



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale in:

Biologia Molecolare e Applicata

**Analisi delle Variazioni del Numero di Copie (CNV) in
pazienti affetti da epilessia**

**Analysis of Copy Number Variations (CNV) in patients
affected by epilepsy**

Tesi di Laurea Magistrale di:
Giuseppe Stivaletta

Relatore
Prof. Marco Barucca

Correlatore:
Prof.ssa Valentina Gatta

Sessione Autunnale
Anno Accademico 2023/2024

*A mia madre,
questo traguardo è in parte anche suo
per le giornate passate insieme in macchina,
alla pazienza e l'amore che ha permesso tutto questo*

*A Letizia,
che mi ha sopportato nei miei stati d'animo alterati
e mi ha dato la forza di passare ogni ostacolo*

Indice

1. Abstract	1
2. Introduzione	2
2.1 Definizione di epilessia	2
2.2 Eziologia	4
2.3 Classificazione	6
2.4 Le basi genetiche dell'epilessia.....	8
2.5 Consulenza genetica.....	16
2.6 Diagnosi ed analisi CMA (Chromosomal Microarray Analysis).....	18
3. Materiali e metodi	27
3.1 Reclutamento dei pazienti	27
3.2 Casistica	27
3.3 Tecnica di estrazione	29
3.4 Quantizzazione.....	30
3.5 Analisi CMA (Chromosomal Microarray Analysis)	31
3.5.1 Digestione.....	33
3.5.2 Ligazione	33
3.5.3 Reazione a catena della polimerasi (PCR)	34
3.5.4 Purificazione degli amplificati	36
3.5.5 Quantificazione	36
3.5.6 Frammentazione	36
3.5.7 Marcatura.....	37
3.5.8 Ibridazione.....	38
3.5.9 Lavaggio, rivelazione e scansione degli array.....	39
4. Risultati	41
5. Discussione	43
6. Conclusioni	45
7. Bibliografia	47

1. Abstract

L'epilessia è una patologia caratterizzata da crisi convulsive che possono essere più o meno debilitanti per l'individuo affetto. È una patologia eterogenea in quanto presenta un notevole numero di quadri clinici diversi, a seconda del paziente in cui si manifesta, dell'età, delle comorbilità e soprattutto dei geni alterati se ne sono responsabili. Negli ultimi anni la ricerca scientifica ha aiutato le persone affette da epilessia sia nella comprensione di quest'ultima, sia nella terapia, portando molti pazienti a convivere più facilmente. Le epilessie che riconoscono una eziologia genetica al giorno d'oggi sono largamente conosciute e studiate, in quanto le metodiche molecolari utilizzate permettono di indagare l'intero genoma, o quasi. La prima tecnica da utilizzare da linee guida e, quindi, effettuata in prima battuta presso il laboratorio di Genetica Medica dell'Università <G. d'Annunzio> di Chieti è la Chromosomal Microarray Analysis (CMA), una metodica comparativa che studia le possibili alterazioni in termini di variazione nel numero di copie (CNV) e polimorfismi a singolo nucleotide del DNA nei pazienti analizzati. Per tale motivo, questo studio ha preso in considerazione la CMA effettuata in un totale di 10 pazienti con diagnosi di epilessia idiopatica, andando a valutare il loro assetto genetico dai risultati ottenuti. In conclusione, è stato possibile notare come la maggior parte dei pazienti in esame presenta almeno una alterazione cromosomica, che non sempre fa emergere esclusivamente un sospetto clinico, in quanto esistono molte variazioni che non state ancora classificate in letteratura. D'altro canto, la ricerca scientifica in questo ambito è in netta crescita e fan ben sperare per il futuro, in cui si avranno sempre meno risultati incerti e più individui con una diagnosi di epilessia accurata. Inoltre, la CMA è una tecnica che permette lo studio completo dell'assetto cromosomico di un individuo, permettendo di andare a valutare i risultati non solo nell'ambito di ricerca (in questo caso l'epilessia) ma in generale di qualsiasi potenziale patologia correlata.

2. Introduzione

2.1 Definizione di epilessia

Le patologie neurologiche conosciute al giorno d'oggi sono estremamente numerose e la maggior parte di esse non sono ancora del tutto comprese, in quanto il Sistema Nervoso Centrale (SNC) è un mondo tutt'ora in esplorazione. Le patologie ad esso correlate possono essere distinte in cinque macrogruppi: malattie cerebrovascolari, infettive e infiammatorie, neoplastiche, degenerative e traumatiche. L'epilessia non è classificabile con questo metodo, in quanto può essere la manifestazione clinica di numerosi fattori e condizioni.

I neuroni normalmente generano segnali elettrici e chimici che agiscono su altri neuroni, organi e muscoli, in cui vengono prodotte risposte elettro-chimiche. La funzionalità delle cellule neuronali viene modulata dal passaggio dell'impulso elettrico che le attiva o disattiva, oppure ne rafforza o indebolisce le connessioni. Le diverse aree cerebrali, che si distinguono per funzionalità, sono interconnesse tra loro e variano in maniera sincrona la loro eccitabilità, producendo così un'attività elettrica con una determinata frequenza facilmente osservabili, registrando un classico elettroencefalogramma (EEG). Quando il ritmo dell'impulso elettrico cambia, vuol dire che la connettività cerebrale sta cambiando, e muta di conseguenza lo stato dei circuiti neurali (ovviamente, questo non è solo alla base di stati patologici, in quanto è lo stesso meccanismo che porta al passaggio dal sonno alla veglia e viceversa) (Simone Rossi, 2020). D'altro canto, alcune alterazioni periodiche dell'attività elettrica del cervello sono caratteristiche di alcune disfunzioni cerebrali transitorie che possono originare ad esempio nella corteccia cerebrale o nelle strutture ippocampali e sono fenotipicamente diverse in base alla zona d'origine (Bola Adamolekun, 2024). Studi di neuropatologia mostrano come un'iperattività transitoria, anomala e sincrona all'interno di una popolazione neuronale nel cervello può scatenare crisi cerebrali di varie entità. Tale disfunzione cerebrale può essere accompagnata da diversi disturbi,

motori e sensoriali, a seconda della regione cerebrale coinvolta nell'origine (Władysław Lasoń et al., 2013). Proprio per questo, le stimolazioni sono estremamente regolate da molti meccanismi che riescono (nello stato fisiologico) a prevenire una serie di piccoli errori che potrebbero portare a conseguenze anche gravi. Le crisi convulsive sono il classico esempio del risultato di una o più interruzioni dell'attività elettrica neuronale ed, in base alla causa, si possono distinguere in:

- **Epilettiche:** non hanno una causa scatenante apparente (cioè non sono provocate) e si ripresentano due o più volte nell'arco di un breve periodo di tempo. Una sola crisi convulsiva non è considerata epilessia. Le convulsioni epilettiche sono dette sindrome convulsiva o epilessia.
- **Non epilettiche:** queste crisi convulsive sono provocate da un disturbo reversibile o temporaneo che altera la condizione fisiologica del cervello, come ad esempio un'infezione, un trauma cranico o una reazione a un farmaco. Nei bambini, una febbre può scatenare una crisi convulsiva non epilettica (chiamata crisi convulsiva febbrile) (Bola Adamolekun, 2024).

Un esempio di disfunzione cerebrale è l'epilessia, chiamata anche malattia epilettica, un disturbo cerebrale cronico in cui gruppi di neuroni nel cervello inviano segnali in modo errato e causano convulsioni (National Institute of Neurological Disorders and Stroke, 2024). Epilessia e convulsioni spesso vengono utilizzate come sinonimi, ma in realtà sono, per definizione, facilmente distinguibili. L'epilessia è una condizione in cui si susseguono convulsioni ricorrenti e spontanee. Le convulsioni sono episodi più o meno brevi caratterizzati da alterazioni periodiche, solitamente iperstimolazioni, dell'attività elettrica del cervello, che si traducono in una disfunzione cerebrale transitoria. Possono coinvolgere una parte precisa parte del corpo (focale) o l'intero corpo (generalizzato) e talvolta sono accompagnati da perdita di coscienza e del controllo della funzione intestinale o vescicale (*World Health Organization, 2024*). L'epilessia, essendo definita come <disturbo cronico cerebrale=>, è caratterizzata da convulsioni ricorrenti che sono spontanee (ossia, non correlate a fattori di stress reversibili) e si verificano a distanza di più di 24 ore. Una singola convulsione non è sintomatologica di un quadro epilettico, perché potrebbe essere stata provocata da fattori esterni e potrebbe essere l'unico evento riconoscibile come tale nell'individuo (Helen E. Scharfman, 2007).

Si parla di epilessia in una di queste tre possibili situazioni:

- Almeno due crisi non provocate che si succedono in un tempo minimo di 24 ore;
- Una crisi non provocata succeduta da ulteriori crisi con alto rischio di recidiva (almeno il 60%) dopo due crisi riflesse, che si verificano negli anni seguenti (entro 10 anni);
- Diagnosi di sindrome epilettica (*Robert S. Fisher et al. 2014*).

L'epilessia è spesso definita idiopatica, dato che effettuare una diagnosi adeguata è molto complesso, ma vari disturbi del cervello, quali malformazioni, ictus, tumori e mutazioni genetiche possono esserne la causa che spesso rimane sconosciuta. Colpisce circa 50 milioni di persone in tutto il mondo ed il 10% della popolazione mondiale ha avuto almeno una convulsione, scaturendo epilessia nell'1-2% della popolazione mondiale (Jessica Falco-Walter, 2020). Questa condizione patologica colpisce persone di tutte le età, parametro che può variare in base al tipo di epilessia e quindi la causa scatenante. La stragrande maggioranza dei pazienti è in grado di vivere una vita normale con un trattamento adeguato, ma attuare un regime terapeutico idoneo è difficile e spesso non accade, soprattutto perché a monte la diagnosi è errata. Alcuni pazienti hanno gravi comorbidità come disturbi psichiatrici e ritardo mentale, tra i più importanti si riconosce il disturbo dello spettro autistico. Inoltre, è responsabile dello 0,3 % di tutti i decessi nel mondo (*Carlos A. M. Guerreiro, 2016*).

