alternativas terapéuticas en los próximos años. Es evidente que faltan parámetros de seguimiento clínico de los pacientes con AME para que haya un consenso en el ámbito internacional. Por lo tanto es imprescindible que todos los parámetros de seguimiento molecular y clínico sean validados. Un ensayo terapéutico a escala autonómica inicialmente, que involucre a una parte representativa de pacientes con AME será beneficioso no solo en el estado actual de la enfermedad, sino como un elemento esquemático para prepararse y estar organizado para los avances futuros.

La participación en el EUROSMART implica el compartir la información, la misma metodología y los mismos indicadores de evolución y efectividad en un conjunto de más de 100 pacientes europeos. Existen varios fármacos que podrían utilizarse en este contexto. Sin embargo, en los medicamentos que pueden ejercer su efecto directamente sobre el gen SMN2 (por ejemplo fenilbutirato y ácido valproico, que ejercen su efecto inhibiendo las histonadeacetilasas), todavía deben realizarse estudios de toxicidad (ensayos FASE I). No está descartado que en los pacientes con AME exista una mayor sensibilidad a este tipo de fármacos. Mientras tanto nuestro grupo está realizando estudios *in vitro* en células de pacientes con distintos genotipos. Se dispone de varias líneas celulares de pacientes que se han establecido en los estudios de los últimos años. Éstas incluyen cultivos primarios de fibroblastos y linfoblastos inmortalizados con distintos genotipos (*delección/delección; delección/mutación puntual; mutación puntual /mutación puntual*). De algunos de ellos se dispone de bloques de músculo congelado y de músculo en cultivo. A todos se los está tratando con inhibidores de la histona deacetilasa como el ac. valproico, el fenilbutirato y la hidroxurea y los objetivos son observar la respuesta farmacológica de las distintas líneas celulares de estos pacientes con genotipos distintos.

Mientras estos estudios van progresando, es necesario definir la historia natural de los pacientes y validar las medidas de seguimiento de fuerza muscular y función motora. De acuerdo a la evidencia existente, la elección de l-acetil carnitina como fármaco para este proyecto debido a su probada eficacia y seguridad parece adecuada. Mas aún, la carnitina parece ejercer un efecto protector hepatotóxico (BLAHA, V.; SIMEK, J.; ZADAK, Z. *Exp Toxicol Pathol.* 1992; 44: 165-8), que podría ser aprovechado como coadyuvante de otros fármacos (por ej., Ac.valproico) potencialmente aplicables a la AME en un futuro.

La inquietud de grupos de investigación y neurólogos ha dado lugar a un consorcio europeo que aglutinó a pacientes de diferentes países (EUROSMART). De esta forma se pretende que los profesionales dispongan de medidas estandarizadas para ser aplicadas en la valoración de la efectividad

de estos ensayos. El EUROSMART es un consorcio europeo que involucra Hospitales y Universidades de 6 países para el seguimiento coordinado de un grupo de pacientes con AME.

En los pacientes que han formado parte se ha medido su fuerza muscular, se ha encuestado su calidad de vida y diagramado la historia natural de la enfermedad para que en todos ellos los parámetros utilizados de evaluación sean los mismos. En algunos grupos (incluyendo el español) se han estudiado algunos marcadores biológicos. El coordinador del proyecto ha sido el Dr. Luciano Merlini, actualmente en la Universidad de Ferrara, en Italia.

