

ARTIGO ORIGINAL

Atrofia muscular espinhal: caracterização clínica e genética de uma população pediátrica como prelúdio de uma nova abordagem farmacológica

Spinal Muscle Atrophy: clinical and genetic characterization of a pediatric population as prelude of a new pharmacology approach

Ana Brás^{1,2}, Filipe Palavra^{2,3}, Henriqueta Araújo⁴, Vera Ribeiro⁴, Isabel Fineza²

1-Serviço de Neurologia, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, Coimbra, Portugal

2-Centro de Desenvolvimento da Criança – Neuropediatria, Hospital Pediátrico, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, Coimbra, Portugal

3-Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal

4-Centro de Desenvolvimento da Criança – Terapia Ocupacional, Hospital Pediátrico, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, Coimbra, Portugal

Informações sobre o artigo:

Artigo Original, publicado em Sinapse, Volume 18, Número 2, Novembro de 2018. Versão eletrónica em www.sinapse.pt
© 2018 Sociedade Portuguesa de Neurologia. Todos os direitos reservados.

Palavras-chave:

atrofia muscular espinhal
SMN1
SMN2
Nusinersen

Key-words:

spinal muscle atrophy
SMN1
SMN2
Nusinersen

Correspondência com o autor:

Ana Brás
Serviço de Neurologia
Hospitais da Universidade de Coimbra
Centro Hospitalar e
Universitário de Coimbra
Praceta Mota Pinto
3000-075 Coimbra
acatbras4@hotmail.com

Resumo

Introdução: A atrofia muscular espinhal (AME) é uma doença neuromuscular caracterizada pela degeneração progressiva dos neurónios motores no corno anterior da medula espinhal provocada por uma mutação do gene *Survival Motor Neuron 1* (SMN1). A pseudocópia do gene SMN1, o gene SMN2, é um biomarcador da gravidade da doença. A eficácia do novo tratamento aprovado (Nusinersen) depende do número de cópias do gene SMN2.

Objetivo: Caracterizar clínica e geneticamente os doentes com diagnóstico de AME em seguimento na consulta de Doenças Neuromusculares do Centro de Desenvolvimento da Criança e apresentar os resultados iniciais das crianças sob tratamento com Nusinersen.

Metodologia: Estudo descritivo e retrospectivo, com análise de dados demográficos, clínicos, avaliação objetiva, complicações, exames complementares de diagnóstico e dados genéticos de crianças com diagnóstico de AME.

Resultados: Foram identificados 33 doentes, dos quais 17 ainda se encontram vivos (10 do sexo masculino). De entre estes doentes, 17.6% (n=3) eram do tipo 1, 47% (n=8) do tipo 2 e 35.3% (n=6) do tipo 3. Apenas 2 doentes AME tipo 1 com 2 cópias do gene SMN2 iniciaram tratamento com Nusinersen. Estes doentes apresentaram uma boa evolução da resposta motora: 1º doente de 17 meses, score CHOP-INTEND inicial 41/64 (aos 3 meses), 43/64 após 6 meses e 45/64 após 14 meses; 2º doente de 7 meses, score CHOP-INTEND inicial 29/64 (no primeiro mês) e 32/64 após 6 meses.

Conclusão: A idade da primeira manifestação, a forma de apresentação, idade de aquisição de competências motoras e padrão de fraqueza muscular na análise de subgrupos foi congruente com as descrições clínicas da literatura. As deleções que envolvem os exões 7 e 8 foram as mais frequentes. Dois doentes AME 1 apresentaram mutações pontuais. Os resultados preliminares do tratamento com Nusinersen parecem ser promissores.

Abstract

Introduction: Spinal muscular atrophy (SMA) is a genetical neuromuscular disease characterized by progressive degeneration of motor neurons in the anterior horn of the spinal cord caused by a mutation in the *Survival Motor Neuron 1* (SMN1) gene. The pseudocopy of the SMN1 gene, the SMN2 gene is a biomarker of disease severity. The efficacy of the new treatment approved (Nusinersen) will depend on the number

of copies of the SMN2 gene.

Objective: To characterize (clinically and genetically) patients diagnosed with SMA at follow-up in the Neuromuscular Diseases consultation of the Child Development Centre and to present the initial results of children under treatment with Nusinersen.

