

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE**  
**„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI**  
**ȘCOALA DOCTORALĂ**  
**DOMENIUL MEDICINĂ**

*AMIOTROFIA SPINALĂ – CORELAȚII CLINICO-BIOLOGICE*  
*ROLUL ANALIZEI NEUROFILAMENTELOR pNF-H ÎN LCR LA*  
*PACIENȚI TRATAȚI CU NUSINERSEN*  
**REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT**

**Conducător de doctorat:**

**Prof. Univ. Dr. Daniela Adriana Ion**

**Student-doctorand:**

**Moroșan (Bădina) Mihaela**

**2024**



## CUPRINS

Introducere .....	8
I. PARTEA GENERALĂ .....	12
Capitolul 1. Amiotrofia spinală .....	13
1.1. Definiție .....	13
1.2. Istoric .....	13
1.3. Epidemiologie .....	14
1.4. Etiologie .....	14
1.5. Proteina SMN .....	15
1.6. Manifestări clinice .....	16
1.7. Clasificare .....	16
1.7.1. În funcție de tipul de AMS .....	17
1.7.2. În funcție de numărul de copii ale genei SMN2 .....	18
1.7.3. În funcție de capacitățile funcționale/achizițiile motorii .....	19
1.8. Diagnostic .....	19
1.9. Diagnostic diferențial .....	20
1.10. Tratament .....	21
1.10.1. Nusinersen (Spinraza) .....	21
1.10.2. Onasemnogene abeparvovec-xioi (Zolgensma) .....	22
1.10.3. Risdiplam (Evrysdy) .....	22
1.10.4. Tratamente combinate .....	22
1.10.5. Terapii adjuvante .....	23
1.11. Monitorizarea evoluției sub tratament .....	24
1.12. Managementul pacientului cu AMS .....	25
1.12.1. Managementul funcției respiratorii .....	25
1.12.2. Managementul funcției gastrointestinale .....	25
1.12.3. Managementul ortopedic și recuperarea funcțională motorie .....	26
1.12.4. Managementul psihologic .....	26
1.13. Profilaxie .....	26
Capitolul 2. Scalele funcționale motorii .....	28
2.1. CHOP-INTEND .....	28
2.2. HINE-2 .....	29

2.3. HFMSE .....	29
2.4. RULM.....	30
2.5. 6MWT.....	30
Capitolul 3. Neurofilamentele pNF-H .....	32
3.1. Definiție .....	32
3.2. Rol.....	32
3.3. Subunități .....	32
3.4. Structura subunităților.....	33
3.5. pNF-H.....	33
Capitolul 4. Creatinina serică.....	35
Capitolul 5. Nusinersen (Spinraza).....	36
II. PARTEA ORIGINALĂ.....	38
Capitolul 6. Ipoteze de lucru.....	39
Capitolul 7. Obiectivele generale și secundare.....	40
7.1. Obiective generale: .....	40
7.2. Obiective secundare:.....	40
Capitolul 8. Metodologia generală a cercetării .....	41
8.1. Caracteristicile loturilor de studiu.....	41
8.2. Consimțământul informat .....	41
8.3. Criterii de includere .....	42
8.4. Criterii de excludere.....	43
8.5. Siguranța pacientului .....	43
8.6. Evaluarea clinică preliminară .....	43
8.7. Datele antropometrice.....	44
8.8. Stabilirea scorurilor pe scalele funcționale motorii .....	44
8.9. Determinarea nivelului neurofilamentelor pNF-H din LCR.....	44
8.9.1. Recoltarea probelor.....	44
8.9.2. Prelucrarea preanalitică.....	45
8.9.3. Verificarea aspectului macroscopic .....	45
8.9.4. Determinarea celularității .....	45
8.9.5. Determinarea concentrației de clor.....	45
8.9.6. Determinarea nivelului neurofilamentelor pNF-H .....	46
8.10. Determinarea nivelului pNF-H și al creatininei din ser .....	46

8.10.1. Recoltarea probelor.....	46
8.10.2. Prelucrarea preanalitică.....	46
8.10.3. Verificarea aspectului microscopic .....	47
8.10.4. Determinarea nivelului neurofilamentelor pNF-H .....	47
8.10.5. Determinarea nivelului creatininei serice .....	47
8.11. Grupul de control .....	47
8.12. Analiza statistică .....	47
Capitolul 9. Modificări în nivelul pNF-H din lichidul cefalorahidian și evoluția motorie după doza de încărcare cu nusinersen în diferite tipuri de amiotrofie spinală (Studiul 1) .....	49
9.1. Introducere .....	49
9.2. Ipoteze.....	49
9.3. Obiective .....	49
9.4. Material și metodă .....	50
9.5. Rezultate .....	50
9.6. Discuții.....	57
9.7. Limitări .....	58
9.8. Concluzii.....	58
Capitolul 10. Dinamica modificărilor nivelurilor pNF-H în LCR comparată cu scorurile scalelor motorii funcționale pe parcursul a trei ani de tratament cu nusinersen la copiii cu amiotrofie spinală tipurile 2 și 3 (Studiul 2) .....	60
10.1. Introducere .....	60
10.2. Ipoteze.....	60
10.3. Obiective .....	60
10.4. Material și metodă .....	61
10.5. Rezultate .....	61
10.6. Discuții.....	71
10.7. Limitări .....	73
10.8. Concluzii.....	73
Capitolul 11. Impactul tratamentului cu nusinersen asupra nivelului neurofilamentelor, al creatininei și al funcției motorii în recuperarea amiotrofiei spinale la populația pediatrică: o analiză a acestor biomarkeri (Studiul 3) .....	74
11.1. Introducere .....	74

11.2. Ipoteze.....	74
11.3. Obiective.....	74
11.4. Material și metodă .....	74
11.5. Rezultate .....	75
11.6. Discuții.....	91
11.7. Limitări .....	92
11.8. Concluzii.....	93
Capitolul 12. Importanța nivelului neurofilamentelor pNF-H în lichidul cefalorahidian ca factor predictiv și pentru monitorizarea răspunsului la tratamentul cu nusinersen pentru amiotrofia spinală în populația pediatrică în diferite perioade de timp corelat cu alți biomarkeri clinico-biologici (Studiul 4) .....	95
12.1. Introducere .....	95
12.2. Ipoteze.....	95
12.3. Obiective .....	96
12.4. Material și metodă .....	96
12.5. Rezultate .....	96
12.6. Discuții.....	130
12.6.1. AMS tip 1.....	131
12.6.2. AMS tip 2.....	132
12.6.3. AMS tip 3.....	134
12.6.4. AMS cu 2 copii ale genei SMN2 .....	135
12.6.5. AMS cu 3 copii ale genei SMN2 .....	136
12.6.6. AMS cu 4 copii ale genei SMN2 .....	138
12.7. Limitări .....	138
12.8. Concluzii.....	138
Capitolul 13. Discuții finale.....	141
Capitolul 14. Direcții viitoare de cercetare .....	143
Capitolul 15. Concluzii finale și contribuții personale .....	144
Bibliografie .....	146

## Lista cu lucrările științifice publicate

1. Axente, M., Shelby, E-S., Mirea, A., Sporea, C., **Badina, M.**, Padure, L., Ion, D.A. (2021). Clinical features and genetics in non-5q spinal muscular atrophy caused by acid ceramidase deficiency. *Journal of Medicine and Life*, 14(3), 424 – 428, <https://medandlife.org/wp-content/uploads/20.-jml-2021-0147.pdf> (Cap. 1, pag. 20)
2. Mirea, A.; Shelby, E.-S.; Axente, M.; **Badina, M.**; Padure, L.; Leanca, M.; Dima, V.; Sporea, C. Combination Therapy with Nusinersen and Onasemnogene Apeparvovec-xioi in Spinal Muscular Atrophy Type I. *J. Clin. Med.* 2021, 10, 5540. <https://doi.org/10.3390/jcm10235540>, <https://www.mdpi.com/2077-0383/10/23/5540/htm> (Cap. 1, pag. 22-23)
3. **Badina, M.**; Bejan, G.C.; Sporea, C.; Padure, L.; Mirea, A.; Leanca, M.-C.; Axente, M.; Grigoras, F.P.; Bejan, M.; Shelby, E.-S.; et al. Changes in pNFH Levels in Cerebrospinal Fluid and Motor Evolution after the Loading Dose with Nusinersen in Different Types of Spinal Muscular Atrophy. *Medicina* 2023, 59, 1244. <https://doi.org/10.3390/medicina59071244>, <https://www.mdpi.com/1648-9144/59/7/1244> (Cap. 9, pag. 49-59)
4. **Badina, M.**; Sporea, C.; Bejan, C.G.; Mirea, A.; Ion, D.A. The dynamic of changes of pNFH levels in the CSF compared with the motor scales' scores during three years of nusinersen treatment in children with spinal muscular atrophy types 2 and 3. *Balneo and PRM Research Journal*, 2024, 15(1):643, <https://bioclima.ro/Balneo643.pdf> (Cap. 10, pag. 60-73)
5. **Badina M.**, Sporea C., Bejan G.C., Mirea A., Ion D.A. Impact of Nusinersen on Neurofilament, Creatinine Levels, and Motor Function in Pediatric Spinal Muscular Atrophy Rehabilitation: A Biomarker Analysis. *Rehabilitation Medicine. Balneo and PRM Research Journal*, 2024, 15(2):681, <https://doi.org/10.12680/balneo.2024.681>, <https://bioclima.ro/Balneo681.pdf> (Cap. 11, pag. 74-94)

## **Amiotrofia spinală**

Amiotrofia spinală (atrofia musculară spinală, AMS), este o boală neurodegenerativă rară, cu transmitere autozomal recesivă, caracterizată prin degradarea treptată a neuronilor motori din coarnele anterioare ale măduvei spinării. Boala evoluează cu slăbiciune musculară progresivă și atrofie a musculaturii scheletice, alături de manifestări respiratorii și digestive care în timp, în lipsa unui tratament adecvat, pot duce la insuficiență respiratorie, paralizie și chiar deces în formele grave [1,2].

AMS, deși este considerată cea mai comună cauză de mortalitate și morbiditate în populația pediatrică, este o boală genetică rară, cu o prevalență de 1-2 la 100.000 de persoane și o incidență de 1 la 10.000 de nou-născuți vii [3-5].

Cauza AMS este sinteza insuficientă a proteinei necesare supraviețuirii neuronilor motori – proteina SMN, și se datorează în peste 95% din cazuri unei deleții sau mutații în regiunea 5q13, la nivelul genei SMN1 care codifică această proteină [1].

În condiții normale, 80-90% din cantitatea de proteină SMN este produsă de gena SMN1, restul de 10-20% fiind produsă de gena SMN2, apărută ca urmare a unor procese de inversie și duplicare ale genei SMN1 în decursul evoluției [6,7]. Cele două gene sunt aproape identice, cu excepția unor perechi de baze (7 în intronul 6, 2 în intronul 7, una în exonul 7 și una în exonul 8 – unde timina este înlocuită cu citozina în poziția 820) [8]. Această modificare duce la alterarea splicing-ului ARN-ului mesager, prin activarea acestuia într-un alt loc și eliminarea exonului 7 din structura genei SMN2 de către niște proteine inițiatore ale îmbinării [9]. Ca urmare a lipsei exonului 7, care apare în aproximativ 90% din transcriptele SMN2, se sintetizează o proteină modificată structural și funcțional, mai scurtă și rapid degradabilă în celule de către sistemul ubicuitină-proteazom [6-8].

Gena SMN2 este prezentă de obicei în mai multe copii situate în aceeași regiune cromozomială ca și gena SMN1, iar cantitatea de proteină SMN produsă depinde de numărul de copii ale genei SMN2 existente și influențează vârsta de apariție a simptomelor, severitatea manifestărilor clinice și rapiditatea evoluției spre paralizie, atrofie și insuficiențe de organ [10-12].

AMS evoluează cu slăbiciune musculară progresivă și atrofie a musculaturii scheletice, alături de manifestări respiratorii și digestive care în timp, în lipsa unui tratament adecvat, pot duce la insuficiență respiratorie, paralizie și chiar deces în formele grave. Slăbiciunea musculară este frecvent simetrică și se manifestă preponderent



proximal, la nivelul centurilor, afectând mai mult membrele inferioare decât pe cele superioare, în timp ce reflexele tendinoase profunde sunt abolite sau mult diminuate [13].

Tabloul clinic este dominat de consecințele limitării abilităților motorii, cu deformări posturale importante (în principal scolioze și contracturi) și consecințe asupra funcționării aparatelor respirator și digestiv [14].

Primele manifestări clinice apar de obicei în copilărie, în perioada de dezvoltare neuromusculară și de achiziții motorii, ducând în formele grave la dizabilități funcționale severe care evoluează cu paralizie și atrofie musculară, complicații respiratorii și digestive și insuficiențe de organ ce pot evolua până la deces.

### **Tipuri de AMS**

În funcție de vârsta de apariție a simptomelor și gradul de dezvoltare a abilităților fizice, AMS a fost clasificată în 5 tipuri principale de boală, subîmpărțite în diferite subtipuri în funcție de gravitatea manifestărilor clinice [15–17].

Tipul 0 de AMS este considerat cea mai severă dar și cea mai rară formă de boală, simptomele apar din viața intrauterină și adesea pacienții necesită suport ventilator încă de la naștere și nu vor putea niciodată să stea în șezut sau să-și controleze mișcările capului. De obicei există doar o copie a genei SMN2, iar speranța de viață este sub 6 luni [9,18].