2.2 Eziologia

Quando l'epilessia non si associa a lesioni del cervello si parla di Epilessia Primaria, mentre quando ne è riconducibile (tumori, processi infiammatori prolungati, malformazioni etc.) si parla di Epilessia Secondaria. Tra la primaria la più importante è l'epilessia dovuta ad alterazioni genetiche, infatti sono oggi conosciuti quasi mille geni che possono portare a numerose crisi epilettiche diverse tra loro (Istituto Superiore di Sanità, 2019). Esiste quindi anche una predisposizione a sviluppare crisi epilettiche, anche se nella maggior parte dei casi sembra non avere una vera e propria causa genetica, ovvero la predisposizione non si basa sulla genetica dell'individuo, ma può essere il risultato di una varietà di fattori di rischio e la loro significatività varia da popolazione a popolazione. Nel 50% dei casi, comunque, la causa rimane sconosciuta.

Tuttavia, al giorno d'oggi le metodiche di sequenziamento per l'intero genoma hanno dei costi relativamente bassi ed, insieme all'utilizzo di pannelli genetici, rendono la pratica clinica in questo ambito conveniente in termini di costi, tempistiche e funzionalità.

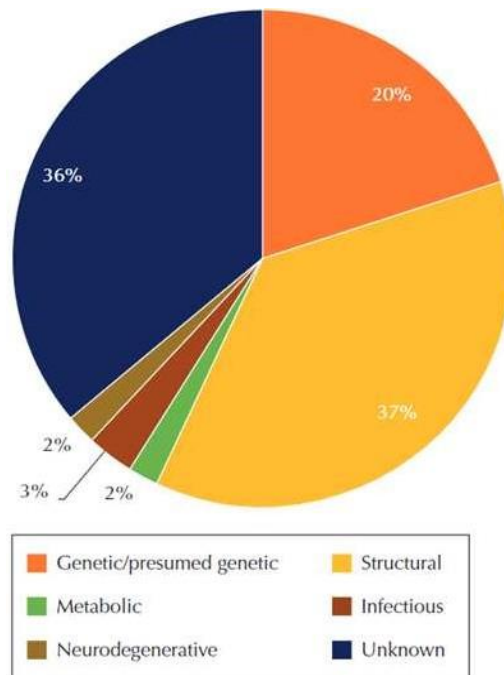


FIGURA 1: *L'immagine mostra (in percentuale) la frequenza delle sei eziologie conosciute per l'epilessia nella comunità europea, e si può dedurre che:*

- *L'eziologia genetica è una delle più frequenti, quindi la cosiddetta <predisposizione> viene riconosciuta in molti pazienti epilettici;*
- *Nonostante i passi da gigante della ricerca scientifica in questo ambito, in buona parte delle epilessie non viene riconosciuta una causa.*
- *Le cause strutturali sono altrettanto numerose, in cui rientrano anomalie anatomiche, traumi, tumori ed altri (Simona Balestrini et al., 2020).*

Le cause più frequenti di crisi epilettiche variano secondo l'età di insorgenza:

- Prima dei 2 anni: disturbi neurologici congeniti o ereditari, lesioni perinatali e disturbi metabolici ereditati o acquisiti;
- Dai 2 ai 14 anni: epilessie idiopatiche;
- Adulti: traumi cerebrali, astinenza da alcol, tumori, ictus e cause sconosciute (nel 50% dei casi);

- Persone più anziane: tumori e ictus (Bola Adamolekun, 2024).

2.3 Classificazione

La ricerca scientifica sta portando grandi cambiamenti, basandosi in primo luogo sull'aggiornamento più accurato possibile di definizioni e classificazioni delle epilessie, per diminuire drasticamente diagnosi e trattamenti errati, oggi ancora molto frequenti. La classificazione è di cruciale importanza per discriminare i vari quadri clinici, portando non solo ad una diagnosi corretta, ma anche ad un trattamento appropriato. Troppo spesso i pazienti vengono sottoposti ad una diagnosi poco accurata, quindi non solo ci possono essere errori nella valutazione, ma l'epilessia se identificata non viene descritta in modo appropriato non arrivando a conoscere il tipo di epilessia di cui è affetto il paziente; quindi, bisogna capire quale sia l'evento scatenante l'epilessia e se si può attuare o meno un regime terapeutico mirato. Le crisi epilettiche possono essere differenziate in base alla distanza temporale con la malattia scatenante, o predisponente:

- 1) Crisi epilettiche sintomatiche acute, definite anche <provocate=: insorgono in presenza di danno cerebrale (quindi di tipo meccanico), o condizioni patologiche metaboliche o insorte in presenza di agenti tossici;
- 2) Crisi epilettiche sintomatiche remote, definite anche <non provocate=: non si riconosce una vera e propria causa oppure il danno cerebrale, se presente, è datato e non può essere indicato a priori come causa scatenante (Huff JS et al., 2020).

Questa distinzione è importante per la definizione dell'epilessia stessa.

L'International League Against Epilepsy (ILAE) ha rivisto e riorganizzato nel 2013 e poi nel 2017 la classificazione delle epilessie, che era stata revisionata solamente nel 1989, divenendo definitiva in termini di criteri di classificazione. L'aggiornamento viene effettuato per mantenere il passo con la ricerca scientifica ed al giorno d'oggi esistono tre livelli di classificazione: Si suddividono in tipi di crisi (o convulsioni), tipi di epilessia e sindrome epilettica (Robert S. Fisher et al., 2017).

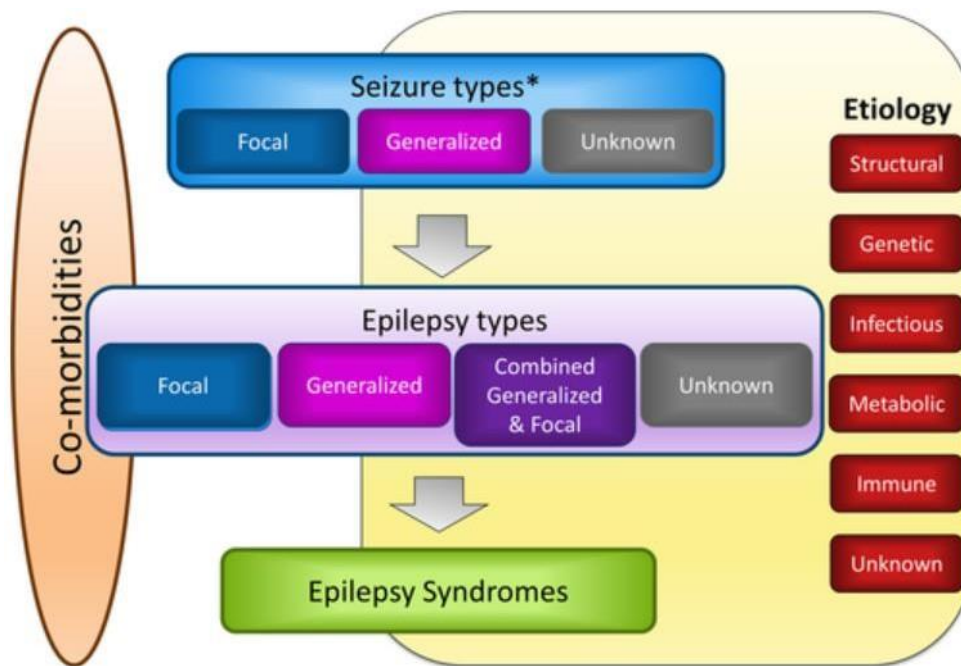


FIGURA 2: *Le crisi possono essere ampiamente categorizzate in crisi focali (originate all'interno di reti cerebrali limitate a un emisfero), crisi generalizzate (originate in un punto all'interno e che coinvolgono rapidamente reti cerebrali distribuite bilateralmente) e crisi di esordio sconosciuto (se non ci sono informazioni sufficienti per classificare la crisi come focale o generalizzata) (Piero Perucca et al., 2020).*

Il secondo livello è la diagnosi del tipo di epilessia, che comprende quattro classi principali: epilessia focale, epilessia generalizzata, epilessia focale e generalizzata combinata ed epilessia sconosciuta. Questo livello include una nuova categoria di epilessia (focale e generalizzata combinata), che riflette l'esistenza di meccanismi condivisi tra i gruppi consolidati di epilessia focale ed epilessia generalizzata. Il terzo livello è la delineazione della sindrome epilettica, quando può essere fatta una diagnosi sindromica specifica (Piero Perucca et al., 2020).

Un'altra classificazione prevede la suddivisione in base alla causa scatenante:

- 1) **Strutturale:** alterazioni anatomiche cerebrali prenatali o perinatali che possono essere dovute a molteplici cause come traumi, mancanza d'ossigeno e malformazioni congenite;
- 2) **Infettiva:** patologie causate da microorganismi come meningite ed encefalite;
- 3) **Genetica;**
- 4) **Metabolica:** ictus ed altre situazioni in cui viene a mancare ossigeno alle cellule nel sistema nervoso centrale;
- 5) **Immunologica:** di solito hanno un'origine genetica;
- 6) **Sconosciuta.**

Queste non sono categorie reciprocamente esclusive e molte eziologie rientrano in più di una categoria. Infatti, i fattori genetici probabilmente svolgono un ruolo, a vari livelli, nel rischio di crisi in tutte le persone con epilessia. Tra le epilessie genetiche, le prime che sono state identificate come tali sono state le monogeniche familiari, in cui le alterazioni sono localizzate nella sequenza codificante delle proteine che causava sostituzioni di amminoacidi (missenso) o troncamento delle proteine (nonsense, frameshift, delezione o splicing). Essendo monogeniche la maggior parte delle volte sono dominanti de novo, ma solo una minoranza di epilessie in generale ha un'eziologia monogenica. Le epilessie comuni, come le epilessie genetiche generalizzate e le epilessie focali, seguono un'ereditarietà complessa. Ciò significa che hanno una base poligenica, in cui più varianti geniche contribuiscono al disturbo, con o senza un effetto da fattori ambientali (Amy McTague MBChB et al., 2016).

