



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN MEDICINA E CHIRURGIA

***CARATTERIZZAZIONE FENOTIPICA DELLA SMA IN ETÀ
ADULTA NELL'ERA DELLE DISEASE-MODIFYING THERAPIES***

***PHENOTYPIC CHARACTERIZATION OF ADULT SMA
IN THE ERA OF DISEASE-MODIFYING THERAPIES***

Relatore: Chiar.mo

Prof.re Mauro Silvestrini

Tesi di laurea di

Giordano Simeone

Correlatore: Chiar.ma

Dott.ssa Michela Coccia

ANNO ACCADEMICO 2025/2026

*Sembra sempre
impossibile finché non viene fatto.*

INDICE

INTRODUZIONE	pag.4
CAPITOLO I – ATROFIA MUSCOLARE SPINALE	pag.8
1.1 Classificazione clinica della SMA	pag.8
1.2 Eziologia	pag.11
1.3 Epidemiologia	pag.11
1.4 Implicazioni cliniche primarie e secondarie	pag.13
1.4.1. Interessamento muscolo scheletrico	pag.13
1.4.2 Difficoltà di alimentazione e problemi di assunzione alimentare	pag.14
1.4.3 Interessamento respiratorio	pag.15
1.5 Diagnosi	pag.18
1.5.1. Screening neonatali	pag.20
1.6 Scale di valutazione motoria	pag.22
1.6.1. Altre scale utilizzate	pag.24
CAPITOLO II - GENETICA E PATOGENESI	pag.27
2.1 Geni SMN1 e SMN2	pag.27
2.2 Gene modificatore di SMA: SMN2	pag.29
2.3 Espressione nei tessuti e localizzazione subcellulare	pag.32
2.4 Espressione della proteina nel periodo fetale	pag.34
CAPITOLO III - TERAPIA	pag.34
3.1 Farmaci SMN target	pag.34
3.2 Farmaci non SMN target	pag.43

CAPITOLO IV - OBIETTIVO DELLO STUDIO	pag.46
4.1 Metodi	pag.46
4.2 Analisi statistica	pag.48
CAPITOLO V – DISCUSSIONE	pag.71
CONCLUSIONI	pag.77
BIBLIOGRAFIA	pag.78
SITOGRAFIA	pag.83
APPENDICE	pag.84

INTRODUZIONE

L'atrofia muscolare spinale (Spinal Muscular Atrophy, SMA) rappresenta una malattia neuromuscolare genetica rara, autosomica recessiva, caratterizzata dalla degenerazione progressiva dei motoneuroni α del corno anteriore del midollo spinale e dei nuclei motori bulbari, con conseguente debolezza muscolare progressiva, atrofia e compromissione funzionale variabile.

Nella maggior parte dei casi, la SMA è causata da delezioni o mutazioni bialleliche del gene Survival Motor Neuron 1 (SMN1), localizzato sul cromosoma 5q13. La perdita di funzione di SMN1 determina una riduzione della proteina SMN, essenziale per la sopravvivenza neuronale e per il corretto mantenimento dell'unità motoria.

La gravità clinica della malattia è parzialmente modulata dal numero di copie del gene SMN2, omologo di SMN1, in grado di produrre piccole quantità di proteina SMN funzionale. In generale, un maggior numero di copie di SMN2 si associa a fenotipi clinici meno severi; tuttavia, tale relazione appare incompleta e non sempre sufficiente a spiegare l'ampia variabilità clinica osservata nella pratica.

Tradizionalmente, la SMA viene classificata in differenti sottotipi clinici sulla base dell'età di esordio e della massima acquisizione motoria raggiunta. Le forme più severe, come la SMA I, esordiscono nei primi mesi di vita e sono caratterizzate dall'incapacità di acquisire la posizione seduta autonoma. Le forme SMA II consentono generalmente il raggiungimento della posizione seduta ma non della deambulazione autonoma, mentre i pazienti SMA III acquisiscono la deambulazione, pur potendo successivamente perderla nel corso della malattia. La SMA IV rappresenta invece la forma a esordio più tardivo e generalmente meno severa.

Sebbene tale classificazione mantenga un importante valore clinico, negli ultimi anni è emerso come i fenotipi della SMA adulta siano significativamente più eterogenei rispetto a quanto descritto nelle popolazioni pediatriche. In particolare, numerosi pazienti adulti presentano caratteristiche intermedie e sovrapposte tra i differenti sottotipi clinici, rendendo talvolta difficile una distinzione netta tra SMA II, SMA III e SMA IV.

Parallelamente, il miglioramento delle cure di supporto e il progressivo aumento dell'aspettativa di vita hanno modificato la composizione della popolazione SMA adulta, portando all'osservazione di pazienti con traiettorie cliniche estremamente differenti.

Negli ultimi anni, l'introduzione delle Disease Modifying Therapies (DMTs), tra cui nusinersen, risdiplam e onasemnogene abeparvovec, ha profondamente modificato la storia naturale della SMA. Per la prima volta, infatti, sono disponibili trattamenti in grado di aumentare la produzione della proteina SMN e di modificare l'evoluzione clinica della malattia.

L'impatto delle nuove terapie appare particolarmente evidente nei pazienti trattati precocemente, soprattutto nell'ambito dello screening neonatale e dell'intervento presintomatico. Tuttavia, una quota significativa della popolazione adulta attuale ha raggiunto l'età adulta in assenza di trattamento precoce oppure ha iniziato una DMT soltanto in età avanzata.

La popolazione adulta attualmente osservata costituisce infatti l'ultima generazione di pazienti cresciuti prevalentemente nell'era pre-DMT e rappresenta pertanto un'opportunità unica per comprendere la storia naturale tardiva della malattia e identificare i determinanti clinici associati alla disabilità residua

In questo contesto, la caratterizzazione clinica e funzionale della SMA adulta assume un'importanza crescente, sia per comprendere meglio la reale variabilità fenotipica della malattia, sia per definire strumenti adeguati al monitoraggio della progressione clinica e della risposta terapeutica.

La valutazione clinico-funzionale dei pazienti SMA si basa attualmente sull'utilizzo di scale standardizzate, tra cui la Hammersmith Functional Motor Scale Expanded (HFMSSE), la Revised Upper Limb Module (RULM) e la scala Medical Research Council (MRC).

La HFMSSE rappresenta uno degli strumenti più utilizzati per la valutazione delle capacità motorie grossolane e della funzione assiale e prossimale, mentre la RULM consente una valutazione più specifica della funzione residua degli arti superiori, particolarmente utile nei pazienti non deambulanti o con grave compromissione motoria.

Accanto alla valutazione motoria, la funzione respiratoria rappresenta uno degli aspetti centrali della gestione clinica della SMA. La debolezza progressiva della muscolatura respiratoria può infatti determinare insufficienza ventilatoria e aumentare significativamente morbilità e mortalità.

Tra i principali parametri utilizzati nella pratica clinica, la capacità vitale forzata (Forced Vital Capacity, FVC) rappresenta uno degli indicatori più diffusi per il monitoraggio della funzione ventilatoria nei pazienti neuromuscolari.

Nonostante l'ampio utilizzo delle scale funzionali nella SMA, persistono numerose criticità nella valutazione della popolazione adulta. In primo luogo, gli items di valutazione che compongono le scale funzionali in questione sono disegnati per misurare principalmente il grado di acquisizione di funzioni nel corso dello sviluppo neuromotorio. Inoltre, per quanto gli studi di validazione delle scale comprendessero una quota di soggetti in età adulta, questa era sicuramente minoritaria e non rappresentativa dell'estrema variabilità fenotipica che si manifesta nel corso di tutta la vita adulta, soprattutto per quelle forme di malattia per le quali lo span di vita non è significativamente ridotto. Infine, queste scale funzionali sono limitate da significativi effetti pavimento e soffitto, non essendo in grado di intercettare variazioni clinicamente significative sia in pazienti gravemente compromessi con residue competenze motorie che possono essere rilevanti, né sfumate alterazioni qualitative nel pattern di movimento o faticabilità o variazioni di forza segmentaria con impatto funzionale minore nei pazienti meno compromessi.

In particolare, rimane incompletamente definita l'interazione tra gravità motoria, coinvolgimento respiratorio, numero di copie di SMN2 ed età del paziente, fattori che potrebbero contribuire alla definizione di fenotipi clinici distinti nell'età adulta. Un ulteriore elemento di interesse riguarda il possibile ruolo dell'età come fattore modificatore della progressione clinica. Sebbene diversi studi abbiano descritto il declino funzionale nella SMA, i dati disponibili sulla popolazione adulta avanzata risultano ancora limitati, così come le informazioni relative ai pattern topografici di distribuzione della debolezza muscolare.

In questo scenario, risulta pertanto necessario approfondire la caratterizzazione clinica e funzionale della SMA nell'età adulta, con particolare attenzione

all'eterogeneità fenotipica, alle relazioni tra funzione motoria e respiratoria, all'effetto dell'età e al ruolo delle variabili genetiche.

La definizione più accurata dei fenotipi adulti appare infatti fondamentale non solo per comprendere meglio la storia naturale della malattia, ma anche per interpretare correttamente l'impatto delle nuove strategie terapeutiche e costruire futuri modelli di monitoraggio clinico nell'era delle Disease Modifying Therapies.

CAPITOLO I – ATROFIA MUSCOLARE SPINALE

1.1 CLASSIFICAZIONE CLINICA DELLA SMA

La SMA viene classificata in differenti forme cliniche sulla base dell'età di esordio, dei sintomi e delle massime acquisizioni motorie raggiunte dal paziente. Tale classificazione consente di distinguere fenotipi caratterizzati da differente gravità clinica e prognosi funzionale

SMA TIPO I

La SMA di tipo I, nota anche come malattia di Werdnig-Hoffmann, rappresenta la forma più grave e frequente della malattia. L'esordio avviene generalmente entro i primi sei mesi di vita, spesso già nelle prime settimane.

I pazienti presentano grave ipotonia, marcata debolezza muscolare simmetrica e riduzione dei movimenti spontanei. La compromissione interessa prevalentemente la muscolatura prossimale e assiale, con scarsa capacità di controllo del capo ed impossibilità ad acquisire la posizione seduta autonomamente.

Dal punto di vista respiratorio, la SMA di tipo I è caratterizzata da importante debolezza dei muscoli intercostali con relativa preservazione del diaframma. Tale condizione determina il tipico pattern respiratorio paradossale, con rientramento della gabbia toracica durante l'inspirazione.

La tosse inefficace e la ridotta clearance delle secrezioni favoriscono infezioni respiratorie ricorrenti, atelettasie ed evoluzione verso insufficienza respiratoria cronica. Inoltre, la debolezza bulbare può determinare difficoltà di suzione e deglutizione, con aumentato rischio di aspirazione e malnutrizione.

Prima dell'introduzione delle moderne terapie e del supporto ventilatorio, la sopravvivenza era generalmente limitata ai primi due anni di vita.

SMA TIPO II

La SMA di tipo II presenta un esordio tra i 6 e i 18 mesi di vita. I pazienti acquisiscono la capacità di mantenere la posizione seduta autonomamente, ma non raggiungono la deambulazione indipendente.

La debolezza muscolare interessa soprattutto gli arti inferiori e la muscolatura del tronco, con progressiva riduzione delle capacità funzionali. Nel tempo si sviluppano frequentemente retrazioni tendinee, deformità articolari e scoliosi progressiva, favorita dalla debolezza della muscolatura paravertebrale.

Il coinvolgimento respiratorio è molto frequente e rappresenta una delle principali complicanze cliniche. La debolezza dei muscoli respiratori determina riduzione della capacità vitale forzata (FVC), inefficacia della tosse e predisposizione a infezioni respiratorie ricorrenti.

Nei pazienti SMA II, la scoliosi contribuisce ulteriormente al peggioramento della meccanica ventilatoria, causando una sindrome restrittiva progressiva. Molti pazienti necessitano nel tempo di ventilazione non invasiva, soprattutto durante il sonno.

Dal punto di vista nutrizionale possono comparire disfagia, difficoltà alimentari e alterazioni della crescita. Tuttavia, rispetto alla SMA I, la sopravvivenza è significativamente maggiore e molti pazienti raggiungono l'età adulta.

SMA TIPO III

La SMA di tipo III, o malattia di Kugelberg-Welander, presenta esordio dopo i 18 mesi di vita e comprende un ampio spettro di severità clinica.

I pazienti acquisiscono la deambulazione autonoma, ma possono andare incontro a progressiva perdita della capacità di cammino nel corso della malattia. La debolezza muscolare interessa prevalentemente la muscolatura prossimale degli arti inferiori, determinando difficoltà nella corsa, nel salire le scale e nell'alzarsi da posizione seduta.

La progressione della malattia è generalmente lenta e il coinvolgimento respiratorio risulta meno severo rispetto alle forme infantili. Tuttavia, nei pazienti non deambulanti

o con lunga durata di malattia possono comparire riduzione della funzione respiratoria, tosse inefficace e disturbi respiratori del sonno.

Anche nella SMA III possono svilupparsi scoliosi, osteopenia e retrazioni articolari, sebbene con minore frequenza e gravità rispetto alla SMA II.

SMA TIPO IV

La SMA di tipo IV rappresenta la forma adulta della malattia, con esordio generalmente dopo la seconda o terza decade di vita.

Il quadro clinico è caratterizzato da debolezza muscolare prossimale lentamente progressiva, prevalentemente a carico degli arti inferiori. I sintomi iniziali comprendono facile affaticabilità, difficoltà nella deambulazione prolungata e ridotta forza muscolare.

La progressione è generalmente lenta e molti pazienti mantengono la deambulazione autonoma per decenni. Il coinvolgimento respiratorio è solitamente lieve o assente, anche se possono essere presenti modeste alterazioni restrittive nei casi più avanzati.

Le deformità scheletriche e la scoliosi risultano meno frequenti rispetto alle forme pediatriche. Inoltre, la sopravvivenza non appare significativamente ridotta.

Nella popolazione adulta la classificazione basata esclusivamente sull'età di esordio e sulle acquisizioni motorie massime raggiunte può risultare riduttiva. La durata di malattia, la perdita acquisita di funzioni motorie, il coinvolgimento respiratorio, l'assetto genetico e l'esposizione alle terapie modificanti la malattia contribuiscono infatti a determinare una significativa eterogeneità clinica anche all'interno dello stesso sottotipo diagnostico.

Sebbene questa classificazione continui a rappresentare il sistema di riferimento più utilizzato nella pratica clinica, l'introduzione delle terapie modificanti la malattia e il miglioramento della sopravvivenza hanno progressivamente reso meno netti i confini tra i diversi sottotipi clinici. In particolare, nella popolazione adulta è frequente osservare fenotipi intermedi caratterizzati da traiettorie funzionali che non risultano pienamente rappresentate dalla classificazione tradizionale.

1.2 EZIOLOGIA

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

I pazienti affetti da SMA hanno un numero variabile di copie di un secondo gene, SMN 2, che codifica per una forma accorciata della proteina SMN, dotata di una funzionalità ridotta rispetto alla proteina SMN completa (codificata dal gene SMN 1 sano). Il numero di copie del gene SMN 2 è quindi alla base della grande variabilità della patologia, con forme più o meno gravi ed un enorme ventaglio sintomatico.

In assenza di un valido trattamento farmacologico la patologia peggiora progressivamente, anche le terapie di supporto come la fisioterapia, la ventilazione non invasiva o il supporto nutrizionale non modificano il corso naturale della malattia, ma possono esclusivamente rallentarlo.

1.3 EPIDEMIOLOGIA

L'atrofia muscolare spinale (Spinal Muscular Atrophy, SMA) rappresenta una delle più frequenti malattie neuromuscolari genetiche dell'età pediatrica ed è considerata la principale causa genetica di mortalità infantile correlata a patologie neuromuscolari.

L'incidenza della SMA è stimata tra 1 caso ogni 6.000 e 11.000 nati vivi, con una frequenza media comunemente riportata di circa 1:10.000. La prevalenza dei portatori sani nella popolazione generale è stimata intorno a 1 individuo ogni 40-60 soggetti, rendendo la SMA una delle più comuni malattie autosomiche recessive.

La distribuzione dei diversi sottotipi clinici varia in funzione dell'età della popolazione considerata. Le forme più severe, in particolare la SMA di tipo I, rappresentano la quota maggiore dei casi alla nascita; tuttavia, grazie al miglioramento delle cure di supporto e all'aumento della sopravvivenza, le forme SMA II e SMA III risultano

maggiormente rappresentate negli studi di prevalenza condotti sulla popolazione generale.

Secondo i dati del registro italiano ItaSMAC, in Italia sono attualmente seguiti oltre 1.200 pazienti affetti da SMA 5q, con una prevalenza stimata di circa 2,12 casi ogni 100.000 abitanti. La popolazione registrata comprende sia soggetti pediatrici sia adulti, confermando come la SMA rappresenti oggi una condizione cronica che interessa un numero crescente di pazienti in età adulta.

La popolazione adulta costituisce una quota rilevante della comunità SMA. I dati del registro nazionale evidenziano infatti la presenza di oltre 600 pazienti adulti, pari a circa la metà della popolazione complessivamente seguita. Questo dato riflette il progressivo miglioramento della sopravvivenza osservato negli ultimi decenni e la crescente necessità di sviluppare modelli assistenziali e strumenti di valutazione specificamente dedicati all'età adulta.

L'introduzione delle terapie modificanti la malattia (Disease Modifying Therapies, DMTs) e l'implementazione dei programmi di screening neonatale stanno inoltre modificando la storia naturale della SMA, contribuendo a una progressiva trasformazione delle caratteristiche epidemiologiche e cliniche della popolazione affetta.

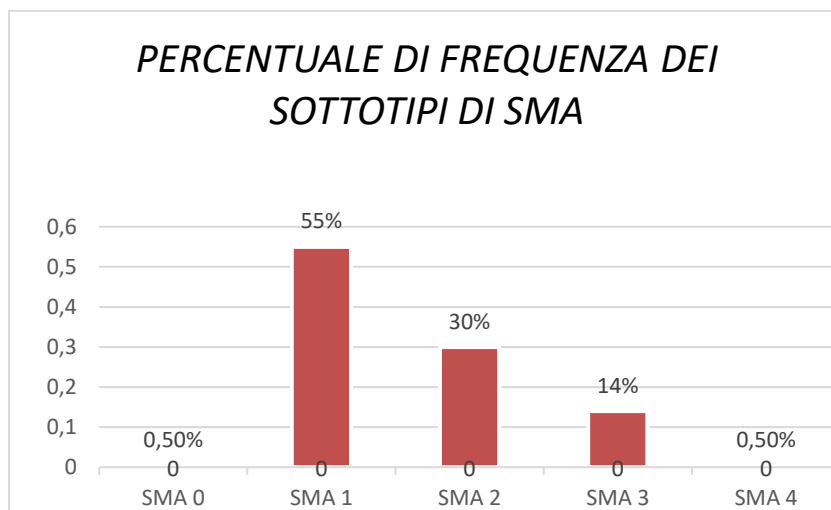


Grafico 1: percentuale di frequenza dei sottotipi di SMA

- *SMA I: è la più frequente alla nascita, ma anche la più letale se non viene trattata;*

- *SMA II e III: sono forme più lievi, meno frequenti alla nascita, ma più rappresentate nei dati di prevalenza (cioè tra chi vive con la malattia);*
- *SMA I e IV: sono rari, il tipo 0 è quasi sempre letale alla nascita*

1.4 IMPLICAZIONI CLINICHE PRIMARIE E SECONDARIE

1.4.1 INTERESSAMENTO MUSCOLO SCHELETRICO

La debolezza muscolare rappresenta la manifestazione clinica cardine dell'atrofia muscolare spinale ed è conseguenza della progressiva perdita dei motoneuroni del corno anteriore del midollo spinale. Il coinvolgimento interessa prevalentemente la muscolatura prossimale e assiale, con gravità variabile in relazione al sottotipo clinico e all'età di esordio.

Nelle forme più severe, la compromissione motoria determina una marcata limitazione delle acquisizioni posturali e delle tappe dello sviluppo motorio, mentre nelle forme a esordio più tardivo si osserva una progressiva riduzione delle capacità funzionali precedentemente acquisite. La ridotta attività motoria e il deficit di carico sul sistema scheletrico favoriscono inoltre lo sviluppo di osteopenia e aumentano il rischio di fratture.

Con la progressione della malattia possono comparire numerose complicanze muscoloscheletriche secondarie. Tra le più frequenti vi sono le retrazioni muscolo-tendinee e le limitazioni articolari, che contribuiscono alla perdita di funzione e alla riduzione dell'autonomia nelle attività quotidiane. Un ruolo particolarmente rilevante è svolto dalla scoliosi, soprattutto nei pazienti non deambulanti, dove la debolezza della muscolatura paravertebrale favorisce la comparsa e la progressione delle deformità vertebrali.

La scoliosi rappresenta una delle principali cause di disabilità nella SMA e può influenzare significativamente la funzione respiratoria attraverso l'alterazione della meccanica toracica e la riduzione della compliance della parete toracica. Nei casi più avanzati, la progressione della deformità può richiedere un trattamento chirurgico correttivo.

La gestione delle complicanze muscoloscheletriche richiede un approccio multidisciplinare che integri monitoraggio clinico, fisioterapia, interventi posturali e utilizzo di ortesi personalizzate. L'impiego di ausili per la mobilità e di tecnologie assistive contribuisce inoltre a preservare il più a lungo possibile l'autonomia funzionale e la partecipazione alle attività della vita quotidiana.

L'introduzione delle terapie modificanti la malattia ha modificato in parte la storia naturale della SMA; tuttavia, le complicanze muscoloscheletriche continuano a rappresentare un elemento centrale nella gestione clinica dei pazienti, soprattutto nelle coorti adulte che hanno trascorso gran parte della loro vita in epoca pre-terapeutica.

1.4.2 DIFFICOLTA' DI ALIMENTAZIONE E PROBLEMI DI ASSUNZIONE ALIMENTARE

Sono stati segnalati problemi di alimentazione e deglutizione in tutti i tipi di SMA dovuti a disfunzione bulbare. Questi problemi sono comuni nei sitters e non-sitters, con una prevalenza del 36% di almeno una difficoltà correlata all'alimentazione.

I problemi comunemente segnalati sono quelli alla mascella, affaticamento correlato alla masticazione e soffocamento.

