



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DELL'INSUBRIA

DIPARTIMENTO DI MEDICINA E CHIRURGIA

Dottorato di Ricerca in

MEDICINA CLINICA E SPERIMENTALE E MEDICAL HUMANITIES

XXXII ciclo

**Atrofia Muscolare Spinale:
presentazione clinica, quadri radiologici,
nuovi trattamenti e biomarcatori**

Relatore

Prof. Marco Cosentino

Correlatore

Prof. Maurizio Versino

Tesi di dottorato di

Megi Meneri

Matricola n 701145

ANNO ACCADEMICO 2018-2019

INDICE

1. INTRODUZIONE.....	4
1.1 EPIDEMIOLOGIA	5
1.2 GENETICA E PATOGENESI	6
1.2.1 <i>Gene SMN</i>	6
1.2.2 <i>Proteina SMN</i>	13
1.2.3 <i>Patogenesi</i>	17
1.3 CLASSIFICAZIONE CLINICA E STORIA NATURALE	21
1.3.1. <i>Modificatori del fenotipo</i>	27
1.4 DIAGNOSI	29
1.5 SCALE DI VALUTAZIONE MOTORIA.....	32
1.6 BIOMARCATORI.....	36
1.6.1 <i>Elettromiografia</i>	36
1.6.2. <i>Imaging</i>	38
1.6.3 <i>Neurofilamenti</i>	40
1.7 STANDARD DI CURA.....	42
2. TERAPIA	45
2.1 FARMACI RIPROPOSTI.....	45
2.2 FARMACI NON SMN -TARGET	47
2.3 FARMACI SMN-TARGET	48
3. SCOPO DELLO STUDIO	55
4 MATERIALI E METODI.....	57
4.1 I PARTE – STUDIO DELLA SICUREZZA E DELL’EFFICACIA DI NUSINERSEN	57
4.2 II PARTE DI STUDIO - NEUROFILAMENTI POTENZIALI BIOMARCATORI	63
5. ANALISI STATISTICA	65
6. RISULTATI.....	66
6.1 I PARTE – STUDIO DELLA SICUREZZA E DELL’EFFICACIA DI NUSINERSEN	66

6.2 II PARTE DELLO STUDIO- NEUROFILAMENTI POTENZIALI BIOMARCATORI.....	82
7. DISCUSSIONE.....	89
8. BIBLIOGRAFIA.....	97
9 APPENDICE.....	110

1. INTRODUZIONE

L'Atrofia Muscolare Spinale (SMA) è una malattia neurodegenerativa relativamente frequente nonché la prima causa di morte per malattia genetica nell'infanzia.

La forma più comune di atrofia muscolare spinale è la SMA I, che è un disturbo autosomico recessivo causato dalla mutazione del gene SMN (SMA5q, OMIM 253300). Le mutazioni nel gene SMN 1 (Survival Motor Neuron 1: esone 7 e 8) portano alla deplezione della proteina SMN; questo fenomeno determina una progressiva degenerazione dei motoneuroni e comporta un quadro clinico caratterizzato da debolezza muscolare e atrofia.

In assenza di trattamenti in grado di modificare la storia naturale della malattia, la patologia si caratterizza da un peggioramento progressivo delle performance motorie con progressiva paralisi ai quattro arti che rende nel tempo il paziente dipendente nelle attività della vita quotidiana.

La compromissione muscolare comprende anche i muscoli respiratori comportando la comparsa di insufficienza respiratoria di vario grado, talvolta portando alla necessità di ventilazione assistita.

Negli ultimi anni, sono stati compiuti progressi significativi nella ricerca e nella proposta di nuove strategie terapeutiche per la SMA. Circa due anni fa il Nusinersen, un oligonucleotide antisense che modifica la trascrizione SMN2, è stato approvato da EMA / FDA , cambiando la storia naturale della patologia . I risultati degli studi clinici hanno mostrato un'ottima risposta clinica dopo la

somministrazione di Nusinersen in pazienti con SMA I portando a un'approvazione precoce del farmaco, mentre esistono pochi recenti studi su SMA III che hanno fornito risultati meno sorprendenti, sebbene incoraggianti

Considerando gli scarsi dati disponibili sull'efficacia di Nusinersen in questa popolazione e l'alto costo di questo farmaco somministrato per via intratecale, sono necessari biomarcatori affidabili di risposta precoce al trattamento per identificare i pazienti che potrebbero trarre beneficio dal trattamento.

1.1 EPIDEMIOLOGIA

La SMA è la principale causa di morte su base genetica in età infantile causata da insufficienza respiratoria. Ha un'incidenza di circa 1 su 11.000 nati vivi (Farrar et al., 2017). La frequenza di portatori di patologia è di circa 1:47 (caucasici) - 72 (afroamericani), ma varia leggermente a seconda dell'etnia gruppo. L'incidenza della malattia è probabilmente molto più bassa di quella attesa dalla frequenza dei portatori del gene a causa dell'elevata mortalità del tipo SMA 0. La SMA II rappresenta oltre la metà (52%) di tutti i pazienti affetti da SMA, la SMA III il 36% e solo il 12% dei pazienti con SMA viventi è affetto da SMA I (SMA Foundation). Ad oggi non esiste un registro mondiale di SMA geneticamente confermata, ma Verhaart et al. Hanno riferito che in un periodo di osservazione di 5 anni (2011-2015) a 4653 persone è stata diagnosticata la SMA in Europa (Verhaart et al., 2017a).

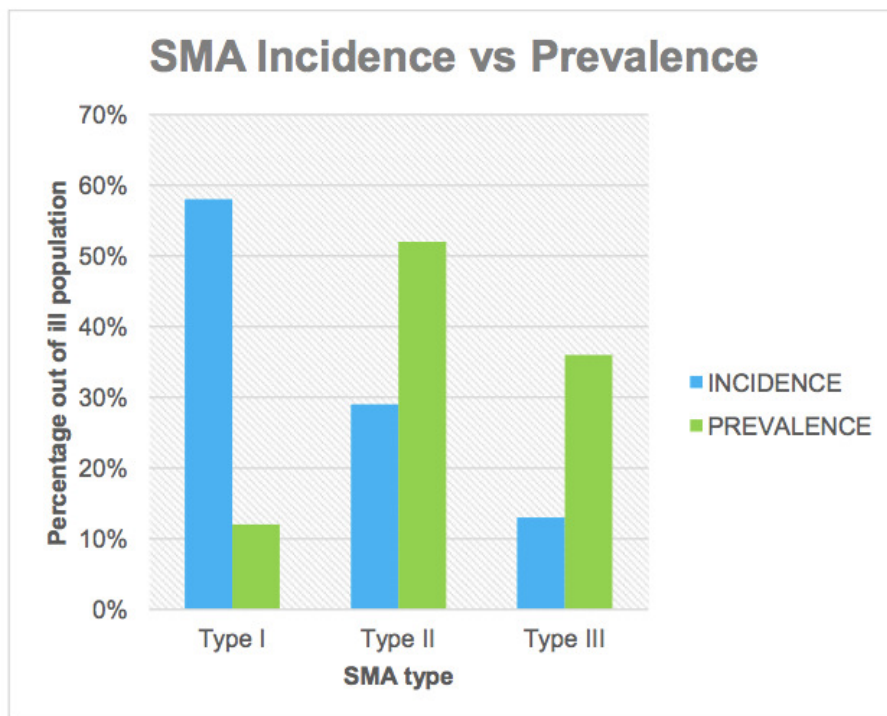


Fig 1 .SMA incidenza e prevalenza negli Stati Uniti

Confronto tra incidenza della malattia e prevalenza: la prevalenza di tipo I è bassa a causa della sua elevata mortalità. Tipo II e III hanno una prevalenza elevata e cumulativa. Dati forniti da SMA Foundatio

1.2 GENETICA E PATOGENESI

1.2.1 GENE SMN

Circa un secolo dopo le prime descrizioni cliniche della malattia nel 1990 fu identificato, grazie a studi di linkage, il locus del gene causativo della SMA, localizzato a livello di una complessa

regione del cromosoma 5q (5q11.2-13.2) (Brzustowicz et al., 1990; Wang et al., 1995; Clermont et al., 1994). Solo nel 1995 il gene denominato SMN (Survival Motor Neuron), che mappa in tale regione, venne identificato come gene responsabile della malattia (Lefebvre et al., 1995, Monani et al., 2005 review, Wirth et al., 2006 review). Il gene SMN è lungo 20 kb e comprende nove esoni (esoni 1, 2a, 2b, 3-8) e otto introni e si trova sul cromosoma 5 in un complessa regione (5q13.2) altamente instabile. Essa è costituita da due grandi frammenti genomici invertiti (duplicazione invertita) che contengono sequenze ripetitive multicopy, sequenze tipo retrotrasposoni, pseudogeni e geni, tutti presenti in due copie: un telomerico e un SMN1 attivo e un centromerico quasi inattivo SMN2. Per tale motivo può essere soggetta a riarrangiamenti intracromosomici che includono la duplicazione genica, la conversione genica e le delezioni de novo (Lorson et al., 1998, Cifuentes-Diaz et al., 2001).

SMN1 e SMN2 differiscono di soli 5 nucleotidi tutti collocati nella regione 3' del gene: uno nell'introne 6, uno nell'esone 7, due nell'introne 7 e uno nell'esone 8 (Monani et al. 1999). Solo le alterazioni nella copia telomerica del gene sono responsabili dello sviluppo della malattia (Lorson et al. 1998, Kleyn et al. 1993, Melky et al. 1994). La differenza sostanziale è la sostituzione C-T in posizione +6 dell'esone 7 (c.840C>T) nel gene SMN2 è rilevante dal punto di vista funzionale (Burglen L. et al., 2006). Infatti nonostante sia una mutazione silente che non altera la sequenza aminoacidica della proteina tradotta, è localizzata a livello di uno splicing enhancer esonico e determina dunque spesso uno splicing alternativo del pre-mRNA di SMN2, che taglia l'esone 7; codificando in ultima analisi una proteina instabile che è rapidamente degradata. Il 90-95% della proteina tradotta da SMN2 è quindi più corta e instabile in vivo, mentre solo il 5-10% codifica per una proteina funzionale a lunghezza intera (FL) (Burnett et al., 2009). Il gruppo di Bowerman (Bowerman et al., 2012a) ha suggerito la necessità di valore inferiore al 15% di SMN per sviluppare il solito fenotipo SMA nel topo.

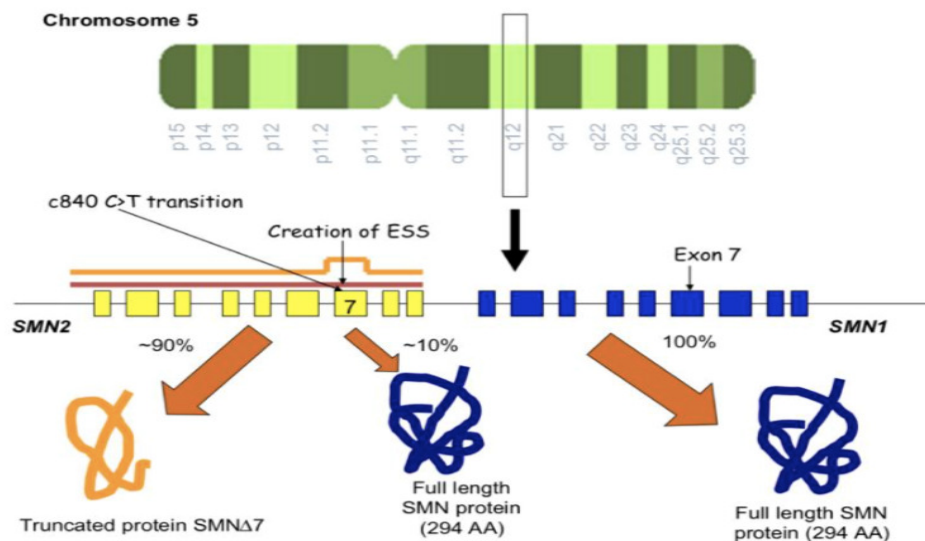


Fig 2 Regione SMN braccio corto cromosoma 5

*Questa immagine mostra il gene SMN1 e SMN2 ed i corrispondenti prodotti proteici. La proteina stabile in blu e quella instabile in arancione. Spinal muscular atrophies. *Pediatr Clin N Am.* 2015;62:743–766*

La presenza del gene SMN2 è esclusiva delle specie umane (Rochette et al. 2001). Entrambe le copie SMN sono trascritte in diversi tessuti umani (cervello, midollo spinale, cuore, muscolo, fegato, rene, polmone e pancreas) (Lefebvre et al. 1995), ma il prodotto proteico è stato trovato principalmente nei MN spinali (Coovert et al. 1997). La quantità della proteina è ridotta nel tessuto del paziente in base alla gravità del fenotipo.

Il numero di copie di SMN2 è correlato al fenotipo SMA; Maggiore è il numero di copie SMN2 di un paziente, maggiore è la presenza della proteina SMN2 a lunghezza intera e di conseguenza più lieve è il fenotipo (Lefebvre et al. 1995, Burghes et al. 1997).

Sia SMN1 che SMN2, attraverso lo splicing alternativo, possono produrre diverse isoforme proteiche: SMN 5, SMN7 e SMN5,7 che mancano rispettivamente di esoni 5, 7 o entrambi (Gennarelli et al. 1995).

Le mutazioni di SMN presentano caratteristiche specifiche nelle varie forme di SMA. Il 95% dei pazienti affetti da SMA I-III con mutazione di 5q-13 presenta l'assenza in omozigosi dell'esone 7 ed 8 o solo dell'esone 7 di SMN1, a causa di delezioni del gene SMN1 o di conversione genica di SMN1 in SMN2. Di questi, nel 90% dei casi è riscontrabile l'assenza di entrambi gli esoni 7 ed 8, mentre solo nel 10% esclusivamente dell'esone 7. La base molecolare di quest'ultimo fenomeno è da ricondurre alla conversione genica, un meccanismo di mutazione comune nella regione SMA che causa la conversione di SMN1 in SMN2 o viceversa. L'assenza in omozigosi di SMN1 è invece presente solo raramente nei pazienti con SMA IV (Brahe C. et al., 1995).

Il restante 5% dei pazienti SMA con mutazione di 5q13 presenta mutazioni intrageniche di SMN1; tipicamente questi pazienti sono eterozigoti con una delezione su un cromosoma e una mutazione subdola sull'altro cromosoma.

Le mutazioni puntiformi identificate fino ad oggi sono circa 40: sono soprattutto mutazioni missenso che alterano la funzionalità della proteina SMN1, ma vi sono anche mutazioni nonsense e frameshift (Wirth B et al., 2000).

Comunque nei pazienti SMA è sempre presente almeno una copia del gene SMN2. L'assenza in omozigosi di SMN2, un genotipo trovato nel 5-10% dei controlli, sembra non avere conseguenze cliniche mentre la presenza di almeno un gene SMN1 funzionante è sufficiente a proteggere dalla SMA. I portatori di mutazione genica in eterozigosi non mostrano alcun tipo di deficit clinico, sebbene è stato riportato un minimo aumento del rischio di sclerosi laterale amiotrofica (SLA) (Butchbach, 2016). La perdita omozigote di SMN1 e SMN2 non è mai stata segnalata (2017).

Data la natura instabile del genoma che contiene il gene SMN, i pazienti possono avere un numero variabile di copie di SMN2 (in genere tra 1 e 4), che è ciò che maggiormente influenza il fenotipo clinico. Poiché ogni SMN2 produce circa 10% di trascritti FL, un aumentato numero di geni SMN2 è di grande beneficio per i pazienti in quanto si traduce in una maggiore espressione di proteina SMN-FL, che può andare dal 10 al 50%, quantità sufficiente per lo sviluppo neuronale ma non per la sopravvivenza dei motoneuroni nel midollo spinale (Lunn and Wang, 2008).

I pazienti SMA tipo I sono omozigoti per la delezione di SMN1 ed hanno una o due copie di SMN2, producendo così circa 10-20% del trascritto FL. I pazienti con SMA tipo II hanno tre geni SMN2 funzionanti, mentre i pazienti con SMA tipo IIIa presentano quattro copie di SMN2 e producono quindi circa 40% di trascritto FL (Feldkotter et al., 2002).

Altri possibili mutazioni genetiche segnalate riguardano altri geni (4%, SMA non 5q) come Coiled-Coil-Helix- Coiled-Coil-Helix Domain Contenente 10 (CHCHD10), Coiled-Coil-Helix- Coiled-Coil-Helix Domain Containing 10 (CHCHD10), Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily V Member 4 (TRPV4), Dynein Cytoplasmic 1 Heavy Chain 1 (DYNC1H1) and BICD2 (Wirth et al., 1999)

1.2.1.1 SPLICING ALTERNATIVO

Diverse teorie sono state postulate per cercare di giustificare lo splicing alternativo dell'esone 7 nel gene SMN2 di cui le principali si basano sulla perdita di un enhancer o la creazione di un silencer.

Lo splicing è regolato dalla concentrazione di proteine spliceosomiche e non spliceosomali, proteine ricche di serina-arginina (proteine SR), proteine simili a SR e ribonucleoproteine eterogenee (hnRNPs). Alcune di queste proteine si legano a sequenze pre-mRNA chiamate esoni splicing enhancer (ESEs), intronic splicing enhancer (ISEs), exonic splicing silencer (ESSs) e intronic splicing silencer (ISSs).

Nel 2002, Cartegni e Kranier sostenevano l'ipotesi che la sostituzione a livello dell'esone 7 c.840C>T alterasse la sequenza di un ESEs, sopprimendone la funzione. L'esone 7 del gene SMN è caratterizzato da un sito di splicing 3' debole all'interno delle 54 paia di basi che lo compongono. L'inclusione dell'esone 7 nell'mRNA è regolata positivamente da molti elementi esonici in cis, chiamati splicing enhancer intronici, e negativamente da elementi ESSs oppure (ISSs). (Cartegni L. et al., 2002).

Un importante ESE si trova all'estremità 5' dell'esone 7 di SMN1 ed è riconosciuto dal fattore di splicing SF2/ASF (una proteina SR) che interagisce con la classe U2 delle snRPN e con il suo fattore ausiliario U2AF. Questa sequenza ESE è alterata dalla sostituzione c.840C>T in SMN2, e ciò determina un mancato reclutamenti del fattore di splicing SF2/ASF. Ne consegue che l'esone 7 non viene riconosciuto dagli elementi proteici che regolano lo splicing e viene generato uno splicing alternativo che taglia l'esone 7 (SMN Δ 7). Specifici effettori molecolari di sintesi che mimano la funzione delle proteine SR possono quindi andare a correggere lo splicing di SMN2 (Cartegni and Krainer, 2002) così come l'utilizzo di oligonucleotidi antisenso (modificati bifunzionali) che si legano al sito di legame di SF2/ASF (Skordis et al. 2003).

Una seconda ipotesi è quella proposta nel 2003 da Kashima e Manley, i quali sostenevano che la sostituzione c.840C>T in SMN2 generi un ESS che legando hnRNP A1 facilita lo skipping

dell'esone 7. Tale teoria è supportata dal fatto che il knockdown di hnRNP A1, determinato con l'utilizzo di siRNA (small interfering RNA), induce un aumento dell'inclusione dell'esone 7.

Una terza ipotesi tende ad unificare i due meccanismi precedentemente descritti, attribuendo la facilitazione dello splicing alternativo del trascritto SMN che taglia l'esone 7 a un duplice meccanismo che comprende sia la perdita di un ESE specifico per SF2/ASF che la contemporanea creazione di un ESS specifico per hnRNP A1. È stato dimostrato, inoltre, sempre da Cartegni, che SF2/ASF e hnRNP A1 si antagonizzano tra loro con una competizione che sembra essere basata sulle loro concentrazioni relative e capacità di legame all'RNA (Cartegni et al., 2006). L'espressione variabile di questi regolatori di splicing potrebbe essere responsabile della differente frazione di inclusione dell'esone 7 nei diversi tessuti e dunque contribuire all'interessamento isolato dei motoneuroni che si osserva nella SMA.

Ulteriori meccanismi agiscono sullo splicing dell'esone 7 di SMN2. In particolare, un altro ESE molto potente si trova nella regione centrale dell'esone 7. Il fattore di splicing tipo SR Htra2 β 1 e molte altre proteine di splicing (SRp30c, hnRNP G e RBM) riconoscono questo ESE facilitando l'inclusione dello stesso esone 7 e determinando quel 10% del trascritto FL SMN2. Infatti l'overespressione di Htra2 β 1 incrementa fino all'80% il livello di trascritti FL SMN2 (Hofmann Y. et al., 2002). Lo splicing silencer intronico più importante tra tutti gli splicing enhancer e silencer degli introni 6 e 7 è, invece, ISS-N1 che esercita un potente effetto sull'attività di altri elementi positivi cis dell'esone 7 e dell'introne 7. Esso costituito da 15 paia di basi ed è localizzato a 5bp dal dominio di binding per U1 snRNP (particella ribonucleoproteica nucleare ricca in uridina, essenziale per il processo di splicing) nell'introne 7. Oligonucleotidi antisenso contro ISS-N1 determinano l'inclusione dell'esone 7 in quasi tutti gli mRNA trascritti di SMN2, come dimostrato in esperimenti sia in vitro che sulle cellule (Singh NK et al., 2006).

Il meccanismo di inclusione o esclusione dell'esone 7 non è ancora stato determinato con chiarezza. Importanti passi avanti nei possibili approcci terapeutici potranno sicuramente essere fatti con una maggiore comprensione di tale meccanismo.

1.2.2 PROTEINA SMN

La proteina SMN è composta da 294 aminoacidi con lunghezza intera è 38 KDa e costituisce un complesso multifunzionale essenziale per la sopravvivenza degli animali (Liu et al., 1997).

Il gene SMN è stato altamente conservato durante le evoluzioni, espresso ubiquitariamente nell'uomo e in altre specie; infatti la proteina SMN è stata rilevata nei vertebrati e negli animali invertebrati (Monani et al. 2005). Livelli particolarmente elevati della proteina SMN sono stati riscontrati nei motoneuroni spinali, nel cervello e nei tessuti muscolari (Battaglia et al. 1997). Questa proteina è presente sia nel citosol che nel nucleo. Nel nucleo si localizza nei cosiddetti gemini (gems) in quanto colocalizzano con i corpi di Cajal (Liu et al. 1997), strutture che contengono alti livelli di fattori coinvolti nella trascrizione e nel processamento di diversi tipi di RNA nucleare, delle piccole ribonuclio proteine nucleari (snRNPs) e delle piccole ribonucleoproteine nucleolari (snoRNPs) (Monani 2005). La quantità di "gems" nelle linee cellulari o nei tessuti di pazienti affetti è inversamente correlata alla gravità della patologia: nei pazienti con SMA I le "gems" sono poche o del tutto assenti (Patrizi et al. 1999). SMN è stata ritrovata, inoltre, nei granuli degli assoni dei motoneuroni dove viene trasportato rapidamente in modo bidirezionale (Zhang et al. 2003, Zhang et al. 2006) e nei coni di crescita dei motoneuroni e forse anche nelle strutture postsinaptiche delle giunzioni neuromuscolari nei muscoli (Rossoll et al. 2003).

Da un punto di vista funzionale, la proteina SMN è in grado di auto assemblarsi formando strutture multimeriche (Monani 2005). Due domini sono responsabili di questa auto-associazione: uno minore (codificato dall'esone 2b), e uno maggiore (codificato dall'esone 6) (Young et al., 2000 Lorson et al., 1998). La capacità di omodimerizzare correla inversamente con la gravità della malattia. Infatti le mutazioni che impediscono l'autoassemblaggio e la formazione del complesso multimerico, presumibilmente espongono i monomeri di SMN mutati a una rapida degradazione cellulare ubiquitino-mediata (Chang et al., 2004). Non sorprende che le mutazioni più frequenti di SMN1 riscontrate nei pazienti con SMA si raggruppino tutte in prossimità del dominio per la self-association presente nell'esone 6. L'interazione successiva con Gemine 2-7 contribuisce alla formazione di un complesso multiproteico stabile. Tale complesso interagisce con numerose proteine (Monani, 2005), in diversi e specifici domini della proteina SMN, come il dominio di legame dell'acido nucleico (esoni 2A e 2B), dove SMN Interacting Protein 1 (SIP1), noto anche come Gemin2, si lega. Questo dominio contiene il sito di legame di altre particelle, come p53.

Un'altra importante regione è il dominio Tudor, codificato sull'esone 3, che interagisce con proteine come FUS, Histone 3 e Fragile X Mental Retardation Protein (FMRP) RNA polimerasi II. Le proteine coinvolte nella dinamica dell'actina (le Profiline) interagiscono con una sequenza ricca di prolina , mentre il dominio C-terminale (CTD) contenente una regione ricca di tirosina e glicina (scatola YG) interagisce con Gemina3, proteina zinco-dito (ZPR1) (Singh et al., 2017b). I suoi ruoli possono essere approssimativamente divisi in cinque categorie principali:

- 1) Metabolismo dell'RNA (splicing pre-mRNA, trascrizione attraverso la sua interazione con CTD di pol II, translazione e formazione di granuli da stress (SG));**
- 2) Ricombinazione / riparazione del DNA;**

3) Trasduzione del segnale;

4) Traffico intracellulare (endocitosi, citoscheletro);

5) Effetti ad ampio spettro.

Nel metabolismo dell'RNA, uno dei suoi ruoli principali é quello di facilitare la maturazione, l'assemblaggio e la funzione (quindi sia citoplasmatici che nucleari) delle piccole ribonucleoproteine nucleari spliceosomiali (snRNPs), che sono le componenti centrali del complesso spliceosomico (Battle et al. , 2006; Pellizzoni et al., 1998). Uno snRNP spliceosomico è composto da un piccolo acido ribonucleico (snRNA) e un anello eptamerico di proteine Sm (Singh et al., 2017b).

La biogenesi di SnRNP è un processo articolato in più fasi che inizia nel nucleo, si sposta nel citoplasma e torna nel nucleo. Si inizia con la co-trascrizione di una transcripto (m7G-cap addizione e 3' scissione finale) che diventa un pre-snRNA. Viene quindi spostato attraverso un complesso di esportazione nel citoplasma dove viene ulteriormente elaborato dal complesso SMN che, dopo aver caricato l'anello Sm eptamerico (precedentemente dimetilizzato dalla proteina arginina N-metiltransferasi (PRMT5), elabora il pre-snRNA con ipermetilazione 3' terminale e si sposta di nuovo insieme Cajal Bodies nucleare per la maturazione definitiva (Sm core funziona come localizzatore nucleare) (Lanfranco et al., 2017; Singh et al., 2017b)

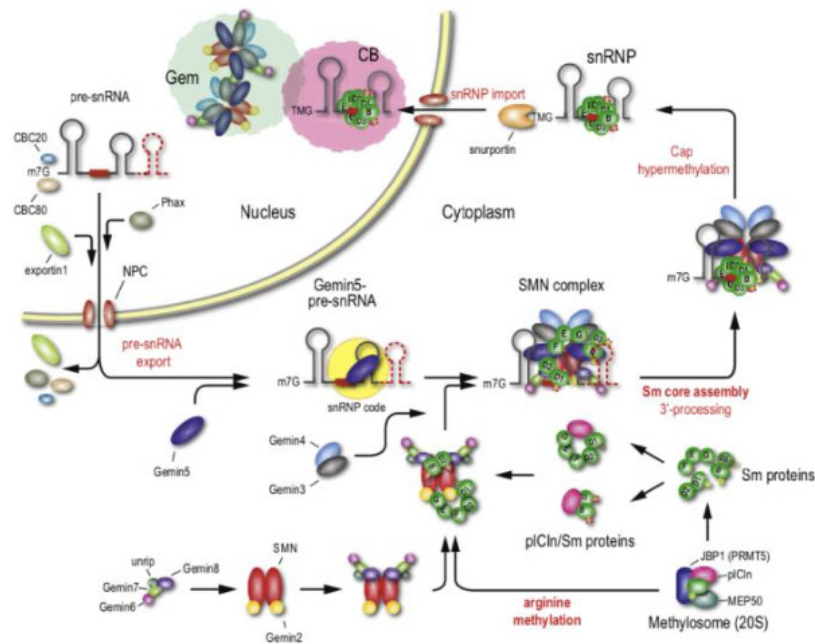


Fig. 3 Biogenesi di snRNP: Dopo la trascrizione e l'elaborazione nel nucleo e dopo essere stata esportata nel citoplasma, il pre-snRNA è associato al complesso SMN e al nucleo Sm. Il complesso viene quindi riportato nel nucleo. *The Function of Survival Motor Neuron Complex and Its Role in Spinal Muscular Atrophy Pathogenesis.* By B.R. So, Z. Zhang, G. Dreyfuss in Sumner, 2017

Si ritiene che SMN sia coinvolto nel traffico di mRNA lungo l'assone e nei coni di crescita di motoneuroni (MN) (Sumner et al., 2017). Ciò è stato suggerito da livelli ridotti di b-actina in questi siti in MN derivati da topi SMA. La SMN facilita la colocalizzazione della ribonucleoproteina nucleare eterogena R (hnRNP R) / HuD con mRNA di B-ACTINA e la sua mancanza compromette la crescita del neurone. Nei fibroblasti interagisce direttamente con la caveoli-1 per sequestrare i ribosomi inattivi ed è in grado di rilasciare loro in uno stato attivo tale da alterare la dinamica della b-actina. Nuovi studi sono necessari per verificare se lo stesso processo succede anche nei neuroni (Singh et al., 2017b).

Inoltre, ci sono molti studi che dimostrano il coinvolgimento della SMN nei altri sistemi; la sua riduzione dei livelli di SMN influenza lo sviluppo del sistema cardiovascolare (Heier et al., 2010; Palladino et al., 2011; Shababi et al., 2010, 2012) come sistema respiratorio (Michaud et al., 2010), osso (Shanmugarajan et al., 2009), intestino (Gombash et al., 2015; Sintusek et al., 2016), testis (Ottesenet al., 2016), milza (Thomson et al., 2017), pancreas (Bowerman et al., 2012b; Lamarca et al., 2013), fegato (Vitte et al., 2004) e cellule gliali (Bradl e Lassmann, 2010; Caraballo-Miralles et al., 2012; McGivern et al., 2013). Questo effetto sistemico della SMN è un problema che deve essere preso in considerazione per gli approcci terapeutici e la somministrazione.

1.2.3 PATOGENESI

Le patologie dei motoneuroni (MND) sono costituiti da un vasto gruppo di malattie causate dalla degenerazione di MN nel tronco encefalico e / o nel midollo spinale causando in ultima analisi atrofia muscolare. La SMA è una malattia caratterizzato da una fase acuta, durante la quale una grande porzione di MN degenera e va incontro a morte cellulare, ed una fase cronica successiva, in cui è stato identificato un particolare sottogruppo di MN resistenti e sopravvissuti.

La quantità di SMN è direttamente proporzionale alla sopravvivenza cellulare, poiché i MN degli individui SMA I muoiono molto prima di quelle SMA II o III (Ng et al., 2015).