Methodology: This is a descriptive and retrospective study focusing on demographic and clinical data, objective evaluation, complications and complementary diagnostic tests performed (including molecular data) to children with SMA.

Results: A total of 33 patients were enrolled, 17 alive (10 males). Of all living patients, 17.6% (n = 3) were type 1, 47% (n = 8) type 2 and 35.3% (n = 6) type 3. Only 2 patients with SMA type 1 and 2 copies of the SMN2 gene started treatment with Nusinersen. These patients had a good evolution of the motor milestones: in the first 17-months-patient, the initial CHOP-INTEND score was 41/64 (at 3 months), 43/64 after 6 months and 45/64 after 14 months; in the second 7-months-patient, the initial CHOP-INTEND score was 29/64 (at month 1) and 32/64 after 6 months.

Conclusion: The age of first manifestations, presentation symptom, age of achievement of motor milestones and pattern of muscle weakness in all subgroup analyses were congruent with the clinical descriptions of the literature. The deletions involving exons 7 and 8 were the most frequent mutations. Two SMA type 1 patients had point mutations. Preliminary results with Nusinersen treatment seem to be promising.

Introdução

A atrofia muscular espinhal (AME) foi descrita pela primeira vez por Werdnig e Hoffmann, no final do século XIX. Trata-se de uma doença neurodegenerativa rara, caracterizada pela degenerescência progressiva do motoneurónio alfa localizado no corno anterior da substância cinzenta da medula espinhal, condicionando atrofia e fraqueza muscular generalizada.^{(1),(2)} Classicamente, os diferentes tipos de AME encontram-se divididos consoante a idade de início e idade de aquisição de competências motoras (desde o tipo 0 ao 4), sendo amplo o espectro clínico, desde a morte nas primeiras semanas de vida até à fraqueza muscular ligeira, com sobrevida até à idade adulta.⁽³⁾

A AME resulta de um defeito genético no gene *SMN* (*Survival Motor Neuron*) localizado ao nível do braço longo do cromossoma 5 (5q13).⁽⁴⁾ Aproximadamente 95% dos casos ocorrem por deleção homocigótica dos exões 7 e 8 no gene *SMN1*, condicionando a formação de uma proteína truncada e não funcional.^{(5),(6)} Os restantes casos ocorrem por deleção isolada do exão 7 ou mutações pontuais nestas regiões em heterocigotia composta com deleção do outro alelo.⁽⁷⁾ A ausência da proteína SMN é incompatível com a vida, sendo essencial para o desenvolvimento, em fases muito precoces da vida. Por este motivo, existe uma pseudocópia do gene *SMN1* com lo-

calização centromérica no braço longo do cromossoma 5, o gene *SMN2*. Este gene tem um papel crucial quando se consideram as novas abordagens terapêuticas para a AME. O gene *SMN2* difere do gene *SMN1* em 5 nucleótidos na localização 3'.⁽⁸⁾ A substituição de uma citosina por timina (c.840C>T) resulta num *splicing* alternativo do pré-RNA mensageiro com exclusão, em cerca de 85% dos casos, do exão 7.⁽⁹⁾ Devido a este *splicing* alternativo, o gene *SMN2* produz uma quantidade importante de proteína truncada; contudo, em cerca de 15% dos casos, o *splicing* alternativo permite a inclusão do exão 7, levando à formação de uma proteína funcional.

Existe ainda a duplicação de outros genes (ex. genes *NAIP*, *SERF1* e *GTF2H2*) que foram recentemente identificados e que provavelmente podem estar implicados na doença, funcionando como moduladores fenotípicos.^{(10),(11),(12)}

A dinâmica de funcionamento do gene *SMN2* permite afirmar que o principal fator de influência na gravidade do fenótipo é o número de cópias deste gene, correlacionando-se com a idade de início, gravidade e subtipo de AME. Os doentes com AME tipo 0 têm uma cópia do gene *SMN2*, os doentes com AME tipo 1 apresentam duas cópias, os doentes com AME tipo 2 apresentam três cópias e os doentes com AME tipo 3 apresentam três ou quatro cópias do gene *SMN2*.⁽¹³⁾

Estudos indicam que existe uma relação inversamente proporcional entre o número de cópias SMN2 e a gravidade da doença.⁽¹⁴⁾