2.4 Le basi genetiche dell'epilessia

I meccanismi genetici che possono essere implicati nelle sindromi epilettiche sono poco conosciuti e possono essere la causa di anomalie dello sviluppo, morte neuronale, cambiamenti nell'eccitabilità neuronale attraverso modifiche nei canali ionici voltaggio-dipendenti e ligando-dipendenti, come risultato di un singolo gene (modello semplice di ereditarietà) o un'influenza combinata di più geni e fattori ambientali (che

agiscono come modulatori genici) (D. Bhalla, 2011). Da ormai diversi anni la genetica è una parte fondamentale della pratica clinica quotidiana dell'epilessia. Le conoscenze odierne permettono di utilizzare diversi pannelli genici per studiare la possibile causa di epilessia, soprattutto nei giovani pazienti. Così come in altri ambiti della medicina, anche per le epilessie il trattamento è sempre più personalizzato, grazie alla conoscenza dei pattern molecolari alla base di disfunzioni o malfunzioni del tessuto cerebrale, quindi in base ai geni mutati e l'anamnesi del paziente il medico può direzionarsi verso varie alternative di terapia in target. La base genetica dell'epilessia non è una scoperta odierna, infatti per molti anni è stata sospettata da diversi clinici ed ora, con le nuove tecniche di sequenziamento in uso, è stato possibile arrivare ad avere un quadro abbastanza chiaro. Tutt'ora il fondamento genetico di questa malattia viene erroneamente sottovalutato, basti pensare che le mutazioni <de novo>, sia somatiche che germinali, sono sempre più riconosciute nell'insorgenza delle encefalopatie epilettiche ma non sempre vengono diagnosticate. L'eziologia genetica non sempre implica epilessia generalizzata, molte epilessie focali infatti riconoscono questa causa (Rhys H. Thomas and Samuel F. Berkovic, 2014). Dall'identificazione del primo gene dell'epilessia da parte di Stenlein e colleghi nel 1995, *CHRNA4*, il ritmo della scoperta dei geni ha mostrato una traiettoria costante fino al 2013, in cui si è assistito ad una crescita esponenziale, con oltre 1000 geni attualmente identificati in associazione con epilessie monogeniche (Ruggiero et al., 2023).

Sostanzialmente l'epilessia ha una eziologia genetica se i sintomi sono presenti dalla nascita, in cui si hanno convulsioni febbrili come nell'iperpiressia (Pearl et al., 2018). Può essere scaturita anche da una lesione durante il periodo perinatale, generalmente risultante da uno stato di ipossia o ischemia correlata a ictus, sepsi o insufficienza cardiovascolare. Questo rischio di lesioni varia a seconda del termine di nascita. Molte volte, invece, l'epilessia è il risultato di alterazioni cromosomiche: l'1-10% dei pazienti con trisomia 21 riferiscono sintomi convulsivi e quasi il doppio mostra anomalie nell'elettroencefalogramma (EEG). L'epilessia, a seconda dell'individuo, tende a comparire maggiormente in due fasi diverse della vita: tende ad iniziare presto nella vita (soprattutto se si ha predisposizione genetica) e nella terza decade in parallelo alla progressione della demenza senile (Engel J. Et al., 2008).

Le epilessie più importanti in termini epidemiologici e di morbilità che riconoscono un'origine genetica sono le sindromi autosomiche dominanti. Due sindromi epilettiche

autosomiche dominanti possono presentarsi con crisi neonatali: epilessia neonatale familiare benigna (BFNE) ed epilessia neonatale-infantile familiare benigna (BFNIE). Le epilessie familiari autolimitate con esordio nei neonati o nei bambini, in precedenza chiamate BFNIE, sono caratterizzate da crisi focali motorie ad esordio neonatale o infantile e dall'assenza di complicazioni neuroevolutive. Le crisi tendono a regredire durante l'infanzia e sono quindi chiamate "autolimitate" (Charissa Millevert et al., 2023). In un recente studio sono state valutate 36 famiglie, in cui ognuna presentava almeno due individui che sono o sono stati affetti da crisi neonatali infantili. Tramite sequenziamento diretto è stata identificata una alterazione molecolare del gene *KCNQ2* in 32 famiglie (89%). Il gene mutato presentava, nei diversi casi, alterazioni diverse tra cui: sedici sostituzioni, cinque inserzioni/delezioni, quattro delezioni esoniche uniche (una osservata in due famiglie separate) ed una duplicazione esonica (Bronwyn E. Grinton et al., 2015). Una storia familiare positiva per l'epilessia di solito suggerisce l'eziologia genetica, ma si possono verificare penetranza incompleta ed ereditarietà de novo, situazioni da non sottovalutare in quanto sono tra i motivi principali delle epilessie definite <idiopatiche= (la clinica non scopre la causa della patologia). Le varianti patogene di *KCNQ2*, *SCN2A* e *PRRT2* rappresentano circa l'80% delle epilessie neonatali familiari autolimitanti (Charissa Millevert et al., 2023). D'altro canto, essendo malattie per lo più monogeniche ed essendo autolimitanti, rientrano tra le epilessie meno aggressive che inoltre possono essere trattate precocemente.

Le tecniche di sequenziamento NGS negli ultimi anni hanno avuto un impatto notevole nello studio di mutazioni ed, in generale, di alterazioni geniche che possono portare ad un fenotipo anomalo che può corrispondere in alcuni casi ad uno stato di malattia. Come detto, per le epilessie con insorgenza neonatale/infantile un ruolo cruciale viene svolto dalle alterazioni genetiche che ne predispongono l'individuo, quindi vanno trattati parallelamente in quanto affini.

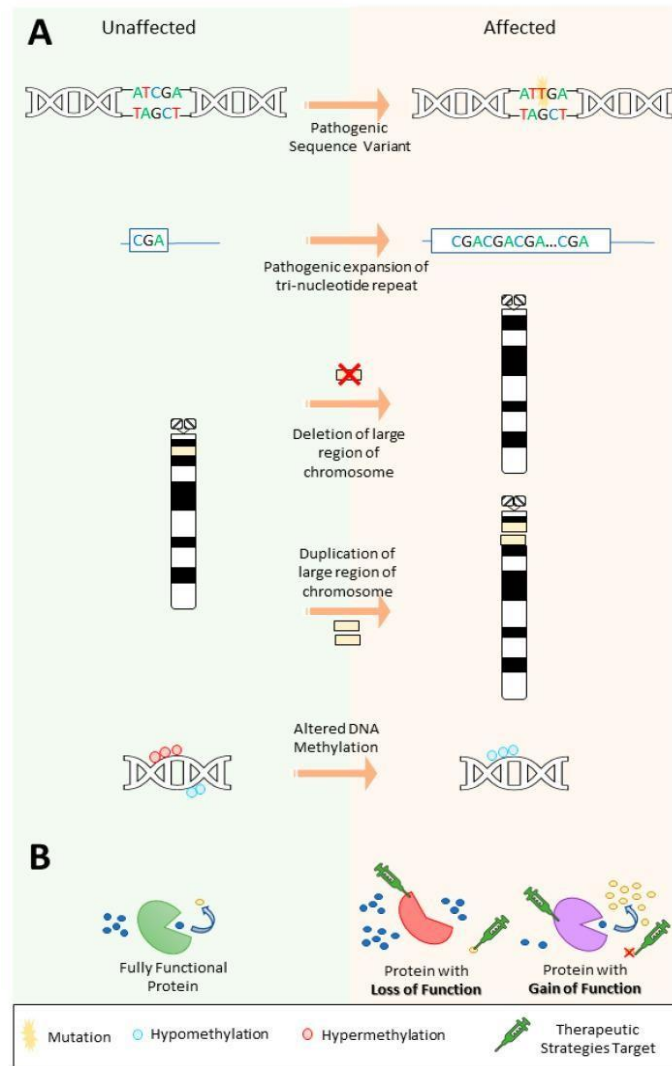


FIGURA 3: Sono tante le alterazioni molecolari a livello di nucleotidi, geni e cromosomi che possono causare l'epilessia, tra cui: varianti di sequenza, varianti di ripetizione di espansione, varianti del numero di copie e variazione epigenetica (esempio classico è l'errata metilazione del DNA). Diversi tipi di varianti possono agire in sinergia, ad esempio, un'espansione di ripetizione può causare una maggiore ipermetilazione di un promotore genico che porta alla sua inattivazione. L'effetto della variante può portare ad una perdita o ad un guadagno di funzione, che scaturisce i diversi fenotipi epilettici (Rastin C. et al., 2023).

Un esempio di epilessia genetica complessa, quindi multifattoriale, può essere osservata dalla crescente evidenza che alcune grandi delezioni/duplicazioni cromosomiche ricorrenti possono essere potenziali fattori di suscettibilità all'epilessia.

Sebbene non vi siano sufficienti prove a sostegno di queste come direttamente causali, le varianti del numero di copie (CNV) 15q13.3, 15q11.2 e 16p13.11 sono state rilevate in pazienti con encefalopatia focale o epilettica più frequentemente rispetto alla popolazione generale non malata (Orsini A. et al., 2017).

Un gruppo di ricerca, confrontando i pannelli genici dell'epilessia di quattro importanti studi clinici, ha notato l'eterogeneità del numero di geni presi in esame (da 144 a 511) e di questi solo 111 geni (15,5%) sono stati inclusi in tutti e quattro i pannelli clinici. Quasi il 90% dei geni era associato a encefalopatie epilettiche e dello sviluppo. In confronto, solo il 5% dei geni era associato a cause monogeniche di "epilessie comuni" (vale a dire, sindromi epilettiche generalizzate e focali). I geni autosomici recessivi erano i più frequenti (56% dei geni); tuttavia, ciò variava a seconda del fenotipo (Oliver KL et al., 2023). Quest'esempio apre gli occhi sulla problematica più grande al giorno d'oggi presente nella diagnosi di epilessia: non esiste un percorso standardizzato ma ogni laboratorio, in base alla propria esperienza clinica, costituisce i propri pannelli genici da analizzare. Per una patologia così radicata nella popolazione, la ricerca scientifica deve aumentare le proprie conoscenze anche per standardizzare il percorso diagnostico in ambito genetico.

Nelle variazioni più frequentemente individuate nelle epilessie genetiche rientrano anomalie cromosomiche, variazioni del numero di copie (CNV) e mutazioni in un singolo gene che portano appunto ad epilessie monogeniche (Shimizu H. et al., 2022.). Un'anomalia cromosomica è una condizione presente in una cellula in cui il numero di cromosomi o la struttura di un cromosoma differisce dal cariotipo normale. Molti tipi di epilessie sono associate a queste condizioni, in cui può essere coinvolto un cromosoma sessuale o un autosoma. In molte patologie le variazioni cromosomiche vengono riscontrate nella maggior parte dei casi clinici, per l'epilessia la casistica è diversa: la condizione più frequente da riscontrare è nella Variazione del Numero di Copie (CNV), solitamente si parla di delezioni (M. Elia et al., 2006). Per l'eziologia dell'epilessia queste alterazioni possono essere distinte in comuni o rare, in relazione alla frequenza all'interno della popolazione (<1% sono rare, >1% sono comuni) (Tubi et al., 2019). Con l'avvento di tecniche più accurate e performanti è molto più veloce il processo che porta alla scoperta di nuovi geni che, mutando, possono portare a malattie, e quindi anche ad epilessia. Fino a pochi anni fa si stimava che la metà di tutte le epilessie fosse di origine genetica (Pal et al., 2010). La classificazione che si

utilizza al giorno d'oggi per i seguenti geni, in accordo con numerosi articoli presenti in letteratura, presenta quattro categorie di geni:

- Geni dell'epilessia;
- Geni dell'epilessia associati al neuro accrescimento;
- Geni correlati all'epilessia;
- Geni potenzialmente associati all'epilessia (Jie Wanga et al., 2016).