În tipul 1 de boală - cel mai frecvent tip (aproximativ 58% din cazurile pediatrice de AMS), denumit și boala Werdnig-Hoffmann, simptomele apar în primele 6 luni de viață, iar pacienții au un aspect flasc (floppy infant) din cauza hipotoniei severe, cu slăbiciune musculară preponderent axială și reflexe tendinoase profunde diminuate [19–22]. Copii nu vor achiziționa abilitatea de a merge, nu vor fi capabili să mențină poziția șezând fără sprijin și uneori nu vor avea nici controlul poziției capului [11,21]. Din punct de vedere genetic acești pacienți prezintă cel mai frecvent o singură copie a genei SMN2 pentru subtipul 1A și 2 copii ale genei SMN2 pentru subtipurile 1B și 1C, iar fără suport ventilator mor în primii 2 ani de viață [23,24].

În boala Dubowitz – cum mai este denumit tipul 2 de AMS, care are o frecvență de aproximativ 29% din cazurile pediatrice, simptomele apar între 6 și 18 luni de viață [19,20]. În general sunt prezente 2 sau 3 copii ale genei SMN2, pacienții pot sta în șezut dar nu pot merge fără sprijin. În evoluție apar deformări osoase în special ale cutiei

toracice și scolioze, contracturi, dificultăți de ventilație și deglutiție, tuse inefficientă. Speranța de viață este mai mare, acești pacienți ajungând frecvent la maturitate [25].

Tipul 3 de AMS, denumit și boala Kugelberg-Welander, cu o frecvență de aproximativ 13% din cazurile pediatrice, este de obicei diagnosticat după vârsta de 18 luni, uneori chiar în adolescență, când încep să apară primele simptome [11,18–20]. Frecvent există 3 copii (în tipul 3A), 4 sau chiar mai multe copii ale genei SMN2 (în tipul 3B) și evoluează cu pierderea treptată, în grade variate de severitate, a abilităților câștigate până în acel moment, dar speranța de viață nu este influențată de această boală [25].

În tipul 4 de AMS simptomele apar la vârsta adultă, de obicei după 30 de ani, iar pacienții își pierd foarte rar abilitatea de a merge, eventual după vârsta de 50 de ani, iar speranța de viață este considerată normală [18]. În general, acești pacienți au între 4 și 8 copii ale genei SMN2 care reușesc să producă destul de multă proteină SMN [26].

### **Tratament AMS**

În momentul de față sunt aprobate 3 medicamente modificatoare de boală pentru tratamentul AMS datorate mutațiilor sau delețiilor genei SMN1 în regiunea q11.2-q13.3 a cromozomului 5. Toate aceste medicamente au rolul de a crește cantitatea de proteină SMN la nivelul neuronilor motori, dar diferă prin modul de acțiune, modul de administrare și nivelul de biodisponibilitate al proteinei SMN furnizate la nivel tisular [27–29].

Fiecare din cele trei medicamente aprobate - Nusinersen (Spinraza), Onasemnogene abeparvovec-xioi (Zolgensma) și Risdiplam (Evrysdy), are recomandări, criterii de includere, criterii de excludere și posibile reacții adverse, iar rezultate favorabile s-au înregistrat în studii pentru fiecare schemă de tratament, în ceea ce privește creșterea speranței de viață și îmbunătățirea calității vieții [30–33].

Studiile pe termen lung vor clarifica diferite aspecte în ceea ce privește tratamentul recomandat în funcție de vârsta pacientului, gravitatea formei de boală, timpul trecut de la apariția simptomelor la posibilitatea inițierii tratamentului și eficacitatea schimbării diferitelor scheme de tratament între ele sau a administrării simultane a mai multor tipuri de medicamente [6,29,30,34–36].

Rezultatele obținute în urma tratamentelor administrate depind în primul rând de statusul neurologic al pacientului în momentul inițierii terapiei, de gradul de deformare osoasă și de degradare musculară și de numărul de copii ale genei SMN2 prezente, astfel

încât inițierea tratamentului în perioada presimptomatică sau cât mai curând de la debutul simptomelor este crucială [37–39].

Pentru formele cele mai grave de AMS, cu debut simptomatic înainte de naștere și șanse minime de supraviețuire pentru câteva luni, tratamentul inițiat in utero poate reprezenta o șansă oferită acestor copii, conform studiilor efectuate pe șoareci, putând crește eficacitatea terapiilor actuale chiar și în alte forme de boală [39–41].

### **Terapii adjuvante**

Prin administrarea medicamentelor se tratează cauza declanșării bolii, aducându-se aportul necesar de proteină SMN pentru a stopa degradarea neuronilor motori, dar pentru obținerea celor mai bune rezultate pentru funcțiile motorii, respiratorii și digestive este necesară tratarea efectelor degradării treptate a motoneuronilor, în special prin recuperarea și tonifierea musculaturii atrofiate, prevenirea infecțiilor și supravegherea dietei [42–44].

Posturarea corectă, poziționarea cu ajutorul ortezelor, verticalizarea, exercițiile fizice active sau pasive și chiar tratamentul chirurgical sunt utilizate pentru gestionarea deformărilor musculoscheletale, pentru îmbunătățirea funcției pulmonare și a simptomatologiei digestive [42,45].

### **Monitorizarea evoluției sub tratament**

Odată cu apariția tratamentelor modificatoare de boală se simte tot mai mult necesitatea comparării evoluției stării generale a pacienților și câștigurilor obținute din punct de vedere motor, în funcție de tipul terapiei instituite, profilul fenotipic al bolii, vârsta de inițiere a tratamentului și severitatea simptomelor, cu ajutorul unor biomarkeri pentru a se personaliza terapia administrată în vederea obținerii celor mai bune rezultate posibile pentru fiecare pacient în parte.

Biomarkerii circulanți – nivelul de proteină SMN disponibil, nivelul neurofilamentelor (componente exclusiv neuronale), proteina Tau (proteină neuron-specifică) sau creatinina serică oferă informații asupra răspunsului la tratament, evoluției bolii și prognosticului, cu dezavantajul metabolizării și clearance-ului în timp [46–50].

În timp ce biomarkerii serologici sunt în faza de început de descoperire și validare pentru AMS, biomarkerii electrofiziologici au fost utilizați de-a lungul timpului în studiile

clinice asupra bolilor neuromusculare pentru aprecierea statusului funcțional și capitalului de neuroni viabili (CMAP, MUNE, SMUP, electromiografia) [51–54].

Analiza fenotipului genetic, a modificărilor aspectelor electrofiziologice și imagistice, precum și evoluția nivelului unor markeri circulanți pot sugera progresia bolii, prognosticul și răspunsul la tratament, fiecare categorie având avantaje și dezavantaje în evaluarea individuală [55,56].

Odată cu noile descoperiri în știință și tehnologie se vor îmbunătăți nu doar mecanismele de acțiune și căile de administrare ale tratamentelor aplicate, ci și modurile de evaluare pentru gradul de hipotonie și atrofie, precum și a evoluției funcționale a pacienților sub tratament cu ajutorul imaginilor computerizate și a inteligenței artificiale [57].

### **Managementul pacientului cu AMS**

Abordarea pacientului cu AMS este multidisciplinară, din cauza numeroaselor aspecte clinice și a consecințelor lor asupra diferitelor aparate și sisteme și în special asupra managementului ortopedic, respirator, gastrointestinal și nutrițional [58,59].

Complicațiile apărute prin afectarea aparatului respirator din cauza hipoventilației datorate slăbiciunii musculaturii respiratorii, a tusei ineficiente cu acumularea secrețiilor și a suprainfecțiilor reprezintă principalele cauze de mortalitate și morbiditate în AMS [59–62].

Tonifierea mușchilor respiratori și stimularea tusei pentru eliminarea secrețiilor prin fizioterapie și kinetoterapie, drenajul postural, aspirarea manuală sau mecanică și ventilația asistată sunt doar câteva tehnici de îmbunătățire a funcției respiratorii și astfel a oxigenării țesuturilor și organelor [62,63].

Dezvoltarea abilităților funcționale motorii sau recâștigarea achizițiilor pierdute din cauza bolii depind atât de programele de fizioterapie și kinetoterapie aplicate, dar și de voința și posibilitatea pacienților și aparținătorilor de a efectua exercițiile individuale recomandate [62,64].

Posturarea corectă, mobilizarea articulațiilor și reducerea contracturilor pot scădea riscul apariției formelor invalidante prin echipamente care să asigure mobilitatea pacienților și posibilitatea de autoîngrijire.

La nevoie se poate apela la orteze, cadre de sprijin sau scaune rulante, și chiar operații de îndreptare și susținere a coloanei vertebrale pentru creșterea calitatea vieții [64,65].

### **Scalele funcționale motorii**

Evaluarea deficitului motor și a forței musculare sunt utilizate în practica zilnică de către kinetoterapeuți și medici de recuperare pentru determinarea gradului de afectare neuromusculară, a severității bolii, prognosticului și evoluției în timp a diferitelor boli în special ca răspuns la tratamentele aplicate [66,67].

În AMS s-au creat și au fost validate diferite scale de evaluare funcțională motorie bazate pe caracteristicile clinice ale bolii, corelate cu gradul de severitate al simptomelor, vârsta pacienților și tipul de AMS. Scalele, cu diferite grade de complexitate, evaluează mișcările voluntare sau reflexe, postura, abilitatea de a merge cu sau fără sprijin sau rezistența la efort [68,69].

### **Neurofilamentele**

Neurofilamentele (NF) sunt heteropolimeri proteici exclusiv neuronali și sunt studiate în ultimii ani tot mai des ca posibili biomarkeri pentru agresiunea, degradarea și moartea neuronală datorită creșterii concentrației lor în LCR și de aici în sânge în urma unor afecțiuni acute neuronale, în boli neurodegenerative cum ar fi boala Parkinson, boala Alzheimer, boala Charcot-Marie-Tooth, demența frontotemporală, demența vasculară sau cu corpi Lewy, scleroza amiotrofică laterală, scleroza multiplă, neuropatia toxică sau cu axon gigant sau în arsuri severe [70–73].

Neurofilamentele aparțin clasei IV de filamente intermediare și alături de microfilamente și microtubuli participă la formarea citoscheletului neuronal [70,71].

Pe lângă rolul structural, neurofilamentele contribuie la modularea impulsului nervos, fiind implicate și în creșterea și menținerea diametrului axonal [74]. Activitatea neurofilamentelor este modulată de diverse oxidări, glicozilări, fosforilări, nitrări, ubicuitări, polimerizări, asamblări și dezasamblări - procese fizice și biochimice la care sunt supuse în timpul transportului lor, de la locul de sinteză situat în corpul neuronal la nivel axonal unde își desfășoară principala activitate [74–76].

Pe baza caracteristicilor fizice, chimice și recent a celor genetice, neurofilamentele au fost diferențiate în 5 subunități. Trei dintre ele, prezente atât la nivel central cât și la

nivel periferic, sunt denumite în funcție de masa moleculară mică - low (NF-L), medie - medium (NF-M) și mare - heavy (NF-H). Acestea li se adaugă o a patra subunitate,  $\alpha$ -internexin – în sistemul nervos central, respectiv periferin – în sistemul nervos periferic [70,74,77–79].

### **pNF-H**

pNF-H rezultă din fosforilarea subunității cu cea mai mare dimensiune a neurofilamentelor (NF-H), proces care îi conferă un mare grad de stabilitate față de diferitele enzime proteolitice din jur [74,76,80]. Este omniprezentă în neuroni, cu un maxim al concentrației la nivel axonal [70,81].

În bolile care afectează integritatea neuronală se eliberează componentele structurale ale acestora și acest fapt duce implicit la apariția subunității pNF-H în spațiul interneuronal de unde ajunge în LCR și apoi în ser [70,72,82].

Gradul de afectare al neuronilor este direct proporțional cu cantitatea de pNF-H și alte elemente structurale eliberate în LCR, cantitate care s-a corelat în diferite studii clinice cu diagnosticul, evoluția bolii și eficacitatea tratamentului administrat [75,83].

Modificarea nivelului de neurofilamente nu depinde doar de cauza care a provocat degradarea și distrugerea neuronilor, ci și de gradul de progresie a bolii, de severitatea simptomelor și de timpul scurs de la apariția simptomelor până la inițierea tratamentului specific [71,75,83,84].

Odată cu apariția tratamentelor modificatoare de boală se simte tot mai acut necesitatea depistării unor biomarkeri cât mai fideli pentru creșterea preciziei prognosticului, urmărirea evoluției, monitorizarea răspunsului la tratament și compararea efectelor diferitelor tratamente administrate, iar pentru bolile neurodegenerative neurofilamentele au fost din ce în ce mai des luate în calcul, fiind componente structurale exclusiv neuronale, care apar în cantități mici în LCR ca urmare a metabolismului normal al celulei neuronale, dar care sunt eliberate în cantități corespunzătoare dimensiunii afectării în caz de leziune sau moarte neuronală [71,84].

Stabilitatea crescută și cantitatea mare la nivel axonal sunt două aspecte deosebit de importante în alegerea nivelului subunității pNF-H a neurofilamentelor pentru analizarea ca biomarker al afectării neuronale [76,80].

### **Creatinina serică**

Creatinina serică este considerată un marker al activității musculare în diferite boli neuromusculare, nivelul ei fiind în corelație directă cu masa de țesut muscular existentă în organism și cu metabolismul muscular (de exemplu în distrofia musculară Duchenne sau Becker, în boala Kennedy sau în alte boli care evoluează cu atrofie musculară indiferent de etiologie) [85–87].

Creatinina serică nu este influențată de alimentație, de ritmul circadian, de efortul fizic sau de alte constante biologice, fiind corelată direct cu metabolismul muscular.