El objetivo fundamental del EUROSMART ha sido realizar un estudio colaborativo multicéntrico internacional con el fin de caracterizar a un grupo de pacientes con atrofia muscular espinal para validar métodos objetivos de medida de la fuerza muscular, funciones motoras, función pulmonar y calidad de vida a través de un ensayo clínico. El Dr. Tizzano ha sido el investigador principal en España y el proyecto se ha realizado en colaboración con el hospital San Juan de Dios de Barcelona (Dra. Febrer del Servicio de Rehabilitación y el asesoramiento del Dr. Colomer de Neuropediatría). Fue aprobado por los Comités de Ética del Hospital de Sant Pau y del Hospital San Juan de Dios y por la Agencia Española del Medicamento (EudraCT 2004-001-544-76). Obtenidos los consentimientos informados, se incorporaron al ensayo un total de 24 pacientes españoles con la forma crónica de la enfermedad (tipo II y III) y el ensayo comenzó en octubre de 2004, finalizando todos los centros en enero-febrero de 2006. En total se estudiaron 110 pacientes de los distintos países a los que se les administró l-acetil carnitina oral en un ensayo aleatorio doble ciego contrastado con placebo, durante un período de 9 meses, con controles inicial, trimestral y final de los parámetros nombrados en el objetivo fundamental. Las observaciones preliminares indican que desde el punto de vista de organización (local e internacional) y científico el ensayo ha sido un éxito. Una parte de los resultados ha sido presentada en la 10ª Reunión Internacional de las Familias SMA en junio de 2006, en Montreal y los resultados finales están en fase de análisis y se han discutido en la reunión anual de la World Muscle Society, en Brujas (Bélgica), en la primera semana de octubre de 2006 y se preparan publicaciones al respecto.

Independientemente de los resultados de la administración de carnitina, este modelo será aplicable a posibles tratamientos sintomáticos con otros fármacos o tratamientos más relacionados con la función específica del gen y la proteína SMN en el futuro. Es la primera vez que se ha realizado un ensayo clínico de AME en España y su organización ha constituido un paso previo imprescindible en el camino para hallar un tratamiento de la AME con el esfuerzo de toda la comunidad científica internacional. Asimismo se ha participado a través del European Neuromuscular Centre (ENMC) en una reunión internacional para discutir y determinar las pautas para la realización de ensayos clínicos en pacientes con AME que ha dado lugar a la siguiente publicación: "Outcome measures and treatment of spinal muscular atrophy: 134th ENMC International Workshop". BERTINI, E.; BURGHESE, A.; BUSHBY, K.; ESTOURNET, B.; FINKEL, R.; HUGHES, R.; IANNACCONE, S.; MELKI, J.; MERCURI, E.; MUNTONI, F.; VOIT, T.; REITTER, B.; SWOBODA, K.; TIZIANO, D.; TIZZANO, E.; TOPALOGU, H.; WIRTH, B.; ZERRES, K. *Neuromuscular Disorders* 15: 802-816 (2005).

5. El futuro: La atención integral del afectado y su familia y el camino hacia el tratamiento

Nuestro grupo ha aportado la idea en la reunión del grupo europeo de AME en marzo de 2003 de la creación de Centros de Excelencia para el tratamiento integral del paciente y sus familiares. Estos Centros serían referencia de distintos centros satélites distribuidos a lo largo del territorio español, que seguirán criterios de atención y rehabilitación similares. De esta manera se aseguraría a todos o casi todos los pacientes el mismo tipo de atención integral.

La AME es una enfermedad devastadora y los pacientes tienen un rendimiento intelectual por encima del término medio. Tenemos ejemplos claros en nuestros pacientes afectados de AME tipo III: José Antonio Fortuny, de Menorca, autor del libro *Diálogos con Axel* (ediciones La Tempestad, 2003), un relato muy logrado y meritorio de lo que es enfrentar y vivir la AME. De Pedro Lamana Val, de Zaragoza, pintor de cuadros al óleo dignos de un artista consumado, y el caso de Marta Estapé, bióloga que colaboró con nuestro grupo hasta su fallecimiento por insuficiencia respiratoria en mayo de 2003. Esto indica claramente que es necesario actuar con lo que tengamos ahora o cuanto antes y que no sea tarde para ese millar de pacientes que existen afectados en todo el territorio español. Podemos realizar investigaciones sofisticadas de aplicación en varios años, pero no debemos olvidar a aquellos que por la evolución de la enfermedad no podrán alcanzar el tren de los tratamientos paliativos o curativos.