I pazienti affetti da SMA possono anche avere problemi di motilità gastroesofagea, che possono presentarsi con stitichezza, gonfiore e malattia da reflusso gastroesofageo. È importante notare che con la progressione della malattia, molti pazienti da SMA dipendono dall'uso di ventilatori come la B-PAP, che può portare a insufflazione gastrica, ciò può peggiorare lo svuotamento gastrico. Inoltre, recenti studi evidenziano che anche la barriera mucosa del tratto gastrointestinale è interessata, il che può portare a carenza nell'assorbimento di micro e macronutrienti.

L'intervento iniziale consiste nell'adattamento delle consistenze degli alimenti introdotti durante lo svezzamento. La preferenza per cibi semisolidi e liquidi addensati consente di ridurre il rischio di aspirazione e di compensare le difficoltà masticatorie, garantendo al contempo un apporto nutrizionale adeguato. Parallelamente, risulta fondamentale modificare la postura durante la somministrazione del pasto: nelle forme

cliniche più severe, ad esempio, l'utilizzo della posizione supina con il capo ruotato lateralmente contribuisce a prevenire l'elevato rischio di aspirazione. In alcuni casi, tale modalità alimentare può essere mantenuta per l'intero arco di vita del paziente.

Qualora la funzione deglutitoria venga completamente compromessa, si rende necessario il ricorso all'alimentazione tramite sondino naso-gastrico (SNG); successivamente, può essere indicata l'esecuzione di una gastrostomia percutanea endoscopica (PEG) come soluzione nutrizionale a lungo termine (Arnold et al., 2015; Mastella & Ottonello, 2009, pp. 121-128; Mastella & Ottonello, 2009, pp. 179-184).

1.4.3 INTERESSAMENTO RESPIRATORIO

Le complicanze respiratorie rappresentano la principale causa di ospedalizzazione, morbilità e mortalità nei pazienti affetti da Atrofia Muscolare Spinale (SMA).

La funzione respiratoria può essere indagata mediante metodiche invasive e non invasive; tuttavia, considerando la scarsa tollerabilità delle prime in età pediatrica, si privilegia l'utilizzo di tecniche non invasive. Tra queste rientrano la spirometria, la misurazione del picco di flusso della tosse (Peak Cough Flow, PCF), l'analisi del pattern ventilatorio e la valutazione del contributo toraco-addominale durante la respirazione spontanea a riposo (Quiet Breathing, QB). Sebbene spirometria e PCF forniscano informazioni rilevanti, si tratta di test volontari che richiedono un elevato grado di collaborazione; al contrario, l'analisi del QB risulta applicabile anche nei pazienti non collaboranti.

Fin dalla prima infanzia, nei soggetti affetti da SMA di tipo I e II si osserva una riduzione degli indici spirometrici, con un declino generalmente lento, potenzialmente aggravato dalla presenza di scoliosi. Inoltre, la tosse risulta inefficace sin dai primi anni di vita, rendendo necessario il ricorso a tecniche di assistenza. I bambini con SMA presentano un elevato rischio di ipoventilazione e possono necessitare di supporto ventilatorio per correggere la riduzione della saturazione dell'ossiemoglobina arteriosa e prevenire la microatelettasia.

Le tecniche di valutazione respiratoria comunemente utilizzate non forniscono tuttavia informazioni specifiche sullo stato funzionale dei muscoli inspiratori della gabbia toracica (iRCM). Questo aspetto è di particolare interesse clinico, poiché nella SMA il diaframma risulta relativamente preservato in virtù della conservazione dei motoneuroni frenici, mentre la debolezza muscolare interessa progressivamente gli iRCM.

La valutazione del contributo toraco-addominale durante il QB consente di analizzare selettivamente il coinvolgimento dei diversi gruppi muscolari respiratori. Nei pazienti con SMA I e SMA II sono state descritte asincronia toraco-addominale e ridotta espansione della gabbia toracica, prevalentemente in posizione supina. In tale postura, l'azione del diaframma risulta facilitata e può mascherare un deficit degli iRCM; risulta pertanto clinicamente rilevante valutare il pattern respiratorio anche in posizione seduta, nella quale diaframma e muscoli della gabbia toracica contribuiscono in misura comparabile al volume corrente.

Alla luce di queste considerazioni, è stato ipotizzato che le diverse forme di SMA siano caratterizzate da pattern ventilatori e toraco-addominali specifici durante il QB e che il contributo della gabbia toracica al volume corrente rappresenti un indicatore sensibile della funzionalità degli iRCM, influenzato dalla postura.

Secondo uno studio multicentrico trasversale condotto su un'ampia coorte di pazienti adulti italiani affetti da atrofia muscolare spinale (SMA) naïve al trattamento, la compromissione respiratoria rappresenta un aspetto clinico frequente ma non universalmente presente in età adulta. Lo studio ha incluso 145 pazienti (prevalentemente SMA3), con un'età mediana di 37 anni, valutando parametri quali capacità vitale forzata (FVC), volume espiratorio forzato nel primo secondo (FEV1) e necessità di ventilazione non invasiva (NIV).

I risultati hanno mostrato che circa due terzi dei pazienti presentavano una funzione respiratoria nella norma, mentre una quota variabile tra il 30% e il 40% evidenziava valori patologici di FVC e FEV1, il 14% dei soggetti necessitava di NIV.

La funzione respiratoria risultava significativamente correlata alla gravità della malattia e alla compromissione motoria, misurata tramite scale validate come HFMSE

e RULM. In particolare, valori più bassi di FVC e FEV1 erano associati a SMA di tipo 2, perdita della deambulazione, pregresso intervento per scoliosi e utilizzo di dispositivi di supporto respiratorio.

Un dato particolarmente rilevante emerso dallo studio è la sostanziale stabilità della funzione respiratoria in età adulta, suggerendo che il declino più marcato possa verificarsi nelle fasi precedenti della vita. Gli autori sottolineano pertanto l'importanza di un monitoraggio respiratorio regolare anche nei pazienti adulti, indipendentemente dalla severità clinica, evidenziando come la FVC possa rappresentare un biomarcatore utile sia per il follow-up sia per la valutazione della risposta alle terapie modificanti la malattia.

Per ovviare alle problematiche respiratorie e supportare il paziente nel quotidiano si rende necessario l'utilizzo di presidi respiratori di supporto, messi a disposizione dal SSN:

- Aspiratore portatile, per pulire bocca e alte vie aeree dal ristagno di secrezioni;
- Pallone rianimatore AMBU, uno strumento utile nelle situazioni di urgenza;
- Saturimetro portatile, per rilevare i parametri vitali di saturazione e frequenza cardiaca;
- Macchina della tosse, per trattare il deficit della tosse e consentire adeguata espettorazione;
- Ventilazione meccanica Non Invasiva (NIV), nei casi più gravi Ventilazione Tracheostomica (TV), per supportare meccanicamente la respirazione durante una parte o tutto l'arco della giornata.

1.5 DIAGNOSI

I principali sospetti diagnostici nel neonato riguardano debolezza diffusa e ipotonia globale, successivamente si possono notare difficoltà nel sostegno e controllo del capo, pianto debole e ritardo nel raggiungimento delle tappe psicomotorie. Nelle forme più gravi, con età di insorgenza precoce, si notano anche problematiche legate a deglutizione e respirazione.

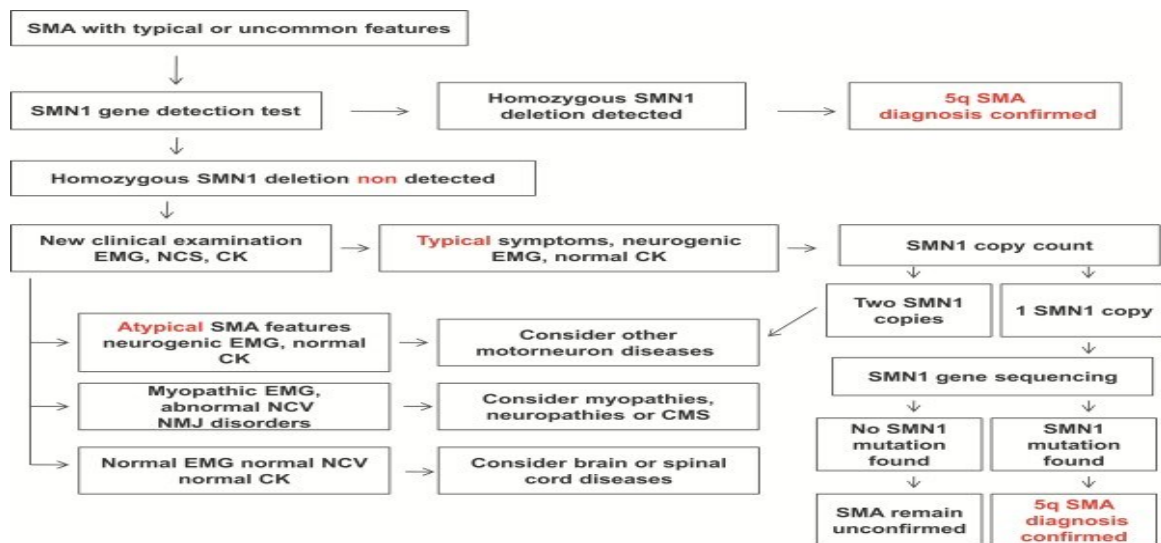


Figura 1: algoritmo delle procedure diagnostiche per guidare alla diagnosi di SMA

Il test diagnostico di primo livello per un paziente SMA dovrebbe essere la ricerca della delezione omozigote del gene SMN1. L'assenza dell'esone 7 di SMN1 (con o senza la delezione dell'esone 8) conferma la diagnosi di SMA. Il test raggiunge fino al 95% di sensibilità e quasi il 100% di specificità.

Se il test di primo livello risulta negativo, è necessario eseguire ulteriori esami di laboratorio, tra cui il dosaggio delle creatinichinasi e test elettrofisiologici come l'elettromiografia (EMG) e lo studio della conduzione nervosa. Se l'EMG suggerisce una malattia del motoneurone, è necessario eseguire ulteriori test per le mutazioni SMN. Se il paziente ha una singola copia di SMN1, è obbligatorio sequenziare le regioni codificanti dell'allele non deletato per identificare la seconda mutazione causativa, generalmente sottili variazioni di sequenza, tra cui mutazioni puntiformi, inserzioni e delezioni. Tuttavia, in circa un terzo dei pazienti con un quadro clinico tipico e una singola copia di SMN1, la seconda mutazione non si trova nella regione

codificante SMN1/SMN2. Questo riscontro è più comune nella SMA3. L'analisi della sequenza del gene SMN1 è suggerita anche in quei pazienti che presentano un quadro clinico tipico, 2 copie di SMN1 e sono nati da genitori consanguinei.

Al contrario, in un paziente con 2 copie di SMN1, la diagnosi di SMA correlata alla mutazione di SMN1 è praticamente esclusa e dovrebbero essere presi in considerazione altri disturbi dei motoneuroni come SMARD1, atrofia muscolare spinale legata all'X, la SMA distale e la sclerosi laterale amiotrofica giovanile.

In generale, le principali condizioni da considerare nella diagnosi differenziale di un lattante che presenti ipotonia e/o debolezza sono le miopatie congenite, ovvero miopatie caratterizzate da tipiche alterazioni strutturali o ultrastrutturali (bastoncelli, cores, nuclei centrali) alla biopsia muscolare, la distrofia miotonica congenita, le sindromi miasteniche congenite, le miopatie metaboliche e i disordini congeniti del motoneurone e del nervo periferico (come la neuropatia congenita ipomielinizzante), oltre a condizioni non neuromuscolari, tra cui sindromi genetiche come la sindrome di Prader-Willi, l'encefalopatia ipossico-ischemica acuta, la sepsi neonatale e condizioni discinetiche o metaboliche.

Gli strumenti più importanti per orientare la diagnosi differenziale, oltre all'esame clinico e a un'accurata anamnesi familiare, comprendono il dosaggio della creatinichinasi (CK) — tenendo presente che nelle forme croniche di SMA i livelli possono essere solo moderatamente elevati — gli studi elettromiografici e della conduzione nervosa per distinguere condizioni neurogene e alterazioni della trasmissione neuromuscolare, la risonanza magnetica encefalica, la biopsia muscolare e test genetici o metabolici specifici

Se l'esame elettrofisiologico esclude una malattia del motoneurone, il bambino deve essere riesaminato e sottoposto a ulteriori test diagnostici, tenendo conto di altri disturbi.

SMA variant	Inheritance/gene	Clinical features
Scapuloperoneal SMA	AD 12q24.1-q24.31	Progressive weakness of scapuloperoneal and laryngeal muscles
SMA with pontocerebellar hypoplasia	AR <i>VRK1</i>	Brainstem and cerebellar hypoplasia, early onset (0-6 mo)
X-linked infantile SMA with arthrogryposis	X-linked Xp11.3-q11.2 <i>UBA1</i>	Contractures, onset at birth or infancy, early death
SMA with respiratory distress type I	AR- <i>IGHMBP2</i>	Early onset (< 3 mo), eventration of diaphragms, distal weakness, pes equines.
Congenital distal SMA	AD12q23-q24	Early onset with contractures, nonprogressive
Distal SMA-V/CMT2d	AD 7p15 <i>GARS</i>	Distal SMA with upper limb predominance

Figura 2: altre forme di SMA non correlate al gene SMN

1.5.1 SCREENING NEONATALI

Storicamente, la diagnosi tardiva ha rappresentato un limite rilevante nella gestione clinica. Tuttavia, l'introduzione delle terapie modificanti la malattia (Disease Modifying Therapies, DMT) ha profondamente modificato la storia naturale della SMA. Dal 2016, la Food and Drug Administration ha approvato tre DMT: nusinersen (oligonucleotide antisense che modula lo splicing di SMN2), onasemnogene abeparvovec (terapia genica sostitutiva mediante vettore AAV9) e risdiplam (modulatore orale dello splicing di SMN2).

Evidenze precliniche e cliniche hanno dimostrato che l'efficacia terapeutica è strettamente dipendente dalla precocità dell'intervento, con outcome significativamente migliori nei pazienti trattati in fase presintomatica. Nei soggetti affetti da SMA di tipo 1, la perdita dei motoneuroni inizia in epoca perinatale ed è rapidamente progressiva, con severa denervazione entro i primi mesi di vita e perdita di oltre il 90% delle unità motorie entro i sei mesi.

Lo screening neonatale (Newborn Screening, NBS) per SMA rappresenta uno strumento cruciale per l'identificazione precoce dei soggetti affetti, consentendo l'avvio tempestivo del trattamento e il massimo beneficio clinico. L'inclusione della SMA nei pannelli di screening è supportata dai criteri di Wilson and Jungner e dai principi dell'Organizzazione Mondiale della Sanità relativi allo screening di popolazione.

Negli ultimi anni, programmi di NBS per SMA sono stati implementati a livello regionale o nazionale in diversi Paesi, tra cui Australia, Belgio, Canada, Germania, Italia, Giappone, Taiwan e Stati Uniti. Negli Stati Uniti, l'Advisory Committee on Heritable Disorders in Newborns and Children ha incluso la SMA nel Recommended Uniform Screening Panel (RUSP) nel 2018.

Nel complesso, l'identificazione presintomatica mediante NBS, in associazione alle DMT disponibili, rappresenta un paradigma di medicina traslazionale di successo, in grado di modificare significativamente la prognosi e la qualità di vita dei pazienti affetti da SMA.

Tuttavia, non è stato identificato alcun marcatore biochimico da utilizzare come biomarcatore clinicamente significativo nella NBS.

Il test consiste in un'analisi PCR in tempo reale in grado di rilevare la presenza del gene SMN1 da un campione di sangue essiccato (DBS), più precisamente identificando delezioni omozigoti dell'esone 7 nel gene SMN1 nei neonati affetti. I campioni vengono raccolti pungendo il tallone del neonato entro 48-72 ore dalla nascita e lasciando asciugare le gocce di sangue intero sulla carta di Guthrie.

Il protocollo progettato per NBS è molto rapido e fornisce risultati in tempi molto rapidi. Si compone di due fasi principali: estrazione del DNA e analisi di amplificazioni mediante PCR in tempo reale.

Un risultato negativo valido per SMA è determinato dall'amplificazione del gene SMN1 (figura 5a), mentre un risultato positivo valido è determinato dall'assenza di amplificazione del gene SMN1 (figura 5b).

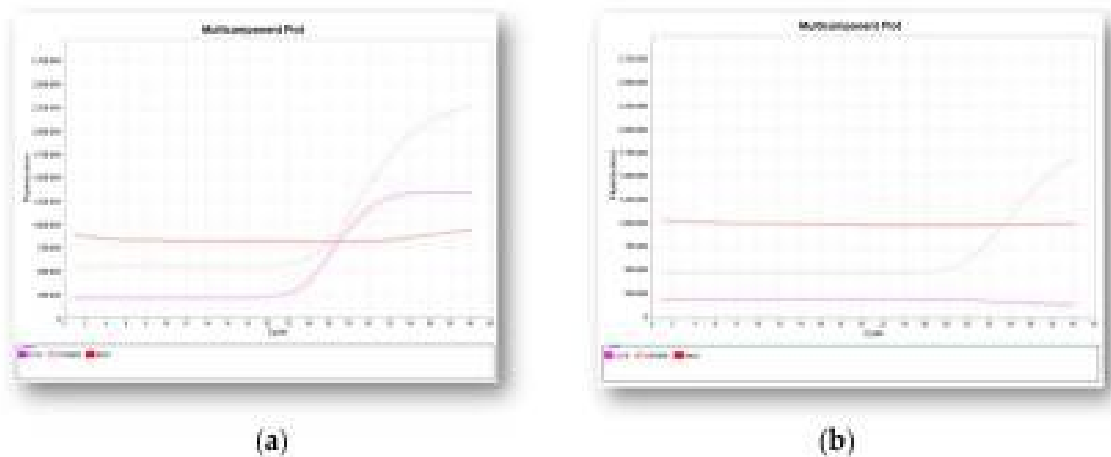


Figura 3: Due grafici rappresentativi multicomponente della PCR in tempo reale ottenuti mediante il rilevamento qualitativo dell'esone 7 nel gene *SMN1*.

Controllo interno (curva rosa), gene *SMN1* (curva viola): **(a)** è mostrato un risultato negativo con l'amplificazione del gene *SMN1*; **(b)** è riportato un risultato positivo determinato dall'assenza di amplificazione del gene *SMN1*.

In caso di risultato negativo del test NBS SMA, non sono necessarie ulteriori azioni e non vengono fornite informazioni alle famiglie, come già concordato nella politica NBS. Per confermare il risultato positivo, l'analisi del campione deve essere ripetuta brevemente. Per un test NBS SMA positivo confermato, è necessario procedere con il richiamo del neonato e l'analisi del test di conferma. Ancora più importante, per fornire informazioni riguardanti l'SMA, sul significato del risultato positivo del test e per condurre un'attenta valutazione clinica del neonato, è essenziale per la famiglia una consulenza multidisciplinare con genetisti medici, neurologi pediatrici e anche uno psicologo.

1.6 SCALE DI VALUTAZIONE MOTORIA

- Hammersmith Functional Motor Scale Expanded (**HFMSE**): si compone di 33 item classificati su una scala da 0 a 2.
 - Score 2: movimento possibile senza compensi
 - Score 1: movimenti possibili con compensi
 - Score 0: movimento non possibile

Il punteggio totale varia da 0 a un massimo di 66;

- Revised Upper Limb Module (**RULM**): il RULM valuta solo l'arto superiore, ma correla molto bene con la capacità di svolgere le attività quotidiane. Consiste in item come mettere una moneta in una tazza, raccogliere una moneta, portare una mano alla spalla, sollevare pesi e altri compiti. Il test è molto sensibile nella valutazione della forza muscolare distale. Contiene 20 elementi con un punteggio massimo di 37 punti. Il paziente sceglie l'arto preferito e gli esercizi vengono eseguiti unilateralmente. Ci vogliono circa 20 minuti. Il RULM può valutare le funzioni motorie nei pazienti affetti da SMA non deambulanti.

- 6 Minute Walking Test (**6MWT**): Il test del cammino di 6 minuti è applicabile ai pazienti affetti da SMA che possono camminare. Richiede la collaborazione del paziente, quindi non è adatto ai bambini molto piccoli. Al paziente viene chiesto di camminare per 25 metri su una superficie piana per 6 minuti il maggior numero di volte possibile. È obbligatorio un riposo di almeno 10 minuti prima dell'inizio del test. È possibile riposare durante il test ma senza sedersi. Non sono ammessi dispositivi di sostegno come ortesi o bastoni. L'analisi riguarda:
 - La distanza percorsa durante i sei minuti delle prove;
 - La distanza percorsa durante ogni minuto del test;
 - Tempo per completare ogni camminata di 25 metri;
 - Il numero di cadute;
 - La differenza tra la distanza percorsa nel primo e nell'ultimo minuto del test

I risultati vengono confrontati con quelli ottenuti da partecipanti sani abbinati in base a sesso, età, peso e altezza. Il risultato del test dipende non solo dalla forza muscolare ma anche dalle funzioni del sistema cardiopolmonare.

1.6.1 ALTRE SCALE UTILIZZATE

- **Functional Oral Intake Scale (FOIS):** è una scala di classificazione funzionale utilizzata per descrivere il livello di assunzione alimentare per via orale nei pazienti con disfagia, in particolare in ambito neurologico.

La scala non valuta direttamente la fisiopatologia della deglutizione, ma l'impatto funzionale del disturbo sulla nutrizione quotidiana.

La FOIS si articola in sette livelli gerarchici:

- Livello 1: assenza di alimentazione per os.
 - Livello 2: minima assunzione orale, non sufficiente dal punto di vista nutrizionale
 - Livello 3: alimentazione orale associata a nutrizione enterale
 - Livello 4: alimentazione orale completa limitata a un'unica consistenza
 - Livello 5: alimentazione orale completa con più consistenze, con restrizioni
 - Livello 6: alimentazione orale completa senza restrizioni di consistenza, ma con l'uso di strategie compensatorie
 - Livello 7: alimentazione orale normale, senza limitazioni o strategia
-
- **Mann Assessment of Swallowing Ability (MASA):** è scala di valutazione clinico-strumentale, finalizzata all'analisi delle abilità deglutitorie e alla stima del rischio di aspirazione nei pazienti con patologie neurologiche.

