



UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„CAROL DAVILA” din BUCUREȘTI



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

CORELAȚII CLINICE ȘI ELECTROFIZIOLOGICE LA COPIII CU
AMIOTROFIE SPINALĂ ÎN TRATAMENT CU NUSINERSEN

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător de doctorat:

Prof. Univ. Dr. Daniela Adriana Ion

Student-doctorand:

Stoica (Axente) Mihaela

2024

Cuprins

INTRODUCERE	
I. PARTEA GENERALĂ	3
Capitolul 1. Atrofia musculara spinala 5q – aspecte clinice, diagnostic si tratament	4
1.1. Definiție, incidență, genetică	4
1.1.1. Gena SMN	6
1.1.2. Mutații intragenice	7
1.1.3. Proteina SMN	8
1.2. Histopatologic	9
1.3. Tablou clinic	10
1.4. Clasificarea funcțională 2018	14
1.5. Complicațiile AMS	15
1.6. Scale funcționale	17
1.7. Diagnostic	18
1.8. Evoluția naturală a AMS	22
1.9. Tratament	27
1.10. Aspecte electrofiziologice	31
1.10.1. Conducerea nervoasă motorie	31
1.10.2. CMAP ca biomarker predictiv AMS	32
II. CONTRIBUȚII PERSONALE	35
Capitolul 2. Cadrul general al cercetării	36
2.1. Studii derulate în cadrul cercetării doctorale	36
2.2. Material și metodă	36
2.2.1. Evaluarea electrofiziologică	37
2.2.2. Evaluarea funcțională	38
Capitolul 3. Aspecte clinice și electrofiziologice la pacienții cu AMS tip 1, 2 și 3 înaintea inițierii tratamentului cu nusinersen (Studiul 1)	41
3.1. Introducere	41
3.2. Material și metodă	41
3.3. Rezultate	43
3.4. Discuții	46
3.5. Concluzii	47

Capitolul 4. Aspecte clinice și genetice în AMS non 5q cauzate de deficitul de ceramidază acidă (Studiul 2)	48
4.1. Introducere	48
4.2. Studii de caz	48
4.2.1. Mutații în gena GARS1	48
4.2.2. Mutații în gena PLEKHG5	50
4.2.3. Mutații în gena EXOSC3	50
4.2.4. Mutații în gena ASAH1	51
Capitolul 5. Modificări clinice și electrofiziologice în AMS pediatrică după 2 ani de tratament cu nusinersen (Studiul 3)	55
5.1. Introducere	55
5.2. Material și metodă	55
5.3. Rezultate	56
5.4. Discuții	58
5.1. Concluzii	59
Capitolul 6. Timp - eficiență în cazurile de AMS tip 1 și 2 tratate cu nusinersen (Studiul 4)	60
6.1. Introducere	60
6.2. Material și metodă	60
6.3. Rezultate	61
6.4. Discuții	66
6.5. Concluzii	67
Capitolul 7. Studiul final	68
7.1. Introducere	68
7.2. Material și metodă	68
7.3. Rezultate	69
7.3.1. Date demografice	69
7.3.2. Număr copii SMN2	72
7.3.3. Date baseline – la inițierea tratamentului cu nusinersen (T0)	73
7.3.4. Rezultatele pe scalele motorii și electrofiziologice în funcție de tipul AMS	79
7.3.5. Rezultatele motorii și electrofiziologice în funcție de numărul de copii SMN2	94
7.4. Discuții	98
7.5. Concluzii	107
Bibliografie	109

Lista cu lucrările științifice publicate

1. **Axente, M.**, Sporea, C., Grigoriu, A., Mirea, A., Leanca, M.C., Marinescu, G.I., et al. Clinical and Electrophysiological Aspects in Children with Spinal Muscular Atrophy Type 1, 2 and 3 before Treatment. J Neurophysiol Neurol Disord [Internet]. 2021;9(1), https://www.jscholaronline.org/full-text/JNND/9_103/Clinical-and-Electrophysiological-Aspects.php (Cap. 3, pag. 41-47)
2. **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. 4, pag. 48-54)
3. **Axente, M.**; Mirea, A.; Sporea, C.; Pădure, L.; Drăgoi, C.M.; Nicolae, A.C.; Ion, D.A. Clinical and Electrophysiological Changes in Pediatric Spinal Muscular Atrophy after 2 Years of Nusinersen Treatment. Pharmaceutics. 2022; 14(10):2074. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14102074>, <https://www.mdpi.com/1999-4923/14/10/2074/htm> (Cap. 5, pag. 55-59)
4. **Axente, M.**; Sporea, C.; Mirea, A.; Burcea, C.-C.; Ion, D. A. (2023). Time-Efficacy in SMA Type 1 and 2 Cases Treated with Nusinersen. Balneo and PRM Research Journal, 14(2):566, <http://bioclima.ro/Balneo566.pdf> (Cap. 6, pag. 60-67)
5. 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>
6. 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>

Atrofia musculară spinală (AMS) este o boală neuromusculară, degenerativă, ereditară, cu incidența în populația pediatrică de 1:6.000- 1: 11000 [1], cu evoluție diferită în funcție de vârsta la care debutează primele semne de boală, respectiv de la forma precoce extrem de severă, cu mortalitate până la 2 ani, cu afectare bulbară, până la forma clinică ușoară, fără afectare respiratorie, cu deficit motor proximal, dar păstrarea mersului autonom.

Cursul natural al bolii s-a schimbat odată cu aprobarea tratamentelor inovatoare cu oligonucleotidă antisens (ASO/antisense oligonucleotide) care au dus la schimbarea tabloului clinic, respectiv la apariția fenotipurilor noi. În funcție de momentul începerii tratamentului, rezultatele obținute sunt promițătoare, astfel că în formele precoce copiii supraviețuiesc peste 2 ani în marea lor majoritate, iar în formele intermediare și tardive s-a observat stoparea regresului motor cu conservarea pe termen mai lung a mersului autonom.

Alături de tratamentul medicamentos se impune respectarea standardelor de îngrijire (kinetoterapia generală și respiratorie, managementul respirator și cel nutrițional corespunzător, ortezarea, prevenirea complicațiilor ortopedice: scolioză progresivă, luxația de sold, retracțiile tendinoase) [2,3].

Studierea modificărilor electrofiziologice în aceasta afecțiune este o temă nouă, originală atât pe plan național cât și internațional, fiind puțin regăsită în literatura de specialitate. În era diagnosticului genetic, explorarea electrofiziologică aduce elemente în plus despre gradul degenerării motoneuronilor/axonilor motori dar și despre procesele compensatorii de reinervare/regenerare cronice.

Scopul acestei cercetări a fost identificarea unor biomarkeri de predictibilitate pentru evoluția AMS și monitorizarea parametrilor clinici și electrofiziologici ai pacienților aflați în tratament modificator de boală (nusinersen), pe o durată de 3 ani de la inițierea tratamentului.

Cercetarea a fost desfășurată în premieră în România și a inclus pacienți pediatrici cu AMS tip 1, 2 și 3 aflați în tratament la Centrul Național Clinic de Recuperare Neuropsihomotorie pentru Copii „Dr. Nicolae Robănescu” (CNCRNC).

Acest studiu de *tip analitic observațional* reprezintă o temă originală în țara noastră întrucât odată cu introducerea tratamentului specific (nusinersen) s-a creat un context clinic nou, neexplorat anterior. În literatura de specialitate din România nu există date referitoare la evoluția din punct de vedere electrofiziologic sub acest tratament, iar în publicațiile internaționale acestea sunt foarte puține. Obiectivul principal a fost cercetarea evoluției electrofiziologice și clinice într-un lot reprezentativ de pacienți pediatrici AMS 5q (tip 1, 2 și 3) după 3 ani de tratament cu nusinersen prin compararea datelor inițiale și finale.

Ca obiective secundare am urmărit corelațiile statistice între datele electrofiziologice și clinice (scale motorii) la inițierea tratamentului, compararea evoluției pacienților cu AMS tratați față de cei netratați (date din literatură- evoluția naturală a bolii), relația între tabloul clinic și numărul de copii SMN2. De asemenea am analizat influența pe care o are vârsta de inițiere a tratamentului asupra rezultatelor, atât asupra evoluției clinice cât și electrofiziologice, dar și cazuri particulare de AMS non 5q (aspecte clinice, paraclinice și tratament), tipuri particulare de afectare genetică (heterozigot compus) și cazul unui pacient presimptomatic de la debut (evoluție clinică și electrofiziologică sub tratament).

Limitele studiului au fost legate de numărul relativ mic de pacienți, heterogenitatea grupului (vârste foarte diferite chiar și în cadrul aceluiași tip, cu debut al bolii la intervale variabile de timp), vârsta pediatrică care punctual a creat mici probleme de cooperare în timpul examinărilor.

Incidența bolii este de 1:6000-11.000 nou născuți vii, iar frecvența purtătorilor sănătoși în populația generală de 1:40-1:60 [1,4]. În 1990 a fost localizată poziția genei responsabile de AMS, prin studii de linkage, în locusul 5q11.2-13.3, conținând aproximativ 500 kb [5]. În această regiune au fost identificate secvențe genice și nongenice duplicate în număr variabil [6]. La nivelul genomului uman, spre deosebire de animale, aceasta regiune conține cel puțin patru gene prezente în regiunea centromerică și telomerică. La nivelul cromozomului 5 întâlnim 2 perechi de gene isoforme- 2 gene SMN1 la nivel telomeric și 2 gene SMN 2 la nivel centromeric care diferă doar prin câteva nucleotide la nivelul exonului 7, una fiind importantă funcțional: gena SMN1 are o citozina (C) în aceeași poziție în care gena SMN2 conține o tiamină (T).

În 1995 Lefebvre et al. au raportat că prezența mutațiilor în ambele alele telomerice (SMN1) determină AMS. Această genă a fost denumită gena de supraviețuire a neuronului motor [7]. Ulterior Coover et al. au arătat că gena centromerică SMN2 are aceleași secvențe nucleotidice în proporție de 99% ca și SMN1 dar boala este cauzată doar de mutația în gena SMN1 [8]. Mutația tipică, întâlnită în 95 % cazurilor de AMS, se află la nivelul genei SMN1 pe brațul lung al cromozomului 5 (5q), prin deleția homozigotă a exonului 7.