La atención a los familiares tampoco puede dejarse de lado. La información de los alcances y las limitaciones del proceso en el proceso diagnóstico así como la detección de portadores y el adecuado asesoramiento genético son pilares fundamentales de la atención integral. El registro de pacientes y el conocer sus centros de seguimiento harán posible poder aplicar los criterios de rehabilitación, fisioterapia y quirúrgicos a la mayoría de ellos.

El objetivo final es que cada caso nuevo de AME pueda ser diagnosticado, informado y seguido correctamente y contribuir a que tenga la mejor calidad de vida posible de acuerdo con sus posibilidades. Existen algunos medicamentos o compuestos farmacéuticos que, a pesar de no curar la enfermedad, podrían aliviar parte de las manifestaciones clínicas mejorando la calidad de vida, aunque esto debe probarse específicamente en la AME con ensayos clínicos controlados de los que el EUROSMART es un buen ejemplo. Es posible que ninguno de ellos por sí solo sea efectivo. Debemos mentalizarnos de que si existiera algún tratamiento establecido en el futuro, éste seguramente deberá ser combinado, gracias al efecto complementario o aditivo de diferentes compuestos (*Figura 3*). Mientras tanto, la validación de medidas de fuerza muscular, función motora, función respiratoria, marcadores biológicos y calidad de vida permitirán definir la eficacia de protocolos de tratamiento. Después de más de una década de trabajo, nuestros esfuerzos siguen encaminados en esta dirección.

6. Bibliografía

- AKLI, S.; CAILLAUD, C.; VIGNE, E.; STRATFORD, P.L.; POENARU, L.; PERRICAUDET, M.; KAHN, A.; PESCHANSKI, M.R. 1993. "Transfer of a foreign gene into the brain using adenovirus vectors". *Nat Genet* 3: 224-228.
- ANDREASSI, C.; ANGELOZZI, C.; TIZIANO, F.D.; VITALI, T.; VINCENZI, E.; BONINSEGNA, A.; VILLANOVA, M.; BERTINI, E.; PINI, A.; NERI, G., AND BRAHE, C. 2004. "Phenylbutyrate increases SMN expression *in vitro*: relevance for treatment of spinal muscular atrophy". *European Journal of Human Genetics* 12, 59-65.