Nel primo gruppo rientrano 168 geni, di cui 86 scoperti negli ultimi 8 anni. Vi rientrano geni che causano epilessia pura, o comunque malattie in cui il sintomo principale è l'epilessia. Due geni classificati come geni dell'epilessia sono stati declassati nel gruppo sottostante: quest'appunto è importante in quanto ogni anno non solo vengono scoperti vari geni, ma quelli già conosciuti e classificati vengono revisionati e ricollocati per avere un quadro il più accurato possibile.

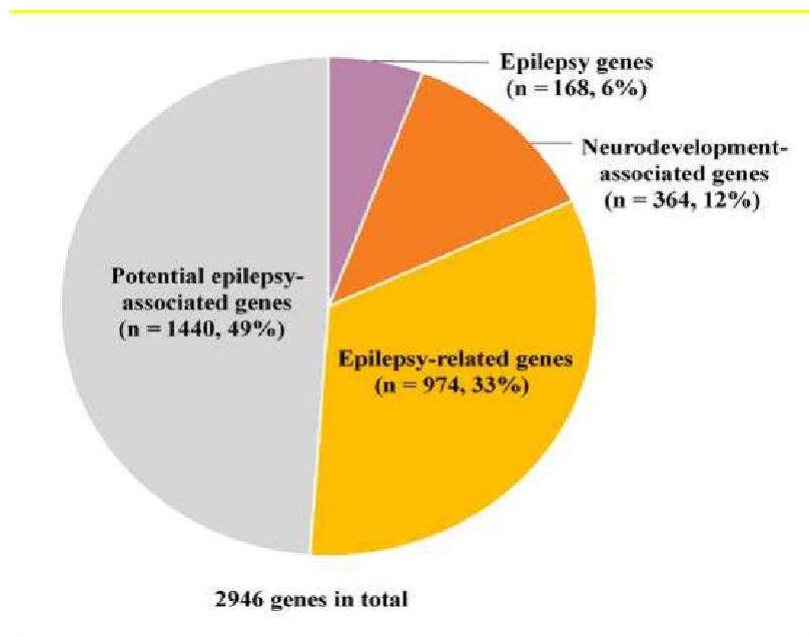


FIGURA 4: Rappresentazione con grafico a torta del numero di geni in ogni gruppo della classificazione (in percentuale).

La percentuale più elevata (49%) riguarda i geni potenzialmente associati all'epilessia. In questo gruppo i geni presenti sono stati individuati alterati più o meno frequentemente in pazienti affetti da crisi epilettiche, ma tutt'ora la ricerca non ne è riuscita ad assegnare una vera e propria causa (Meng-Wen Zhang et al., 2024).

Questo porta a capire l'importanza della ricerca scientifica nei prossimi anni ed il lavoro ancora da svolgere per aggiornare periodicamente la classificazione, oltre che individuare nuovi geni.

I geni associati all'epilessia possono essere classificati tramite la funzionalità della proteina per cui codificano.

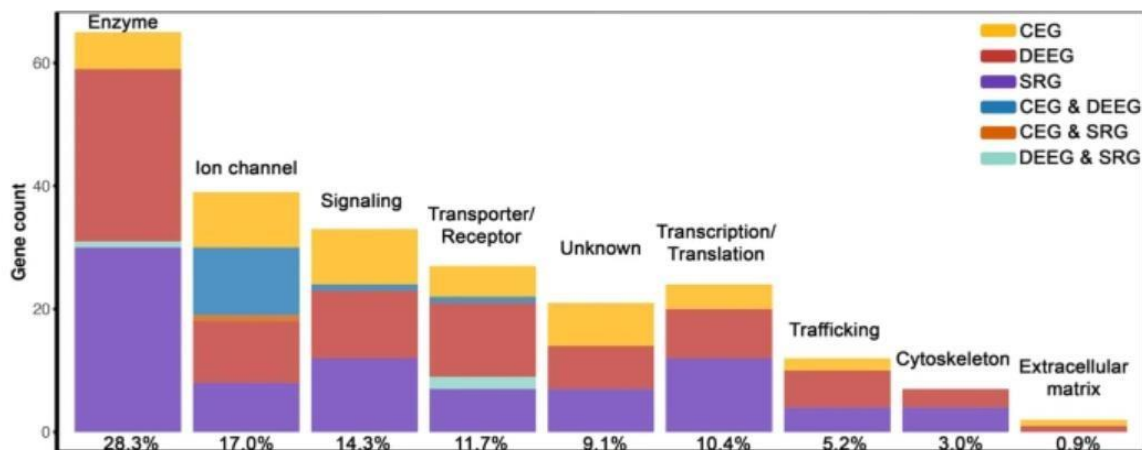


FIGURA 5: L'immagine rappresenta un istogramma in cui sono riportate le funzionalità delle proteine che, se mutate, possono portare manifestazioni epilettiche (Chi et al., 2024)

Da questi dati si enfatizza quanto sia districata la via di comunicazione del sistema nervoso e i suoi meccanismi di controllo, notando le diverse funzioni delle proteine prodotte che possono portare a quadri epilettici diversi tra di loro. Inoltre, per valutare il modello di espressione per i geni associati all'epilessia, sono stati ottenuti dati di espressione tessuto-specifici (tramite GTEx) che hanno dimostrato la maggiore espressione nel sistema nervoso centrale rispetto ad altri organi, a dimostrazione del fatto che, se alterati, questi geni non portano a gravi conseguenze in altri distretti (Chi et al., 2024).

I fenotipi associati ad una mutazione dello stesso gene in due individui possono essere diversi. Ad esempio, le mutazioni in *SCN1A* sono responsabili del 70-80% dei casi di encefalopatia epilettica evolutiva, o sindrome di Dravet, una delle epilessie con prognosi peggiore. Al contrario, le varianti di *SCN1A* sono anche associate al fenotipo più lieve dell'epilessia genetica con convulsioni febbrili. Sebbene si conosca l'associazione tra alterazione genica ed epilessia, il meccanismo patogenico ed il fenotipo associato possono differire in base a molteplici fattori, tra cui fattori di

trascrizione ed il fenotipo prodotto dalla mutazione genetica nell'individuo. Inoltre, geni diversi da percorsi non sovrapposti possono dare origine a fenotipi comuni. Ad esempio, si segnala che *SCN1B*, *GABRG2*, *HCN1* e *SCN8A* sono associati alla sindrome di Dravet. Una specifica sindrome epilettica può avere quindi diverse cause genetiche (Hunter SE et al., 2022).

Un esempio lampante dell'importanza del tipo e della posizione della mutazione nel gene è stato studiato con la subunità 1 del canale del sodio voltaggio-dipendente (*SCN1A*) associata a diverse sindromi epilettiche, che vanno dai fenotipi relativamente lievi riscontrati nelle famiglie con epilessia genetica con convulsioni febbrili, all'epilessia mioclonica grave dell'infanzia (Harkin LA et al., 2007). È stato scoperto che cambiamenti significativi di polarità sono più frequenti nel sensore di tensione e nella regione dei pori della proteina *SCN1A*. Si tratta di aree di importanza cruciale per la funzione del canale e contengono numerosi amminoacidi carichi. Qualsiasi cambiamento significativo nella polarità in queste aree può alterare il rilevamento della tensione o portare a un'alterazione della carica nella regione dei pori. I fenotipi gravi di Dravet non sono stati associati ad un cambiamento di polarità, ma ad un aumento significativo del volume molecolare (SM Zuberi et al., 2011). Queste scoperte risaltano l'importanza del nucleotide o nucleotidi mutati, quali sono ed in quale area della proteina sarà presente l'amminoacido errato che rispecchia i diversi fenotipi dell'epilessia.

Nella maggior parte delle malattie genetiche rare, soprattutto quelle caratterizzate da un fenotipo infausto, non viene ereditata l'alterazione genetica causale dal patrimonio parentale, ma sono per lo più alterazioni de novo. Per definizione, può essere ereditabile dalla prole solamente ciò che è presente nel patrimonio genetico dei gameti parentali; solo una parte delle epilessie (o della suscettibilità dell'individui a scatenarle) può essere ereditato in quanto non tutte hanno una base genetica responsabile.

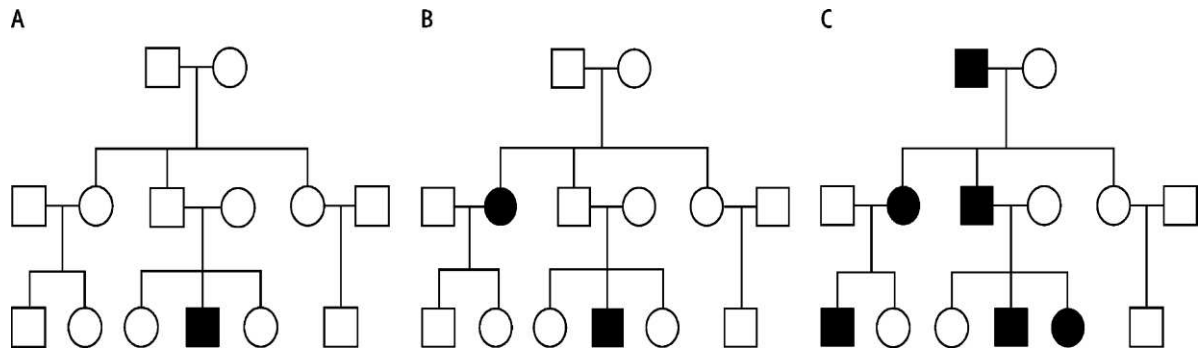


FIGURA 6: sono riportati i casi in cui non avviene la trasmissione del gene mutato verticalmente ma la mutazione è de novo (fig. A), trasmissione sporadica (fig. B) e trasmissione comune verticale (fig. C) (Colin A. Ellis et al., 2019).