La MASA comprende 24 item, che indagano:

- Stato di coscienza e cooperazione;
- Controllo posturale del capo e del tronco;
- Funzionalità dei nervi cranici coinvolti nella deglutizione;
- Forza, mobilità e coordinazione di labbra, lingua e mandibola;
- Qualità della voce e della tosse volontaria;
- Gestione delle secrezioni salivari

Il punteggio totale varia da 0 a 200. La MASA risulta particolarmente utile nell'identificazione precoce della disfagia e nel follow-up clinico.

- La Medical Research Council Scale (**MRC**): è una scala di 6 valori per la misurazione della forza attraverso l'osservazione dei movimenti, del comportamento muscolare e la somministrazione di test manuali muscolari per i gradi 4 e 5. Questa scala di valutazione era stata sviluppata in ambito neurologico per la misurazione della forza in pazienti affetti da ferite da guerra e dalla poliomielite, ma grazie al semplice e immediato utilizzo, il suo impiego è stato esteso anche in pazienti non affetti da questa problematica.

Uno dei limiti principali della scala è dato dalla somministrazione manuale della stessa, il che rende il risultato difficilmente oggettivabile (soprattutto per i gradi 4 e 5) tra più operatori sullo stesso paziente. È utile quindi l'utilizzo dello score dallo stesso operatore al fine di misurare i cambiamenti di forza del paziente nel tempo. L' MRC Scale è costituita da un punteggio di attribuzione della forza che va da 0 a 5:

- 0: assenza di contrazione;
- 1: accenno di contrazione muscolare;
- 2: movimento attivo eliminando la forza di gravità;
- 3: movimento attivo contro la forza di gravità;
- 4: movimento attivo contro la forza di gravità e una resistenza;
- 5: forza normale.

Nel manuale "Aids to the Examination of the Peripheral Nervous System" vengono riportate tutte le procedure e le posizioni specifiche per l'applicazione della scala in ogni distretto di cui si necessita la valutazione della forza. Quando si applica questa scala occorre tenere in considerazione che è pressoché impossibile isolare l'azione muscolare di un singolo muscolo rispetto i sinergici, e che tra il 3 e 4 vi è un ampio divario, infatti, nello studio sperimentale di MacAvoy e colleghi nel 2007 emerge che:

- per flettere il gomito contro gravità basta il 4% della forza massima dei muscoli flessori;

- la forza di grado 3/5 esprime solo il 4% della forza massima dei muscoli esaminati, rappresentando un valore di forza molto basso rispetto a quello che, nella pratica clinica, si è portati a pensare applicando questa scala;
- tra il grado 3/5 e 4/5 sussiste un ampio divario perché con il grado 4/5 si sviluppa potenzialmente oltre il 96% della forza massima, facendosi che includa livelli di forza sia elevati che intermedi.

Il gold standard per la misurazione della forza resta la dinamometria isocinetica tramite l'utilizzo di dispositivi specifici, ma per via dell'assenza di costi e della facilità di applicazione, l'MRC grading system rimane un valido strumento nella pratica clinica anche nei pazienti non affetti da affezioni neurologiche.

CAPITOLO II - GENETICA E PATOGENESI

2.1 GENI SMN1 e SMN2

Le prime descrizioni cliniche dell'atrofia muscolare spinale risalgono alla seconda metà del XIX secolo. Le forme dell'adulto furono descritte inizialmente da Aran e Duchenne intorno al 1850, mentre alla fine del secolo Werdnig e Hoffmann caratterizzarono la forma infantile più grave della malattia, successivamente denominata atrofia muscolare spinale di tipo I o malattia di Werdnig-Hoffmann. Per molti anni la comprensione dei meccanismi molecolari alla base della patologia è rimasta limitata, fino allo sviluppo delle tecniche di genetica molecolare negli anni Novanta.

Nel 1990, grazie a studi di linkage genetico, il locus responsabile della SMA fu localizzato nella regione 5q13 del cromosoma 5. Successivamente, nel 1995, il gene responsabile della malattia venne identificato dal gruppo di ricerca guidato da Judith Melki presso l'Hôpital Necker-Enfants Malades di Parigi. In questo studio furono sequenziati due geni candidati presenti nella regione 5q13: il gene Survival Motor Neuron (SMN), successivamente denominato SMN1, e il gene Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein (NAIP).

L'organizzazione genomica del locus SMA nella regione del cromosoma 5q13 è particolarmente complessa. In questa regione è presente una duplicazione di circa 500 kb che determina la presenza di due copie altamente omologhe di diversi geni. In particolare, sono presenti due copie del gene SMN: una localizzata sul lato telomerico, denominata SMN1, e una sul lato centromerico, denominata SMN2. Analogamente, anche il gene NAIP è presente in due copie distinte, una telomerica e una centromerica.

Sono stati proposti diversi modelli per descrivere l'organizzazione di questa regione genomica, tra cui il modello di duplicazione invertita e il modello di duplicazione in tandem. In entrambi i casi, il gene SMN1 e la copia telomerica del gene NAIP sono

localizzati nella porzione telomerica del locus, mentre il gene SMN2 e la copia centromerica di NAIP sono localizzati nella regione centromerica. La complessità strutturale di questa regione genomica contribuisce alla variabilità genetica osservata nei pazienti affetti da SMA e rappresenta uno degli elementi chiave per comprendere i meccanismi molecolari alla base della malattia.

I geni SMN1 e SMN2 sono mostrati secondo due modelli nella figura.

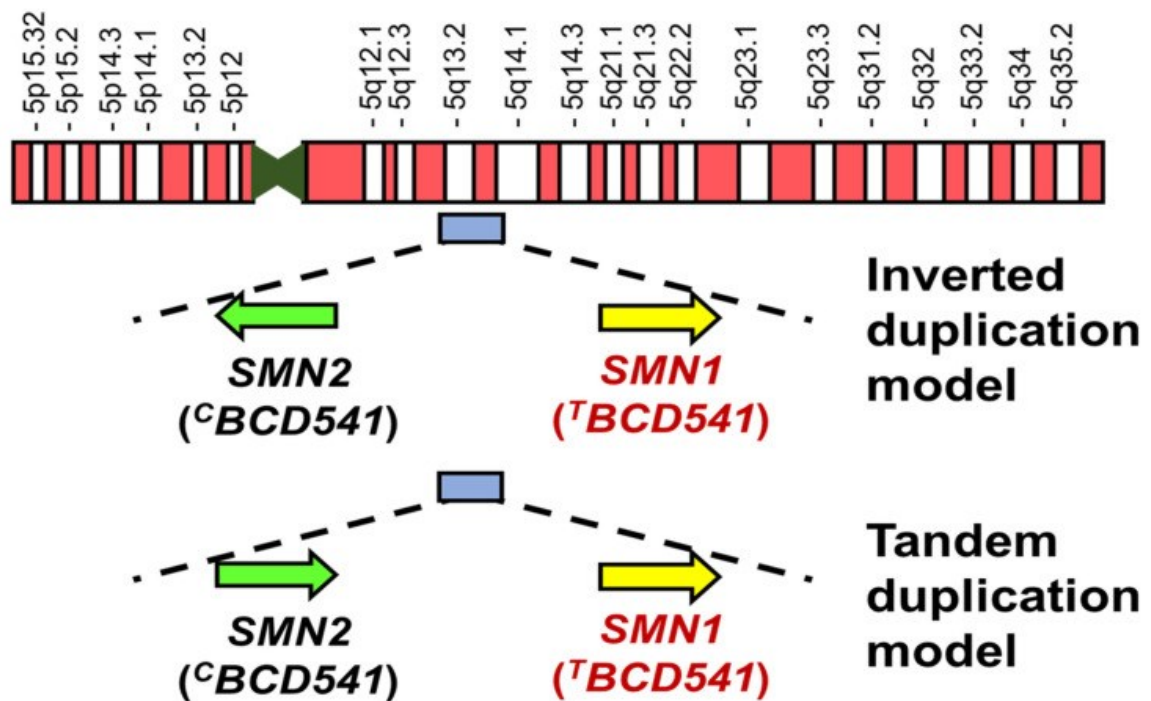


Figura 4: Geni SMN nel cromosoma 5q13

Secondo il primo rapporto di SMN1 (*Lefebvre et al.*) L'assenza completa di SMN1 (o delezione omozigote di SMN1) è stata trovata in 226 di 229 pazienti con SMA indipendentemente dai loro sottotipi clinici, e una mutazione intragenica di SMN1 è stata trovata in 3 dei 229 pazienti. Sulla base di questi risultati, è stato considerato che la mutazione SMN1 causa SMA o che SMN1 è un gene causale di SMA.

Il gene SMN1 è lungo circa 20kb ed è costituito circa da nove esoni (esoni 1, 2°, 2b, 3, 4, 5, 6, 7 e 8). Il codone di inizio della traduzione (ATG) e il codone di terminazione (TAA) si trovano rispettivamente negli esoni 1 e 7. Il gene codifica per la proteina SMN che comprende 294 amminoacidi ed è lunga 38kDa.

2.2 GENE MODIFICATORE DI SMA: SMN2

SMN1 è presente sul lato telomerico, mentre il gene omologo centromerico è SMN2. Questi geni hanno quasi la stessa sequenza nucleotidica, l'unica differenza è stata riscontrata nella regione codificante a livello della sesta posizione nucleotidica nell'esone 7 (c.840C in SMN1 e c840T in SMN2). La transizione da C a T nell'esone 7 di SMN2 è una sostituzione sinonima che non causa un cambiamento di amminoacido; SMN2 è in grado di produrre SMN funzionale.

Lefebvre et al. hanno riportato nel loro articolo sulla scoperta di SMN1 che l'assenza di SMN2 è stata osservata nel 5% degli individui di controllo e nello 0% dei pazienti con SMA. Secondo i risultati sperimentali utilizzando topi modello SMA, il knockout di SMN (-/-) è embrionicamente letale, ma l'introduzione di SMN2 umano salva l'embrione. Pertanto, SM2 può produrre una certa quantità di proteina SMN funzionale nello stadio embrionale dei pazienti, salvando la morte embrionale o fetale.

In particolare, la presenza di SMN2 non compensa completamente l'assenza di SMN1 nei pazienti con SMA. Sebbene la transizione da C a T in SMN2 sia sinonima, ciò non significa che SMN1 e SMN2 funzionino allo stesso modo.

SMN1 produce trascrizioni a lunghezza intera e SMN2 produce principalmente mRNA privo dell'esone 7 perché la transizione da C a T (o transizione da C a U nel pre-mRNA) dell'esone 7 di SMN2 inibisce lo splicing alternativo dell'esone stesso. Il prodotto principale di SMN2 è un mRNA troncato privo dell'esone 7 ($\Delta 7$ -SMN2 mRNA) e il prodotto minore è un mRNA SMN2 a lunghezza intera. Pertanto, il prodotto proteico principale è SMN troncato da $\Delta 7$ -SMN2 mRNA, e il prodotto proteico minore è una proteina SMN di lunghezza intera da mRNA SMN2 a lunghezza intera.

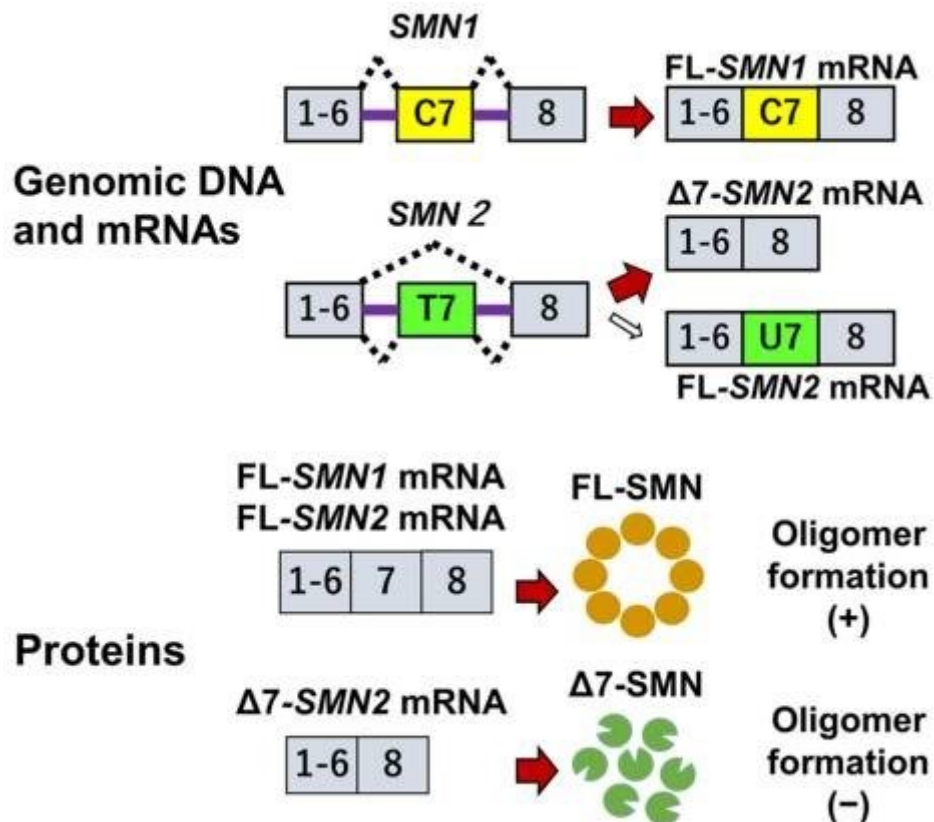


Figura 5: splicing alternativo dei geni SMN e dei suoi prodotti proteici.

Come calcolato utilizzando i dati del sangue dei pazienti con SMA (Crawford TO et al, 2012), SMN2 produce circa l'80% al 90% di mRNA $\Delta 7$ -SMN e dal 10% al 20% di mRNA SMN a lunghezza intera. Tuttavia a livello proteico, la proteina $\Delta 7$ -SMN è una proteina instabile e quasi non rilevabile inoltre, un ciclo di feedback regola lo splicing del trascritto SMN2 e bassi livelli di proteina SMN a lunghezza intera possono esacerbare il salto dell'esone 7 di SMN2, portando a un'ulteriore riduzione della proteina SMN a lunghezza intera. Questa è il motivo per cui la presenza di SMN2 non compensa completamente l'assenza di SMN1 nei pazienti con SMA. Tuttavia, un aumento del numero di copie di SMN2 può produrre più proteine SMN a lunghezza intera migliorando il fenotipo SMA.

Cartegni e Krainer hanno proposto una teoria dell'interruzione del motivo enhancer dello splicing esonico (ESE) da parte della transizione da C a T. Il motivo ESE è un elemento cis-agente che facilita l'inclusione dell'esone insieme a un fattore trans-

agente chiamato proteina SF2/ASF. Kashima e Manley hanno proposto una teoria della creazione del motivo silencer dello splicing esonico (ESS) da parte della transizione da C a T. Il motivo ESS è un elemento cis-agente che facilita l'esclusione dell'esone insieme a un fattore trans-agente chiamato RNP nucleare eterogeneo (hnRNP) A1/2. Infine, la transizione da C a T modifica le condizioni del legame U2AF e del reclutamento di snRNP sul sito di splicing 3'.

È noto che la proteina SMN a lunghezza intera oligomerizza e forma un complesso proteico multimerico. Tuttavia, è difficile per la proteina $\Delta 7$ -SMN oligomerizzare. I difetti di oligomerizzazione di SMN sono correlati alla gravità dell'SMA. Utilizzando l'analisi pulse-chase, Burnett et al. hanno esplorato la stabilità e la degradazione delle proteine SMN e $\Delta 7$ -SMN a lunghezza intera. La proteina SMN viene degradata dal sistema dell'ubiquitina proteasoma e la proteina $\Delta 7$ -SMN ha un'emivita due volte più breve rispetto alla proteina SMN a lunghezza intera all'interno delle cellule. Inoltre, quando le mutazioni inibiscono la formazione del complesso proteico SMN con le proteine partner, la stabilità della proteina SMN può diminuire.

La transizione da C a T in *SMN2* è una sostituzione sinonima, ciò significa che *SMN2* può produrre lo stesso SMN a lunghezza intera prodotto da *SMN1*. Velasco et al. hanno trovato un rapporto più elevato di dosaggio del gene *SMN2/SMN1* nei genitori di pazienti con SMA di tipo II e III rispetto ai genitori di quelli con tipo I. Sulla base di questa scoperta, hanno presentato l'ipotesi che l'esistenza di copie multiple del gene *SMN2* possa compensare la delezione del gene *SMN1*, modificando la gravità della SMA. Questa ipotesi è stata supportata da molti ricercatori.

Arnold et al. Hanno semplificato i dati riportati sulla correlazione tra fenotipo e numero di copie di *SMN2*; almeno una copia di *SMN2* è necessaria per sviluppare SMA (o prevenire la morte embrionale) e i neonati con la forma più grave della malattia (tipo 0) di solito hanno solo una copia. I neonati con SMA di tipo I di solito hanno due o tre copie di *SMN2*. La SMA di tipo II è solitamente associata a tre copie. I pazienti con SMA di tipo III hanno tre o quattro copie e i pazienti con SMA di tipo IV di solito hanno almeno quattro copie. Tuttavia, nel mondo reale, molti pazienti a

cui è stata diagnosticata clinicamente la SMA di tipo IV non vengono testati per i geni SMN1 e SMN2 e potrebbero presentare altre anomalie genetiche.

In particolare, la correlazione tra fenotipo e numero di copie di SMN2 non è assoluta. Alcuni pazienti con due copie di SMN2 presentano fenotipi SMA più lievi, mentre alcuni con tre copie del gene sono stati descritti come affetti da SMA di tipo 1. Questi risultati suggeriscono che il numero di copie di SMN2 non è funzionalmente equivalente tra i pazienti con SMA o altri modificatori genetici al di fuori di SMN2 possono contribuire alla progressione della malattia.

La correlazione inversa tra il numero di copie di SMN2 e la gravità dell'SMA è applicabile ai pazienti con delezione completa di SMN1. Tuttavia, va anche notato che il numero di copie di SMN2 non è necessariamente correlato alla gravità nei pazienti con mutazioni intrageniche di SMN1.

2.3 ESPRESSIONE NEI TESSUTI E LOCALIZZAZIONE SUBCELLULARE

Studi successivi hanno dimostrato che nei pazienti affetti da atrofia muscolare spinale (SMA) la quantità di SMN è fortemente ridotta sia in linee cellulari linfoblastoidi sia in tessuti come fegato e midollo (Lefebvre et al. Nat. E Gen. 1997). Questa proteina è ubiquitaria, ma la sua carenza provoca in modo selettivo la degenerazione di queste cellule nervose, suggerendo una particolare vulnerabilità del sistema motorio.

Dal punto di vista subcellulare, Liu e Dreyfuss hanno scoperto che la proteina SMN è presente sia nel citoplasma sia in particolari strutture del nucleo chiamate “gems” (Gemini of Cajal bodies), così nominate perché sono simili in numero (2-6) e dimensioni (0,1-1 um) e si trovano frequentemente vicino o associati ai corpi di Cajal. Queste strutture sono implicate nella biogenesi delle piccole ribonucleoproteine nucleari (snRNP), elementi essenziali per lo splicing del pre-mRNA, una delle funzioni molecolari principali della SMN (Liu, Dreyfuss et al. EMBO J. 1996).

2.4 ESPRESSIONE DELLA PROTEINA NEL PERIODO FETALE

Le indagini condotte (burlett et al. Mol e Gen. 1998) hanno evidenziato come, in diversi distretti tissutali: tra cui muscolo scheletrico, cuore, reni, timo, pancreas e polmoni, la proteina SMN presenti una concentrazione significativamente più alta nel cervello durante la fase fetale rispetto al periodo successivo alla nascita.

(Ramos et al. J.Clin. Investig. 2019) hanno anche quantificato i livelli di proteine SMN in campioni di midollo spinale isolati durante autopsie accelerate. I risultati hanno mostrato che, oltre il terzo mese di vita, l'espressione di SMN si stabilizza su valori decisamente inferiori rispetto a quelli rilevati in epoca prenatale.

In termini comparativi, i dati indicano che nei campioni prenatali la quantità di SMN è mediamente più che doppia rispetto a quella registrata nei soggetti di età inferiore a tre mesi, e addirittura oltre sei volte superiore rispetto ai valori riscontrati nei soggetti di età compresa tra tre mesi e quattordici anni. Questa distribuzione temporale evidenzia un picco di espressione durante lo sviluppo intrauterino, seguito da un calo rapido e consistente nella fase postnatale, in particolare dopo i primi mesi di vita.

CAPITOLO III - TERAPIA

L'ultimo decennio di ricerca preclinica per i trattamenti dell'SMA ha portato a significativi progressi nella comprensione dei meccanismi biologici, cellulari, e genetici alla base dell'SMA. Nonostante queste conoscenze, diverse sfide hanno reso difficile lo sviluppo di farmaci. L'SMA comprende un ampio spettro di fenotipi e

un'ampia popolazione che sviluppa l'esordio dei sintomi durante l'infanzia. Inoltre, il trattamento terapeutico deve essere in grado di colpire efficacemente i tessuti rilevanti per la malattia (come i somi degli alpha-motoneuroni inferiori nel sistema nervoso centrale e le giunzioni neuromuscolari nel sistema nervoso periferico). Studi genotipo/fenotipo sull'uomo e indagini precliniche hanno dimostrato che il miglior approccio terapeutico per prevenire o migliorare la progressione della malattia è attraverso l'aumento dei livelli di SMN. Studi su modelli animali suggeriscono che anche un aumento relativamente modesto di SMN, se somministrato precocemente, produce miglioramenti clinicamente significativi.

In particolare, nonostante l'intervento precoce sia cruciale per un miglioramento ottimale, i modelli animali suggeriscono che il ripristino dell'SMN in età avanzata può ancora fornire qualche beneficio terapeutico.