- ANDREASSI, C.; JARECKI, J.; ZHOU, J.; COOVERT, D.D.; MONANI, U.; CHEN, X.; WHITNEY, M.; POLLOK, B.; ZHANG, M.; ANDROPHY, E.; BURGHESE, AHM. 2001. "Aclarubicin treatment restores SMN levels to cells derived from type I spinal muscular atrophy patients". *Hum Mol Genet* 10:2841-2849.
- AZZOUZ, M.; HOTTINGER, A.; PATERNA, J.C.; ZURN, A.D.; AEBISCHER, P.; BUELER, H. 2000. "Increased motoneuron survival and improved neuromuscular function in transgenic ALS mice after intraspinal injection of an adeno-associated virus encoding Bcl-2". *Hum Mol Genet* 9:803-811.
- BARON-DELAGE, S.; ABADIE, A.; ECHANIZ-LAGUNA, A.; MELKI, J.; BERETTA, L. 2000. "Interferons and IRF-1 induce expression of the survival motor neuron(SMN) genes". *Mol Med* 6:957-968.
- BLEDSE, AW.; JACKSON, CA.; MCPHERSON, S.; MORROW, CD. 2000. "Cytokine production in motor neurons by poliovirus replicon vector gene delivery". *Nat Biotechnol* 18:964-969.
- BREMER, J. 1983. "Carnitine-metabolism and function". *Physiol Rev* 63: 1420-1480.
- BRICHTA, L.; HOFMANN, Y.; HAHNEN, E.; SIEBZEHRUBL, FA.; RASCHKE, H.; BLUMCKE, I.; EYUPOGLU, IY AND WIRTH, B. 2003. "Valproic acid increases the SMN2 protein level: a well-known drug as a potential therapy for spinal muscular atrophy". *Hum Mol Genet* 12:2481-2489.
- BROMBERG, M., AND SWOBODA, K. 2002. "Motor unit number estimation in infants and children with spinal muscular atrophy". *Muscle Nerve* 25:445-447.
- BURGHESE, AHM. 1997. "When is a deletion not a deletion? When it is converted". *Am J Hum Genet* 61:9.
- BÜRGLIN, L.; LEFEBVRE, S.; CLERMONT, O.; BULRLET, P.; VIOLLET, L.; CRUAUD, C.; MUNNICH, A.; MELKI, J. 1996. "Structure and organization of the human survival motor neurone (SMN) gene". *Genomics* 32:479-482.
- BUSSAGLIA, E.; CLERMONT, O.; TIZZANO, E.; LEFEBVRE, S.; BURGLEN, L.; CRUAUD, C.; URTIZBEREA, JA.; COLLOMER, J.; MUNNICH, A.; BAIGET, M.; MELKI, J. 1995. "A frame-shift deletion in the survival motor neuron gene in Spanish spinal muscular atrophy patients". *Nat Genet* 11:335-337.