Após amplos anos de investigação^{(15),(16)} e com os resultados do estudo ENDEAR⁽¹⁷⁾ (para doentes com AME tipo I), surgiu um tratamento promissor para a doença, o Nusinersen (Spinraza®, Biogen). Trata-se de um oligonucleótido antissense que modifica o *splicing* do pré-RNA mensageiro do gene SMN2 por bloquear a região NI silenciadora do intrão 7, promovendo a inclusão do exão 7 na transcrição génica e o aumento da produção da proteína SMN. O estudo ENDEAR mostrou uma melhoria estatisticamente significativa nas aquisições motoras avaliadas pelo Exame Neurológico de Hammersmith Infância parte 2 (HINE-2) (41% de melhoria no grupo de doentes tratados vs. 0% no grupo placebo), na escala The Children's Hospital of Philadelphia Infant Test of Neuromuscular Disorders (CHOP-INTEND) (≥ 4 pontos, 71% no grupo de doentes tratados vs. 3% no grupo controlo) e na necessidade de ventilação permanente (39% no grupo de doentes tratados vs. 68% no grupo controlo).⁽¹⁷⁾

O nusinersen é disponibilizado em solução (de 12 mg por 5 ml) para administração intratecal aos 0, 14, 28 e 63 dias, mantendo-se posteriormente com administrações a cada 4 meses. Apresenta um bom perfil de segurança e é bem tolerado, sendo os principais efeitos secundários (reportados até ao momento na literatura) relacionados com o procedimento da punção lombar.

A possibilidade de usar este novo tratamento nesta doença rara veio necessariamente provocar uma mudança radical na respetiva abordagem terapêutica, esperando-se uma modificação profunda da história natural da AME. Este estudo pretende caracterizar clínica e geneticamente os doentes com diagnóstico de AME do Centro de Desenvolvimento da Criança do Hospital Pediátrico de Coimbra e revelar os resultados iniciais dos doentes sob tratamento com Nusinersen.

Metodologia

Estudo descritivo e retrospectivo de doentes com o diagnóstico clínico e/ou genético de AME prévia ou atualmente seguidos em consulta de Doenças Neuromusculares no Centro de Desenvolvimento da Criança do Hospital Pediátrico de Coimbra. O estudo baseou-se na análise dos processos clínicos dos doentes. Avaliaram-se parâmetros demográficos, clínicos (idade e sintoma

de apresentação, existência de controlo cefálico e do tronco, idade de aquisição e perda de marcha, idade de diagnóstico, forma clínica de AME), história familiar, avaliação objetiva (com análise do padrão de fraqueza muscular, disfagia, disartria, presença de fasciculações da língua, contracturas e escoliose), necessidade de ventilação não-invasiva (VNI) permanente e de gastrostomia, resultados de exames complementares de diagnóstico (valores de actividade de creatina cinase [CK] sérica, dados de electromiograma [EMG] e de biópsia muscular) e resultados da análise molecular.

Os doentes foram divididos consoante o tipo clínico de AME, segundo os *Criteria of the International SMA Consortium*.⁽³⁾ Por último, realizou-se a descrição da evolução clínica dos doentes sob tratamento com Nusinersen com a aplicação da escala CHOP-INTEND na avaliação da resposta motora. Salienta-se que a prescrição do medicamento foi realizada somente a doentes com AME tipo I, à luz do Programa de Acesso Precoce (PAP) que permitiu a rápida entrada do fármaco em Portugal, para doentes com a forma mais grave da doença.

Resultados

Foram identificados 33 doentes, dos quais 17 ainda se encontram vivos. Dos doentes já falecidos ($n=16$), 87.5% ($n=14$) eram do tipo I, com mediana de idade de óbito de 23 meses. A análise descritiva recaiu sobre os 17 doentes ainda vivos (Tabela I), 10 do sexo masculino e 7 do sexo feminino, com idades compreendidas entre os 7 meses e 40 anos. De todos os doentes, 17.6% ($n=3$) eram do tipo I, 47% ($n=8$) do tipo 2 e 35.3% ($n=6$) do tipo 3.

A idade de apresentação foi consideravelmente inferior no grupo de doentes do tipo I, tal como seria de esperar, pelas características biológicas da doença. Todos os doentes do tipo I não adquiriram controlo cefálico ou outra competência motora na idade esperada. Dos doentes do tipo 2, 75% tinham controlo cefálico e apenas 50% apresentaram capacidade para ortostatismo. Apesar do início tardio da marcha em todos os doentes do tipo 3, apenas 2 conseguem marcha com apoio à data do presente estudo.