Burlet et al. (Burlet et al., 1998) ha mostrato che l'SMN subisce una drammatica riduzione dopo la nascita sia a livello muscolare, cardiaco e cerebrale, suggerendo il suo maggiore coinvolgimento patologico nel periodo prenatale. Inoltre, Boza-Moran et al. hanno dimostrato una diminuzione

lineare della SMN nelle cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC) mentre si differenziava nelle MN (Boza-Morán et al., 2015). Questi risultati suggeriscono che la carenza SMN nel periodo fetale può predisporre alla debolezza selettiva e alla degenerazione degli MN. Sebbene le trascrizioni FL-SMN2 siano quasi assenti nei neuroni a livello cerebrale e nelle MN del midollo spinale, ciò non è vero per gli altri tessuti come i muscoli scheletrici, i reni e la pelle, dove il gene SMN2 può fornire livelli sufficienti di proteina funzionale e stabile. In effetti, Ruggiu et al. ha suggerito che questa particolare vulnerabilità dei MN rispetto ad altre cellule del midollo spinale verso il deficit di SMN1 in vivo è dovuta all'inefficiente inclusione dell'esone 7 selettivamente e ancor meno nelle MN SMA rispetto alle MN sane (e quindi ai livelli più bassi di FL – SMN2): inoltre, la carenza di SMN provoca un percorso di feedback negativo che si traduce in un'ulteriore riduzione della SMN (Ruggiu et al., 2012).

Le prime descrizioni di SMA hanno evidenziato il coinvolgimento delle corna ventrale (VH) del midollo spinale, implicando quindi una disfunzione dell'LMN. La SMA I deriva più che da una degenerazione della MN, da un arresto prematuro nello sviluppo della giunzione neuromuscolare (NMJ) (Martínez-Hernández et al., 2009). La quantificazione delle MN a livello delle VH del midollo spinale nei feti umani affette da SMA I tra le 12 e le 22 settimane ha dimostrato una riduzione del numero nei pazienti con SMA rispetto ai controlli; questo dato potrebbe essere spiegato solo parzialmente dalla cospicua apoptosi nelle MN, tipica nelle prime età gestazionali (Simic et al., 2000; Soler-Botija et al., 2002). Queste alterazioni coinvolgono non solo il numero MN ma anche la loro morfologia, con un aspetto cromatolitico e una diminuzione del numero di sinapsi (Lippa e Smith, 1988). Vari studi confermano che i MN sono stati erroneamente migrati e bloccati nelle prime fasi dello sviluppo (Simic et al., 2000). Inoltre si è osservato che gli assoni sono alterati: le radici nervose sono più sottili e formate da un numero ridotto di MN (Ghatak, 1978): Chou e Nonaka contarono 4194–5848 assoni mielinizzati in una radice di controllo e 1652– 2077 in una radice

SMA, il cui diametro era compreso tra 2,9 μ m e 4,2 μ m (Chou e Nonaka, 1978). Inoltre, la diminuzione degli assoni mielinizzati è associata all'aumento degli assoni non mielinizzati circondati da una singola cellula di Schwann, suggerendo anche una maturazione interrotta degli assoni. Queste aberrazioni assonali si verificano non solo a livello prossimale dell'assone, ma anche a livello intramuscolare (2017). Il reperto patologico più tipico a livello delle radici nervose è rappresentato da i cosiddetti fasci gliali, formati da astrocitici, positivi alla proteina acida fibrillare gliale (GFAP), probabilmente a causa di una risposta gliale alla perdita precoce di MN (Brock e McIlwain, 1984).

Inoltre i studi evidenziano un coinvolgimento neuromuscolare complesso con disfunzione dell'NMJ(placca neuromuscolare), della funzionalità mitocondriale, e della miogenesi .Al livello dell'NMJ (già nella fase presintomatica) è stato evidenziato la presenza di aggregazione della proteina del neurofilamento, diminuzione della densità e localizzazione alterata delle vescicole sinaptiche, contenuto ridotto e alterata maturazione del recettore dell'acetilcolina (AChR). Tutti questi riscontri portano ad una neurotrasmissione compromessa, ma i meccanismi esatti rimangono inspiegabili. Molti di questi deficit sono presenti prima che abbia luogo la fase sintomatica (Sumner et al., 2017). Al fine di indagare se queste prime alterazioni della NMJ si accompagnano a danno sinaptico, Kong et al. ha studiato il topo $\Delta 7$ ed ha dimostrato che le NMJ rimangono innervate sebbene profondamente alterati nella morfologia e nell'attività sinaptica fino alle fasi sintomatiche della malattia (ad eccezione di quei compartimenti muscolari particolarmente colpiti nei topi SMA come muscoli intercostali e paraspinali), (Kong et al., 2009).Inoltre si è dimostrato che questo processo è dovuto alla ridotta densità della vescicola sinaptica a causa del ridotto contenuto vesicololare nei terminali pre-sinaptici, confermando l'ipotesi che la perdita assonale non sia l'iniziale innesco della neurodegenerazione nella SMA.

Al livello muscolare si osserva atrofia delle fibre muscolari di tipo I e II con un aspetto immaturo, nuclei centrali, ispessimento del tessuto connettivo endomisiale (Martínez-Hernández et al., 2009). La SMN è nota per essere fondamentale per lo sviluppo neuromuscolare fetale ed è stata trovata nei miotubi, mentre il muscolo fetale SMA mostra livelli più bassi di SMN (Soler-Botija et al., 2005). I risultati dell'istologia tra controllo e muscoli SMA hanno dimostrato che i miotubi nel tessuto patologico erano più piccoli, più sottili e con una distribuzione alterata, ma senza differenze nell'espressione di desossinucleotidiltransferasi del terminale DUTP (TUNEL) e deossinucleotidil transferasi dUTP. Ciò che è interessante è la diversa risposta all'assenza di SMN da parte di diversi tessuti: da un lato non c'erano differenze nell'analisi TUNEL ma i miotubi erano più piccoli con nuclei e citoplasma di dimensioni ridotte, d'altro canto i campioni di midollo spinale SMA hanno rivelato una maggiore frammentazione del DNA e downregulation dei meccanismi antiapoptotici ma con aspetto morfologico alla microscopia conservato (Soler-Botija, 2002; Soler-Botija et al., 2003). Questa è la prova che questi due tessuti rispondono diversamente alla mancanza di SMN durante lo sviluppo fetale. Al contrario, un altro gruppo ha sottolineato lo sviluppo alterato delle NMJ dopo la nascita nei topi SMA (Kariya et al., 2008). Secondo articoli meno recenti il ballooning neuronale e la neurodegenerazione si verificano non solo nelle corna anteriori del midollo spinale, ma anche nei nuclei ventrali del talamo e nelle cellule dei gangli delle radici dorsali (Probst et al., 1981; Towfighi et al., 1985), Harding et al. ha confermato che queste alterazioni sono presenti anche nei nuclei talamici ventrale dei pazienti affetti (Harding et al., 2015). Essi definiscono la SMA come un "disordine di rete". Hua et al. suggeriscono che molte popolazioni cellulari svolgono un ruolo centrale nella patogenesi della SMA. (Hua et al., 2015).

Tutti questi risultati mostrano che, a causa della diversa patogenesi e delle diverse risposte dei vari tessuti all'assenza di SMN, dovranno essere sviluppate strategie terapeutiche, rivolte sia ai MN che ai tessuti periferici.

1.3 CLASSIFICAZIONE CLINICA E STORIA NATURALE

LA5q-SMA è una malattia neurologica genetica, caratterizzata da degenerazione e perdita dei motoneuroni nel tronco encefalico e nel midollo spinale con conseguente debolezza e atrofia muscolare. Vengono attribuite le prime descrizioni riconosciute di un fenotipo lieve di SMA

Werdnig e Hoffman nei primi anni del 1890 (Werdnig, 1891). Beevor, d'altra parte, descrisse in Brain nei primi anni del 1900 una forma di grave SMA ed è stato il primo a sottolineare il caratteristico coinvolgimento dell'apparato respiratorio, caratterizzato dal risparmio del diaframma ma deterioramento dei muscoli intercostali (Beevor, 1902; Sumner et al., 2017).

Derivando da una degenerazione progressiva dei motoneuroni delle corna anteriori del midollo spinale e del tronco encefalico l'ipostenia agli arti ha distribuzione simmetrica e prossimale ed interessa principalmente gli arti inferiori; sono coinvolti anche i muscoli del tronco, determinando un quadro di debolezza intercostale, mentre l'interessamento bulbare provoca atrofia e fascicolazioni della lingua. Un segno aggiuntivo può essere un tremore delle mani quando gli arti sono estesi. Dato l'interessamento principale del II neurone di moto i riflessi tendinei profondi si presentano ridotti o assenti e il riflesso plantare, quando evocabile, è in flessione. Importante per le sequele che determina sul quadro sintomatologico è l'interessamento della muscolatura respiratoria che avviene soprattutto in fase avanzata della malattia (con relativo risparmio del diaframma), mentre la muscolatura del volto, il muscolo cardiaco e la muscolatura liscia non sono interessati.

Caratteri distintivi si ritrovano poi nei quattro sottogruppi in cui questa malattia è stata suddivisa dall'International SMA Consortium in base all'età di esordio, al raggiungimento di specifiche attività motorie (sedersi, camminare) e all'età di decesso (Zerres et al., 1999).

La forma infantile (tipo I o di Werdnig-Hoffmann) è la forma più grave ed è presente nel 50% dei pazienti (Munsat et al., 1992). E' associata alla delezione dell'esone 7 nel gene SMN1 nel 95% dei casi. L'esordio si ha entro i sei mesi d'età, ma frequentemente la malattia si manifesta entro il primo mese, mentre in un terzo dei casi i movimenti fetali in utero sono ridotti o del tutto assenti. Il bambino si può presentare debole e ipotonico alla nascita ("floppy baby"), mentre altri neonati sembrano svilupparsi normalmente per alcuni mesi prima che il deficit di forza divenga evidente. Inizialmente vengono colpiti i muscoli del tronco e del cingolo pelvico e scapolare, mentre i muscoli cranici, delle mani e dei piedi rimangono indenni. Si evidenziano, quindi, ipotonia (valutabile con il movimento passivo delle articolazioni), ipostenia prossimale dei cingoli ed areflessia generalizzata. Vi è una correlazione diretta tra precocità d'esordio e velocità di progressione della malattia anche se la progressione verso la paralisi generalizzata degli arti e del tronco è quasi sempre rapida, con interessamento di tutti i muscoli scheletrici ad eccezione di quelli oculari. Il bambino assume, allora, una postura caratteristica con braccia addotte flesse a livello dei gomiti, gambe con abduzione delle anche e rotazione esterna e flessione di anche e ginocchia (in posizione a "rana"). Non sono in grado di stare seduti né di sostenere il capo. Il pianto è flebile, la suzione e la deglutizione sono meno valide, la respirazione si fa paradossa (per la paralisi dei muscoli intercostali, con il relativo risparmio del diaframma che garantisce la respirazione e determina una deformità del tronco che rimane schiacciato lateralmente e non segue i movimenti respiratori, mentre l'addome si rigonfia – cosiddetto petto "a campana"). Spesso i bambini nelle fasi terminali della malattia giacciono immobili e necessitano di alimentazione con sondino naso-gastrico o PEG. Di solito il decesso avviene entro i due anni di età per insufficienza respiratoria, spesso aggravata da infezioni respiratorie ricorrenti.

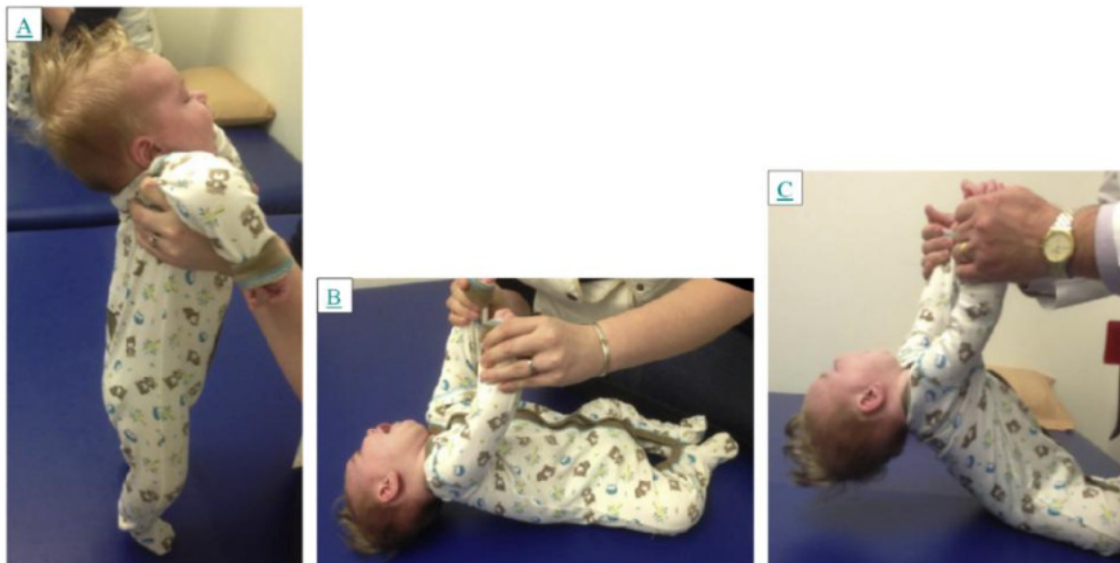


Fig 4 Presentazione clinica SMA I Questa immagine mostra ipotonìa (A), tipica postura della coscia di rana (B) e incapacità di controllare la testa (C). Immagine da “*Spinal Muscular Atrophy: 125 Years Later and on the Verge of a Cure*” by M. Oskoui, B.T. Darras, D.C. De Vivo in *Summer*, 2017

La forma intermedia di SMA (tipo II) è ereditata in modo autosomico recessivo e in oltre il 90% dei casi è associata alla delezione dell'esone 7 del gene SMN1. Esordisce tra i 6 e i 18 mesi d'età, in genere in modo insidioso e comporta una ritardata e parziale acquisizione della funzione motoria. I bambini riescono ad acquisire la posizione seduta, ma il successivo sviluppo motorio si arresta e non riescono mai ad assumere la posizione eretta o a camminare senza sostegno. L'ipostenia e l'amiotrofia sono rilevanti, inizialmente prossimali, poi diffuse. I riflessi tendinei risultano ridotti o assenti. In fase avanzata è colpita anche la muscolatura innervata dal distretto bulbare. Le fascicolazioni della lingua sono meno comuni rispetto al tipo I, ma il tremore periferico può essere più evidente. La deglutizione è spesso normale. Il coinvolgimento dei muscoli intercostali è presente nel 50% dei pazienti ed è strettamente correlato con la prognosi. Durante l'infanzia tendono a svilupparsi contratture e deformità, come la dislocazione dell'anca e la cifoscoliosi, per lo squilibrio tra muscoli agonisti-antagonisti, che favoriscono a loro volta lo sviluppo di complicanze respiratorie.

Frequentemente si ha una stabilizzazione del quadro clinico dopo uno o due anni, ma il miglioramento è raro. La progressione è lenta e il raggiungimento della terza o quarta decade di vita è solitamente la regola.

La forma più lieve di SMA (tipo III o di Kugelberg-Welander) è anch'essa trasmessa come tratto autosomico recessivo ed è associata alla delezione nel gene SMN1 nell'80-90% dei casi. E' suddivisa per motivi prognostici in base all'età di esordio nel tipo IIIa (entro i tre anni di età) e IIIb (dopo i tre anni di età). Esordisce insidiosamente con debolezza muscolare progressiva e simmetrica fin dall'inizio. Solitamente vengono colpiti inizialmente i cingoli (normalmente quello pelvico e poi quello scapolare) e i muscoli prossimali di gambe e braccia. Generalmente questi pazienti riescono a sedersi e camminare, anche se possono essere presenti evidenti contratture muscolari e scoliosi. Il tremore è comune e può essere anche la caratteristica d'esordio. I riflessi tendinei vengono persi, mentre la muscolatura bulbare e i tratti corti-spinali sono risparmiati. La malattia progredisce lentamente, anche se più precoce è l'esordio e meno favorevole è la prognosi. L'aspettativa di vita non è ridotta. Solo il 50% dei pazienti di tipo IIIa riesce ancora camminare a 14 anni, mentre il 90% dei pazienti IIIb mantiene ancora questa capacità dopo oltre 45 anni di malattia (Zerres K. et al., 1995).

La forma adulta di SMA (tipo IV) è caratterizzata da un'età d'esordio usualmente oltre i 30 anni di vita, con una lieve debolezza e ipotrofia muscolare simmetrica o asimmetrica soprattutto a carico dei muscoli ileopsoas, tricipite e quadricipite e risparmio del grande gluteo (sedi di interessamento muscolare sostanzialmente diversi rispetto alla distrofia di Becker). I riflessi sono ridotti. La progressione della malattia è molto lenta, talora si arresta, e questi pazienti hanno un'aspettativa di vita pressoché normale.

Per meglio classificare la ampia variabilità del fenotipo così ampio Dubowitz, 1991 ha proposto una nuova classificazione di tipo decimale di ogni forma di SMA. Questa nuova classificazione, distingue le varie presentazioni di ogni tipo di SMA , ad esempio nella SMA III i bambini in grado di camminare stabilmente vengono classificati come 3,5, i bambini in grado di raggiungere la stazione eretta ma camminare con grandi difficoltà vengono classificati come 3,1 (Dubowitz, 1995)

Le altre forme di SMA (definita non-5q SMA) presentano debolezza iniziale e altri sintomi associati (Zerres et al. 2003). Attualmente 16 geni diversi sono associati a forme non 5q (Peeters et al. 2014) , presentandosi come forme autosomiche dominante (es. atrofia muscolare spinale prevalente agli arti inferiori) o autosomiche recessive (es. atrofia muscolare spinale con epilessia mioclonica progressiva) o forme X linked (es. M. Kennedy).

Ogni paziente SMA porta almeno 1 copia SMN2, visto che la sua assenza porta alla morte fetale embrionale. Numerosi studi hanno dimostrato che il numero di copie SMN2 è correlato al fenotipo SMA: maggiore è il numero di copie, più lieve è il fenotipo. Il gruppo di Elsheikh ha diviso 45 pazienti adulti (> 21 anni) in due diversi gruppi in base al numero di copie SMN2 (3 vs 4) e li ha confrontati misurando la contrazione massimale isometrica volontaria (MVIC), la SMA Foundation Rating Scale (SMAFRS) e la Forced Vital Capacity (FVC). Questi due gruppi non differivano per quanto riguarda FVC e MVIC, ma quelli che trasportavano 3 copie SMN2 ottennero meno punti allo SMAFRS e solo un terzo dei pazienti era ambulante rispetto al 70% nel gruppo che portava 4 copie di SMN2 (Elsheikh et al., 2009) . La popolazione si può così dividere in :

- Carrier sani: 1 SMN1, 0 SMN2, con una quantità risultante del 50% di proteine funzionali, sufficiente per il normale funzionamento;
- Nei pazienti con SMA I, II, di tipo III grave vi è una quantità massima del 20-30% di proteine funzionali, poiché il numero di copie SMN 2 più comune è 2-3;
- I pazienti con SMA III più lievi con 4 copie di SMN2 possono raggiungere livelli di proteina circa del 40%, sempre però al di sotto della soglia del 50%;

Sebbene clinicamente asintomatici, sono stati descritti individui senza SMN1 ma con 5 copie di SMN2 (2017). Si può pertanto confermare che esiste una corrispondenza tra numero di copie SMN2, livelli di proteine SMN e fenotipo.

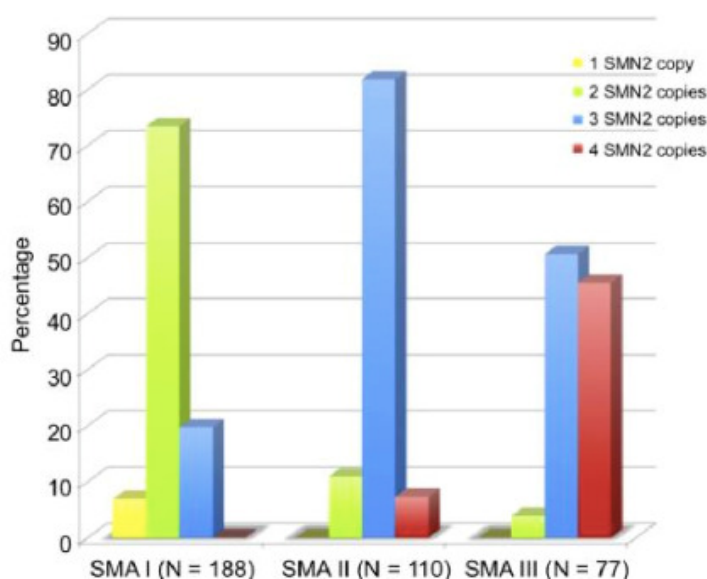


Fig. 5 Diagramma della frequenza dei pazienti con SMA Tipo I, II e III per numero di copia SMN2

Nell'80% dei bambini con SMA I, sono state trovate una o due copie di SMN2, l'82% dei pazienti con SMA II portatore copie di SMN2 e il 96% dei pazienti con SMA III portava tre o quattro copie di SMN2. Immagine pubblicato da Feldkotter M, Schwarzer V, Wirth R, Wienker TF, Wirth B. Quantitative analyses of SMN1 and SMN2 based on real-time light Cyclor PCR: fast and highly reliable carrier testing and prediction of severity of spinal muscular atrophy. Am J Hum Genet. 2002;70(2):358–368, in Summer, 2017

Esistono inoltre diversi meccanismi che possono regolare i livelli di proteine SMN, come integrità della sequenza, fattori di splicing trans-regolatori, regolazione della trascrizione, stabilizzazione dell'mRNA SMN, regolazione post-traduzionale (fosforilazione, ubiquitinazione, sumoilazione) e localizzazione subcellulare. Esistono anche fattori esterni che possono ostacolare l'espressione di SMN, come la fame, l'ipossia e lo stress ossidativo (Sumner et al., 2017).

1.3.1. MODIFICATORI DEL FENOTIPO

I modificatori del fenotipo sono molecole endogene che sono in grado di modulare la gravità della malattia e la loro espressione può portare a un fenotipo meno grave. La loro efficacia non è correlata al numero di copie SMN 2; sono stati segnalati fratelli con lo stesso background genetico ma con fenotipo patologico diverso (Bernal et al., 2011).

Tra questi modificatori troviamo:

- *Plastin 3 (PLS3)* è un modificatore di fenotipo specifico (femminile) di genere che si lega all'actina e la stabilizza (HosseiniBarkooie et al., 2016). Oprea et al. ha studiato sei famiglie in cui fratelli e sorelle avevano ereditato lo stesso numero di SMN1 e SMN2, ma le donne lo erano asintomatici mentre i loro fratelli maschi presentavano la patologia (Oprea et al., 2008). Attraverso un'analisi

dell'espressione differenziale a livello del trascritto si è identificato il PLS3 come gene capace di modificare selettivamente il fenotipo indipendentemente dall'SMN.

Recenti studi sui modelli di topo SMA che hanno sovraespresso il PLS3 hanno dimostrato che può migliorare il fenotipo neuromuscolare, come dimostrato dai dati elettrofisiologici: area della placca, dimensione delle fibre muscolari, contenuto di vescicola sinaptica e dimensione di MN sono state tutte migliorate (Ackermann et al., 2013). In questo stesso articolo, sebbene, non siano stati osservati miglioramenti significativi nelle funzioni motorie né nella sopravvivenza nei topi SMA gravemente colpiti, mentre nei topi affetti da lieve quadro è stato registrato solo un lieve, anche se significativo, miglioramento della sopravvivenza. Una possibile spiegazione è stata data dal fatto che la sovraespressione di PLS3 non ha avuto alcun effetto in tessuti diversi da quello neurale, come cuore, polmoni e intestino. Alrafiah et al. trans-infetto un topo SMA ($\Delta 7$, vedi paragrafo 1.1.9.2 Modelli in vivo) con un Lentivirus (LV) che trasportava cDNA PLS3 umano e dimostrò che i neuroni in vitro affrontavano un aumento della crescita e della lunghezza dei neuriti. Inoltre lo stesso gruppo ha anche trattato topi con virus adeno-associato 9 (AAV9) codificante per PLS3 ottenendo un leggero ma significativo miglioramento della sopravvivenza (Alrafiah et al., 2018)

-Il fattore di crescita insulino-simile 1 (IGF1), sintetizzato dal fegato in risposta all'ormone della crescita (GH), ha un'isoforma muscolare (mIGF-1) che può aumentare il trofismo muscolare nel topo SMA $\Delta 7$ (Bosch-Marcé et al., 2011). È anche un fattore neurotrofico e la sua distribuzione sistemica può portare a una maggior produzione di SMN nel cuore, nel sistema nervoso centrale (SNC) e nei muscoli in un topo SMA;

- *Neural calcium sensor Neurocalcin delta (NCALD)*: è un regolatore negativo dell'endocitosi dipendente dal calcio che è stato scoperto come modificatore SMA in cinque soggetti asintomatici senza copie di SMN1 e quattro copie di SMN2. Poiché interagisce con la clatrina, si pensa che sia

coinvolto nel riciclaggio delle vescicole nella placca terminale. La sua assenza migliora i fenotipi patologici nei modelli zebrafish, worm, mouse e ripristina la lunghezza assonale e crescita eccessiva in MNs. Inoltre, questi dati contribuiscono all'ipotesi che l'endocitosi sia uno dei principali meccanismi interrotti nei modelli SMA (Riessland et al., 2017);

- Altre molecole studiate come modificatori della malattia sono, tra gli altri: actinina (ACTN), fattore di crescita trasformante - β (TGF - β), fattore di trascrizione 6 (ATF6), fattore di crescita dei fibroblasti 2 (FGF2), intermedio attivato con calcio nel canale di potassio (KCNN3) (Dimitriadi et al., 2010), modificatore simil-Ubiquitin che attiva l'enzima 1 (UBA1) (Wishart et al., 2014), Phosphatase e tensin homolog (PTEN) (Little et al., 2015).

1.4 DIAGNOSI

La valutazione clinica è considerata l'approccio necessario a qualsiasi caso sospetto di SMA, anche se il "*gold standard*" per la diagnosi è l'analisi genetica molecolare, che consente di distinguere eterozigosi composte e non 5q SMA (Nurputra et al., 2013). Quando si arriva alla diagnosi genetica, il primo strumento utile è il rilevamento della delezione omozigote di SMN1 (sensibilità 93-95%; specificità ca 100%) (Ogino e Wilson, 2004) attraverso l'identificazione dell'assenza dell'esone 7 di SMN1, che è correlata alla perdita dell'intero gene.

La sostituzione C> T consente ad enzima specifica di restrizione (DraI) di identificare quel particolare sito nell'esone 7 di SMN tramite la Polimerase Chain Reaction (PCR): i pazienti sani presentano l'esone 7 SMN1, mentre i soggetti affetti da SMA no.

Altre tecniche utilizzate sono la denaturazione ad alte prestazione della cromatografia liquida (DHPLC)(Sutomo et al., 2002), amplificazione della sonda di legatura multiplex (MLPA), analisi di fusione ad alta risoluzione (HRMA) (Chen et al., 2009) microbead array liquide (Pyatt et al., 2007). Le analisi di seconda linea sono il sequenziamento o il dosaggio SMN tramite Real-Time TaqMan PCR (Gómez-Curet et al., 2007). Questo viene sfruttato anche per rilevare il numero di copie SMN2.

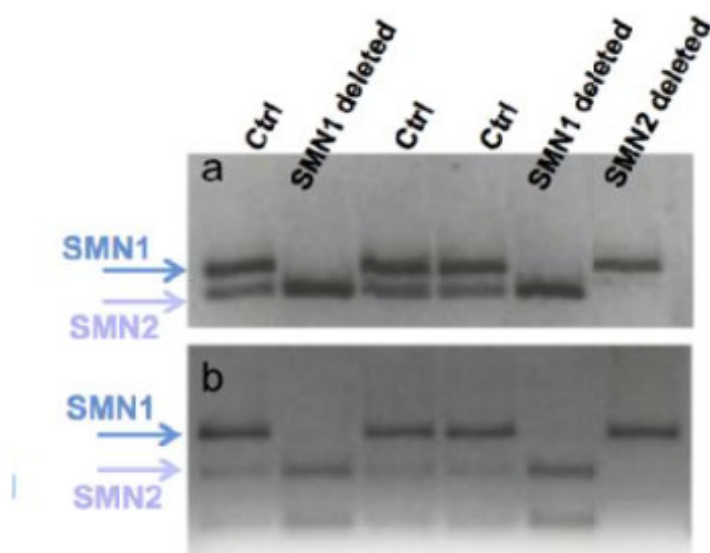


Fig. 6 PCR - Polimorfismo della lunghezza del frammento di restrizione (PCR-RFLP) Ctrl: controllo

a Rappresentazione di possibili attività dopo il taglio di DraI, specifico per l'esone 7, su SMN1 e SMN2; b. Rappresentazione di possibili attività dopo il taglio di Ddel, specifico per l'esone 8, su SMN1 e SMN2

L'elettrofisiologia può essere utile per distinguere tra alterazioni miopatico e neurogene una volta che i livelli ematici di creatina chinasi (CK) pongono il sospetto di un sottostante disturbo neuromuscolare. Questo esame era più utile prima dell'introduzione dell'analisi molecolare genetica, ma al giorno d'oggi può ancora essere sfruttato come biomarker nella storia naturale e anche negli studi clinici. Uno studio ha dimostrato che la variazione di CMAP e MUNE età, dipendeva da tipo SMA e numero copia SMN (Swoboda et al., 2005).

In tutte le quattro forme i segni clinici sono accompagnati da alterazioni elettrofisiologiche da denervazione, visibili all'EMG come attività spontanea elettrica a riposo (punte-onda, potenziali di fibrillazione, fascicolazioni), aumento della durata e dell'ampiezza dei potenziali di unità motoria evocati durante uno sforzo volontario ed aumento della frequenza di potenziali polifasici (che riflettono una reinnervazione), associati ad un diminuito recruitment. E' presente attività spontanea tipo firing ritmico delle unità motorie (attività EMG continua a 7-18Hz). La velocità di conduzione dei nervi motori è normale o minimamente ridotta (soprattutto nella SMA tipo I).

Per confermare lo stato di portatore, i genitori devono sottoporsi al dosaggio del gene SMN1: una sola copia significa essere portatori sani della patologia, mentre due di solito escludono questo rischio. Esistono delle eccezioni come nel caso del cosiddetto portatore "2 + 0", che trasporta due copie sullo stesso cromosoma e nessuna sull'altro.

Un'altra possibilità di falsa negativa all'esame è a causa dell'identificazione di una delezione invece di una semplice mutazione.

È quindi sempre importante considerare il mosaicismo di fronte a risultati sospetti.

Inoltre con l'introduzione delle nuove prospettive terapeutiche che modificano drasticamente la storia naturale di patologia , lo screening prenatale sarà l'approccio diagnostico nel futuro per le SMA(Boardman et.al., 2017)

1.5 SCALE DI VALUTAZIONE MOTORIA

Sono già stati pubblicati studi di validazione su molte scale che valutano la funzione motoria applicate alla SMA (Cano et al., 2014). Le scale sono progettate per identificare la progressione della malattia che causa progressiva debolezza muscolare degli arti superiori e inferiori e del tronco. Le scale utilizzate attualmente per valutare i pazienti con SMA sono elencate nella Tabella 1.

Per quanto riguarda la SMA I, i principali outcome da tenere in considerazione per la storia naturale sono la sopravvivenza e la necessità di assistenza respiratoria meccanica. La maggior parte dei test in genere si basano sulla normale acquisizione delle tappe motorie dello sviluppo, perciò non sono appropriati per i pazienti affetti da SMA I. (Glanzman et al., 2011).