Il primo trattamento basato sull'SMN approvato dalla FDA è diventato disponibile nel dicembre 2016 e nei quattro anni successivi a questa approvazione, sono seguiti diversi altri candidati promettenti e altre due terapie approvate dalla FDA

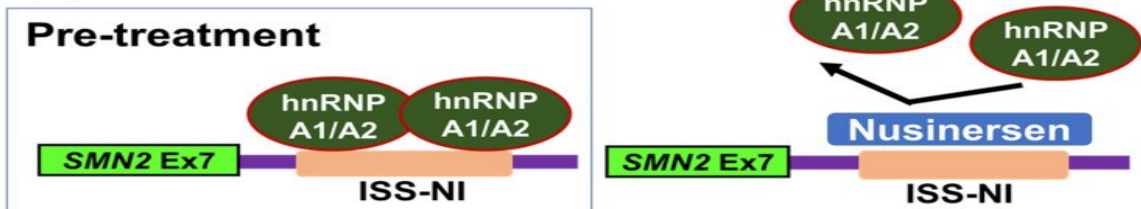
3.1 FARMACI SMN-TARGET

NUSINERSEN: UN OLIGONUOCLEOTIDE ANTISENSO

Nusinersen (Spinraza) è un farmaco ASO che ha come bersaglio un sito ISS nell'introne 7 di *SMN2*, ISS-N1. Per la somministrazione dei farmaci è necessaria l'iniezione diretta nel liquido cerebrospinale all'interno dello spazio intratecale poiché gli ASO non attraversano la barriera emato-encefalica intatta. Pertanto, nusinersen viene iniettato per via intratecale tre o quattro volte nell'arco di due mesi durante il periodo di carico iniziale e ogni quattro o sei mesi durante il periodo di mantenimento. Nusinersen utilizza un filamento sintetico di acidi nucleici legati tra loro da uno scheletro 2'O-metossietile che funziona riconoscendo e legandosi all'RNA cellulare per correggere lo splicing genico. Nusinersen utilizza l'appaiamento Watson-Crick per legare specificamente la sequenza ISS-N1 (intronic splicing silencer-N1) in *SMN2*, che è un importante elemento inibitorio che regola lo splicing dell'esone 7. ISS-N1 ha

dimostrato di essere un modello bersaglio per gli ASO per aumentare il rapporto della proteina SMN a lunghezza intera derivata dai trascritti *SMN2*, poiché l'inibizione di ISS-N1 determina l'inclusione dell'esone 7 nei trascritti *SMN2 maturi*.

(1) Hua model



(2) Singh model

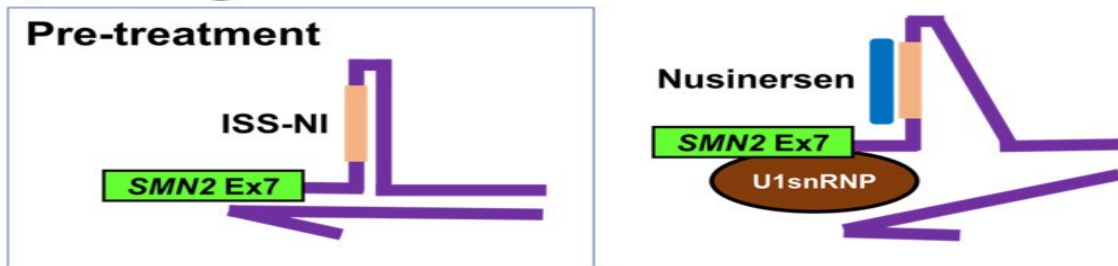


Figura 6: L'immagine sopra mostra come Nusinersen interagisce con il gene *SMN2* per ripristinare i livelli di proteina SMN.

Legandosi sulla regione ISS-N1 su *SMN2*, l'ASO è in grado di impedire lo splicing e quindi includere l'esone 7 nella trascrizione finale. Ciò consente la traduzione di un SMN completo, funzionale e stabile proteina

Lo studio CS3B (ENDEAR) è stato uno studio di fase 3, randomizzato, in doppio cieco, controllato con procedura simulata, condotto in 121 neonati sintomatici di età ≤ 7 mesi, con diagnosi di SMA (insorgenza dei sintomi prima dei 6 mesi di età). Lo studio CS3B è stato progettato per valutare l'effetto di Spinraza sulla funzione motoria e sulla sopravvivenza. I pazienti sono stati randomizzati in rapporto 2:1 al gruppo Spinraza (secondo il regime posologico approvato) o al gruppo di controllo con procedura simulata, per una durata di trattamento compresa tra 6 e 442 giorni.

I neonati presentavano una delezione o mutazione *SMN1*, due copie di *SMN2* e hanno sviluppato sintomi entro i 6 mesi di età. Gli endpoint primari erano la percentuale di responder alle tappe motorie (valutata dalla Hammersmith Infant Neurological

Examination Section 2 (HINE2) e la sopravvivenza libera da eventi (valutata in base al tempo fino al decesso o all'uso di supporto ventilatorio permanente). Gli endpoint secondari includevano analisi di sottogruppo della sopravvivenza globale e dei tassi di sopravvivenza libera da eventi in base alla durata della malattia allo screening. L'ultima valutazione è stata eseguita il giorno 394 dopo l'inizio del trattamento. Nell'analisi finale, una percentuale significativamente maggiore di neonati nel gruppo nusinersen rispetto al gruppo di controllo ha mostrato una risposta motoria miliare (rispettivamente 37 su 73 [51%] contro 0 su 37 [0%] neonati). Il tasso di sopravvivenza libera da eventi è stato significativamente più alto nel gruppo nusinersen rispetto al gruppo di controllo. Anche il tasso di sopravvivenza globale è stato significativamente più alto nel gruppo nusinersen rispetto al gruppo di controllo. In particolare, i neonati con una durata di malattia più breve allo screening avevano maggiori probabilità di trarre beneficio dal nusinersen rispetto a quelli con una durata di malattia più lunga.

Lo studio CHERISH ha arruolato 126 bambini con SMA di tipo II e III; due terzi (n = 84) sono stati trattati con nusinersen e un terzo (n = 42) ha ricevuto un trattamento placebo. I bambini presentavano delezioni o mutazioni nel gene SMN1 e due o più copie di SMN2; la maggior parte era portatrice di tre copie di SMN2. I sintomi erano comparsi dopo i 6 mesi di età e, allo screening, i partecipanti presentavano le seguenti caratteristiche: età compresa tra 2 e 12 anni, capacità di sedersi in modo indipendente ma nessuna storia di deambulazione autonoma.

L'endpoint primario era la variazione media dei minimi quadrati rispetto al basale nel punteggio della Hammersmith Expanded Functional Motor Scale (HFMSE) a 15 mesi dall'inizio del trattamento. L'endpoint secondario era la percentuale di bambini con un aumento clinicamente significativo del punteggio HFMSE rispetto al basale (≥ 3 punti, indicativi di un miglioramento in almeno due abilità motorie).

All'analisi intermedia, il gruppo trattato con nusinersen ha mostrato un aumento medio dei minimi quadrati di 4,0 punti nel punteggio HFMSE dal basale al mese 15, mentre il gruppo di controllo ha mostrato una diminuzione media (-1,9 punti). Questa differenza tra i gruppi è risultata significativa e a favore di nusinersen (differenza media dei minimi quadrati nella variazione: 5,9 punti; intervallo di confidenza al 95%: 3,7-8,1; $p < 0,001$).

All'analisi finale, il 57% dei bambini nel gruppo nusinersen ha mostrato un aumento del punteggio HFMSE di almeno 3 punti dal basale al mese 15, rispetto al 26% dei bambini nel gruppo di controllo ($p < 0,001$).

Lo studio NURTURE ha arruolato 25 bambini con SMA diagnosticata geneticamente, che presentavano delezioni o mutazioni nel gene SMN1 e due o tre copie di SMN2. L'endpoint primario dello studio era il tempo al decesso o alla necessità di intervento respiratorio (ventilazione invasiva o non invasiva per ≥ 6 ore al giorno in modo continuativo per ≥ 7 giorni, oppure tracheostomia).

Gli endpoint secondari includevano la percentuale di partecipanti vivi, il raggiungimento delle tappe motorie e il mantenimento del peso corporeo. Le tappe motorie sono state valutate mediante i criteri dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), la scala HINE-2 e la Children's Hospital of Philadelphia Infant Test of Neuromuscular Disorders (CHOP INTEND).

Ai partecipanti è stato somministrato nusinersen per la prima volta nella prima infanzia, quando erano ancora presintomatici. Al momento della pubblicazione dei risultati dello studio, i bambini avevano già superato l'età prevista per l'insorgenza dei sintomi della SMA di tipo I o II. Tutti i partecipanti erano vivi e nessuno necessitava di ventilazione continua. Inoltre, tutti avevano raggiunto la capacità di sedersi senza supporto; 23 (92%) erano in grado di camminare con assistenza e 22 (88%) di camminare in modo indipendente.

Questi risultati sottolineano l'importanza di un trattamento precoce con nusinersen subito dopo la diagnosi genetica di SMA nella fase presintomatica della prima infanzia e suggeriscono il potenziale valore dello screening neonatale per la SMA.

ONASEMNOGENE ABEPARVOVEC

Onasemnogene abeparvovec è il successivo nuovo farmaco introdotto nella pratica clinica dopo nusinersen. È stato approvato negli stati uniti nel 2019 e in Europa e Giappone nel 2020.

Onasemnogene abeparvovec è un farmaco basato su un vettore scAAV9 in grado di attraversare la barriera emato-encefalica. I vettori AAV non si integrano nel DNA dell'ospite. Dopo essere entrato nella cellula ospite, il vettore AAV si trasloca nel

nucleo, dove il transgene agisce come un episoma (un piccolo cromosoma stabile separato dal cromosoma nativo).

Tuttavia, l'efficienza di espressione genica dei vettori AAV che impacchettano DNA a singolo filamento non è elevata. Questo perché il DNA a doppio filamento deve essere sintetizzato prima dell'espressione genica.

In onasemnogene abeparvovec, per aumentare l'efficienza dell'espressione genica, il vettore scAAV (AAV autocomplementare) impacchetta il genoma a doppio filamento. Inoltre, l'ITR scAAV aumenta la velocità con cui il transgene a doppio filamento viene trascritto e la proteina risultante viene prodotta. L'enhancer CMV ibrido e il promotore CB attivano il transgene per consentire un'espressione proteica SMN continua e sostenuta.

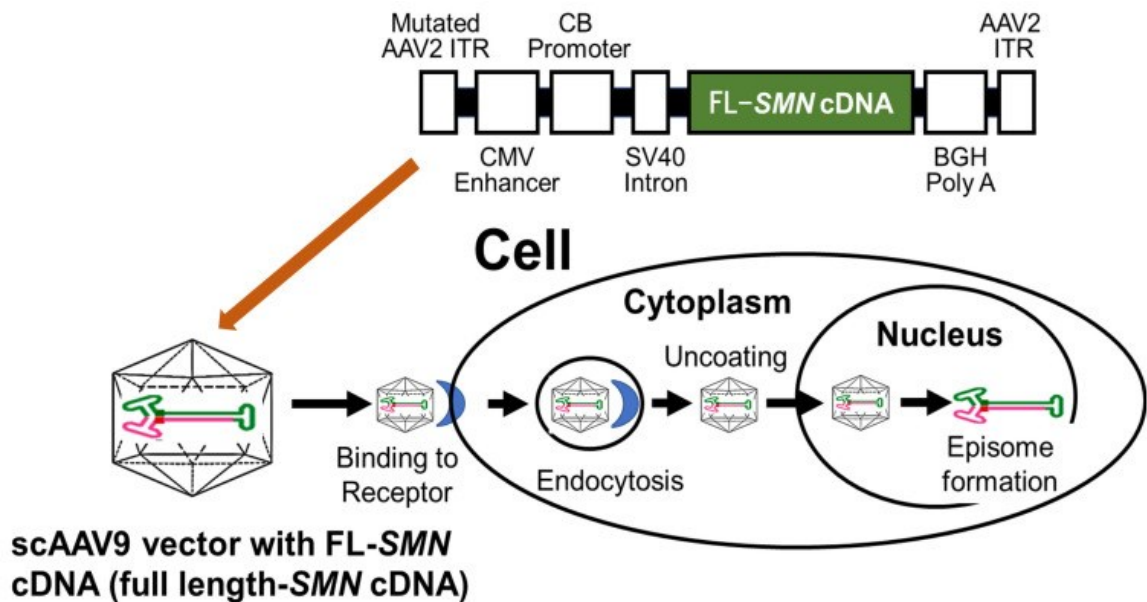


Figura 7: Meccanismo d'azione di onasemnogene abeparvovec.

Le abbreviazioni sono le seguenti: AAV2 (virus adeno-associato sierotipo 2); AAV9 (AAV sierotipo 9); BGH Poly A (poliadenilazione dell'ormone della crescita bovino); CB (β -actina di pollo); cDNA (DNA complementare); CMV (citomegalovirus); ITR (ripetizione terminale invertita); scAAV (AAV autocomplementare); SV (virus della scimmia).

Lo studio START ha arruolato 15 neonati con SMA di tipo I che presentavano delezioni nel gene SMN1 e due copie di SMN2. I partecipanti sono stati suddivisi in

due coorti di trattamento con onasemnogene abeparvovec: una coorte a basso dosaggio e una coorte ad alto dosaggio. L'età media dei neonati nella coorte a basso dosaggio era di 6,3 mesi (intervallo 5,9–7,2 mesi), mentre nella coorte ad alto dosaggio era di 3,4 mesi (intervallo 0,9–7,9 mesi).

L'endpoint primario dello studio era la sicurezza del trattamento, mentre l'endpoint secondario era il tempo al decesso o alla necessità di ventilazione permanente. Nelle analisi esplorative, i punteggi della funzione motoria valutati mediante la scala CHOP INTEND sono stati confrontati tra le due coorti; inoltre, le tappe motorie della coorte ad alto dosaggio sono state confrontate con quelle riportate negli studi sulla storia naturale della malattia (coorti storiche).

Nel gruppo trattato con la dose più elevata si è osservato un rapido aumento del punteggio CHOP INTEND rispetto al basale dopo la terapia genica (incremento di 9,8 punti a 1 mese e di 15,4 punti a 3 mesi). Al contrario, nei gruppi di controllo storici questo punteggio tendeva a diminuire. Dei 12 pazienti trattati con il dosaggio più elevato, 11 erano in grado di sedersi senza assistenza, 9 di girarsi su un fianco, 11 di alimentarsi per via orale e di parlare, e 2 di camminare autonomamente.

I risultati dell'estensione a 5 anni dello studio START sono stati successivamente riportati. Il follow-up ha evidenziato che 10 pazienti della coorte ad alto dosaggio (le famiglie di 2 pazienti hanno rifiutato la partecipazione al follow-up) erano vivi e non necessitavano di ventilazione permanente. Inoltre, i traguardi motori raggiunti durante lo studio START sono stati mantenuti nel follow-up a lungo termine; due pazienti hanno inoltre raggiunto un nuovo traguardo motorio, ossia la stazione eretta con assistenza.

Lo studio START ha mostrato un miglioramento significativo della funzione motoria nei pazienti della coorte ad alto dosaggio trattati prima dei 3 mesi di età (trattamento precoce) e con una funzione motoria relativamente elevata al momento del trattamento (punteggio CHOP INTEND ≥ 20). Al contrario, nei pazienti trattati dopo i 3 mesi di età o con una funzione motoria più bassa al momento del trattamento (punteggio CHOP INTEND < 20) il miglioramento della funzione motoria è risultato limitato, anche all'interno della coorte ad alto dosaggio.

Pertanto, due fattori sembrano influenzare la prognosi della funzione motoria: il momento del trattamento (precoce o tardivo) e il livello di funzione motoria al momento dell'inizio della terapia.

RISDIPLAM

Risdiplam (Evrysdi) è il terzo farmaco introdotto nella pratica clinica, ma è il primo farmaco da prescrizione approvato dalla FDA. È stato approvato negli Stati Uniti nel 2020 e in Europa e in Giappone nel 2021. Originariamente approvato per il trattamento di pazienti con SMA di età superiore a 2 mesi, è ora approvato negli Stati Uniti per pazienti pediatrici e adulti con SMA di tutte le età.

Risdiplam è una soluzione orale contenente un composto a piccole molecole che modifica lo splicing del pre-mRNA *SMN2*. *Questo medicinale viene somministrato una volta al giorno; il dosaggio dipende dall'età e dal peso corporeo.*

Il risdiplam è distribuito nelle cellule centrali e periferiche e agisce nel nucleo, regola lo splicing alternativo di *SMN2*. Tuttavia, non c'è consenso sul meccanismo con cui il risdiplam promuove l'inclusione dell'esone 7 di *SMN2* con elevata specificità.

Studi precedenti hanno suggerito che potrebbe agire su due regioni dell'esone 7 di *SMN2* per uno splicing del pre-mRNA altamente selettivo. Nel pre-mRNA di *SMN2*, l'esone 7 e le sue regioni fiancheggianti hanno due strutture a forcina: forcina terminale 1 (TSL1) vicino al sito di splicing 3' e forcina terminale 2 (TSL2) vicino al sito di splicing 5' e sono strettamente correlate allo splicing alternativo dell'esone 7 di *SMN2*. Il risdiplam potrebbe influenzare queste strutture a forcina.

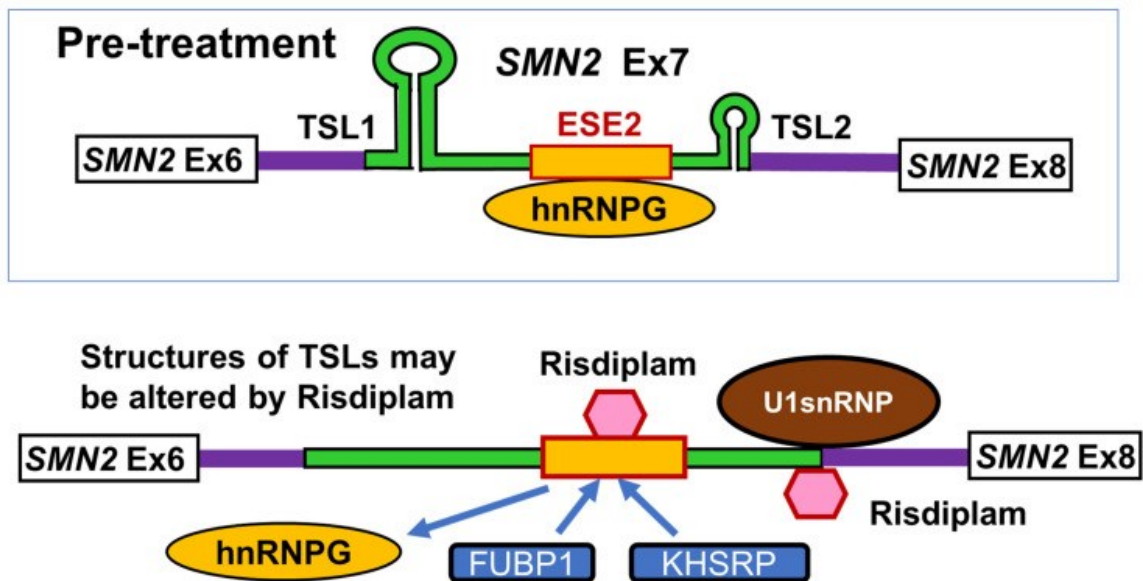


Figura 8: meccanismo d'azione di risdiplam

La prima regione è il sito di splicing 5' dell'esone 7 del pre-mRNA trascritto dal gene *SMN2*. Un analogo del risdiplam può legarsi alla struttura a forcina, TSL2, all'estremità dell'esone 7 di *SMN2* e stabilizzare il duplex della sequenza di RNA del sito di splicing 5' e della sequenza di RNA U1 snRNP e promuovere l'inizio dello splicing.

La seconda regione è la struttura interna attorno all'enhancer di splicing esonico 2 (ESE2) al centro dell'esone 7 di *SMN2*. Un analogo del risdiplam si lega alla regione ESE2, che altera la struttura a forcina, TSL1, nella prima metà dell'esone 7 di *SMN2*. Gli analoghi del risdiplam legati alla regione ESE2 inibiscono il legame della proteina hnRNP promuovendo al contempo il legame di due proteine regolatrici dello splicing: la proteina legante l'elemento a monte lontano 1 (FUBP1) e il suo omologo, la proteina regolatrice dello splicing di tipo KH (KHSRP). TSL1 include un elemento cis-agente che sopprime lo splicing dell'esone 7 di *SMN2*, mentre le proteine FUBP1 e KHSRP sono fattori trans-agenti che promuovono lo splicing dell'esone 7 di *SMN2*.

PICCOLE MOLECOLE

Le piccole molecole che modulano lo splicing del gene SMN2 stanno entrando nella fase clinica. Il principale vantaggio di questi farmaci è la possibilità di somministrazione orale. Mentre la somministrazione intratecale di nusinersen limita il suo effetto principalmente ai motoneuroni del sistema nervoso centrale, la distribuzione sistemica ottenuta con la somministrazione orale consente di agire anche su altri tessuti dell'organismo.

Tuttavia, uno svantaggio potenziale è rappresentato dalla comparsa di effetti indesiderati, poiché queste piccole molecole potrebbero teoricamente modulare la trascrizione di altri geni. Per ridurre questo rischio, è stato condotto uno screening in vitro ad alta produttività volto a identificare molecole altamente specifiche per l'inclusione dell'esone 7, che ha portato all'identificazione di RG7800 e RG7916.

- RG7800. La sicurezza, la tollerabilità, la farmacocinetica e la farmacodinamica di RG7800 sono state valutate in uno studio multicentrico, randomizzato, in doppio cieco, controllato con placebo e a dosi multiple. Lo studio prevedeva una finestra di trattamento di 12 settimane in pazienti adulti e pediatrici affetti da SMA (studio MOONFISH, condotto tra il 2014 e il 2015). Dopo una singola dose del composto, i livelli di mRNA SMN2 a lunghezza intera sono aumentati significativamente in modo dose-dipendente. Tuttavia, studi preclinici hanno mostrato che il trattamento a lungo termine (39 settimane) con RG7800 nelle scimmie era associato a tossicità oculare; di conseguenza, lo studio clinico è stato interrotto poco dopo l'arruolamento del primo gruppo di pazienti.
- RG7916. Uno studio di fase I condotto su volontari sani ha permesso di identificare il dosaggio ottimale di RG7916 e ha dimostrato che il farmaco aumenta i livelli di mRNA di SMN2 negli esseri umani in modo dose-dipendente. Successivamente sono stati avviati tre studi di fase II per valutare la sicurezza e l'efficacia di RG7916 nei pazienti con SMA di tipo I, II e III. Lo studio SUNFISH, avviato nel 2016, valuta la sicurezza, la tollerabilità e l'efficacia di RG7916 in pazienti non deambulanti con SMA di tipo II e III di età compresa tra 2 e 25 anni. La Parte 1 dello studio SUNFISH valuta la

sicurezza, la farmacodinamica, la farmacocinetica e il dosaggio ottimale del farmaco, mentre nella Parte 2 l'efficacia viene valutata rispetto al placebo con una randomizzazione 2:1. Lo studio FIREFISH, iniziato nel 2016, è uno studio in aperto che valuta l'efficacia di RG7916 in pazienti con SMA di tipo I di età compresa tra 1 e 7 mesi e con due copie del gene SMN2. Nella Parte 1 vengono valutati dosaggi crescenti del farmaco, mentre nella Parte 2 viene studiata l'efficacia al dosaggio selezionato.