No que diz respeito à avaliação objetiva (Tabela II), o padrão mais frequente de fraqueza muscular nos doentes do tipo I foi a tetraplegia, nos doentes dos tipos 2 e 3 foi a tetraparésia proximal de predomínio nos membros inferiores. Apenas 2 doentes com AME tipo I e I

Tabela I. Caracterização clínica dos doentes, divididos por diferentes tipos de AME.

TIPO AME	Idade atual méd.	Idade de apresentação méd. (meses)	Apresentação clínica (mais comum)	Aquisição da marcha méd. (meses)	Controlo cefálico (%)	Idade de perda de capacidade de marcha méd. (meses)	História familiar
TIPO 1 (n=3)	13 meses	2.3	Hipotonia generalizada	Sem marcha	-	-	-
TIPO 2 (n=8)	20.3 anos	8.4	Fraqueza muscular membros inferiores	11 (4 doentes não adquiriram marcha)	75	13	-
TIPO 3 (n=6)	26 anos	18.8	Início tardio da marcha	18	100	105 (2 doentes têm marcha com apoio)	-

Tabela II. Caracterização clínica dos doentes, divididos por diferentes tipos de AME.

TIPO AME	Padrão mais frequente de fraqueza muscular	Disfagia (%)	Disartria (%)	Fasciculações na língua (%)	Contracturas (%)	Escoliose (%)
TIPO 1 (n=3)	Tetraplegia	50	33.3	66.7	66.6 (contracturas generalizadas)	33.3
TIPO 2 (n=8)	Tetraparésia proximal de predomínio nos membros inferiores (G1-G2) com atrofia das cinturas	12.5	12.5	12.5	62.5 (contracturas generalizadas)	87.5
TIPO 3 (n=6)	Tetraparésia proximal de predomínio nos membros inferiores (G3-G4) com atrofia das cinturas	0	0	0	50 (contracturas nos joelhos)	66.7

do tipo 2 apresentavam disfagia e fasciculações da língua. A presença de escoliose grave foi notória no grupo de doentes com AME tipos 2 e 3.

No tocante à avaliação ventilatória, verificou-se que todos os doentes do tipo 1 apresentaram baixa eficiência ventilatória com necessidade de VNI aos 0, 1 e 12 meses. Todos os doentes do tipo 2 apresentaram baixa eficiência ventilatória com necessidade de VNI em média aos 86 meses, sendo que 50% tinham também síndrome de apneia obstrutiva do sono. Apenas 3 doentes do tipo 3 necessitaram de VNI em média numa idade superior, apenas aos 14 anos.

Dos 2 doentes com AME tipo 1 com disfagia, apenas 1 necessitou de gastrostomia, tal como o doente com disfagia do tipo 2.

O estudo da atividade sérica da CK foi realizado nos doentes com AME tipo 3 (29-324 U/L, média de 174.2 U/L). O EMG foi realizado em 50% dos doentes com AME tipo 2 e em 66.7% dos do tipo 3, mostrando sinais de atrofia muscular com reinervação crónica, de origem neurogénica. A biópsia muscular, revelando atrofia mus-

cular neurogénica crónica, foi realizada em 83.3% dos doentes com AME tipo 3.

A análise molecular (Tabela III) revelou deleção em homozigotia dos exões 7 e 8 no gene *SMN1* apenas em 1 doente com AME tipo 1, em 7 do tipo 2 e em 4 do tipo 3. Foi detetada a variante em homozigotia (C770_780dup) e a variante em heterozigotia (c.759dupC) em 2 doentes do tipo 1. Apenas 1 doente do tipo 3 apresentava a deleção em homozigotia do exão 7. Um doente do tipo 3 apresentava biópsia e EMG compatível com AME, mas o estudo molecular foi negativo. Foi ainda determinado o número de cópias do gene *SMN2* num total de 7 doentes, dos quais 3 do tipo 1 (com 3 [n=1] e 2 [n=2] cópias), 3 do tipo 2 (com 3 cópias) e 1 do tipo 3 (com 2 cópias).