Nel 2010 è stata sviluppata una scala della funzione motoria **Children's Hospital of Philadelphia Infant Test of Neuromuscular Disorders (CHOP-INTEND)** con l'obiettivo di fornire un metodo affidabile per rilevare i cambiamenti nel decorso della patologia. Tale scala è applicabile ai bambini affetti da vari disturbi neuromuscolari (Glanzman et al., 2010). È divisa in 16 categorie (movimenti spontanei degli arti superiori / inferiori, impugnatura, testa nella linea mediana con stimolazione visiva, adduttori dell'anca, rotolamento suscitato da gambe / braccia, flessione di spalla e gomito e abduzione orizzontale, flessione della spalla e flessione del gomito, flessione dell'anca e dorsiflessione del piede, controllo della testa, flessione del gomito flessione del collo, estensione testa / collo), ciascuno item viene valutato con una scala da 0 (nessuna risposta) a 4 (risposta completa).-Vedi Appendice 1. I bambini di solito che sviluppano la malattia presentano un punteggio di 25 (fino a 4) e perdono circa 1,27 punti / anno (Govoni et al., 2018)

HFMS (Hammersmith Functional Motor Scale) è stato creato nel 2003 appositamente per i bambini affetto da SMA tipo II e III (Main et al., 2003). La scala è formata da 20 elementi valutati da 0 a 2, ma è stato brevemente modificato in HMFSE (Glanzman et al., 2011) che consente la distinzione tra tipo II e III attraverso 13 misure di funzioni motorie. -Vedi Appendice

I sei minuti -test di deambulazione (6MWT) è stato recentemente confermato come misura di outcome, e per valutare la SMA negli studi clinici (Dunaway Young et al., 2016). Questo test è in grado di differenziare non solo il gruppo di controllo dai soggetti affetti, ma anche all'interno di quest'ultimo gruppo.

SCALE NAME	ABBREVIATION	SMA TYPE	SUMMARY DETAILS	SCORING	REFERENCES
Children's Hospital of Philadelphia Infant Test of Neuromuscular Disease	CHOP INTEND	SMA I	It evaluates the strength of the related muscle groups and the ability to move the body segment against another or against gravity, observing elicited and reflexive movements	16 items, (0–4 scale): 0 - no response 1 - minimal 2 - partial 3 - nearly full 4 - complete response	Glanzamn et al 2010 Glanzamn et al 2011
Egen Klassification Scale	EK2	SMA II, III	It evaluets Muscle strength, range of motion, respiratory competence	17 items (0-3 scale) 0 - Unaided 1 - Partially able 2 - Partially able (worse than 1) 3 - Inability	Steffensen et al 2011
Gross Motor Function Measure	GMFM	SMA II, III	Measure of motor function evaluating 5 dimensions: A - lying and rolling B - sitting C - crawling and kneeling D - standing E - walking, running, and jumping	88 items (0-3 scale) 0 - does not initiate 1 - initiates 2 - partially completes 3 - completes	Nelson et al 2006
Hammersmith Functional Motor Scale	HFMS	SMA II, III (>30 mo)	Specifically designed to test motor function in non ambulant	20 items (0-3 scale) 0 - inability 1 - with assistance 2 - unaided	Mazzone et al 2014
Expanded Hammersmith Functional Motor Scale	HFMS-E	SMA II, III	Additional items particularly aimed at ambulant individuals	33 items (0-3 scale) 0 - inability 1 - with assistance 2 - unaided	Glazman et al 2011
Modified Hammersmith Functional Motor Sclae Extend	MHFMS-Extend	SMA II, III (2-12 ys)	Designed for young non-ambulatory children, changed in the testing order and with additional items	28 items (0-3 scale) 0 - inability 1 - with assistance 2 - unaided	Krossechell et al 2006 Krossechell et al 2011
Motor Function Measure	MFM	SMA II, III	Detailed profile of the physical impairment evaluating 3 dimensions D1: standing and transfers D2: axial and proximal motor function D3: distal motor function	32 or 20 items (0-4 scale) 0 - inability or inconsistent 1 - task partially performed 2 - incomplete or imperfect 3 - normal	Berard et al 2005 Vuillerot et al 2013
North Star Ambulatory Assessment for SMA	NSAA for SMA	SMA III	Several items assessing abilities that are necessary to remain functionally ambulant	17 items (0-2 scale) 0 - Unable to achieve independently 1 - Goals achieved independently with modified method 2 - Normal	Mazzone et al 2009
Test of infant Motor Performance	TIMP	SMA I	Comprehensive assessment of the postural and selective control of movement	13 items for spontaneous motor observations (0 - no/1 – yes scale) 29 items for elicited motor behaviors (0 - 6 scale)	Finkle et al 2008

Tab 1. Le scale funzionali proposte per la SMA

1.6 BIOMARCATORI

Un biomarcatore ideale dovrebbe avere livelli di espressione alterati nei pazienti rispetto ai controlli, mantenere livelli costanti durante il corso della malattia, essere suscettibile agli effetti dei trattamenti e/o in fase di esacerbazione della malattia e riflettere in maniera affidabile il grado di deterioramento neurologico e la durata della malattia. In seguito elenchiamo possibili biomarcatori per la SMA.

1.6.1 ELETTROMIOGRAFIA

Per tutte le forme di SMA, l'elettromiografia mostra un quadro neurogeno caratterizzato da aumento della durata e dell'ampiezza del potenziale d'azione durante la contrazione volontaria, aumento del tasso di potenziali polifasici e riduzione del reclutamento, insieme ad attività elettrica spontanea (fibrillazioni e fascicolazioni). La velocità di conduzione dei nervi motori esaminati con l'elettroencefalografia è normale o minimamente ridotta (specialmente nella SMA I) (Buchthal et al., 1970).

Una tecnica utile per studiare la perdita del II motoneurone è quella che stima il numero di unità motorie (MUNE). Il MUNE è un metodo che stima il numero dei motoneuroni inferiori di un determinato nervo, responsabili dell'innervazione di un gruppo di muscoli, ed è calcolato dal rapporto tra il massimo potenziale d'azione composto muscolare (CMAP) e la media del potenziale di singola unità motoria (SMUP) (McComas et al., 1991). L'ampiezza dello SMUP fornisce anche un dato quantitativo sulla dimensione del motoneurone ed una misura dell'estensione della reinnervazione collaterale (Kang et al., 2014). MUNE e CMAP sono due parametri elettrofisiologici

affidabili che possono stimare la compromissione dei motoneuroni e possono essere utilizzati per monitorare nel tempo la progressione della malattia (Bromberg et al., 2002).

Sebbene si ritenga che la SMA colpisca principalmente i muscoli prossimali, anche i valori dei MUNE dei muscoli distali (ipotenar) sono molto bassi (Bromberg et al. 2006). I valori medi di MUNE e CMAP differiscono sostanzialmente tra i tre diversi tipi (I, II e III) di SMA: i pazienti affetti da tipo I presentano valori più bassi e i pazienti affetti da tipo III hanno valori più alti.

Nei pazienti con SMA I, il valore MUNE è basso al momento della diagnosi, ma di solito viene registrato quando i pazienti sono già sintomatici e la malattia ha già iniziato a progredire. L'esame elettrofisiologico correla con il numero delle copie di SMN2: i soggetti con meno di 3 copie di SMN2 presentano valori di MUNE e di CMAP significativamente ridotti rispetto a pazienti con maggior numero di copie.

In un altro studio longitudinale condotto in una coorte di pazienti con SMA II e III, è stato dimostrato che il MUNE è moderatamente correlato alle prove funzionali in SMA II e in SMA III non deambulanti, mentre non mostra correlazione significativa nel gruppo di pazienti SMA III deambulanti.

Il MUNE e il CMAP sono due parametri affidabili che vengono utilizzati come misura di outcome negli studi clinici. La loro validità è stata confermata nello studio preclinico con animali, infatti nei modelli murini trattati con oligonucleotide antisense o terapia genica, queste misure sono state corrette dopo i trattamenti (Arnold et al. 2014).

1.6.2. IMAGING

In letteratura esistono pochi studi di tomografia computerizzata (CT) dei muscoli in SMAII e SMAIII e ancora meno quelli sulla risonanza magnetica (MRI) (Liu et al.,1994, Quijano-Roys et al.,2012)

Il modello di coinvolgimento muscolare nella SMA3 è diverso da quello della distrofia muscolare di Becker (BMD). Nella BMD, il gluteo massimo è preferibilmente interessato e l'ileopsoas è relativamente preservato fino a fasi tardive. Sebbene i muscoli della coscia posteriore siano maggiormente coinvolti in alcuni tipi di distrofie muscolari dei cingoli degli arti inferiori (LGMD), simili alla BMD, i muscoli della coscia anteriore possono essere preferibilmente coinvolti in altri tipi di LGMD.(Tasca et al.,2012)

Il danno preferenziale del muscolo ileopsoas, in combinazione con un coinvolgimento precoce del muscolo tricipite brachiale, è altamente significativo, sebbene non patognomonico, di SMA. Inoltre il muscolo quadricipite femorale è gravemente coinvolto radiologicamente, e la sua gravità va di pari passo con quella del muscolo ileopsoas. Invece si osserva un risparmio relativo del muscolo adduttori lungo, gracile e sartorio. (Liu et al.,1994, Quijano-Roys et al.,2012)

In un recente studio si è osservato che il muscolo deltoide degli arti superiori, parti dei muscoli posteriori della coscia e abduttori delle cosce negli arti inferiori sono relativamente conservati. Anche i muscoli dell'addome del retto sono stati risparmiati.

I risultati di alcuni di questi studi sembrano confermare le descrizioni cliniche di un coinvolgimento più grave dei muscoli quadricipiti femorale dei muscoli ileopsoas invece gli adduttori lunghi, gracili e muscoli sartori sono stati come già noto relativamente risparmiati.

Considerando l'innervazione dei muscoli coinvolti, si può ipotizzare che i segmenti lombare e cervicale inferiore siano più vulnerabili all'insorgenza della malattia. I muscoli più gravemente coinvolti, ileopsoas e quadricipite femorale, sono innervati dai segmenti lombari superiori, mentre il gluteo massimo preservato è innervato dai segmenti sacri superiori. Il tricipite brachiale è innervato principalmente dal segmento C7, mentre i bicipiti conservati e i muscoli deltoidi sono innervati dai segmenti C5 e C6. I segmenti toracici (muscolo retto dell'addome) sembrano risparmiati.

Sebbene la perdita di funzionalità nel tempo fosse evidente nella SMA II-SMA III , è difficile dimostrare che questa perdita è dovuta a progressiva debolezza muscolare. Questo potrebbe essere documentato solo in studi con lunghi periodi di follow-up di circa 10 anni, a causa della natura lentamente progressiva della malattia(Iannaccone et al.,2000). Studi precedenti di risonanza magnetica della SMA non hanno affrontato la progressione della malattia. Un recente studio sulla misurazione del volume muscolare della coscia mediante RM in soggetti SMA2 e SMA3 ha rivelato un cambiamento minimo dell'intervallo nell'arco di 6 mesi e gli investigatori hanno concluso che la SMA è una malattia "stabile".

1.6.3 NEUROFILAMENTI

I Neurofilamenti (Nfs) sono proteine citoscheletriche specifiche dei neuroni con un diametro caratteristico di 8-10 nm e sono membri della famiglia dei filamenti intermedi (Lee et al 1996). Sono presenti nel corpo cellulare e negli assoni e sono coinvolti nella crescita, nella stabilizzazione e nella polarizzazione delle cellule neurali, garantendo una conduzione assonale efficace.

In base al peso molecolare delle loro subunità, i Nfs sono classificati in catene leggere (NfL), medie (NfM) e pesanti (NfH). Le subunità dei Nfs sono formate da un dominio α -elicoidale non variabile, una testa globulare amminico-terminale variabile e un dominio carbossi-terminale (Khalil et al 2018). Modifiche post-traduzionali come la fosforilazione e la O-glicosilazione sono cruciali per l'aggregazione dei neurofilamenti, specialmente in NfM e NfH (Lee et al 1996).

Essendo altamente espressi in assoni mielinizzati di grosso calibro, i Nfs vengono rilasciati nello spazio extracellulare (Fig.7) e i loro livelli aumentano nel sangue e nel liquido cerebrospinale in proporzione al grado di danno assonale, sia in condizioni normali che patologiche (Reiber et al 1994). L'invecchiamento fisiologico è stato associato ad un aumento dei livelli di NfL nel sangue e nel liquido cerebrospinale, probabilmente a causa della riduzione del turnover del liquor, del danno assonale strutturale lentamente progressivo e delle alterazioni metaboliche nel catabolismo dei Nfs (Khalil et al 2018). Inoltre, è stata trovata una maggiore quantità di Nfs in pazienti affetti da varie malattie neurologiche, come la sclerosi multipla, in cui è stato riscontrato che i Nfs sono correlati a disabilità e attività infiammatoria, le malattie cerebrovascolari, i trauma cranici e le malattie neurodegenerative, tra cui la malattia di Alzheimer, la demenza fronto-temporale, il morbo di Parkinson e la SLA (Khalil et al 2018). In particolare, è stato ipotizzato che l'alterato trasporto dei Nfs lungo l'assone e il loro successivo accumulo nel corpo cellulare, possano provocare la morte dei

motoneuroni (MNs) nella SLA, ipotizzando un ruolo dei Nfs nella neurodegenerazione. Visto che la loro affidabilità e riproducibilità è stata dimostrata in vari studi, i Nfs sono considerati perciò come biomarcatori utili e promettenti nella diagnosi delle malattie del motoneurone, sia per monitorare la progressione della malattia, sia per valutare la risposta farmacologica (Gagliardi, Meneri et. al 2019).

Un recente studio ha suggerito che i neurofilamenti pesanti fosforilati (p-NfH) plasmatici potrebbero essere sfruttati come biomarcatori della risposta al trattamento con Nusinersen nei pazienti SMA I: in questi pazienti sono stati riscontrati elevati livelli di p-NfH rispetto ai controlli, con conseguente rapido declino dei livelli di p-NfH dopo soli due mesi dall'inizio del trattamento, fino a raggiungere una variazione relativa del 90,1% a 10 mesi (Darras et al 2019).

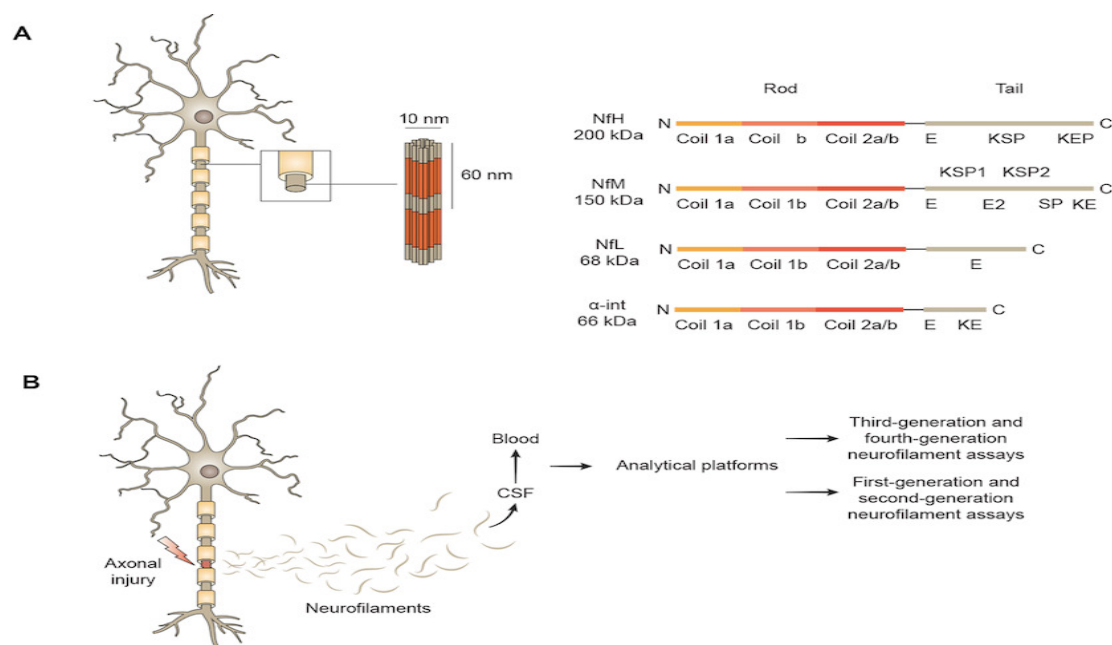


Fig7 Rappresentazione del neruofilamento a) motoneurone sano b) danno motoneurale

Diagnostic and prognostic role of Blood and Cerebrospinal Fluid and blood neurofilaments in Amiotrophic lateral Sclerosis: A review of the Literature Gagliardi D, Meneri.M 2019

1.7 STANDARD DI CURA

Gli standard di cura utilizzati sussistono nel fornire assistenza ventilatoria meccanica, sottoporre i pazienti alla chirurgia spinale per scoliosi, nutrizione enterale tramite PEG, cure palliative e fisioterapia

L'insufficienza respiratoria rappresenta la principale causa di decesso negli pazienti affetti da SMA (principalmente di tipo I e). I bambini che non riescono a sedersi se non viene introdotto alcun supporto respiratorio di solito muoiono entro 2 anni.

La popolazione è generalmente divisa in ambulant, sitter e non sitter; questi ultimi rappresentano il sottotipo di pazienti più fragili. Le loro famiglie devono essere informate già nelle prime fasi di malattia sulla ventilazione non invasiva (NIV), gestione della secrezione e vaccinazioni di routine raccomandate (come il vaccino antinfluenzale, il vaccino contro lo pneumococco e la profilassi del virus respiratorio sinciziale con palivizumab); inoltre devono essere consapevoli della possibilità dell'introduzione di tracheostomia permanente (Wang et al., 2007).

La fisioterapia mirata, la macchina della tosse e la ventilazione non invasiva (NIV) migliorano la qualità della vita, aumentano sopravvivenza (Han et al., 2015; Lemoine et al., 2012).

In questo campo il maggiore avanzamento terapeutico è rappresentato dall'introduzione di BiPAP ovvero di una macchina che fornisce pressione positiva durante l'inspirazione creando un gradiente di ispirazione-espiazione più grande, al fine di aumentare il volume corrente. Questo meccanismo funziona meglio se regolato con la respirazione spontanea e per brevi periodi come la notte. BiPAP può essere impostata come NIV o come ventilazione invasiva attraverso la tracheostomia (Sumner et al., 2017).

È probabile che i pazienti con SMA sviluppino nel corso della storia clinica patologie ortopediche anche molte gravi legate alla debolezza muscolare che porta a sua volta a mobilità limitata e talvolta persino ad osteoporosi e/o fratture (Wang et al., 2007). Le anomalie scheletriche hanno un forte impatto sui diversi sistemi: la deformità spinale può peggiorare la funzione polmonare. La scoliosi complica il quadro clinico fino al 95% dei pazienti con SMA, principalmente di tipo I e II. La sua gestione varia da trattamenti non chirurgici, per rallentare la progressione della scoliosi come fisioterapia, terapia occupazionale, ortesi e sedute ergonomiche a trattamenti chirurgici come la fusione spinale con fissazione iliaca per stabilizzare l'asimmetria pelvica. L'età e lo stato di maturazione del tessuto osseo, l'obesità, lo stato nutrizionale, la flessibilità spinale residua, la funzione polmonare e la progressione della scoliosi sono aspetti essenziali da prendere in considerazione quando si considera un intervento chirurgico. L'esperienza suggerisce che prima viene eseguita la chirurgia, migliori sono i risultati, ma in genere è più vantaggioso nei pazienti di età superiore ai due anni e con una sufficiente riserva polmonare.

Si pensa che i pazienti SMA soffrano di malnutrizione in primo luogo a causa dell'atrofia muscolare e in secondo luogo a causa della disfunzione bulbare. Quest'ultima causa compromissione sia dell'alimentazione e sia della deglutizione (elevata probabilità di polmoniti da aspirazione) ed è solitamente accompagnata da disfunzione gastrointestinale come motilità alterata, costipazione, svuotamento gastrico ritardato e reflusso gastro-esofageo.

La malnutrizione ha anche un forte impatto sulla crescita, specialmente nei *non sitters*. Sebbene la malnutrizione sia comune nella SMA, finora non esiste un chiaro consenso sui tempi di avvio del supporto nutrizionale (Farrar et al., 2017).

Al fine di evitare queste conseguenze pericolose per la vita, strategie utili consistono nella modifica della consistenza del cibo introducendo una dieta con formule semisolide (con riduzione

dell'assunzione di grassi a causa di anomalie della beta-ossidazione, aumento dell'assunzione proteica per contrastare la perdita muscolare e l'atrofia), riducendo i tempi di alimentazione. Non è stato raggiunto un consenso sul momento ideale per il posizionamento della PEG, sia per via percutanea che mediante tecniche chirurgiche (Wang et al., 2007)

2. TERAPIA

Una volta considerata una malattia non curabile attualmente la SMA è diventata una delle patologie neurologiche più interessanti non solo per i farmaci approvati dalle agenzie del farmaco (FDA) / (EMA), ma anche per le nuove prospettive terapeutiche.

I meccanismi più efficaci sono quelli che ripristinano il livello proteico di SMN. Questo risultato può essere ottenuto o agendo sul gene SMN2 in modo da incrementare la quantità di proteina funzionante trascritta o somministrando nella cellula il gene SMN1 funzionale sostituendo così il gene difettoso.

2.1 FARMACI RIPROPOSTI

Prima degli ultimi due anni la SMA era considerata una malattia non trattabile e studi clinici sul potenziamento della produzione di SMN e/o sull'aumento della sopravvivenza venivano eseguiti somministrando farmaci noti già sottoposti all'approvazione dell'agenzia farmaceutica.

La possibilità di sfruttarli è vantaggiosa sotto diversi punti di vista: nessun ulteriore finanziamento per sviluppare una molecola completamente nuova, assenza di periodi di approvazione dalle agenzie del farmaco, analisi post-marketing già state eseguite e quindi in tutti i casi i composti sono considerati sicuri. Finora, tuttavia, questi trattamenti non hanno ancora avuto molto successo.

- Inibitori del histone deacetilasi (HDAC)

In questa categoria fanno parte i farmaci come butirrato di sodio (Chang et al., 2001), fenilbutirrato (Andreassi et al., 2004), agiscono sul controllo epigenetico attraverso riattivazione dell'espressione genica. In particolare l'acido valproico ha dimostrato di aumentare la trascrizioni del SMN in vitro (Brichta et al., 2003; Sumner et al., 2003) e in vivo (Tsai et al., 2008). L'acido valproico è stato studiato in cinque studi clinici (NCT01033331, NCT00227266, NCT00374075, NCT00481013, NCT00661453) ma i risultati previsti non sono stati raggiunti (Swoboda et al., 2009). Lo stesso per il fenilbutirrato (Mercuri et al., 2007).

- Neuroprotettivi

- Riluzolo è già stato approvato dalla FDA per la SLA (Doble, 1996). Il farmaco inibisce il rilascio presinaptico glutamatergico e protegge dall'eccitotossicità. Uno studio clinico di fase ha dimostrato la sicurezza del farmaco in assenza di miglioramento della funzione del MN (Russman et al., 2003).
- L'idrossiurea inibitore della ribonucleotide reduttasi, è stata testata in vitro con risultati accettabili, mostrando aumento di SMN nei linfociti SMA (Grzeschik et al., 2005)

- Antibiotici

In questa categoria il focus principale è sul Ceftriaxone. Questo noto farmaco è in grado di attraversare la barriera ematoencefalica (BBB) attraverso un trasporto attivo ed è stato dimostrato capace di aumentare il *up take* di glutammato nei topi SLA (Rothstein et al., 2005). Per quanto riguarda i topi SMA i dati preclinici dimostrano un miglioramento del fenotipo neuromuscolare (Nizzardo et al., 2011)

2.2 FARMACI NON SMN - TARGET

Sebbene la SMA sia principalmente una patologia del MN, sono stati fatti molti sforzi per sviluppare farmaci che non agiscono solo a livello degli motoneuroni. Questo perché ci sono evidenze cliniche e sub-cliniche di un coinvolgimento dei tessuti periferici, suggerendo che il *targeting* esclusivamente del sistema nervoso potrebbe essere insufficiente come terapia a lungo termine. È quindi utile sviluppare strategie alternative al fine di affrontare i processi patologici cronici della SMA (Bowerman et al., 2017).

- Olesoxime (TRO19622) è finora l'unico composto esistente con un effetto neuroprotettivo

che agisce a valle del SMN. È un farmaco attivo per via orale con una struttura simile al colesterolo (infatti è altamente lipofila ed è in grado di attraversare il BBB) che agisce all'esterno membrana mitocondriale modulando la sua permeabilità verso i vari fattori di stress ossidativi (Bordet et al., 2007). È già stato classificato farmaco orfano della FDA per la SLA e SMA (Bordet et al., 2010). All'inizio del 2017 Bertini et al. ha pubblicato i risultati di un studio multicentrico di fase 2 su 160 pazienti di età compresa tra 3 e 25 anni con pazienti SMA II e III non ambulatoriale (Bertini et al., 2017). Sebbene gli endpoint primari (miglioramento della funzione motoria) non fossero raggiunti, la somministrazione di olesoxime ha mostrato un rallentamento del declinico delle funzioni motorie nei pazienti sintomatici con SMA II e III (Farrar et al., 2017). Ulteriori ricerche dovranno essere condotte al fine di cercare delle specifiche funzioni motorie per le quali l'olesoxime è efficace. Inoltre, potrebbero essere condotti nuovi studi per una dose più alta del farmaco.

-CK2127107: è un composto capace di agire sulla troponina. Il razionale dell'uso di questo farmaco nasce dal riscontro di distribuzione anomala della troponina nel muscolo scheletrico dei pazienti con SMA (Stevens et al., 2008). Uno studio clinico di fase 2 è tuttora in corso (Bowerman et al., 2017).

Numerosi studi preclinici hanno identificato alcune altre molecole che non agiscono sui livelli di SMN ma che potrebbero modificare la storia clinica nei pazienti SMA, come la quercetina, BAY 55-9837, rapamicin, STL-182, Tiramsetiv.

2.3 FARMACI SMN-TARGET

Vari composti possono agire a diversi livelli per stabilizzare l'mRNA di SMN2 o la proteina SMN ,dalla trascrizione SMN2 al miglioramento al inclusione dell'esone 7 (Calder et al., 2016).

Nusinersen

Nusinersen (Spinraza®) è il primo farmaco approvato dalla FDA (FDA, 2016a) e dall'EMA (EMA, 2017) per la SMA. Il suo meccanismo si basa sull'approccio ASO: gli ASO sono sequenze corte di acidi nucleici concepite per ibridizzare sequenze specifiche, in questo caso sequenze pre-mRNA, modulando così l'espressione genica (Vacek et al., 2003; Zanetta et al., 2014). Come precedentemente descritto, più del 90% del trascritto SMN2 presenta l'assenza dell'esone 7 (SMN Δ 7). La sua inclusione è regolata da due sequenze di silenziatori intronici specifici (ISS), uno nell'introne 6 e l'altro nell'introne 7 (ISS-N1), e da due potenziatori di splicing introniche situate

nell'introne 7 (Gladman e Chandler, 2009). In effetti, enormi progressi furono possibili quando fu scoperto l'ISS-N1 (Singh et al., 2006).

Nusinersen funziona attraverso un percorso mirato al SMN inducendo una modifica di splicing: promuove l'inclusione dell'esone 7 del SMN2 che porta alla produzione della proteina FLSMN: si ibrida ISS-N1 causando riarrangiamenti della struttura del DNA mascherando il sito dove il sistema dello splicing (realizzato da hnRNP A1 / A2) si lega (Singh et al., 2017a). Sono state testate due principali famiglie ASO: 2'-O - (- 2-metossietil) -modificato (MOE) e oligomeri di morfolino (MO).

Nusinersen richiede la somministrazione intratecale (Haché et al., 2016) che garantisce una adeguata dose di farmaco al CNS (Goyal e Narayanaswami, 2018), ma non nei tessuti periferici in cui SMN rimane sotto la soglia. Al momento il programma di amministrazione approvato è composto da quattro dosi di carico (1st-3 somministrato ogni 2 settimane e il 4 dopo un mese) ed una dose di mantenimento quindi deve essere somministrato ogni quattro mesi per tutta la vita (FDA, 2016b)

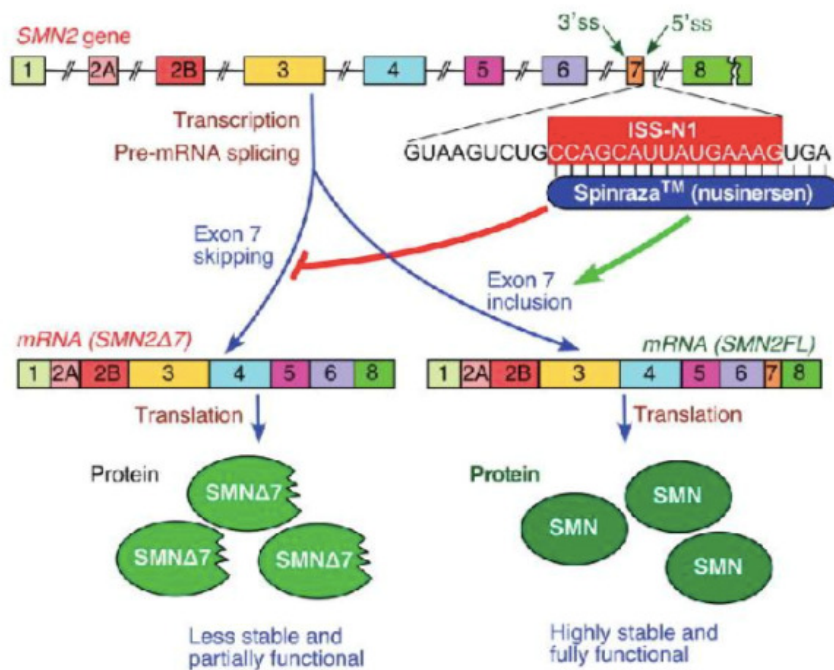


Fig8 L'immagine sopra mostra come Nusinersen interagisce con il gene SMN2 per ripristinare i livelli di proteina SMN. Legandosi sulla regione ISS-N1 su SMN2, l'ASO è in grado di impedire lo splicing e quindi includere l'esone 7 nella trascrizione finale. Ciò consente la traduzione di un SMN completo, funzionale e stabile proteina (Singh et al., 2017a)

Nel 2016 Chiriboga et al. hanno esaminato la sicurezza, la tollerabilità, la farmacocinetica e l'efficacia di Nusinersen nei bambini di età compresa tra 2-14 anni affetti da SMA infantile –lo studio clinico era disegnato su uno schema terapeutico di dosi diverse di infusione somministrata (Chiriboga et al., 2016). Gli esiti primari sono stati raggiunti nel gruppo ad alte dosi (9 mg) in pazienti con SMA II e III e quindi 24 dei 28 pazienti iniziali sono stati arruolati per uno studio di estensione a 9-14 mesi dopo la prima iniezione .

Uno studio di fase II in aperto ha arruolato 20 pazienti affetti da SMA I di età compresa tra 3 settimane e 7 mesi confermando i dati precedenti, con un programma di dose variabile (con 6 o 12

mg) (Finkel et al., 2016). Un quinto dei pazienti che hanno partecipato a questa studio sono deceduti durante il follow-up e le analisi effettuate hanno rivelato livelli di mRNA e SMN di FL SMN2 fino a sei volte superiori (Wurster e Ludolph, 2018).