Creatinina serică reprezintă un parametru mai util în evaluarea gradului de utilizare a musculaturii față de creatinkinază, care se corelează mai bine cu gradul de degradare musculară [88].

În bolile neurodegenerative, o scădere a nivelului creatininei serice sugerează progresia gradului de denervare musculară, iar gradul scăderii acestui parametru se corelează cu severitatea afecțiunii [89,90].

Diferite studii pe pacienți cu AMS au urmărit nivelul creatininei ca biomarker pentru scăderea activității musculare prin denervarea progresivă care apare în cursul evoluției naturale a bolii și modificările nivelului seric apărute pe parcursul introducerii terapiei specifice modificatoare de boală [11,47,48,91].

### **Nusinersen (Spinraza)**

Nusinersen (Spinraza) este primul medicament aprobat pentru tratamentul etiologic al AMS 5q. Substanța activă este o oligonucleotidă antisens care previne splicing-ul prematur al ARN-ului mesager, incluzând exonul 7 în procesul de transcripție a genei SMN2 care codifică proteina SMN și determinând producerea unei proteine necesare supraviețuirii neuronilor motori corespunzătoare ca lungime și funcționalitate pentru oprirea degradării neuronale [92,93].

Tratamentul vizează în primul rând menținerea sau chiar îmbunătățirea funcției motorii și îmbunătățirea funcției respiratorii și implicit a calității vieții.

Medicamentul este condiționat sub formă de soluție injectabilă, cu cale de administrare intratecală, ambalat în flacoane de 5 ml, conținând 12 mg de substanță activă la o concentrație de 2,4 mg/ml.

Doza recomandată pentru fiecare administrare este de 5 ml (12 mg), iar schema de tratament cuprinde două părți: perioada de încărcare – cu administrarea medicamentului

în zilele 0, 14, 28 și 63 de la inițierea terapiei și perioada de întreținere, care presupune administrarea unei doze de medicament odată la 4 luni ( $\pm$  2 săptămâni) pe parcursul întregii vieți [94]. Înainte de administrare se recomandă extragerea a 5 ml de LCR pentru a menține constantă presiunea intracraniană [95].

### **Ipoteze de lucru**

AMS face parte din categoria bolilor neurodegenerative care evoluează cu distrugerea progresivă și moartea neuronilor motori, însoțită de consecințele aferente: eliberarea componentelor structurale neuronale în spațiul interstițial neuronal, în LCR și în ser, afectarea funcției motorii și a masei musculare.

Nivelul neurofilamentelor eliberate – și implicit al componentei pNF-H a acestora, ca structuri existente exclusiv la acest nivel, ar trebui să fie direct proporțional cu cantitatea de neuroni lezați și astfel să reprezinte un mod de cuantificare a gradului de afectare neuronală. Din spațiul interstițial, neurofilamentele ajung în LCR și de aici în ser, iar nivelul detectat depinde atât de cantitatea eliberată cât și de procesele metabolice suferite și de clearance-ul plasmatic.

Afectarea funcției motorii se observă prin evoluția scorurilor pe scalele funcționale de evaluare motorie, iar gradul de atrofiere al masei musculare este reflectat de nivelul creatininei serice.

Odată cu introducerea tratamentului modificador de boală, distrugerea neuronilor este stopată, nivelul neurofilamentelor pNF-H în LCR ar trebui să se mențină la un minim bazal datorat metabolismului neuronal normal, performanțele motorii ar trebui să se îmbunătățească pe măsura aplicării programelor de recuperare funcțională, iar masa musculară ar crește, mărinde astfel și nivelul creatininei serice în concordanță cu gradul activității musculare.

Parametrii de monitorizare pentru funcția motorie (scorul obținut pe scale) și pentru intensitatea activității musculare (nivelul creatininei serice) ar trebui să evolueze invers proporțional față de markerii degradării neuronale (nivelul pNF-H din LCR și din ser). La evaluarea de la inițierea tratamentului, creșterea neurofilamentelor ar trebui să fie în concordanță cu scăderea scorurilor motorii și a nivelului creatininei serice, iar odată cu administrarea tratamentului cu nusinersen, nivelul neurofilamentelor ar trebui să scadă și performanțele motorii și nivelul creatininei serice să se îmbunătățească.



### **Obiective generale**

- Determinarea nivelului neurofilamentelor pNF-H din LCR în funcție de vârstă, tipul de boală, numărul de copii ale genei SMN2 și stadiul tratamentului (la inițiere, pe parcursul primului an din perioada de întreținere, respectiv la un an, doi și trei de tratament) pentru populația pediatrică tratată cu nusinersen în CNCRNC Dr. Nicolae Robănescu în vederea stabilirii unor niveluri de referință pentru pacienții pediatrici cu AMS din România
- Analizarea evoluției nivelului neurofilamentelor pNF-H din LCR în diferite perioade de tratament
- Monitorizarea evoluției AMS prin prisma nivelului neurofilamentelor ca biomarker al progresiei bolii
- Stabilirea importanței nivelului pNF-H ca factor predictiv pentru evaluarea răspunsului la tratament

### **Obiective secundare**

- Evaluarea statusului funcțional al pacienților reflectat prin scorurile obținute pe scalele funcționale motorii în diferite perioade de tratament
- Analizarea evoluției nivelului neurofilamentelor pNF-H din ser și al creatininei serice în diferite perioade de tratament
- Stabilirea corelațiilor dintre nivelul neurofilamentelor pNF-H din LCR, valoarea scorurilor obținute pe scalele de evaluare motorie, nivelul neurofilamentelor pNF-H din ser și al creatininei serice
- Corelarea valorilor și a evoluției nivelului neurofilamentelor pNF-H din LCR pentru utilizarea acestui parametru ca marker predictiv asupra rezultatelor tratamentului în timp
- Determinarea eficacității tratamentului administrat în funcție de evoluția nivelului neurofilamentelor pNF-H față de momentul inițial

### **Metodologia generală a cercetării**

În perioada cercetării doctorale au fost analizate loturi de pacienți diagnosticați cu AMS, tratați cu nusinersen prin Programul Național pentru Boli Rare – Tratamentul cu Nusinersen pentru Atrofia Musculară Spinală, în perioada octombrie 2018 – noiembrie 2023, în Centrul Național Clinic de Recuperare Neuropsihomotorie Dr. Nicolae

Robănescu din București – spital clinic tip monospecialitate, dedicat recuperării neuropsihomotorii a copilului, structură unică în România, de nivel european, cu adresabilitate la nivelul întregii țări.

În studii au fost incluși toți pacienții eligibili în condițiile unor criterii stricte de admitere și respingere.

Studiile au fost aprobate de Comisia de Etică a Centrului Național Clinic de Recuperare Neuropsihomotorie Copii „Dr. Nicolae Robănescu” (acordul nr. 7464 din 01 octombrie 2018).

Consimțământul informat a fost obținut de la aparținătorii legali ai tuturor pacienților incluși în studii, conform reglementărilor locale și a Declarației Asociației Medicale Mondiale de la Helsinki, revizuită în anul 2000 la Edinburgh.

Toate prelucrările de date au respectat regulamentul GDPR 697/2016.

Criteriile generale de includere în studii au fost: pacient pediatric, existența unei mutații bialelice sau o mutație și o deleție heterozigote a genei SMN1 în regiunea 5q13 confirmată prin analiză genetică, existența a cel puțin 2 copii ale genei SMN2, lipsa oricărei afecțiuni acute care ar fi putut să influențeze suplimentar nivelul neurofilamentelor pNF-H, admiterea în programul național de tratament cu nusinersen, administrarea tratamentului și efectuarea evaluărilor clinice, paraclinice și funcționale dinaintea fiecărei administrări cu personalul specializat și aparatura din cadrul CNCRNC Dr. N. Robănescu.

Principalele criterii de excludere au fost: administrarea altui tratament modificador de boală, prezența altei afecțiuni cunoscute pentru distrugerea neuronilor motori cu creșterea nivelului pNF-H din LCR și ser, existența unor afecțiuni suplimentare care ar fi putut influența performanțele motorii, nerespectarea schemei standard de tratament cu nusinersen.

Evaluarea clinică dinaintea administrării fiecărei doze de tratament a fost efectuată de o echipă multidisciplinară a CNCRNC Dr. N. Robănescu. Medici neurologi pediatri, anesteziști și pediatri specializați și cu experiență în evaluarea pacienților cu AMS au coroborat parametrii clinici, rezultatele parametrilor funcționali furnizați de kinetoterapeuți specializați în evaluarea pacienților cu această afecțiune și parametrii paraclinici rezultați din prelucrarea probelor biologice în laboratorul acreditat al CNCRNC Dr. N. Robănescu.

Evaluările au fost efectuate de aceleași persoane pentru scăderea riscului de eroare în cadrul analizelor și a interpretării datelor, iar administrarea medicamentului s-a realizat după obținerea acordului echipei multidisciplinare.

Datele demografice, antropometrice, clinice și paraclinice ale participanților, care au fost folosite în cadrul studiilor, au fost preluate din foile de observație ale pacienților și din datele înregistrate în mod curent în programul informatic al CNCRNC Dr. N. Robănescu.

Kinetoterapeuți din cadrul CNCRNC Dr. N. Robănescu, specializați în evaluarea pacienților cu AMS, au evaluat abilitățile motorii ale subiecților incluși în studii utilizând scale funcționale specifice tipului de AMS. Evaluările au fost efectuate de aceeași echipă de specialiști pentru a minimiza gradul de subiectivitate.

În cadrul studiilor desfășurate s-au folosit datele obținute pe scala CHOP-INTEND pentru pacienții diagnosticați cu AMS tip 1 și HFMSE pentru cei cu tipurile 2 și 3.

Scala CHOP-INTEND a fost validată pentru pacienți cu vârsta cuprinsă între 3 luni și 2 ani, cu deficiențe motorii severe și dificultăți respiratorii [96]. Scala evaluează forța și mobilitatea mușchilor axiali și periferici cu ajutorul a 16 cerințe în diferite grade de dificultate apreciate cu un punctaj de la 0 la 4 puncte (când cerința este îndeplinită corect), punctajul maxim care poate fi obținut pe această scală pentru îndeplinirea completă a cerințelor fiind de 64 puncte [15,97,98]. În acest fel sunt apreciate mișcările spontane, reflexul de prindere, gradele de flexie și extensie ale membrilor, stabilitatea capului [15].

Scala HFMSE (The Expanded Hammersmith Functional Motor Scale), introdusă în evaluarea pacienților cu AMS din 2005, este scala Hammersmith modificată pentru a fi folosită atât în tipul 2 cât și în tipul 3 de AMS, pentru pacienți cu debut tardiv al simptomelor [15,99]. Scala are un punctaj maxim de 66 puncte care se pot obține prin îndeplinirea corectă a 33 de cerințe evaluate fiecare cu maxim 2 puncte [69,100].

S-au utilizat atât valorile absolute înregistrate, cât și cele relative la punctajul maxim posibil de obținut pe scalele motorii (randamentul) pentru a putea compara performanțele realizate de pacienți.

### **Determinarea nivelului neurofilamentelor pNF-H din LCR**

Probele de LCR s-au recoltat chiar înainte de fiecare administrare intratecală a nusinersen-ului prin puncție lombară, într-un recipient steril, în cantitate de aproximativ

5 ml, corespunzătoare volumului de medicament administrat, conform protocolului de administrare a medicamentului.

Nivelul de pNF-H a fost determinat prin tehnica ELISA (the enzyme-linked immunosorbent assay), conform instrucțiunilor de lucru din prospectul emis de producătorul kitului de reactivi, destinat pentru determinarea cantitativă in vitro a neurofilamentelor pNF-H în probele de LCR sau ser de origine umană și care face parte din categoria dispozitivelor medicale pentru diagnostic in vitro.

### **Determinarea nivelului pNF-H și al creatininei din ser**

Probele de sânge destinate analizelor de laborator pentru monitorizarea și evaluarea paraclinică a pacienților au fost recoltate înainte de administrarea fiecărei doze de nusinersen.

Nivelul de pNF-H a fost determinat prin tehnica ELISA, pe același tip de trusă ca și cel folosit pentru determinarea nivelului neurofilamentelor pNF-H din LCR.

Nivelul creatininei serice a fost determinat prin metoda Jaffe îmbunătățită, bazată pe reacția creatininei cu picratul de sodiu.

### **Grupul de control**

Studiile efectuate nu au avut un grup separat de control. Datele obținute chiar înainte de începerea tratamentului au fost utilizate pe post de "grup de control" pentru urmărirea rezultatelor obținute în diferite momente ale tratamentului apreciate relativ la aceste valori.

Nivelurile neurofilamentelor pNF-H din LCR și din ser s-au interpretat în valori absolute și în comparație cu valorile obținute chiar înainte de administrarea primei doze de nusinersen pentru aprecierea răspunsului la tratament.

Abordarea a permis evaluarea progresiei naturale a acestei afecțiuni înainte de administrarea tratamentului modificador de boală, oferind o linie de referință pentru comparația cu rezultatele obținute în timp.

## **Modificări în nivelul pNF-H din lichidul cefalorahidian și evoluția motorie după doza de încărcare cu nusinersen în diferite tipuri de amiotrofie spinală (Studiul 1)**

Primul studiu a pornit de la ipoteza că perioada de încărcare cu nusinersen poate fi considerată ca având cea mai mare influență asupra nivelului neurofilamentelor din LCR, cu reducerea marcată a acestuia ca urmare a asigurării unei cantități suficiente de proteină SMN, eliminând astfel cauza distrugerii anormale a neuronilor motori, aspect reflectat clinic prin creșterea scorurilor pe scalele de evaluare motorie.