Foi efetuada a comparação entre os 3 doentes do tipo 1 de acordo com número de cópias do gene *SMN2* (3 vs. 2), mostrando que a idade do primeiro sintoma (5 meses vs. 1 mês), idade do diagnóstico (12 meses vs. 2.5 meses) e uso de VNI (12 meses vs. 1 mês) foram mais tardias no doente com 3 cópias do gene *SMN2*. Inicia-

Tabela III. Caracterização molecular nos diferentes tipos de AME. Determinação do número de cópias do gene *SMN2* em 7 doentes.

TIPO AME	DELEÇÃO EXÕES 7 E 8 – <i>SMN1</i>	IDELEÇÃO EXÃO 7 – <i>SMN1</i>	OUTRA MUTAÇÃO <i>SMN1</i>
TIPO 1	1 (3 cópias <i>SMN2</i>)	-	Variante em homozigotia C770_780dup (2 cópias <i>SMN2</i>) Variante em heterozigotia c.759dupC (2 cópias <i>SMN2</i>)
TIPO 2+	7 (3 doentes com 3 cópias <i>SMN2</i>)	-	-
TIPO 3*	4 (1 doente com 2 cópias <i>SMN2</i>)	1	-

+ 1 doente com estudo genético realizado no estrangeiro, sendo o resultado apenas parcialmente conhecido

* 1 doente com clínica e biópsia compatível, mas estudo genético negativo

ram tratamento com Nusinersen os doentes com AME tipo I com 2 cópias do gene *SMN2* e com idade inferior a 6 meses, à luz do supracitado PAP.

O primeiro doente, com 17 meses à data da conclusão deste estudo, iniciou tratamento aos 3 meses de vida, inicialmente apresentando um fenótipo grave, caracterizado por hipotonia generalizada, disfagia e fasciculações da língua, sob VNI em 24 horas e com uma pontuação na escala de avaliação de competências motoras CHOP-INTEND de 41/64. Após 6 meses (5 administrações), assistiu-se a uma melhoria da resposta motora, mais notória na extensão dos joelhos, com uma pontuação na escala CHOP-INTEND de 43/64. Após 14 meses (7 administrações), apresentava melhoria parcial nas competências motoras ao nível do controlo cefálico, com movimentos de rotação e inclinação ântero-posterior e ainda na capacidade de rolar para os dois lados, iniciando os movimentos com os membros inferiores, sendo a pontuação total CHOP-INTEND de 45/64. Atualmente, ao exame objetivo, apresenta movimentos ativos dos quatro membros com G2 (MMT) proximal nos membros superiores e G3 (MMT) nos membros inferiores e com necessidade de VNI apenas durante 14 horas por dia.

O segundo doente, de 7 meses de idade à data da conclusão deste estudo, iniciou tratamento no primeiro mês de vida, apresentando uma avaliação motora inicial CHOP-INTEND de 29/64 e VNI durante 24 horas; após 6 meses (5 administrações), assistiu-se igualmente a uma melhoria da resposta motora (CHOP-INTEND de 32/64), com aquisição de competências motoras, nomeadamente na capacidade de rolar no leito e nos movimentos de extensão dos membros inferiores. Apresenta movimentos ativos dos quatro membros com G3

(MMT) nos membros inferiores. Este doente mantém a necessidade de VNI em 24 horas por dia.

Discussão

Os doentes incluídos neste estudo foram divididos nos diferentes tipos de doença conforme os critérios internacionais. Não se encontraram diferenças, face ao que se encontra descrito na literatura, em relação a esta mesma distribuição por tipos. Também a idade do primeiro sintoma, apresentação clínica, idades de aquisição de competências motoras e padrão de fraqueza muscular foram congruentes com as descrições clínicas da literatura.