Gena SMN1, gena patogenică din AMS este copia telomerică a duplicației (SMNtel). Numărul copiilor variază astfel: o copie SMN1 pe fiecare cromozom în 82-96% din subiecții sănătoși, 2 copii SMN1 pe fiecare cromozom în 4-18% din subiecții sănătoși. Prezența a cel puțin unei copii SMN1 este indispensabilă pentru supraviețuirea motoneuronilor. Gena SMN1 conține 20 Kb și 9 exoni (1, 2a, 2b, 3-8) [9]. Gena SMN1 codifică proteina SMN ce conține 294 aminoacizi. [10]

Gena SMN2 este localizată centromeric față de gena SMN1(SMNcen), fiind răspunzătoare de severitatea fenotipului bolii. Genele SMN1 și SMN2 diferă prin 5 nucleotide doar una fiind importantă funcțional, respectiv traslocarea citozinei (C) în tiamină (T) la nivelul unui site de splicing al exonului 7 SMN2 [11]. Această schimbare modifică încorporarea secvenței exonului 7 în ARM mesager rezultând sinteza unei proteine mai scurte, rapid degradabile, cu eficiență funcțională redusă. Totuși, gena SMN2 poate produce în proporție de aproximativ 10 % proteina SMN funcțională. S-a dovedit că numărul copiilor SMN2 variază de la individ la individ și este răspunzător de gravitatea tabloului clinic.

Corelații genotip-fenotip

Nu există corelații între tipul SMN1 patogenic și severitatea bolii: deleția homozigotă a exonului 7 este observată la aproape toți pacienții (94%), doar o mică parte a cazurilor prin conversie genică. Mecanismul de conversie genică constă în transformarea genei SMN1 în SMN2 și implicit creșterii numărului de copii SMN2 [12,13].

Proteina SMN

Este o moleculă mare, cu greutate de 38 kDa, prezentă în citoplasmă și nucleu. În nucleu este concentrată în structuri numite „gems” (corpuri Cajal). Aceștia conțin niveluri crescute de factori implicați în transcripție și procesează tipuri variate de ARN nuclear. Numărul de corpuri Cajal din țesuturi sau linii celulare la pacienții cu AMS se corelează invers proporțional cu severitatea bolii, cazurile cu AMS tip 1 au foarte puțini sau deloc. Proteina SMN este de asemenea prezentă la nivelul axonilor neuronali, transportată birecțional. Este bine reprezentată la nivelul terminațiilor în creștere și la nivelul membranei postsinaptice a joncțiunii neuromusculare.

Tablou clinic

Semnele clinice caracteristice acestei afecțiuni sunt hipotonie/deficit motor și atrofia musculară datorate pierderii/degenerării motoneuronilor spinali +/- bulbari [14]. Deficitul motor este la nivel proximal, centuri pelvină mai afectată decât scapulară, precum și la nivel axial. Severitatea bolii poate varia de la deficit ușor pe centuri cu prezervarea mersului autonom până la formele infantile grave cu hipotonie generalizată severă, insuficiența respiratorie și tulburări de deglutiție. Debutul și evoluția bolii sunt distincte și variază de la o perioadă presimptomatică cu durată imprezibilă, de la câteva zile/săptămâni în formele precoce cu regres motor rapid, până la durată de ani în formele tardive, apoi cu stabilizarea funcției motorii și eventual progresie lentă [14]. În condiții de stres/infecții acute, regresul motor se poate accentua [15].

Clasificarea decimală (Dubowitz 1997) reflectă diferența dintre sugarul cu AMS de tip 1, forma precoce cu deficit motor sever, atrofie musculară, disfuncție bulbară precoce și un prognostic grav pentru supraviețuire (tip 1.1), apoi sugarul cu evoluție tipică de AMS (1.5), iar cei cu debutul regresului motor probabil la vârsta de 3 luni, unii atingând abilitatea de a avea controlul capului și cu o rezervă respiratorie mai bună, disfuncție minimă (tip 1.9). Pentru grupul intermediar 2 (tipul 2), variabilitatea clinică între forma severă „slabă” capabil să stea în șezut doar cu sprijin, control precar al capului, hipotonie axială severă dar și la nivelul membrelor inferioare (2.1) și forma „puternică” (2.9) reprezentată de pacienții care au achiziționat poziția sezandă fără sprijin, dar nu se ridică în ortostatism, fără disfuncție bulbară semnificativă. În cazul pacienților cu tipul 3, se identifică o formă severă (3.1) în care copilul este capabil să stea în ortostatism și să facă câțiva pași instabil, iar forma tardivă (3.9) care merge autonom stabil, cu deficit proximal minim, fără disfuncție bulbară [16].

Clasificarea funcțională 2018

Din 2018 s-a redefinit clasificarea AMS în funcție de achizițiile motorii dobândite, pacienții fiind grupați în 3 categorii: cei care nu stau în șezut („nonsitters”), cei care stau în șezut („sitters”) și pacienți ambulanți („walkers”). În categoria „nonsitters” sunt majoritatea pacienților tip 1, dar pot fi și cei din tipul 2 care au pierdut abilitatea de a sta în șezut (în special tipul 2a). „Sitters” sunt cei din tipul 2 dar pot fi și cei din tipul 1 sau 3 care au câștigat sau respectiv au pierdut achiziția funcțională. În ultima categorie „walkers” sunt cei din tipul 3 ambulanți și cei din tipurile 1 și 2 care au câștigat mersul autonom.

Complicațiile amiotrofiei spinale sunt variate în funcție de tipul precoce sau tardiv de boală. Astfel, în tipul 1 și 2a sunt frecvente tulburările respiratorii, cu disfuncție de tip restrictiv, din cauza afectării musculaturii respiratorii accesorii (muschi intercostali). Afectarea mușchilor respiratori determină scăderea clearanceului secrețiilor din căile aeriene, făcând tusea ineficientă, determinând hipoventilație nocturnă și pneumonie recurentă. Aplicarea ventilației noninvasive birezionale (BiPAP/ Bilevel Positive Airway Pressure) și utilizarea tehnicilor de clearance al secrețiilor traheobronșice (tuse asistată/ „cough assist”) au adus o netă îmbunătățire a calității vieții, prevenind complicațiile respiratorii amenințătoare de viață, și implicit au dus la o durată mai mare de supraviețuire a acestor pacienți. Tot în formele precoce de boală întâlnim frecvent tulburările de deglutiție și gastrointestinale, pacienții prezentând disfagie și microaspirații.

Semnele gastrointestinale întâlnite pot fi: constipație, evacuare gastrică întârziată și reflux gastroesofagian potențial amenințător de viață datorită riscului de microaspirații pulmonare. Indivizii cu forme 2 și 3 nonambulanți au risc de a dezvolta obezitate.

Complicații ortopedice întâlnite în AMS sunt : scolioza progresivă, luxația de șold și redorile articulare sunt cele mai frecvente. Acestea sunt mai des întâlnite în tipul 2 și în formele severe de AMS tip 3 (AMS tip 3a).

Scalele funcționale utilizate în evaluarea copiilor cu AMS sunt : scala de evaluare a bolilor neuromusculare pentru sugari a Spitalului de Copii din Philadelphia (CHOP INTEND/ The Children's Hospital of Philadelphia Infant Test of Neuromuscular Disorders) pentru tipul 1 [17,18], scala motorie funcțională extinsă Hammersmith (HFMSE/ Hammersmith Functional Motor Scale Expanded) pentru tipul 2 și 3, și testul de 6 minute de mers (6MWT/ 6 minute walking test) pentru cazurile care și-au păstrat mersul autonom. CHOP INTEND a fost dezvoltată pentru pacienții cu vârsta între 3 luni și 4 ani, conține 16 elemente, iar scala notează gradul de îndeplinire a cerințelor motorii indicate de kinetoterapeut, atât prin observație directă cât și prin răspunsul dat de mamă. Scorul total posibil este 64. HFMSE este o scală utilizată pentru evaluarea abilităților fizice la pacienții cu AMS de tip 2 și 3. Acesta conține 33 de elemente care sunt evaluate pe o scară de 0, 1, 2, cu un scor total realizabil de 66. [19,20]. 6MWT [21–23] măsoară distanța în metri parcursă de pacient în 6 minute, timp în care merge cu pas normal, fără alergare, fără oprire. Acesta este testul de referință al multor studii, cu ajutorul căruia se evaluează progresia bolii în AMS tip 3.

Diagnostic

Testarea genetică este standardul de aur în diagnosticul AMS. În practică, suspiciunea clinică pe care o avem în fața unui sugar hipoton („floppy infant”) cu deficit motor marcat, generalizat, areflexie și afectare bulbară (respiratorie și deglutiție) trebuie susținută de efectuarea unui test genetic (amplificarea sondei dependentă de ligaturarea multiplex- **MLPA**/Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification și reacția cantitativă de polimerizare în lanț- **qPCR**/ quantitative Polymerase Chain Reaction). Acest test trebuie efectuat cât mai curând posibil, întrucât în cazul formelor precoce de boală (AMS tip 1) fiecare zi înseamnă regres motor important (asociat cu procesul degenerativ al motoneuronilor) [24].

Numărul de copii SMN2

Analiza numărului de copii SMN2 nu se efectuează în mod obișnuit în cadrul diagnosticului sau al testării purtătorului pentru AMS. Deși numărul de copii SMN2 influențează severitatea bolii, variantele secvenței SMN2 dar și alte gene au fost, de asemenea, implicate în influențarea fenotipului AMS [25]. Prin urmare, rezultatele

numărului de copii SMN2 pot furniza informații probabilistice privind severitatea clinică pentru un copil sau făt afectat, dar nu sunt definitive.

Atrofia musculară spinală non5q

5% din cazurile de AMS nu sunt datorate mutației tipice în gena SMN1 de pe cromozomul 5, ci unor alte mutații, rezultând un tablou clinic care indică boala de motoneuron cu particularități specifice. Până în prezent au fost descrise 16 gene asociate cu AMS non 5q [47]. Cele mai frecvente mutații întâlnite non5q sunt în gena *ASAH1* (AMS cu epilepsie mioclonică), *IGHMBP2* (AMS cu disfuncție respiratorie severă), *ATP7A* (AMS forma distală X linkată), *GARS* și *PLEKHG5* (neuropatie senzitivo-motorie), *EXOSC3* (hipoplazia ponto-cerebelară și AMS). Aspectele clinice sunt asemănătoare cu forma tipică a AMS 5q, pacienții prezintă deficit motor predominant proximal, dar și axial, amiotrofii severe, evoluția progresivă, disfuncția bulbară, areflexie osteotendinoasă. În toate aceste forme deficitul motor nu se datorează lipsei proteinei SMN, prin urmare nu au indicație terapeutică. În practica medicală au fost nevoie de investigații suplimentare pentru a stabili forma de AMS, respectiv teste electrofiziologice, electroencefalogramă, rezonanță magnetică nucleară, dar și teste suplimentare genetice (secvențiere monogenică Sanger, secvențierea întregului exom).