Scopul acestui studiu retrospectiv a fost acela de a analiza modificările survenite în nivelul neurofilamentelor pNF-H din LCR după perioada de încărcare cu nusinersen, corespunzătoare primelor 6 luni de tratament modificator de boală, în diferite tipuri de AMS, la pacienți cu diferite fenotipuri și cu terapia inițiată la diferite vârste, comparativ cu nivelul inițial. Suplimentar, am analizat relația dintre rezultatele obținute pe scalele de evaluare motorie și evoluția nivelului pNF-H în LCR ca expresie a reducerii degradării neuronilor motori.

În studiu au fost incluși 38 pacienți cu diagnostic confirmat genetic de AMS, acceptați în programul național de boli rare pentru tratamentul cu nusinersen în perioada octombrie 2018 – iulie 2021 în cadrul CNCRNC Dr. N. Robănescu - toți pacienții care împliniseră 6 luni de la inițierea tratamentului cu nusinersen . Au fost analizate rezultatele obținute în două momente de timp: înainte de inițierea tratamentului (momentul T0) și înainte de administrarea celei de-a 5-a doze de tratament (momentul T1), doză cu care începe tratamentul de întreținere.

Studiul a evaluat comparativ rezultatele obținute pentru diferite categorii de pacienți, în funcție de vârstă, tipul de AMS și numărul de copii SMN2, pentru a determina categoria cu cel mai bun răspuns la tratament.

Media de vârstă în funcție de tipul de AMS a fost între 2,07 și 215 luni, cei mai tineri pacienți fiind cei cu AMS tip 1.

Valorile nivelului pNF-H în LCR înainte de inițierea tratamentului au variat foarte mult între diferite categorii de pacienți. Cea mai mică valoare a pNF-H fost de 0,035 ng/ml și s-a obținut la un pacient în vârstă de 104 luni cu 3 copii ale genei SMN2 diagnosticat cu AMS tip 2, iar cea mai mare valoare, de 3,321 ng/ml a fost înregistrată la un pacient în vârstă de 3,63 luni, cu 2 copii ale genei SMN2, diagnosticat cu AMS tip 1.

Gama largă de valori pNF-H observate în studiu este de asemenea remarcabilă, cele mai ridicate niveluri ale pNF-H fiind obținute înainte de inițierea tratamentului, în cele mai grave forme de boală și la pacienții cu cele mai mici scoruri pe scalele motorii funcționale, similar cu rezultatele altor studii din literatură [32,101,102].

Observațiile arată că tratamentul cu nusinersen poate duce la îmbunătățiri ale funcției motorii și la o scădere a nivelurilor pNF-H pentru pacienții pediatrici cu AMS [103]. Eficiența tratamentului este dovedită prin încetinirea sau oprirea progresiei bolii (pe baza simptomelor clinice) și prin modificări ale scorurilor obținute de pacienți pe scalele motorii.

Corelația dintre nivelul pNF-H în LCR și scorurile obținute la evaluarea motorie specifică pentru AMS în primele 6 luni de tratament a fost negativă însemnând că scăderea nivelului pNF-H în timpul tratamentului a evoluat odată cu creșterea scorurilor pe scalele de evaluare funcțională motorie, deși corelația a fost semnificativă statistic doar în cazul AMS de tip 2.

Luând în considerare că doza de nusinersen administrată în conformitate cu protocolul medicamentului indicat de producător compensează lipsa de proteină SMN necesară și acoperă necesarul pentru supraviețuirea neuronilor motori, pentru a compara eficacitatea tratamentului ținând cont de diferitele scale motorii funcționale aplicate pacienților, variația procentuală a acestor parametri (nivelul pNF-H și scorul relativ pe scalele funcționale) a fost mai relevantă decât diferența în valori absolute pentru acești parametri.

Randamentul modificărilor nivelului pNF-H este reprezentat de procentul diferenței dintre nivelul inițial al neurofilamentelor față de nivelul obținut după 6 luni de tratament, iar pentru scalele motorii acesta este reprezentat de procentul diferenței dintre valoarea relativă a scorului la 6 luni de la inițierea tratamentului față de valoarea relativă inițială (valoare relativă față de valoarea maximă a scalei).

După șase luni de tratament cu nusinersen, funcția motorie a prezentat o îmbunătățire pentru majoritatea pacienților incluși în studiu, demonstrată prin creșterea scorurilor pe scalele funcționale motorii, în timp ce doar câțiva pacienți nu au prezentat nicio modificare a scorurilor obținute sau au înregistrat o scădere a acestora.

Constatările sugerează că majoritatea pacienților au prezentat un răspuns pozitiv la tratamentul cu nusinersen în ceea ce privește creșterea scorurilor funcționale motorii și scăderea nivelurilor pNF-H în LCR.

## **Dinamica modificărilor nivelurilor pNF-H în LCR comparată cu scorurile scalelor motorii funcționale pe parcursul a trei ani de tratament cu nusinersen la copiii cu amiotrofie spinală tipurile 2 și 3 (Studiul 2)**

În acest studiu s-au urmărit modificările nivelului de neurofilamente pNF-H în LCR pe parcursul a trei ani de tratament de întreținere cu nusinersen, s-au analizat aceste modificări comparativ cu valorile de la începutul tratamentului și de la începutul perioadei de întreținere pentru diferite vârste și tipuri de AMS, iar rezultatele au fost evaluate prin prisma performanțelor obținute pe scalele funcționale motorii.

Scopul acestui studiu retrospectiv a fost acela de a analiza modificările survenite în nivelul neurofilamentelor pNF-H din LCR în primul an de tratament și la trei ani de la inițierea tratamentului cu nusinersen, la populația pediatrică cu debut tardiv al manifestărilor clinice - în tipurile 2 și 3 de AMS, la pacienți cu diferite fenotipuri și la diferite vârste, comparativ cu nivelul inițial. Suplimentar, am analizat relația dintre rezultatele obținute pe scalele de evaluare motorie și evoluția nivelului pNF-H în LCR ca expresie a reducerii degradării neuronilor motori.

Lotul acestui studiu retrospectiv monocentric a fost format din 18 pacienți diagnosticați cu atrofie musculară spinală și tratați cu nusinersen în perioada octombrie 2018 – iulie 2023 prin Programul Național pentru Boli Rare desfășurat în cadrul CNCRNC Dr. Nicolae Robănescu.

În studiu au fost incluși toți pacienții diagnosticați cu AMS de tip 2 sau 3, cu cel puțin 13 doze de tratament administrate până în iulie 2023.

În cadrul studiului, nivelul neurofilamentelor pNF-H în LCR a fost determinat la trei ani de la începerea tratamentului cu nusinersen, mai exact la 38 de luni. Rezultatele au fost analizate atât în funcție de vârstă, sex, tip de AMS și de numărul de copii ale genei SMN2, precum și din punct de vedere al evoluției scorurilor pe scalele funcționale motorii față de valorile obținute în primul an de tratament.

Din analiza datelor obținute nu s-au observat corelații semnificative statistic între nivelul pNF-H din LCR la a 13-a injecție și cel de la momentul inițierii tratamentului sau față de tipul de AMS, numărul de copii ale genei SMN2 și sexul pacienților.

Majoritatea pacienților a prezentat îmbunătățiri ale scorurilor funcționale. Dinamica evoluției motorii în funcție de randamentele obținute pe scalele de evaluare în trei ani de tratament, în valoare absolută și relativ la de momentul inițierii nu a depins în mod semnificativ de sexul, vârsta sau tipul de AMS al pacienților.

Cea mai rapidă scădere a nivelului pNF-H a fost obținută în primele șase luni de tratament cu nusinersen, așa cum s-a observat și în studiile pentru pacienți adulți, cu forme de AMS cu debut tardiv (tip 3 și 4), ca dovadă a eficacității tratamentului în încetinirea sau chiar oprirea degradării neuronale din cauza existenței unei cantități insuficiente de proteină SMN necesară supraviețuirii neuronilor motori [104].

Scorurile obținute pe scalele de evaluare motorie sugerează o oprire a degradării funcțiilor motorii sau chiar o îmbunătățire treptată a performanțelor odată cu trecerea timpului și continuarea administrării tratamentului.

Rata de scădere a pNF-H nu se corelează cu o îmbunătățire mai rapidă a performanțelor motorii în oricare dintre momentele studiate (la 6, 10 sau 38 de luni de la inițierea tratamentului), nivelul pNF-H în LCR neputând fi luat în considerare ca factor predictiv al evoluției pacienților, ci doar ca și criteriu de diagnostic, comparativ cu studiile efectuate pentru pacienții cu atrofie spinală laterală, la care nivelul pNF-H a avut atât valoare de diagnostic cât și valoare prognostică [105].

Corelația nesemnificativă a scăderii nivelului de pNF-H în LCR cu creșterea scorurilor motorii se poate datora lotului mic de pacienți, intervalului de timp variat dintre debutul simptomelor și inițierea terapiei, diferitelor grade de afectare funcțională motorie la inițierea tratamentului și complianței inegale a pacienților pentru efectuarea terapiei fizice individuale, aspect cu un rol semnificativ în recuperarea funcțională a acestor pacienți [44].

Rezultatele obținute sunt similare cu cele descrise în analizele nivelului pNF-H în LCR din studiile SHINE, NURTURE, EBRACE, ENDEAR și CHERSH privind loturile de control (populația sănătoasă cu vârsta cuprinsă între 0 și 20 de ani) și populația diagnosticată cu AMS (înainte de tratament și cu sau fără tratament) [106].

În perioada de inițiere în tipurile 2 și 3 de AMS, evoluția nivelului neurofilamentelor este similară cu cea descrisă în studiile pe pacienți adulți, total diferită de rezultatele obținute la pacienții cu AMS tip 1, pentru care există o mai pronunțată rată de scădere a nivelului de neurofilamente pNF-H din LCR sub tratamentul cu nusinersen raportat la valoarea din momentul inițierii terapiei. Cantitatea de pNF-H existentă depinde de numărul de neuroni viabili care sunt afectați și de rata de degradare și de eliminare a pNF-H din LCR [104,106,107].

Cele mai mari valori ale neurofilamentelor pNF-H au fost observate înainte de inițierea tratamentului și media valorii pe subgrup de pacienți a fost mai mare pentru



pacienții cu AMS tip 2 comparativ cu cei cu tip 3, similar cu datele din alte studii privind efectele nusinersen pe populația pediatrică cu AMS [104,106].

Pe de altă parte, comparativ cu rezultatele din alte studii, pacienții cu 2 copii ale genei SMN2 au avut valori medii ale pNF-H în LCR mai mici comparativ cu cei cu mai mult de 2 copii ale genei SMN2, fapt influențat probabil și de numărul aproape dublu de pacienți cu mai mult de 2 copii ale genei SMN2, dar aparținând tipului 2 de AMS, în concordanță cu vârsta de debut a simptomelor, aspect care subliniază faptul că gena SMN2 nu poate furniza cantitatea de proteină SMN necesară indiferent de numărul de copii existente ale acestei gene.

Faptul că cel mai tânăr pacient a avut cea mai mare valoare a pNF-H înainte de inițierea tratamentului sugerează o rată mai accelerată a distrugerii neuronale în primele luni de viață, subliniind importanța efectuării screening-ului neonatal pentru AMS odată cu apariția terapiei modificatoare de boală.

Creșterea nivelului pNF-H a fost observată atât la pacienții cu scleroză multiplă în perioadele de activare a bolii, cât și corelată cu progresia bolii în scleroza laterală amiotrofică. Cu toate acestea, ar putea fi de ajutor în diagnosticul diferențial al acestor boli la pacienții cu forme de AMS cu debut tardiv [108,109].

Monitorizarea nivelului pNF-H în AMS aduce informații despre eficacitatea tratamentului în stoparea degradării neuronale din cauza deficienței proteinei SMN, dar poate semnală și apariția unei afecțiuni asociate care afectează neuronii motori înaintea altor manifestări clinice.

În timpul tratamentului cu nusinersen pentru populația pediatrică diagnosticată cu forme mai puțin severe de AMS (tipurile 2 și 3), nivelul de pNF-H în LCR a scăzut semnificativ, mai ales în perioada de încărcare. După acea perioadă, pNF-H a rămas la un nivel scăzut în comparație cu valorile inițiale în condițiile în care nu a apărut niciun eveniment extern care ar fi putut produce daune sau o degradare a neuronilor motori din alte cauze.

Scăderea pNF-H este însoțită de îmbunătățirea scorurilor pe scalele de evaluare motorie. Cu toate acestea, cei doi parametri nu se corelează semnificativ, cel puțin pentru grupul și momentele studiate din cei trei ani de tratament cu nusinersen.

Creșterea nivelului pNF-H în LCR în condițiile unor tipuri clinice cu debutul tardiv al AMS la copii și adolescenți ar putea face parte din criteriile de diagnostic privind starea acută de degradare a neuronilor motori și capitalul viabil de neuroni afectați.

### **Impactul tratamentului cu nusinersen asupra nivelului neurofilamentelor, al creatininei și al funcției motorii în recuperarea amiotrofiei spinale la populația pediatrică: o analiză a acestor biomarkeri (Studiul 3)**

Obiectivele principale ale acestui studiu au fost acelea de a analiza evoluția biomarkerilor funcționali (scorurile pe scalele funcționale motorii) și paraclinici (nivelul pNF-H din LCR și ser și al creatininei serice) în timpul tratamentului cu nusinersen, pentru populația pediatrică diagnosticată cu diferite tipuri de AMS și compararea rezultatelor respective cu cele de la inițierea tratamentului și de la începutul perioadei de încărcare.