Nel 2017 sono stati pubblicati su NEJM due studi importanti. Il primo riportava i dati di outcome tra gruppo di controllo e gruppo in trattamento con Nusinersen nella SMA I

(ENDEAR). In questo studio i bambini trattati hanno mostrato aumento della sopravvivenza (o assenza di necessità di ventilazione invasiva) rispetto al gruppo controllo (Finkel et al., 2017). I bambini arruolati erano portatori di delezione omozigote del gene SMN1 e con due copie di SMN2, di età inferiore ai 7 mesi con insorgenza della malattia prima di 6 mesi. Erano stati assegnati con un rapporto 1: 2 del gruppo di controllo rispetto al gruppo ASO (intratecale) che veniva somministrato nei giorni 1, 15, 29, 64 e una dose di mantenimento ogni 4 mesi: 80 bambini nel gruppo Nusinersen e 41 nel gruppo di controllo. La metà dei bambini del gruppo Nusinersen hanno raggiunto un miglioramento di almeno una categoria nel CHOP-INTEND . Alla fine dello studio, sono deceduti o sono stati sottoposti a ventilazione assistita permanente 39% dei bambini appartenenti al gruppo Nusinersen contro il 68% di bambini deceduti nel gruppo controllo . Questo studio è stato addirittura interrotto prima del termine prestabilito per questioni etiche nei confronti dei bambini nel gruppo di controllo, che sono stati successivamente arruolati in uno studio di estensione in aperto chiamato SHINE. Nessuno dei partecipanti ha raggiunto le normali tappe motorie, confermando che l'intervento tempestivo è essenziale affinché Nusinersen abbia una migliore efficacia.

L'altro studio fondamentale è il CHERISH che evidenzia la efficacia in pazienti con età compresa tra 2-12 anni (Mercuri et al., 2018). In questo studio sono stati arruolati 84 pazienti nel gruppo Nusinersen e 42 nel gruppo controllo. Come nel ENDEAR, più del 50% dei pazienti trattati con Nusinersen ha presentato un miglioramento di almeno 3 punti nel punteggio HFMSE; il

miglioramento risultata più evidente nei pazienti trattati non appena si manifestavano i primi sintomi. Ogni bambino che ha partecipato allo studio CHERISH è stato invitato a prendere parte a uno studio di estensione in aperto (NCT02594124). I risultati dell'EAP (Expanded Access Program) confermando un tasso di risposta del 77% con miglioramento medio di 4 punti in CHOP-INTEND(Pechmann et al., 2018). Questi due studi non hanno valutato la sicurezza del farmaco. Per questo motivo è in corso lo studio di fase II di NURTURE (NCT02386553).

Molto dovrà anche essere capito sugli effetti di Nusinersen su forme più lievi come la SMA III e IV, nonché la necessità di identificare nuovi e affidabili biomarcatori di malattia per facilitare il monitoraggio.

Terapia genica

L'idea alla base della terapia genica è quella di consegnare una copia funzionante di un gene in cellule prive di quel gene specifico. Nel 2010, Passini ha usato per la prima volta il virus AAV8 che esprime SMN nei topi SMA Δ 7 (Passini et al., 2010). La durata della vita animale è stata prolungata di 57 giorni. Nello stesso periodo l'AAV9 auto-complementare (scAAV9) è stato infuso per la prima volta per via venosa iniezione con gli stessi risultati positivi (Foust et al., 2010).

AveXis ha sfruttato questo scAAV9 che trasporta un wild type hSMN1 per sviluppare un farmaco efficace nella SMA. Poiché AAV9 attraversa la barriera ematoencefalica si pensa che una singola somministrazione endovenosa sia sufficiente per fornire un rilascio sistemico. In accordo con i dati preclinici molto promettenti, nel novembre 2017 sono stati pubblicati i primi risultati su uno studio clinico di Fase 3 in pazienti SMA I, il quale l'endpoint primario è la sicurezza e il secondario la sopravvivenza / necessità di supporto ventilatorio permanente . A 20 mesi dall'inizio dello studio

tutti i pazienti erano vivi e privi di eventi avversi. N 3 su 15 pazienti hanno ricevuto una dose bassa (coorte 1), mentre 12 hanno ricevuto una dose elevata (coorte 2): tra questi 11 sono stati in grado di sedersi senza assistenza (n.9 per almeno 30 secondi), e 2 camminavano in modo indipendente. (Mendell et al., 2017)

Nel precedente studio i bambini sono stati trattati con una singola iniezione endovenosa e i bambini che avevano già gli anticorpi contro il virus sono stati esclusi dallo studio. Le iniezioni ripetute non sono fattibili a causa della formazione anticipata di anticorpi contro scAAV9. Il farmaco ha un'azione mirata sulle cellule neuronali come neuroni e astrociti (Foust et al., 2009) agendo in modo efficiente sulle cellule post-mitotiche come le MN, ma potrebbero sorgere dei problemi quando si tratta di cellule altamente proliferative come le cellule muscolari. Inoltre sono pochi i dati sui effetti collaterali a lungo termine. Sarà quindi determinante ed inevitabile combinare diverse strategie rivolte a diversi aspetti della malattia. (Bengtsson et al., 2017; Tizzano e Finkel, 2017).

Piccole molecole

- RG7800 è un composto in fase di sviluppo di Novartis Pharmaceuticals e Hoffmann-La

Roche. Questo composto mostra affinità con i siti di splicing degli esoni 5 e 7. Nel topo SMA è in grado di fare incrementare i livelli di proteina SMN fino al 90% nel cervello e al 70% nei muscoli (Naryshkin et al., 2014). Dopo alcuni dati di effetti collaterali in ambito oculare, un altro composto simile RO7034067 (RG7916) è stato proposto. Dopo uno studio di fase I che ha fornito buone informazioni in sicurezza e tollerabilità, ci sono vari studi clinici in corso con questa nuova molecola: FIREFISH per SMA I (NCT02913482), SUNFISH per SMA II e III (NCT02908685) e

JEWELFISH (NCT03032172) per pazienti che hanno già subito altri trattamenti . (Bharucha-Goebel e Kaufmann, 2017)

- Branaplam (LMI070) è stato sviluppato da Novartis modificando una molecola splicing-modificatore già esistente (Cherry et al., 2013). Dopo risultati rassicuranti in fibroblasti e mioblasti (Palacino et al., 2015), e dopo aver studiato il suo meccanismo d'azione attraverso l'interazione con il sito di giunzione 5 'dell'introne 7 SMN2, sono stati avviati studi clinici. In Europa è attualmente in corso uno studio di fase I / II sull'uomo (NCT02268552) con somministrazione settimanale. Sono stati pubblicati due articoli con risultati provvisori, che riportano alcuni miglioramenti nella funzione motoria (Shorrock et al., 2018).

3. SCOPO DELLO STUDIO

L'atrofia muscolare spinale (SMA) è una malattia genetica ereditaria che colpisce il secondo motoneurone con gravità variabile. Tale condizione porta alla mancata acquisizione di tappe motorie come camminare, sedersi o rotolare e/o anche le dalla perdita nel tempo delle abilità acquisite La SMA è causata da una mutazione del gene SMN1 sul cromosoma 5q13, provocando una drastica riduzione dei livelli di proteina SMN.

Negli ultimi anni sono state proposte molte strategie innovative in ambito farmacologico al fine di fornire un trattamento efficace per la SMA .

Nel dicembre 2016 è stato approvato dalla FDA e successivamente nel 2017 dall'EMA il primo farmaco per tale patologia. Questo farmaco si basa su un oligonucleotide antisenso (ASO), Nusinersen, che porta alla sintesi completa e funzionale della proteina SMN.

La scoperta di un farmaco efficace ha cambiato il decorso naturale della patologia rendendola una patologia potenzialmente curabile. I studi clinici sperimentali sono stati effettuati su pazienti affetti di SMA I, portando alla approvazione precoce di questo farmaco, mentre le indicazioni attuali terapeutiche in diversi paesi inclusa l'Italia comprendono tutte le forme di SMA.

Lo scopo di questo studio è quello di descrivere una casistica di paziente affetti da SMA in particolare:

- analizzare l'outcome dei pazienti affetti da SMA in corso di trattamento con Nusinersen intratecale con scale di valutazioni validate su patologie neuromuscolari

- valutazione di quadri di RMN muscolare e studi elettrofisiologici mirati
- l'eventuale efficacia nei paziente con diverse età e fenotipi

Inoltre uno dei obbiettivi è quello di proporre eventuali nuovi biomarcatori affidabili anche in previsione di nuove opportunità e scenari terapeutici.

Perciò il lavoro è stato articolato in due parti: una riguardante l'efficacia del Nusinersen in una coorte di pazienti seguiti presso un singolo centro (I parte – Studio di efficacia e sicurezza di Nusinersen) e una focalizzata sul dosaggio dei neurofilamenti nel liquor e il loro utilizzo come possibile biomarcatore di patologia.(II parte- Neurofilamenti come biomarcatore di Malattia)

4 MATERIALI E METODI

4.1 I PARTE – STUDIO DELLA SICUREZZA E DELL’EFFICACIA DI NUSINERSEN

Sono stati valutati n.8 paziente trattati con Nusinersen dal febbraio 2018 ad agosto 2019 presso l’UO di Neurologia Fondazione IRCCS Ca ' Granda Ospedale Maggiore Policlinico di Milano che non presentavo controindicazioni alla somministrazione di Nusinersen .

Criteri di inclusione

- Diagnosi genetica di SMA
- consenso informato per il trattamento

Criteri di esclusione:

- diagnosi di genetica di SMA non 5 q
- 1 copia di SMN 2
- controindicazioni ad esecuzione di puntura lombare (es. grave scoliosi portatori di barre metalliche a livello L4-L5, lesioni occupanti spazio a livello cerebrale)

I pazienti sono stati tutti trattati con una dose di 12 mg (5 ml) per somministrazione.(inizialmente con 4 dosi di carico ai giorni 0, 14, 28 e 63 e successivamente, con una dose di mantenimento una volta ogni 4 mesi)-secondo le raccomandazioni dell'Agenzia Italiana del Farmaco - Linee guida AIFA.

Puntura lombare e somministrazione

Pervio consenso informato i paziente sono stati sottoposti a puntura lombare a livello L4-L5 in posizione seduta o supina, prelevando 5 cc di liquor e successivamente somministrando in 1-3 min per via intratecale la dose di Nusinersen. Il paziente manteneva successivamente la posizione supina per almeno 5 ore .

In casi di pazienti con età inferiore a 18 anni, previo consenso informato degli entrambi genitori, la procedura è stata eseguita in sedazione profonda con supporto anestesilogico (continuo monitoraggio elettrocardiografico ,saturazione del O2 e misurazione intermittente della pressione sanguigna, per tutta la durata della procedura)

Valutazione Clinica

I pazienti sono stati sottoposti a visita neurologica prima di ogni somministrazione del farmaco valutando le funzioni dei nervi cranici, i riflessi osteotendinei, disfagia , eventuale recupero di tappe motorie, con una particolare attenzione alla misurazione della forza segmentaria agli arti superiori e

inferiori . La forza segmentaria si misura nei vari distretti muscolari con una valutazione da 0 a 5, in cui lo zero indica l'assenza di movimento e il 5 la capacità di movimento contro massima resistenza.

Un'ulteriore controllo clinico effettuato a distanza di 6-7 ore dalla somministrazione del farmaco valutando eventuali effetti collaterali post procedura : cefalea , segni meningei.

Scale motorie

Tutti i paziente trattati sono stati regolarmente valutati nel tempo con scale di funzioni motorie standardizzate come segue:

- Hammersmith Scala funzionale del motore estesa (**HF MSE**): si compone di 33 item classificati su una scala da 0 a 2.
 - Score 2: movimento possibile senza compensi
 - Score 1 : movimento possibile con compensi
 - Score 0 :movimento non possibile.

Il punteggio totale varia 0 a un massimo di 66; i punteggi più bassi indicano scarsa funzione motoria. Il test è stato somministrato in tutti i pazienti in tutte le sedute di trattamento.

- Revised Upper Limb Module (**RULM**) questo test è stato ideato per la valutazione della capacità motorio negli atri superiori. Il test è composto da 19 item, ciascun item valutato con uno score da 0-2. La scala è somministrato in tutti i pazienti alla prima, alla quarta e poi successivamente in ogni seduta di trattamento.

- Motor Function Measure (**MFM**) questo test comprende 32 item per pazienti dai 6 a 61 anni e 20 item per bambini sotto i 6 anni. Valutazione per item da 0-3 punti e il punteggio totale corrisponde con la somma di tutti gli item . La scala valuta tre dimensioni diverse
 - D1: le capacità motoria in piedi e i spostamenti 13 items:
 - D2 motricità assiale e prossimale 12 items
 - D3 motricità distale agli arti 7 items

è stato somministrata in tutti i pazienti alla prima, alla quarta e poi successivamente in ogni trattamento.

- 6 Minute Walking test (**6MWT**) questo test consente la misura della capacità funzionale residua di un paziente e consiste nel far camminare il soggetto per sei minuti lungo un corridoio di lunghezza minima pari a 30 metri in una superficie di marcia rigida, alla velocità scelta dal paziente . Il test è stato somministrato qualora fosse possibile (solo nei pazienti deambulanti) alla prima, alla quarta e poi successivamente in ogni seduta di trattamento.
- La scala Children's Hospital of Philadelphia Infant Test of Neuromuscular Disorders (**CHOP INTEND**) viene utilizzata per valutare le capacità motorie dei pazienti affetti da atrofia muscolare spinale a insorgenza infantile. Il test si compone di 16 items, utilizzati per valutare le capacità motorie. Ciascun elemento è validato su una scala da 0 a 4, dove 0 sta per assenza di risposta ad un particolare test e 4 sta per risposta nella norma. Il punteggio totale varia da 0 a 64 .Le condizioni cliniche di questi pazienti sono state valutati in collaborazione con l'ospedale pediatrico di riferimento.

Acquisizione RMN muscolare

Tutti i pazienti inclusi nello studio sono stati sottoposti a studio di RM neuromuscolare mediante apparecchiatura 1.5 T (Philips Achieva, Philips Healthcare, Best, theNetherlands) con utilizzo della bobina Sense XL TORSO a 16 canali. I soggetti sono stati

posizionati feet-first sul lettino con la bobina a livello bacino-femorale, le braccia sul torace e la testa su un cuscino. Ogni esame acquisito è stato valutato avere una buona qualità di immagine.

Il protocollo di RM è stato effettuato su più distretti corporei per valutare la distribuzione dell'atrofia muscolare. Per ogni paziente sono stati valutati mediante scansioni assiali a 5 mm di spessore i muscoli del cingolo pelvico, della coscia e della gamba, con il seguente protocollo RM: ***T1 TSE, T2 STIR, 3- Point DIXON, sequenze di rilassometria T2***. E' stata inoltre utilizzata una sequenza DTI a 15 direzioni per la valutazione dei muscoli della coscia. Il tempo complessivo dello scan è stato di circa 60 minuti per paziente.

La sequenza 3-point DIXON è stata utilizzata per la quantificazione della degenerazione fibro-adiposa dei fasci muscolari, espressa come Mean Fat Fraction (MFF, %). La procedura di elaborazione della MFF è stata eseguita utilizzando il software Image J. Dalla sequenza mDIXON-Quant_BH è stata prodotta la mappa di percentuale di grasso (MFF) tramite la formula:

$$\text{FAT\%}=(F*100)/(F+W)$$

dove F indica il contributo da parte del grasso e W il contributo da parte dell'acqua nel segnale.

Successivamente, è stata presa la sequenza T1W_TSE volumetrica, coregistrata e riscalata sulla mappa MFF, e su questa sono stati segmentati gli stessi muscoli analizzati per il DTI, tramite Seed ROI 2D manuali nella sezione trasversa massima.

Per l'elaborazione del dato DTI è stato usato come software Tortoise_V2.5.0, Diffusion Toolkit e Trackvis. I dati DTI grezzi sono stati sottoposti ad una procedura di registrazione: riallineamento e correlazione al volume anatomico $b=0$ e correzione delle distorsioni causate da movimento, correnti parassite e sovracampionamento delle immagini di diffusione, con una dimensione finale del voxel di 1,5 mm.

Tutte le immagini sono state visionate da uno specialista Neuroradiologo.

Neuroelettrofisiologia

La risposta del potenziale d'azione muscolare (Compound muscle action potential, CMAP) e la stima del numero di unità motorie (Motor unit number estimation, MUNE) sono stati monitorati nel tempo, stimolando per ogni paziente il nervo ulnare dx. I valori MUNE sono stati calcolati dal rapporto del CMAP massimo con l'unità motoria singola media potenziale (SMUP). È stato ottenuto un campione di SMUP spostando l'elettrodo stimolante in più punti lungo il nervo ulnare. La tecnica di stimolazione a punti multipli si basa sull'attivazione elettrica di una singola unità motoria ad un determinato stimolo (tutto o niente). Le risposte sono state considerate tutto o niente quando erano presenti e stabili (senza frazionamento) in un dato livello di stimolazione e assente ad un livello inferiore dell'attivazione. I calcoli di MUNE sono basati della area sottostante del picco negativo. Le risposte CMAP e SMUP sono state registrate con elettrodi adesivi sull'eminenza ipotenar.

4.2 II PARTE DI STUDIO - NEUROFILAMENTI POTENZIALI BIOMARCATORI

I pazienti SMA III sono stati reclutati presso l'Unità di Neurologia della Fondazione IRCCS Ca 'Granda Ospedale Maggiore Policlinico di Milano e presso l'Unità di Neurologia dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Pisa.

I pazienti sono stati valutati con un follow-up di 6 mesi, a partire dalla prima somministrazione di Nusinersen e nei giorni di trattamento successivi (a due settimane e ad uno, due e sei mesi dal primo trattamento, secondo l'Agenzia Nazionale del Farmaco nazionale - Linee guida AIFA).

Tutti i pazienti sono stati regolarmente valutati nel tempo con scale motoria standardizzate:

- Hammersmith Functional Motor Scale Expanded (HFMSSE)
- 6 Minute Walking Test (6MWT) per pazienti deambulanti.

Tutti i soggetti e i genitori di minori hanno fornito un consenso informato per la raccolta, la conservazione e l'analisi dei materiali biologici secondo le disposizioni dei comitati etici locali

Analisi CSF

I campioni del liquor cefalorachidiano sono stati raccolti prima della somministrazione intratecale di Nusinersen. In ogni seduta di somministrazione del farmaco i liquor prelevati sono stati analizzati presso laboratorio centrale locale per esame chimico fisico :

- glicemia
- proteine
- cellule

I dosaggi di NF su liquor sono stati eseguiti su campioni ottenuti sul primo (pre-trattamento) e sulla somministrazione a sei mesi .

Inoltre sono state condotte analisi del liquido cerebrospinale su campioni selezionati di soggetti e pazienti sani con diverse condizioni neurologiche (esclusi i disturbi neurodegenerativi / dei motoneuroni) con un'età comparabile ai pazienti con i pazienti SMA studiati.

I livelli di pNfH e NfL nel liquor sono stati misurati usando commercialmente kit di analisi degli immunosorbenti (ELISA) disponibili per enzimi (pNfH: Euroimmun, Lubeca, Germania - NfL: UmanDiagnostics AB, Umea, Svezia) secondo le istruzioni del produttore.

Lo studio è stato condotto in conformità con la Dichiarazione di Helsinki e ha seguito le linee guida ICH GCP. Tutti i soggetti e i genitori di minori hanno fornito il consenso informato scritto per la raccolta, la conservazione e analisi di materiali biologici secondo le disposizioni dei comitati etici locali.

5. ANALISI STATISTICA

Le caratteristiche della popolazione sono state analizzate attraverso statistiche descrittive, le variabili continue sono state riportate come media \pm DS o mediana [IQR], a seconda dei casi. Sono state rappresentate le variabili categoriali come numeri e percentuali. La normalità delle distribuzioni è stata valutata visivamente dalla rappresentazione del *box plot* e valutata con il test di D'Agostino-Pearson.

Per entrambi pNfH e NfL, i valori inferiori a quelli inferiori il limite di quantificazione sono stati approssimativamente definiti come la metà della concentrazione più bassa calibrata (50 pg / mL e 0,0625 ng / mL per NfL e NfH, rispettivamente).

Confronti tra i gruppi sono stati eseguiti con il Mann- Test di Whitney. I confronti all'interno del gruppo nel tempo sono stati effettuati mediante test t accoppiati o Wilcoxon , dove fosse appropriato. Le associazioni tra variabili sono state valutate con il coefficiente di correlazione di Spearman non parametrico.

Differenze statisticamente significative sono state assunte al 5% di livello di probabilità. Tutte le analisi sono state eseguite con GraphPad Prism versione 8 (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA USA).

6. RISULTATI

6.1 I PARTE – STUDIO DELLA SICUREZZA E DELL’EFFICACIA DI NUSINERSEN

I paziente trattati dal febbraio 2018 ad agosto 2019 sono in totale 8 di cui M :5 e F: 3 come riportato in Tabella 2. L’età media dei paziente tratti è di 21 anni (3 mesi - 43 anni)

La nostra casistica comprende in maggioranza pazienti affetti da SMA III (7 casi su 8).

	Sesso	Tipo SMA	Mut.SMN1	N.Copie SMN2	Età insorgenza	Deambulazione	Spirometri a	Eta inizio trattamento	N. Infusioni
Pz1	M	III	<i>del ex 7 c.389A>G (p.Y130C)</i>	2	14 anni	No	Normale	29 anni	4+4
Pz2	M	III	<i>del ex 7 - 8 (Homo)</i>	3	15 mesi	Si	Normale	13 anni	4+3
Pz3	M	III	<i>del ex 7 - 8 (Homo)</i>	3	3 anni	Si	Normale	32 anni	4+2
Pz4	M	III	<i>del ex 7 (Homo)</i>	3	15 anni	Si	Rest	35 anni	4+2
Pz5	F	III	<i>del ex 7 (Homo)</i>	3	3 anni	Si	Normale	11 anni	4+2
Pz6	F	III	<i>del ex 7 (Homo)</i>	3	18 mesi	Si	Normale	9 anni	4+2
Pz7	F	III	<i>del ex 7 (Homo)</i>	2*	2 anni	No	Rest	43 anni	4
Pz8	M	I	<i>del ex 7 (Homo)</i>	2	1 mesi	NA	Rest	3 mesi	4+1

Tab 3.Descrizione della popolazione in studio

La mutazione più frequente è quella di una delezione in omozigosi a carico del esone 7. Come anche precedentemente descritto in letteratura il numero delle copie di SMN2 corrisponde con la gravità del quadro clinico , perciò nelle nostra casistica costituita da SMA III la maggior parte dei paziente presenta 3 copie di SMN 2.

Il *paziente 1* presenta un quadro SMA III essendo portatore di solo 2 copie di SM 2 . Questa condizione particolare è spiegata dal fatto che il paziente è portatore di una mutazione missense c.389A>G (p.Y130C) . In letteratura questa mutazione genera un allele meno funzionale (ipomorfo) , e il quadro clinico non correla perciò con il numero di SMN2. Il paziente di fatto ha presentato i primi sintomi all'età di 14 anni e solo di recente ha perso la capacità a deambulare.

La paziente 7 invece è portatrice di una delezione in omozigosi del ex 7 SMN1 ma presenta un quadro di SMA di tipo III essendo portatrice di una variante c.859G>C con effetto modificatore del comportamento di SMN2 in grado di mitigare la clinica dei pazienti deleti omozigoti per SMN1. Di fatto è descritto in letteratura che questa variante aumenti la trascrizione integrale originata dagli alleli SMN2.

L'esordio dei sintomi è in media intorno ai 3 anni di vita e varia: nella forma SMA I già nelle primi mesi di vita, invece nelle forme SMA3 I anche a 15 anni. I primi disturbi sono associati con difficoltà nella deambulazione condizionando plurime cadute a terra.

Nella nostra casistica solo un paziente non ha raggiunto mai la capacità di deambulare (paziente 8- SMA I) .Nei pazienti SMA III della nostra corte tale capacità è ancora mantenute nel 71 % dei casi (

5 pazienti su 7). La deambulazione è stata persa per il paziente 1 nell'età di 18 anni e per la paziente 7 nell'età di 12 anni .

L'età media nel momento della prima somministrazione del farmaco nella coorte di soli pazienti SMA III è di 25 anni, e varia da 9 anni a 43 anni. In media dal primo sintomo all'inizio del trattamento sono passati in media oltre ai 19 anni con una finestra che varia da 7 anni ai 41 anni.

Tutti i pazienti sono stati sottoposti come da indicazioni AIFA a dose di carico di n. 4 somministrazioni di Nusinersen e somministrazioni successive ogni 4 mesi.

Nei pazienti SMA III il paziente 1 ha eseguito 8 infusioni intratecali in totale; il paziente 2 ha effettuato 7 infusioni ;la paziente 7 ha effettuato solo la dose di carico e gli altri pazienti sono stati sottoposti attualmente a 6 infusioni. Il paziente SMA I è stato sottoposto a 5 infusioni intratecali. Tutte le procedure sono state ben tollerate senza importanti complicazioni peri procedurali. L'unico effetto collaterale è stata la cefale post procedurale (3 pazienti su 7) .

I valori degli esami ematochimici completi di emocromo con formula, funzionalità renale e funzionalità epatica non hanno evidenziato alterazioni di nessuno dei valori (eccetto per i valori bassi di creatinina , dato compatibile con la patologia di base) L'analisi dei liquor non ha evidenziato in nessuna delle somministrazioni alterazioni di proteine/ cellule/glucosio.

Valutazione clinica

Tutti i pazienti sono stati sottoposti a valutazioni cliniche neurologiche prima di ogni somministrazione del farmaco.

I riflessi osteotendinei sono aboliti sia a livello degli arti inferiori che superiori in tutti i pazienti. Nessuno dei pazienti ha presentato coinvolgimento dei nervi cranici. In 3 casi su 7 dei pazienti affetti da SMA III è presente tremore distale fine.

Come si osserva nelle Tab 4a e 4b non si è osservato un miglioramento significativo della forza segmentaria. La compromissione della forza segmentaria riguarda principalmente i muscoli prossimali degli arti inferiori e la perdita di forza si correla con la perdita della deambulazione. I muscoli principalmente colpiti sono il quadricipite ed ileopsoas con MRC che varia da 1 fino ad un punteggio massimo di 3. Questi punteggi non sono correlati significativamente con la durata di malattia (correlazione tra MRC quadricipite e durata malattia : $r=-0.61$ $p=0.16$)

In genere il coinvolgimento muscolare è simmetrico e nessuno dei pazienti ha mostrato peggioramento significativo nel follow up.

Nessuno dei pazienti SMA III presenta alla valutazione compromissione della deglutizione. Il paziente SMA I presenta una grave disfagia con necessità di alimentazione enterale.

Tutti i pazienti eseguono follow up spirometrico e solo in 3 casi presentano quadro di insufficienza respiratoria di tipo restrittivo. In 2 pazienti (pz 7 e pz 8) il quadro restrittivo necessita di ventilazione assistita notturna e nel pz.4 il quadro si presenta di grado lieve senza necessità di trattamento.

I pazienti presentano grado vario di scoliosi e la paziente 7 è stata sottoposta ad intervento di correzione della colonna con barra di Harrington.

L'intervento di allungamento dei tendini è stato eseguito nella paziente 7 all'età di 16 anni senza beneficio e nel paziente 2 con iniziale miglioramento delle performance motorie.

Paziente 1	DX			SIN		
	I somm	IV somm	V somm	I somm	IV somm	V somm
Trapezio	5	5	5	5	5	5
Bicipite Brachiale	3 1/2	3 1/2	3 1/2	3	3 1/2	3 1/2
Tricipite Brachiale	3	3	3	2	2	2 1/2
Prensione	5	5	5	5	5	5
Quadricipite	2	2	2	2	2	2
Ileopsoas	1	1	1	1	1	1
T. anteriore	1	1	1	1	1	1
T. posteriori	1	1	1	1	1	1

Paziente 2	DX			SIN		
	I somm	IV somm	V somm	I somm	IV somm	V somm
Trapezio	5	5	5	5	5	5
Bicipite Brachiale	4-	4-	4-	4	4	4
Tricipite Brachiale	3	3	3	3-	3-	3-
Prensione	5	5	5	5	5	5
Quadricipite	2	2	2	2	2	2
Ileopsoas	2	2	2	2	2	2
T. anteriore	4	4	4	4	4	4
T. posteriori	4	4	4	4	4	4

Paziente 3	DX			SIN		
	I somm	IV somm	V somm	I somm	IV somm	V somm
Trapezio	3	3	3=	3	3	3
Bicipite Brachiale	3+	3+	3=	3=	3=	3=
Tricipite Brachiale	2=	2=	2	2	2	2
Prensione	3=	3=	3	3=	3=	3=
Quadricipite	2	2	2	2=	2=	2=
Ileopsoas	1	1	1	1	1	1
T. anteriore	3	3	3	3	3	3
T. posteriori	3	3	3	3	3	3

TAB4.a Valutazione cliniche : Misurazioni di MRC dei principali muscoli prima di ogni seduta di trattamento

Paziente 4	DX			SIN		
	I somm	IV somm	V somm	I somm	IV somm	V somm
Trapezio	5	5	5	5	5	5
Bicipite Brachiale	4 1/2	4 1/2	4 1/2	4	4	4
Tricipite Brachiale	4 1/2	4 1/2	4 1/2	4	4	4
Prensione	5	5	5	5	5	5
Quadricipite	2 1/2	2 1/2	2 1/2	2	2	2
Ileopsoas	1 1/2	1 1/2	1 1/2	1 1/2	1 1/2	1 1/2
T. anteriore	5	5	5	5	5	5
T. posteriori	5	5	5	5	5	5

Paziente 5	DX			SIN		
	I somm	IV somm	V somm	I somm	IV somm	V somm
Trapezio	4+	4+	5	4+	4+	5
Bicipite Brachiale	3+	3+	4	3+	3+	4
Tricipite Brachiale	2 1/2	2 1/2	3 1/2	2 1/2	2 1/2	4-
Prensione	4	4	4 1/2	4	4	4
Quadricipite	2	2	2 1/2	2	2	2 1/2
Ileopsoas	3	3	3-	3	3	3-
T. anteriore	4	4	4+	4	4	4+
T. posteriori	4	4	4	4-	4-	4

Paziente 6	DX			SIN		
	I somm	IV somm	V somm	I somm	IV somm	V somm
Trapezio	5	5	5	5	5	5
Bicipite Brachiale	5-	5-	5	5-	5-	5
Tricipite Brachiale	5-	5-	5	5	5	5
Prensione	5	5	5	5	5	5
Quadricipite	3 1/2	3 1/2	3	3 1/2	3 1/2	3 1/2
Ileopsoas	4	4	4-	4	4	4
T. anteriore	4 1/2	4 1/2	4	4 1/2	4 1/2	4 1/2
T. posteriori	5	5	5	5	5	5

TAB4b Valutazione cliniche : Misurazioni di MRC dei principali muscoli prima di ogni seduta di trattamento

Scale di valutazione

Tutti i pazienti SMA III della nostra casistica sono stati sottoposti a valutazione HFMSE prima di ogni somministrazione intratecale.