Evoluția naturală a AMS

În ce privește evoluția naturală a AMS înainte de era terapeutică, datele din literatură prezintă studii efectuate pe populații de pacienți cu tipurile 1, 2 și 3 urmărind evoluția acestora într-o perioadă variabilă de timp (12-24 luni), monitorizând funcția motorie (scala CHOP INTEND), funcția bulbară (respiratorie și deglutiția), dar și rata de supraviețuire. Datele au fost utile în studiile clinice efectuate (ENDEAR, CHERISH) pentru răspunsul la tratamentul cu nusinersen, acestea având și lot de control cu pacienți AMS fără tratament ("sham controled"). Astfel, pacienții cu AMS tip 1 fără tratament au fost urmăriți în 3 studii longitudinale de evoluție naturală a bolii folosind pentru monitorizare scala CHOP INTEND: două au fost efectuate în Statele Unite de rețeaua de cercetare clinică neuromusculară pediatrică (PNCR/Pediatric Neuromuscular Clinical Research) [26] și rețeaua de excelență în studii clinice în neuroștiință (NeuroNEXT/The Network for Excellence in Neuroscience Clinical Trials) [27], iar cealaltă în Italia într-un singur centru (Nemo Center of the Gemelli Hospital) [28].

Tratament

Nusinersen [29] este prima terapie țintită SMN2 pre-ARN mesager aprobată pentru AMS (decembrie 2016 pentru Statele Unite ale Americii și mai 2017 pentru Europa) [30,31]. Nusinersen este o oligonucleotidă antisens aparținând oligodezoxinucleotidelor fosforilate . Nusinersen își exercită efectul prin modificarea produsului genetic, acționând la nivelul genei SMN2 [32]. Gena SMN2 codifică o proteină SMN Δ 7, care diferă de proteina SMN (produsă de gena SMN1) prin 11 nucleotide , este o proteină trunchiată, nefuncțională, rezultând prin omiterea exonului 7 în 80-90% din transcriptul ARNmessenger [33]. Nusinersen țintește ribonucleoproteina nucleară heterogenă A1 (hnRNP A1) (“zona de splicing”) în ARN-ul pre-mesager al SMN2, în aval de exonul 7. Aceasta ajustează procesul de îmbinare care duce la creșterea sintezei transcrierilor care conțin exonul 7 [34-36] și implicit creșterea cantității de proteină funcțională (SMN). Nusinersen are un timp de înjumătățire lung de aproximativ cinci luni, astfel se administrează inițial sub formă de patru doze de încărcare pe o perioadă de 2 luni, urmate de doze de întreținere la fiecare 4 luni [37,38]. Nusinersen s-a dovedit extrem de eficient în îmbunătățirea funcției motorii [39,40] dar și a funcției respiratorii și deglutiției/ stării nutriționale [41,42]. Doza este aceeași la toate grupele de vârstă. Toxicitatea ASOs, de obicei dependentă de doză, include efecte secundare sistemice, cum ar fi febră și artralgiile, trombocitopenia, toxicitatea tubulară renală proximală și hepatotoxicitatea [39-45].

În decembrie 2016, Agenția Americană a Medicamentului (FDA/ Food and Drug Administration) a aprobat nusinersen sub numele de marcă Spinraza® ca primul medicament pentru tratamentul AMS. Agenția Europeană pentru Medicamente (EMA/ European Medicines Agency) l-a aprobat 6 luni mai târziu. Începând cu august 2021, nusinersen este disponibil în 22 de țări europene [46]. Potrivit Biogen, până în martie 2021, peste 11.000 de pacienți din întreaga lume au primit tratament cu nusinersen [48].

În România, nusinersen este aprobat oficial pentru utilizare în *mai 2018* pentru toate tipurile de AMS, grupele de vârstă și stadiile bolii. Primul pacient începe tratamentul în *octombrie 2018*, CNCRNC „Dr Nicolae Robănescu” fiind primul centru de administrare.

Aspecte electrofiziologice

Potențialul de acțiune motor compus (CMAP/ Compound Motor Action Potential) reprezintă suma potențialelor motorii individuale. Aceste potențiale individuale sunt generate de fibre musculare care sunt depolarizate de axonii fibrelor nervoase cu viteze de conducere similare. Amplitudinea depinde de integritatea axonilor, de fibrele musculare pe care le depolarizează și de gradul de variabilitate a vitezei de conducere a fibrelor

individuale. În AMS potențialul de acțiune motor compus are amplitudine redusă din cauza pierderii numărului de axoni viabili, dar cu latențe distale și viteze de conducere normale, deoarece mielina este intactă. Din cauza pierderii axonale, amplitudinea CMAP-urilor poate fi redusă semnificativ. În tipul 1 de amiotrofie spinală amplitudinea CMAP este extrem de mică, de obicei <0,5 mV, ajungând la maxim de 1 mV pre-tratament, fiind corelată cu gradul afectării motorii. În tipul 2 amplitudinea CMAP este în medie între 1-2,5 mV, uneori cu creșterea ușoară a ariei, acest aspect fiind corelat cu procesul cronic de reinervare nervoasă. În tipul 3 de AMS amplitudinea CMAP este de obicei normală, dar aria și durata CMAP sunt crescute în contextul procesului cronic de reinervare/ sprouting. [49,50]. Conform datelor din literatură [27], CMAP a fost urmărit ca factor de prognostic și biomarker pentru evoluția AMS.

Cercetarea derulată în cadrul studiilor doctorale a analizat evoluția clinică și electrofiziologică sub tratament ASO a unui lot reprezentativ de pacienți din țara noastră cu AMS tip 1, 2 și 3 simptomatici. De asemenea, un aspect important a fost compararea evoluției CMAP la pacienții noștri tratați, cu cea a celor netratați (date din literatură), pentru a dovedi importanța CMAP ca factor predictiv al evoluției AMS.

Studii derulate în cadrul cercetării doctorale

În cursul cercetării doctorale au fost realizate **5 studii**:

Primul studiu a evidențiat diferențele existente între parametri clinici și electrofiziologici ai pacienților cu AMS tip 1, 2 și 3 înaintea inițierii tratamentului și cei ai populației sănătoase de aceeași vârstă [51].

Al doilea studiu a analizat tabloul clinic și datele electrofiziologice în formele atipice de AMS (non 5q) comparativ cu forma tipică, AMS 5q [52].

Al treilea studiu a identificat corelații între parametri electrofiziologici (amplitudinea CMAP) și scorurile funcționale pe scalele motorii în urma monitorizării periodice, timp de 2 ani, din 4 în 4 luni, a 34 de pacienți cu AMS tip 1, 2 și 3 aflați sub tratament cu nusinersen [53].

Al patrulea studiu, derulat pe un lot extins de 60 de pacienți cu AMS tip 1 și 2, a analizat influența timpului între debutul simptomatologiei și inițierea tratamentului asupra evoluției bolii [54].

Al cincilea studiu a inclus 71 de pacienți cu AMS tip 1, 2 și 3 care au fost monitorizați timp de 3 ani.

Un loc aparte îl ocupă cazul pacientului presimptomatic (Nr 72) diagnosticat antenatal și confirmat genetic perinatal, care sub tratament cu nusinersen și standarde corecte de îngrijire a avut o dezvoltare motorie normală pe etape de vârstă.

Material și metodă

Cercetarea s-a desfășurat în cadrul CNCRNC “Dr.Nicolae Robănescu”, cu recrutarea pacienților în perioada octombrie 2018 - mai 2020, a inclus 72 de copii diagnosticați cu AMS tip 1, 2 și 3, a căror evoluție a fost monitorizată până în mai 2023. Toți pacienții au fost confirmați genetic prin test MLPA, marea majoritate având mutație homozigotă a genei SMN1, doar 2 fiind cu aspectul genetic de heterozigot compus, necesitând secvențiere genică. Unul dintre pacienți a fost presimptomatic (diagnosticat genetic antenatal și confirmat perinatal), restul de 71 fiind simptomatici. Cercetarea s-a desfășurat cu respectarea legislației în vigoare, după obținerea aprobării din partea Comisiei de Etică a CNCRNC (nr. 7465/01.10.2018) și a consimțământului informat al aparținătorilor legali ai tuturor pacienților înrolați în studiu. Anterior obținerii consimțământului informat, aparținătorilor legali li s-au explicat toate detaliile legate de modul în care se desfășoară cercetarea și în care sunt colectate, analizate și prelucrate datele, precum și forma în care rezultatele cercetării urmează a fi diseminate.

Toți pacienții au urmat un protocol de evaluare clinică - examinare neurologică, testare funcțională pe scale internaționale omologate (CHOP INTEND, HFMSE, 6MWT), ulterior au fost evaluați electrofiziologic cu înregistrarea CMAP la nivel distal nerv ulnar drept. Datele au fost colectate la momentul inițial, anterior introducerii schemei terapeutice cu nusinersen, și înaintea fiecărei administrări, efectuate intratecal o dată la 4 luni, pe o durată de 3 ani din momentul inițierii tratamentului.

Evaluarea electrofiziologică

În vederea obținerii datelor electrofiziologice s-a utilizat un aparat de electromiografie (EMG) tip Keypoint cu 6 canale, stimulator clasic/pediatric, electrozi de suprafață adezivi. În cabinet a fost creată o atmosferă plăcută, confortabilă pentru a asigura relaxarea copilului și familiei în vederea unei cât mai bune colaborări. Nu s-a administrat sedare generală sau locală. Temperatura cutanată distală înregistrată a fost de peste 35,5°. Electrozi de suprafață cu gel adeziv au fost amplasați la nivelul eminenței hipotenare - electrodul activ (de culegere) și la 3 cm distal de acesta - electrodul de referință. Stimularea electrică s-a realizat la nivelul articulației pumnului, la nivelul nervului ulnar drept (la 2-3 cm medial de nervul median) folosind stimulatorul pediatric, aplicând intensități progresive de la 10-15 mA până la 50 mA. CMAP-ul obținut a fost fezabil, reproductibil, obținut la intensități supra-maximale,

stimularea electrică repetându-se de 3 ori. Softul aparatului a înregistrat amplitudinea maximă (vârful/”peak”-ul negativ).