Acest studiu retrospectiv a fost realizat pe un lot de 69 de pacienți tratați pentru AMS în CNCRNC Dr. Nicolae Robănescu în perioada noiembrie 2020 – noiembrie 2023 prin Programul Național pentru Boli Rare – Tratamentul cu Nusinersen.

În studiu au fost incluși toți pacienții pentru care au fost conservate în condițiile de stabilitate indicate de producătorul kiturilor de reactivi probe pereche de ser și LCR, colectate înainte de administrarea intratecală a medicamentului, în diferite etape ale tratamentului (înainte de inițiere - prima doză, înainte de începerea tratamentului de întreținere - a cincea doză, unul, doi sau trei ani de la inițierea terapiei - dozele 7, 10 și respectiv 13 de medicament).

Din punct de vedere clinic, scorurile pe scalele de evaluare motorie s-au îmbunătățit. Din punct de vedere paraclinic, s-au observat modificări favorabile ale nivelurilor parametrilor investigați, cum ar fi creatinina serică (indicativ de atrofie musculară) și nivelurile pNF-H în LCR și ser (reflectând afectarea neuronilor motori).

Cele mai ridicate niveluri de pNF-H în LCR au fost observate înainte de inițierea tratamentului cu nusinersen în toate momentele analizate. Această tendință a fost consecventă în diferitele tipuri de AMS și pentru pacienții cu număr variat de copii ale genei SMN2 [104,110–114].

În mod remarcabil, pacienții cu AMS tip 1 și cei cu 2 copii ale genei SMN2 au prezentat cele mai ridicate niveluri de pNF-H, în concordanță cu constatările din literatura de specialitate privind factorii de severitate ai bolii [104,111].

Cea mai semnificativă scădere a nivelurilor de pNF-H din LCR a avut loc între inițierea tratamentului și începutul terapiei de întreținere, indiferent de tipul AMS sau numărul de copii ale genei SMN2. În timpul perioadei de întreținere, nivelurile de pNF-H din LCR au rămas în general mai scăzute decât cele de la început, cu excepția a doi

pacienți cu AMS de tip 1 și 2 copii ale genei SMN2, ale căror valori au crescut mult înainte de a 7-a și a 10-a doză de medicament, dar ale căror tendințe ulterioare s-au aliniat cu acelea ale grupurilor de pacienți din care aparțineau.

Nivelul seric al pNF-H a avut, de asemenea, cele mai mari valori la inițierea tratamentului pentru pacienții cu 2 copii ale genei SMN2 comparativ cu cei cu 3 sau 4 copii. Totuși, grupul de pacienți cu AMS tip 2 a înregistrat cele mai mari valori ale acestui parametru, în timp ce cei cu AMS tip 1 și 3 au avut valori similare.

Nivelul creatininei serice, care indică atrofia musculară, a scăzut în primele 6 luni de tratament cu nusinersen, dar a crescut în timpul tratamentului de întreținere, în special la pacienții cu AMS tip 2 și 3. Pacienții diagnosticați cu AMS tip 1 au prezentat fluctuații relativ minore, deși nivelul a continuat să crească după trei ani de tratament, aliniindu-se cu aspectele obținute pe studiile despre atrofia musculară din cercetările anterioare [48,115,116]. În plus, pacienții au prezentat creșteri ale nivelului creatininei serice după 3 ani de tratament cu nusinersen în comparație cu valoarea inițială, corelată în special cu pierderea musculară scăzută și metabolismul muscular crescut, asemănător constatărilor din literatura de specialitate [47,117].

Monitorizarea nivelului neurofilamentelor pNF-H oferă informații despre evoluția degenerării neuronului motor, iar creatinina serică, împreună cu evaluarea pe scalele motorii specifice reflectă gradul de activitate musculară.

Scăderea nivelului de neurofilamente în ser și LCR demonstrează încetinirea sau chiar oprirea degradării neuronale anormale. Creșterea creatininei serice se datorează intensificării activității musculare involuntare (de exemplu, respirație sau înghițire) și voluntare (evaluată prin scorurile obținute pe scalele motorii funcționale) ca urmare a îmbunătățirii funcționalității neuronale.

Evoluția nefavorabilă a acestor parametri (creșterea nivelului pNF-H și scăderea nivelului creatininei sau a scorurilor funcționale) se traduce printr-o lipsă de răspuns la strategia de tratament aleasă. O evoluție favorabilă a nivelului neurofilamentelor, dar o stagnare sau o scădere a nivelului creatininei și a scorurilor obținute la evaluările funcționale pot sugera un tratament medicamentos eficient, dar o lipsă de compliantă a pacientului la terapia adjuvantă sau necesitatea unei intensificări a acesteia prin creșterea numărului de ședințe de kinetoterapie, a duratei ședințelor sau a complexității exercițiilor efectuate.

**Importanța nivelului neurofilamentelor pNF-H în lichidul cefalorahidian ca factor predictiv și pentru monitorizarea răspunsului la tratamentul cu nusinersen pentru amiotrofia spinală în populația pediatrică în diferite perioade de timp corelat cu alți biomarkeri clinico-biologici (Studiul 4)**

În acest studiu retrospectiv sunt abordate obiectivele cercetării doctorale pentru tot lotul de pacienți pediatrici diagnosticați cu AMS 5q tratați prin Programul Național pentru Boli Rare – Tratamentul cu Nusinersen pentru Atrofia Musculară Spinală, în perioada octombrie 2018 – noiembrie 2023, în CNCRNC Dr. Nicolae Robănescu din București.

Studiul a analizat comparativ modificările nivelului neurofilamentelor pNF-H din LCR și ser, ale creatininei serice și ale scorurilor pe scalele de evaluare funcțională motorie în anumite perioade de timp, pe tipuri de AMS, pentru numărul diferit de copii ale genei SMN2 și cu tratament inițiat la vârste variate pe o perioadă de maxim trei ani de tratament.

Astfel, s-au urmărit importanța determinării nivelului pNF-H din LCR în monitorizarea răspunsului pacienților la tratament și utilizarea acestui biomarker ca factor predictiv al evoluției pacienților pe scalele funcționale motorii.

Lotul studiului final a fost format din 76 de pacienți și au fost efectuate analize din toate probele disponibile de LCR și ser pentru determinarea prin metoda ELISA a nivelului neurofilamentelor pNF-H, s-a urmărit evoluția neurofilamentelor, a creatininei serice și a scorurilor obținute pe scalele motorii în anumite momente de timp și pentru diferite perioade, atât individual cât și pe loturi de pacienți, în funcție vârstă, tipul de AMS și de numărul de copii ale genei SMN2.

Momentele de timp analizate au fost: T0 – înainte de inițierea tratamentului (prima doză I1), T1 – înainte de începerea perioadei de întreținere (a cincea doză I5, la 6 luni de la inițierea tratamentului), T2 – a șasea doză de tratament I6, la 8 luni de la inițiere, respectiv T3, T4 și T5 – la unul, doi sau trei ani de la inițierea terapiei – dozele 7 (I7), 10 (I10) și respectiv 13 (I13) de medicament.

În urma analizei rezultatelor obținute ca urmare a administrării tratamentului cu nusinersen timp de trei ani, majoritatea pacienților au avut o evoluție favorabilă. Scorurile obținute pe scalele de evaluare motorie s-au îmbunătățit ca urmare a creșterii mobilității și forței musculare, nivelul creatininei serice a crescut, datorită activității musculare mai intense, iar nivelurile neurofilamentelor pNF-H din LCR și din ser au scăzut ca urmare a scăderii degradării neuronilor motori datorată creșterii cantității de proteină SMN

necesară supraviețuirii acestor neuroni, similar cu rezultatele altor studii din literatura de specialitate [109,110,118].

Cea mai importantă scădere a nivelului pNF-H din LCR s-a observat în perioada de încărcare cu nusinersen, în primele 6 luni de la inițierea tratamentului, iar în perioada de întreținere nivelul pNF-H din LCR s-a situat pentru majoritatea pacienților la valori sub un nivel bazal datorat probabil metabolismului neuronal normal [104,111].

Nivelul pNF-H din ser a urmat același curs de scădere treptată a valorilor pe parcursul tratamentului și s-a stabilizat sub o valoare minimă pentru majoritatea pacienților, într-un ritm mai lent față de nivelul din LCR.

Nivelul creatininei serice a crescut odată cu creșterea activității musculare și a fost însoțit de îmbunătățirea scorurilor pe scalele de evaluare motorie [47,115,117].

Nivelul neurofilamentelor pNF-H din LCR la inițierea tratamentului a avut valori cu atât mai mari cu cât numărul de copii ale genei SMN2 și tipul de AMS erau mai mici, deci în formele cele mai grave de boală și cât mai aproape de apariția simptomelor, când numărul neuronilor motori viabili era mai mare, ca și necesarul de proteină SMN pentru supraviețuirea lor [104,111,113,114].

Determinarea unui nivel pNF-H în LCR la inițiere mai mare a dus la observarea unor niveluri ale pNF-H în ser mai mari și a evoluat cu o scădere mai accentuată pe parcursul tratamentului [119,120].

Corelații pentru aprecierea evoluției pacienților sub tratamentul cu nusinersen s-au observat atât între valorile absolute ale nivelului pNF-H din LCR și ceilalți parametri studiați (vârsta, tipul de AMS, numărul de copii ale genei SMN2, scorurile obținute pe scalele motorii, nivelurile creatininei serice și al neurofilamentelor pNF-H din ser), cât mai ales între variațiile valorilor obținute în diferite perioade de tratament față de valorile de la începutul tratamentului sau de la începutul perioadei de întreținere, în valori absolute sau în valori relative la valoarea inițială [120–123].

Creșterea cu ajutorul tratamentului a nivelului proteinei SMN a dus la scăderea degradării neuronilor și îmbunătățirea performanțelor motorii cu atât mai mult cu cât inițial afectarea era mai severă, reflectată printr-un nivel mai ridicat al pNF-H în LCR și ser.

În cea mai severă formă de boală – AMS tip 1, obținerea unui nivel ridicat al pNF-H în LCR la inițierea tratamentului ar putea fi considerat un factor predictiv negativ pentru randamentele pe scalele motorii de-a lungul tratamentului, iar obținerea unor valori

ridicate ale nivelului neurofilamentelor pNF-H din LCR de-a lungul tratamentului sugerează obținerea unui randament mai scăzut la doi ani de tratament. În cazul AMS tip 2 și 3, nivelul inițial mai mare de pNF-H în LCR s-a asociat cu obținerea unor randamente mai bune în timp și cu niveluri mai mari ale creatininei serice.

Cu cât neurofilamentele pNF-H din LCR au scăzut mai puțin de-a lungul tratamentului, cu atât s-au obținut randamente mai bune la doi și trei ani de tratament, o variație mică în timp a nivelului pNF-H din LCR sugerând o evoluție motorie mai bună în doi și trei ani de tratament. O variație mai mare a nivelului pNF-H din LCR atât în perioada de încărcare cât și în cea de întreținere s-a asociat cu obținerea în timp a unor randamente mai mari pentru formele cu debut tardiv al simptomelor și cu creșteri mai importante ale nivelului creatininei serice (tipul 2 și 3 de AMS).

Pacienții care au recuperat foarte mult din activitatea musculară în perioada de încărcare, au avut o creștere mai modestă a activității motorii în perioada de întreținere.

Indiferent de numărul de copii ale genei SMN2, vârsta mai mică la inițierea tratamentului s-a asociat cu forme mai severe de boală, cu valori mai mari ale pNF-H în LCR și cu variații mai mari ale neurofilamentelor pe parcursul tratamentului, cu creșteri mai mari ale randamentului și ale nivelului creatininei în timp, variația nivelului pNF-H în perioada de încărcare fiind direct corelată cu variația randamentului la momentele analizate, în timp ce o variație mai mică a pNF-H din LCR în perioada de întreținere a dus la obținerea unor randamente mai mari pe scalele motorii.

Observarea unor variații mai mari ale nivelului pNF-H din ser la 6 luni, un an și doi ani de tratament s-a asociat cu un nivel al creatininei serice la doi ani de tratament mai mare, sugerând că și variația nivelului pNF-H din ser în timpul tratamentului de întreținere cu nusinersen față de valoarea inițială ar putea fi un factor predictiv pentru intensitatea activității musculare la doi ani de tratament.

### **Limitări**

Rezultatele studiilor sunt limitate de posibilitatea existenței unor factori suplimentari, independenți de boala de bază, care ar putea interfera atât cu nivelul pNF-H, cât și cu performanțele pe scalele funcționale motorii, cu un rol deosebit atribuit gradului de degradare neuromusculară la momentul inițierii tratamentului și capacității individuale de a suplimenta tratamentul medicamentos cu tratamente adjuvante (kinetoterapie). Diferențele de vârstă în cadrul aceleiași tip de AMS au fost semnificative,

vârsta de inițiere a tratamentului depinzând de disponibilitatea medicamentului recent aprobat și nu de vârsta apariției simptomelor sau de rapiditatea diagnosticului.

Metodele folosite pentru a evalua răspunsul pacienților la tratamentul cu nusinersen pentru atrofia musculară spinală sunt limitate de aspectele inerente ale fiecărui biomarker analizat. Mai mult, studiul întâmpină obstacolele analizării evoluției unei boli rare din cauza dimensiunii reduse a cohorței de pacienți și a lotului de control.

Evaluarea performanțelor motorii se bazează pe cooperarea pacientului, care poate fi o provocare, în special în populațiile pediatrice cu dispoziții și stări de sănătate fluctuante. În plus, completarea tratamentului cu terapii adjuvante precum kinetoterapia introduce o complexitate suplimentară. Terapia fizică este esențială în îmbunătățirea diferitelor aspecte ale funcției motorii, inclusiv postura, tonusul și forța musculară precum și mobilitatea pacienților [44]. Aceste aspecte se traduc într-o calitate îmbunătățită a vieții pentru pacienți și familiile acestora, subliniind importanța unei abordări holistice a managementului AMS.