I valori ottenuti nel tempo sono riportati nella Fig.8

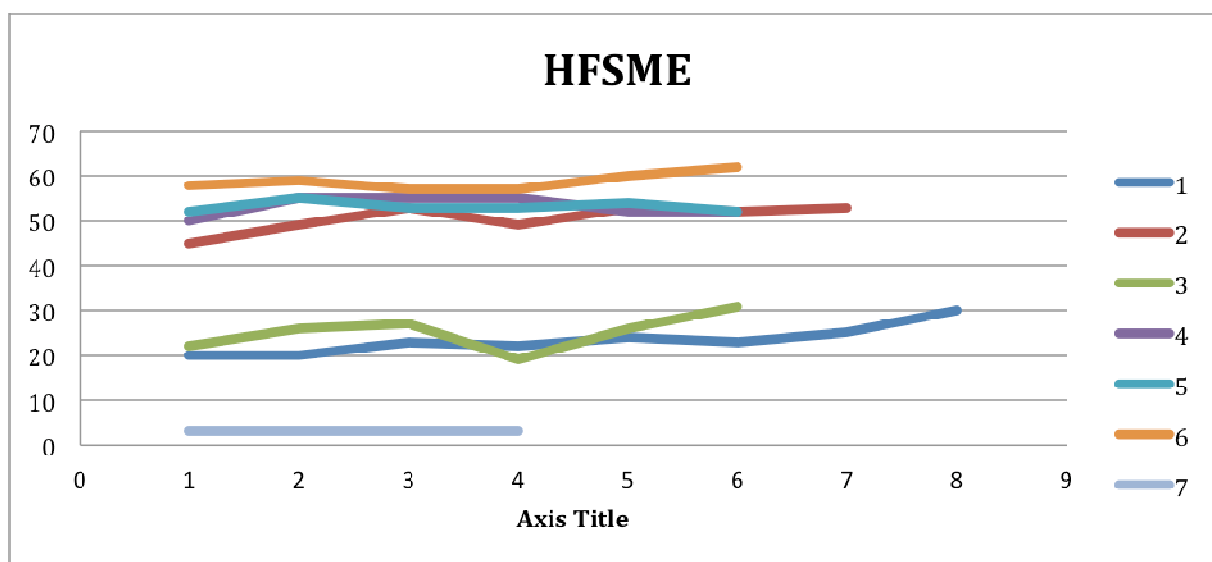


Fig.8 Punteggio HFSME di ogni pazienti prima di ogni somministrazione di Nusinersen

I pazienti presi in studio presentano valori iniziali di HFSME diversi tra di loro. 3 pazienti su 7 hanno raggiunto un punteggio < 25 / (Scala di valutazione funzionale da 0 a 60, dove il punteggio minore corrisponde a minor forza), questi pazienti hanno tutti un età maggiore di 18 anni e due hanno perso la capacità di deambulare.

Invece i pazienti che hanno ottenuto dei punteggi più alti sono quelli più giovani (eccezione per il paziente 4). Il punteggio di HFSME è correlato significativamente con la durata della malattia ($p=0.017$)

Nessuno dei pazienti ha presentato un peggioramento del punteggio HFSME a distanza di un anno dal trattamento. In media sono stati guadagnati 3,6 punti nel arco di 10 mesi variando da 2 punti (paziente 4, paziente 5, paziente 6) a 8 punti paziente 2. La variazione nel tempo dei valori della scala HFSME non è correlato significativamente né con gli anni di durata di malattia, ($r=-0,18$ $p=0,7$) né con l'età dei pazienti nel momento della prima somministrazione ($r=-0,28$ $p=0.55$)

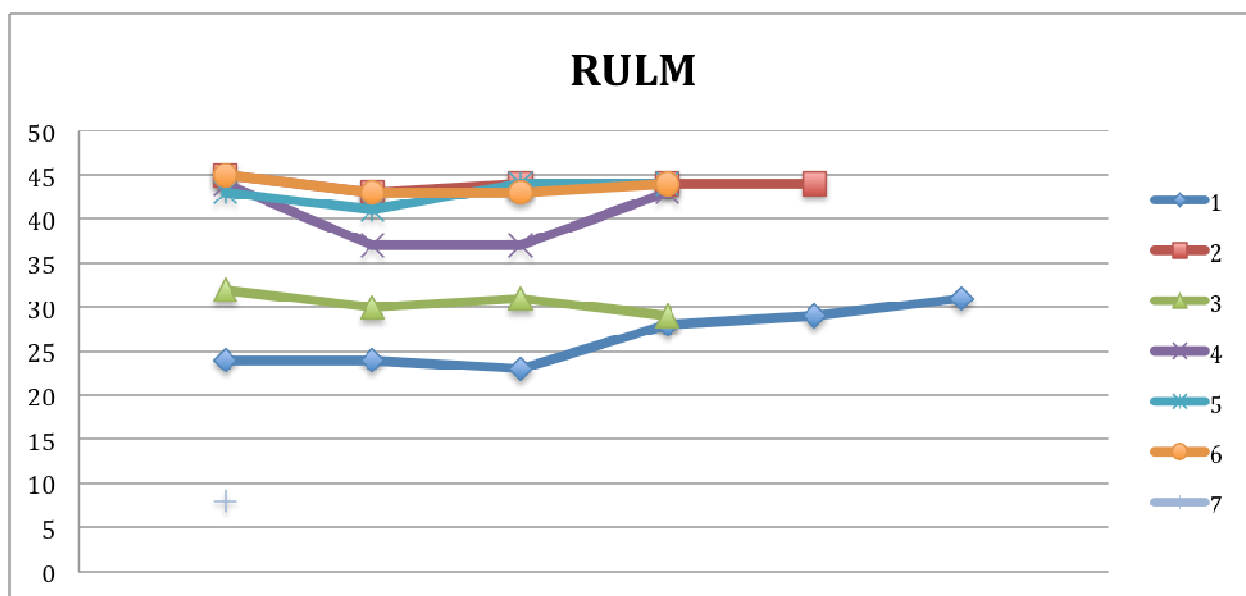


Fig.9 Punteggio HFSME di ogni pazienti prima di ogni somministrazione del Nusinersen

La scale funzionale RULM è stata applicata prima del inizio di trattamento , alla fine della dose di carico e successivamente ad ogni somministrazione. I valori sono stati mantenuti stabili nel tempo , senza un significativo miglioramento a 10 mesi di follow up ($p=0.19$) mostrando un iniziale miglioramento dopo la quinta dose del farmaco.

La scala MFM è stata effettuata in tutti i casi senza riscontro di modifiche importanti durante il corso di follow up (p=0.5).

Le funzioni motorie del singolo paziente SMA I della nostra casistica hanno registrato un miglioramento nel tempo. Dopo un iniziale deterioramento del punteggio CHOP INTEND (Fig.10) registrato tra prima e seconda infusione, si può osservare un miglioramento progressivo nei prossimi 6 mesi (da 7 a 27 punti).

CHOP - Patient 8

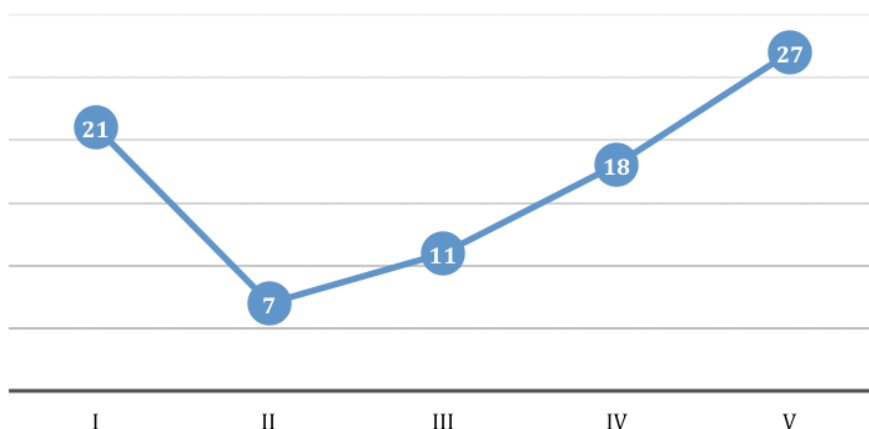


Fig.10 Valutazione CHOP paziente affetto da SMA I

Il paziente ha effettuato la prima somministrazione quando aveva 3 mesi, e ad un anno di età, conserva la capacità di respirare autonomamente ed utilizza la NIV soltanto durante le ore notturne.

Il paziente presenta grave quadro di disfagia e necessità di sondino nasogastrico per la deglutizione e tale parametro non è migliorato nel tempo.

Elelctrofisiologia

Tutti i pazienti hanno eseguito come da protocollo di studio CMAP e MUNE .

I valori registrati non hanno evidenziato modifiche nel tempo e non si è evidenziata una correlazione con la presentazione clinica o le scale di funzionalità motoria.

I valori registrati non hanno evidenziato modifiche significative nel tempo durante la somministrazione di Nusinersen come riportato nella Fig. 12 .Non è stata identificata una correlazione tra CMAP e miglioramento dei valori HFSME ($r=0,3$ $p=0.39$) Inoltre non è stata individuata una correlazione tra durata di malattia e valori CMAP ($r=-0.085$, $p=0.9$)

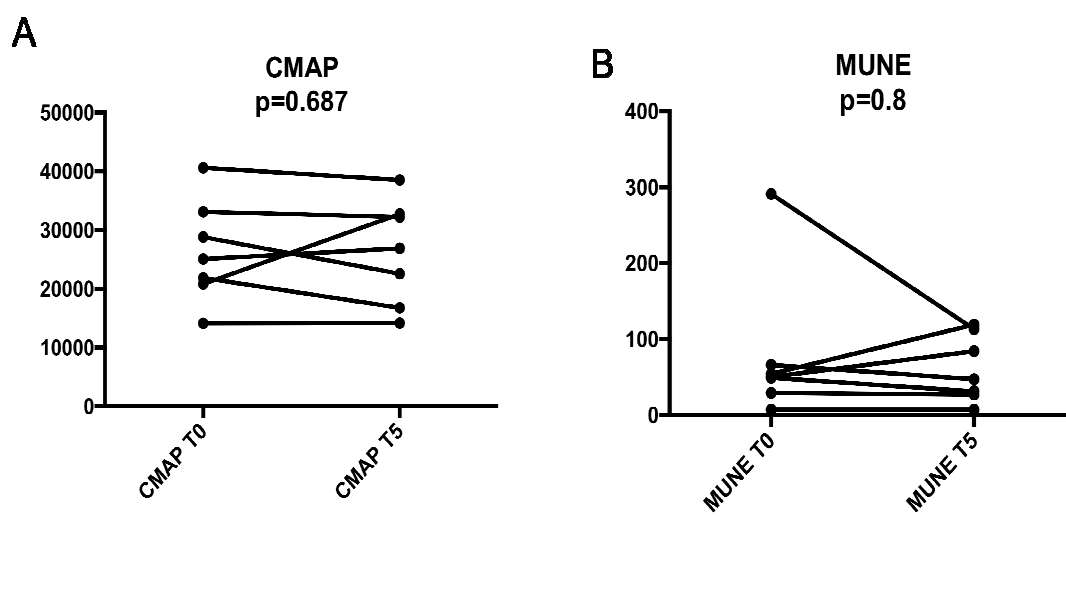


Fig 11. Correlazioni tra i valori di CMAP alla prima somministrazione e alla 5 somministrazione(A); correlazione tra i valori di MUNE alla prima e alla 5 somministrazione di Nusinersen(B)

RMN muscolare

I pazienti sono stati tutti sottoposti ha studio di RMN muscolare prima della prima infusione con Nusinersen.

Lo studio di risonanza ha rivelato in tutti i pazienti studiati un quadro variabile di sostituzione fibro-adiposa, correlato all'età dei pazienti, alla durata di malattia e alle condizioni cliniche.

Lo studio degli arti superiori e inferiori con sequenze T1 mostra atrofia della muscolatura indagata con gradiente prossimo-distale, con quadro di infiltrazione fibroadiposa maggiore a livello della muscolatura glutea e del quadricipite agli arti inferiori, e della muscolatura scapolare e del braccio agli arti superiori. I pazienti 2, 5 e 6 che sono i più giovani del campione (rispettivamente di anni 13, 9 e 11), presentano un minor coinvolgimento della muscolatura distale rispetto a quella prossimale, e un interessamento molto più marcato a carico del cingolo pelvico rispetto al cingolo scapolare. I pattern sono piuttosto simmetrici e si associano modesti aspetti di flogosi nei distretti sovradescritti. Inoltre l'infiltrazione mostra un aspetto "tigroide", che ricorda l'origine neurogena della malattia. (Fig. 12)

La paziente 7 (età 43 anni e perdita della deambulazione all'età di 12 anni) presenta un quadro di sostituzione fibro-adiposa del tessuto muscolare quasi completa a livello degli arti inferiori e un modesto coinvolgimento degli arti superiori. Questa paziente presenta i punteggi più bassi nelle valutazioni delle scale funzionali.

Solo tre pazienti hanno eseguito la RMN di controllo a distanza di un anno dal trattamento: in tutti questi pazienti lo studio dell'arto inferiore, confrontato con l'esame pre-trattamento, documenta una stabilità dei reperti senza progressione dell'atrofia e dell'infiltrazione fibroadiposa in due pazienti

(paziente 5 e 6)e in un paziente (paziente 2) ha documentato un iniziale riduzione degli aspetti di infiltrazione fibroadiposa, che sono globalmente ridotti sia a livello della muscolatura del cingolo pelvico che della coscia. Quest'ultimo paziente presenta nelle scale funzionali un miglioratene del punteggio nelle scale di HFMSE di 8 punti.

I dettagli del riscontro in RMN sono descritti n BOX 1 e BOX 2. Studi di RMN quantitativo sono ancora in corso e l'analisi statistica verrà effettuata una volta ottenuti tutte le immagini a distanza di 12 mesi di follow up.

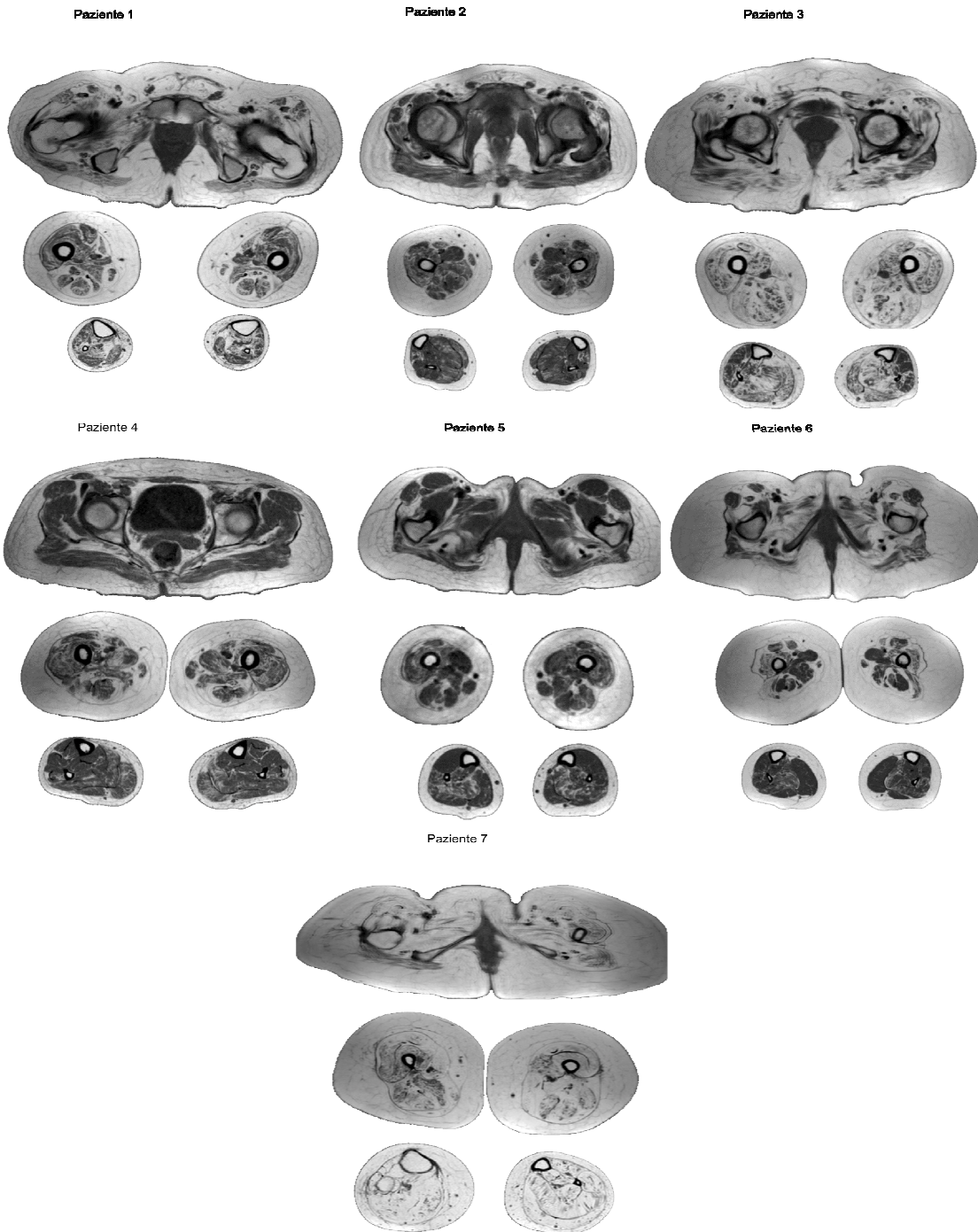


Fig 12. Sequenze T1 di Sezioni di risonanza magnetica muscolare degli arti inferiori nei pazienti affetti da SMA III

BOX 1

Paziente 1

Marcata, diffusa atrofia della muscolatura del cingolo pelvico, coscia e gamba bilateralmente (**con gradiente prossimo-distale**). *Degenerazione fibroadiposa*: laddove si osserva l'atrofia, il muscolo appare inoltre degenerato e infiltrato con pattern "striato" per conservazione di alcune fibre muscolari. A livello della gamba si osserva un relativo risparmio del muscolo tibiale anteriore e del gastrocnemio bilateralmente. *Edema*: si osserva discreta quota di edema muscolare a carico del muscolo grande, piccolo e medio gluteo, vasto mesiale bilateralmente, intermedio e laterale e, più modesta, a livello dell'adduttore magno. A livello della gamba analogamente è presente un edema muscolare a livello del tibiale anteriore e posteriore e gastrocnemio bilateralmente. Il quadro RM è caratterizzato da marcata atrofia della muscolatura indagata, più evidente a livello del cingolo pelvico e coscia, con associati aspetti di degenerazione fibroadiposa, Relativamente risparmiata la muscolatura nucale e paraspinale superiore.

Paziente 2

RMN prima del trattamento :Diffusa atrofia della muscolatura indagata più evidente a livello del cingolo pelvico e della coscia rispetto alla gamba, dove si apprezzano peraltro aspetti di pseudoipertrofia del soleo e dei gemelli.Infiltrazione fibroadiposa: i muscoli maggiormente caratterizzati dagli aspetti di infiltrazione fibroadiposa a livello del cingolo pelvico sono di glutei piccolo e medio (fat fraction intorno al 70%). A livello della coscia si apprezza una maggior interessamento della muscolatura della loggia anteriore (fat fraction intorno al 45% a livello del quadricipite, dove si apprezza relativo risparmio del retto). A livello della gamba sono maggiormente compromessi il muscolo soleo, tibiale anteriore e gemello mesiale, con pattern prevalente a destra (fat fraction intorno tra il 30-40%). Soprattutto a livello del soleo si apprezza un pattern "striato" dell'infiltrazione fibroadiposa.Edema: discreta iperintensità di segnale nelle immagini T2 con soppressione di grasso sospetta per presenza di edema a carico dell'adduttore lungo e magno, capo lungo del bicipite. A livello della gamba si apprezzano segni di edema a livello del soleo e dei gemelli mesiale e laterale bilateralmente. il quadro RM è caratterizzato da diffusa atrofia/ipotrofia della muscolatura indagata con **gradiente prossimo-distale** a livello dell'arto inferiore, con quadro di infiltrazione fibroadiposa maggiore a livello della muscolatura glutea (medio e piccolo), della loggia anteriore della coscia, del soleo e tibiale anteriore.

RMN a distanza di 12 mesi : l'esame documenta un miglioramento per quanto riguarda gli aspetti di infiltrazione fibroadiposa, che sono globalmente ridotti sia a livello della muscolatura del cingolo pelvico che della coscia, sempre mantenendo un pattern a maggior coinvolgimento della muscolatura della loggia anteriore, con risparmio del muscolo abduuttore lungo che è oggi anche maggiormente ipertrofico del controllo precedente.Meno evidente il miglioramento a carico della muscolatura della gamba, dove tuttavia non si apprezzano neppure significativi peggioramenti sia per quanto riguarda l'aspetto di degenerazione

BOX 2

Paziente 5

RMN prima del trattamento :diffusa atrofia della muscolatura indagata più evidente a livello del cingolo pelvico e della coscia rispetto alla gamba, quadro che quindi presenta un **gradiente prossimo distale**. Ipertrofici i muscoli gracile, sartorio e adduttore lungo. Infiltrazione fibroadiposa: i muscoli maggiormente caratterizzati degli aspetti di infiltrazione fibroadiposa a livello del cingolo pelvico sono di glutei mentre in corrispondenza della coscia si apprezza una maggiore interessamento della quadricipite /mean fat fraction 30% circa, dove le componenti maggiormente coinvolte sono vasto intermedio e laterale, adduttore magno, mentre sono più circoscritti gli aspetti di infiltrazione fibroadiposa a carico della muscolatura della loggia posteriore, maggiori a destra a livello del semitendinoso. A livello della gamba sono maggiormente compromessi il muscolo soleo, tibiale posteriore e peroneo lungo. Soprattutto a livello del soleo si apprezza un pattern "striato" dell'infiltrazione fibroadiposa. Conservato il tibiale anteriore. Edema: discreta iperintensità di segnale nelle immagini T2 con soppressione di grasso sospetta per presenza di edema a carico del grande gluteo, quadricite in tutte le sue componenti, adduttore magno. Quadro RM è caratterizzato da atrofia della muscolatura indagata con gradiente prossimo-distale, con quadro di infiltrazione fibroadiposa maggiore a livello della muscolatura glutea, quadricipite e adduttore magno mentre sono risparmiati i muscoli gracile, sartorio e adduttore lungo. A livello della gamba i maggiori segni sono a livello del tibiale posteriore e soleo, con risparmio del tibiale anteriore in minor misura dei gastrocnemi. Pattern piuttosto simmetrico a cui si associano modesti aspetti di flogosi nei distretti sovradescritti

RMN a distanza di 12 mesi : rispetto al controllo precedente non si apprezzano progressioni sia della atrofia che dell'infiltrazione fibroadiposa, che riguarda in particolare la muscolatura del comparto anteriore, con risparmio dei muscoli sartorio, gracile e tra la muscolatura del comparto mesiale, del muscolo adduttore lungo, ipertrofici. Anche a livello della muscolatura della gamba il quadro è stabile, continua ad apprezzarsi un maggior coinvolgimento del muscolo tibiale posteriore e del soleo, in particolare in quest'ultimo il pattern di infiltrazione mostra un aspetto "tigroide", che ricorda l'origine neurogena della malattia. Sempre conservati i muscoli gemelli e il tibiale anteriore, peraltro moderatamente ipertrofici. Riguarda valutazione delle immagini con soppressione del grasso, sono ridotti gli aspetti di edema, già modesti, precedentemente descritti, che persistono in maniera molto lieve a carico della muscolatura della loggia anteriore della coscia. In conclusione: lo studio dell'arto inferiore, confrontato con l'esame pre-trattamento, documenta una stabilità dei reperti senza progressione dell'atrofia e dell'infiltrazione fibroadiposa.

Paziente 7

RMN prima del trattamento'esame documenta una diffusa, marcata atrofia e una completa degenerazione fibroadiposa della muscolatura indagata, in tutti distretti esaminati, per cui è scarsamente riconoscibile un pattern di selettività, senza aspetti di flogosi nelle immagini acquisite.

6.2 II PARTE DELLO STUDIO- NEUROFILAMENTI POTENZIALI BIOMARCATORI

Nella seconda parte dello studio sono stati arruolati 12 pazienti con diagnosi di SMA III.

In questa casistica verranno studiati 6 dei 7 pazienti affetti di SMAIII riportati nella casistica precedente (paziente 1,2,3,4,5,6)

L'età del primo trattamento variava da 9 a 74 anni, con 9 pazienti (75%) >18 anni. La durata minima di malattia dall'inizio del trattamento è di 7,5 anni, mentre la durata massima è di 32 anni. Le caratteristiche di base sono riassunte nella Tabella 4

Caratteristiche	SMA III (n=12)
Sesso F –n (%)	4 (33%)
Età insorgenza sintomi (anni)	5.5 (2.3-14.8)
Età inizio trattamento (anno)	28.5 (15-34.8)
Durata malattia	20.1 ±10
SMN 2 copie-n (%)	
2	1 (8.3%)
3	7 (58.3%)
4	4 (33.3%)
Deambulanti-n (%)	10 (83.3%)
Compromissione respiratoria-n (%)	2 (16,7%)
HFSME (punteggio)	40.8±13.5
6 MWT9 (metri)	304±126

Tab 4 *Caratteristiche coorte*

Due pazienti hanno utilizzato sedie a rotelle dall'età di 18 e 29 anni, e altri due hanno avuto un lieve coinvolgimento respiratorio dovuto rispettivamente alla malattia polmonare restrittiva e alla sindrome ostruttiva-apnea notturna. Tutte le amministrazioni di Nusinersen erano ben tollerate e le

unico evento avverso riportato era la cefalea dopo puntura lombare in 6 (50%) soggetti dopo la prima infusione del farmaco.

prima infusione del farmaco.

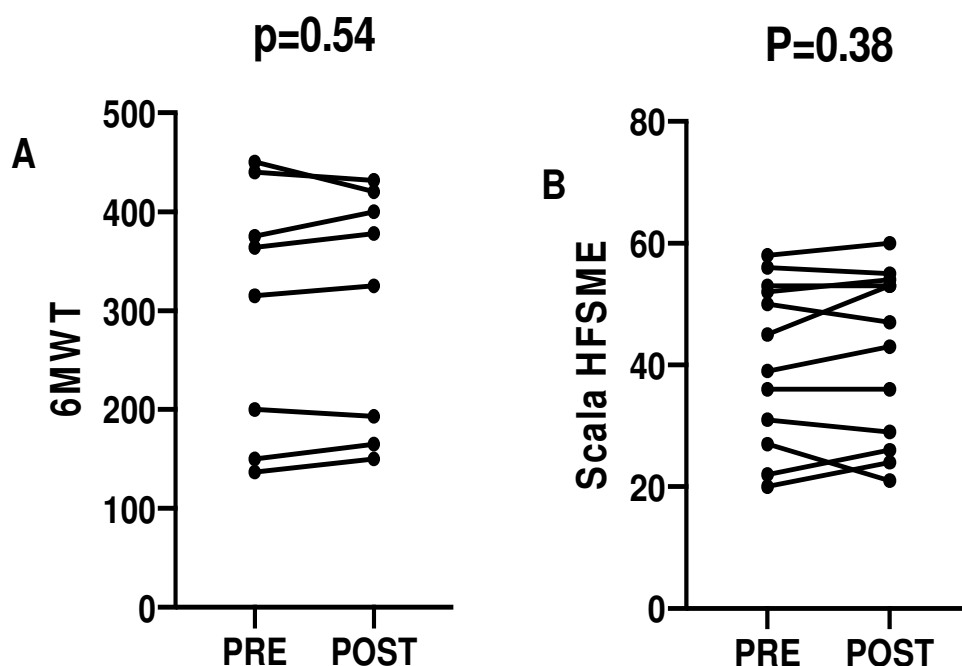


Fig.13 Valutazione di scale standardizzate motorie in pazienti di SMA III. Punteggi individuali al 6 minut test (A) e Hammersmith Functional Motor Scale Expanded (B) al baseline (pre) e dopo 5 iniezioni (post) di Nusinersen.

Le funzioni motorie non sono state significativamente modificate da Nusinersen nei pazienti di tipo 3 SMA durante il follow-up di 6 mesi, nelle prestazioni nel test di 6MWT ($+4,0 \pm 17,7$ metri, $p = 0,54$) e nel punteggio HFMSE ($+1,0 \pm 3,8$ punti, $p = 0,38$) rispetto al basale (rispettivamente Figura 13A e 13B)

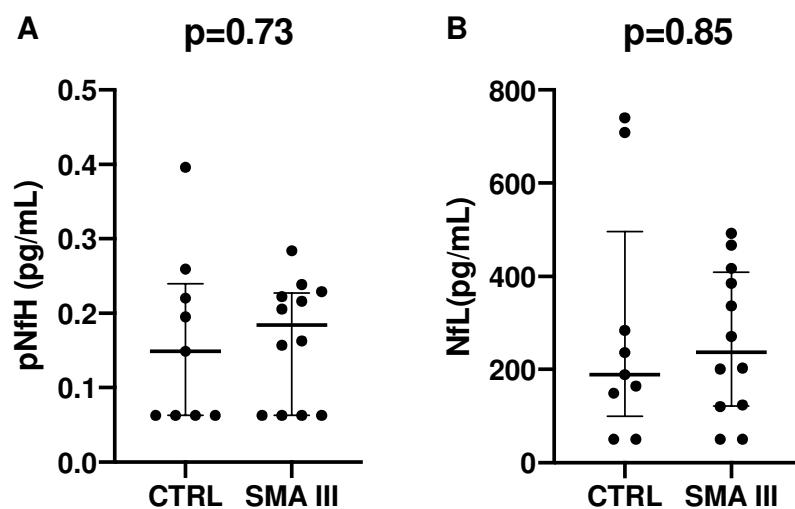


Fig 14 Concentrazioni di neurofilamento a catena pesante fosforilato (pNfH) nel liquido cerebrospinale (CSF) e del neurofilamento a catena leggera (NfL). Livelli di pNfH (A) e NfL (B) nel liquido cerebrospinale di pazienti SMA III e controlli (mediana [IQR]).

I valori dei neurofilamenti (pNfH e NfL) dosati nel liquor nei pazienti SMA III prima del trattamento sono stati paragonati a quelli osservati nei controlli ($n = 9$, età: 29.0 [22.0 – 54.5] anni). I valori ottenuti della nostra coorte di pazienti affetti da SMA III è molto al di sotto dei valori alterati descritti in precedenza nei pazienti affetti da SMA I o sclerosi laterale amiotrofica (Figura 14 A e B).

Per entrambi pNfH e NfL, i valori inferiori al limite di quantificazione sono stati approssimativamente definiti come la metà della concentrazione più bassa calibrata (50 pg / mL e 0,0625 ng / mL per NfL e NfH, rispettivamente).

I valori di pNfH e NfL non erano correlati con l'età nel gruppo controllo (rispettivamente $p=0.54$ e $p=0.06$)

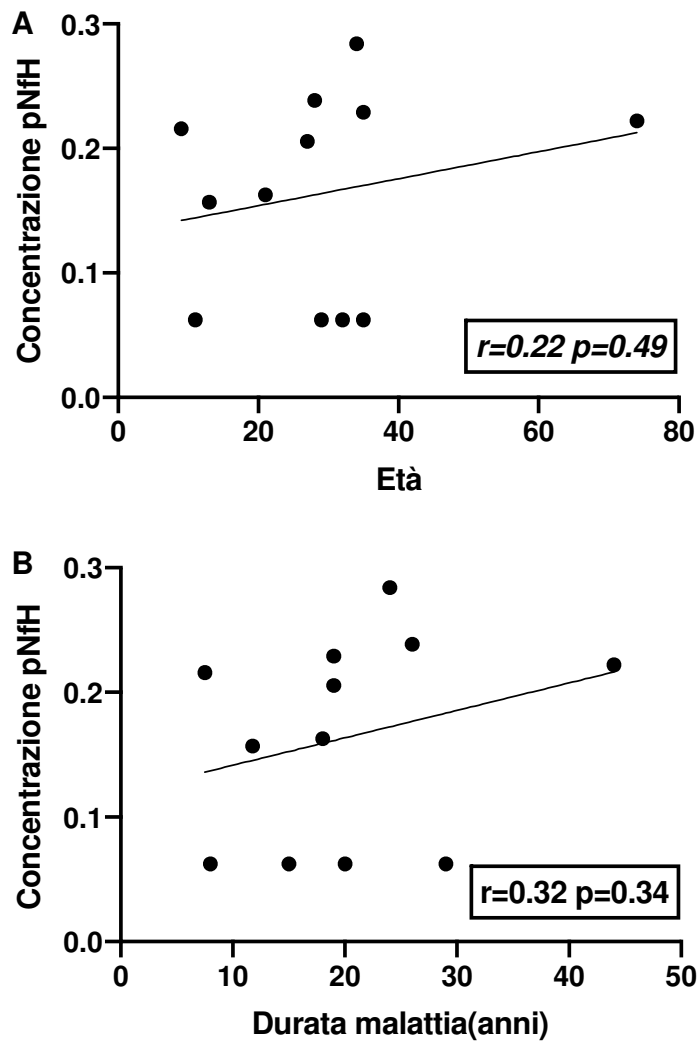


Fig 15 Correlazione tra i livelli di pNfH e l'età al trattamento (A) e durata della malattia (B). 4 di 12 pazienti al basale presentavano valori inferiori al limite di rilevazione

Inoltre è stato analizzato qualora ci fosse una correlazione tra i valori di pNfH riscontrati nel liquor pre trattamento e l'età e/o la durata della malattia: in nessuno dei due casi si è verificato una correlazione statisticamente significativa come viene illustrato in Fig.15.