Infine, lo studio JEWELFISH, avviato nel 2017, è uno studio esplorativo in aperto che valuta la sicurezza e l'efficacia di RG7916 in pazienti con SMA che hanno precedentemente partecipato a studi clinici con terapie mirate al gene SMN2.

3.2 FARMACI NON SMN-TARGET

Le terapie basate su SMN rimangono in prima linea nelle strategie di trattamento, ma non tutti i pazienti che ricevono farmaci dipendenti da SMN sperimentano un sollievo sintomatico completo. Inoltre, non tutti gli individui con mutazioni/delezioni bialleliche di SMN1 sono idonei alla copertura assicurativa per le terapie geniche mirate. Il rischio di effetti collaterali potenzialmente gravi ha portato ad un dibattito sul trattamento dei neonati presintomatici con quattro o più copie di SMN2. Tuttavia, questi individui possono comunque sviluppare disfunzioni motorie e quindi potrebbero beneficiare della terapia.

Un'altra popolazione di pazienti affetti da SMA per la quale è stata sollevata la questione dell'idoneità ai trattamenti è quella degli adulti che hanno già subito una significativa perdita di motoneuroni e che potrebbero non trarre un beneficio sostanziale dagli approcci terapeutici basati su SMN. Per questi motivi, sono state studiate numerose strategie terapeutiche indipendenti da SMN.

STRATEGIE NEUROPROTETTIVE

Esistono tre agenti neuroprotettivi approvati per l'uso in altre malattie che sono stati testati per l'efficacia nei pazienti con SMA:

- IL GABAPENTIN, un anticonvulsivante usato per trattare il dolore neuropatico, è stato valutato per la sua capacità di diminuire la segnalazione del glutammato e quindi diminuire l'eccitotossicità. Tuttavia, due ampi studi clinici composti da pazienti con SMA di tipo II-III hanno dimostrato effetti minimi sulla funzione motoria;
- IL RILUZOLO, è stato utilizzato per trattare pazienti con SLA con alcuni benefici. L'uso del riluzolo in modelli animali di SMA è apparso promettente, dove è stato in grado di migliorare i difetti neuromuscolari in un modello *di C. elegans* e la durata della vita e l'organizzazione del citoscheletro in un modello di topo.
- L'OLESOXIMA, è una molecola lipofila che agisce a livello dei mitocondri dei neuroni in particolare: si lega a proteine mitocondriali come VDAC (Voltage-Dependent Anion Channel) e TSPO, stabilizza la membrana mitocondriale, riduce la liberazione di fattori pro-apoptotici. Abbiamo diversi studi: NCT01302600 (condotto tra il 2014 e il 2017) e NCT02628743 (iniziato nel 2017).

STRATEGIE MIRATE AI MUSCOLI

Dato il ruolo intrinseco di SMN nello sviluppo neuromuscolare, sono state ampiamente esplorate strategie che migliorano la funzione muscolare.

La miostatina è un membro della superfamiglia del fattore di crescita trasformante β ed è prevalentemente sintetizzata ed espressa nel muscolo scheletrico. La miostatina agisce come un regolatore negativo endogeno della crescita e delle dimensioni del muscolo scheletrico ed è neutralizzata dalla glicoproteina autocrina follistatina e dal propeptide della miostatina. Studi che hanno valutato i benefici della somministrazione di follistatina ricombinante a topi SMN Δ 7 hanno osservato miglioramenti nella durata della vita, nella funzione motoria e nella morte dei motoneuroni.

- SRK-015, un anticorpo monoclonale che blocca l'attivazione della forma latente della miostatina piuttosto che inibire la forma matura. Studi preclinici su un modello murino di SMA indotta farmacologicamente hanno dimostrato che sia la somministrazione precoce che tardiva di muSRK-015P (una variante subottimale di SRK-015) aumentano la massa muscolare e la funzione motoria. È in corso uno studio clinico per valutare i benefici di SRK-015 somministrato per via endovenosa a pazienti di tipo II-III (NCT03921528).

Un altro approccio incentrato sul muscolo utilizza attivatori rapidi della troponina, aumentano l'affinità per il calcio del complesso regolatore troponina-tropomiosina, che determina la sensibilizzazione del sarcomero alle concentrazioni di calcio e migliora la contrattilità del muscolo scheletrico e le prestazioni muscolari.

- RELDESEMPTIV (CK-2127107), un attivatore rapido della troponina scheletrica di seconda generazione, ha dimostrato di aumentare la produzione di forza da parte del tibiale anteriore in seguito alla stimolazione transcutanea del nervo peroneo profondo in adulti sani. Gli studi clinici per Reldesemtiv hanno completato la fase 2 (NCT02644668).

CAPITOLO IV - OBIETTIVO DELLO STUDIO

Il presente studio si propone di approfondire la caratterizzazione clinica, funzionale e respiratoria della SMA 5q nell'età adulta, con particolare attenzione all'eterogeneità fenotipica delle forme SMA II-IV.

In particolare gli obiettivi dello studio sono:

- Descrivere le caratteristiche cliniche e funzionali dei pazienti adulti con SMA, analizzando stato motorio, funzione respiratoria e distribuzione della debolezza muscolare;
- Valutare la relazione tra parametri funzionali motori e funzione respiratoria, mediante l'analisi delle principali scale cliniche utilizzate nella pratica neuromuscolare (HFMSE, RULM, MRC e FVC%);
- Analizzare l'associazione tra numero di copie di SMN2 e manifestazioni clinico-funzionali nella popolazione adulta;
- Esplorare l'effetto dell'età sui parametri funzionali, con particolare attenzione alle modificazioni motorie e respiratorie osservabili nelle età più avanzate,
- Approfondire il pattern topografico di distribuzione e progressione del deficit stenico nei differenti distretti muscolari;
- Contribuire alla definizione del fenotipo della SMA adulta nell'era delle Disease Modifying Therapies, fornendo un quadro clinico-funzionale utile come riferimento per la valutazione della progressione di malattia e dell'impatto delle nuove strategie terapeutiche.

4.1 METODI

Disegno dello studio

Il presente studio nasce come uno studio osservazionale retrospettivo e trasversale, condotto presso un centro di terzo livello (Centro Clinico NeMo Ancona) specializzato

nella presa in carico delle malattie neuromuscolari e costituisce il primo tentativo sistematico di descrivere in modo approfondito il fenotipo dell'atrofia muscolare spinale (SMA) nell'età adulta.

Popolazione

Lo studio è stato condotto analizzando i dati clinici di pazienti adulti affetti da SMA consecutivamente afferiti presso il Centro Clinico NeMO Ancona.

Criteri di inclusione:

- Età pari o superiore ai 18 anni;
- Diagnosi genetica confermata di delezione bi-allelica del gene SMN1, con determinazione del numero di copie SMN2 mediante tecnica MPLA.

Criteri di esclusione:

- Assenza di conferma genetica di SMA
- Pazienti con SMA1 (per la natura tipicamente infantile e rapidamente evolutiva di questa forma).

La selezione è stata volutamente inclusiva: si è scelto di coprire lo spettro più ampio possibile di presentazioni fenotipiche, senza escludere pazienti con gradi diversi di compromissione motoria, per riflettere fedelmente la varietà reale della SMA adulta nella pratica clinica quotidiana.

Valutazione

Per ciascun paziente sono stati raccolti dati demografici, genetici e clinico-funzionali, estratti dalle cartelle cliniche cartacee ed elettroniche in un database anonimizzato appositamente costruito per lo studio.

Sono stati raccolti:

- Dati demografici;
- Caratterizzazione genetica;
- Scale di valutazione funzionale;
- Valutazione della funzione respiratoria.

La valutazione funzionale è stata effettuata utilizzando scale validate e ampiamente impiegate nella pratica clinica neuromuscolare. In particolare:

- La Hammersmith Functional Motor Scale Expanded (HF MSE), utilizzata per la quantificazione della motricità globale e composta da moduli che valutano attività grossolane e capacità motorie intermedie;
- La Revised Upper Limb Module (RULM), specifica per la valutazione della funzione degli arti superiori;
- Il Six-Minute Walking Test (6MWT), impiegato nei soli pazienti deambulanti per misurare la resistenza allo sforzo e la capacità funzionale nella deambulazione;
- La scala Medical Research Council (MRC), utilizzata per la quantificazione della forza muscolare nei principali distretti, con calcolo del punteggio totale.

La funzione respiratoria è stata valutata tramite spirometria standardizzata, con registrazione della capacità vitale forzata (FVC) espressa in litri e percentuale del predetto e il peak cough flow (PCEF). È stata inoltre documentata la presenza di ventilazione non invasiva (NIV) o invasiva (VMI) e l'anno di inizio del supporto ventilatorio.

4.2 ANALISI STATISTICA

Per l'analisi di sottogruppo, i pazienti sono stati stratificati:

- Per tipo di SMA (2, 3, 4);
- Per numero di copie SMN2;
- Per stato funzionale;
- Per fasce di età (<40 anni, 40-50, 50-60, >60 anni).

Le differenze tra gruppi sono state analizzate mediante test non parametrici (Mann-Whitney per confronti a due gruppi e Kruskal-Wallis per confronti multipli).. I confronti post-hoc tra gruppi sono stati analizzati applicando la

correzione di Dunn per confronti multipli. La significatività statistica è stata fissata a $p \leq 0,05$.

Le correlazioni tra variabili continue (età e punteggi funzionali) sono state valutate con il coefficiente di correlazione di rango di Spearman (ρ). La significatività statistica è stata fissata a $p \leq 0,05$.

Per descrivere e individuare un eventuale correlazione non lineare tra variabili, sono state utilizzate curve di regressione non parametrica mediante adattamento LOESS.

Le correlazioni multivariate sono state esplorate con modelli di regressione lineare multiple, includendo come variabili indipendenti l'età, il numero di copie SMN2 e le scale funzionali principali, per valutare la capacità predittiva combinata rispetto alla funzione respiratoria.

RISULTATI

Caratteristiche demografiche, cliniche e funzionali del campione

Il campione analizzato comprendeva 30 pazienti adulti affetti da SMA 5q, di cui 13 femmine e 17 maschi. L'età media complessiva era pari a 46 anni, con un range compreso tra 20 e 73 anni.

Dal punto di vista fenotipico, non erano presenti pazienti con SMA I.

10 pazienti erano classificati come SMA II, 17 come SMA III e 3 come SMA IV. I pazienti con SMA II erano prevalentemente di sesso femminile, con 7 femmine e 3 maschi e presentavano un'età media di 35,5 anni. L'età di esordio tra i 4 e i 18 mesi. Per quanto riguarda il numero di copie di SMN2, 8 pazienti SMA II presentavano 3 copie, mentre in due casi il dato non era disponibile.

Il gruppo SMA III era il più rappresentativo nel campione, comprendendo 17 pazienti, di cui 5 femmine e 12 maschi. L'età media era pari a 50,7 anni con un range compreso tra i 26 e 73 anni. L'età di esordio variava tra 18 e 180 mesi. In questo sottogruppo, il numero di copie SMN2 risultava eterogeneo: 6 pazienti presentavano 2 copie, 5 pazienti 3 copie e pazienti 4 copie.

Il gruppo SMA IV comprendeva 3 pazienti di cui 1 femmina e 2 maschi, con età media pari a 53,6 anni e range compreso tra 45 e 64 anni. L'età di esordio era compreso tra 240 e 540 mesi.

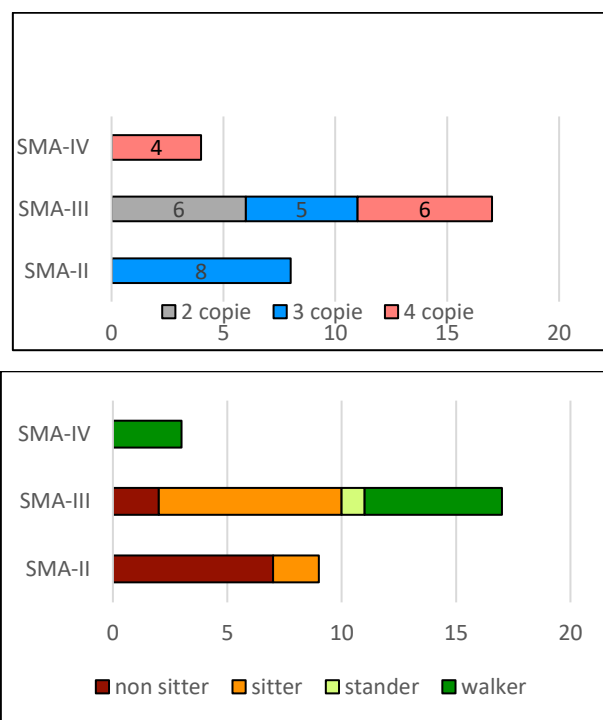


Grafico 2: Distribuzione del campione per sottotipo clinico di SMA

Dal punto di vista funzionale, il campione comprendeva 9 pazienti non-sitter, 10 sitter, 1 stander e 9 walker.

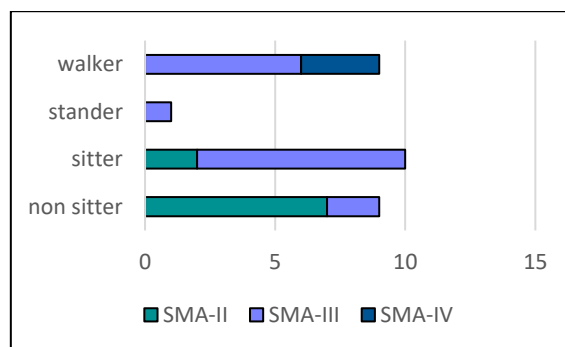
Il gruppo dei pazienti non deambulanti comprendeva 7 soggetti SMA II, che quindi non avevano mai acquisito la deambulazione autonoma, e 10 soggetti SMA III che avevano subito una regressione motoria nel corso della vita con decorso estremamente variabile: la perdita della deambulazione era avvenuta mediamente a 26,3 anni, con una variabilità molto elevata che andava dai 18 mesi ai 54 anni. 8 di loro avevano perso la deambulazione mantenendo la capacità di controllo di tronco da seduti (sitter), mentre in 2 casi si è osservata anche la perdita della capacità di mantenere autonomamente la posizione seduta (non sitter). È interessante notare come il caso con perdita della deambulazione più precoce (pochi mesi il raggiungimento della tappa motoria, a 18 mesi) nonostante l'età relativamente avanzata di 64 anni, conserva la capacità di mantenere la posizione seduta, mentre uno dei due casi di SMA III non

sitter è rappresentato da un paziente che aveva mantenuto la deambulazione fino ai 44 anni.

Complessivamente, il gruppo dei non-sitter comprendeva 10 pazienti, con età media pari a 54 anni e range compreso tra 20 e 73 anni: 7 pazienti SMA II con età compresa tra i 25 e i 56 anni e età media di 26,2 anni e i 2 pazienti descritti, uno di 60 anni con perdita della deambulazione a 10 anni e l'altro di 51 anni, che aveva appunto perso la deambulazione solo a 44 anni. Il gruppo dei sitter comprendeva invece 10 pazienti di età compresa tra i 20 a i 73 anni e età media di 49 anni, dei quali 2 pazienti SMA II, uno di 20 anni e l'altra di 50 anni, e 8 pazienti SMA III di età compresa tra i 38 e i 73 anni (media 50 anni), con età media di perdita della deambulazione di 17,6 anni. A questo proposito, la media è trascinata verso il basso soprattutto dalla presenza del soggetto descritto con perdita della deambulazione a 18 mesi, che costituisce un significativo outlier, mentre negli altri pazienti la regressione motoria era avvenuta tra i 9 anni e i 54 anni e solo in due casi prima dei 20 anni.

Il gruppo degli stander era costituito da un solo paziente SMA III, con esordio a 18 mesi ed età attuale di 46 anni. I walker erano 9, di cui 6 SMA III e 3 SMA IV, con età media pari a 44 anni e range compreso tra 26 e 64 anni.

Nei 7 pazienti in grado di eseguire il 6-Minute Walking Test, la distanza media percorsa era pari a 345,7 metri, con valori compresi tra 101 e 534 metri.



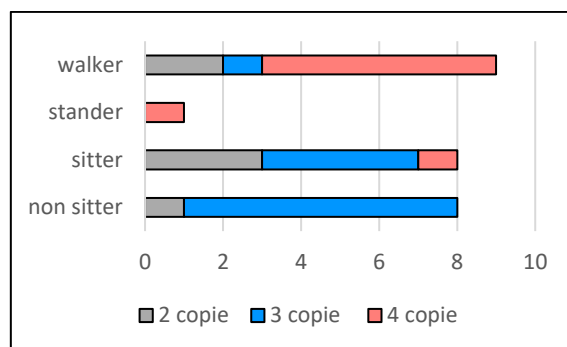


Grafico 3: Distribuzione del campione secondo lo stato funzionale motorio

Nel gruppo dei pazienti deambulanti walker n=9 la composizione del campione è mista: la quota più ampia è rappresentata dai portatori di quattro copie (4 su 9), affiancata da 1 con tre copie e 2 con due copie. La categoria “stander” comprende un solo soggetto, portatore di tre copie di SMN2. Tra i pazienti “sitter” (n=10) individuiamo 3 pazienti con due copie, 5 pazienti con tre copie e 1 paziente con quattro copie. Nei “non sitter” (n=8) la ripartizione è ancora più sbilanciata verso le tre copie (7 su 8) con la restante parte costituita dalle due copie. Procedendo dai walker ai sitter e ai non sitter aumenta progressivamente la quota delle tre copie, mentre le quattro copie sono più frequenti tra i deambulanti e non compaiono nei non sitter; le due copie sono presenti in tutte le classi funzionali con frequenze intermedie.

Osservando la composizione del campione per tipo di SMA rispetto allo stato funzionale si rilevano 9 soggetti “walker” che comprendono 6 soggetti con SMA III e tutti i 3 soggetti con SMA IV della nostra coorte, 1 soggetto “stander” affetto da SMA III, 10 soggetti “sitter” (n=10), prevalentemente affetti da SMA III (8 su 10) con due soggetti SMAII, 9 soggetti “non sitter” (n=9) dei quali la maggior parte (7 su 9) con SMA tipo II e 2 soggetti SMA III.

Variabile	Totale	SMA II	SMA III	SMA IV
N	30	10	17	3
Femmine/Maschi	13/17	7/3	5/12	1/2

Variabile	Totale	SMA II	SMA III	SMA IV
Età media, anni (range)	46 (20–73)	35,5 (20–56)	50,76 (26–73)	53,67 (45–64)
Età di esordio, mesi (range)	4-540	4–18	18–180	240–540
2 copie SMN2, n	6	0	6	0
3 copie SMN2, n	13	8	5	0

Tabella 1: Caratteristiche cliniche e demografiche del campione

Caratteristiche clinico-funzionali post perdita della deambulazione

Nel campione studiato, i pazienti non deambulanti comprendevano soggetti classificati come sitter e non-sitter. Complessivamente, 8 pazienti presentavano una storia di regressione motoria con perdita della deambulazione nel corso della malattia, appartenenti ai gruppi SMA II-SMA III.

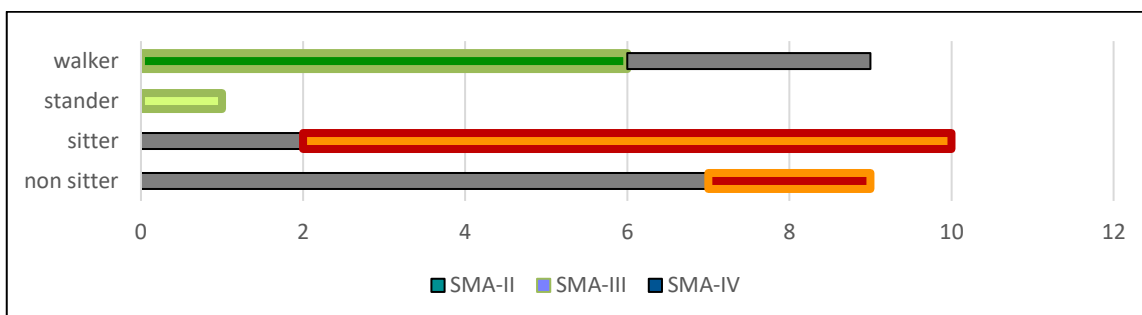


Grafico 4: Caratteristiche clinico-funzionali pazienti SMA (II,III,IV)

Nei pazienti SMA III non deambulanti l'età media di perdita della deambulazione risultava pari a 24,9 anni, con ampia variabilità interindividuale (range 1,5-54 anni) e l'età media risultava superiore rispetto ai soggetti ancora deambulanti o stander (58 vs 40,4), mentre non emergevano differenze significative relativamente all'età di esordio della malattia (63,8 vs 73,7 mesi; $p=0,58$).



Grafico 5: Distribuzione dell'età nei pazienti SMA III deambulanti e non deambulanti

Dal punto di vista motorio, i pazienti che avevano perso la deambulazione mostravano una significativa riduzione dei punteggi RULM rispetto ai soggetti ancora deambulanti o stander (15,3 vs 35,7; $p=0,001$). Le competenze funzionali degli arti superiori residue nei pazienti non deambulanti mostravano una ampia variabilità con un solo paziente con competenze pienamente conservate e la maggior parte dei pazienti non deambulanti con punteggi di RULM inferiori a 20, mentre la quasi totalità dei pazienti deambulanti conservava piene competenze funzionali, raggiungendo il pieno punteggio nella scala RULM.