Parametrii paraclinici, deși sunt mai puțin influențați de factori externi sau de cooperarea pacientului, nu sunt specifici tipului de boală și sunt influențați de metabolismul individual.

### **Concluzii finale și contribuții personale**

În studiile doctorale realizate în cei patru ani am reușit să includ un număr de 76 pacienți cu amiotrofie spinală tratați cu nusinersen, număr important în condițiile în care această afecțiune face parte din categoria de boli rare, iar tratamentul cu nusinersen a fost aprobat din 2016 la nivel mondial și din 2018 în România.

Cercetarea din perioada doctorală a adus o contribuție majoră în înțelegerea gradului de lezare a neuronilor motori din lipsa proteinei SMN în funcție de fenotipul pacientului, precum și asupra importanței administrării de nusinersen pentru încetinirea sau chiar stoparea degradării neuronale prin determinarea valorilor nivelului pNF-H în LCR în funcție de vârsta pacientului, tipul de AMS și numărul de copii ale genei SMN2 înainte de inițierea terapiei și în primii trei ani de tratament.

Determinarea unui maxim al nivelului pNF-H în perioada de întreținere, nivel datorat probabil metabolismului normal neuronal, conferă posibilitatea utilizării acestui parametru pentru stabilirea stadiului de activitate al bolii și al dimensiunii capitalului neuronal existent, informații deosebit de utile care conferă nivelului pNF-H din LCR

valoare de **indicator al urgenței inițierii tratamentului specific** și de **biomarker pentru monitorizarea răspunsului la tratament**.

Stabilirea corelațiilor dintre nivelul neurofilamentelor pNF-H din LCR, valoarea scorurilor obținute pe scalele de evaluare motorie, nivelul neurofilamentelor pNF-H din ser și al creatininei serice sugerează valoarea pNF-H ca **biomarker al progresiei bolii**.

Unul dintre cele mai importante aspecte rezultate din analiza datelor a fost posibilitatea utilizării gradului de variație al nivelului pNF-H din diferite perioade de tratament (perioada de încărcare, primul an de tratament etc.) ca **factor predictiv pentru evoluția motorie** pentru doi sau trei ani de tratament din punct de vedere al statusului funcțional – reflectat în gradul de creștere a randamentului obținut pe scalele motorii și al nivelului creatininei serice pentru evaluarea intensității activității motorii.

Corelarea evoluției parametrilor funcționali (scorurile pe scalele motorii și nivelul creatininei serice) cu nivelurile pNF-H din LCR și ser pentru evaluarea eficienței schemei de tratament medicamentos combinat cu terapia adjuvantă de susținere a funcțiilor respiratori și digestive și programele de kinetoterapie, fizioterapie sau ergoterapie reprezintă o contribuție personală deosebită în **personalizarea tratamentului pacientului** pentru obținerea celor mai bune rezultate în timp.

Studiile efectuate contribuie semnificativ la înțelegerea spectrului bolii și a răspunsului la tratament, oferind noi perspective în abordarea pacientului pediatric cu AMS și subliniind importanța introducerii determinării nivelului pNF-H ca analiză de rutină pentru evaluarea acestor pacienți.

Analiza comparativă a nivelurilor pNF-H din LCR și ser și a variațiilor din diferite perioade corelate cu randamentele obținute și cu nivelul creatininei serice creează oportunitatea **aprecierii comparative a răspunsului cu alte tipuri de tratament** medicamentos și cu combinații de tratamente modificatoare de boală.

Rezultatele obținute trebuie validate pentru grupuri mai mari de pacienți și verificate pentru perioade mai lungi de timp, deschizând astfel porțile unei noi epoci pentru tratamentul personalizat în AMS.

Evaluarea reală a pacienților cu AMS presupune corelarea tuturor datelor clinice și monitorizarea oricăror biomarkeri disponibili pentru o apreciere corectă a progreselor înregistrate și pentru personalizarea în dinamică a terapiei în funcție de necesitățile și posibilitățile fiecărui pacient.



## Bibliografie

1. Mercuri, E., Sumner, C. J., Muntoni, F., Darras, B. T., & Finkel RS. Spinal muscular atrophy [Internet]. [cited 2021 May 17]. Available from: <https://ghr.nlm.nih.gov/condition/spinal-muscular-atrophy#statistics>
2. Li W. How do SMA-linked mutations of SMN1 lead to structural/functional deficiency of the SMA protein? *PLoS One*. 2017;12(6):1–13.
3. Prior TW, Snyder PJ, Rink BD, Pearl DK, Pyatt RE, Mihal DC, et al. Newborn and carrier screening for spinal muscular atrophy. *Am J Med Genet Part A* [Internet]. 2010;152A(7):1608–16. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ajmg.a.33474>
4. Weimer LH. Neuromuscular disorders in pregnancy [Internet]. 1st ed. Vol. 172, *Handbook of Clinical Neurology*. Elsevier B.V.; 2020. 201–218 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-64240-0.00012-X>
5. Verhaart IEC, Robertson A, Wilson IJ, Aartsma-Rus A, Cameron S, Jones CC, et al. Prevalence, incidence and carrier frequency of 5q-linked spinal muscular atrophy – a literature review. *Orphanet J Rare Dis* [Internet]. 2017;12(1):124. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13023-017-0671-8>
6. Lorson CL, Hahnen E, Androphy EJ, Wirth B. A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1999 May 25;96(11):6307–11. Available from: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.96.11.6307>
7. Sivaramakrishnan M, McCarthy KD, Campagne S, Huber S, Meier S, Augustin A, et al. Binding to SMN2 pre-mRNA-protein complex elicits specificity for small molecule splicing modifiers. *Nat Commun* [Internet]. 2017 Nov 14;8(1):1476. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41467-017-01559-4>
8. Hua Y, Vickers TA, Baker BF, Bennett CF, Krainer AR. Enhancement of SMN2 exon 7 inclusion by antisense oligonucleotides targeting the exon. *PLoS Biol*. 2007;5(4):e73.
9. Rudnik- Schöneborn S, Berg C, Zerres K, Betzler C, Grimm T, Eggermann T, et al. Genotype–phenotype studies in infantile spinal muscular atrophy (SMA) type I in Germany: implications for clinical trials and genetic counselling. *Clin Genet* [Internet]. 2009 Aug 24;76(2):168–78. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1399-0004.2009.01200.x>

10. Harada Y, Sutomo R, Sadewa AH, Akutsu T, Takeshima Y, Wada H, et al. Correlation between SMN2 copy number and clinical phenotype of spinal muscular atrophy: three SMN2 copies fail to rescue some patients from the disease severity. *J Neurol* [Internet]. 2002 Sep 1;249(9):1211–9. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00415-002-0811-4>
11. Gidaro T, Servais L. Nusinersen treatment of spinal muscular atrophy: current knowledge and existing gaps. *Dev Med Child Neurol* [Internet]. 2019 Jan 17;61(1):19–24. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/dmcn.14027>
12. Axente M, Mirea A, Sporea C, Pădure L, Drăgoi CM, Nicolae AC, et al. Clinical and Electrophysiological Changes in Pediatric Spinal Muscular Atrophy after 2 Years of Nusinersen Treatment. *Pharmaceutics* [Internet]. 2022 Sep 29;14(10):2074. Available from: <https://www.mdpi.com/1999-4923/14/10/2074>
13. Farrar MA, Kiernan MC. The Genetics of Spinal Muscular Atrophy: Progress and Challenges. *Neurotherapeutics*. 2015;12(2):290–302.
14. Tiziano FD, Tizzano EF. 25 years of the SMN genes: the Copernican revolution of spinal muscular atrophy. *Acta Myol myopathies cardiomyopathies Off J Mediterr Soc Myol*. 2020 Dec;39(4):336–44.
15. Pierzchlewicz K, Kępa I, Podogrodzki J, Kotulska K. Spinal Muscular Atrophy: The Use of Functional Motor Scales in the Era of Disease-Modifying Treatment. *Child Neurol Open* [Internet]. 2021 Jan 1;8:2329048X211008725. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/2329048X211008725>
16. Arnold WD, Kassar D, Kissel JT. Spinal muscular atrophy: Diagnosis and management in a new therapeutic era. *Muscle Nerve* [Internet]. 2015 Feb 1;51(2):157–67. Available from: <https://doi.org/10.1002/mus.24497>
17. Dubowitz V. Chaos in the classification of SMA: A possible resolution. *Neuromuscul Disord* [Internet]. 1995;5(1):3–5. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/096089669400075K>
18. Finkel R, Bertini E, Muntoni F, Mercuri E. 209th ENMC International Workshop: Outcome Measures and Clinical Trial Readiness in Spinal Muscular Atrophy 7–9 November 2014, Heemskerk, The Netherlands. *Neuromuscul Disord* [Internet]. 2015 Jul;25(7):593–602. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nmd.2015.04.009>

19. Verhaart IEC, Robertson A, Wilson IJ, Aartsma-Rus A, Cameron S, Jones CC, et al. Prevalence, incidence and carrier frequency of 5q-linked spinal muscular atrophy – a literature review. *Orphanet J Rare Dis* [Internet]. 2017 Dec 4;12(1):124. Available from: <http://ojrd.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13023-017-0671-8>
20. Lally C, Jones C, Farwell W, Reyna SP, Cook SF, Flanders WD. Indirect estimation of the prevalence of spinal muscular atrophy Type I, II, and III in the United States. *Orphanet J Rare Dis* [Internet]. 2017 Dec 28;12(1):1–6. Available from: <https://ojrd.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13023-017-0724-z>
21. Scarciolla O, Stuppia L, De Angelis MV, Murru S, Palka C, Giuliani R, et al. Spinal muscular atrophy genotyping by gene dosage using multiple ligation-dependent probe amplification. *Neurogenetics* [Internet]. 2006 Nov 22;7(4):269–76. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10048-006-0051-3>
22. Peredo DE, Hannibal MC. The floppy infant: evaluation of hypotonia. *Pediatr Rev.* 2009 Sep;30(9):e66-76.
23. Nance JR. Spinal Muscular Atrophy. *Continuum (Minneapolis)*. 2020;26(5):1348–68.
24. Kaufmann P, McDermott MP, Darras BT, Finkel R, Kang P, Oskoui M, et al. Observational study of spinal muscular atrophy type 2 and 3: Functional outcomes over 1 year. *Arch Neurol.* 2011;68(6):779–86.
25. Farrar MA, Kiernan MC. The Genetics of Spinal Muscular Atrophy: Progress and Challenges. *Neurotherapeutics* [Internet]. 2015;12(2):290–302. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878747923008255>
26. Willis TA. Therapeutic advances in spinal muscular atrophy. *Paediatr Child Heal (United Kingdom)* [Internet]. 2023;33(1):23–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.paed.2022.12.010>
27. Mercuri E, Sumner C. J., Muntoni F., Darras B. T., & Finkel RS, Mercuri E, Sumner CJ, Muntoni F, Darras BT, Finkel RS. Spinal muscular atrophy. *Nat Rev Dis Prim* [Internet]. 2022 Aug 4 [cited 2021 May 17];8(1):52. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41572-022-00380-8>
28. Monnette A, Chen E, Hong D, Bazzano A, Dixon S, Arnold WD, et al. Treatment preference among patients with spinal muscular atrophy (SMA): a discrete choice experiment. *Orphanet J Rare Dis* [Internet]. 2021 Dec 20;16(1):36. Available from:

<https://ojrd.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13023-020-01667-3>

29. Mirea A, Shelby ES, Axente M, Badina M, Padure L, Leanca M, et al. Combination Therapy with Nusinersen and Onasemnogene Abeparvovec-xioi in Spinal Muscular Atrophy Type I. *J Clin Med* [Internet]. 2021 Nov 26;10(23):5540. Available from: <https://www.mdpi.com/2077-0383/10/23/5540>
30. Erdos J, Wild C. Mid- and long-term (at least 12 months) follow-up of patients with spinal muscular atrophy (SMA) treated with nusinersen, onasemnogene abeparvovec, risdiplam or combination therapies: A systematic review of real-world study data. *Eur J Paediatr Neurol* [Internet]. 2022;39:1–10. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090379822000629>
31. Darras BT, Masson R, Mazurkiewicz-Beldzińska M, Rose K, Xiong H, Zanoteli E, et al. FIREFISH Part 2: 24-month Efficacy and Safety of Risdiplam in Infants with Type 1 Spinal Muscular Atrophy (SMA) (4126). *Neurology*. 2021;96(15\_supplement):1–3.
32. Finkel RS, Mercuri E, Darras BT, Connolly AM, Kuntz NL, Kirschner J, et al. Nusinersen versus Sham Control in Infantile-Onset Spinal Muscular Atrophy. *N Engl J Med*. 2017;377(18):1723–32.
33. Mendell JR, Al-Zaidy SA, Lehman KJ, McColly M, Lowes LP, Alfano LN, et al. Five-Year Extension Results of the Phase 1 START Trial of Onasemnogene Abeparvovec in Spinal Muscular Atrophy. *JAMA Neurol*. 2021;78(7):834–41.
34. Mercuri E, Pera MC, Scoto M, Finkel R, Muntoni F. Spinal muscular atrophy — insights and challenges in the treatment era. *Nat Rev Neurol* [Internet]. 2020;16(12):706–15. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41582-020-00413-4>
35. Bitetti I, Manna MR, Stella R, Varone A. Sequential treatment with nusinersen, Zolgensma(®) and risdiplam in a paediatric patient with spinal muscular atrophytype 1: a case report. Vol. 42, *Acta myologica : myopathies and cardiomyopathies : official journal of the Mediterranean Society of Myology*. Italy; 2023. p. 82–5.
36. Hahn A, Günther R, Ludolph A, Schwartz O, Trollmann R, Weydt P, et al. Short-term safety results from compassionate use of risdiplam in patients with spinal muscular atrophy in Germany. *Orphanet J Rare Dis* [Internet]. 2022;17(1):1–10. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13023-022-02420-8>