- BUSSAGLIA, E.; TIZZANO, EF; ILLA, I.; CERVERA, C.; BAIGET, M. 1997. "Cramps and minimal EMG abnormalities as preclinical manifestations of spinal muscular atrophy patients with homozygous deletions of the SMN gene". *Neurology* 48:1443-1445.
- CARTEGNI, L.; KRAINER, AR. 2002. "Disruption of an SF2/ASF-dependent exonic splicing enhancer in SMN2 causes spinal muscular atrophy in the absence of SMN". *Nat Genet* 30: 377-384.
- CHANG, J.G.; HSIEH-LI, H.M.; JONG, YJ.; WANG, N.M.; TSAI, C.H.; LI, HUNG. 2001. "Treatment of spinal muscular atrophy by sodium butyrate". *Proc Natl Acad Sci USA* 98:9808-9813.
- CHANG, J.G.; TSAI, F.J.; WANG, W.Y.; JONG, Y.J. 2002. "Treatment of spinal muscular atrophy by hidroxyurea". *Am.J.Hum.Genet*, suppl.October 580.
- COOVERT, D.D.; LE, T.T.; McANDREWS, P.E.; STRASSWIMMER, J.; CRAWFORD, T.O.; MENDELL, J.R.; COULSON, S.E.; ANDROPHY, E.J.; PRIOR, T.W.; BURGHESE, A.H.M. 1997. "The survival motor neuron protein in spinal muscular atrophy". *Hum Mol Genet* 6:1205-1214.
- CRAWFORD, T., AND PARDO, M. 1996. "The neurobiology of childhood spinal muscular atrophy". *Neurobiol Dis* 3: 97-110.
- CUSCO, I.; BARCELO, M.J.; DEL RIO, E.; MARTIN, Y.; HERNANDEZ-CHICO, C.; BUSSAGLIA, E.; BAIGET, M.; TIZZANO, E.F. 2001. "Characterisation of SMN hybrid genes in Spanish SMA patients: de novo, homozygous and compound heterozygous cases". *Hum Genet*. 108:222-229.
- CUSCÓ, I.; BARCELÓ M.J.; BAIGET, M.; TIZZANO, EF. 2002a. "Implementation of SMA carrier testing in genetic laboratories: comparison of two methods for quantifying the SMN1 gene". *Hum Mutation* 20:452-459.
- CUSCÓ, I.; BARCELÓ, M.J.; SOLER, C.; PARRA, J.; BAIGET, M.; TIZZANO, E.F. 2002 b. "Prenatal diagnosis for risk of spinal muscular atrophy". *British Journal of Obstetrics and Gynecology* 109: 1244-1249.
- CUSCÓ, I.; LÓPEZ, E.; SOLER, C.; BAIGET, M.; TIZZANO, E.F. 2003. "A genetic and phenotypic analysis in Spanish spinal muscular atrophy patients with C.399_402del AGAG, the most frequently found subtle mutation in the SMN1 gene". *Hum Mutation* 22:136-143.
- CUSCÓ, I.; BARCELÓ, M.J.; ROJAS-GARCÍA, R.; ILLA, I.; CERVERA, C.; GÁMEZ, J.; POU, A.; IZQUIERDO G.; BAIGET M.; TIZZANO E.F. 2006. "SMN2 copy number predicts acute or chronic SMA but does not account for intrafamilial variability in sibilings". *Journal of Neurology* 253:21-25.
- DiDONATO, C.J.; PARKS, R.J.; KOTHARY, R. 2003. "Development of a gene therapy strategy for restoration of survival motor neuron protein expression: implications for spinal muscular atrophy therapy". *Hum Gene Ther* 14:179-88.
- DUPONT-VERSTEEGDEN, E.E.; KATZ, M.S.; McCARTER, R.J. 1995. "Beneficial versus adverse effects of long-term use of Clenbuterol in mdx mice". *Muscle and Nerve* 18: 1447-1459.
- ECHÁNIZ-LAGUNA, A.; MINIQU, P.; BARTHOLDI, D.; MELKI, J. 1999. "The promoters of the survival motor neuron gene (SMN) and its copy (SMNc) share common regulatory elements". *Am J Hum Genet* 64:1365-1370.
- FAN, L.; SIMARD L.R. 2002. "Survival motor neuron (SMN) protein: role in neurite outgrowth and neu-