Tra le epilessie di origine genetica, comunemente un individuo non ha una storia familiare di epilessia (fig. 6A). Tali casi erano tradizionalmente considerati non genetici, sebbene fosse possibile un'eredità recessiva, specialmente nelle comunità consanguinee. Ora sappiamo che le mutazioni de novo (assenti nel DNA germinale parentale) sono responsabili di molti casi di encefalopatie epilettiche e di una quota ancora sconosciuta di epilessie sporadiche comuni. Meno comunemente (fig. 6B) uno o due parenti affetti nella famiglia allargata suggeriscono un'eredità complessa con una combinazione di varianti di rischio su più geni. Raramente (fig. 6C) il fatto che molti parenti siano affetti suggerisce un'eredità autosomica dominante; tali famiglie hanno portato alle prime scoperte dei geni dell'epilessia, in quanto sono molto più facili da studiare (Colin A. Ellis et al., 2019).

2.5 Consulenza genetica

La consulenza genetica è una tappa fondamentale per la maggior parte dei pazienti che devono intraprendere un percorso diagnostico in ambito genetico, in quanto il sospetto diagnostico inizia dal momento in cui il clinico conosce la storia del paziente ed il suo rapporto con la patologia che verrà indagata successivamente. Come detto, tra i tanti tipi di epilessie presenti, una buona parte presenta una causa genetica che può essere monogenica o multigenica, semplice o complessa, ereditata o de novo. Solo una parte

delle epilessie di origine genetica segue un'ereditarietà di tipo mendeliano, mentre per la maggior parte di esse è possibile ipotizzare una ereditarietà di tipo complesso (Nicita et al., 2012). Al giorno d'oggi esistono molteplici metodiche per analizzare il DNA di un paziente con sospetto, quindi bisogna ipotizzare accuratamente, in base ai sintomi e comorbidità, se sia più efficace utilizzare una tecnica mirata su un gene (o pochi geni), oppure effettuare un'indagine <a tappeto= quando non si hanno dei precisi indizi (ovviamente i costi lievitano all'aumentare dei geni da analizzare). Il primo passo della consulenza è l'anamnesi familiare, la storia familiare deve essere raccolta costruendo un pedigree di almeno tre generazioni (probando, genitori e nonni). La costruzione inizia dal probando, per poi passare ai genitori, ai nonni, agli zii e, se possibile, ai cugini primi. È in egual modo importante ascoltare il paziente nella descrizione dei sintomi, in quanto l'epilessia deve essere inquadrata precisamente per poter ricercare nella classificazione quale sia quella più vicina alle manifestazioni del paziente. Ovviamente, bisogna ricordare che individui della stessa famiglia possono essere affetti da epilessie diverse, anche se il gene o i geni implicati sono gli stessi (variabilità fenotipica). L'anamnesi personale inizia dalle informazioni sulla gravidanza (tempistiche, potenziali infezioni, movimenti fetali, gestosi, etc), e alla nascita (parto eutocico, distocico, asfissia etc). Bisogna sempre cercare di raccogliere informazioni riguardanti tutte le comorbidità sia di tipo non neurologico (ad esempio anomalie strutturali e malattie metaboliche) sia di tipo neurologico. Relativamente a queste ultime è necessario indagare soprattutto sull'eventuale presenza di disturbo dello sviluppo, disturbo da deficit di attenzione e iperattività (ADHD), autismo, disturbi del movimento etc. La descrizione della sintomatologia epilettica è per certo la parte più importante della fenotipizzazione di un paziente. Le linee guida presenti aiutano a classificare il tipo di epilessia, non sempre però si riesce ad avere un quadro chiaro e qui spesso si utilizzano tecniche che indagano mutazioni a tappeto. (Berg et al., 2010) L'aiuto di un testimone in alcune situazioni è fondamentale in quanto il paziente stesso non è in grado di descrivere i sintomi, in alcuni casi può perdere memoria o coscienza, per questo si richiede una testimonianza o una registrazione tramite telecamere in casa delle manifestazioni. È importante chiedere le circostanze in cui le crisi sono avvenute: spesso le tipologie di epilessie sono caratterizzate dalla situazione ambientale che può scatenare la crisi come sorgenti luminose intermittenti e suoni. Epilessie idiopatiche, epilessie generalizzate idiopatiche (non presentano sintomi nell'infanzia) ed epilessie

focali del primo anno di vita sono i tre tipi di epilessia che più frequentemente presentano una causa genetica, solitamente si parla di individui nello stadio infantile, quindi effettuare la più accurata consulenza è il primo passo per una corretta diagnosi (Amedeo Bianchi et al., 2016).

2.6 Diagnosi ed analisi CMA (Chromosomal Microarray Analysis)

Molte malattie sintomatiche e soprattutto asintomatiche in età giovanile al giorno d'oggi vengono diagnosticate in ritardo e per alcune di esse la tempistica è fondamentale per poter attuare il corretto protocollo di terapia. Trovare una diagnosi può essere un viaggio lungo e le opportunità di agire precocemente vengono spesso perse durante la cosiddetta "odissea diagnostica". Per formulare una diagnosi di epilessia il primo passo è valutare i sintomi e la storia clinica del paziente. In quanto tale, l'epilessia può compromettere la memoria a causa della perdita di coscienza, andando a compromettere la descrizione dei sintomi da parte del paziente, ed essendo un passaggio chiave nella comprensione dell'anamnesi bisogna richiedere osservazioni dettagliate da parte di terzi, se presenti. Il medico deve considerare l'eziologia dell'epilessia del paziente e cercare comorbidità, come difficoltà di apprendimento, disturbi dello spettro autistico e disturbi psichiatrici, tra cui depressione (O. Devinsky, 2018). Il test CMA è raccomandato come test di prima linea nella valutazione postnatale iniziale di individui con quanto segue:

- Anomalie multiple non specifiche di una sindrome genetica ben delineata;
- DD/ID (Developmental Disabilities/Intellectual Disabilities);
- Disturbi dello spettro autistico.

Viene raccomandata un'ulteriore determinazione dell'uso del test CMA per la valutazione del bambino con ritardo della crescita, ritardo del linguaggio e altre indicazioni meno studiate, in particolare mediante studi prospettici.

Nei casi di squilibrio cromosomico identificati tramite CMA, si raccomanda un follow-up appropriato, che includa studi citogenetici/FISH del paziente, valutazione dei genitori, valutazione genetica clinica e consulenza (Manning M. et al.; 2020).

L'epilessia è una patologia in cui per la diagnosi non esiste un vero e proprio gold standard: una storia dettagliata insieme a un resoconto affidabile di un testimone oculare ne sono la chiave. Conoscere se si è verificata una vera crisi epilettica, in base allo studio di sintomi e segni, è indispensabile in quanto nessun elemento da solo può essere segnalato come sintomo dell'epilessia (Roland D. Thijs et al., 2019).

L'attività elettrica del cervello può essere studiata tramite elettroencefalogramma (EEG), tecnica fondamentale nella diagnosi dell'epilessia, perché le alterazioni elettriche, spesso molto indicative, possono essere presenti anche in assenza dei sintomi. Le alterazioni elettriche possono venir meno nel momento in cui non è avvenuta una crisi epilettica recentemente, pertanto un EEG negativo, svolto in questo momento, non esclude la diagnosi di epilessia. Anche la risonanza magnetica e la TAC cerebrale sono esami diagnostici validi (Fisher RS et al. 2005).

Al giorno d'oggi è largamente documentata l'importanza della neuroimmagine, che consente lo studio della neuroanatomia del paziente a cui è stata diagnosticata preventivamente l'epilessia. Tecniche di imaging avanzate, tra cui la risonanza magnetica per immagini (MRI), la tomografia a emissione di positroni (PET) e la risonanza magnetica funzionale (fMRI), hanno notevolmente aiutato i ricercatori in questo ambito a conoscere le basi dell'insorgenza di questa patologia (Montalvo M. et al., 2022). Storicamente l'EEG è stata la principale tecnica utilizzata per aggiornare la classificazione, in quanto si è studiato dai primi anni la componente anatomica su tutte. Negli ultimi anni la situazione è cambiata, in quanto le nuove tecniche di sequenziamento (NGS) hanno permesso la ricerca di mutazioni genetiche che possono essere alla base delle varie sindromi epilettiche (Abdelsamad A. et al., 2023).

Per l'epilessia genetica, considerando la resa delle varie modalità di test, la riduzione dei costi dei test basati su NGS e l'eterogeneità genetica delle epilessie, Sequenziamento dell'Esoma (ES) o Sequenziamento del Genoma (GS), ove fattibili e disponibili, sono stati raccomandati come test di primo livello in tutte le epilessie con presunta base genetica. Gli ES possono rilevare varianti di singoli nucleotidi all'interno delle regioni codificanti, che sono gli esoni con siti intronici fiancheggiati, così come varianti del numero di copie (CNV) a livello di più esoni e di geni completi del genoma umano; tuttavia, le CNVs monoesoniche solitamente non vengono coperte e le delezioni/duplicazioni più grandi potrebbero non essere rilevate. Il GS, essendo il gold standard, è un singolo test genetico completo che offre vantaggi identificando varianti

nelle regioni non codificanti, espansioni di ripetizioni trinucleotidiche, varianti strutturali e varianti del DNA mitocondriale. Tuttavia, decifrare i risultati di GS è davvero un'impresa ardua a causa della sostanziale generazione di varianti di significato incerto (VUS) e varianti non codificanti. La CMA è ancora importante come test di primo livello nella pratica attuale. Le CNVs patogene sono implicate in circa il 5%-16% di tutte le epilessie, in particolare quelle associate a disturbi dello sviluppo neurologico. CMA per esaminare delezioni/duplicazioni più grandi (>100 a 300 kb) e microdelezioni/duplicazioni può essere offerto nel caso di un ES negativo. La CMA può anche identificare regioni con perdita di eterozigosi in più tratti del genoma. Questa scoperta può suggerire la consanguineità e sollevare la possibilità di un disturbo ereditario autosomico recessivo (Sayoni Roy Chowdhury MD. Et al., 2024).

Un'analisi di microarray cromosomico (CMA) è stato considerato per diversi anni il test genetico di prima linea per aiutare nella valutazione diagnostica dell'ID (Intellectual Disability) quando l'anamnesi del paziente e l'esame obiettivo non forniscono una diagnosi evidente. La CMA può essere eseguita tramite aCGH (Microarray-based Comparative Genomic Hybridization) o utilizzando un array SNP. La CMA è uno dei migliori strumenti disponibili per rilevare le variazioni del numero di copie nella composizione cromosomica (Haeri M. et al., 2015). In ambito prenatale, è alla pari con il cariotipo tradizionale per il rilevamento di squilibri cromosomici importanti come aneuploidia e riarrangiamenti sbilanciati, ma riesce a rilevare anche microdelezioni e microduplicazioni (Levy B et al., 2018). La CMA è una tecnica comparativa che confrontano il DNA di un paziente con un campione di DNA di controllo normale per identificare zone dei cromosomi maggiormente presenti o meno nel campione del paziente rispetto al controllo (Snijders et al., 2001).