37. Kong L, Valdivia DO, Simon CM, Hassinan CW, Delestrée N, Ramos DM, et al. Impaired prenatal motor axon development necessitates early therapeutic intervention in severe SMA. *Sci Transl Med* [Internet]. 2021 Jan 27;13(578):eabb6871. Available from: <http://stm.sciencemag.org/content/13/578/eabb6871.abstract>
38. Aragon-Gawinska K, Mouraux C, Dangouloff T, Servais L. Spinal Muscular Atrophy Treatment in Patients Identified by Newborn Screening—A Systematic Review. *Genes* (Basel) [Internet]. 2023;14(7). Available from: <https://www.mdpi.com/2073-4425/14/7/1377>
39. Baptiste C, De Vivo DC. Spinal Muscular Atrophy: A Potential Target for In Utero Therapy. *Clin Obstet Gynecol* [Internet]. 2021;64(4). Available from: [https://journals.lww.com/clinicalobgyn/fulltext/2021/12000/spinal\\_muscular\\_atrophy\\_\\_a\\_potential\\_target\\_for\\_in.20.aspx](https://journals.lww.com/clinicalobgyn/fulltext/2021/12000/spinal_muscular_atrophy__a_potential_target_for_in.20.aspx)
40. Oskoui M, Dangouloff T, Servais L. Universal Newborn Screening for Spinal Muscular Atrophy. *JAMA Pediatr* [Internet]. 2024;178(6):520–1. Available from: <https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2024.0489>
41. Nakevska Z, Yokota T. Challenges and future perspective of antisense therapy for spinal muscular atrophy: A review. *Eur J Cell Biol* [Internet]. 2023;102(2):151326. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0171933523000419>
42. Yi YG, Shin HI, Jang DH. Rehabilitation of spinal muscular atrophy: current consensus and future direction. *J Genet Med*. 2020;17(2):55–61.
43. Trenkle J, Brugman J, Peterson A, Roback K, Krossschell KJ. Filling the gaps in knowledge translation: Physical therapy recommendations for individuals with spinal muscular atrophy compared to standard of care guidelines. *Neuromuscul Disord* [Internet]. 2021;31(5):397–408. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960896621000407>
44. Mirea A, Leanca MC, Onose G, Sporea C, Padure L, Shelby ES, et al. Physical Therapy and Nusinersen Impact on Spinal Muscular Atrophy Rehabilitative Outcome. *Front Biosci* [Internet]. 2022 Jun 6;27(6):179. Available from: <https://www.imrpress.com/journal/FBL/27/6/10.31083/j.fbl2706179>
45. Iftikhar M, Frey J, Shohan MJ, Malek S, Mousa SA. Current and emerging therapies for Duchenne muscular dystrophy and spinal muscular atrophy.

- Pharmacol Ther [Internet]. 2021;220:107719. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0163725820302503>
46. Smeriglio P, Langard P, Querin G, Biferi MG. The identification of novel biomarkers is required to improve adult SMA patient stratification, diagnosis and treatment. *J Pers Med*. 2020;10(3):1–23.
  47. Freigang M, Wurster CD, Hagenacker T, Stolte B, Weiler M, Kamm C, et al. Serum creatine kinase and creatinine in adult spinal muscular atrophy under nusinersen treatment. *Ann Clin Transl Neurol* [Internet]. 2021 May 31;8(5):1049–63. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/acn3.51340>
  48. Alves CRRR, Zhang R, Johnstone AJ, Garner R, Nwe PH, Siranosian JJ, et al. Serum creatinine is a biomarker of progressive denervation in spinal muscular atrophy. *Neurology* [Internet]. 2020 Mar 3;94(9):e921–31. Available from: <https://www.neurology.org/doi/10.1212/WNL.00000000000008762>
  49. Rudnik-Schöneborn S, Lützenrath S, Borkowska J, Karwanska A, Hausmanowa-Petrusewicz I, Zerres K. Analysis of Creatine Kinase Activity in 504 Patients with Proximal Spinal Muscular Atrophy Types I–III from the Point of View of Progression and Severity. *Eur Neurol* [Internet]. 1998;39(3):154–62. Available from: <https://doi.org/10.1159/000007926>
  50. Deutsch L, Osredkar D, Plavec J, Stres B. Spinal Muscular Atrophy after Nusinersen Therapy: Improved Physiology in Pediatric Patients with No Significant Change in Urine, Serum, and Liquor <sup>1</sup>H-NMR Metabolomes in Comparison to an Age-Matched, Healthy Cohort. *Metabolites* [Internet]. 2021;11(4). Available from: <https://www.mdpi.com/2218-1989/11/4/206>
  51. Arnold WD, Porensky PN, McGovern VL, Iyer CC, Duque S, Li X, et al. Electrophysiological Biomarkers in Spinal Muscular Atrophy: Preclinical Proof of Concept. *Ann Clin Transl Neurol*. 2014 Jan;1(1):34–44.
  52. Swoboda KJ, Prior TW, Scott CB, McNaught TP, Wride MC, Reyna SP, et al. Natural history of denervation in SMA: Relation to age, SMN2 copy number, and function. *Ann Neurol* [Internet]. 2005;57(5):704–12. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ana.20473>
  53. Kolb SJ, Coffey CS, Yankey JW, Krosschell K, Arnold WD, Rutkove SB, et al. Natural history of infantile-onset spinal muscular atrophy. *Ann Neurol* [Internet]. 2017;82(6):883–91. Available from:

- <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ana.25101>
54. Kolb SJ, Coffey CS, Yankey JW, Krosschell K, Arnold WD, Rutkove SB, et al. Baseline results of the NeuroNEXT spinal muscular atrophy infant biomarker study. *Ann Clin Transl Neurol* [Internet]. 2016;3(2):132–45. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/acn3.283>
  55. Kariyawasam DST, D’Silva A, Lin C, Ryan MM, Farrar MA. Biomarkers and the Development of a Personalized Medicine Approach in Spinal Muscular Atrophy. *Front Neurol*. 2019;10:898.
  56. Pino MG, Rich KA, Kolb SJ. Update on Biomarkers in Spinal Muscular Atrophy. *Biomark Insights* [Internet]. 2021;16:11772719211035644. Available from: <https://doi.org/10.1177/11772719211035643>
  57. Taleb A, Rambaud P, Diop S, Fauches R, Tomasik J, Jouen F, et al. Spinal Muscular Atrophy Hypotonia Detection Using Computer Vision and Artificial Intelligence. *JAMA Pediatr* [Internet]. 2024;178(5):500–2. Available from: <https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2024.0030>
  58. Neil EE, Bisaccia EK. Nusinersen: A Novel Antisense Oligonucleotide for the Treatment of Spinal Muscular Atrophy. *J Pediatr Pharmacol Ther* [Internet]. 2019;24(3):194–203. Available from: <https://doi.org/10.5863/1551-6776-24.3.194>
  59. Farrar MA, Park SB, Vucic S, Carey KA, Turner BJ, Gillingwater TH, et al. Emerging therapies and challenges in spinal muscular atrophy. *Ann Neurol* [Internet]. 2017;81(3):355–68. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ana.24864>
  60. Bersanini C, Khirani S, Ramirez A, Lofaso F, Aubertin G, Beydon N, et al. Nocturnal hypoxaemia and hypercapnia in children with neuromuscular disorders. *Eur Respir J*. 2012 May;39(5):1206–12.
  61. Khirani S, Colella M, Caldarelli V, Aubertin G, Boulé M, Forin V, et al. Longitudinal course of lung function and respiratory muscle strength in spinal muscular atrophy type 2 and 3. *Eur J Paediatr Neurol* [Internet]. 2013;17(6):552–60. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090379813000615>
  62. Dunaway S, Montes J, McDermott MP, Martens W, Neisen A, Glanzman AM, et al. Physical therapy services received by individuals with spinal muscular atrophy (SMA). *J Pediatr Rehabil Med*. 2016;9:35–44.

63. Chatwin M, Bush A, Simonds AK. Outcome of goal-directed non-invasive ventilation and mechanical insufflation/exsufflation in spinal muscular atrophy type I. *Arch Dis Child* [Internet]. 2011;96(5):426–32. Available from: <https://adc.bmj.com/content/96/5/426>
64. Fujak A, Raab W, Schuh A, Richter S, Forst R, Forst J. Natural course of scoliosis in proximal spinal muscular atrophy type II and IIIa: descriptive clinical study with retrospective data collection of 126 patients. *BMC Musculoskelet Disord* [Internet]. 2013;14(1):283. Available from: <https://doi.org/10.1186/1471-2474-14-283>
65. Chua K, Tan CY, Chen Z, Wong HK, Lee EH, Tay SKH, et al. Long-term Follow-up of Pulmonary Function and Scoliosis in Patients With Duchenne’s Muscular Dystrophy and Spinal Muscular Atrophy. *J Pediatr Orthop* [Internet]. 2016;36(1). Available from: [https://journals.lww.com/pedorthopaedics/fulltext/2016/01000/long\\_term\\_follow\\_up\\_of\\_pulmonary\\_function\\_and.13.aspx](https://journals.lww.com/pedorthopaedics/fulltext/2016/01000/long_term_follow_up_of_pulmonary_function_and.13.aspx)
66. Vuillerot C, Payan C, Girardot F, Fermanian J, Iwaz J, Bérard C, et al. Responsiveness of the Motor Function Measure in Neuromuscular Diseases. *Arch Phys Med Rehabil* [Internet]. 2012;93(12):2251-2256.e1. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003999312004042>
67. Bérard C, Payan C, Hodgkinson I, Fermanian J, The MFM Collaborative Study Group. A motor function measure scale for neuromuscular diseases. Construction and validation study. *Neuromuscul Disord* [Internet]. 2005;15(7):463–70. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960896605001112>
68. Ribault S, Rippert P, Jain M, Le Goff L, Genod DV, Barriere A, et al. Psychometric Characteristics of the Motor Function Measure in Neuromuscular Diseases: A Systematic Review1. *J Neuromuscul Dis* [Internet]. 2023 May 2;10(3):301—314. Available from: <https://europepmc.org/articles/PMC10408216>
69. Ramsey D, Scoto M, Mayhew A, Main M, Mazzone ES, Montes J, et al. Revised Hammersmith Scale for spinal muscular atrophy: A SMA specific clinical outcome assessment tool. Singh RN, editor. *PLoS One* [Internet]. 2017 Feb 21;12(2):1–19. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0172346>
70. Yuan A, Rao M V., Veeranna, Nixon RA. Neurofilaments and neurofilament



- proteins in health and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. 2017 Apr 3;9(4):a018309. Available from: <http://cshperspectives.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a018309>
71. Yuan A, Nixon RA. Neurofilament Proteins as Biomarkers to Monitor Neurological Diseases and the Efficacy of Therapies. *Front Neurosci* [Internet]. 2021 Sep 27;15(September):689938. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2021.689938/full>
  72. Pijnenburg YALL, Janssen JC, Schoonenboom NSMM, Petzold A, Mulder C, Stigbrand T, et al. CSF Neurofilaments in Frontotemporal Dementia Compared with Early Onset Alzheimer's Disease and Controls. *Dement Geriatr Cogn Disord* [Internet]. 2007;23(4):225–30. Available from: <https://www.karger.com/DOI/10.1159/000099473>
  73. Butchbach MERR. Copy number variations in the survival motor neuron genes: Implications for spinal muscular atrophy and other neurodegenerative diseases. *Front Mol Biosci*. 2016;3(MAR):1–10.
  74. Yuan A, Rao M V., Veeranna, Nixon RA. Neurofilaments at a glance. *J Cell Sci* [Internet]. 2012 Jul 15;125(14):3257–63. Available from: <http://jcs.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jcs.104729>
  75. Kušnierová P, Zeman D, Hradílek P, Čábal M, Zapletalová O. Neurofilament levels in patients with neurological diseases: A comparison of neurofilament light and heavy chain levels. *J Clin Lab Anal*. 2019;33(7):1–8.
  76. Petzold A. Neurofilament phosphoforms: Surrogate markers for axonal injury, degeneration and loss. *J Neurol Sci* [Internet]. 2005 Jun;233(1):183–98. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022510X05001048>
  77. Hoffman PN, Lasek RJ. The slow component of axonal transport. Identification of major structural polypeptides of the axon and their generality among mammalian neurons. *J Cell Biol* [Internet]. 1975 Aug 1;66(2):351–66. Available from: <https://rupress.org/jcb/article/66/2/351/77483/The-slow-component-of-axonal-transport>
  78. Yuan A, Sasaki T, Kumar A, Peterhoff CM, Rao M V., Liem RK, et al. Peripherin Is a Subunit of Peripheral Nerve Neurofilaments: Implications for Differential Vulnerability of CNS and Peripheral Nervous System Axons. *J Neurosci* [Internet]. 2012 Jun 20;32(25):8501–8. Available from:

- <https://www.jneurosci.org/lookup/doi/10.1523/JNEUROSCI.1081-12.2012>
79. Yuan A, Rao M V., Sasaki T, Chen Y, Kumar A, Veeranna, et al. Alpha-internexin is structurally and functionally associated with the neurofilament triplet proteins in the mature CNS. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* [Internet]. 2006 Sep 27;26(39):10006–19. Available from: <https://www.jneurosci.org/lookup/doi/10.1523/JNEUROSCI.2580-06.2006>
  80. Wang H, Wu M, Zhan C, Ma E, Yang M, Yang X, et al. Neurofilament proteins in axonal regeneration and neurodegenerative diseases. *Neural Regen Res* [Internet]. 2012 Mar 15 [cited 2023 Dec 9];7(8):620–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25745454>
  81. Laser-Azogui A, Kornreich M, Malka-Gibor E, Beck R. Neurofilament assembly and function during neuronal development. *Curr Opin Cell Biol* [Internet]. 2015;32:92–101. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0955067415000058>
  82. Rosengren LE, Karlsson JOJE, Karlsson JOJE, Persson LI, Wikkelso C. Patients with amyotrophic lateral sclerosis and other neurodegenerative diseases have increased levels of neurofilament protein in CSF. *J Neurochem* [Internet]. 1996 Nov 23;67(5):2013–8. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1471-4159.1996.67052013.x>
  83. Gordon BA. Neurofilaments in disease: what do we know? *Curr Opin Neurobiol* [Internet]. 2020;61:105–15. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959438820300398>
  84. Heckler I, Venkataraman I. Phosphorylated neurofilament heavy chain: a potential diagnostic biomarker in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurophysiol* [Internet]. 2022 Feb 9;127(3):737–45. Available from: <https://journals.physiology.org/doi/10.1152/jn.00398.2021>
  85. das Neves W, Alves CRR, de Souza Borges AP, de Castro G. Serum Creatinine as a Potential Biomarker of Skeletal Muscle Atrophy in Non-small Cell Lung Cancer Patients. *Front Physiol*. 2021;12(April):1–5.
  86. Patel SS, Molnar MZ, Tayek JA, Ix JH, Noori N, Benner D, et al. Serum creatinine as a marker of muscle mass in chronic kidney disease: Results of a cross-sectional study and review of literature. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2013;4(1):19–29.
  87. De Rosa S, Greco M, Rauseo M, Annetta MG. The Good, the Bad, and the Serum

- Creatinine: Exploring the Effect of Muscle Mass and Nutrition. *Blood Purif.* 2023;52(9–10):775–85.
88. Ito D, Hashizume A, Hijikata Y, Yamada S, Iguchi Y, Iida M, et al. Elevated serum creatine kinase in the early stage of sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol* [Internet]. 2019;266(12):2952–61. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00415-019-09507-6>
  89. Blasi L, Sabbatini D, Fortuna A, Querin G, Martinelli I, Vianello S, et al. The value of serum creatinine as biomarker of disease progression in spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA). *Sci Rep* [Internet]. 2023 Oct 12;13(1):17311. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-023-44419-6>
  90. Wang L, Chen M, He R, Sun Y, Yang J, Xiao L, et al. Serum Creatinine Distinguishes Duchenne Muscular Dystrophy from Becker Muscular Dystrophy in Patients Aged  $\leq 3$  Years: A Retrospective Study. *Front Neurol* [Internet]. 2017 May 8;8:196. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fneur.2017.00196/full>
  91. Milella G, Introna A, D'Errico E, Fraddosio A, Scaglione G, Morea A, et al. Cerebrospinal Fluid and Clinical Profiles in Adult Type 2–3 Spinal Muscular Atrophy Patients Treated with Nusinersen: An 18-Month Single-Centre Experience. *Clin Drug Investig* [Internet]. 2021;41(9):775–84. Available from: <https://doi.org/10.1007/s40261-021-01071-0>
  92. Corey DR. Nusinersen, an antisense oligonucleotide drug for spinal muscular atrophy. *Nat Neurosci* [Internet]. 2017;20(4):497–9. Available from: <https://doi.org/10.1038/nn.4508>
  93. Chiriboga CA. Nusinersen for the treatment of spinal muscular atrophy. *Expert Rev Neurother* [Internet]. 2017;17(10):955–62. Available from: <https://doi.org/10.1080/14737175.2017.1364159>
  94. Medicale SIAD, Ciulu-Costinescu F. RAPORT DE EVALUARE A TEHNOLOGIILOR MEDICALE DCI: ELOSULFASE ALFA INDICAȚIA : MUCOPOLIZAHARIDOZA TIP IVA Data depunerii dosarului. 2017;(48). Available from: [https://www.anm.ro/\\_/EVALUARE\\_TEHNOLOGII\\_MEDICALE/CONTESTATII/32563\\_Elosulfase\\_alfa\\_Vimizim.pdf](https://www.anm.ro/_/EVALUARE_TEHNOLOGII_MEDICALE/CONTESTATII/32563_Elosulfase_alfa_Vimizim.pdf)
  95. EMA- CHMP. Anexa I Rezumatul Caracteristicilor Produsului Jcovden. 2022;1–28.

96. Glanzman AM, McDermott MP, Montes J, Martens WB, Flickinger J, Riley S, et al. Validation of the Children's Hospital of Philadelphia Infant Test of Neuromuscular Disorders (CHOP INTEND). *Pediatr Phys Ther* [Internet]. 2011;23(4):322–6. Available from: [https://journals.lww.com/pedpt/Fulltext/2011/23040/Validation\\_of\\_the\\_Children\\_s\\_Hospital\\_of.2.aspx](https://journals.lww.com/pedpt/Fulltext/2011/23040/Validation_of_the_Children_s_Hospital_of.2.aspx)
97. Claborn MK, Stevens DL, Walker CK, Gildon BL. Nusinersen: A Treatment for Spinal Muscular Atrophy. *Ann Pharmacother*. 2019;53(1):61–9.
98. Glanzman AMM, Mazzone E, Main M, Pelliccioni M, Wood J, Swoboda KJJ, et al. The Children's Hospital of Philadelphia Infant Test of Neuromuscular Disorders (CHOP INTEND): test development and reliability. *Neuromuscul Disord* [Internet]. 2010/01/13. 2010 Mar;20(3):155–61. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960896609006981>
99. Glanzman AM, O'Hagen JM, McDermott MP, Martens WB, Flickinger J, Riley S, et al. Validation of the Expanded Hammersmith Functional Motor Scale in Spinal Muscular Atrophy Type II and III. *J Child Neurol* [Internet]. 2011 Sep 21;26(12):1499–507. Available from: <https://doi.org/10.1177/0883073811420294>
100. O'Hagen JM, Glanzman AM, McDermott MP, Ryan PA, Flickinger J, Quigley J, et al. An expanded version of the Hammersmith Functional Motor Scale for SMA II and III patients. *Neuromuscul Disord* [Internet]. 2007;17(9):693–7. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960896607001861>
101. 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* [Internet]. 2019 May 17 [cited 2024 May 9];6(5):932–44. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/acn3.779>
102. Darras BT, Sumner CJ, Muntoni F, Crawford TO, Finkel RS, Mercuri E, et al. Plasma Phosphorylated Neurofilament Heavy Chain Levels Over Time in Participants With Infantile-and Later-onset SMA: Data from the SHINE Study (1692). *AAN Enterprises*; 2020.
103. De Wel B, De Schaepdryver M, Poesen K, Claeys KG. Biochemical and clinical biomarkers in adult SMA 3–4 patients treated with nusinersen for 22 months. *Ann Clin Transl Neurol*. 2022;9(8):1241–51.
104. Badina M, Bejan GC, Sporea C, Padure L, Mirea A, Leanca MC, et al. Changes in

- pNFH Levels in Cerebrospinal Fluid and Motor Evolution after the Loading Dose with Nusinersen in Different Types of Spinal Muscular Atrophy. *Medicina (Kaunas)* [Internet]. 2023 Jul 4;59(7):1244. Available from: <https://www.mdpi.com/1648-9144/59/7/1244>
105. Poesen K, De Schaepdryver M, Stubendorff B, Gille B, Muckova P, Wendler S, et al. Neurofilament markers for ALS correlate with extent of upper and lower motor neuron disease. *Neurology*. 2017 Jun;88(24):2302–9.
  106. Paris A, Bora P, Parolo S, MacCannell D, Monine M, van der Munnik N, et al. A pediatric quantitative systems pharmacology model of neurofilament trafficking in spinal muscular atrophy treated with the antisense oligonucleotide nusinersen. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol*. 2023 Feb;12(2):196–206.
  107. Paris A, Bora P, Parolo S, Monine M, Tong X, Eraly S, et al. An age- dependent mathematical model of neurofilament trafficking in healthy conditions. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol*. 2022 Apr;11(4):447–57.
  108. De Schaepdryver M, Jeromin A, Gille B, Claeys KG, Herbst V, Brix B, et al. Comparison of elevated phosphorylated neurofilament heavy chains in serum and cerebrospinal fluid of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg & Psychiatry* [Internet]. 2018 Apr 1;89(4):367 LP – 373. Available from: <http://jnnp.bmj.com/content/89/4/367.abstract>
  109. Li JJY, Dai Y, Sun XXH, Ren HTH, Shen DDC, Yang XZX, et al. Comparison of neurofilament light and heavy chain in spinal muscular atrophy and amyotrophic lateral sclerosis: A pilot study. *Brain Behav*. 2023 May;13(5):e2997.
  110. De Wel B, De Schaepdryver M, Poesen K, Claeys KG. Biochemical and clinical biomarkers in adult <sc>SMA</sc> 3–4 patients treated with nusinersen for 22 months. *Ann Clin Transl Neurol* [Internet]. 2022 Aug 14;9(8):1241–51. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/acn3.51625>
  111. Lapp HS, Freigang M, Hagenacker T, Weiler M, Wurster CD, Günther R. Biomarkers in 5q-associated spinal muscular atrophy—a narrative review. *J Neurol* [Internet]. 2023 Sep 8;270(9):4157–78. Available from: <https://link.springer.com/10.1007/s00415-023-11787-y>
  112. 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* [Internet]. 2019 Jan

- 10;12:175628641984605. Available from:  
<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1756286419846058>
113. Faravelli I, Meneri M, Saccomanno D, Velardo D, Abati E, Gagliardi D, et al. Nusinersen treatment and cerebrospinal fluid neurofilaments: An explorative study on Spinal Muscular Atrophy type 3 patients. *J Cell Mol Med* [Internet]. 2020 Mar 7;24(5):3034–9. Available from:  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jcmm.14939>
114. Badina M, Sporea C, Bejan GC, Mirea A, Ion DA. The dynamic of changes of pNFH levels in the CSF compared with the motor scales' scores during three years of nusinersen treatment in children with spinal muscular atrophy types 2 and 3. *Balneo PRM Res J* [Internet]. 2024 Mar 31;15(Vol.15, 1):643. Available from:  
<https://bioclima.ro/Balneo643.pdf>
115. Sarıkaya Uzan G, Paketçi C, Günay Ç, Edem P, Özsoy Ö, Hız Kurul S, et al. The Effect of Nusinersen Therapy on Laboratory Parameters of Patients with Spinal Muscular Atrophy. *Neuropediatrics* [Internet]. 2022 Oct 24;53(05):321–9. Available from: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0042-1750719>
116. Stolte B, Nonnemacher M, Kizina K, Bolz S, Totzeck A, Thimm A, et al. Nusinersen treatment in adult patients with spinal muscular atrophy: a safety analysis of laboratory parameters. *J Neurol* [Internet]. 2021 Dec 25;268(12):4667–79. Available from: <https://link.springer.com/10.1007/s00415-021-10569-8>
117. Silva P. Serum Creatinine Levels Reflect Disease Severity in Muscular Dystrophy Patients [Internet]. 2015 [cited 2024 Jan 5]. Available from: <https://muscular dystrophynews.com/news/serum-creatinine-levels-reflect-disease-severity-in-muscular-dystrophy-patients/>
118. Badina M, Sporea C, Bejan GC, Mirea A, Ion DA. Impact of Nusinersen on Neurofilament, Creatinine Levels, and Motor Function in Pediatric Spinal Muscular Atrophy Rehabilitation: A Biomarker Analysis. *Creat Levels, Mot Funct Pediatr Spinal Muscular Atrophy Rehabil A Biomark Anal Rehabil Med Balneo PRM Res J*. 2024;15(2):681.
119. Xing X, Liu X, Li X, Li M, Wu X, Huang X, et al. Insights into spinal muscular atrophy from molecular biomarkers. *Neural Regen Res* [Internet]. 9900; Available from:

[https://journals.lww.com/nrronline/fulltext/9900/insights\\_into\\_spinal\\_muscular\\_atrophy\\_from.410.aspx](https://journals.lww.com/nrronline/fulltext/9900/insights_into_spinal_muscular_atrophy_from.410.aspx)

120. Li D, Yang J, Wang X, Yang L, Luo R, Huang S. Analysis of the efficacy and adverse effects of nusinersen in the treatment of children with spinal muscular atrophy in China. *Brain Behav.* 2024 Jul;14(7):e3630.
121. Chen Y. Effects of nusinersen on motor function in children with spinal muscular atrophy : a retrospective study. 2024;(July):1–8.
122. Axente M, Sporea C, Mirea A, Burcea CC, Ion DA. Time-Efficacy in SMA Type 1 and 2 Cases Treated with Nusinersen. *Balneo PRM Res J [Internet].* 2023 Jun 23;14(Vol.14, 2):566. Available from: <http://bioclima.ro/Balneo566.pdf>
123. Badina M, Sporea C, Bejan GC, Mirea A, Ion DA. Impact of Nusinersen on Neurofilament , Creatinine Levels , and Motor Function in Pediatric Spinal Muscular Atrophy Rehabilitation : A Biomarker Analysis. 2024;1–23.