Nos doentes com AME tipo I, os músculos expiratórios estão frequentemente envolvidos,^{(18),(19)} daí a necessidade de recurso ao BiPAP em fases mais precoces da vida, o que se associa a uma maior sobrevida e qualidade de vida.⁽²⁰⁾ Os doentes com AME apresentam complicações digestivas, principalmente os doentes do tipo I⁽²¹⁾, como demonstrado no grupo analisado. As complicações osteoarticulares (contracturas generalizadas) e a escoliose foram registadas principalmente nos doentes dos tipos 2 e 3.^{(22),(23)}

Perante um fenótipo sugestivo de AME, realiza-se inicialmente o estudo para a deleção homozigótica dos exões 7 e 8 do gene *SMN1* (situação mais comum) e todos os nossos doentes realizaram estudo genético. As deleções que envolvem os dois exões (7 e 8) foram mais frequentes do que as deleções isoladas do exão 7, como estabelecido na literatura.⁽²⁴⁾ Apenas 1 doente com AME tipo 3 não apresentava mutações/deleções identificáveis, o que sugere a existência de uma provável mutação/deleção numa sequência promotora ou intrónica do gene *SMN1*. Os 2 doentes com AME tipo I com fenó-

tipo grave apresentavam mutações pontuais, um deles apresentou a variante em homozigotia mais frequente na população portuguesa (C770_780dup) e o outro apresentou uma nova variante em heterozigotia. O resultado da análise genética permite afirmar que existe uma fraca correlação entre o tipo de deleção/mutação e a gravidade do fenótipo clínico, o que pode contribuir para aumentar a dificuldade do aconselhamento genético.⁽²⁴⁾ Contudo, o número de cópias do gene *SMN2* é um bom biomarcador de prognóstico e gravidade do fenótipo clínico^{(4),(9)}, como ficou patente na comparação direta entre os doentes com AME tipo 1 com 2 e 3 cópias do gene *SMN2*. Os dois doentes que iniciaram tratamento com Nusinersen tinham 2 cópias do gene *SMN2*. Tendo como mecanismo de ação a inibição da região silenciadora intrónica 7 do gene *SMN2*, a sua ação e o seu impacto na biologia da doença vão depender inteiramente do número de cópias *SMN2*.⁽²⁵⁾

As escalas de avaliação da função motora, adequadas a este grupo de doentes, que permitem monitorizar a progressão da doença e a eficácia dos novos tratamentos, são as escalas HINE-2 e CHOP-INTEND, tendo sido esta última a utilizada na avaliação dos nossos doentes. Segundo a metodologia dos ensaios clínicos de fase III⁽¹⁷⁾, foi considerada a existência de uma resposta significativa quando se verificou um aumento no score CHOP-INTEND ≥ 4 pontos. Nos nossos doentes, no primeiro caso, houve uma melhoria do score em 4 pontos em 14 meses e, no segundo caso, de 3 pontos em 6 meses. De notar que, no primeiro caso, houve uma redução significativa da necessidade do número de horas de VNI. A utilização de Nusinersen em novos doentes, preferencialmente em formas mais precoces, assim como o controlo evolutivo dos que já o realizam, através da aplicação de escalas de avaliação da resposta motora padronizadas, pode ser útil para se concretizarem, no futuro, estudos de longevidade nestes doentes e de segurança associada à utilização do fármaco.

Conclusão

A disponibilização de um primeiro fármaco com provas dadas (em ensaios duplamente cegos e randomizados) na melhoria clínica de indivíduos com AME é, sem dúvida, um marco muito significativo para esta população de doentes neuromusculares. Da nossa experiência, para já ainda reduzida em número, os resultados observados são promissores, sendo que este novo tratamen-

to pode alterar o prognóstico e a sobrevida destes doentes. Torna-se, assim, premente a necessidade de uma nova revisão da classificação fenotípica, baseada atualmente apenas em critérios de idade de início e idade de aquisição de competências motoras. A genética molecular terá seguramente um papel crucial nesta mudança de paradigma, em que os aspetos farmacogenómicos se avistam como cruciais, na prática clínica diária. ■