- romuscular maturation during neuronal differentiation and development". *Hum Mol Genet* 11:1.605-1.614.
- FELDKÖTTER, M.; SCHWARZER, V.; WIRTH, R.; WIENKER, TF.; WIRTH, B. 2002. "Quantitative Analyses of SMN1 and SMN2 Based on Real-Time LightCycler PCR: Fast and Highly Reliable carrier testing and Prediction of severity of Spinal Muscular Atrophy". *Am J Hum Genet* 70:358-368.
- FIDZIANSKA AND RAFALOWSKA. 2002. "Motoneuron death in normal and spinal muscular atrophy-affected human fetuses". *Acta Neuropathol* 104:363-8
- FRANCIS, J.W.; SANDROCK, A.W.; BHIDE, P.G.; VONSATTEL, J.P.; BROWN, R.H JR. 1998. "Heterogeneity of subcellular localization and electrophoretic mobility of survival motor neuron (SMN) protein in mammalian neural cells and tissues". *Proc Natl Acad Sci USA* 95:6492-6497.
- HADDAD, H., MD; CIFUENTES-DIAZ, C., PHD; MIROGLIO, A., MSC; ROBLLOT, N.A; JOSHI,V, MSC, AND MELKI, J., MD, PHD. 2003. "Riluzole attenuates spinal muscular atrophy disease progression in a mouse model". *Muscle Nerve* 28: 432-437,.
- HOFMANN, Y.; LORSOM, C.L.; STAMM, S.; ANDROPHY, E.J.; WIRTH, B. 2000. "Htra2- β 1 stimulates an exonic splicing enhancer and can restore full-length SMN expression to survival motor neuron 2 (SMN2)". *Proc Natl Acad Sci USA* 97:9618-9623.
- HOFMANN, Y.; WIRTH, B. 2002. "HnRNP-G promotes exon 7 inclusion of survival motor neuron (SMN) via direct interaction with Htra2- β 1". *Hum Mol Genet* 11:2037-2049.
- HOTTINGER, A.F.; AZZOUZ, M.; DEGLON, N.; AEBISCHER, P.; ZURN, AD. 2000. "Complete and long-term rescue of lesioned adult motoneurons by lentiviral-mediated expression of glial cell line-derived neurotrophic factor in the facial nucleus". *J. Neurosci* 20:5587-5593.
- IANNACONE, S.T., MD; HYNAN, L., S., PHD. 2003. "And the American Spinal Muscular Atrophy Randomized Trials (AmSMART) Group". *Arch Neurol.* 60: 1.130-1.136.
- KASHIMA, T.; MANLEY, J. 2003. "A negative element in SMN2 exon 7 inhibits splicing in spinal muscular atrophy". *Nat Genet* 34: 460-463.
- KEIR, S.D.; MITCHELL, W.J.; FELDMAN, L.T.; MARTIN, J.R. 1995. "Targeting and gene expression in spinal cord motor neurons following intramuscular inoculation of an HSV-1 vector". *J. Neurovirol* 1:259-267.
- KERR, D.A.; NERY, J.P.; TRAYSTMAN, R.J.; CHAU, N.; HARDWICK, J.M. 2000. "Survival motor neuron protein modulates neuron-specific apoptosis". *Proc Natl Acad Sci USA* 97:13312-13317.
- KINALI, M., MD; MERCURI, E., MD; MAIN, M., MA; BIASIA, F. DE., MD; KARATZA, A., MD; HIGGINS, R., BSc, SRR; BANKS, LM, DCR, SRR; MANZUR, A., MD, AND MUNTONI, F., MD. 2002. "Pilot trial of albuterol in spinal muscular atrophy". *Neurology* 59:609-610.
- KISSEL, J.T.; MCDERMOTT, M.P.; NATARAJAN, R., ET AL. 1998. "Pilot trial of albuterol in facioscapulohumeral muscular dystrophy". *Neurology* 50: 1402-1406.
- LA BELLA, V.; KALLENBACH, S.; PETTMANN, B. 2000. "Expression and subcellular localization of two isoforms of the survival motor neuron protein in different cell types". *J. Neuroscience Research* 62:346-356.