Per i valori NfL :i valori riscontrati nel liquor pre trattamento erano correlati significativamente con l'età alla prima infusione del farmaco ($r = 0.59$, $p = 0.046$); Una correlazione marginalmente

significativa si è osservata tra i valori NfL nel liquor e la durata della malattia ($r = 0.55$, $p = 0.066$) (Figura 16).

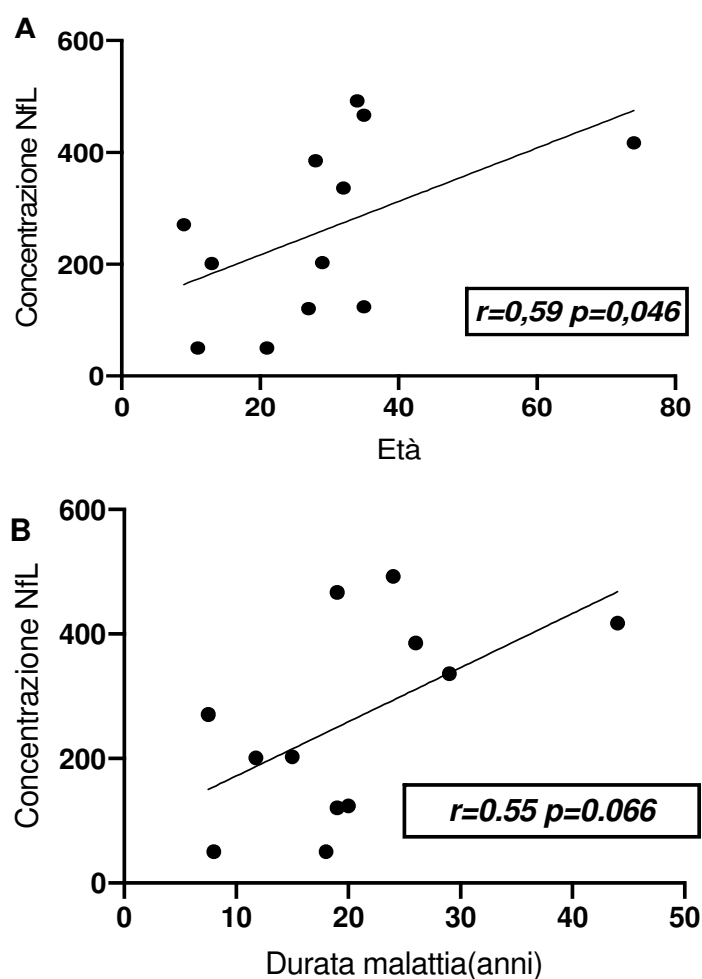


Fig 16 Correlazione tra i livelli di NFL e l'età al trattamento (A) e durata della malattia (B). :2 di 12 valori NfL al basale erano inferiori al limite di rilevazione.

È interessante notare che il confronto tra i valori di entrambi i tipi di neurofilamento prima e dopo 6 mesi dall'inizio del trattamento ha mostrato una leggera ma significativa diminuzione (pNfH: mediana delle differenze -0.0236 ± 0.0486 ng / ml, $p = 0.016$ - NfL: media delle differenze -70.0 ± 97.7 pg / mL, $p = 0.031$).Fig 17

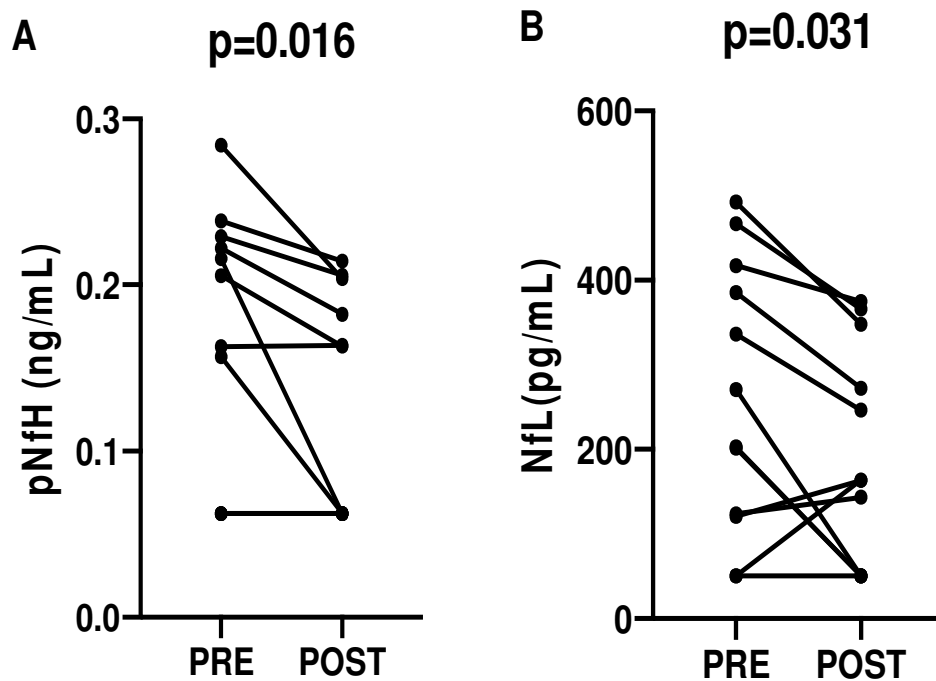


Fig.17 Concentrazioni nel liquor del neurofilamento a catena pesante fosforilato (pNfH) e del neurofilamento a catena leggera (NfL). Livelli di pNfH (A) e livelli di NfL (B) di tutti i pazienti SMA III al basale (Pre) e dopo 5 iniezioni (Post) di Nusinersen.

Tuttavia, non è stata osservata alcuna correlazione significativa tra la differenza pre-post nei punteggi HFMSE e la variazione nel tempo sia dei livelli nel liquor sia dei NfL sia quelli dei pNfH (Figura 18A e 18 B)

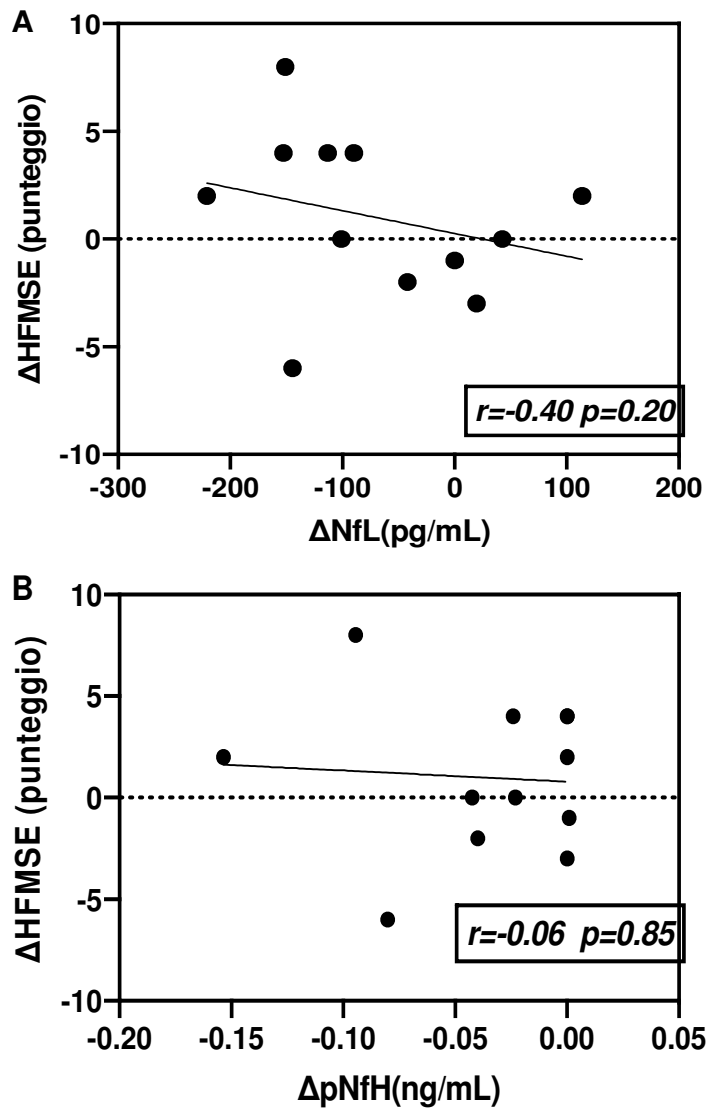


Fig.18 Correlazione tra la variazione nel tempo dei valori dei neurofilamenti e tra le variazioni nel tempo dei punteggi HFMSE. :NfL-HFSME (A) o dei pNfH - HFSME(B)

7. DISCUSSIONE

In questo studio su una piccola coorte omogenea di pazienti di SMA III, riportiamo i nostri risultati preliminari sugli effetti della somministrazione di Nusinersen sulla funzione motoria a breve termine. I primi pazienti che hanno iniziato la somministrazione sono ormai in trattamento da almeno un anno ed è quindi possibile trarre le prime considerazioni circa l'efficacia del farmaco.

Nessuno dei pazienti ha presentato gli effetti collaterali sistemici che sono stati segnalati con alcuni ASO, tra cui trombocitopenia e insufficienza epatica e renale. Ciò può essere in parte dovuto al fatto che il Nusinersen differisce dagli altri ASO nella sua via di somministrazione (intratecale vs. sottocutanea o endovenosa), dose e frequenza di dosaggio; pertanto, è previsto un livello inferiore di esposizione sistemica. Gli effetti collaterali più frequenti sono quelli associati alla puntura lombare e includono cefalea e rachialgia. La cefalea dopo somministrazione è stata segnalata in circa metà della popolazione in studio. Solo in un caso la cefalea si è protratta per più di 72 h e si è risolta con l'idratazione e il riposo. Nessuno dei sintomi cefalalgici riportati in questi pazienti sono stati causati da aumento della pressione intracranica o idrocefalo.

Il fatto che il Nusinersen è un farmaco che viene somministrato per via intratecale espone sempre il paziente a dei rischi di complicanze legate alla procedura di puntura lombare (vista l'invasività della procedura) e le difficoltà legate a problemi anatomici legati alla patologia come la grave scoliosi possono portare alla mancata somministrazione del trattamento. Ad ogni modo, tutti i pazienti arruolati sono stati trattati con le dosi ed i tempi previsti dalle linee guida AIFA. A sei mesi dall'inizio del trattamento, abbiamo osservato un leggero miglioramento delle funzioni motorie dei pazienti trattati, che tuttavia rispetto ai valori pre-trattamento non ha raggiunto la significatività. Nessuno dei pazienti trattati ha presentato durante l'osservazione un peggioramento delle funzioni motorie. Una recente analisi dei dati dello studio CS2/CS12, che includeva un sottogruppo di

pazienti deambulanti con SMA di tipo II e III trattati con Nusinersen, ha mostrato un miglioramento delle prestazioni motorie (misurato dal 6MWT) a 35 mesi dall'inizio del trattamento (Montes et al 2019). In questo studio sono stati analizzati 14 pazienti SMA II –III deambulanti con età che varia da 2- 15 anni confrontando il 6MWT a 12 mesi ed a 35 mesi di trattamento. Nel primo anno si è evidenziato un incremento in media di 17 metri al 6MWT e al terzo anno di 98 metri. Invece nella nostra casistica i pazienti deambulanti SMA III sono in totale 8 di età compresa tra 9 a 35 anni e nel follow up di 6 mesi si è osservato un incremento in media di 5.3 metri. L'apparente incoerenza con i nostri risultati è probabilmente dovuta alla durata del follow-up, e alla durata della malattia nel momento d'inizio della terapia. Inoltre nel nostro studio, abbiamo reclutato selettivamente pazienti di SMA III, che erano più anziani rispetto alla coorte CS2/CS12 (il 64% dei pazienti inclusi nello studio di Montes et al. 2019 aveva un'età inferiore a 11 anni). Come precedentemente descritto, la SMA III si presenta con diversi quadri fenotipici da pazienti deambulanti con diverse funzioni motorie conservate a pazienti gravemente compromessi con totale dipendenza nelle attività di vita quotidiana e nella nostra casistica sono stati inclusi anche i pazienti non deambulanti. Nessuno dei nostri pazienti è stato trattato nelle fasi iniziali della malattia e la progressione della malattia è stata lenta per tutti. L'aumento relativamente modesto del punteggio medio HFMSE nei pazienti affetti da SMA di tipo III potrebbe essere dovuto al fatto che alcuni degli item più difficili previsti dal HFMSE (ad esempio, accovacciarsi, saltare, salire le scale) sono semplicemente più difficili da raggiungere indipendentemente dal tipo di SMA anche nei casi dove si parte da punteggi alti di HFSME. Le scale motorie di RULM e MFM non hanno mostrato un cambiamento nel periodo di osservazione. Il fenotipo più grave e l'età avanzata potrebbero spiegare l'effetto meno sorprendente di Nusinersen nel breve follow-up del nostro studio. Si osserva però a distanza di un anno un trend ancora in miglioramento delle funzioni motorie.

Anche se nella nostra casistica non si è osservato un miglioramento significativo delle funzionalità motorie, i nostri risultati suggeriscono che il trattamento con Nusinersen potrebbe prevenire il deterioramento della funzione motoria. Le basi biologiche proposte di questo effetto rimangono da studiare, ma possono essere correlate alla continua crescita assonale e reinnervazione delle fibre muscolari, miglioramento della funzione neuronale/assonale, maturazione di sinapsi anormali e/o effetti di giunzione transneuromuscolare sui muscoli. Tutti questi processi possono essere potenzialmente indotti dall'aumento della produzione di proteine SMN correlata al trattamento continuato con Nusinersen. Ulteriori studi saranno necessari per chiarire il meccanismo d'azione responsabile della stabilità clinica o eventuale miglioramento indotto dal Nusinersen sulla funzione motoria.

Interessante notare che i soggetti in trattamento riferiscono frequentemente una maggior resistenza all'esercizio fisico e tolleranza alla fatica. Tale parametro non è inserito nelle scale funzionali utilizzate, e diventa pertanto necessario insieme all'osservazione con le scale motorie utilizzare scale di misurazione della fatica nel follow up, per individuare i soggetti che presentano maggior risposta al trattamento.

Un punto importante nello studio dei pazienti SMA è la conoscenza delle alterazioni genetiche in particolare la mutazioni puntiformi. Il comportamento delle mutazioni puntiformi in SMN1/SMN2 è eterogeneo e richiede adeguata convalida. Queste alterazioni portano a modificare la storia della patologia e fanno sì che il quadro clinico non sia correlato con il numero di copie di SMN2. Nella nostra casistica 2 pazienti riportavano queste alterazioni (pazienti SMA 3 con 2 copie di SMN2). Non si è evidenziato però durante il trattamento una differenza nella risposta clinica con gli altri pazienti, questo ultimo dato probabilmente legato anche con il breve follow up di pazienti con SMA

III. La conoscenza e lo studio di queste mutazioni e/o varianti genetiche può aiutare a progettare nuove terapie per affrontare queste mutazioni peculiari ed allestire dei farmaci ad hoc per condizioni specifiche. Un'attenta analisi genetica, che non si fermi solo all'identificazione dell'assenza del gene SMN1, dovrebbe essere sempre eseguita prima di intraprendere il trattamento.

Lo studio di risonanza ha rivelato in tutti i nostri pazienti un'atrofia della muscolatura indagata con gradiente prossimo-distale, con quadro di infiltrazione fibroadiposa maggiore a livello della muscolatura glutea e del quadricipite agli arti inferiori, e della muscolatura scapolare e del braccio agli arti superiori. Questi dati sono in linea con quello riportato nei pochi studi riguardante l'imaging muscolare nei pazienti affetti da SMA. Il nostro studio ha dei limiti visto che abbiamo utilizzato una scala di valutazione qualitativa per la classificazione della degenerazione grassa del muscolo in RMN. Sono in fase di sviluppo biomarcatori quantitativi che miglioreranno la valutazione dei muscoli e la progressione della malattia in studi futuri. Un dato importante è quello riguardante i controlli delle RMN; i pazienti sottoposti a follow up di un anno (n.3 pazienti) hanno mostrato stabilità del quadro radiologico e in un caso segni di miglioramento della sostituzione fibroadiposa.

In un paziente si è evidenziato come il miglioramento delle immagini RMN sia andato di pari passo con il miglioramento dei punteggi nelle scale motorie a distanza di 12 mesi di follow up..

Ovviamente, visto la storia naturale lenta della patologia, un follow up più lungo e un campione maggiore di pazienti sono necessari per stabilire se la RMN muscolare può rispecchiare o talvolta anticipare l'andamento clinico.

Il CMAP e i valori del MUNE sono rimasti generalmente stabili nella nostra casistica come riportato anche in altri studi su pazienti SMA III. I valori CMAP e MUNE hanno dimostrato di essere

correlati con la progressione della malattia nei disturbi neuromuscolari e l'incremento del MUNE e valori CMAP stabili sono stati osservati in alcuni gruppi di pazienti nonostante il declino della funzione motoria. Questi risultati, confermano quello che è stato suggerito precedentemente, ovvero che il beneficio del trattamento con Nusinersen sulla capacità di innervazione distale potrebbe essere meno significativo del suo beneficio complessivo sulla funzione motoria ed è probabilmente influenzato da fattori tra cui età, gravità della denervazione al momento dell'arruolamento, durata dell'esposizione e gruppo dei muscoli nervosi testato. Perciò può essere utile l'utilizzo di una tecnica incrementale di MUNE a punti multipli come endpoint nei futuri studi clinici. (Montes et al. 2019)

Inoltre nel nostro studio descriviamo i cambiamenti nel tempo della concentrazione liquorale di entrambi pNfH e NfL, che sono stati proposti come potenziali biomarcatori della risposta al trattamento.

I livelli di neurofilamenti nel liquido cerebrospinale dei pazienti affetti al basale prima del trattamento si sono dimostrati paragonabili a quelli dei soggetti controllo, e sono comunque tutti costantemente al di sotto dei valori soglia che di solito definiscono i campioni patologici (Khalil et al., 2018). Questa scoperta probabilmente riflette la lenta progressione della malattia tipica della SMA di tipo 3, in cui la degenerazione assonale è un processo lento che ha meno probabilità di influenzare in modo significativo la concentrazione dei neurofilamenti. Come in precedenza descritto per gli individui sani (Vågberg M et al., 2015), la concentrazione di NfL è correlata positivamente con l'età e la durata della malattia nei pazienti SMA III, mentre i livelli di pNfH sono meno influenzati dall'età dei pazienti e dalla durata della malattia.

Nonostante valori quasi normali al basale, la concentrazione liquorale sia di pNfH che di NfL è risultata significativamente ridotta a sei mesi rispetto ai valori pre-trattamento. Questa scoperta

suggerisce un iniziale effetto biochimico del trattamento, che potrebbe riflettere una ridotta degenerazione assonale, che può essere catturata molto prima che qualsiasi cambiamento nelle prestazioni motorie diventi clinicamente evidente. Analogamente al nostro studio, Wurster e colleghi (Wurster et.al, 2019) hanno descritto le variazioni dei parametri liquorali nel tempo in una coorte di pazienti di tipo 2 e 3 SMA trattati con Nusinersen. Nel loro studio, tuttavia, non è stata evidenziata una differenza significativa nelle concentrazioni di neurofilamento tra campioni pre e post trattamento. Il nostro disegno di studio potrebbe averci concesso di rilevare cambiamenti significativi grazie al suo follow-up più lungo (6 mesi rispetto a 2 mesi dopo l'inizio del trattamento) e alla coorte omogenea di pazienti di tipo 3 SMA. Inoltre, i pazienti arruolati nel nostro studio avevano una durata complessiva della malattia più breve, che potrebbe avere ulteriormente influenzato i risultati. Infine, parte della variabilità nei risultati potrebbe essere potenzialmente correlata alla differente sensibilità tra i kit ELISA impiegati, in particolare per i livelli di pNfH.

Nonostante questi risultati incoraggianti, non abbiamo osservato alcuna correlazione significativa tra la concentrazione di neurofilamento nel tempo e il cambiamento delle funzioni motorie a sei mesi, come il punteggio della scala HFMSE. Si ipotizza che la mancanza di un significativo effetto clinico durante questo follow-up relativamente breve possa in parte spiegare questa incoerenza. In effetti, importanti limiti del nostro studio includono il piccolo numero di pazienti e la durata relativamente breve del follow-up. Inoltre, è necessario discutere delle limitazioni analitiche: la concentrazione di base dei neurofilamenti nel nostro studio era inferiore al limite inferiore di quantificazione in una proporzione significativa di pazienti. Questi limiti potrebbero essere affrontati in futuro mediante l'uso di metodi più sensibili progettati per rilevare concentrazioni di analiti inferiori, come il test immunologico che è stato recentemente sviluppato per il rilevamento di NfL (Kuhle et. al.,2016) I

nostri risultati suggeriscono che sia i livelli di pNfH e NfL sono ridotti dalla somministrazione di Nusinersen in una proporzione significativa di pazienti di tipo 3 SMA già a sei mesi dopo il primo trattamento, ma rimangono necessari ulteriori studi sull'accuratezza dei neurofilamenti come marcatori di risposta al trattamento.

La disponibilità di Nusinersen ha drasticamente modificato l'assistenza clinica dei neonati e bambini con SMA che spesso però non raggiungono le stesse tappe motorie dei coetanei sani; perciò molte domande rimangono senza risposta per quanto riguarda il trattamento ottimale. Una delle problematiche maggiori è quella dell'identificazione della gamma di pazienti che trarranno beneficio da Nusinersen e la definizione rigorosa dei criteri di efficacia.

Lo screening neonatale per la SMA deve essere ancora validato nel pannello di screening raccomandato. La diagnosi precoce della SMA consentirà indubbiamente l'inizio della terapia presintomatica e diversi studi preliminari hanno dimostrato che il Nusinersen è meno efficace quando il trattamento viene iniziato dopo una più lunga durata della malattia. Inoltre, la disponibilità di nuovi ulteriori farmaci e la possibilità di screening neonatale e della diagnosi presintomatica per la SMA lasciano spazio a diverse considerazioni sulla tempistica appropriata dell'inizio del trattamento e il tipo di trattamento da proporre. Una delle nuove prospettive è quella della combinazione del Nusinersen con altre terapie ora disponibili (terapia genica).

Complessivamente, i nostri dati suggeriscono che il trattamento con Nusinersen aiuta a mantenere stabile il quadro clinico nei pazienti affetti da SMA di tipo 3.

In considerazione dei costi del farmaco e dei futuri possibili trattamenti urge l'identificazione di biomarcatori validi per questa condizione. Il nostro studio suggerisce come possibile biomarcatore il dosaggio di neurofilamenti nel liquor.

8. BIBLIOGRAFIA

- Ackermann, B., Kröber, S., Torres-Benito, L., Borgmann, A., Peters, M., Hosseini Barkooie, S.M., Tejero, R., Jakubik, M., Schreml, J., Milbradt, J., et al. (2013). Plastin 3 ameliorates spinal muscular atrophy via delayed axon pruning and improves neuromuscular junction functionality. *Hum. Mol. Genet.* 22, 1328–1347.
- Alrafiah, A., Karyka, E., Coldicott, I., Iremonger, K., Lewis, K.E., Ning, K., and Azzouz, M. (2018). Plastin 3 Promotes Motor Neuron Axonal Growth and Extends Survival in a Mouse Model of Spinal Muscular Atrophy. *Mol. Ther. - Methods Clin. Dev.* 9, 81–89.
- Andreassi, C., Angelozzi, C., Tiziano, F.D., Vitali, T., De Vincenzi, E., Boninsegna, A., Villanova, M., Bertini, E., Pini, A., Neri, G., et al. (2004). Phenylbutyrate increases SMN expression in vitro: relevance for treatment of spinal muscular atrophy. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* 12, 59–65.
- Battaglia G, Princivalle A, Forti F, Lizier C, Zeviani M. Expression of the SMN gene, the spinal muscular atrophy determining gene, in the mammalian central nervous system. *Hum Mol Genet*; 6: 1961–71 (1997)
- Battle, D.J., Kasim, M., Yong, J., Lotti, F., Lau, C.-K., Mouaikel, J., Zhang, Z., Han, K., Wan, L., and Dreyfuss, G. (2006). The SMN complex: an assembly machine for RNPs. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 71, 313–320.
- Battle DJ, Lau CK, Wan L, Deng H, Lotti F, Dreyfuss G. The Gemin5 protein of the SMN complex identifies snRNAs. *Mol. Cell* 23, 273–279 (2006)
- Bäumer D, Lee S, Nicholson G, Davies JL, Parkinson NJ, Murray LM, Gillingwater TH, Ansorge O, Davies KE, Talbot K. Alternative splicing events are a late feature of pathology in a mouse model of spinal muscular atrophy. *PLoS Genet.* Dec;5(12):e1000773 (2009)
- Beevor, C.E. (1902). A case of congenital spinal muscular atrophy (family type), and a case of hæmorrhage into the spinal cord at birth, giving similar symptoms. *Brain* 25, 85–108.
- Bernal, S., Also-Rallo, E., Martínez-Hernández, R., Alías, L., Rodríguez-Alvarez, F.J., Millán, M., Hernández-Chico, C., Baiget, M., and Tizzano, E.F. (2011). Plastin 3 expression in discordant spinal muscular atrophy (SMA) siblings. *Neuromuscul. Disord. NMD* 21, 413–419.
- Bertini, E., Dessaud, E., Mercuri, E., Muntoni, F., Kirschner, J., Reid, C., Lusakowska, A., Comi, G.P., Cuisset, J.-M., Abitbol, J.-L., et al. (2017). Safety and efficacy of olesoxime in patients with type 2 or non-ambulatory type 3 spinal muscular atrophy: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2 trial. *Lancet Neurol.* 16, 513–522.
- Bharucha-Goebel, D., and Kaufmann, P. (2017). Treatment Advances in Spinal Muscular Atrophy. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 17. Birey, F., Andersen, J., Makinson, C.D., Islam, S., Wei, W., Huber, N., Fan, H.C., Metzler, K.R.C.,
- Boardman, F.K., Sadler, C., and Young, P.J. (2017). Newborn genetic screening for spinal muscular atrophy in the UK: The views of the general population. *Mol. Genet. Genomic Med.* 6, 99–108.
- Bordet, T., Buisson, B., Michaud, M., Drouot, C., Galéa, P., Delaage, P., Akentieva, N.P., Evers, A.S., Covey, D.F., Ostuni, M.A., et al. (2007). Identification and characterization of cholest-4-en-3-one, oxime (TRO19622), a novel drug candidate for amyotrophic lateral sclerosis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 322, 709–720.
- Bordet, T., Bernal, P., Abitbol, J.-L., and Pruss, R.M. (2010). Olesoxime (TRO19622): A Novel Mitochondrial-Targeted Neuroprotective Compound. *Pharm. Basel Switz.* 3, 345–368.

- Bosch-Marcé, M., Wee, C.D., Martínez, T.L., Lipkes, C.E., Choe, D.W., Kong, L., Van Meerbeke, J.P., Musarò, A., and Sumner, C.J. (2011). Increased IGF-1 in muscle modulates the phenotype of severe SMA mice. *Hum. Mol. Genet.* 20, 1844–1853.
- Bowerman, M., Becker, C.G., Yáñez-Muñoz, R.J., Ning, K., Wood, M.J.A., Gillingwater, T.H., and Talbot, K. (2017). Therapeutic strategies for spinal muscular atrophy: SMN and beyond. *Dis. Model. Mech.* 10, 943–954.
- Bowerman M, Anderson CL, Beauvais A, Boyl PP, Witke W, Kothary R. SMN, profilin IIa and plastin 3: a link between the deregulation of actin dynamics and SMA pathogenesis. *Mol Cell Neurosci. Sep;42(1):66-74 (2009)*
- Boza-Morán, M.G., Martínez-Hernández, R., Bernal, S., Wanisch, K., Also-Rallo, E., Le Heron, A., Alías, L., Denis, C., Girard, M., Yee, J.-K., et al. (2015). Decay in survival motor neuron and plastin 3 levels during differentiation of iPSC-derived human motor neurons. *Sci. Rep.* 5.
- Brahe C, Servidei S, Zappata S, Ricci E, Tonali P, Neri G. Genetic homogeneity between childhood-onset and adult-onset autosomal recessive spinal muscular atrophy. *Lancet* 346:741-742 (1995)
- Brahms H, Meheus L, de Brabandere V, Fischer U, Lührmann R. Symmetrical dimethylation of arginine residues in spliceosomal Sm protein B/B' and the Sm-like protein LSm4, and their interaction with the SMN protein. *RNA* 7, 1531–1542 (2001)
- Brichta, L., Hofmann, Y., Hahnen, E., Siebzehnruhl, F.A., Raschke, H., Blumcke, I., Eyupoglu, I.Y., 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.
- Brock, T.O., and McIlwain, D.L. (1984). Astrocytic proteins in the dorsal and ventral roots in amyotrophic lateral sclerosis and Werdnig-Hoffmann disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 43, 609–619.
- Bromberg M. Motor unit estimation: reproducibility of the spike-triggered averaging technique in normal and ALS subjects. *Muscle Nerve.* 1993; 16:466–471.
- Burglen, L., Lefebvre, S., Clermont, O., Burlet, P., Viollet, L., Cruaud, C., Munnich, A., and Melki, J. (1996). Structure and organization of the human survival motor neuron (SMN) gene. *Genomics* 32, 479–482.
- Burlet, P., Huber, C., Bertrand, S., Ludosky, M.A., Zwaenepoel, I., Clermont, O., Roume, J., Delezoide, A.L., Cartaud, J., Munnich, A., et al. (1998). The distribution of SMN protein complex in human fetal tissues and its alteration in spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.* 7, 1927–1933.
- Burnett, B.G., Muñoz, E., Tandon, A., Kwon, D.Y., Sumner, C.J., and Fischbeck, K.H. (2009). Regulation of SMN protein stability. *Mol. Cell. Biol.* 29, 1107–1115.
- Burt, E.C., Towers, P.R., and Sattelle, D.B. (2006). *Caenorhabditis elegans* in the study of SMN-interacting proteins: a role for SMI-1, an orthologue of human Gemin2 and the identification of novel components of the SMN complex. *Invert. Neurosci.* 6, 145–159.
- Butchbach, M.E.R. (2016). Copy Number Variations in the Survival Motor Neuron Genes: Implications for Spinal Muscular Atrophy and Other Neurodegenerative Diseases. *Front. Mol.*
- Buchthal F, Olsen P. Electromyography and muscle biopsy in infantile spinal muscular atrophy. *Brain.* 1970; 93:15–30.
- Bürglen L, Lefebvre S, Clermont O, Burlet P, Viollet L, Cruaud C, Munnich A, Melki J. Structure and organization of the human survival motor neuron (SMN) gene. *Genomics* 32:479-482 (1996)
- Biosci. 3. Calder, A.N., Androphy, E.J., and Hodgetts, K.J. (2016). Small Molecules in Development for the Treatment of Spinal Muscular Atrophy. *J. Med. Chem.* 59, 10067–10083.