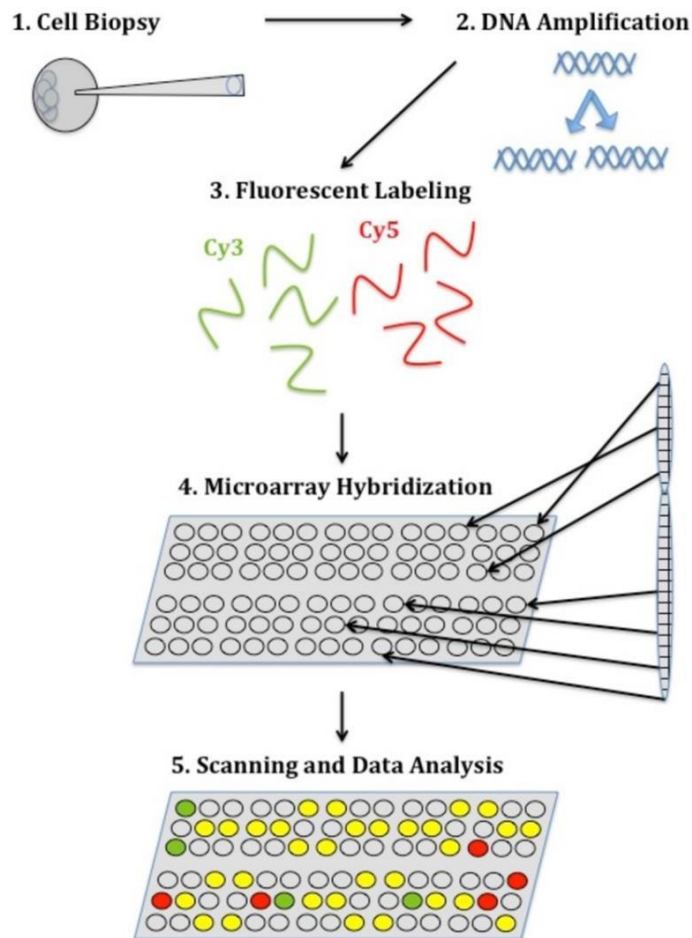


FIGURA 7: *Rappresentazione dei passaggi principali della tecnica microarray. Il DNA dello standard e del paziente vengono marcati con sonde differenti, l'emissione di luce sulle molecole fluorescenti in ogni spot rileverà quale dei due campioni presenti più copie di quel tratto di DNA (Aaron Theisen, 2008).*

Nell'approccio CMA, i campioni di DNA del paziente e di controllo vengono frammentati, etichettati con diversi colori fluorescenti (quindi marcati in modo differenziale) e ibridati in modo competitivo con cromosomi in metafase. L'intensità del segnale fluorescente del DNA marcato rispetto a quella del DNA di riferimento può essere in questo modo tracciato su ciascun cromosoma, consentendo l'identificazione delle variazioni del numero di copie (Kallioniemi, A., et al., 1992). Vengono mescolati insieme in proporzioni uguali e posizionati su un array contenente più sonde da sequenze rappresentative di tutto il genoma umano. La miscela di DNA si lega (si ibrida) in modo competitivo alle sequenze complementari situate all'interno del DNA della sonda sull'array. L'intensità di fluorescenza di ogni sonda viene misurata utilizzando un software di imaging digitale. Dopo un processo di normalizzazione,

viene calcolato un rapporto delle intensità di fluorescenza tra il paziente e il campione di controllo. Un rapporto di 1 indica contributi uguali dal paziente e dal campione di controllo che a sua volta rappresenta un numero di copie normale in quel locus. Un rapporto significativamente maggiore di 1 indica che una quantità maggiore di DNA del paziente si è ibridata in una posizione particolare rispetto al DNA di controllo. Ciò rappresenta un guadagno di materiale cromosomico del paziente (una duplicazione o trisomia). Al contrario, una perdita di materiale genetico (una delezione o monosomia) nel paziente produrrebbe un rapporto significativamente inferiore a 1 a causa di una maggiore ibridazione delle sequenze di DNA di controllo rispetto al DNA del paziente. La posizione e la dimensione del guadagno/perdita possono essere determinate dal numero di sonde consecutive che mostrano un rapporto superiore o inferiore a 1. La risoluzione e la capacità diagnostica di aCGH dipendono dal numero e dai tipi di sonde utilizzate e dalla loro distribuzione nell'intero genoma (Shearer et al., 2007).) La CMA al giorno d'oggi è uno strumento fondamentale per formulare la diagnosi di numerose patologie che possono presentare una base genetico-molecolare, come autismo, epilessia, disabilità intellettive e disturbi cognitivi. L'analisi citogenetica comune è tutt'ora un ottimo strumento per rilevare variazioni nella struttura cromosomica tramite bandeggio, ma può rilevare riarrangiamenti fino a 5 Mb. La detection rate è stata aumentata dalla CMA che rileva variazioni strutturali fino a 1Kb di grandezza, utile nello studio delle CNVs ed LOH (Loss Of Heterozygosity). Le prime non sempre sono indicative in quanto sono presenti anche in individui sani, quindi il clinico si dirige tramite vari database genetici che classificano queste variazioni in base al potenziale patogenico.

Questa tecnica nella diagnosi prenatale presenta il 99% di successo (ovvero i pazienti hanno ricevuto una diagnosi corretta), mentre nei pochi casi in cui si sono riscontrati problemi è per la minore efficacia nell'identificare traslocazioni bilanciate e triploidia fetale (Wapner RJ et al., 2012).

Le anomalie citogenetiche includono anomalie numeriche (aneuploidia, ipodiploidia, iperdiploidia e poliploidia) e anomalie strutturali (delezione, duplicazione, triplicazione, amplificazione, traslocazione, inversione, inserzione, cromosoma marcatore, ecc.) (Shao et al., 2021). Le varianti del numero di copie (CNV) e le mutazioni puntiformi sono le principali cause genetiche di centinaia di malattie. Uno

studio di coorte ha indagato l'utilità della CMA in 51 neonati in cui è stata diagnosticata precedentemente epilessia grave. Sono state trovate CNV nel 17,6% dei bambini; CNV clinicamente significative o patogene probabili nel 5,9%, CNV incerte nel 3,9% e CNV significative improbabili nel resto. È noto che mutazioni *de novo* in diversi geni sono responsabili di alcune encefalopatie epilettiche. Inoltre, è noto che rare varianti del numero di copie *de novo* (CNV) rappresentano fino a circa l'8% dei casi (Kamien BA et al., 2012). Un esempio è la delezione 16p13.11, che colpisce circa lo 0,6% dei pazienti epilettici ed è il fattore di rischio genetico singolo più diffuso per la suscettibilità complessiva alle crisi epilettiche identificato fino ad oggi. Sono state anche identificate una serie di regioni geniche che sembrano portare delezioni associate all'epilessia e giustificano una valutazione dettagliata come per le delezioni 16p13.11. In una ricerca scientifica, nel locus 16p13.11 associato all'epilessia, sono state trovate delezioni maggiori di 100 kb in 23 pazienti (Heinzen E.L. et al., 2010). L'individuazione di CNV, sia *de novo* che ereditate, è fondamentale per la prognosi e per l'attuazione corretta della terapia. In un neonato è stata ritrovata la delezione 16p13.11, classificata al giorno d'oggi come VUS, ma presente anche in un paziente di questa ricerca, a dimostrazione del fatto che l'aggiornamento continuo tramite nuove scoperte è di fondamentale importanza nella diagnosi ed in una potenziale terapia mirata (Allen et al., 2015).

Mentre alcune varianti possono essere previste con sicurezza come patogene o meno, in molti casi elementi di evidenza mancano o sono in conflitto tra loro. In queste situazioni, la variante è spesso classificata e segnalata come VUS. I recenti progressi nella tecnologia di sequenziamento di nuova generazione che hanno consentito il sequenziamento rapido ed economico di numerosi geni in una volta sola (test del pannello), delle regioni del genoma che codificano per le proteine (l'esoma) o dell'intero genoma, hanno aumentato la resa dei test genetici e li hanno resi più accessibili, ma hanno anche aumentato notevolmente il numero di VUS riscontrati nella pratica clinica. In altre parole, più sequenze si studiano, più è probabile trovare una VUS. Il microarray cromosomico è la maggior causa dell'aumento del numero di VUS.

La CMA è entrata a far parte della routine clinica per formulare una possibile diagnosi anche nei neonati e infanti con stati patologici congeniti come malformazioni e varie disabilità. La mancanza di linee guida uniformi per la resa clinica prevista di CMA, in

termini di risoluzione e copertura (ad esempio, intero genoma o specifico del locus), impedisce la standardizzazione della pratica clinica per i test CMA in quanto, la maggior parte dei laboratori clinici mantiene database interni di CNV patogeni e benigni, ma potrebbero non concordare sulle interpretazioni (Miller DT et al., 2010). Questa tecnologia è stata un importante progresso nella genetica clinica, aumentando la percentuale di bambini con grave disabilità intellettiva e ritardo dello sviluppo per i quali è stata identificata un'anomalia citogenetica causativa, da circa il 5% utilizzando il cariotipo a bande di Giemsa, al 20-25% utilizzando microarray cromosomici (Beaudet et al., 2014). Questa tecnologia è accettata come test di primo livello per la valutazione degli squilibri cromosomici associati a disabilità intellettiva, autismo e/o anomalie congenite multiple. I limiti dell'uso della CMA includono l'impossibilità di rilevare:

eventi genetici che non influenzano il numero di copie relativo delle sequenze di DNA (ad esempio, riarrangiamenti cromosomici bilanciati); tuttavia, la CMA può rivelare cambiamenti nel numero di copie in riarrangiamenti cromosomici apparentemente "bilanciati" (ad esempio, guadagni o perdite nei siti di rottura cromosomica o in prossimità di essi) (Shao et al., 2021).

Sorprendentemente, l'entità della variazione nel numero di copie nel genoma umano supera l'eterogeneità nella variazione della sequenza. Esistono diversi database che forniscono dati per le CNV nei controlli sani e negli individui sintomatici, come Database of Genomic Variants (DGV) (Haeri M. et al., 2015).