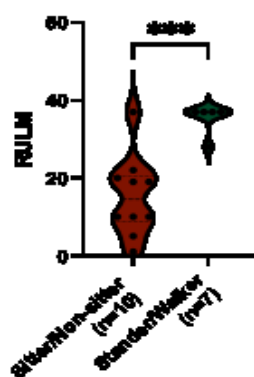


Grafico 6: Confronto dei punteggi RULM nei pazienti SMA III deambulanti e non deambulanti

Per quanto riguarda la funzione respiratoria, i pazienti non deambulanti presentavano valori medi di FVC% inferiori rispetto ai soggetti ancora deambulanti; tuttavia, tale differenza non raggiungeva la significatività statistica (95,4 vs 79,7; $p=0,065$), in relazione all'elevata variabilità intragruppo osservata.

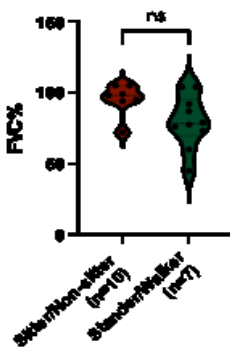


Grafico 7: Distribuzione della FVC% nei pazienti SMA III deambulanti e non deambulanti

In particolare, anche nei soggetti con grave compromissione motoria erano osservabili valori relativamente conservati di FVC%, con ampia sovrapposizione tra i due gruppi funzionali.

Effetto dell'età sui parametri funzionali nei pazienti SMA III

Nei pazienti affetti da SMA III, l'analisi delle relazioni tra età e performance funzionali evidenziava una progressiva riduzione delle capacità motorie con l'avanzare dell'età.

In particolare, i punteggi HFMSE mostravano una forte correlazione negativa con l'età ($r=-0,72$; $p=0,001$).

Un modello di regressione lineare descriveva tale andamento indicando una riduzione media di circa 1,13 punti HFMSE per anno ($HFMSE = -1,130 \cdot \text{età} + 80,60$).

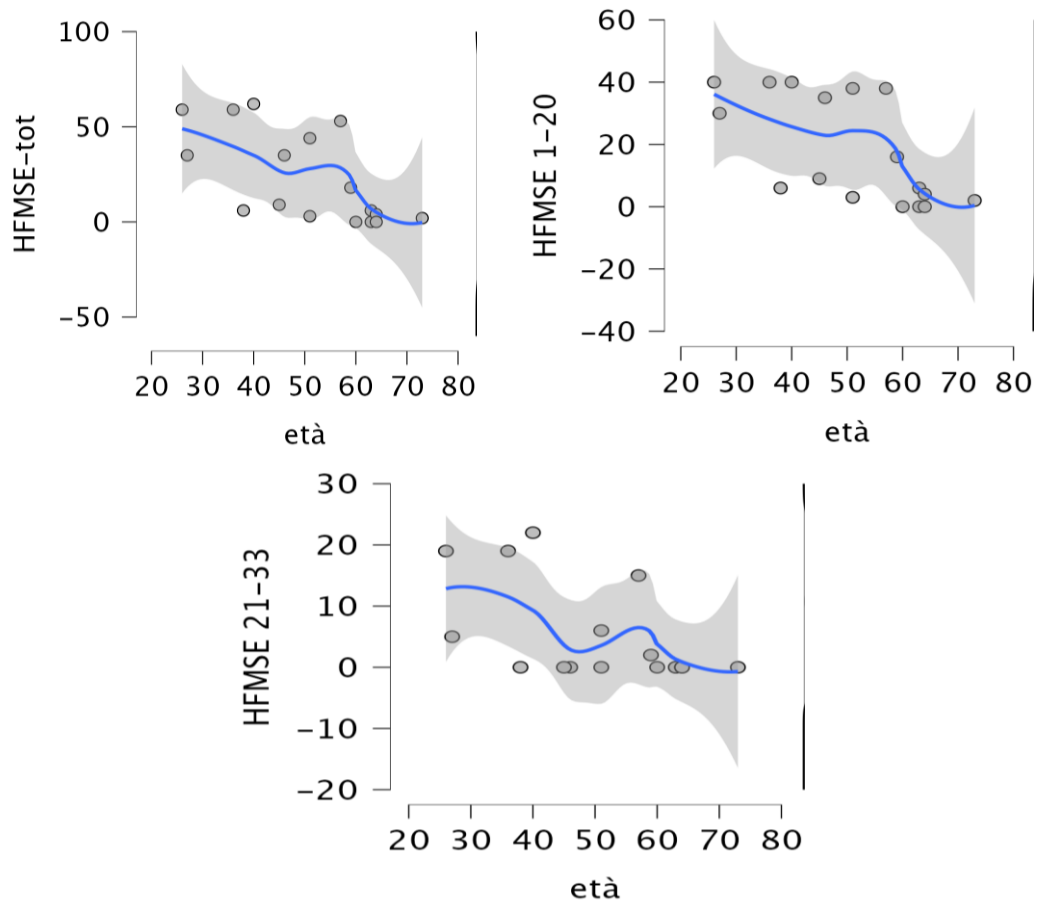


Grafico 8: Correlazione tra età e punteggio HFMSE nei pazienti SMA III

Tuttavia, l'osservazione della curva di regressione non parametrica mediante adattamento LOESS mostrava un andamento non lineare della progressione funzionale.

La curva evidenziava infatti una relativa stabilità dei punteggi nelle prime decadi dell'età adulta, seguita da un più evidente declino nella seconda metà della distribuzione, con un punto di flessione approssimativamente collocabile intorno ai 60 anni.

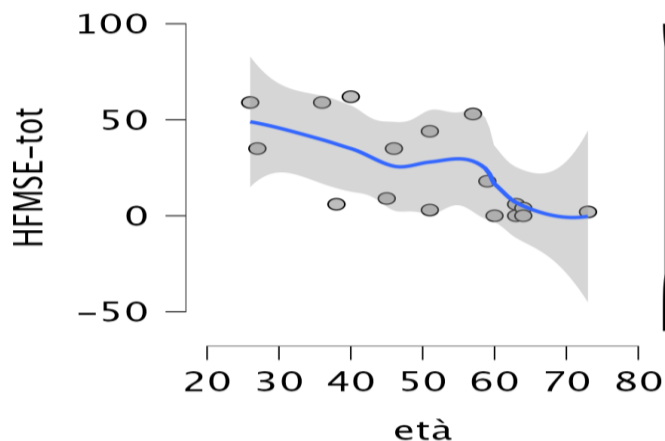


Grafico 9: Andamento HFMSE in funzione dell'età

Per approfondire tale osservazione, i pazienti venivano suddivisi in fasce d'età (<40 anni, 40–50 anni, 50–60 anni, >60 anni).

L'analisi comparativa dei punteggi HFMSE tra le differenti fasce d'età evidenziava differenze globalmente significative ($H=8,64$; $p=0,016$). Nonostante i confronti multipli post-hoc non raggiungessero la significatività statistica, in relazione alla ridotta numerosità campionaria e all'elevata dispersione dei dati, emergeva un chiaro trend negativo solo dopo i 60 anni, con valori di HFMSE sostanzialmente comparabili per le altre fasce di età.

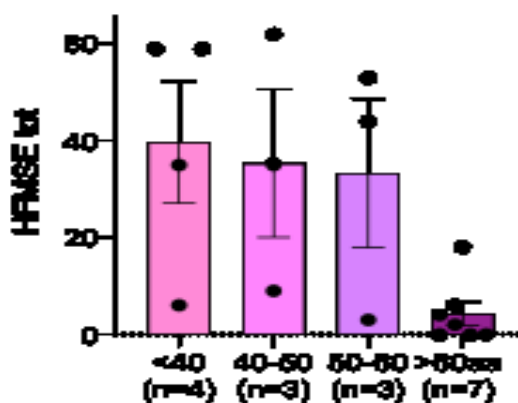


Grafico 10: Distribuzione dei punteggi HFMSE per classi d'età.

Il confronto binario tra pazienti di età inferiore e superiore ai 60 anni evidenziava una marcata riduzione dei punteggi HFMSE nei soggetti oltre la sesta decade di vita.

I pazienti di età inferiore ai 60 anni presentavano infatti un punteggio HFMSE totale medio pari a 36,5 (range 3–62; SD=23,1), mentre nei pazienti di età superiore ai 60 anni il punteggio medio risultava pari a 4,3 (range 0–18; SD=6,47), con differenza statisticamente significativa ($U=5,5$; $p=0,002$).

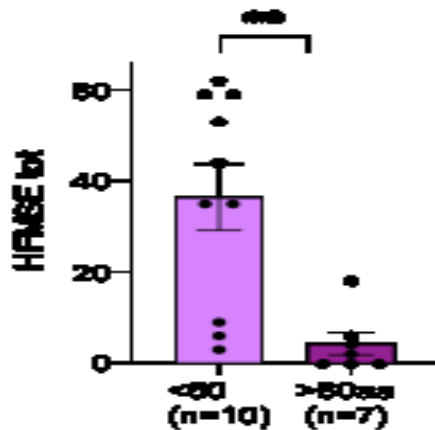
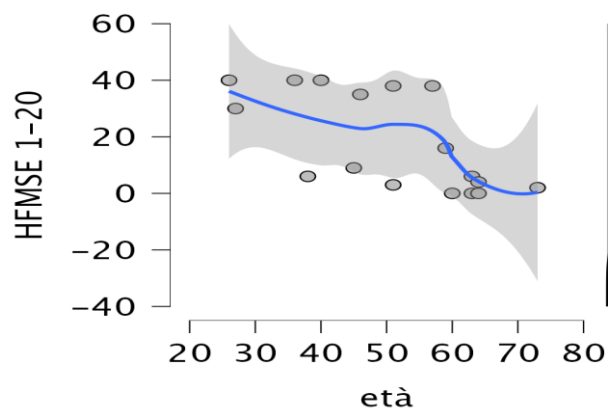


Grafico 11: Confronto dei punteggi HFMSE nei pazienti SMA III <60 e >60 anni

L'analisi separata dei due moduli della HFMSE mostrava un andamento analogo. Per il modulo 1 (items 1–20), i pazienti di età inferiore ai 60 anni presentavano un punteggio medio pari a 27,9 (range 3–40; SD=15,47), rispetto a un valore medio di 4,0 (range 0–16; SD=5,77) nei soggetti oltre i 60 anni.

Anche il modulo 2 (items 21–33) mostrava una riduzione nei pazienti più anziani, con valori medi pari a 8,6 (range 0–22; SD=9,14) nei soggetti <60 anni e 0,28 (range 0–2; SD=0,76) nei soggetti >60 anni.



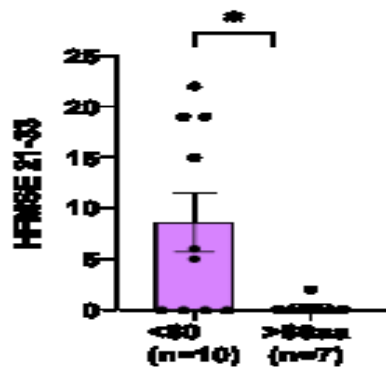
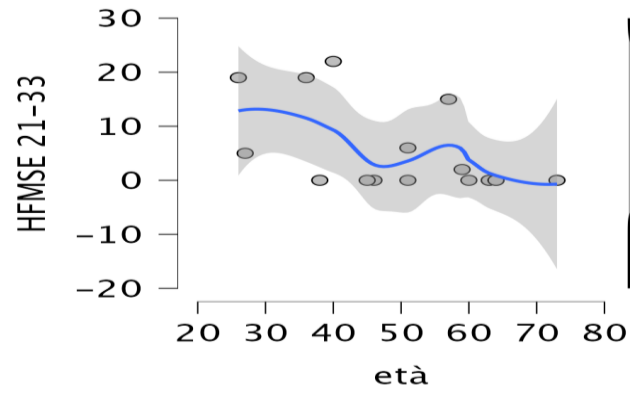
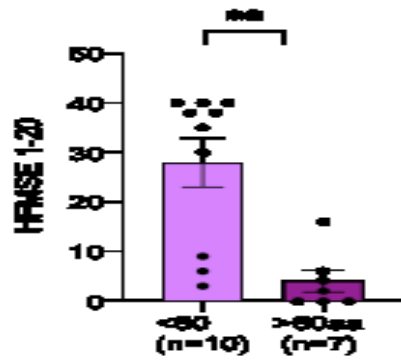


Grafico 12: Distribuzione dei moduli HFMSE 1-20 e 21-33 nei pazienti SMA III <60 e >60

Lo stesso andamento risultava osservabile per la RULM.

I pazienti di età inferiore ai 60 anni presentavano infatti un punteggio RULM medio pari a 31,10 (range 19–37; SD=7,96), mentre nei pazienti oltre i 60 anni il punteggio medio risultava pari a 13,14 (range 1–37; SD=11,88).

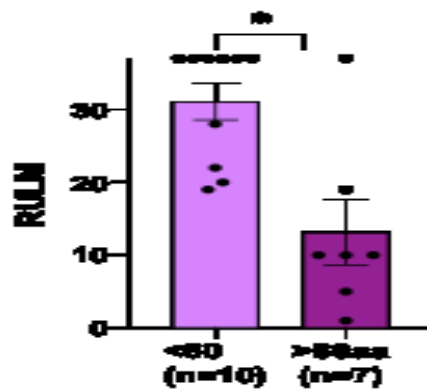
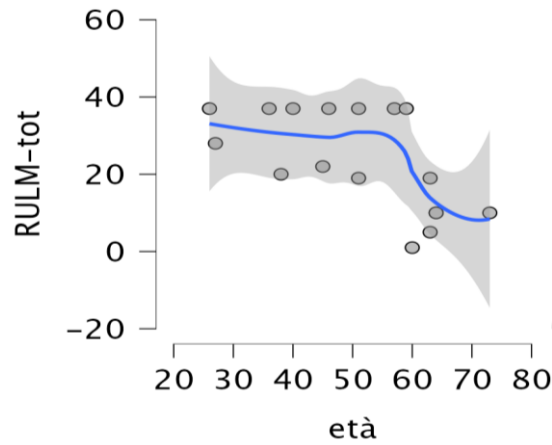


Grafico 13: Distribuzione dei punteggi RULM nei pazienti SMA III <60 e >60 anni

Per quanto riguarda la funzione respiratoria, la FVC% non mostrava una correlazione lineare significativa con l'età nell'intera popolazione SMA III ($r=-0,39$; $p=0,135$).

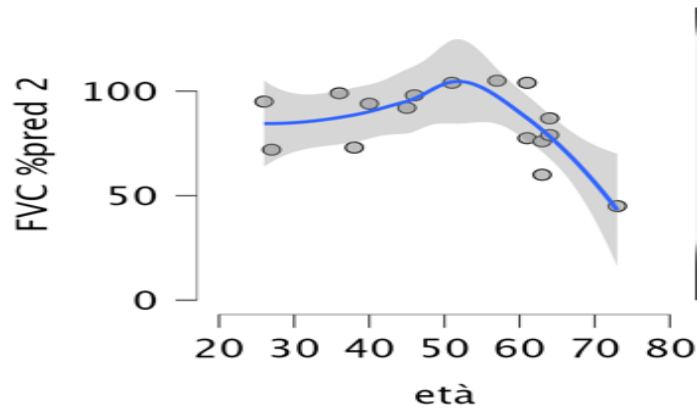


Grafico 14: Correlazione tra età e FVC% nei pazienti SMA III

Tuttavia, anche in questo caso la curva LOESS mostrava un andamento bifasico, caratterizzato da relativa stabilità prima dei 60 anni e successivo declino nelle età più avanzate.

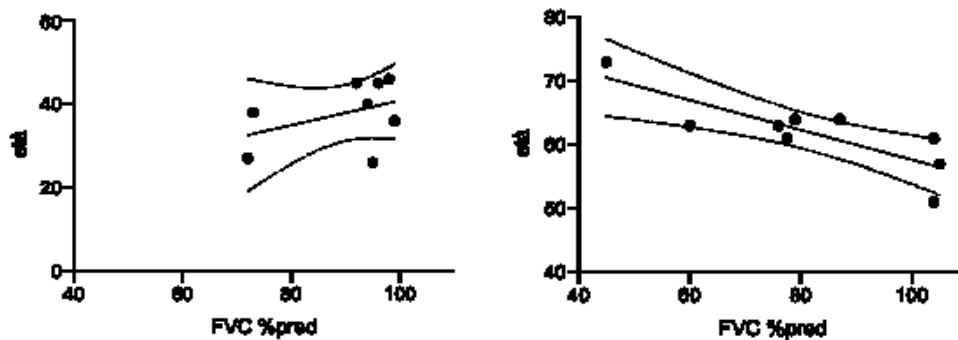


Grafico 15: Correlazione tra età e FVC% nei pazienti di età inferiore e superiore ai 60 anni

In assenza di correlazione significativa tra età e FVC% nei pazienti di età inferiore ai 60 anni ($r=0,14$; $p=0,78$), nei soggetti oltre i 60 anni emergeva invece una forte correlazione negativa ($r=-0,77$; $p=0,012$).

L'analisi per fasce d'età evidenziava differenze significative anche per la FVC% ($H=9,71$; $p=0,006$).

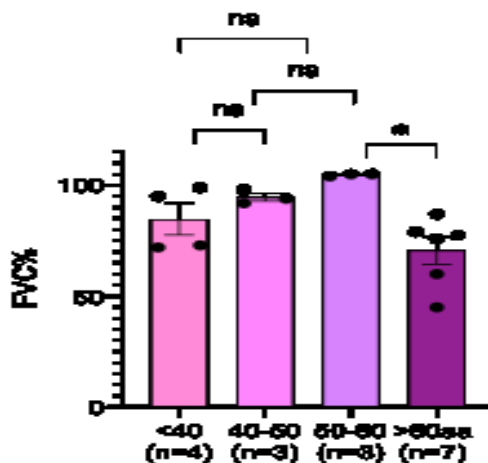


Grafico 16: Distribuzione della FVC% nelle differenti fasce d'età

Il confronto tra pazienti di età inferiore e superiore ai 60 anni mostrava valori medi di FVC% pari a 93,7% (range 72–105; SD=12,07) nei soggetti <60 anni e pari a 70,75% (range 45–87; SD=15,39) nei soggetti >60 anni, con differenza statisticamente significativa (U=8,0; p=0,016).

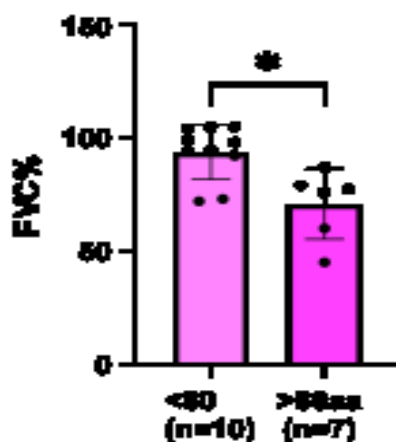


Grafico 17: Confronto della FVC% nei pazienti SMA III <60 e >60 anni

Nel complesso, l'analisi dei parametri funzionali mostrava un andamento relativamente stabile nelle prime decadi dell'età adulta, seguito da un più evidente peggioramento motorio e respiratorio oltre i 60 anni.

Relazione tra numero di copie di SMN2 e parametri funzionali

L'analisi dei parametri funzionali in relazione al numero di copie di SMN2 evidenziava differenze significative nelle performance motorie e respiratorie dei pazienti adulti con SMA.

Per quanto riguarda la funzione motoria globale, i punteggi HFMSE mostravano differenze significative tra i gruppi distinti per numero di copie di SMN2 ($H=12,63$; $p=0,0018$).

I pazienti portatori di 4 copie di SMN2 presentavano i valori medi più elevati di HFMSE, mentre i soggetti con 3 copie mostravano i punteggi più bassi.

In particolare, il confronto post-hoc evidenziava una differenza statisticamente significativa tra pazienti con 3 e 4 copie di SMN2 ($p=0,0016$).

SMA3: ANOVA HFMSE tot x SMN2

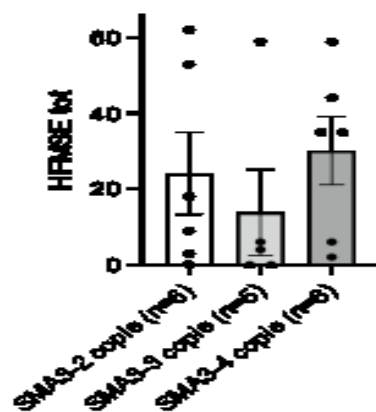


Grafico 18: Distribuzione dei punteggi HFMSE in relazione al numero di copie di SMN2

Anche la funzione degli arti superiori, valutata mediante RULM, mostrava differenze significative tra i differenti gruppi genetici ($H=13,04$; $p=0,0015$).

I pazienti con 3 copie di SMN2 presentavano un punteggio RULM medio pari a 9,8, inferiore sia rispetto ai pazienti con 2 copie (media 27,0; $p=0,04$) sia rispetto ai pazienti con 4 copie (media 31,0; $p=0,0025$).

SMA3: ANOVA RULM tot x SMN2

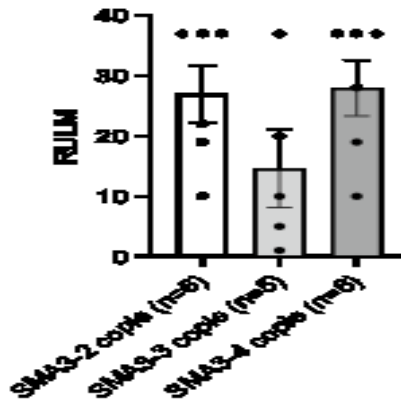


Grafico 19: Distribuzione dei punteggi RULM in relazione al numero di copie di SMN2

Anche l'analisi della funzione respiratoria evidenziava differenze significative tra i gruppi distinti per numero di copie di SMN2 ($H=9,85$; $p=0,007$).

I pazienti con 3 copie mostravano infatti i valori medi di FVC% più bassi rispetto agli altri gruppi. In particolare, il confronto tra pazienti con 2 e 3 copie risultava statisticamente significativo (97,7% vs 58,2%; $p=0,008$).

I pazienti con 4 copie presentavano valori intermedi di FVC% (83,8%), senza differenze statisticamente significative rispetto ai soggetti con 3 copie ($p=0,18$).

SMA3: ANOVA FVC tot x SMN2

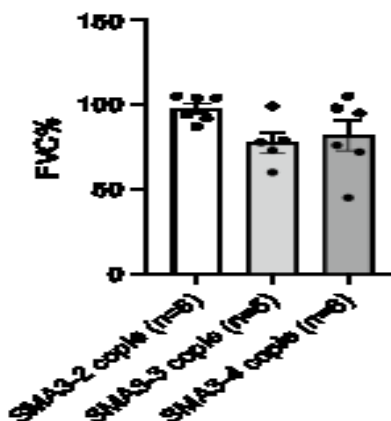


Grafico 20: Distribuzione della FVC% in relazione al numero di copie di SMN2

Nel complesso, i pazienti portatori di 3 copie di SMN2 mostravano le performance funzionali peggiori in tutte le principali misure cliniche considerate, sia motorie sia respiratorie.