- Caraballo-Miralles, V., Cardona-Rossinyol, A., Garcera, A., Villalonga, P., Soler, R.M., Olmos, G., and Lladó, J. (2012). SMN deficiency attenuates migration of U87MG astrogloma cells through the activation of RhoA. *Mol. Cell. Neurosci.* 49, 282–289.
- Cartegni L & Krainer AR. Disruption of an SF2/ASF-dependent exonic splicing enhancer in SMN2 causes spinal muscular atrophy in the absence of SMN1. *Nat Genet* 30:377-384 (2002)
- Cartegni L, Hastings ML, Calarco JA, de Stanchina E, Krainer AR. Determinants of exon 7 splicing in the spinal muscular atrophy genes, SMN1 and SMN2. *Am J Hum Genet*; 78: 63–77 (2006)
- Cifuentes-Diaz C, Frugier T, Tiziano FD, Lacène E, Roblot N, Joshi V, Moreau MH, Melki J. Deletion of murine SMN exon 7 directed to skeletal muscle leads to severe muscular dystrophy. *J Cell Biol* 152:1107–1114 (2001)
- Cobben JM, van der Steege G, Grootsholten P, de Visser M, Scheffer H, Buys CH. Deletions of the survival motor neuron gene in unaffected siblings of patients with spinal muscular atrophy. *Am. J. Hum. Genet.* 57, 805–808 (1995)
- Coovert DD, Le TT, McAndrew PE, Strasswimmer J, Crawford TO, Mendell JR, Coulson SE, Androphy EJ, Prior TW, Burghes AH. The survival motor neuron protein in spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet*; 6: 1205–14 (1997)
- Carissimi, C., Baccon, J., Straccia, M., Chiarella, P., Maiolica, A., Sawyer, A., Rappsilber, J., and Pellizzoni, L. (2005). Unrip is a component of SMN complexes active in snRNP assembly. *FEBS Lett.* 579, 2348–2354.
- Carissimi, C., Saieva, L., Baccon, J., Chiarella, P., Maiolica, A., Sawyer, A., Rappsilber, J., and Pellizzoni, L. (2006). Gemin8 is a novel component of the survival motor neuron complex and functions in small nuclear ribonucleoprotein assembly. *J. Biol. Chem.* 281, 8126–8134.
- Chang, J.G., Hsieh-Li, H.M., Jong, Y.J., Wang, N.M., Tsai, C.H., and Li, H. (2001). Treatment of spinal muscular atrophy by sodium butyrate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 9808–9813.
- Charroux, B., Pellizzoni, L., Perkinson, R.A., Shevchenko, A., Mann, M., and Dreyfuss, G. (1999). Gemin3: A novel DEAD box protein that interacts with SMN, the spinal muscular atrophy gene product, and is a component of gems. *J. Cell Biol.* 147, 1181–1194.
- Charroux, B., Pellizzoni, L., Perkinson, R.A., Yong, J., Shevchenko, A., Mann, M., and Dreyfuss, G. (2000). Gemin4. A novel component of the SMN complex that is found in both gems and nucleoli. *J. Cell Biol.* 148, 1177–1186.
- Chen, T.-H., Chang, J.-G., Yang, Y.-H., Mai, H.-H., Liang, W.-C., Wu, Y.-C., Wang, H.-Y., Huang, Y.-B., Wu, S.-M., Chen, Y.-C., et al. (2010). Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of hydroxyurea in spinal muscular atrophy. *Neurology* 75, 2190–2197.
- Chen, W.J., Dong, W.J., Lin, X.Z., Lin, M.T., Murong, S.X., Wu, Z.Y., and Wang, N. (2009). Rapid diagnosis of spinal muscular atrophy using High-Resolution Melting Analysis. *BMC Med. Genet.* 10, 45.
- Cherry, J.J., Osman, E.Y., Evans, M.C., Choi, S., Xing, X., Cuny, G.D., Glicksman, M.A., Lorson, C.L., and Androphy, E.J. (2013). Enhancement of SMN protein levels in a mouse model of spinal muscular atrophy using novel drug-like compounds. *EMBO Mol. Med.* 5, 1035–1050.
- Chien, Y.-H., Chiang, S.-C., Weng, W.-C., Lee, N.-C., Lin, C.-J., Hsieh, W.-S., Lee, W.-T., Jong, Y.-J., Ko, T.-M., and Hwu, W.-L. (2017). Presymptomatic Diagnosis of Spinal Muscular Atrophy Through Newborn Screening. *J. Pediatr.* 190, 124-129.e1.
- Chiriboga, C.A., Swoboda, K.J., Darras, B.T., Iannaccone, S.T., Montes, J., De Vivo, D.C., Norris, D.A., Bennett, C.F., and Bishop, K.M. (2016). Results from a phase 1 study of Nusinersen (ISIS-SMN Rx) in children with spinal muscular atrophy. *Neurology* 86, 890–897.

- Chou, S.M., and Nonaka, I. (1978). Werdnig-Hoffmann disease: proposal of a pathogenetic mechanism. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 41, 45–54.
- Coque, E., Raoul, C., and Bowerman, M. (2014). ROCK inhibition as a therapy for spinal muscular atrophy: understanding the repercussions on multiple cellular targets. *Front. Neurosci.* 8
- Darras BT, Crawford TO, Finkel RS, Mercuri E, De Vivo DC, Oskoui M, et al. Neurofilament as a potential biomarker for spinal muscular atrophy. *Ann Clin Transl Neurol.* 2019 May;6(5):932–44.
- Dimitriadi, M., Sleight, J.N., Walker, A., Chang, H.C., Sen, A., Kalloo, G., Harris, J., Barsby, T., Walsh, M.B., Satterlee, J.S., et al. (2010). Conserved Genes Act as Modifiers of Invertebrate SMN Loss of Function Defects. *PLoS Genet.* 6, e1001172.
- Doble, A. (1996). The pharmacology and mechanism of action of riluzole. *Neurology* 47, 233S- 241S.
- Dominguez, E., Marais, T., Chatauret, N., Benkhelifa-Ziyyat, S., Duque, S., Ravassard, P., Carcenac, R., Astord, S., Pereira de Moura, A., Voit, T., et al. (2011). Intravenous scAAV9 delivery of a codon-optimized SMN1 sequence rescues SMA mice. *Hum. Mol. Genet.* 20, 681–693.
- Dubowitz, V. (1991). Chaos in classification of the spinal muscular atrophies of childhood. *Neuromuscul. Disord. NMD* 1, 77–80.
- Dubowitz, V. (1995). Chaos in the classification of SMA: a possible resolution. *Neuromuscul. Disord. NMD* 5, 3–5.
- Dunaway Young, S., Montes, J., Kramer, S.S., Marra, J., Salazar, R., Cruz, R., Chiriboga, C.A., Garber, C.E., and De Vivo, D.C. (2016). Six-minute walk test is reliable and valid in spinal muscular atrophy: 6MWT in SMA. *Muscle Nerve* 54, 836–842.
- Elsheikh, B., Prior, T., Zhang, X., Miller, R., Kolb, S.J., Moore, D., Bradley, W., Barohn, R., Bryan, W., Gelinas, D., et al. (2009). An analysis of disease severity based on SMN2 copy number in adults with spinal muscular atrophy. *Muscle Nerve* 40, 652–656.
- EMA (2017). First medicine for spinal muscular atrophy. 3.
- Faravelli, I., Nizzardo, M., Comi, G.P., and Corti, S. (2015). Spinal muscular atrophy—recent therapeutic advances for an old challenge. *Nat. Rev. Neurol.* 11, 351–359.
- Farrar, M.A., Park, S.B., Vucic, S., Carey, K.A., Turner, B.J., Gillingwater, T.H., Swoboda, K.J., and Kiernan, M.C. (2017). Emerging therapies and challenges in spinal muscular atrophy. *Ann. Neurol.* 81, 355–368.
- FDA (2016a). Press Announcements - FDA approves first drug for spinal muscular atrophy.
- FDA (2016b). SPINRAZA (Nusinersen) injection, for intrathecal use. 13.
- Finkel, R.S., Chiriboga, C.A., Vajsar, J., Day, J.W., Montes, J., De Vivo, D.C., Yamashita, M., Rigo, F., Hung, G., Schneider, E., et al. (2016). Treatment of infantile-onset spinal muscular atrophy with Nusinersen: a phase 2, open-label, dose-escalation study. *The Lancet* 388, 3017–3026.
- Finkel, R.S., Mercuri, E., Darras, B.T., Connolly, A.M., Kuntz, N.L., Kirschner, J., Chiriboga, C.A., Saito, K., Servais, L., Tizzano, E., et al. (2017). Nusinersen versus Sham Control in Infantile-Onset Spinal Muscular Atrophy. *N. Engl. J. Med.* 377, 1723–1732.
- Foust, K.D., Nurre, E., Montgomery, C.L., Hernandez, A., Chan, C.M., and Kaspar, B.K. (2009). Intravascular AAV9 preferentially targets neonatal-neurons and adult-astrocytes in CNS. *Nat. Biotechnol.* 27, 59–65.

Foust, K.D., Wang, X., McGovern, V.L., Braun, L., Bevan, A.K., Haidet, A.M., Le, T.T., Morales, P.R., Rich, M.M., Burghes, A.H.M., et al. (2010). Rescue of the spinal muscular atrophy phenotype in a mouse model by early postnatal delivery of SMN. *Nat. Biotechnol.* 28, 271–274.

Gagliardi D, Meneri M, Domenica Saccomanno, Nereo Bresolin, Giacomo Pietro Comi Stefania Corti Diagnostic and Prognostic Role of Blood and Cerebrospinal Fluid and Blood Neurofilaments in Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Review of the Literature. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20(17), 4152

Gabanella F, Butchbach ME, Saieva L, Carissimi C, Burghes AH, Pellizzoni L. Ribonucleoprotein assembly defects correlate with spinal muscular atrophy severity and preferentially affect a subset of spliceosomal snRNPs. *PLoS ONE* 2, e921 (2007)

Gabanella F, Carissimi C, Usiello A, Pellizzoni L. The activity of the spinal muscular atrophy protein is regulated during development and cellular differentiation. *Hum. Mol. Genet.* 14, 3629–3642 (2005)

Glinka M, Herrmann T, Funk N, Havlicek S, Rossoll W, Winkler C, Sendtner M. The heterogeneous nuclear ribonucleoprotein-R is necessary for axonal beta-actin mRNA translocation in spinal motor neurons. *Hum Mol Genet.* May 15;19(10):1951-66 (2010)

Ghatak, N.R. (1978). Spinal roots in Werdnig-Hoffmann disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 41, 1–7. Giani, F.C., Fiorini, C., Wakabayashi, A., Ludwig, L.S., Salem, R.M., Jobaliya, C.D., Regan, S.N., Ulirsch, J.C., Liang, G., Steinberg-Shemer, O., et al. (2016). Targeted Application of Human Genetic Variation Can Improve Red Blood Cell Production from Stem Cells. *Cell Stem Cell* 18, 73–78.

Gladman, J.T., and Chandler, D.S. (2009). Intron 7 conserved sequence elements regulate the splicing of the SMN genes. *Hum. Genet.* 126, 833–841.

Glanzman, A.M., Mazzone, E., Main, M., Pelliccioni, M., Wood, J., Swoboda, K.J., Scott, C., Pane, M., Messina, S., Bertini, E., et al. (2010). The Children's Hospital of Philadelphia Infant Test of Neuromuscular Disorders (CHOP INTEND): Test development and reliability. *Neuromuscul. Disord.* 20, 155–161.

Glanzman, A.M., O'Hagen, J.M., McDermott, M.P., Martens, W.B., Flickinger, J., Riley, S., Quigley, J., Montes, J., Dunaway, S., Deng, L., et al. (2011). Validation of the Expanded Hammersmith Functional Motor Scale in Spinal Muscular Atrophy Type II and III: *J. Child Neurol.*

Glascok, J., Sampson, J., Haidet-Phillips, A., Connolly, A., Darras, B., Day, J., Finkel, R., Howell, R.R., Klinger, K., Kuntz, N., et al. (2018). Treatment Algorithm for Infants Diagnosed with Spinal Muscular Atrophy through Newborn Screening. *J. Neuromuscul. Dis.* 1–14.

Gombash, S.E., Cowley, C.J., Fitzgerald, J.A., Iyer, C.C., Fried, D., McGovern, V.L., Williams, K.C., Burghes, A.H.M., Christofi, F.L., Gulbransen, B.D., et al. (2015). SMN deficiency disrupts gastrointestinal and enteric nervous system function in mice. *Hum. Mol. Genet.* 24, 3847–3860.

Gómez-Curet, I., Robinson, K.G., Funanage, V.L., Crawford, T.O., Scavina, M., and Wang, W. (2007). Robust quantification of the SMN gene copy number by real-time TaqMan PCR. *Neurogenetics* 8, 271–278.

Govoni, A., Gagliardi, D., Comi, G.P., and Corti, S. (2018). Time Is Motor Neuron: Therapeutic Window and Its Correlation with Pathogenetic Mechanisms in Spinal Muscular Atrophy. *Mol. Neurobiol.*

Goyal, N., and Narayanaswami, P. (2018). Making sense of antisense oligonucleotides: A narrative review: Antisense Oligonucleotides. *Muscle Nerve* 57, 356–370.

Grzeschik, S.M., Ganta, M., Prior, T.W., Heavlin, W.D., and Wang, C.H. (2005). Hydroxyurea enhances SMN2 gene expression in spinal muscular atrophy cells. *Ann. Neurol.* 58, 194–202.

- Gubitz, A.K., Mourelatos, Z., Abel, L., Rappsilber, J., Mann, M., and Dreyfuss, G. (2002). Gemin5, a novel WD repeat protein component of the SMN complex that binds Sm proteins. *J. Biol. Chem.* 277, 5631–5636.
- Haché, M., Swoboda, K.J., Sethna, N., Farrow-Gillespie, A., Khandji, A., Xia, S., and Bishop, K.M. (2016). Intrathecal Injections in Children With Spinal Muscular Atrophy. *J. Child Neurol.* 31, 899–906.
- Han, Y.J., Park, J.D., Lee, B., Choi, Y.H., Suh, D.I., Lim, B.C., and Chae, J.-H. (2015). Home Mechanical Ventilation in Childhood-Onset Hereditary Neuromuscular Diseases: 13 Years' Experience at a Single Center in Korea. *PLoS ONE* 10.
- Harahap, I.S.K., Saito, T., San, L.P., Sasaki, N., Gunadi, Nurputra, D.K.P., Yusoff, S., Yamamoto, T., Morikawa, S., Nishimura, N., et al. (2012). Valproic acid increases SMN2 expression and modulates SF2/ASF and hnRNP A1 expression in SMA fibroblast cell lines. *Brain Dev.* 34, 213–222.
- Harding, B.N., Kariya, S., Monani, U.R., Chung, W.K., Benton, M., Yum, S.W., Tennekoon, G., and Finkel, R.S. (2015). Spectrum of Neuropathophysiology in Spinal Muscular Atrophy Type I. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 74, 15–24.
- Heier, C.R., Satta, R., Lutz, C., and DiDonato, C.J. (2010). Arrhythmia and cardiac defects are a feature of spinal muscular atrophy model mice. *Hum. Mol. Genet.* 19, 3906–3918.
- Hosseinibarkooie, S., Peters, M., Torres-Benito, L., Rastetter, R.H., Hupperich, K., Hoffmann, A., Mendoza-Ferreira, N., Kaczmarek, A., Janzen, E., Milbradt, J., et al. (2016). The Power of Human Protective Modifiers: PLS3 and CORO1C Unravel Impaired Endocytosis in Spinal Muscular Atrophy and Rescue SMA Phenotype. *Am. J. Hum. Genet.* 99, 647–665.
- Hofmann Y & Wirth B. hnRNP-G promotes exon 7 inclusion of survival motor neuron (SMN) via direct interaction with Htra2-beta1. *Hum Mol Genet* 11:2037-2049 (2002)
- Quijano-Roy S, Avila-Smirnow D, Carlier RY. Whole body muscle MRI protocol: pattern recognition in early onset NM disorders. *Neuro- muscul Disord* 2012;22(suppl 2):S68–84.
- Kariya, S., Park, G.-H., Maeno-Hikichi, Y., Leykekhman, O., Lutz, C., Arkovitz, M.S., Landmesser, L.T., and Monani, U.R. (2008). Reduced SMN protein impairs maturation of the neuromuscular junctions in mouse models of spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.* 17, 2552–2569.
- Kaufman, D.L., Houser, C.R., and Tobin, A.J. (1991). Two forms of the gamma-aminobutyric acid synthetic enzyme glutamate decarboxylase have distinct intraneuronal distributions and cofactor interactions. *J. Neurochem.* 56, 720–723.
- Kaufmann, P., McDermott, M.P., Darras, B.T., Finkel, R., Kang, P., Oskoui, M., Constantinescu, A., Sproule, D.M., Foley, A.R., Yang, M., et al. (2011). Observational Study of Spinal Muscular Atrophy Type 2 and 3. *Arch. Neurol.* 68.
- Khalil M, Teunissen CE, Otto M, Piehl F, Sormani MP, Gatteringer T, et al. Neurofilaments as biomarkers in neurological disorders. *Nat Rev Neurol.* 2018 Oct;14(10):577–89.
- Kong, L., Wang, X., Choe, D.W., Polley, M., Burnett, B.G., Bosch-Marcé, M., Griffin, J.W., Rich, M.M., and Sumner, C.J. (2009). Impaired synaptic vesicle release and immaturity of neuromuscular junctions in spinal muscular atrophy mice. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 842–851.
- Kuhle J, Barro C, Andreasson U, Derfuss T, Lindberg R, Sandelius Å, et al. Comparison of three analytical platforms for quantification of the neurofilament light chain in blood samples: ELISA, electrochemiluminescence immunoassay and Simoa. *Clin Chem Lab Med.* 2016 Oct 1;54(10):1655–61.
- Lamarca, N.H., Golden, L., John, R.M., Naini, A., Vivo, D.C.D., and Sproule, D.M. (2013). Diabetic Ketoacidosis in an Adult Patient With Spinal Muscular Atrophy Type II: Further Evidence of Extraneural Pathology Due to Survival Motor Neuron 1 Mutation? *J. Child Neurol.* 28, 1517–1520.

Lanfranco, M., Vassallo, N., and Cauchi, R.J. (2017). Spinal Muscular Atrophy: From Defective Chaperoning of snRNP Assembly to Neuromuscular Dysfunction. *Front. Mol. Biosci.* 4.

Le, T.T., Pham, L.T., Butchbach, M.E.R., Zhang, H.L., Monani, U.R., Coovert, D.D., Gavrilina, T.O., Xing, L., Bassell, G.J., and Burghes, A.H.M. (2005). SMN Δ 7, the major product of the centromeric survival motor neuron (SMN2) gene, extends survival in mice with spinal muscular atrophy and associates with full-length SMN. *Hum. Mol. Genet.* 14, 845–857.

Lee M. K. and D. W. Cleveland, (1996.) "Neuronal Intermediate Filaments," *Annual Review of Neuroscience*, vol. 19, no. 1, pp. 187–217.

Lefebvre S, Burlet P, Liu Q, Bertrand S, Clermont O, Munnich A, Dreyfuss G, Melki J. Correlation between severity and SMN protein level in spinal muscular atrophy. *Nat. Genet.* Jul; 16:265-269 (1997)

Lefebvre, S., Bürglen, L., Reboullet, S., Clermont, O., Burlet, P., Viollet, L., Benichou, B., Cruaud, C., Millasseau, P., Zeviani, M., et al. (1995). Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell* 80, 155–165.

Lemoine, T.J., Swoboda, K.J., Bratton, S.L., Holubkov, R., Mundorff, M., and Srivastava, R. (2012). Spinal muscular atrophy type 1: Are proactive respiratory interventions associated with longer survival? *Pediatr. Crit. Care Med. J. Soc. Crit. Care Med. World Fed. Pediatr. Intensive Crit. Care Soc.* 13, e161–e165.

Liang, W.-C., Yuo, C.-Y., Chang, J.-G., Chen, Y.-C., Chang, Y.-F., Wang, H.-Y., Ju, Y.-H., Chiou, S.-S., and Jong, Y.-J. (2008). The effect of hydroxyurea in spinal muscular atrophy cells and patients. *J. Neurol. Sci.* 268, 87–94.

Lippa, C., and Smith, T. (1988). Chromatolytic neurons in Werdnig-Hoffmann disease contain phosphorylated neurofilaments.

Little, D., Valori, C.F., Mutsaers, C.A., Bennett, E.J., Wyles, M., Sharrack, B., Shaw, P.J., Gillingwater, T.H., Azzouz, M., and Ning, K. (2015). PTEN Depletion Decreases Disease Severity and Modestly Prolongs Survival in a Mouse Model of Spinal Muscular Atrophy. *Mol. Ther.* 23, 270–277.

Little, S.E., Janakiraman, V., Kaimal, A., Musci, T., Ecker, J., and Caughey, A.B. (2010). The cost-effectiveness of prenatal screening for spinal muscular atrophy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 202, 253.e1-253.e7.

Liu, Q., Fischer, U., Wang, F., and Dreyfuss, G. (1997). The Spinal Muscular Atrophy Disease Gene Product, SMN, and Its Associated Protein SIP1 Are in a Complex with Spliceosomal snRNP Proteins. *Cell* 90, 1013–1021.

Liu GC, Jong YJ, Chiang CH, Yang CW. Spinal muscular atrophy: MR evaluation. *Pediatr Radiol* 1992;22:584–586.
Lorson CL, Strasswimmer J, Yao JM, Baleja JD, Hahnen E, Wirth B, Le T, Burghes AH, Androphy EJ. SMN oligomerization defect correlates with spinal muscular atrophy severity. *Nat Genet* 19:63–66 (1998)

Lunn MR & Wang CH. Spinal muscular atrophy. *Lancet.* Jun 21;371(9630):2120-33 (2008) Mackenzie A. Genetic therapy for spinal muscular atrophy. *Nat Biotechnol.* Mar;28(3):235-7 (2010)

Main, M., Kairon, H., Mercuri, E., and Muntoni, F. (2003). The Hammersmith Functional Motor Scale for Children with Spinal Muscular Atrophy: a Scale to Test Ability and Monitor Progress in Children with Limited Ambulation. *Eur. J. Paediatr. Neurol.* 7, 155–159.

McComas A. Motor unit estimation: methods, results, and present status. *Muscle Nerve.* 1991; 14:585–597.

Martínez-Hernández, R., Soler-Botija, C., Also, E., Alias, L., Caselles, L., Gich, I., Bernal, S., and Tizzano, E.F. (2009). The Developmental Pattern of Myotubes in Spinal Muscular Atrophy Indicates Prenatal Delay of Muscle Maturation. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 68, 474–481.

- Mendell, J.R., Al-Zaidy, S., Shell, R., Arnold, W.D., Rodino-Klapac, L.R., Prior, T.W., Lowes, L., Alfano, L., Berry, K., Church, K., et al. (2017). Single-Dose Gene-Replacement Therapy for Spinal Muscular Atrophy. *N. Engl. J. Med.* 377, 1713–1722.
- Mercuri, E., Bertini, E., Messina, S., Solari, A., D’Amico, A., Angelozzi, C., Battini, R., Berardinelli, A., Boffi, P., Bruno, C., et al. (2007). Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of phenylbutyrate in spinal muscular atrophy. *Neurology* 68, 51–55.
- Mercuri, E., Darras, B.T., Chiriboga, C.A., Day, J.W., Campbell, C., Connolly, A.M., Iannaccone, S.T., Kirschner, J., Kuntz, N.L., Saito, K., et al. (2018). Nusinersen versus Sham Control in Later-Onset Spinal Muscular Atrophy. *N. Engl. J. Med.* 378, 625–635.
- Michaud, M., Arnoux, T., Bielli, S., Durand, E., Rotrou, Y., Jablonka, S., Robert, F., Giraudon-Paoli, M., Riessland, M., Mattei, M.-G., et al. (2010). Neuromuscular defects and breathing disorders in a new mouse model of spinal muscular atrophy. *Neurobiol. Dis.* 38, 125–135.
- Monani UR, Lorson CL, Parsons DW, Prior TW, Androphy EJ, Burghes AH, McPherson JD. A single nucleotide difference that alters splicing patterns distinguishes the SMA gene SMN1 from the copy gene SMN2. *Hum Mol Genet.* Jul;8(7):1177-83 (1999)
- Monani UR, Pastore MT, Gavriline TO, Jablonka S, Le TT, Andreassi C, DiCocco JM, Lorson C, Androphy EJ, Sendtner M, Podell M, Burghes AH. A transgene carrying an A2G missense mutation in the SMN gene modulates phenotypic severity in mice with severe (type I) spinal muscular atrophy. *J Cell Biol* 160:41–52 (2003)
- Monani UR, Sendtner M, Coovert DD, Parsons DW, Andreassi C, Le TT, Jablonka S, Schrank B, Rossoll W, Prior TW, Morris GE, Burghes AH. The human centromeric survival motor neuron gene (SMN2) rescues embryonic lethality in *Smn(-/-)* mice and results in a mouse with spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet.* Feb 12;9(3):333-9 (2000)
- Monani UR. Spinal muscular atrophy: a deficiency in a ubiquitous protein; a motor neuron-specific disease. *Neuron.* Dec 22;48(6):885-96 (2005)
- Munsat TL & Davies KE. International SMA consortium meeting. *Neuromuscul Disord.* June ; 2(5-6):423-8 (1992)
- Montes, J., Gordon, A.M., Pandya, S., De Vivo, D.C., and Kaufmann, P. (2009). Clinical outcome measures in spinal muscular atrophy. *J. Child Neurol.* 24, 968–978.
- Montes J, Dunaway Young S, Mazzone ES, Pasternak A, Glanzman AM, Finkel RS, et al. Nusinersen improves walking distance and reduces fatigue in later-onset spinal muscular atrophy. *Muscle Nerve.* 2019 Jul 12;
- Murray LM, Comley LH, Thomson D, Parkinson N, Talbot K, Gillingwater TH. Selective vulnerability of motor neurons and dissociation of pre- and post-synaptic pathology at the neuromuscular junction in mouse models of spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.* 17, 949–962 (2008)
- Murray LM, Lee S, Bäumer D, Parson SH, Talbot K, Gillingwater TH. Pre-symptomatic development of lower motor neuron connectivity in a mouse model of severe spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet.* Feb 1;19(3):420-33 (2010)
- Naryshkin, N.A., Weetall, M., Dakka, A., Narasimhan, J., Zhao, X., Feng, Z., Ling, K.K.Y., Karp, G.M., Qi, H., Woll, M.G., et al. (2014). SMN2 splicing modifiers improve motor function and longevity in mice with spinal muscular atrophy. *Science* 345, 688–693.
- Nizzardo, M., Nardini, M., Ronchi, D., Salani, S., Donadoni, C., Fortunato, F., Colciago, G., Falcone, M., Simone, C., Riboldi, G., et al. (2011). Beta-lactam antibiotic offers neuroprotection in a spinal muscular atrophy model by multiple mechanisms. *Exp. Neurol.* 229, 214–225.

Nizzardo, M., Simone, C., Dametti, S., Salani, S., Ulzi, G., Pagliarani, S., Rizzo, F., Frattini, E., Pagani, F., Bresolin, N., et al. (2015). Spinal muscular atrophy phenotype is ameliorated in human motor neurons by SMN increase via different novel RNA therapeutic approaches. *Sci. Rep.* 5, 11746.

Nurputra, D.K., Lai, P.S., Harahap, N.I.F., Morikawa, S., Yamamoto, T., Nishimura, N., Kubo, Y., Takeuchi, A., Saito, T., Takeshima, Y., et al. (2013). Spinal Muscular Atrophy: From Gene Discovery to Clinical Trials: SMA Gene Discovery to Clinical Trials. *Ann. Hum. Genet.* 77, 435–463.

Iannaccone ST, Russman BS, Browne RH, Buncher CR, White M, Samaha FJ. Prospective analysis of strength in spinal muscular atro-phy. DCN/Spinal Muscular Atrophy Group. *J Child Neurol* 2000;15: 97–101.

Ogino, S., and Wilson, R.B. (2004). Spinal muscular atrophy: molecular genetics and diagnostics. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 4, 15–29.

Olsson B, Alberg L, Cullen NC, Michael E, Wahlgren L, Kroksmark A-K, et al. NFL is a marker of treatment response in children with SMA treated with Nusinersen. *J Neurol.* 2019 May 23;

Oprea, G.E., Kröber, S., McWhorter, M.L., Rossoll, W., Müller, S., Krawczak, M., Bassell, G.J., Beattie, C.E., and Wirth, B. (2008). Plastin 3 Is a Protective Modifier of Autosomal Recessive Spinal Muscular Atrophy. *Science* 320, 524–527.

Ottesen, E.W., Howell, M.D., Singh, N.N., Seo, J., Whitley, E.M., and Singh, R.N. (2016). Severe impairment of male reproductive organ development in a low SMN expressing mouse model of spinal muscular atrophy. *Sci. Rep.* 6, 20193.

Palacino, J., Swalley, S.E., Song, C., Cheung, A.K., Shu, L., Zhang, X., Van Hoosear, M., Shin, Y., Chin, D.N., Keller, C.G., et al. (2015). SMN2 splice modulators enhance U1-pre-mRNA association and rescue SMA mice. *Nat. Chem. Biol.* 11, 511–517.

Palladino, A., Passamano, L., Taglia, A., D'Ambrosio, P., Scutifero, M., Rosaria Cecio, M., Picillo, E., Viggiano, E., Torre, V., De Luca, F., et al. (2011). Cardiac involvement in patients with Spinal Muscular Atrophies. *Acta Myol.* 30, 175–178.

Pechmann, A., Langer, T., Schorling, D., Stein, S., Vogt, S., Schara, U., Kölbl, H., Schwartz, O., Hahn, A., Giese, K., et al. (2018). Evaluation of Children with SMA Type 1 Under Treatment with Nusinersen within the Expanded Access Program in Germany. *J. Neuromuscul. Dis.* 1–9.

Pellizzoni, L., Kataoka, N., Charroux, B., and Dreyfuss, G. (1998). A Novel Function for SMN, the Spinal Muscular Atrophy Disease Gene Product, in Pre-mRNA Splicing. *Cell* 95, 615–624.

van der Ploeg, A.T. (2017). The Dilemma of Two Innovative Therapies for Spinal Muscular Atrophy. *N. Engl. J. Med.* 377, 1786–1787.

Probst, A., Ulrich, J., Bischoff, A., and Boltshauser, E. (1981). Sensory ganglioneuropathy in infantile spinal muscular atrophy. Light and electronmicroscopic findings in two cases. *Neuropediatrics* 12, 215–231.

Pyatt, R.E., Mihal, D.C., and Prior, T.W. (2007). Assessment of Liquid Microbead Arrays for the Screening of Newborns for Spinal Muscular Atrophy. *Clin. Chem.* 53, 1879–1885.