Toate examinările au decurs fără incidente majore, copiii au suportat bine procedura de lucru. Nu s-au înregistrat erori legate de lipsa de colaborare sau din alte motive.

Evaluarea funcțională

CHOP-INTEND a fost aplicată pacienților cu AMS tip 1 prin observație directă dar și prin răspunsurile mamei (anumite abilități motorii observate la domiciliu și care nu au putut fi reproduse în sala de examinare). Scala măsoară îmbunătățirea funcției motorii prin evaluarea mișcărilor active, a mobilității și a forței musculare urmând 16 funcții motorii grupate în 3 categorii: cap și gât, mâini; brațe și umeri; picior, membru inferior și șold. Fiecare dintre ele este marcat de la 0 la 4, cu 0 fiind nici un răspuns / capacitatea de a efectua mișcarea și 4 fiind "răspuns complet" (fiind capabil de a efectua sarcina). Scorul total posibil este de 64.

HFMSE este o scală utilizată pentru evaluarea abilităților fizice la pacienții cu atrofie musculară spinală de tip 2 și 3. Acesta conține 33 de funcții motorii grupate în 7 categorii: poziție șezând, rostogolire, tranziție/rostogolire, ortostatism/pas, tranziție/mers pe genunchi, sărituri, urcat/coborât pe scară, care sunt evaluate cu punctaj de 0, 1, 2, cu un scor total realizabil de 66.

6MWT utilizat în cazul copiilor care au dobândit mersul autonom. Testul constă în solicitare de a merge în pas normal, fără alergare, fără oprire timp de 6 minute pentru a măsura distanța pe care o pot îndeplini. Acest test foarte simplu este testul de referință al multor studii. Rezultatul este în metri.

Evaluarea funcțională a pacientului cu AMS se realizează cu scale specifice, în funcție de statusul său funcțional [55]. Acestea sunt prezentate schematic în Tabelul I.1.

Tabel I.1 Scale motorii recomandate în funcție de statusul funcțional al pacientului

Starea funcțională a pacientului	Scale motorii recomandate
“Non-sitter “	CHOP INTEND
“Sitter”	HFMSE
„Walker”	6 MWT, HFMSE

In studiul 1 am analizat aspecte clinice și electrofiziologice la copii cu AMS tip 1, 2 și 3 înaintea inițierii tratamentului cu nusinersen. Am studiat un lot de 36 pacienți internați în CNCRNC „Dr Nicolae Robănescu” în perioada septembrie 2019- ianuarie 2021, având

criteriile de includere și excludere stabilite în planul de cercetare. Evaluarea electrofiziologică și scalele motorii au fost efectuate respectând metodologia descrisă în studiul de cercetare, astfel CMAP a fost înregistrat la nivelul nervului ulnar, prin stimulare supramaximală distală. De asemenea, toți acești pacienți au fost evaluați funcțional folosind scalele CHOP INTEND (AMS tip 1) și HFMSE (AMS tip 2 și 3). Valorile CMAP la pacienții cu AMS din grupul studiat, comparativ cu subiecții sănătoși de aceeași vârstă, au fost în concordanță cu datele menționate în literatura de specialitate. Comparativ cu valorile normale ale CMAP la subiecții sănătoși [56,57] care au o valoare medie la nivelul nervului ulnar de 4-11,5 mV (crescând odată cu vârsta), valori sub această curbă [58] au fost observate în toate formele de AMS din grupul analizat. Valorile CMAP au ridicat suspiciunea de boală de motoneuron periferic, fiind semnificativ scăzute în tipul 1 și 2 și scăzând moderat/normal în tipul 3 [59,60]. Acestea au fost asociate cu durata de la debutul primelor semne de boală, fiind mult mai reduse la copiii care au deja regres motor și atrofie musculară [61]. În subgrupurile de boală am observat valori similare ale amplitudinii CMAP în tipul 1 și 2a, precum și pentru 2b și 3a, acestea au fost asociate cu severitatea evoluției clinice/regresului motor. Similar datelor din literatura de specialitate [14,27,59,61], a fost observată o relație invers proporțională în grupul de studiu între tabloul clinic și numărul de copii SMN2, pacienții cu număr redus de copii având un fenotip mai sever al bolii. În cadrul grupului nostru am demonstrat corelații statistice semnificative între CMAP și scorul pe scalele funcționale, adică în AMS tip 2 pe scala HFMSE ($p < 0,01$, $r = 0,687$) și în AMS tip 1 pe scala CHOP ($p < 0,05$, $r = 0,586$), acestea demonstrând o sinergie între cei doi parametri într-un moment de evoluție al bolii. În AMS tip 3, lipsa semnificației statistice între CMAP și HFMSE a fost interpretată în contextul grupului heterogen de pacienți, majoritatea fiind pacienți non-ambulanți cu evoluție cronică pe termen lung.

În cadrul **studiului 2** am analizat aspecte de diagnostic diferențial la pacienți cu AMS non 5q, prezentând cazuri clinice sugestive întâlnite în practica medicală.

Evaluarea cazurilor de AMS atipice cu mutații non 5q a reprezentat un obiectiv al cercetării, identificarea în practică a acestor pacienți a fost un proces important întrucât aceste cazuri impun o conduită terapeutică diferită și implicit au avut o evoluție/prognostic diferit. 5% din cazurile de AMS nu sunt datorate mutației tipice în gena SMN1 de pe cromozomul 5, ci unor alte mutații, rezultând un tablou clinic care indică boala de motoneuron dar cu particularități specifice [52].

În perioada 2018-2021 în cadrul CNCRNC ”Dr. Nicolae Robănescu” am avut 7 cazuri de AMS non 5q. Mutațiile întâlnite au fost în gena ASAH1, GARS, PLEKHG5, EXOSC3. Aspecte clinice asemănătoare au fost deficitul motor predominant proximal, dar și axial, evoluția progresivă, disfuncția bulbară, areflexia osteotendinoasă. Inițial toți pacienții au fost testați MLPA pentru mutație în gena SMN1 care a infirmat forma tipică de AMS.

Am prezentat în detaliu cazul unui pacient cu mutație în gena ASAH1 care a ridicat dificultăți deosebite de încadrare etiologică, cu debutul simptomatologiei la vârstă de 5-6 ani cu accentuarea deficitului motor pe centuri, amiotrofii generalizate severe, scolioză progresivă, tulburare de vorbire (disfonie severă), noduli periarticulari la nivelul degetelor, modificări epileptiforme (aspect electroencefalografic) fără crize clinice, tablou clinic care corespunde unui fenotip overlap între AMS-EMP (atrofie musculară spinală- epilepsie mioclonica progresivă) și boala Farber [52,62].

Gena ASAH1, situată în locusul 8p22, codifică proteina ASAH (N-acilsfingozină amidohidrolază 1, N-acilsfingozină deacilază sau ceramidază acidă), o enzimă implicată în scindarea, la nivel lizozomal, a ceramidei în sfingozină și un acid gras liber, precum și, în diferite condiții de pH, în sinteza ceramidei din componentele menționate mai sus [63–69]. Mutațiile patogene bialelice în ASAH1 sunt implicate în producerea a două boli cu un mod de transmitere autozomal recesiv al cărui fenotip se poate suprapune uneori, respectiv lipogranulomatoza Farber și AMS-EMP [64–67,69,70]. Până în prezent, există mai puțin de 200 de cazuri de boală Farber și AMS-EMP raportate în literatura de specialitate [71].

Pacientul s-a prezentat în spitalul nostru la vârsta de 13 ani, pentru detresă respiratorie severă, deficit motor global, predominant membrilor inferioare, regres motor, hipotonie axială cu control slab al capului, forță musculară de 2-3/5 pe scala MRC (Medical Research Council/ consiliul medical de cercetare) la nivelul membrilor superioare, respectiv 2/5 pentru membrele inferioare, atrofie musculară severă generalizată, retracții la nivelul coatelor și genunchilor mai mult decât la nivelul articulațiilor distale. Testarea genetică pentru AMS 5q (MLPA și secvențierea Sanger) a fost negativă. Între 5 și 10 ani evoluția a fost lent progresivă, deficitul motor proximal s-a accentuat, iar pacientul a dezvoltat atrofie musculară generalizată severă, tulburare de deglutiție și de respirație, contracturi severe la toate nivelurile, scolioză progresivă severă, lipsa reflexelor osteotendinoase. Gastrostomia a fost efectuată în 2019. După vârsta de 10 ani, regresul motor a fost dramatic, a pierdut mersul independent și a fost imobilizat în scaunul rulant. În martie 2021 a fost efectuată intervenția chirurgicală pentru corecția scoliozei toraco-lombare, în urma căreia deficitul motor s-a accentuat, atrofia musculară a devenit extrem de severă, pacientul mai prezenta mișcări

active minime doar la nivel distal membre superioare. Avea o respirație paradoxală, dificilă, fără a avea nevoie de suport ventilator sau oxigen. Prezenta tulburare de vorbire cu disfonie severă. De asemenea avea retracții la nivelul articulației mandibulare cu mișcări foarte limitate la acest nivel, noduli subcutanați în jurul articulațiilor interfalangiene la nivelul membrelor superioare mai mult decât membrele inferioare. Nu a avut evenimente paroxistice, cum ar fi mioclonii sau alte tipuri de convulsii. Studiul electrofiziologic a arătat o amplitudine ușor redusă a CMAP, dar cu o arie crescută (datorită procesului de reinnervare). Potențialul de acțiune senzitiv a avut amplitudine normală și viteze de conducere normale. EMG cu ac a arătat modificări cronice de denervare cu potențiale foarte ample, polifazice ale unităților motorii și recrutare incompletă. MLPA și secvențierea mongenică tip Sanger au exclus o mutație în gena SMN1, ulterior efectuându-se secvențierea întregului exom cu identificarea a trei mutații heterozigote patogene în gena ASAH1. Având două din trei criterii clinice de boala Farber, dar cu afectare de motoneuron considerăm că acest caz este extrem de rar, „overlap” între cele două afecțiuni determinate de mutația în gena ASAH1. Aspectul clinic a sugerat inițial o formă de AMS tip 3a, în care mersul este achiziționat, dar este instabil, iar regresul se instalează rapid cu pierderea acestei achiziții. Din cauza etiopatogeniei diferite în acest tip de AMS, acest caz nu are indicație de terapie genică sau terapie oligonucleotidică antisens ca formele tipice de AMS 5q. AMS este o boală heterogenă. Cu un fenotip foarte similar, etiologia 5q și non 5q SMA poate fi dificil de distins. Cazurile de AMS non-5q cauzate de mutațiile ASAH1 sunt foarte rare, cu doar 45 de pacienți raportați la nivel mondial și primul în România până în prezent.