- LEFEBVRE, S.; BURGLIN, L.; REBOULLET, S.; CLERMONT, O.; BURLET, P.; VIOLLET, L.; BENICHOU, B.; CRUAUD, C.; MILLASSEAU, P.; ZEVIANI, M.; LE PASLIER, D.; FREZAL, J.; COHEN, D.; WEISSENBACH, J.; MUNNICH, A.; MELKI, J. 1995. "Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene". *Cell* 80:155-165.
- LEFEBVRE, S.; BURLET, P.; LIU, Q.; BERTRANDY, S.; CLERMONT, O.; MUNNICH, A.; DREYFUSS, G.; MELKI, J. 1997. "Correlation between severity and SMN protein level in spinal muscular atrophy". *Nat Genet* 16:265-269.
- LESBORDES, J.C.; CIFUENTES-DIAZ, C.; MIROGLIO, A.; JOSHI, V.; BORDET, T.; KAHN, A.; MELKI, J. 2003. "Therapeutic benefits of cardiostrophin-I gene transfer in a mouse model of spinal muscular atrophy". *Hum Mol Genet* 12:1.233-1.239.
- LIU, Q.; DREYFUSS, G. 1996. "A novel nuclear structure containing the survival of motor neurons protein". *EMBO* 14: 3.555-3.565.
- LORSON, C.L.; ANDROPHY E.J. 2000. "An exonic enhancer is required for inclusion of an essential exon in SMA-determining gene SMN". *Hum Mol Genet* 9: 259-265.
- MARTÍN, Y.; VALERO, A.; DEL CASTILLO, E.; PASCUAL, S.; HERNÁNDEZ-CHICO, C. 2002. "Genetic study of SMA patients without homozygous SMN1 deletions: identification of compound heterozygous and characterisation of novel intragenic SMN1 mutations". *Hum Genet* 110: 257-263.
- MERLINI, L.; MD; SOLARI, A., MD; VITA, G., MD; BERTINI, E., MD; MINETTI, C., MD; MONGINI, T., MD; MAZZONI, E., PHD; ANGELINI, C., MD; MORANDI, L., MD. 2003. "Role of gabapentin in spinal muscular atrophy results of a multicenter, randomized italian study". *J. Child Neurol* 18: 537-541.
- MILLER, S.A.; DYKES, DD.; POLESKY, H. 1989. "A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells". *Nucleic Acids Res* 16: 1.215.
- MONANI, U.; LORSON, C.L.; PARSONS, D.W.; PRIOR, T.W.; ANDROPHY, E.J.; BURGHESE, A.H.; MCPHERSON, J.D. 1999. "A Single nucleotide difference that alters splicing patterns distinguishes the SMA gene SMN1 from the copy gene SMN2". *Hum Mol Genet* 8:1.177-1.183.
- OTTER, S.; GRIMMLER, M.; NEUENKIRCHEN, N.; CHARI, A.; SICKMANN, A.; FISCHER, U. 2006. "A comprehensive interaction map of the human SMN-complex". *J. Biol Chem*.
- PAUSHKIN, S.; GUBITZ, A.; MASSENET, S.; DREYFUSS, G. 2002. "The SMN complex, an assemblyosome of ribonucleoproteins". *Curr Opin Cell Biol* 14: 305-312.
- PEARN, J. 1980. "Classification of spinal muscular atrophies". *Lancet* 1: 919-922.
- ROJAS, R.; TIZZANO, E.; CUSCÓ, I.; GALLARDO, E.; BARCELÓ, M.J.; DE ANDRÉS, I.; LARRODÉ, P.; MARTÍ-MASSÓ, F.J.; MARTÍNEZ-MATOS, J.A.; POVEDANO, M.; RALLO, B.; SERRANO, S.; BAIGET, M.; ILLA, I. 2002. "The absence of the SMN2 gene may play a role in multifocal motor neuropathy". *Neurology* 59: 1.112-1.113.
- ROSSOLL, W.; KRÖNING, A.; OHNDORF, U.; STEEGBORN, C.; JABLONKA, S.; SENDTNER, M. 2002. "Specific interaction of Smn, the spinal muscular atrophy determining gene product, with hnRNP-R and gry-rbp/hnRNP-Q: a role for Smn in RNA processing in motor axons?" *Hum Mol Genet* 11: 93-105.
- RUSSMAN, B.M.S., MD; IANACCONE, S.T., MD; SAMAHA, F.J., MD. 2003. "A phase I trial of riluzole in spinal muscular atrophy". *Arch Neurol* 60:1.601-1.603.