Ramirez, A., Crisafulli, S., Rizzuti, M., Bresolin, N., Comi, G., Corti, S., and Nizzardo, M. (2018). Investigation of New Morpholino Oligomers to Increase Survival Motor Neuron Protein Levels in Spinal Muscular Atrophy. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 167.

Riessland, M., Kaczmarek, A., Schneider, S., Swoboda, K.J., Löhr, H., Bradler, C., Grysko, V., Dimitriadi, M., Hosseinibarkoie, S., Torres-Benito, L., et al. (2017). Neurocalcin Delta Suppression Protects against Spinal Muscular Atrophy in Humans and across Species by Restoring Impaired Endocytosis. *Am. J. Hum. Genet.* 100, 297–315.

Rodino-Klapac, L.R., Haidet, A.M., Kota, J., Handy, C., Kaspar, B.K., and Mendell, J.R. (2009). Inhibition of myostatin with emphasis on follistatin as a therapy for muscle disease. *Muscle Nerve* 39, 283–296.

Rochette CF, Gilbert N, Simard LR. SMN gene duplication and the emergence of the SMN2 gene occurred in distinct hominids: SMN2 is unique to *Homo sapiens*. *Hum Genet.* Mar;108(3):255-66 (2001)

Rothstein JD, Patel S, Regan MR, Haenggeli C, Huang YH, Bergles DE, Jin L, Dykes Hoberg M, Vidensky S, Chung DS, Toan SV, Bruijn LI, Su ZZ, Gupta P, Fisher PB. Beta-lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression. *Nature.* Jan 6;433(7021):73-7 (2005)

Rodda DJ, Chew JL, Lim LH, Loh YH, Wang B, Ng HH, Robson P. Transcriptional regulation of Nanog by Oct4 and Sox2. *J. Biol. Chem.* 280, 24 731–24 737 (2005)

Rossoll W, Jablonka S, Andreassi C, Kröning AK, Karle K, Monani UR, Sendtner M. Smn, the spinal muscular atrophy-determining gene product, modulates axon growth and localization of beta-actin mRNA in growth cones of motoneurons. *J. Cell Biol.* Nov; 163:801-812 (2003)

Rossoll W, Kröning AK, Ohndorf UM, Steegborn C, Jablonka S, Sendtner M. 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 (2002)

Ruggiu, M., McGovern, V.L., Lotti, F., Saieva, L., Li, D.K., Kariya, S., Monani, U.R., Burghes, A.H.M., and Pellizzoni, L. (2012). A Role for SMN Exon 7 Splicing in the Selective Vulnerability of Motor Neurons in Spinal Muscular Atrophy. *Mol. Cell. Biol.* 32, 126–138.

Russman, B.S., Iannaccone, S.T., and Samaha, F.J. (2003). A Phase 1 Trial of Riluzole in Spinal Muscular Atrophy. *Arch. Neurol.* 60, 1601–1603.

Schrank, B., Götz, R., Gunnensen, J.M., Ure, J.M., Toyka, K.V., Smith, A.G., and Sendtner, M. (1997). Inactivation of the survival motor neuron gene, a candidate gene for human spinal muscular atrophy, leads to massive cell death in early mouse embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 9920–9925.

Skordis LA, Dunckley MG, Yue B, Eperon IC, Muntoni F. Bifunctional antisense oligonucleotides provide a trans-acting splicing enhancer that stimulates SMN2 gene expression in patient fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Apr 1;100(7):4114-9 (2003)

Shababi, M., Habibi, J., Yang, H.T., Vale, S.M., Sewell, W.A., and Lorson, C.L. (2010). Cardiac defects contribute to the pathology of spinal muscular atrophy models. *Hum. Mol. Genet.* 19, 4059–4071.

Shababi, M., Habibi, J., Ma, L., Glascock, J.J., Sowers, J.R., and Lorson, C.L. (2012). Partial restoration of cardiovascular defects in a rescued severe model of spinal muscular atrophy. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 52, 1074–1082.

Shanmugarajan, S., Tsuruga, E., Swoboda, K.J., Maria, B.L., Ries, W.L., and Reddy, S.V. (2009). Bone loss in survival motor neuron (*Smn(-/-)* SMN2) genetic mouse model of spinal muscular atrophy. *J. Pathol.* 219, 52–60.

Shorrock, H.K., Gillingwater, T.H., and Groen, E.J.N. (2018). Overview of Current Drugs and Molecules in Development for Spinal Muscular Atrophy Therapy. *Drugs* 78, 293–305.

Simic, G., Seso-Simic, D., Lucassen, P.J., Islam, A., Krsnik, Z., Cviko, A., Jelasic, D., Barisic, N., Winblad, B., Kostovic, I., et al. (2000). Ultrastructural analysis and TUNEL demonstrate motorneuron apoptosis in Werdnig-Hoffmann disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 59, 398–407.

Singh, N.K., Singh, N.N., Androphy, E.J., and Singh, R.N. (2006). Splicing of a critical exon of human Survival Motor Neuron is regulated by a unique silencer element located in the last intron. *Mol. Cell. Biol.* 26, 1333–1346.

Singh, N.N., Howell, M.D., Androphy, E.J., and Singh, R.N. (2017a). How the discovery of ISS-N1 led to the first medical therapy for spinal muscular atrophy. *Gene Ther.* 24, 520–526.

- Singh, R.N., Howell, M.D., Ottesen, E.W., and Singh, N.N. (2017b). Diverse role of survival motor neuron protein. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* 1860, 299–315.
- Sintusek, P., Catapano, F., Angkathunkayul, N., Marrosu, E., Parson, S.H., Morgan, J.E., Muntoni, F., and Zhou, H. (2016). Histopathological Defects in Intestine in Severe Spinal Muscular Atrophy Mice Are Improved by Systemic Antisense Oligonucleotide Treatment. *PLoS ONE* 11.
- Soler-Botija, C. (2002). Neuronal death is enhanced and begins during foetal development in type I spinal muscular atrophy spinal cord. *Brain* 125, 1624–1634.
- Soler-Botija, C., Ferrer, I., Gich, I., Baiget, M., and Tizzano, E.F. (2002). Neuronal death is enhanced and begins during foetal development in type I spinal muscular atrophy spinal cord. *BrainJ. Neurol.* 125, 1624–1634.
- Soler-Botija, C., Ferrer, I., Alvarez, J.L., Baiget, M., and Tizzano, E.F. (2003). Downregulation of Bcl-2 proteins in type I spinal muscular atrophy motor neurons during fetal development. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 62, 420–426.
- Soler-Botija, C., Cuscó, I., Caselles, L., López, E., Baiget, M., and Tizzano, E.F. (2005). Implication of Fetal SMN2 Expression in Type I SMA Pathogenesis: Protection or Pathological Gain of Function *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 64, 215–223.
- Tasca G, Iannaccone E, Monforte M, Masciullo M, Bianco F, Laschena F, et al. Muscle MRI in Becker muscular dystrophy. *Neuro- muscul Disord* 2012;22(suppl 2):S100–106.
- Tissue Eng. Regen. Med. O. Stevens, L., Bastide, B., Maurage, C.A., Dupont, E., Montel, V., Cieniewski-Bernard, C., Cuisset, J.M., Vallée, L., and Mounier, Y. (2008). Childhood spinal muscular atrophy induces alterations in contractile and regulatory protein isoform expressions. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 34, 659–670.
- Sumner, C.J., Huynh, T.N., Markowitz, J.A., Perhac, J.S., Hill, B., Coover, D.D., Schussler, K., Chen, X., Jarecki, J., Burghes, A.H.M., et al. (2003). Valproic acid increases SMN levels in spinal muscular atrophy patient cells. *Ann. Neurol.* 54, 647–654.
- Sumner, C.J., Paushkin, S., and Ko, C.-P. (2017). SPINAL MUSCULAR ATROPHY. *Disease mechanisms and therapy.*
- Surma, M., Wei, L., and Shi, J. (2011). Rho kinase as a therapeutic target in cardiovascular disease. *Future Cardiol.* 7, 657–671.
- Sutomo, R., Akutsu, T., Takeshima, Y., Nishio, H., Sadewa, A.H., Harada, Y., and Matsuo, M. (2002). Rapid SMN1 deletion test using DHPLC to screen patients with spinal muscular atrophy. *Am. J. Med. Genet.* 113, 225–226.
- Swoboda, K.J., Prior, T.W., Scott, C.B., McNaught, T.P., Wride, M.C., Reyna, S.P., and Bromberg, M.B. (2005). Natural History of Denervation in SMA: Relation to Age, SMN2 Copy Number, and Function. *Ann. Neurol.* 57, 704–712.
- Swoboda, K.J., Scott, C.B., Reyna, S.P., Prior, T.W., LaSalle, B., Sorenson, S.L., Wood, J., Acsadi, G., Crawford, T.O., Kissel, J.T., et al. (2009). Phase II open label study of valproic acid in spinal muscular atrophy. *PLoS One* 4, e5268.
- Thomson, A.K., Somers, E., Powis, R.A., Shorrocks, H.K., Murphy, K., Swoboda, K.J., Gillingwater, T.H., and Parson, S.H. (2017). Survival of motor neurone protein is required for normal postnatal development of the spleen. *J. Anat.* 230, 337–346.
- Tizzano, E.F., and Finkel, R.S. (2017). Spinal muscular atrophy: A changing phenotype beyond the clinical trials. *Neuromuscul. Disord.* 27, 883–889.
- Towfighi, J., Young, R.S., and Ward, R.M. (1985). Is Werdnig-Hoffmann disease a pure lower motor neuron disorder? *Acta Neuropathol. (Berl.)* 65, 270–280.

- Tsai, L.-K., Tsai, M.-S., Ting, C.-H., and Li, H. (2008). Multiple therapeutic effects of valproic acid in spinal muscular atrophy model mice. *J. Mol. Med.* 86, 1243–1254.
- Vacek, M., Sazani, P., and Kole, R. (2003). Antisense-mediated redirection of mRNA splicing. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 60, 825–833.
- Valori, C.F., Ning, K., Wyles, M., Mead, R.J., Grierson, A.J., Shaw, P.J., and Azzouz, M. (2010). Systemic Delivery of scAAV9 Expressing SMN Prolongs Survival in a Model of Spinal Muscular Atrophy. *Sci. Transl. Med.* 2, 35ra42-35ra42.
- Vågberg M, Norgren N, Dring A, Lindqvist T, Birgander R, Zetterberg H, et al. Levels and AgeDependency of Neurofilament Light and Glial Fibrillary Acidic Protein in Healthy Individuals and Their Relation to the Brain Parenchymal Fraction. *PloS One.* 2015;10(8):e0135886.
- Verhaart, I.E.C., Robertson, A., Leary, R., McMacken, G., König, K., Kirschner, J., Jones, C.C., Cook, S.F., and Lochmüller, H. (2017a). A multi-source approach to determine SMA incidence and research ready population. *J. Neurol.* 264, 1465–1473.
- Verhaart, I.E.C., Robertson, A., Wilson, I.J., Aartsma-Rus, A., Cameron, S., Jones, C.C., Cook, S.F., and Lochmüller, H. (2017b). Prevalence, incidence and carrier frequency of 5q-linked spinal muscular atrophy – a literature review. *Orphanet J. Rare Dis.* 12.
- Vill, K., Blaschek, A., Schara, U., Kölbel, H., Hohenfellner, K., Harms, E., Olgemöller, B., Walter, M.C., and Müller-Felber, W. (2017). Spinale Muskelatrophie: Zeit für das Neugeborenen screening? *Nervenarzt* 88, 1358–1366.
- Vitte, J.M., Davoult, B., Roblot, N., Mayer, M., Joshi, V., Courageot, S., Tronche, F., Vadrot, J., Moreau, M.H., Kemeny, F., et al. (2004). Deletion of murine Smn exon 7 directed to liver leads to severe defect of liver development associated with iron overload. *Am. J. Pathol.* 165, 1731–1741.
- Wang CH, Kleyn PW, Vitale E, Ross BM, Lien L, Xu J, Carter TA, Brzustowicz LM, Obici S, Selig S, et al. Refinement of the spinal muscular atrophy locus by genetic and physical mapping. *Am J Hum Genet.* Jan;56(1):202-9 (1995)
- Wang, C.H., Finkel, R.S., Bertini, E.S., Schroth, M., Simonds, A., Wong, B., Aloysius, A., Morrison, L., Main, M., Crawford, T.O., et al. (2007). Consensus statement for standard of care in spinal muscular atrophy. *J Child Neurol* 22, 1027–1049.
- Wirth, B., Herz, M., Wetter, A., Moskau, S., Hahnen, E., Rudnik-Schöneborn, S., Wienker, T., and Zerres, K. (1999). Quantitative Analysis of Survival Motor Neuron Copies: Identification of Subtle SMN1 Mutations in Patients with Spinal Muscular Atrophy, Genotype-Phenotype Correlation, and Implications for Genetic Counseling. *Am. J. Hum. Genet.* 64, 1340–1356.
- Wishart, T.M., Mutsaers, C.A., Riessland, M., Reimer, M.M., Hunter, G., Hannam, M.L., Eaton, S.L., Fuller, H.R., Roche, S.L., Somers, E., et al. (2014). Dysregulation of ubiquitin homeostasis and β -catenin signaling promote spinal muscular atrophy. *J. Clin. Invest.* 124, 1821–1834.
- Wurster CD, Günther R, Steinacker P, Dreyhaupt J, Wollinsky K, Uzelac Z, et al. Neurochemical markers in CSF of adolescent and adult SMA patients undergoing Nusinersen treatment. *Ther Adv Neurol Disord.* 2019;12:1756286419846058.
- Zerres K & Davies KE. 59th ENMC International Workshop: Spinal Muscular Atrophies: recent progress and revised diagnostic criteria 17-19 April 1998, Soestduinen, The Netherlands. *Neuromuscul Disord.* Jun;9(4):272-8 (1999)
- Zerres K & Rudnik-Schöneborn S. Natural history in proximal spinal muscular atrophy. Clinical analysis of 445 patients and suggestions for a modification of existing classifications. *ARCH NEUROL.* May, 52(5):518-23 (1995)
- Zhang HL, Pan F, Hong D, Shenoy SM, Singer RH, Bassell GJ. Active transport of the survival motor neuron protein and the role of exon 7 in cytoplasmic localization. *J Neurosci.* 23:6627-6637 (2003)

Zhang H, Xing L, Rossoll W, Wichterle H, Singer RH, Bassell GJ. Multiprotein complexes of the survival of motor neuron protein SMN with Gemins traffic to neuronal processes and growth cones of motor neurons. *J. Neurosci.* 26, 8622–8632 (2006)

Zhang Z, Lotti F, Dittmar K, Younis I, Wan L, Kasim M, Dreyfuss G. SMN deficiency causes tissue-specific perturbations in the repertoire of snRNAs and widespread defects in splicing. *Cell* 133, 585–600 (2008)

Zhou, H., Meng, J., Marrosu, E., Janghra, N., Morgan, J., and Muntoni, F. (2015). Repeated lowdoses of morpholino antisense oligomer: an intermediate mouse model of spinal muscular atrophy to explore the window of therapeutic response. *Hum. Mol. Genet.* 24, 6265–6277.

(2017). Charlotte J Sumner, Sergey Paushkin, Chien-Ping Ko. *Spinal muscular atrophy: disease mechanisms and therapy* (Amsterdam: Elsevier/Academic Press).

Zuluaga-Sanchez S, Teynor M, Knight C, Thompson R, Lundqvist T, Ekelund M, Forsmark A, Vickers AD, Lloyd A. Cost Effectiveness of Nusinersen in the Treatment of Patients with Infantile-Onset and Later-Onset Spinal Muscular Atrophy in Sweden. (2019)

9 APPENDICE

The Children's Hospital of Philadelphia Infant Test of Neuromuscular Disorders

CHOP INTEND

Name: _____ Diagnosis: _____ Gestational age: _____ weeks

Medical Record Number: _____ Date of Birth: _____ Age _____

Date of Evaluation: ___/___/___ Time of evaluation: _____ Time since last feeding: _____

Current health: Good health URI Other illness : _____ Recent surgery : _____

Feeding support: None Nasogastric Tube Gastrostomy Tube

Respiratory support: None BiPAP for _____ hours/day _____ Time off BiPAP at testing _____

	Position	Test Procedure	Graded Response	Score		
1 Spontaneous movement (Upper extremity)	Supine	Observe throughout testing May unweight limb or stimulate infant to facilitate response	Antigravity shoulder movement (achieves elbow off surface)	4	L R	Best side: Brazelton State:
			Antigravity elbow movement (achieves hand and forearm off surface)	3		
			Wrist movement	2		
			Finger movement	1		
			No movement of limbs	0		
2 Spontaneous movement (Lower extremity)	Supine	Observe throughout testing May unweight limb or stimulate infant to facilitate response	Antigravity hip movement (achieves feet and knees off surface)	4	L R	Best side: Brazelton State:
			Antigravity hip adduction/internal rotation (knees off surface)	3		
			Active gravity eliminated knee movement	2		
			Ankle movement	1		
			No movement of limbs	0		
3 Hand grip	Supine	Grip strength: place finger in palm and lift until shoulder comes off surface observe when infant loses grasp May use toy of similar diameter for older children	Maintains hand grip with shoulder off bed	4	L R	Best side: Brazelton State:
			Maintains grip with elbow off surface (shoulders on surface)	3		
			Maintains grip with forearm off surface (elbow supported on surface)	2		
			Maintains grip only with no traction	1		
			No attempt to maintain grasp	0		
4 Head in midline with visual stimulation*	Supine head midline	Visual stimulation is given with toy. If head is maintained in midline for 5 seconds: Place head in maximum available rotation and provide visual stimulation to encourage midline	Rotates from maximum rotation to midline	4	L>R R>L	Best side: Brazelton State:
			Turns head part way back to midline	3		
			Maintains midline for 5 or more seconds	2		
			Maintains midline, less than 5 seconds	1		
			Head falls to side, no attempts to regain midline	0		
5 Hipadductors	Supine, no diaper	Hips flexed and adducted Feet hip width apart and thighs parallel, knees slightly apart	Keeps knee off surface of bed > 5 sec or lifts foot off surface	4	L R	Best side: Brazelton State:
			Keeps knees off surface of bed 1-5 sec	2		
			No attempt to maintain knees off surface	0		

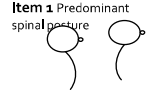
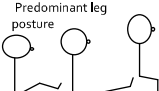
CHOP INTEND SCORE

6 Rolling: elicited from legs*	Supine (arms at side) Keep side tested up roll away from the Side tested	1. Holding infant's lower thigh, flex hip and knee and adduct across midline bringing pelvis vertical maintain traction and pause in this position. 2. If infant rolls to side apply traction at a 45° diagonal to body and pause to allow infant to attempt to derotate body	When traction is applied at the end of the maneuver, rolls to prone with lateral head righting	4	To R	Best side: Brazelton State:
			Rolls through side lying into prone without lateral head righting, clears weight-bearing arm to complete roll	3		
			Pelvis, trunk and arm lift from support surface, head turns and rolls onto side, arm comes thru to front of body	2		
			Pelvis and trunk lift from support surface and head turns to side. Arm remains behind trunk	1		
			Pelvis lifted passively off support surface.	0		
7 Rolling: elicited from arms*	Supine (arms at side) Keep side tested up roll away from the Side tested	1. Hold infant at the elbow move toward opposite shoulder maintain traction on limb and pause with the shoulders vertical allow infant to derotate 2. if the pelvis achieves vertical continue to provide traction	Rolls to prone with lateral head righting	4	To R	Best side: Brazelton State:
			Rolls into prone without lateral head righting; must clear weight-bearing arm completely to finish roll	3		
			Rolls onto side, leg comes thru and adducts, bringing the pelvis vertical	2		
			Head turns to side and shoulder and trunk lift from surface	1		
			Head turns to side; body remains limp or shoulder lifts passively	0		
8 Shoulder and elbow flexion And horizontal abduction	Side-lying with upper arm at 30° of shoulder extension and elbow flexion and supported on body (restrain lower arm if needed)	Prompt reach for a toy presented at arms length at shoulder level (may provide stimulation and observe spontaneous movement)	Clears hand from surface with antigravity arm movement	4	L	Best side: Brazelton State:
			Able to flex shoulder to 45 degrees, without antigravity arm movement	3		
			Flexes elbow after arm comes off body	2		
			Able to get arm off body	1		
			No attempt	0		
9 Shoulder flexion & Elbow flexion	Sitting in lap or on mat with head and trunk support (20° recline)	Present stimulus at midline and at shoulder level at arms length (may provide stimulation and observe spontaneous movement)	Abducts or flexes shoulder to 60 degrees	4	L	Best side: Brazelton State:
			Abducts or flexes shoulder to 30 degrees	3		
			Any shoulder flexion or abduction	2		
			Flexes elbow only	1		
			No attempt to lift arm	0		
10	Sitting in lap or over edge of mat with head and trunk support (20° recline) thigh horizontal to ground	Tickle plantar surface of foot Or gently pinch toe	Extends knee to > 45 degrees	4	L	Best side: Brazelton State:
			Extends knee 15 to 45 degrees	2		
			Any visible knee extension	1		
			No visible knee extension	0		

CHOP INTEND SCORE

11 Hip flexion and foot dorsiflexion	Hold infant against your body with legs free, facing outward. Support at the abdomen with the child's head resting between your arm and thorax	Stroke the foot or pinch the toe	Hip flexion or knee flexion > 30°	4	L R	Best side: Brazelton State:
			Any hip flexion or knee flexion	3		
			Ankle dorsiflexion only	2		
			No active hip, knee or ankle motion	0		
12 Head control*	Sitting with support at the shoulders and trunk erect	Place the infant in ring sit with head erect and assistance given at the shoulders (front and back). <i>(may delay scoring a grade of 1 and 4 until end of test)</i>	Attains head upright from flexion and turns head side to side	4		Score: Brazelton State:
			Maintains head upright for >15 sec (for bobbing head control score a 2)	3		
			Maintains head in midline for >5 sec. with the head tipped in up to 30° of forward flexion or extension	2		
			Actively lifts or rotates head twice from flexion within 15 seconds (do not credit if movement is in time with breathing)	1		
			No response, head hangs	0		
13 Elbow flexion Score with item 14	Supine	Traction response: pull to sit extend arms at 45 degree angle, to point of nearly lifting head off surface	Flexes elbow	4	L R	Best side: Brazelton State:
			Visible biceps contraction without elbow flexion	2		
			No visible contraction	0		
14 Neck Flexion Score with item 13	Supine	Traction response: hold in neutral proximal to wrist and shoulder at 45°, to point of nearly lifting head off surface	Lifts head off bed	4		Score: Brazelton State:
			Visible muscle contraction of SCM	2		
			No muscle contraction	0		
15 Head/Neck Extension (Landau)	Ventral suspension: Prone, held in one hand upper abdomen	Stroke along the spine from neck to sacrum. The coronal axis of the head when parallel to the bed surface = 0 degrees (horizontal)	Extends head to horizontal plane or above	4		Score: Brazelton State:
			Extends head partially, but not to horizontal	2		
			No head extension	0		
16 Spinal Incurvation (Galant)	Ventral suspension: Prone, held in one hand upper abdomen	Stroke Right then Left throacolumbar paraspinals or tickle abdomen or foot or tilt in infants with integrated Galant For infant over 10 kg knees and head may touch	Twists pelvis towards stimulus off axis	4	L R	Best side: Brazelton State:
			Visible paraspinal muscle contraction	2		
			No response	0		
Total score, best score on each side for each item (maximum 64 points):						

CHOP INTEND SCORE

Smartnet & PNCR		Hammersmith Functional Motor Scale for SMA (HFMS)				07/03/09	
Name		DOB					
Date of assessment		Time taken to complete					
Date of spinal surgery		Evaluator					
Please circle highest current level of independent mobility							LBC = Limited by contracture
None	Rolls	Bottom shuffles	creeps /crawls	Walks with crutches / frame /rollator	Walks with KAFO's / AFO's	Independent walking	
Comment.....							
Test	Instruction	2	1	0	L B C	S =	Comments
1 Plinth /chair sitting Can be over edge of plinth or on plinth / floor. Record best you see	Can you sit on the plinth /chair without using your hands for support for a count of 3?(Back unsupported /feet +/- support)	Able to sit using no hand support for a count of 3 or more	Needs one hand support to maintain balance for a count of 3	Needs two hand support to maintain balance Unable to sit			Item 1 Predominant spinal posture  Predominant leg posture  Circle predominant spinal posture and leg position
2 Long sitting Legs straight = knees maybe flexed, knee caps pointing upwards, ankles <10cm apart	Can you sit on the floor/plinth without using your hands for support and with your legs straight for a count of 3?	Able to sit on floor/plinth with legs straight without hand support for a count of 3	Able to sit on floor/plinth with legs straight propping with one hand support for a count of 3	Able to long sit using two hands for a count of 3 Or unable to sit with straight legs			
3 One hand to head in sitting Hand touch head above level of ears	Can you get one hand to your head without bending your neck	Able to bring one hand to head. Head and trunk remain stable	Can only bring hand to head by flexing head	Unable to bring hand to head even using head and trunk movement			R / L
4 Two hands to head in sitting Hands touch head above level of ear	Can you lift both hands up at the same time, to your head, without bending your neck?	Able to place both hands on head arms free from side. Head and trunk remain stable	Able to place hands on head but only using head flexion or side tilt or crawling hands up or one at a time	Unable to place both hands on head			
5 Supine to side-lying	Can you roll onto your side in both directions? Try not to use your hands	Able to ½ roll from supine both ways	Can ½ roll only one way R / L	Unable to half roll either way			Shoulders perpendicular to floor. Trunk and hips in line with body
6 Rolls prone to supine over R	Can you roll from your tummy to your back in both directions?	Turns to supine with free arms to the right	Turns to supine using arms to push/ pull with	Unable to turn into supine			
7 Rolls prone to supine over L		Turns into supine with free arms to the left	Turns to supine using arms to push/ pull with	Unable to turn into supine			
8 Rolls supine to prone over R		Turns to prone with free arms to the right	Turns to prone by pulling/ pushing on arms	Unable to turn into prone			
9 Rolls supine to prone over L	Can you roll from your back to your front in both directions?	Turns to prone with free arms to the left	Turns to prone by pulling/ pushing on arms	Unable to turn into prone			
10 Sitting to lying		Can you lie down in a controlled way from sitting?	Able to lie down in a controlled fashion through side lying or using clothes	Able to lie down by flopping forwards and rolling sideways	Unable or falls over		
11 Props on forearms	Can you prop yourself on your forearms and hold for a count of 3?	Able to achieve prop on elbows with head up for a count of 3	Holds position when placed for a count of 3	Unable			
12 Lifts head from prone	Can you lift you head up keeping your arms by your side for a count of 3?	Able to lift head up in prone arms by side for a count of 3	Lift head with arms in a forward position for a count of 3	Unable			
13 Prop on extended arms	Can you prop yourself up with straight arms for a count of 3?	Able to prop on extended arms, head up for a count of 3	Can prop on extended arms if placed for a count of 3	Unable			
14 Lying to sitting	Can you get from lying to sitting without rolling to your tummy?	Able by using side lying	Turns into prone or towards floor	Unable			
15 Four-point kneeling	Can you get onto your hands and knees with your head up and hold for a count of 3?	Achieves four-point kneeling – head up for a count of 3	Holds position when placed for a count of 3	Unable			

Test	Instruction	2	1	0	L B C	S = S = score	Comments
16 Crawling	Can you crawl forwards?	Able to crawl forwards – moves all four points twice or more	Moves all four points only once	Unable			
17 Lifts head from supine	Can you lift your head to look at your toes keeping your arms folded for a count of 3?	In supine, head must be lifted in mid-line. Chin moves towards chest. Held for a count of 3	Head is lifted but through side flexion or with no neck flexion. Held for a count of 3	Unable			
18 Supported standing	Can you stand using one hand for support for a count of 3?	Can stand using one hand support for a count of 3	Able to stand with minimal trunk support (not hip) for a count of 3	Can stand with hand support but needs knee/hip support in addition for a count of 3 Or unable			
19 Stand unsupported	Can you stand without holding onto anything for a count of 3?	Can stand independently for the more than a count of 3	Stands independently for a count of 3	Stands only momentarily (less than a count of 3) Or unable			
20 Stepping	Can you walk without using any help or aids? Show me	Able to take more than 4 steps unaided	Able to take 2 – 4 steps unaided	Unable			
SCORE		No of 2's =	No of 1's =	No of 0's =	TOTAL =	140	
Comments							

PNCR Expanded Hammersmith Functional Motor Scale for SMA (HFMSE) <i>add-on module</i>							07/03/09	
Test	Instruction	2	1	0	L B C	S =	Comments S = score	
21 Right hip flexion in supine	Can you bring your right knee to your chest?	Full hip flexion achieved	Initiates right hip and knee flexion (more than 10% of available range of motion)	Unable				
22 Left hip flexion in supine	Can you bring your left knee to your chest?	Full hip flexion achieved	Initiates left hip and knee flexion (more than 10% of available range of motion)	Unable				
23 High kneeling to right half kneel	Can you bring your left leg up so that your foot is flat on the ground without using your arms and hold for a count of 10?	Arms used for transition, maintains arms free in half kneel for a count of 10	Maintains half kneel with arm support for a count of 10	Unable				
24 High kneeling to left half kneel	Can you bring your right leg up so that your foot is flat on the ground without using your arms and hold for a count of 10?	Arms used for transition, maintains arms free in half kneel for a count of 10	Maintains half kneel with arm support for a count of 10	Unable				
25 High kneeling to stand leading with left leg	Can you stand up from this position starting with your left leg without using your hands? May need demonstration	Able with arms free	Able to shift weight off both knees (with or without arm support)	Unable				
26 High kneeling to stand leading with right leg	Can you stand up from this position starting with your right leg without using your hands? May need demonstration	Able with arms free	Able to shift weight off both knees (with or without arm support)	Unable				
27 Stand to sit	Can you sit on the floor, in a controlled way? Try not to use your arms.	Able to sit down with arms free and no collapse	Sits on floor but uses arms or crashes	Unable				
28 Squat	Can you squat? Pretend you are going to sit in a very low seat.	Squats with arms free (at least 90° of hip and knee flexion)	Initiates squat (more than 10%), uses arm support	Unable to initiate				
29 Jump 12" forward	Can you jump as far as you can, with both feet, from this line all of the way to the other line?	Jumps at least 12", both feet simultaneously	Jumps between 2-11", both feet simultaneously	Unable to initiate jump with both feet simultaneously				
30 Ascends stairs with rail	Can you walk up the steps? You can use one railing	Ascends 4 stairs with railing, alternating feet	Ascends 2-4 stairs, one rail, any pattern	Unable to ascend 2 stairs one rail				
31 Descends stairs with rail	Can you walk down the steps? You can use one railing	Descends four stairs, with railing, alternating feet	Descends 2-4 stairs, one rail, any pattern	Unable to descend 2 stairs with one rail				
32 Ascends stairs without rail	Can you walk up the steps? This time try not to use the railing	Ascends four stairs, arms free, alternating feet	Ascends 2-4 stairs, arms free, any pattern	Unable to ascend 2 stairs arms free				
33 Descends stairs without rail	Can you walk down the steps? This time try not to use the railing	Descends four stairs, arms free, alternating feet	Descends 2-4 stairs, arms free, any pattern	Unable to descend 2 stairs arms free				
SCORE		No of 2's =	No of 1's =	No of 0's =			TOTAL = /66	

HAMMERSMITH FUNCTIONAL MOTOR SCALE FOR SMA