Studiul 3 a prezentat o analiză a modificărilor clinice și electrografice în AMS pediatric după 2 ani de tratament cu nusinersen. Am evaluat un lot de 34 pacienți cu AMS tip 1, 2 și 3, cu vârsta între 1-16 ani, pe durata a 2 ani de tratament, cu evaluări clinice și electrofiziologice inițiale (T0), și ulterior la fiecare 4 luni, până la 26 luni (T26). S-au aplicat scalele motorii CHOP pentru AMS tip 1 și HFMSE pentru tipul 2 și 3, respectiv 6MWT pentru cei ambulanți. În același timp, a fost înregistrat CMAP distal pe nervul ulnar. Studiul a fost realizat în perioada octombrie 2018 – octombrie 2021. În studiu au fost incluși pacienți cu confirmare genetică a AMS, cu 2 sau mai multe copii ale SMN2. Pacienții care primeau în acel moment un alt medicament (risdiplam sau onasemnogene abeparvovec-xioi) sau care erau agitați sau necooperanți au fost excluși.

La începutul tratamentului (T0), grupul AMS tip 1 a cuprins 11 pacienți “non-sitters”. După 10 administrări de nusinersen (T26), 45,45% au devenit “sitters”, amplitudinea CMAP

crescând de la $0,53 \pm 0,23$ la $1,85 \pm 1,05$. Ceilalți 54,55% dintre pacienții care au rămas “non-sitters” au prezentat o creștere a CMAP de la $0,26 \pm 0,23$ la $1,19 \pm 0,66$. La T0, grupul AMS tip 2 era format din 16 “sitters”. La T26, 4 pacienți (25%) au devenit ambulanți, amplitudinea CMAP crescând de la $2,73 \pm 2,08$ la $3,65 \pm 1,55$. Ceilalți 12 pacienți (75%) care au rămas “sitters” au prezentat o creștere a CMAP de la $0,99 \pm 0,91$ la $1,73 \pm 1,18$. Grupul AMS tip 3 a fost format din 4 “sitters” și 3 “walkers”, atât la T0, cât și la T26. CMAP-ul celor “sitters” a crescut de la $1,25 \pm 0,55$ la $2,05 \pm 0,66$, în timp ce CMAP-ul celor ambulanți a crescut de la $2,73 \pm 2,38$ la $3,66 \pm 2,85$. A existat o creștere semnificativă a CHOP, în concordanță cu CMAP la 5 pacienți pentru AMS tip 1. La pacienții cu AMS tip 2, HFMSE a fost în general staționar, doar 2 dintre aceștia având variații semnificative ale CMAP, peste media grupului. La pacienții cu AMS tip 3, CMAP/HFMSE a prezentat o tendință staționară între T0 și T26. Cea mai semnificativă creștere a amplitudinii CMAP distale a fost înregistrată la pacienții cu AMS tip 1, corelată statistic cu scorurile pe scala CHOP ($p < 0,001$). Majoritatea pacienților cu AMS tip 2 au început tratamentul la mult timp după debutul simptomelor (13-96 luni), care au prezentat amplitudine CMAP și scoruri HFMSE cu valori staționare. Majoritatea pacienților cu AMS tip 3 (4 din 7 pacienți) au fost non-ambulanți la T0. Ei au început tratamentul la câțiva ani după ce și-au pierdut mersul autonom, rămânând non-ambulanți la T26. Copiii cu forme „borderline” au trecut într-o formă superioară, unii dobândind poziția șezând, alții mersul asistat/independent. Pacienții care au avut o amplitudine mai mare a CMAP (motoneuroni/axoni viabili) la începutul tratamentului au avut o evoluție clinică mai bună, acest lucru demonstrând că CMAP este un marker al procesului degenerativ. După 2 ani de tratament cu nusinersen, copiii cu AMS tip 1, 2 și 3 au avut o evoluție clinică favorabilă, după cum arată scorurile de pe scalele motorii. Datele clinice au fost corelate cu datele electrofiziologice, cu semnificație statistică în AMS tip 1. Cu toate acestea, este importantă monitorizarea CMAP în dinamică ca marker electrofiziologic în toate tipurile de AMS pentru a surprinde regresul motor [50] dar și ca factor predictiv.

Studiul 4 a prezentat relația timp-eficiență la pacienții cu AMS tip 1 și 2 în tratament cu nusinersen pe parcursul a 2 ani. Obiectivul principal al acestui studiu a fost de a analiza corelația între momentul inițierii tratamentului față de momentul debutului bolii și evoluția ulterioară a parametrilor clinici și electrofiziologici pe un lot de pacienți cu AMS tip 1 și 2 monitorizați timp de 2 ani [54]. Am evaluat un lot de 60 cazuri, 29 de copii cu AMS tip 1 și 31 cu AMS tip 2; 29 cazuri cu 2 copii SMN2, 29 cazuri cu 3 copii SMN2 și 2 copii cu 4

copii SMN2, cu vârste cuprinse între 3 săptămâni și 16 ani 4 luni. Tratamentul cu nusinersen a fost inițiat între anii 2018 și 2020, iar pacienții au fost monitorizați până în 2022. Toți pacienții din studiul nostru au fost confirmați genetic MLPA cu mutație homozigotă în gena SMN1 (AMS 5q) și au fost simptomatici la începutul tratamentului.

Grupul AMS tip 1 (N=29) a fost relativ omogen, caracterizat prin "non-sitters", debutul simptomelor fiind la vârsta de 1-3 luni. Durata până în momentul diagnosticului a variat între 1 și 8 luni. Vârsta medie la care a început tratamentul a fost între 5 și 8 luni. Regresul motor a fost observat rapid, în câteva zile sau săptămâni, iar primele evaluări motorii și electrofiziologice au fost efectuate la începutul tratamentului.

Grupul AMS tip 2 (N=31) a fost mai heterogen, caracterizat prin "sitters", cu debutul simptomelor între vârsta de 8-12 luni, dar cu diferite forme ale bolii, de la "slab" – 2.1 (Dubowitz) cu hipotonie severă axială, cu mișcări minime la nivelul membrelor inferioare, până la "puternic" – 2.9 (Dubowitz) care menține poziția ortostatică, dar are nevoie de sprijin pentru a merge [72].

Analizând relația durata de timp între debutul bolii/inițierea tratamentului și progresul motor, s-a demonstrat că există o corelație semnificativă în cazul pacienților cu AMS tipurile 1 și 2. Valorile coeficientului de corelație negativă de -0,713 și -0,560 pentru AMS tip 1 și tip 2 indică faptul că, pe măsură ce timpul între debutul simptomatologiei și inițierea tratamentului crește, funcția motorie a pacienților cu AMS tipurile 1 și 2 se agravează.

În cazul pacienților cu AMS tip 1, s-a stabilit o corelație negativă semnificativă statistic între vârsta de debut a bolii și progresul pacienților legat de tratament ($p < 0,05$ și $r = -0,378$).

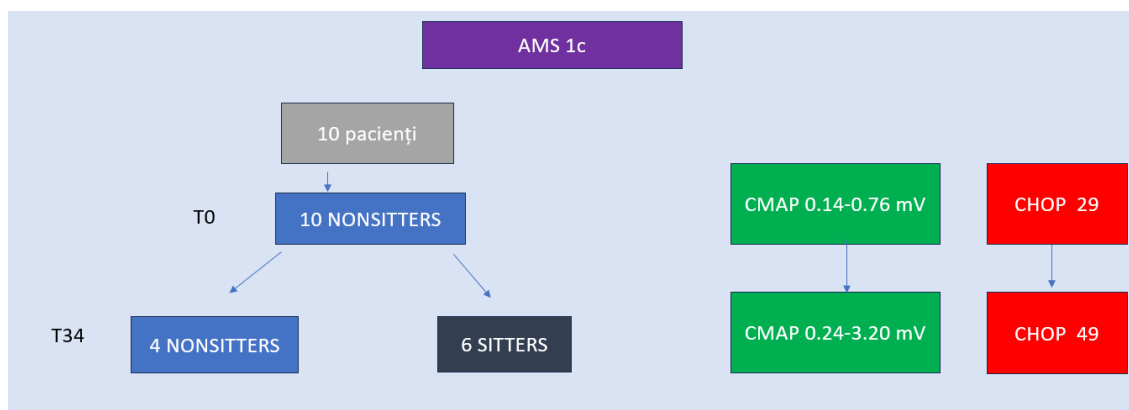
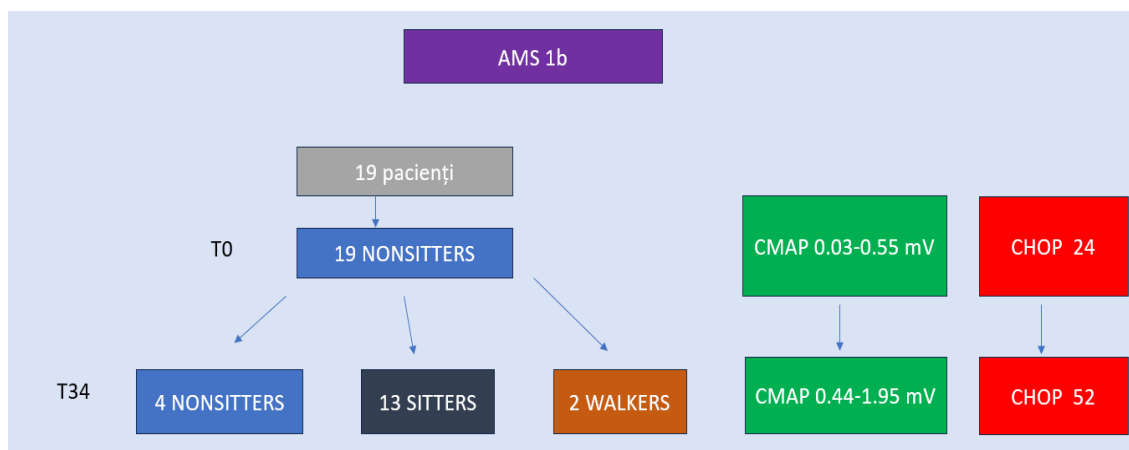
Vârsta precoce a pacientului la inițierea tratamentului are o influență favorabilă asupra evoluției bolii. Astfel, s-a constatat o corelație puternic negativă între vârsta la inițierea tratamentului și evoluția pe scala motorie, pentru ambele tipuri de AMS (tip 1: $p < 0,0001$ și $r = -0,726$; tip 2: $p < 0,001$ și $r = -0,553$). Amplitudinea distală a CMAP la evaluarea inițială (T0) s-a dovedit a fi corelată semnificativ cu evoluția parametrilor motori ($p < 0,001$ și $r = 0,600$).