Bibliografia

1. Werdnig, G. Zwei fruhinfantile hereditare Falle von progressiver Muskelatrophie unter dem Bilde der Dystrophie, aber anf neurotischer Grundlage. Arch. fur Psychiatr. und Nervenkrankheiten. 1891, 22.2: 437-480.
2. Dubowitz, V. Ramblings in the history of spinal muscular atrophy. Neuromuscul. Disord. 2009, 19.1: 69-73.
3. Munsat, T and Davies, K. International SMA Consortium Meeting (26-28 June 1992, Bonn, Germany). Neuromuscular Disord. 1992, 2: 423-428.
4. Lefebvre, S., Burglen, L., Reboullet, S., et al. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. Cell. 1995, 80.1: 155-165.
5. Lorson, C., Hahnen, E., Androphy, E., et al. A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy. Proc. Natl. Acad. Sci. 1999, 96.11: 6307-6311.
6. Lorson, C. and Androphy, E. An exonic enhancer is required for inclusion of an essential exon in the SMA-determining gene SMN. Hum. Mol. Genet. 2000, 9.2: 259-265.
7. Alias, L., Bernal, S., Fuentes-Prior, P., et al. Mutation update of spinal muscular atrophy in Spain: Molecular characterization of 745 unrelated patients and identification of four novel mutations in the SMN1 gene. Hum. Genet. 2009, 125.1: 29-39.
8. Burglen, L., Lefebvre, S., Clermont, O., et al. Structure and organization of the human survival motor neurone (SMN) gene. Genomics. 1996, 32.3:479-482.
9. Mailman, M., Heinz J., Papp, A., et al. Molecular analysis of spinal muscular atrophy and modification of the phenotype by SMN2. Genet. Med. 2002, 4.1:20.
10. Medrano, S., Monges, S., Gravina, L., et al. Genotype-phenotype correlation of SMN locus genes in spinal muscular atrophy children from Argentina. Eur. J. Paediatr. Neurol. 2016, 20.6: 910-917.
11. He, J., Zhang, Q., Lin, Q., et al. Molecular analysis of SMN1, SMN2, NAIP, GTF2H2, and H4F5 genes in 157 Chinese patients with spinal muscular atrophy. Gene. 2013, 518.2: 325-329.
12. Wathiyati, M., Fatemeh, H., Marini, M., et al. Combination of SMN2 copy number and NAIP deletion predicts disease severity in spinal muscular atrophy," Brain Dev. 2009, 31.1:42-45.
13. Arkblad, E., Tulinius, M., Kroksmark, A., et al. A population-based study of genotypic and phenotypic variability in children with spinal muscular atrophy. Acta Paediatr. 2009, 98.5: 865-872.
14. Lefebvre, S., Burlet, P., Liu, Q., et al. Correlation between severity and SMN protein level in spinal muscular atrophy. Nat. Genet. 1997, 16.3: 265.
15. Finkel, R., Chiriboga, C., Vajsar, J., et al. Treatment of infantile-onset spinal muscular atrophy with nusinersen: a phase 2, open-label, dose-escalation study. Lancet. 2016, 388.10063: 3017-3026.
16. Hoy, S.M. Nusinersen: First Global Approval. Drugs. 2017, 77.4: 473-479.
17. Finkel, R.S., Mercuri, E., Darras, B., et al. Nusinersen versus Sham Control in Infantile-Onset Spinal Muscular Atrophy. N. Engl. J. Med. 2017, 377.18: 1723-1732.

18. Kuru, S., Sakai, M., Konagaya, M., et al. An autopsy case of spinal muscular atrophy type III (Kugelberg-Welander disease). *Neuropathology*. 2009, 29.1: 63-67.
19. Schroth, M. Special considerations in the respiratory management of spinal muscular atrophy. *Pediatrics*. 2009, 123. Supplement 4: S245-S249.
20. Oskoui, M., Levy, G., Garland, C., et al. The changing natural history of spinal muscular atrophy type 1. *Neurology*. 2007, 69.20: 1931-1936.
21. Iannaccone, S. T. Modern management of spinal muscular atrophy. *Journal of Child Neurology*. 2007, 22.8: 974-978.
22. Wang, H., Ju, H.Y., Chen, S.M., et al. Joint range of motion limitations in children and young adults with spinal muscular atrophy. *Arch. Phys. Med. Rehabil*. 2004, 85.10: 1689-1693.
23. Haaker, G. and Fujak, A. Proximal spinal muscular atrophy: Current orthopedic perspective. *Application of Clinical Genetics*. 2013, 6.11: 113.
24. Markowitz, J.A., Singh, P., Darras, B.T. Spinal muscular atrophy: A clinical and research update. *Pediatric Neurology*. 2012, 46.1: 1-12.
25. Williams, J.H., Schray, R.C., Patterson, C.A. Oligonucleotide-Mediated Survival of Motor Neuron Protein Expression in CNS Improves Phenotype in a Mouse Model of Spinal Muscular Atrophy. *J. Neurosci*. 2009, 29.24: 7633-7638.