- SIGNORILE, J.F.; BANOVA, K.; GÓMEZ M., ET AL. 1995. "Increased muscle strength in paralyzed patients after spinal cord injury: Effect of beta-2 adrenergic agonist". *Arch Phys Med Rehabil* 76: 55-58.
- SOLER-BOTIJA, C.; FERRER, I.; GICH, I.; BAIGET, M.; TIZZANO, E.F. 2002. "Neuronal death is enhanced and begins during fetal development in type I spinal muscular atrophy spinal cord". *Brain* 125:1.624-1.634.
- SOLER-BOTIJA, C.; FERRER, I.; ALVAREZ, J.L.; BAIGET, M.; TIZZANO, E.F. 2003. "Down-regulation of bcl-2 proteins in type I SMA motor neurons during fetal development". *J. Neuropathol Exp Neurol* 62: 420-426.
- SOLER-BOTIJA, C.; CUSCÓ, I.; LÓPEZ, E.; CLÚA, A.; GICH, I.; BAIGET, M.; FERRER, I.; TIZZANO, E.F. 2005. "Choline acetyltransferase expression does not identify early pathogenic events in fetal SMA spinal cord". *Neuromusc Disord* 15: 253-258.
- SOLER-BOTIJA, C.; CUSCÓ, I.; CASELLES, L.; LÓPEZ, E.; BAIGET, M.; TIZZANO, E.F. 2005. "Implication of fetal SMN2 expression in type I SMA pathogenesis: protection or pathological gain of function?". *Neuropathol Exp Neurol* 64: 215-223.
- SUMMER CHARLOTTE, J., MD; HUYNH THANH, N., BS.; MARKOWITZ, A. J., BS; PERHAC, J. S., BA; HILL, B., BS; COOVERT, D. D., PHD; SCHUSSLER, K., BS; CHEN, X.N, MS; JARECKI, J., PHD; BURGHEES, A., HM., PHD; TAYLOR, J.P, MD; PHD, AND FISCHBECK, K. H. FISCHBECK, MD. 2003. "Valproic Acid Increases SMN Levels in Spinal Muscular Atrophy Patient Cells". *Ann Neurol* 54: 647-654.
- TARNOPOLSKY, M,A.; FLINT BEAL, M. 2001. "Potential for creatine and other therapies targeting cellular energy dysfunction in neurological disorders". *Ann Neurol* 49: 561-574.
- TAYLOR, J.E.; THOMAS, N.H.; LEWIS, C.M.; ABBS, S.J.; RODRIGUES, N.R.; DAVIES, K.E.; MATHEW, C.G. 1998. "Correlation of SMNt and SMNc gene copy number with age of onset and survival in spinal muscular atrophy". *Eur J Hum Genet* 6: 467-474.
- TEIN, I.; SLOANE, A.E.; DONNER, E.J., ET AL. 1995. "Fatty acid oxidation abnormalities in childhood-onset spinal muscular atrophy: Primary or secondary defect(s)?" *Pediatr Neurol* 12: 21-30.
- TIZZANO, E.F.; CABOT, C.; BAIGET, M. 1998. "Cell-specific survival motor neuron gene expression during human development of the central nervous system: implications for the pathogenesis of spinal muscular atrophy". *Am J. Pathol* 153: 355-61.
- VELASCO, E.; VALERO, C.; VALERO, A.; MORENO, F.; HERNANDEZ-CHICO, C. 1996. "Molecular analysis of the SMN and NAIP genes in Spanish spinal muscular atrophy (SMA) families and correlation between number of copies of cBCD54I and SMA phenotype". *Hum Mol Genet* 5: 257-263.
- WINTER, S.C.; VANCE, H.; ZORN, E.M., ET AL. 1992. "Carnitine deficiency in pediatrics: Experience at Valley's Children's Hospital, Fresno, Cal., in: L-carnitine and its Role in Medicine: From Function to Therapy". *London, Ac. Press*, pp 237-263.
- WIRTH, B.; SCHMIDT, T.; HAHNEN, E.; RUDNIK-SCHÖNEBORN, S.; KRAWCZAK, M.; MÜLLER-MYHSOK, B.; SCÖNLING, J.; ZERRES, K. 1997. "De novo rearrangements found in 2% of index patients with spinal muscular atrophy: Mutational mechanisms, Parental Origin, Mutation rate, and implications for genetic counseling". *Am J Hum Genet* 61: 1102-1111.

WIRTH, B. 2000. "An update of the mutation spectrum of the survival motor neuron gene (SMN1) in autosomal recessive spinal muscular atrophy". *Hum Mutat* 15: 228-237.

ZHANG, M.L.; LORSON, C.L.; ANDROPHY, E.J.; ZHOU, J. 2001. "An in vivo reporter system for measuring increased inclusion of exon 7 in SMN2 mRNA: potential therapy of SMA". *Gene Ther* 8:1532-1538.



MINISTERIO
DE TRABAJO
Y ASUNTOS SOCIALES

REAL PATRONATO
SOBRE DISCAPACIDAD