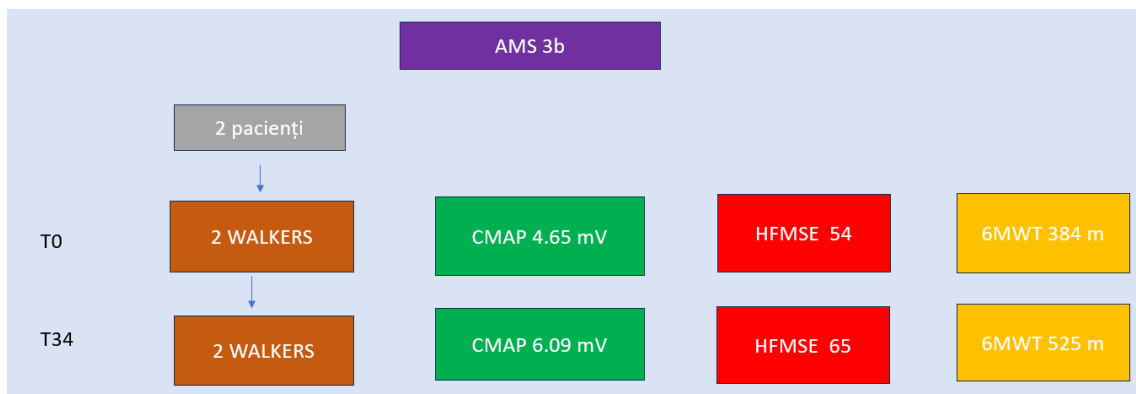
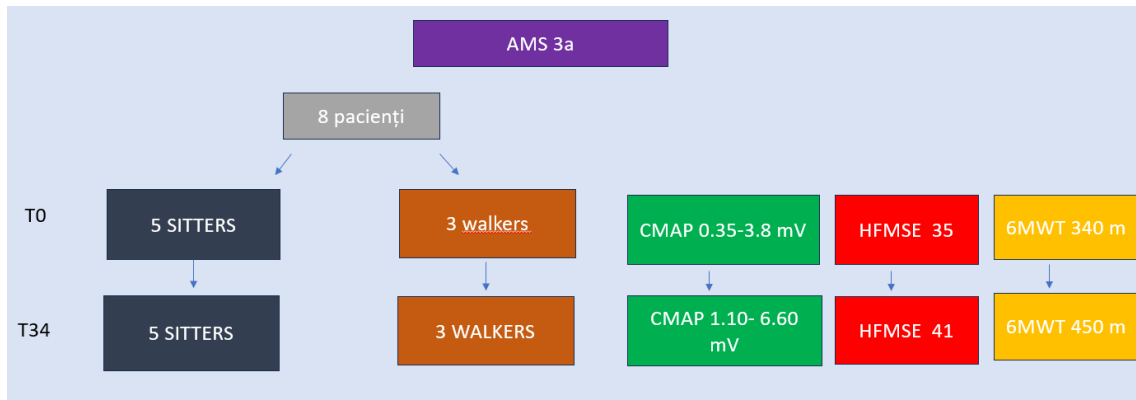
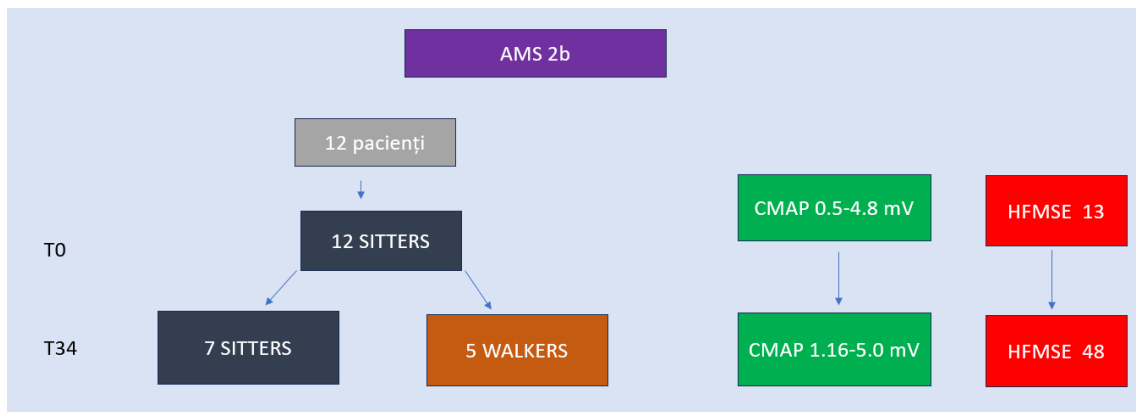
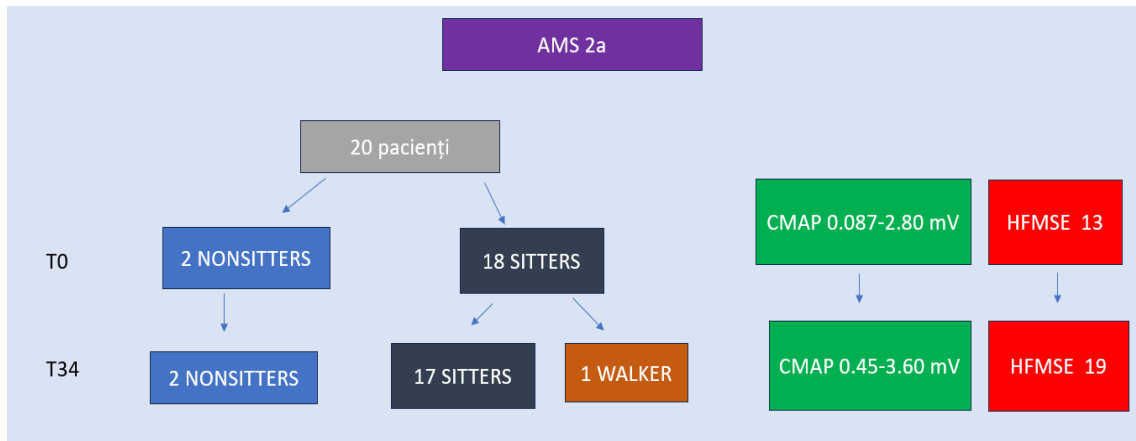
Rezultatele studiului au arătat importanța diagnosticării precoce și a inițierii prompte a tratamentului cu ASO pentru copiii cu AMS tip 1 și 2 în vederea maximizării rezultatelor clinice și pentru a recupera cât mai mult din regresul motor deja instalat. Este important de subliniat rolul kinetoterapiei alături de tratamentul medicamentos, acesta având un rol esențial în recuperarea și gestionarea pacienților cu AMS, ar trebui considerat ca parte a planului general de tratament. De asemenea s-a demonstrat că potențialul de acțiune motor

compus este un factor predictiv în evoluția bolii, util în practica medicală pentru a surprinde regresul motor înainte de apariția primelor semne clinice.

Studiul final a prezentat datele finale, electrofiziologice și clinice pe întreg lotul de pacienți pediatrici (N=72) cu AMS tip 1, 2 și 3 tratați cu nusinersen, după 3 ani de monitorizare. Am analizat întreg lotul de pacienți, toți confirmați genetic cu mutație bialelică în gena SMN1 (69 cu deleție homozigotă și 2 heterozigot compus). 71 pacienți au fost simptomatici la inițierea tratamentului și un pacient a fost presimptomatic (diagnosticat antenatal și confirmat prin test MLPA perinatal). Obiectivul principal a fost cercetarea evoluției electrofiziologice și clinice într-un lot reprezentativ de pacienți pediatrici AMS 5q (tip 1, 2 și 3) pe parcursul a 3 ani de tratament cu nusinersen prin *compararea datelor inițiale și finale*. Lotul întreg de pacienți a fost recrutat în perioada octombrie 2018 - mai 2020 și monitorizat timp de 3 ani din punct de vedere al evoluției clinice și electrofiziologice sub tratament cu nusinersen.

Rezultatele pe scalele motorii și electrofiziologice în funcție de subtipul AMS sunt prezentate în figurile de mai jos





Evoluția electrofiziologică (amplitudinea distală a CMAP) de la T0 la T34, în funcție de numărul de copii SMN2- în lotul de pacienți cu 2 copii SMN2 (N= 32) creșterea medie a CMAP a fost cu 0.93 mV, în lotul de pacienți cu 3 copii SMN2 creșterea amplitudinii CMAP a fost cu 0.77 mV, pe când la cei cu 4 copii SMN2 nivelul obținut la finalul studiului nu a fost semnificativ mai mare față de inițierea tratamentului 0.70 mV.

Centru de referință național în recuperarea neuromotorie pediatrică, Centrul Național de Recuperare Neuropsihomotorie pentru Copii „Dr Nicolae Robanescu”, unde această afecțiune era bine cunoscută și tratată anterior convențional aplicând standardele de îngrijire, a fost primul spital din România în care s-a inițiat tratamentul cu nusinersen în octombrie 2018. Adresabilitatea mare, numărul important de pacienți recrutați a făcut posibilă inițierea acestui studiu în premieră în România.