L'analisi del cariotipo cromosomico G-band è ampiamente utilizzata come metodo per rilevare anomalie genetiche nella diagnosi prenatale clinica. Tuttavia, questo approccio presenta diverse limitazioni, tra cui la necessità di eseguire colture cellulari, un lungo periodo di attesa per la rilevazione (da 2 a 3 settimane) e una bassa risoluzione (solo anomalie cromosomiche > 5–10 Mb possono essere rilevate utilizzando questo approccio) (Xia M. et al., 2020). I pazienti con sospette anomalie cromosomiche sono inizialmente indicati per il test del cariotipo convenzionale. I cromosomi vengono analizzati microscopicamente in metafase con una risoluzione di 400-550 bande. Tuttavia, questo livello di risoluzione non rileva alterazioni cromosomiche che interessano segmenti inferiori a 5 Mb. In media, dal 15 al 20% degli individui con Disabilità Intellettiva (ID), disturbi dello spettro autistico e anomalie congenite multiple vengono diagnosticati con la metodologia dell'aCGH (Pratte-Santos R. et al.,

2016). Dal primo utilizzo del CMA nei primi anni 2000, si è pensato di poter sostituire il cariotipo, che richiede una grande esperienza visiva e manuale, l'utilizzo di cellule vive e i tempi di attesa nell'ordine di settimane. Nonostante questo, il cariotipo ha ancora un posto nel kit di strumenti diagnostici insieme ai microarray cromosomici e ad altre tecniche, ed ogni strumento può fornire le informazioni necessarie per aiutare i neogenitori a prendere decisioni informate. Quando i microarray non forniscono informazioni utilizzabili, altri metodi come il cariotipo rappresentano i passaggi successivi ideali, colmando quelle lacune con i loro punti di forza unici (ThermoFisher Scientific, Behind the Bench, 2020).

Come detto, esistono molte alterazioni genetiche che non possono essere rilevate dal cariotipo tradizionale, come le CNVs. Queste ultime sono delezioni o duplicazioni di tratti di DNA che vanno da 1 kb a un intero cromosoma. Sono causate per lo più da ricombinazione non omologa, associata a meccanismi di riparo del DNA. La ricombinazione non omologa è alla base della formazione delle cosiddette CNVs non ricorrenti. La maggior parte delle microduplicazioni e delle microdelezioni patogene non sono altro che CNVs non ricorrenti (BREDA GENETICS, 2016). Le CNV sono un'importante fonte di normale variazione genomica, ma alcune agiscono come fattori di rischio o cause di malattia. Possono essere suddivise in ricorrenti e non ricorrenti. Esempi di CNV ricorrenti associati a disturbi neurologici o neuroevolutivi includono duplicazioni di 17p12 che causano la sindrome di Charcot-Marie-Tooth e delezioni di 15q11-q13 nelle sindromi di Prader-Willi e Angelman (Mefford HC et al., 2014). Lo sviluppo di microarray cromosomici ha consentito lo studio dell'intero genoma per le CNVs in grandi coorti. Sono stati condotti studi sulle CNVs per l'epilessia generalizzata, l'epilessia focale ed encefalopatia epilettica, rivelando un chiaro ruolo delle CNVs in ciascuna classe principale. Nel complesso, le CNVs rare, alcune delle quali coinvolgono geni malattia noti, contribuiscono al 5-10% dei casi di epilessie infantili (Olson et al., 2014). Da uno studio di 222 pazienti, il rischio di una CNV patogena è segnalato come aumentato con disabilità intellettiva (ID) concomitante, caratteristiche dismorfiche, disturbo dello spettro autistico (ASD), resistenza ai farmaci o altre comorbilità (Helbig I et al., 2014).

Per i neonati e gli infanti esiste la possibilità di prescrivere molti test genetici, in base all'esperienza che possiede il pediatra nella sua gestione delle analisi genetiche: i test maggiormente utilizzati sono il microarray-CGH (per lo studio dei cromosomi) e lo

studio di pannelli genici con varie metodiche. Il risultato dell'aCGH può essere di tre tipi:

-Positivo: risultato che porta alla diagnosi ed a volte è utile alla prognosi;

-Negativo: non porta solitamente alla diagnosi, ma indirizza il clinico nella prescrizione di altri test;

-VUS (Varianti di Significato Incerto): è un risultato intermedio, frequente nel microarray cromosomico che può etichettare una CNV come VUS nel caso in cui in letteratura non è presente una sua certa correlazione con una determinata patologia. Se è documentata la presenza di una VUS nella stessa malattia in molti pazienti diversi verrà diagnosticata comunque come tale, non rientra tra i positivi (Hoffman-Andrews L et al., 2018). Le VUS sono spesso soggette ad una errata valutazione del personale medico e della famiglia del paziente, in quanto è un risultato incerto, non dà spiegazioni e non indirizza verso una diagnosi, in quanto quella CNV non è stata ancora studiata nel dettaglio. La classificazione odierna prevede cinque classi: le CNV con prove insufficienti o contrastanti a supporto dell'associazione con la malattia, tali da non poter essere classificate come "probabilmente patogene", né come "probabilmente benigne", sono VUS. Se classificata come VUS, non porta mai ad una conferma di diagnosi genetica, ma alcune caratteristiche possono indirizzare il clinico. Un esempio è la <VUS de novo= (non ereditata), questa denominazione porta a classificarla come "probabilmente patogena". Una VUS presente anche in un genitore non affetto dalla malattia, è meno probabile sia patogena (Joynt ACM et al., 2021). Una caratteristica relativamente unica delle VUS, rispetto ad altri tipi di risultati ambigui di test medici, sta nel fatto che mentre i secondi rimangono statici nel tempo, il significato delle VUS può essere chiarito, man mano che vengono raccolti più dati grazie alla ricerca scientifica parallela alle diagnosi cliniche. I laboratori riclassificano regolarmente le VUS: possono essere "promossi" a patogeni o "declassati" a benigni (quest'ultimo caso è il più comune) (Hoffman-Andrews L. et al., 2018). Nonostante questi recenti progressi, le diagnosi basate sulla genetica dei pazienti possono essere difficili, poiché esiste sia eterogeneità genetica all'interno di una data sindrome epilettica sia eterogeneità fenotipica associata a mutazioni in un gene specifico.

3. Materiali e metodi

3.1 Reclutamento dei pazienti

I pazienti che sono stati reclutati per questa ricerca scientifica sono stati selezionati a partire da un iter diagnostico nel laboratorio di Genetica Medica presso il Cast dell'Università <G. D'Annunzio= di Chieti, che, in questo caso, prevede l'utilizzo di tecniche molecolari con lo scopo di diagnosticare o aiutare alla diagnosi per pazienti con sospetto di disabilità intellettiva, autismo, disturbi epilettici o caratteristiche dismorfiche. Nella prima fase è prevista una consulenza medica con il paziente (in presenza dei genitori per pazienti minorenni) in cui si attesta che l'individuo presenta dei segni clinici che possono essere utili ad indirizzare la diagnosi di un certo tipo. I campioni dei pazienti, in base alla sintomatologia, vengono sottoposti a determinati esami clinici che saranno i più indicati per quel determinato sospetto diagnostico. Per questa ricerca scientifica interessano sospetti diagnostici quali epilessia e disturbi dello sviluppo (possono essere presenti entrambi nello stesso paziente) e si va alla ricerca di nuovi markers genetico-molecolari che ne possono essere alla base. I nomi dei pazienti non verranno citati per motivi di privacy, ma verranno citate età, sintomatologia ed altre caratteristiche del paziente che possono influenzare il sospetto diagnostico e soprattutto la diagnosi.

3.2 Casistica

Nella seguente sezione verranno riportati i casi clinici analizzati tramite CMA, accomunati tra di loro da una diagnosi di epilessia. Come spiegato precedentemente, l'epilessia è una patologia caratterizzata dalla grande eterogeneità, per eziologia, prognosi e sintomi. Per tale motivo nello studio sono stati presi in esame pazienti affetti da differenti tipi di epilessia. La diagnosi è stata effettuata presso altri centri specializzati, il ruolo del laboratorio di Genetica Medica è stato quello di accumulare una possibile causa genetica alle manifestazioni sintomatiche del paziente (e quindi

anche alla sua diagnosi). I pazienti sono stati riferiti all'Unità di Genetica Medica (CAST, Università <G. d'Annunzio Chieti-Pescara) tra il 2023 e 2024.

I loro nomi non verranno citati sia perché nella maggior parte dei casi sono minorenni, sia per motivi di privacy.

Sono stati presi in considerazione in totale 10 pazienti con un quadro di epilessia. 8 di loro sono pazienti di età pediatrica mentre 2 di loro adulti. Nella tabella sottostante (Tabella 1) vengono riportati l'età, il sesso e la diagnosi per ogni soggetto considerato.

CASO	ETÀ	SESSO	DIAGNOSI
1	12 anni	MASCHIO	Epilessia generalizzata
2	9 anni	FEMMINA	Anomalie epilettiformi e disturbo misto dello sviluppo
3	13 anni	MASCHIO	Epilessia generalizzata con disturbo cognitivo e cardiopatia congenita
4	3 anni	FEMMINA	Convulsioni febbrili ricorrenti e disturbo del comportamento
5	10 anni	FEMMINA	Epilessia locale e disabilità intellettiva lieve
6	1 anno e 10 mesi	FEMMINA	Epilessia focale secondariamente generalizzata in seguito ad episodio febbrile
7	6 anni	FEMMINA	Convulsioni febbrili all'età di 3 anni
8	2 anni	FEMMINA	Epilessia generalizzata e microcefalia
9	39 anni	FEMMINA	Crisi epilettica in stato di gravidanza
10	36 anni	MASCHIO	Epilessia focale

TABELLA 1: *Anamnesi della casistica riportata.*

3.3 Tecnica di estrazione

L'estrazione è il primo passaggio in cui vengono sottoposti i campioni. Nella totalità dei casi è stato effettuato un prelievo di sangue periferico ai pazienti. L'estrazione del DNA è stata effettuata tramite MagPurix2000.



FIGURA 8: Area interna di lavoro dell'estrattore MagPurix2000, in cui vengono caricati i campioni (di sangue o tampone boccale), le cartucce con biglie e soluzioni tamponate per l'estrazione e le eppendorf per l'eluato (protocollo MagPurix2000).

La strumentazione è completamente automatizzata, in grado di estrarre DNA (ed acidi nucleici in generale) a partire da varie tipologie di campione. Può estrarre fino a 12 campioni contemporaneamente da sangue intero, siero, plasma, tamponi orali e tessuti ed è compatibile sia con analisi di qPCR che NGS, fino ad arrivare alla CMA. 200 μ L di sangue periferico viene dispensato nel collection tube, una seconda provetta viene caricata nello strumento già nominata e numerata in cui andrà l'eluato.