Correlati della funzione respiratoria

L'analisi dei correlati della funzione respiratoria veniva condotta utilizzando la FVC% come principale parametro funzionale ventilatorio.

Nella popolazione SMA III, l'età di esordio non mostrava una correlazione significativa con la FVC% ($r=0,35$; $p=0,168$).

La funzione respiratoria mostrava invece una correlazione significativa con le principali scale funzionali motorie.

In particolare, la FVC% risultava moderatamente correlata ai punteggi HFMSE ($r=0,559$; $p=0,020$).

La correlazione più forte emergeva tuttavia tra FVC% e RULM.

I punteggi RULM mostravano infatti una forte correlazione positiva con la funzione respiratoria ($r=0,703$; $p=0,002$), indicando valori di FVC% progressivamente maggiori nei pazienti con migliore funzione degli arti superiori. Per valutare il contributo combinato delle variabili cliniche e genetiche sulla funzione respiratoria, veniva successivamente eseguita un'analisi di regressione lineare multipla.

Il modello comprendente numero di copie di SMN2 e punteggio RULM, covariato per età, spiegava il 67% della varianza della FVC% ($R^2=0,676$; $p=0,006$).

All'interno del modello risultavano predittori significativi della funzione respiratoria:

- lo stato di portatore di 2 copie di SMN2 ($p=0,029$);
- il punteggio RULM (β standardizzato= $0,754$; $p=0,009$).

	Età	Esordio (m)	HFMSE tot	HFMSE 1-30	HFMSE 21-33	RULMtot
FVC (%)	-0.38 (0.135)	0.350 (0.168)	-0.698* (0.020)	0.677* (0.0168)	0.602* (0.040)	0.703** (0.002)

Model Summary - FVC %

Model	R	R ²	Adjusted R ²	RMSE	R ² Change	df1	df2	p
M ₀	0.000	0.000	0.000	17.33	0.000	0	16	
M ₁	0.822	0.676	0.568	11.40	0.676	4	12	0.006**

Nota: M₁ includes età, copie SMN2, RULMtot

<i>Coefficients</i>								
Model		Unstandardized	Standard Error	Standardized ^a	t	p	Collinearity Statistics	
							Tolerance	VIF
M₀	(Intercept)	98.206	4.204		20.505	< 0.001		
M₁	(Intercept)	51.391	20.630		2.491	0.028		
	età	0.052	0.274	0.042	0.181	0.852	0.751	1.331
	copie SMN2 (3)	9.004	7.801		1.154	0.271	0.913	1.095
	copie SMN2 (2)	16.570	8.987		2.478	0.028*		
	RULM-tot	0.998	0.322	0.754	3.100	0.009**	0.676	1.480

^a Standardized coefficients can only be computed for continuous predictors.

Tabella 2: Associazione funzionalità respiratoria e parametri funzionali motori

Nel complesso, la funzione respiratoria mostrava una maggiore associazione con i parametri funzionali motori, in particolare con la funzione degli arti superiori, rispetto all'età di esordio della malattia.

Pattern topografico della debolezza muscolare

L'analisi segmentaria della forza muscolare mediante scala Medical Research Council (MRC) ha consentito di delineare un pattern relativamente costante di distribuzione e progressione del deficit stenico nella popolazione adulta con SMA. L'osservazione dei differenti distretti muscolari ha evidenziato un coinvolgimento non uniforme, caratterizzato da una vulnerabilità selettiva di specifici gruppi muscolari e da una progressione temporalmente differenziata del deficit.

Coinvolgimento degli arti inferiori

Il coinvolgimento più costante, precoce e severo riguardava l'ileopsoas (IP) e il quadricipite femorale (QF).

Entrambi i distretti risultavano significativamente compromessi già nelle prime decadi dell'età adulta, con riduzione dei punteggi MRC osservabile anche nei soggetti più giovani del campione.

La compromissione di IP e QF rappresentava il reperto più uniforme dell'intera coorte, indipendentemente dal sottotipo clinico o dallo stato funzionale.

età (anni)		Ds	Bs	Tb	EC	ECD	Prnsa	Prnsa	FDP	IP	QF	AbpAAI	AdpAAI	BF	TA	Sum
26	1	4.5	4.5	5.0	5.0	4.5	4.0	3.0	3.0	2.0	3.0	5.0	4.0	3.0	3.0	5.0
27	2	2.5	3.5	4.0	4.0	4.0	3.5	3.0	3.0	1.5	2.0	4.0	2.0	4.0	3.0	5.0
36	8	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	2.0	1.0	5.0	4.0	4.0	5.0	5.0
38	4	0.0	3.0	3.0	2.0	2.5	3.0	3.0	3.0	0.0	0.0	1.0	2.0	1.0	1.5	3.0
40	5	4.5	4.0	5.0	5.0	5.0	4.5	4.0	4.5	3.0	3.0	5.0	4.0	4.0	4.0	5.0
45	6	2.0	3.0	3.0	3.0	3.5	3.5	3.0	3.5	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	2.0	3.0
46	7	4.0	5.0	5.0	4.0	4.0	4.0	4.0	3.0	1.0	1.0	3.0	2.0	2.5	4.0	5.0
51	8	2.0	2.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	0.0	1.0	1.0	0.0	1.0	3.0	3.0
51	9	4.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	4.0	2.0	2.0	1.5	0.0	1.5	4.0	5.0
57	10	5.0	4.5	4.5	5.0	5.0	5.0	5.0	4.0	2.0	2.0	4.0	4.0	4.0	3.5	5.0
58	11	4.0	4.0	4.0	5.0	4.5	4.0	4.0	4.0	1.0	1.0	5.0	2.0	2.0	5.0	5.0
60	12	1.0	0.5	0.5	0.5	1.0	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
60	13	1.0	2.0	2.0	2.0	2.5	3.0	1.5	3.0	0.0	1.0	0.0	0.0	2.0	4.0	4.0
60	14	2.0	3.0	3.0	2.0	2.5	3.0	3.0	3.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	3.0	3.0
64	15	1.0	1.5	2.5	2.0	2.0	2.0	2.5	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.5	2.0
64	16	1.0	3.5	3.5	3.0	3.0	3.0	3.0	2.0	0.0	0.0	1.0	1.0	2.0	3.5	5.0
73	17	0.0	1.5	3.0	2.0	2.5	3.0	1.5	1.0	0.0	0.0	2.0	1.0	1.0	1.0	2.0

Grafico 21: Distribuzione dei punteggi MRC dell'ileopsoas e del quadricipite femorale nelle differenti fasce d'età

Con l'avanzare dell'età, il deficit tendeva progressivamente a estendersi agli altri gruppi muscolari della coscia.

Il coinvolgimento degli adduttori risultava generalmente più precoce e severo rispetto agli abduttori, mentre la muscolatura posteriore della coscia mostrava un interessamento relativamente più tardivo.

Tale progressione diventava maggiormente evidente dopo i 40 anni e tendeva ad assumere caratteristiche di severità più marcata oltre i 60 anni.

età (anni)		Ds	Bs	Tb	EC	ECD	Prnsa	Prnsa	FDP	IP	QF	AbpAAI	AdpAAI	BF	TA	Sum
26	1	4.5	4.5	5.0	5.0	4.5	4.0	3.0	3.0	2.0	3.0	5.0	4.0	3.0	3.0	5.0
27	2	2.5	3.5	4.0	4.0	4.0	3.5	3.0	3.0	1.5	2.0	4.0	2.0	4.0	3.0	5.0
36	8	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	2.0	1.0	5.0	4.0	4.0	5.0	5.0
38	4	0.0	3.0	3.0	2.0	2.5	3.0	3.0	3.0	0.0	0.0	1.0	2.0	1.0	1.5	3.0
40	5	4.5	4.0	5.0	5.0	5.0	4.5	4.0	4.5	3.0	3.0	5.0	4.0	4.0	4.0	5.0
45	6	2.0	3.0	3.0	3.0	3.5	3.5	3.0	3.5	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	2.0	3.0
46	7	4.0	5.0	5.0	4.0	4.0	4.0	4.0	3.0	1.0	1.0	3.0	2.0	2.5	4.0	5.0
51	8	2.0	2.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	0.0	1.0	1.0	0.0	1.0	3.0	3.0
51	9	4.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	4.0	2.0	2.0	1.5	0.0	1.5	4.0	5.0
57	10	5.0	4.5	4.5	5.0	5.0	5.0	5.0	4.0	2.0	2.0	4.0	4.0	4.0	3.5	5.0
58	11	4.0	4.0	4.0	5.0	4.5	4.0	4.0	4.0	1.0	1.0	5.0	2.0	2.0	5.0	5.0
60	12	1.0	0.5	0.5	0.5	1.0	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
60	13	1.0	2.0	2.0	2.0	2.5	3.0	1.5	3.0	0.0	1.0	0.0	0.0	2.0	4.0	4.0
60	14	2.0	3.0	3.0	2.0	2.5	3.0	3.0	3.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	3.0	3.0
64	15	1.0	1.5	2.5	2.0	2.0	2.0	2.5	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.5	2.0
64	16	1.0	3.5	3.5	3.0	3.0	3.0	3.0	2.0	0.0	0.0	1.0	1.0	2.0	3.5	5.0
73	17	0.0	1.5	3.0	2.0	2.5	3.0	1.5	1.0	0.0	0.0	2.0	1.0	1.0	1.0	2.0

Grafico 22: Progressione del coinvolgimento dei muscoli della coscia nelle differenti fasce d'età

Parallelamente, si osservava un progressivo coinvolgimento dei compartimenti tibio-peroneali.

Il deficit della muscolatura tibiale anteriore risultava più evidente nelle età avanzate, mentre la muscolatura surale appariva relativamente risparmiata anche nei pazienti con compromissione globale severa.

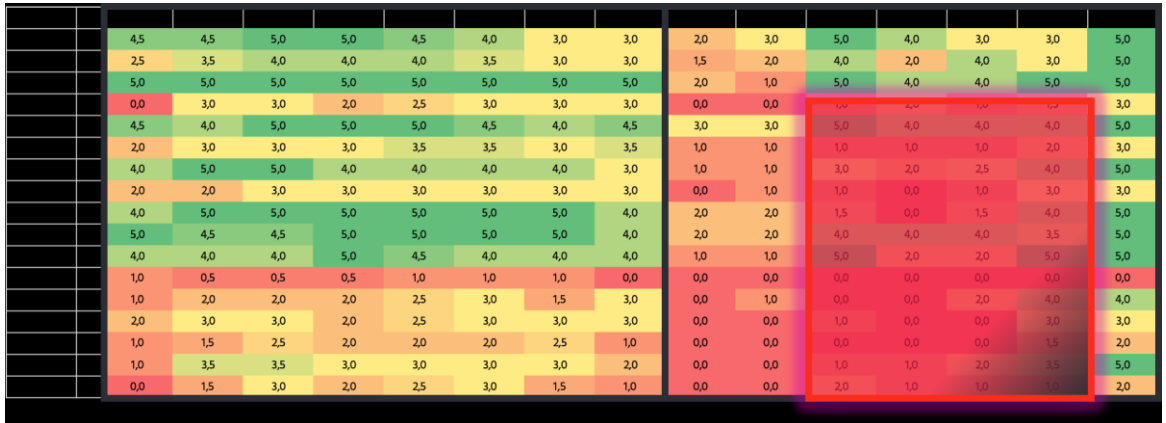


Grafico 23: Distribuzione del coinvolgimento tibio-peroneale e surale

Nel complesso, il pattern osservato agli arti inferiori mostrava una prevalente vulnerabilità della muscolatura prossimale e anteriore rispetto ai compartimenti posteriori distali.

Coinvolgimento degli arti superiori

Per quanto riguarda gli arti superiori, i flessori profondi delle dita (FDP) rappresentavano uno dei distretti più costantemente coinvolti.

La riduzione della forza dei FDP risultava osservabile già nelle fasi più precoci dell'età adulta e tendeva a mantenersi relativamente stabile fino alla sesta decade di vita.

Dopo i 60 anni emergeva invece un peggioramento più evidente e diffuso della compromissione distale.



Grafico 24: Distribuzione dei punteggi MRC dei flessori profondi delle dita nelle differenti fasce d'età

Il deltoide (De) mostrava un pattern differente.

Nella maggior parte dei pazienti, il coinvolgimento del deltoide appariva inizialmente sfumato, con lieve riduzione della forza già presente in età adulta ma generalmente meno severa rispetto ai distretti prossimali degli arti inferiori.

Tuttavia, oltre i 60 anni, il peggioramento della forza del deltoide diventava significativamente più evidente, frequentemente associato a un coinvolgimento più globale della muscolatura prossimale degli arti superiori.

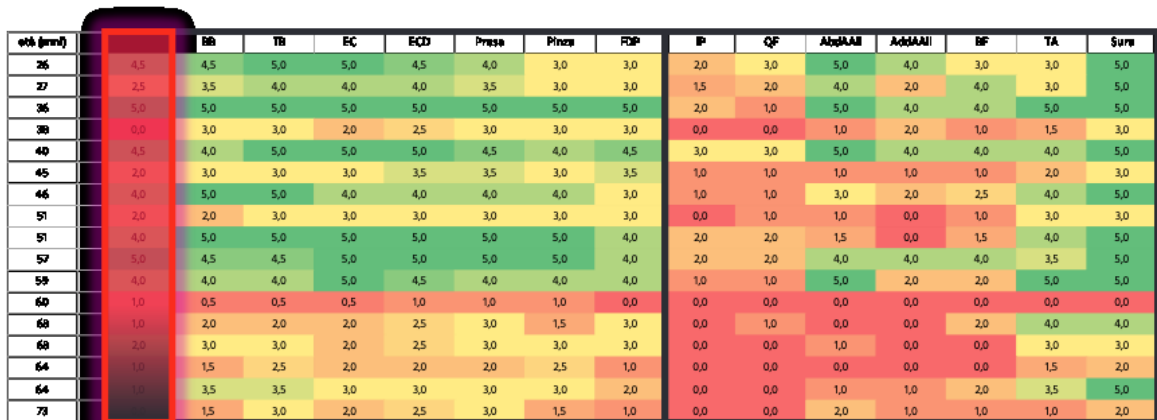


Grafico 25: Distribuzione dei punteggi MRC del deltoide nelle differenti fasce d'età

Nei pazienti oltre la sesta decade di vita si osservava infatti un peggioramento diffuso della forza muscolare agli arti superiori, talora severo, con riduzione

significativa dei punteggi MRC sia a carico della muscolatura prossimale sia dei distretti distali.

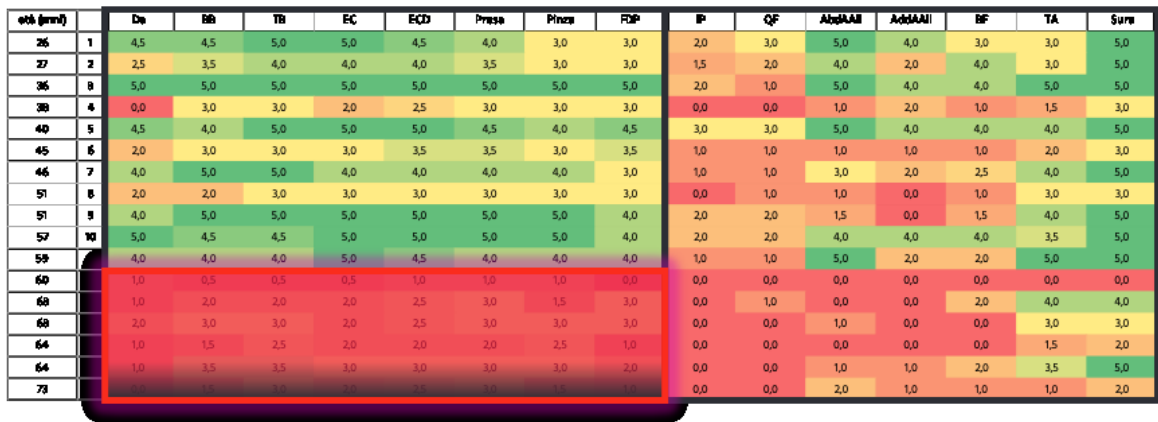


Grafico 26: Coinvolgimento globale degli arti superiori nei pazienti >60 anni

Matrice frequenza per severità del coinvolgimento muscolare

Per sintetizzare il pattern osservato, è stata costruita una matrice combinante frequenza di interessamento muscolare e severità del deficit.

L'interessamento veniva definito dalla presenza di punteggio MRC <4.

La matrice confermava:

- il coinvolgimento invariabile, precoce e severo di ileopsoas e quadricipite femorale;
- il successivo interessamento di adduttori e abduttori della coscia;
- il progressivo coinvolgimento dei compartimenti tibio-peroneali;
- il relativo risparmio della muscolatura surale;
- il coinvolgimento precoce e persistente dei flessori profondi delle dita;
- il peggioramento età-dipendente della muscolatura prossimale degli arti superiori, in particolare del deltoide.

Distretto muscolare	Frequenza interessamento	Severità coinvolgimento	Pattern temporale
Ileopsoas	Molto elevata	Severa	Precoce
Quadricipite femorale	Molto elevata	Severa	Precoce

Distretto muscolare	Frequenza interessamento	Severità coinvolgimento	Pattern temporale
Adduttori coscia	Elevata	Moderata-severa	Progressiva
Abduttori coscia	Moderata-elevata	Moderata	Progressiva
Muscolatura posteriore coscia	Moderata	Moderata	Tardiva
Tibio-peroneali	Moderata	Progressiva	Tardiva
Surali	Bassa	Lieve	Relativamente risparmiati
FDP	Elevata	Moderata	Precoce e persistente
Deltoide	Moderata	Progressiva	Peggioramento >60 anni

Tabella 3: Matrice frequenza x severità del coinvolgimento muscolare

Nel complesso, il pattern topografico osservato mostrava una distribuzione relativamente coerente del deficit stenico nella SMA adulta, caratterizzata da predominante coinvolgimento prossimale degli arti inferiori nelle fasi iniziali, successiva estensione ai compartimenti distali e progressivo interessamento degli arti superiori nelle età più avanzate.

CAPITOLO V – DISCUSSIONE

Il presente studio ha analizzato le caratteristiche cliniche, funzionali e respiratorie di una coorte di pazienti adulti affetti da SMA 5q, con particolare attenzione alle relazioni tra stato funzionale, età, numero di copie di SMN2 e pattern di distribuzione della debolezza muscolare. Nel complesso, i risultati ottenuti evidenziano come la SMA nell'età adulta rappresenti una condizione clinica significativamente più eterogenea e complessa rispetto a quanto tradizionalmente descritto nelle classificazioni pediatriche, suggerendo la necessità di una reinterpretazione fenotipica della malattia nell'era delle Disease Modifying Therapies (DMTs).

Eterogeneità clinica della SMA adulta

Uno degli aspetti più rilevanti emersi dall'analisi riguarda l'ampia variabilità clinica osservata nella popolazione adulta, in particolare nei pazienti SMA III. All'interno dello stesso sottotipo clinico coesistevano infatti soggetti ancora pienamente deambulanti e pazienti sitter, con marcata dispersione dei punteggi HFMSE, RULM e FVC%.

Questa osservazione suggerisce come la SMA III nell'età adulta debba essere interpretata più come un continuum di gravità che come un'entità clinica rigidamente definita. La tradizionale classificazione basata sull'età di esordio e sul massimo livello motorio acquisito appare infatti meno capace di descrivere adeguatamente la complessità fenotipica dei pazienti adulti.

In particolare, prima dei 60 anni il campione mostra una notevole eterogeneità funzionale, con presenza contemporanea di pazienti gravemente compromessi e soggetti con performance prossime ai valori massimali delle scale motorie. Tale variabilità risulta solo parzialmente spiegabile sulla base del numero di copie di SMN2 o dell'età di esordio della malattia.

Questi dati supportano l'ipotesi che, oltre l'età dello sviluppo, la classica relazione genotipo-fenotipo perda progressivamente parte della propria capacità predittiva e che ulteriori fattori modificatori — biologici, epigenetici, ambientali e muscolari — contribuiscano in maniera sostanziale alla definizione del fenotipo adulto.

Progressione età-dipendente e possibile punto di flessione oltre i 60 anni

L'analisi delle correlazioni tra età e parametri funzionali ha evidenziato una progressiva riduzione delle performance motorie con l'avanzare dell'età, particolarmente evidente nei pazienti SMA III. Tuttavia, l'aspetto più interessante emerso è rappresentato dal carattere non lineare di tale andamento.

Le curve di regressione non parametrica mostrano infatti una relativa stabilità dei parametri funzionali nelle prime decadi dell'età adulta, seguita da un deterioramento più evidente oltre la sesta decade di vita. Tale comportamento risultava osservabile sia per la HFMSE sia per la funzione respiratoria.

Il confronto tra pazienti di età inferiore e superiore ai 60 anni confermava una marcata riduzione dei punteggi HFMSE, RULM e FVC% nei soggetti più anziani, suggerendo l'esistenza di un possibile punto di flessione clinicamente rilevante nella storia naturale della SMA adulta.

Sebbene la natura trasversale dello studio non consenta di definire vere traiettorie longitudinali di progressione, questi dati appaiono compatibili con l'ipotesi di un progressivo esaurimento dei meccanismi compensatori neuromuscolari durante l'invecchiamento, con conseguente accelerazione del declino funzionale nelle età più avanzate.

Questo aspetto assume particolare interesse nell'attuale era terapeutica, poiché i pazienti trattati precocemente potrebbero in futuro raggiungere età che storicamente erano raramente osservabili nelle coorti SMA.

Relazione tra stato funzionale e funzione respiratoria

Un ulteriore elemento di interesse riguarda la relazione tra compromissione motoria e funzione respiratoria. Nel nostro campione, i pazienti che avevano perso la deambulazione presentano una significativa riduzione dei punteggi RULM e HFMSE, confermando il progressivo coinvolgimento della funzione motoria nelle fasi avanzate della malattia.