Pacienții au fost recrutați în perioada octombrie 2018- mai 2020, iar ultimele evaluări din studiu au fost efectuate în mai 2023. Au fost publicate datele preliminariei prin studii de etapă prezentate anterior (studiile 1-4).

Dintr-un total de **39 pacienți** cu tipul 1 doar 8 pacienți au ramas în același nivel motor („nonsitters”), restul **31** au obținut și păstrat **noi achiziții motorii semnificative**, 2 ajungând la mers autonom. Toți pacienții din acest grup au supraviețuit, nu s-a înregistrat nici un regres motor. Toți au îmbunătățit funcția bulbară, o parte dintre ei necesitând ventilație noninvazivă pe mască doar pe parcursul nopții. Pentru întreg lotul de pacienți cu AMS tip 1 au existat corelații puternic pozitive cu semnificație statistică între rezultatele inițiale și finale electrofiziologice CHOP (T34) și CMAP (T34), între randamentul pe scala CHOP și CMAP (T0), dar și corelații puternic negative între *vârsta de inițiere a tratamentului* și *CHOP(T34)/CMAP(T34)*, aceste date demonstrând că parametri de evoluție motorie și electrofiziologică au fost concordanți pe parcursul perioadei de monitorizare, dar și că răspunsul motor depinde de inițierea precoce a tratamentului.

Lotul AMS tip 2 a fost cel mai heterogen având 32 pacienți, cu debutul simptomatologiei în această formă este între 6-18 luni după ce copilul a achiziționat poziția sezândă. În evoluție, formele severe prezintă regres motor relativ rapid, cu pierderea acestei abilități motorii devenind „nonsitters” (subtipul 2a). Forma mai stabilă, cu evoluție mai lentă (subtipul 2b), poate conserva poziția sezândă ani de zile, dar din cauza hipotoniei axiale, pacientul dezvoltă forme severe, progresive de scolioză care necesită intervenție chirurgicală înainte de 10 ani. Din subtipul 2a din cei 18 pacienți “sitters” 1 a devenit ambulant, iar în forma 2b dintre cei 12 pacienți “sitters” 7 au devenit “walkers”, existând corelații cu semnificație statistică între parametri electrofiziologici și motori.

Cei 10 pacienți cu AMS tip 3, lot relativ omogen, 8 pacienți în subtipul 3a și 2 pacienți în subtipul 3b, toți au rămas la același nivel motor, nu au regresat, iar cei care au fost inițial ambulanți, și-au îmbunătățit echilibrul și anduranța în mers (distanța parcursă autonom), având o creștere pe scala 6MWT de 30-40%.

În ce privește raportarea rezultatelor obținute la evoluția naturală a bolii, datele din literatură prezintă loturi de pacienți reținuți cu AMS fără tratament în cadrul studiilor clinice ce au precedat aprobarea nusinersen (înainte de 2018). În funcție de tipul AMS, evoluția acestor pacienți netratați a fost rapid progresivă, cu declin motor semnificativ în formele precoce, spre deces (tipul 1) până la vârsta de 18-24 luni, sau pierderea abilităților motorii câștigate anterior în formele tardive. Față de aceasta evoluție, introducerea tratamentului modulator de boală a schimbat major parcursul acestor pacienți, creând fenotipuri noi de boală. Deși nu este curativ, totuși administrarea precoce, înainte de instalarea regresului motor (indiferent de tipul bolii) a creat premisele unei dezvoltări normale și creșterii speranței pentru autonomie.

Pacientul presimptomatic, diagnosticat antenatal și confirmat imediat după naștere (sora unui pacient cu tipul 2a), a avut valori ale CMAP și CHOP normale la debut, fără afectare motorie, tratamentul cu nusinersen s-a inițiat la 2 săptămâni de viață, iar în cursul celor trei ani de monitorizare toți parametri motori și electrofiziologici s-au menținut normali, fără regres. Dezvoltarea motorie și cognitivă a fost în limite normale.

Pe parcursul studiului nu am întâmpinat incidente deosebite, toate examinările au decurs corespunzător. Lotul de pacienți a fost heterogen, cu grupe foarte diferite de vârstă și cu evoluție motorie/regres anterior inițierii tratamentului, care a variat de la câteva săptămâni până la ani, acest aspect reflectându-se în răspunsul la tratament.

Concluzii

Introducerea tratamentului cu nusinersen a schimbat paradigma asupra evoluției acestei afecțiuni neurodegenerative. Monitorizarea parametrilor funcționali și electrofiziologici a unui lot de 72 pacienți pe durata a 3 ani a confirmat faptul că eficacitatea tratamentului a fost incontestabilă. Deși în lot au fost 45% AMS tip 1, nu s-a înregistrat nici un deces, 21/29 pacienți au făcut progrese motorii, nici un regres semnificativ. În tipul 2 - 6/32 pacienți au devenit ambulanți, iar în tipul 3 cei ambulanți au păstrat mersul și crescut anduranța, fără regres.

Am demonstrat cât de important este momentul introducerii tratamentului, adică înaintea instalării regresului motor, aspect corelat cu valoarea inițială a CMAP și scorul funcțional. Acești 2 parametri corelați între ei s-au dovedit factori predictivi în evoluția

ulterioară sub tratament. Chiar dacă diagnosticul de AMS este unul genetic, evaluarea electrofiziologică a demonstrat că CMAP poate fi un parametru util, un factor predictiv important în stabilirea prognosticului, mai sensibil decât evaluarea pe scale funcționale sau evaluarea clinică. Astfel, o scădere ușoară a CMAP poate însemna debutul regresului motor, iar inițierea tratamentului pornind de la o valoare scăzută a CMAP poate fi un factor de prognostic negativ în ce privește evoluția bolii.

Urmărirea unui pacient tratat presimptomatic și constatarea faptului ca evoluția acestuia s-a menținut în limite normale, față de fratele său diagnosticat și tratat tardiv, care a făcut progrese minime care nu-i permit autonomia, deschide noi perspective în a crea premisele implementării screeningului neonatal pentru atrofia musculară spinală în România.

Bibliografie

1. Jones C, Oskoui M, Zielinski D, Vinikoor L, Farwell W. PP09. 1–2352: Systematic review of incidence and prevalence of spinal muscular atrophy (SMA). *Eur J Paediatr Neurol*. 2015;19:S64–5.
2. Mercuri E, Finkel RS, Muntoni F, Wirth B, Montes J, Main M, et al. Diagnosis and management of spinal muscular atrophy: Part 1: Recommendations for diagnosis, rehabilitation, orthopedic and nutritional care. *Neuromuscul Disord*. 2018;28(2):103–15.
3. Finkel RS, Mercuri E, Meyer OH, Simonds AK, Schroth MK, Graham RJ, et al. Diagnosis and management of spinal muscular atrophy: Part 2: Pulmonary and acute care; medications, supplements and immunizations; other organ systems; and ethics. *Neuromuscul Disord* [Internet]. 2018;28(3):197–207. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2017.11.004>
4. Eggermann K, Gläser D, Abicht A, Wirth B. Spinal muscular atrophy (5qSMA): best practice of diagnostics, newborn screening and therapy. *Medizinische Genet*. 2020;32(3):263–72.
5. Brzustowicz LM, Lehner T, Castilla LH, Penchaszadeh GK, Wilhelmsen KC, Daniels R, et al. Genetic mapping of chronic childhood-onset spinal muscular atrophy to chromosome 5q1 1.2–13.3. *Nature*. 1990;344(6266):540–1.
6. Darras BT, Jones Jr HR, Ryan MM, Darryl C. *Neuromuscular disorders of infancy, childhood, and adolescence: a clinician's approach*. Elsevier; 2014.
7. Lefebvre S, Bürglen L, Reboullet S, Clermont O, Burlet P, Viollet L, et al.

- Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell*. 1995;80(1):155–65.
8. Coover DD, Le TT, McAndrew PE, Strasswimmer J, Crawford TO, Mendell JR, et al. The survival motor neuron protein in spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet*. 1997;6(8):1205–14.
 9. Ogino S, Wilson RB. Spinal muscular atrophy: molecular genetics and diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn*. 2004;4(1):15–29.
 10. Washington University, St. Louis MU. Neuromuscular Disease Center [Internet]. [cited 2023 Dec 11]. Available from: <https://neuromuscular.wustl.edu>
 11. 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*. 1999;96(11):6307–11.
 12. Burghes AH. When is a deletion not a deletion? When it is converted. *Am J Hum Genet*. 1997;61(1):9.
 13. Wirth B. An update of the mutation spectrum of the survival motor neuron gene (SMN1) in autosomal recessive spinal muscular atrophy (SMA). *Hum Mutat*. 2000;15(3):228–37.
 14. Arnold WD, Kassar D, Kissel JT. Spinal muscular atrophy: Diagnosis and management in a new therapeutic era. *Muscle and Nerve*. 2015;51(2):157–67.
 15. Rudnik-Schöneborn S, Zerres K, Ignatius J, Rietschel M. Pregnancy and spinal muscular atrophy. *J Neurol*. 1992;239:26–30.
 16. Dubowitz V. Chaos in the classification of SMA: a possible resolution. *Neuromuscul Disord*. 1995;5(1):3–5.
 17. Glanzman AM, Mazzone E, Main M, Pelliccioni M, Wood J, Swoboda KJ, et al. The Children’s Hospital of Philadelphia Infant Test of Neuromuscular Disorders (CHOP INTEND): Test development and reliability The CHOP INTEND is a reliable measure of motor skills in patients with SMA-I and neuromuscular disorders presenting in infancy. *Neuromuscul Disord*. 2010;20(3):155–61.
 18. 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*. 2011;23(4):322–6.
 19. 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*. 2007;17(9–10):693–7.

20. 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*. 2011;26(12):1499–507.
21. Montes J, McDermott MP, Martens WB, Dunaway S, Glanzman AM, Riley S, et al. Six-Minute Walk Test demonstrates motor fatigue in spinal muscular atrophy. *Neurology*. 2010;74(10):833–8.
22. Dunaway Young S, Montes J, Kramer SS, Marra J, Salazar R, Cruz R, et al. Six-minute walk test is reliable and valid in spinal muscular atrophy. *Muscle Nerve*. 2016;54(5):836–42.
23. Govoni A, Ricci G, Maggi L, Meneri M, Bonanno S, Bello L, et al. 6MWT as measure of motor function and endurance in SMA type 3 patients treated with nusinersen. *J Neurol Sci*. 2021;429.
24. Arnold WD, Flanigan KM. A practical approach to molecular diagnostic testing in neuromuscular diseases. *Phys Med Rehabil Clin*. 2012;23(3):589–608.
25. Prior TW. Perspectives and diagnostic considerations in spinal muscular atrophy. *Genet Med*. 2010;12(3):145–52.
26. Finkel RS, McDermott MP, Kaufmann P, Darras BT, Chung WK, Sproule DM, et al. Observational study of spinal muscular atrophy type I and implications for clinical trials. *Neurology*. 2014;83(9):810–7.
27. 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*. 2016;3(2):132–45.
28. De Sanctis R, Pane M, Coratti G, Palermo C, Leone D, Pera MC, et al. Clinical phenotypes and trajectories of disease progression in type 1 spinal muscular atrophy. *Neuromuscul Disord*. 2018;28(1):24–8.
29. Summary of Product INN Nusinersen [Internet]. [cited 2021 May 17]. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/spinraza-epar-product-information_en.pdf
30. AHFS Approved Spinraza [Internet]. [cited 2021 May 17]. Available from: <https://www.ahfsdruginformation.com/spinraza-nusinersen-approved>
31. EMA Nusinersen Approved [Internet]. [cited 2021 May 17]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/orphan-designations/eu-3-12-976>
32. Hjartarson HT, Nathorst-Böös K, Sejersen T. Disease modifying therapies for the management of children with spinal muscular atrophy (5q SMA): an update on the

- emerging evidence. *Drug Des Devel Ther.* 2023;1865–83
33. Cartegni L, Krainer AR. Disruption of an SF2/ASF-dependent exonic splicing enhancer in SMN2 causes spinal muscular atrophy in the absence of SMN1. *Nat Genet.* 2002;30(4):377–84.
 34. Chiriboga CA, Swoboda KJ, Darras BT, Iannaccone ST, Montes J, De Vivo DC, et al. Results from a phase 1 study of nusinersen (ISIS-SMNRx) in children with spinal muscular atrophy. *Neurology.* 2016;86(10):890–7.
 35. Meylemans A, De Bleecker J. Current evidence for treatment with nusinersen for spinal muscular atrophy: a systematic review. *Acta Neurol Belg.* 2019;119:523–33.
 36. Hoy SM. Nusinersen: first global approval. *Drugs.* 2017;77:473–9.
 37. Geary RS, Yu RZ, Levin AA. Pharmacokinetics of phosphorothioate antisense oligodeoxynucleotides. *Curr Opin Investig drugs (London, Engl 2000).* 2001;2(4):562–73.
 38. Healthcare Information SAFETY-NUSINERSEN [Internet]. [cited 2021 May 17]. Available from: https://www.spinraza.com/en_us/home/taking-spinraza/dosing.html
 39. Biogen. Intrathecal administration with SPINRAZA® (nusinersen) [Internet]. [cited 2021 May 17]. Available from: https://www.spinraza.com/content/dam/commercial/spinraza/caregiver/en_us/pdf/spz-us-0603-intrathecal-discussion-tool.pdf
 40. Figueiredo M. Motor Function Improved after Spinraza [Internet]. [cited 2021 May 17]. Available from: <https://smanewstoday.com/2020/06/24/spinrazaimproves-motor-function-after-1-year-children-sma-type-1-2-real-life-study-france/>
 41. SMA NEWS TODAY-SPINRAZA [Internet]. [cited 2021 May 17]. Available from: <https://smanewstoday.com/spinraza-nusinersen>
 42. Szabó L, Gergely A, Jakus R, Fogarasi A, Grosz Z, Molnár MJ, et al. Efficacy of nusinersen in type 1, 2 and 3 spinal muscular atrophy: real world data from Hungarian patients. *Eur J Paediatr Neurol.* 2020;27:37–42. Pechmann A, Langer T, Wider S, Kirschner J. Single-center experience with intrathecal administration of Nusinersen in children with spinal muscular atrophy type 1. *Eur J Paediatr Neurol.* 2018;22(1):122–7.
 43. Figueiredo M. Spinraza (Nusinersen) [Internet]. BioNews. SMA News Today. Available from: <https://smanewstoday.com/spinraza-nusinersen/>
 44. LoMauro A, Mastella C, Alberti K, Masson R, Aliverti A, Baranello G. Effect of nusinersen on respiratory muscle function in different subtypes of type 1 spinal

- muscular atrophy. *Am J Respir Crit Care Med*. 2019;200(12):1547–50.
45. Darras BT, Farrar MA, Mercuri E, Finkel RS, Foster R, Hughes SG, et al. An Integrated Safety Analysis of Infants and Children with Symptomatic Spinal Muscular Atrophy (SMA) Treated with Nusinersen in Seven Clinical Trials. *CNS Drugs* [Internet]. 2019;33(9):919–32. Available from: <https://doi.org/10.1007/s40263-019-00656-w>
 46. Charles River Associates. Assessing the policy and access environment across European countries for SMA patients. 2021.
 47. Theuriet J, Fernandez-Eulate G, Latour P, Stojkovic T, Masingue M, Vidoni L, et al. Genetic characterization of non-5q proximal spinal muscular atrophy in a French cohort: the place of whole exome sequencing. *Eur J Hum Genet*. 2023;1–7.
 48. New data at cure SMA 2021 highlight the long-term efficacy of SPINRAZA® (nusinersen) and Biogen’s commitment to innovation in SMA therapy [Internet]. 2021 [cited 2022 Jun 9]. Available from: <https://investors.biogen.com/news-releases/news-release-details/new-data-cure-sma-2021-highlight-long-term-efficacy-spinraza>
 49. Lewelt A, Krosschell KJ, Scott C, Sakonju A, Kissel JT, Crawford TO, et al. Compound muscle action potential and motor function in children with spinal muscular atrophy. *Muscle and Nerve*. 2010;42(5):703–8.
 50. Weng W-C, Hsu Y-K, Chang F-M, Lin C-Y, Hwu W-L, Lee W-T, et al. CMAP changes upon symptom onset and during treatment in spinal muscular atrophy patients: lessons learned from newborn screening. *Genet Med*. 2021;23(2):415–20.
 51. Axente M, Sporea C, Grigoriu A, Mirea A, Leanca MC, Marinescu GI, et al. Clinical and Electrophysiological Aspects in Children with Spinal Muscular Atrophy Type 1, 2 and 3 before Treatment. *J Neurophysiol Neurol Disord* [Internet]. 2021;9(1). Available from: <https://j scholaronline.org/articles/JNND/Clinical-and-Electrophysiological-Aspects.pdf>
 52. Axente M, Shelby E-S, Mirea A, Sporea C, Badina M, Padure L, et al. Clinical features and genetics in non-5q spinal muscular atrophy caused by acid ceramidase deficiency. *J Med Life*. 2021;14(3):424.
 53. 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*. 2022;14(10):2074.
 54. Axente M, Sporea C, Mirea A, Burcea C-C, Ion DA. Time-Efficacy in SMA Type 1

- and 2 Cases Treated with Nusinersen. *Balneo PRM Res J.* 2023;14(2).
55. 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.* 2021;8:2329048X211008725.
 56. Ryan CS, Conlee EM, Sharma R, Sorenson EJ, Boon AJ, Laughlin RS. Nerve conduction normal values for electrodiagnosis in pediatric patients. *Muscle Nerve.* 2019;60(2):155–60.
 57. McDonald CM. *Electrodiagnosis in pediatrics. Pediatr Rehabil Princ Pract Fifth edn Demos Med Publ New York.* 2015;113–52.
 58. Kolb SJ, Ph D, Coffey CS, Ph D, Yankey JW, Ph D, et al. Natural History of Infantile-Onset Spinal Muscular Atrophy. *Ann Neurol.* 2017;82(6):883–91
 59. 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.
 60. Lewelt A, Krossschell KJ, Scott C, Sakonju A, Kissel JT, Crawford TO, et al. Compound muscle action potential and motor function in children with spinal muscular atrophy. *Muscle and Nerve.* 2010;42(5):703–8
 61. Arnold WD, Porensky PN, McGovern VL, Iyer CC, Duque S, Li X, et al. Electrophysiological biomarkers in spinal muscular atrophy: proof of concept. *Ann Clin Transl Neurol.* 2014;1(1):34.
 62. Axente M. Clinical and Electrophysiological Aspects in Children with Spinal Muscular Atrophy Type 1, 2 and 3 before Treatment. *Jnnnd.* 2021;9(1).
 63. Kolb SJ, Kissel JT. Spinal muscular atrophy. *Neurol Clin.* 2015;33(4):831–46.
 64. Peeters K, Chamova T, Jordanova A. Clinical and genetic diversity of SMN1-negative proximal spinal muscular atrophies. *Brain.* 2014;137(11):2879–96.
 65. N-acylsphingosine amidohydrolase 1; *ASAH1.*
 66. Filosto M, Aureli M, Castellotti B, Rinaldi F, Schiumarini D, Valsecchi M, et al. *ASAH1* variant causing a mild SMA phenotype with no myoclonic epilepsy: a clinical, biochemical and molecular study. *Eur J Hum Genet.* 2016;24(11):1578–83.
 67. Li C-M, Park J-H, He X, Levy B, Chen F, Arai K, et al. The human acid ceramidase gene (*ASAH*): structure, chromosomal location, mutation analysis, and expression. *Genomics.* 1999;62(2):223–31.
 68. Bernardo K, Hurwitz R, Zenk T, Desnick RJ, Ferlinz K, Schuchman EH, et al. Purification, characterization, and biosynthesis of human acid ceramidase. *J Biol*

- Chem. 1995;270(19):11098–102.
69. Park J-H, Schuchman EH. Acid ceramidase and human disease. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Biomembranes*. 2006;1758(12):2133–8.
 70. Frohbergh M, He X, Schuchman EH. The molecular medicine of acid ceramidase. *Biol Chem*. 2015;396(6–7):759–65.
 71. Dymont DA, Bennett SAL, Medin JA, Levade T. *ASAH1-related disorders*. 2018;
 72. Dubowitz V. *Sixty years of spinal muscular atrophy: A personal odyssey*. Sumner CJ, Paushkin S Ko C *Spinal Muscular Atrophy Dis Mech Ther* pp xvii-xxi. 2016