Tuttavia, il peggioramento motorio non risulta proporzionalmente associato a una parallela riduzione della funzione respiratoria. In particolare, i valori di FVC%

mostrano ampia sovrapposizione tra pazienti deambulanti e non deambulanti, con elevata variabilità intra-gruppo.

Questo dato suggerisce una dissociazione almeno parziale tra progressione motoria globale e coinvolgimento respiratorio nella SMA adulta. Alcuni pazienti con grave compromissione motoria mantengono infatti valori relativamente conservati di funzionalità ventilatoria.

Tale osservazione potrebbe riflettere differenti pattern anatomofisiologici di vulnerabilità muscolare, con coinvolgimento non uniforme dei diversi distretti motori e respiratori. La relativa indipendenza tra funzione respiratoria e stato motorio globale potrebbe inoltre contribuire a spiegare l'elevata eterogeneità clinica osservata nei pazienti adulti.

Significato della RULM nella SMA adulta

Nel presente studio, la RULM si è dimostrata una delle misure maggiormente associate sia allo stato funzionale sia alla funzione respiratoria. I pazienti non deambulanti presentano punteggi significativamente inferiori rispetto ai soggetti ancora deambulanti, mentre la stessa scala mostrava la correlazione più forte con la FVC%. Questi risultati suggeriscono come la funzione degli arti superiori possa rappresentare un indicatore particolarmente sensibile della progressione clinica nella SMA adulta, soprattutto nei pazienti con elevata compromissione motoria.

Rispetto alla HFMSE, la RULM appare probabilmente meno influenzata da fenomeni di floor effect nei pazienti non deambulanti e potrebbe risultare più adatta al monitoraggio longitudinale delle forme adulte caratterizzate da lenta progressione e ampia eterogeneità funzionale.

Questo aspetto assume particolare rilevanza nell'era delle DMTs, nella quale la capacità di rilevare modificazioni funzionali anche sottili rappresenta uno degli elementi centrali della pratica clinica e della ricerca.

Numero di copie di SMN2 e perdita di linearità della relazione genotipo-fenotipo

L'analisi delle relazioni tra numero di copie di SMN2 e parametri funzionali ha evidenziato risultati solo parzialmente sovrapponibili alla classica relazione genotipo-fenotipo descritta nelle coorti pediatriche.

Come atteso, i pazienti portatori di quattro copie di SMN2 mostrano mediamente migliori performance motorie rispetto ai soggetti con tre copie. Tuttavia, nel nostro campione, i pazienti con tre copie presentano valori medi di HFMSE, RULM e FVC% inferiori anche rispetto ai pazienti con due copie.

Questo apparente paradosso sembra attribuibile principalmente alla composizione interna del campione. I soggetti con tre copie appartenevano infatti prevalentemente al fenotipo SMA II, mentre tra i portatori di due copie erano presenti diversi pazienti SMA III con migliore funzione residua e maggiore conservazione della deambulazione.

Al di là dell'effetto legato alla composizione del campione, questi risultati sottolineano comunque come, nell'età adulta, il numero di copie di SMN2 non sia sufficiente da solo a spiegare la complessità clinica della malattia. La presenza di fenotipi profondamente differenti nonostante assetti genetici simili suggerisce il possibile contributo di ulteriori fattori modificatori ancora non completamente chiariti.

Pattern topografico della debolezza muscolare

L'analisi segmentaria della forza muscolare ha evidenziato un pattern relativamente coerente di distribuzione del deficit stenico nella SMA adulta.

Il coinvolgimento dell'ileopsoas e del quadricipite femorale risulta precoce, costante e severo già nelle prime decadi dell'età adulta, configurandosi come il reperto più uniforme dell'intera coorte. Con l'avanzare dell'età, il deficit tende progressivamente a estendersi agli altri gruppi muscolari della coscia e successivamente ai compartimenti tibio-peroneali, mentre la muscolatura surale risultava relativamente risparmiata.

Agli arti superiori, i flessori profondi delle dita appaiono coinvolti precocemente e persistentemente, mentre il deltoide mostra un interessamento inizialmente più sfumato ma con netto peggioramento oltre i 60 anni.

Nel complesso, il pattern osservato suggerisce l'esistenza di una progressione topografica relativamente selettiva del deficit muscolare nella SMA adulta,

caratterizzata da predominante vulnerabilità prossimale e anteriore nelle fasi iniziali e successiva estensione ai distretti distali e agli arti superiori nelle età più avanzate.

Implicazioni cliniche nell'era delle Disease Modifying Therapies

L'introduzione delle DMTs ha profondamente modificato la storia naturale della SMA, rendendo sempre più necessario disporre di modelli interpretativi adeguati alla popolazione adulta.

I risultati del presente studio evidenziano come la SMA adulta non possa più essere interpretata esclusivamente attraverso le tradizionali categorie fenotipiche sviluppate in epoca pre-terapeutica. L'ampia eterogeneità osservata, la relativa dissociazione tra funzione motoria e respiratoria e la perdita di linearità della relazione genotipo-fenotipo suggeriscono infatti la necessità di approcci multidimensionali alla valutazione clinica.

In questo contesto, la caratterizzazione approfondita delle coorti adulte attuali assume particolare rilevanza anche come termine di confronto storico-clinico per le future generazioni di pazienti trattati precocemente mediante screening neonatale e intervento terapeutico presintomatico.

La popolazione adulta studiata rappresenta infatti probabilmente una fase di transizione storica della malattia: quella dei pazienti che hanno raggiunto l'età adulta senza trattamento precoce o che hanno iniziato una terapia modificante solo in età avanzata.

Documentarne oggi le caratteristiche cliniche e funzionali significa fornire un riferimento indispensabile per interpretare l'evoluzione futura della SMA nell'era terapeutica.

Limiti dello studio

Il principale limite del presente studio è rappresentato dalla ridotta numerosità campionaria, che limita la potenza statistica delle analisi e riduce la possibilità di generalizzazione dei risultati.

La natura trasversale dello studio non consente inoltre di definire reali traiettorie longitudinali di progressione clinica.

Ulteriori limiti sono rappresentati dall'eterogeneità della popolazione analizzata e dalla ridotta numerosità di alcuni sottogruppi, in particolare dei pazienti SMA IV.

Nonostante tali limitazioni, il lavoro fornisce una caratterizzazione dettagliata della SMA adulta, evidenziando aspetti clinicamente rilevanti relativamente all'eterogeneità fenotipica, alla progressione età-dipendente e alla relazione tra funzione motoria e funzione respiratoria.

CONCLUSIONI

La SMA nell'età adulta appare caratterizzata da una marcata eterogeneità clinica e funzionale, non completamente spiegabile dal sottotipo clinico o dal numero di copie di SMN2.

La progressione della malattia mostra un andamento non lineare, con relativo mantenimento funzionale nelle prime decadi dell'età adulta e più evidente deterioramento oltre i 60 anni.

La funzione respiratoria presenta una relazione solo parziale con la compromissione motoria globale, suggerendo pattern differenziati di vulnerabilità muscolare.

Nel complesso, i risultati del presente studio supportano la necessità di una ridefinizione fenotipica della SMA adulta nell'era delle Disease Modifying Therapies e sottolineano l'importanza di approcci multidimensionali nella valutazione clinica e funzionale dei pazienti adulti.

BIBLIOGRAFIA

Arkblad EL, Darin N, Berg K, Kimber E, Brandberg G, Lindberg C, Holmberg E, Tulinius M, Nordling M. Multiplex ligation-dependent probe amplification improve diagnostics in spinal muscular atrophy. *Neuromuscul Disord*. 2006;16:830–838. doi: 10.1016/j.nmd.2006.08.011.

Bada Juarez JF, Munoz-Garcia JC, Inacio Dos Reis R, Henry A, McMillan D, Kriek M, et al. Detergent-free extraction of a functional low-expressing GPCR from a human cell line. *Biochim Biophys Acta Biomembr*. 2020;1862:183152. doi: 10.1016/j.bbamem.2019.183152.

Bertini E, Burghes A, Bushby K, Estournet-Mathiaud B, Finkel RS, Hughes RA, Iannaccone ST, Melki J, Mercuri E, Muntoni F, et al. 134th ENMC International Workshop: Outcome Measures and Treatment of Spinal Muscular Atrophy, 11-13 February 2005, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscular Disorders*. 2005;15:802–816. doi: 10.1016/j.nmd.2005.07.005.

Bersch B, Dorr JM, Hessel A, Killian JA, Schanda P. Proton-detected solid-state NMR spectroscopy of a zinc diffusion facilitator protein in native nanodiscs. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2017;56:2508–2512. doi: 10.1002/anie.201610441.

Blatnik AJ III, McGovern VL, Burghes AHM. What Genetics Has Told Us and How It Can Inform Future Experiments for Spinal Muscular Atrophy, a Perspective. *Int J Mol Sci*. 2021;22:8494. doi: 10.3390/ijms22168494.

Broecker J, Eger BT, Ernst OP. Crystallography of membrane proteins mediated by polymer-bounded lipid nanodiscs. *Structure*. 2017;25:384–392. doi: 10.1016/j.str.2016.12.004.

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 5q11.2-13.3. *Nature*. 1990;344:540–541. doi: 10.1038/344540a0.

Burghes AHM, Beattie CE. Spinal Muscular Atrophy: Why Do Low Levels of Survival Motor Neuron Protein Make Motor Neurons Sick? *Nat Rev Neurosci*. 2009;10:597–609. doi: 10.1038/nrn2670.

Bürglen L, Lefebvre S, Clermont O, Burlet P, Viollet L, Cruaud C, et al. Structure and Organization of the Human Survival Motor Neurone (SMN) Gene. *Genomics*. 1996;32:479–482. doi: 10.1006/geno.1996.0147.

Burnett BG, Muñoz E, Tandon A, Kwon DY, Sumner CJ, Fischbeck KH. Regulation of SMN Protein Stability. *Mol Cell Biol*. 2009;29:1107–1115. doi: 10.1128/MCB.01262-08.

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;30:377–384. doi: 10.1038/ng854.

Coratti G, Ricci M, Capasso A, D'amico A, Sansone V, Bruno C, Messina S, Ricci F, Mongini T, Coccia M, Siciliano G, Pegoraro E, Turri M, Filosto M, Comi G, Masson R, Maggi L, Bruno I, D'Angelo MG, Trabacca A, Vacchiano V, Donati M, Simone I, Ruggiero L, Varone A, Verriello L, Berardinelli A, Agosto C, Pini A, Maioli MA, Passamano L, Brighina F, Carboni N, Garibaldi M, Zuccarino R, Gagliardi D, Siliquini S, Previtali S, Taruscio D, Boccia S, Pera MC, Pane M, Mercuri E; ITASMAC working group. Prevalence of Spinal Muscular Atrophy in the Era of Disease-Modifying Therapies: An Italian Nationwide Survey. *Neurology*. 2023 Mar 14;100(11):522-528. doi: 10.1212/WNL.000000000201654. Epub 2022 Dec 2. PMID: 36460469; PMCID: PMC10074458.

Cuscó I, López E, Soler-Botija C, Jesús Barceló M, Baiget M, Tizzano EF. A genetic and phenotypic analysis in Spanish spinal muscular atrophy patients with c.399_402del AGAG, the most frequently found subtle mutation in the SMN1 gene. *Hum Mutat*. 2003;22:136–143. doi: 10.1002/humu.10245.

Du D, Neuberger A, Orr MW, Newman CE, Hsu PC, Samsudin F, et al. Interactions of a bacterial RND transporter with a transmembrane small protein in a lipid environment. *Structure*. 2020;28:625–634.e6. doi: 10.1016/j.str.2020.03.013.

Fallini C, Bassell GJ, Rossoll W. Spinal Muscular Atrophy: The Role of SMN in Axonal mRNA Regulation. *Brain Res*. 2012;1462:81–92. doi: 10.1016/j.brainres.2012.01.044.

Fan L, Simard LR. Survival motor neuron (SMN) protein: role in neurite outgrowth and neuromuscular maturation during neuronal differentiation and development. *Hum Mol Genet*. 2002;11:1605–1614. doi: 10.1093/hmg/11.14.1605.

Feldkötter M, Schwarzer V, Wirth R, Wienker TF, Wirth B. Quantitative Analyses of SMN1 and SMN2 Based on Real-Time LightCycler PCR: Fast and Highly Reliable Carrier Testing and Prediction of Severity of Spinal Muscular Atrophy. *Am J Hum Genet*. 2002;70:358–368. doi: 10.1086/338627.

Foust KD, Wang X, McGovern VL, Braun L, Bevan AK, Haidet AM, et al. Rescue of the spinal muscular atrophy phenotype in a mouse model by early postnatal delivery of SMN. *Nat Biotechnol*. 2010;28:271–274. doi: 10.1038/nbt.1610.

Garbes L, Riessland M, Holker I, Heller R, Hauke J, Trankle C, et al. LBH589 induces up to 10-fold SMN protein levels by several independent mechanisms and is effective even in cells from SMA patients non-responsive to valproate. *Hum Mol Genet*. 2009;18:3645–3658. doi: 10.1093/hmg/ddp313.

Geib T, Hertel KJ. Restoration of full-length SMN promoted by adenoviral vectors expressing RNA antisense oligonucleotides embedded in U7 snRNAs. *PLoS One*. 2009;4:e8204. doi: 10.1371/journal.pone.0008204.

Hebert MD, Szymczyk PW, Shpargel KB, Matera AG. *Coilin Forms the Bridge between Cajal Bodies and SMN, the Spinal Muscular Atrophy Protein.* *Genes Dev.* 2001;15:2720–2729. doi: 10.1101/gad.908401.

Ikenaka A, Kitagawa Y, Yoshida M, Lin CY, Niwa A, Nakahata T, et al. *SMN Promotes Mitochondrial Metabolic Maturation during Myogenesis by Regulating the MYOD-MiRNA Axis.* *Life Sci Alliance.* 2023;6:e202201457. doi: 10.26508/lsa.202201457.

Jarecki J, Chen X, Bernardino A, Coovert DD, Whitney M, Burghes A, et al. *Diverse small-molecule modulators of SMN expression found by high-throughput compound screening: early leads towards a therapeutic for spinal muscular atrophy.* *Hum Mol Genet.* 2005;14:2003–2018. doi: 10.1093/hmg/ddi205.

Jodelka FM, Ebert AD, Duelli DM, Hastings ML. *A Feedback Loop Regulates Splicing of the Spinal Muscular Atrophy-Modifying Gene, SMN2.* *Hum Mol Genet.* 2010;19:4906–4917. doi: 10.1093/hmg/ddq425.

Kelly TE, Amoroso K, Ferre M, Blanco J, Allinson P, Prior TW. *Spinal muscular atrophy variant with congenital fractures.* *Am J Med Genet.* 1999;87:65–68. doi: 10.1002/(SICI)1096-8628(19991105)87:1<65::AID-AJMG13>3.0.CO;2-5.

Kim JK, Jha NN, Awano T, Caine C, Gollapalli K, Welby E, et al. *A Spinal Muscular Atrophy Modifier Implicates the SMN Protein in SNARE Complex Assembly at Neuromuscular Synapses.* *Neuron.* 2023;111:1423–1439.e4. doi: 10.1016/j.neuron.2023.02.004.

Lefebvre S, Bürglen L, Reboullet S, Clermont O, Burlet P, Violette L, et al. *Identification and Characterization of a Spinal Muscular Atrophy-Determining Gene.* *Cell.* 1995;80:155–165. doi: 10.1016/0092-8674(95)90460-3.

Lefebvre S, Burlet P, Liu Q, Bertrand S, Clermont O, Munnich A, et al. *Correlation between Severity and SMN Protein Level in Spinal Muscular Atrophy.* *Nat Genet.* 1997;16:265–269. doi: 10.1038/ng0797-265.

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 USA.* 1999;96:6307–6311. doi: 10.1073/pnas.96.11.6307.

Lorson CL, Strasswimmer J, Yao JM, Baleja JD, Hahnen E, Wirth B, et al. *SMN Oligomerization Defect Correlates with Spinal Muscular Atrophy Severity.* *Nat Genet.* 1998;19:63–66. doi: 10.1038/ng0598-63.

Martin R, Gupta K, Ninan NS, Perry K, Van Duyne GD. *The Survival Motor Neuron Protein Forms Soluble Glycine Zipper Oligomers.* *Structure.* 2012;20:1929–1939. doi: 10.1016/j.str.2012.08.024.

- Messina S, Pane M, De Rose P, Vasta I, Sorleti D, Aloysius A, et al. Feeding problems and malnutrition in spinal muscular atrophy type II. *Neuromuscul Disord.* 2008;18:389–393. doi: 10.1016/j.nmd.2008.02.008.
- Niba ETE, Nishio H, Wijaya YOS, Ar Rochmah M, Takarada T, Takeuchi A, et al. Stability and Oligomerization of Mutated SMN Protein Determine Clinical Severity of Spinal Muscular Atrophy. *Genes.* 2022;13:205. doi: 10.3390/genes13020205.
- Pellizzoni L. Chaperoning Ribonucleoprotein Biogenesis in Health and Disease. *EMBO Rep.* 2007;8:340–345. doi: 10.1038/sj.embor.7400941.
- Postis V, Rawson S, Mitchell JK, Lee SC, Parslow RA, Dafforn TR, et al. The use of SMALPs as a novel membrane protein scaffold for structure study by negative stain electron microscopy. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1848:496–501. doi: 10.1016/j.bbamem.2014.10.018.
- Prior TW, Snyder PJ, Rink BD, Pearl DK, Pyatt RE, Mihal DC, et al. Newborn and carrier screening for spinal muscular atrophy. *Am J Med Genet A.* 2010;152A:1605–1607. doi: 10.1002/ajmg.a.33519.
- Ragette R, Mellies U, Schwake C, Voit T, Teschler H. Patterns and predictors of sleep disordered breathing in primary myopathies. *Thorax.* 2002;57:724–728. doi: 10.1136/thorax.57.8.724.
- Ramos Liu Q, Dreyfuss G. A Novel Nuclear Structure Containing the Survival of Motor Neurons Protein. *EMBO J.* 1996;15:3555–3565.
- Roy N, Mahadevan MS, McLean M, Shutler G, Yaraghi Z, Farahani R, et al. The Gene for Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein Is Partially Deleted in Individuals with Spinal Muscular Atrophy. *Cell.* 1995;80:167–178. doi: 10.1016/0092-8674(95)90461-1.
- Shanmugarajan S, Tsuruga E, Swoboda KJ, Maria BL, Ries WL, Reddy SV. Bone loss in survival motor neuron (*Smn(-/-)* SMN2) genetic mouse model of spinal muscular atrophy. *J Pathol.* 2009;219:52–60. doi: 10.1002/path.2566.
- Tiziano FD, Lomastro R, Pinto AM, Messina S, D'Amico A, Fiori S, et al. Salbutamol increases survival motor neuron (SMN) transcript levels in leucocytes of spinal muscular atrophy (SMA) patients: relevance for clinical trial design. *J Med Genet.* 2010;47:856–858. doi: 10.1136/jmg.2010.080366.
- Verhaart IEC, Robertson A, Wilson IJ, Aartsma-Rus A, Cameron S, Jones CC, Cook SF, Lochmüller H. Prevalence, incidence and carrier frequency of 5q-linked spinal muscular atrophy - a literature review. *Orphanet J Rare Dis.* 2017 Jul 4;12(1):124. doi: 10.1186/s13023-017-0671-8. PMID: 28676062; PMCID: PMC5496354.

Vitte J, Fassier C, Tiziano FD, Dalard C, Soave S, Roblot N, et al. Refined characterization of the expression and stability of the SMN gene products. *Am J Pathol.* 2007;171:1269–1280. doi: 10.2353/ajpath.2007.070399.

Wang CH, Finkel RS, Bertini ES, Schroth M, Simonds A, Wong B, et al. Consensus statement for standard of care in spinal muscular atrophy. *J Child Neurol.* 2007;22:1027–1049. doi: 10.1177/0883073807305788.

Werdnig G. Zwei frühinfantile hereditäre Fälle von progressive Muskelatrophie unter dem Bilde der Dystrophie, aber auf neurotischer Grundlage. *Arch Psychiatr Nervenkr.* 1891;22:437–480. doi: 10.1007/BF01776636.

Yanyushin MF, del Rosario MC, Brune DC, Blankenship RE. New class of bacterial membrane oxidoreductases. *Biochemistry.* 2005;44:10037–10045. doi: 10.1021/bi047267l.

Yoder N, Gouaux E. The His-Gly motif of acid-sensing ion channels resides in a reentrant 'loop' implicated in gating and ion selectivity. *eLife.* 2020;9:e56527. doi: 10.7554/eLife.56527.

SITOGRAFIA

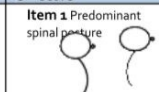
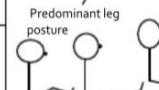
- <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5098831/>

- <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11405177/>

- <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8198411/>
- <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10573646/>
- <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10418635/>
- <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3231874/>
- <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10418635/#sec3-ijms-24-11939>
- <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4628728/>
- <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8286838/#s2>
- <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7846873/>
- <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11549153/>
- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38878146/>
- <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7029319/>
- <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC12092217/>
- <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9503857/>
- <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4514700/>
- <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11380303/>

APPENDICE

HAMMERSMITH FUNCTIONAL MOTOR SCALE

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

Test	Instruction	2	1	0	L B C	S =	Comments
							S = score
16 Crawling	Can you crawl forwards?	Able to crawl forwards – moves all four points twice or more	Moves all four points only once	Unable			
17 Lifts head from supine	Can you lift your head to look at your toes keeping your arms folded for a count of 3?	In supine, head must be lifted in mid-line. Chin moves towards chest. Held for a count of 3	Head is lifted but through side flexion or with no neck flexion. Held for a count of 3	Unable			
18 Supported standing	Can you stand using one hand for support for a count of 3?	Can stand using one hand support for a count of 3	Able to stand with minimal trunk support (not hip) for a count of 3	Can stand with hand support but needs knee/hip support in addition for a count of 3 Or unable			
19 Stand unsupported	Can you stand without holding onto anything for a count of 3?	Can stand independently for the more than a count of 3	Stands independently for a count of 3	Stands only momentarily (less than a count of 3) Or unable			
20 Stepping	Can you walk without using any help or aids? Show me	Able to take more than 4 steps unaided	Able to take 2 – 4 steps unaided	Unable			
SCORE		No of 2's =	No of 1's =	No of 0's =	TOTAL =	/40	
Comments							

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