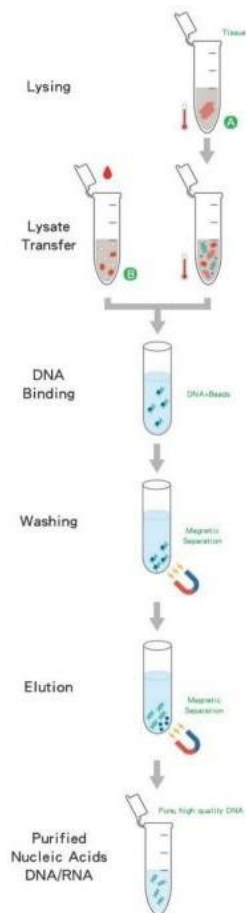


FIGURA 9: *L'immagine rappresenta il workflow della tecnica di estrazione.*

La tecnica utilizza sfere magnetiche che, dopo la fase di lisi cellulare e proteica (con buffer di lisi e proteinasi K), vanno a legare gli acidi nucleici in soluzione e venendo attratte da un magnete esterno separano gli acidi nucleici dal mezzo acquoso. Vengono eluiti in una seconda eppendorf in modo tale da avere DNA purificato pronto da essere analizzato.

3.4 Quantizzazione

Terminata la fase di estrazione, ciò che proseguirà nelle fasi successive sarà l'eluato ovvero il campione di DNA. Prima di proseguire bisogna quantizzare il campione, ovvero analizzare la quantità di DNA all'interno di esso. È stato utilizzato il Qubit 3 Fluorometer dell'Invitrogen, uno strumento capace di quantizzare tutti i tipi di acidi nucleici che vengono richiesti dall'operatore. In questo studio la medesima procedura

serve per avere la concentrazione di DNA nota in quanto per l'array-CGH deve essere standardizzata.

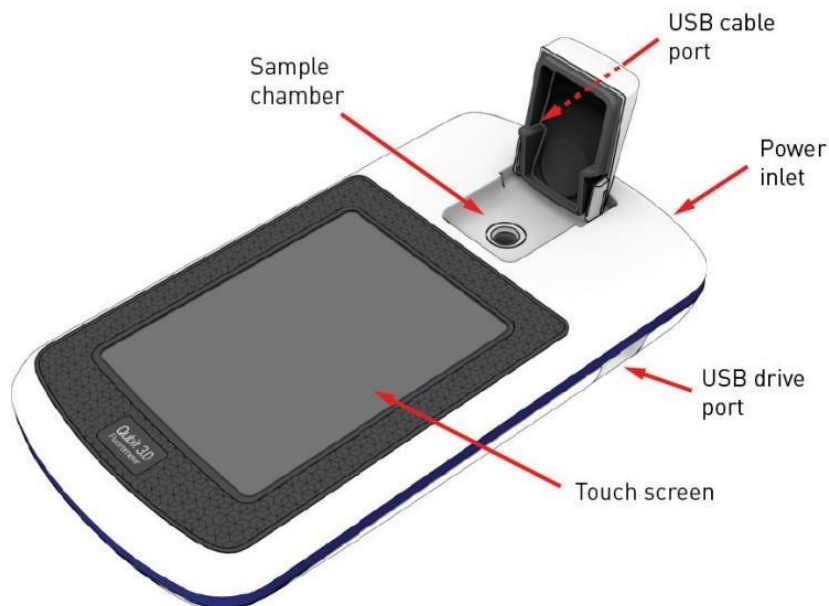


FIGURA 10: *Qubit 3 Fluorometer.*

Il kit prevede l'utilizzo di $1\mu\text{L}$ di fluoroforo e $199\mu\text{L}$ di Buffer: da qui, $198\mu\text{L}$ verranno miscelati con $2\mu\text{L}$ di DNA e verrà quantizzato. Una volta ottenuta la concentrazione, bisogna effettuare la diluizione del campione come da protocollo (sia il campione standard che il campione del paziente devono avere una concentrazione di $50\text{ ng}/\mu\text{L}$, la diluizione va effettuata con TE BUFFER del kit).

3.5 Analisi CMA (Chromosomal Microarray Analysis)

È stato utilizzato il CytoScan Dx Assay e il GeneChipSystem 3000 dell'Applied Biosystems, con un protocollo messo a punto per l'utilizzo in ambito diagnostico, per lo studio di CNV correlate a disabilità intellettiva ed anomalie congenite. Il test CytoScan Dx, con la sua copertura dell'intero genoma, offre una risoluzione più elevata rispetto al cariotipo e una copertura più completa rispetto alla FISH. Questa tecnica richiede diversi passaggi e giorni di lavoro che possono essere la causa principale di

eventuali errori durante l'esecuzione. Viene utilizzata per rilevare le CNVs nel DNA genomica di neonati e bambini a partire da sangue periferico e tamponi, il risultato non è però sempre indicativo in quanto possono non essere presenti CNVs, oppure queste ultime se presenti non hanno significato diagnostico. Oltre le CNVs vengono studiate anche possibili perdite di eterozigotità (LOH) o mancanze di eterozigotità (AOH). Ovviamente il test deve essere affiancato da altre metodiche per una riconferma, ed il risultato deve essere valutato insieme alla consulenza per avere un quadro completo. Vengono utilizzati un controllo positivo, che presenta alterazioni cromosomiche che devono essere registrate, ed un controllo negativo in cui è presente solo il buffer, per valutare possibili contaminazioni.

Una volta estratto il DNA genomico (gDNA) da sangue periferico, viene utilizzata una piastra da 96 pozzetti per analizzare più campioni contemporaneamente. I campioni numerati (figura 11) vengono diluiti utilizzando il buffer per arrivare alla concentrazione di 50 ng/ μ L. Si posiziona una seconda piastra nella zona inferiore del blocco dove inizieranno le prime reazioni: digestione e ligazione. 5 μ L di gDNA diluito vanno aliquotati nella seconda piastra.

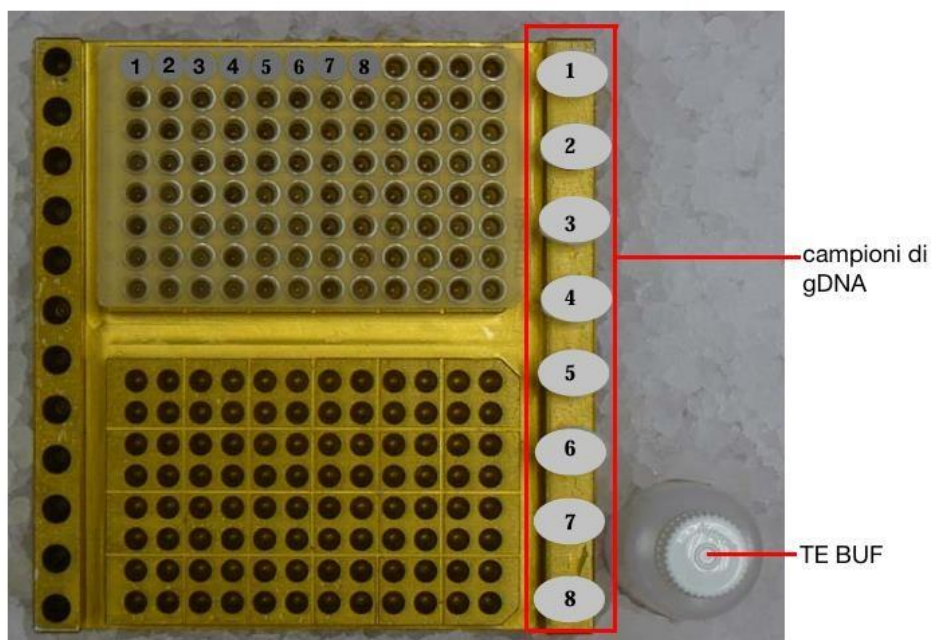


FIGURA 11: *termoblocco di metallo in ghiaccio su cui vengono poste le piastre per mantenere la temperatura dei campioni sempre costante.*

3.5.1 Digestione

Il gDNA va digerito con l'enzima di restrizione NSP I che viene aggiunto alla Mix da preparare insieme a NFW, il buffer ed il BSA. Una volta ottenuta la Master Mix, viene dispensata con una multicanale nei pozzetti della piastra in cui sono presenti i campioni.

Temperatura	Durata
37°C	2 ore
65°C	20 minuti
4°C	5 minuti
4°C	∞

FIGURA 12: *profilo termico utilizzato nella reazione di digestione.*

Reagente	1 campione
○ NFW	11,55 µl
● NSP I BUF	2,00 µl
● BSA	0,20 µl
● NSP I	1,00 µl
Totale	14,75 µl

FIGURA 13: *concentrazioni dei reagenti da utilizzare per singolo.*

3.5.2 Ligazione

Terminata la digestione in termociclatore, bisogna preparare la Master Mix di ligazione, in cui ci saranno il buffer di reazione e l'adattatore di NSP I. Questo passaggio serve a unire le estremità protrudenti prodotte dallo step di digestione, in modo tale da avere ogni tot di basi una sequenza conosciuta (adattatore).

Temperatura	Durata
16°C	3 ore
70°C	20 minuti
4°C	5 minuti
4°C	∞

FIGURA 14: *la Master Mix verrà dispensata nei pozzetti contenenti i campioni digeriti e la piastra sarà sottoposta ad un altro passaggio in termociclatore con il profilo termico*

Reagente	1 campione
● DNA LIG BUF	2,50 µl
● NSP I ADAP	0,75 µl
● LIG DEL DNA	2,00 µl
Totale	5,25 µl

FIGURA 15: *concentrazione dei reagenti da utilizzare per la ligazione.*

3.5.3 Reazione a catena della polimerasi (PCR)

Questo passaggio viene svolto in un termociclatore posto in una camera definita <post-PCR= in quanto bisogna evitare contaminazioni tra i due passaggi. Per prima cosa bisogna riempire il reservoir di NFW, una soluzione che viene utilizzata per andare a diluire i campioni ligati. Una volta effettuata la diluizione, ogni campione (vedi figura 14) deve essere aliquotato in quattro pozzetti, in modo tale da avere per ogni campione quattro reazioni in colonna, in una nuova piastra che verrà utilizzata per la PCR in termociclatore. L'ultimo passaggio prevede la preparazione della Master Mix, in cui verranno inseriti i primers, i DNTPs ed il buffer di reazione. Solo per ultimo viene inserita la TAQ, che non può essere mantenuta a lungo al di sopra dei -20°C.

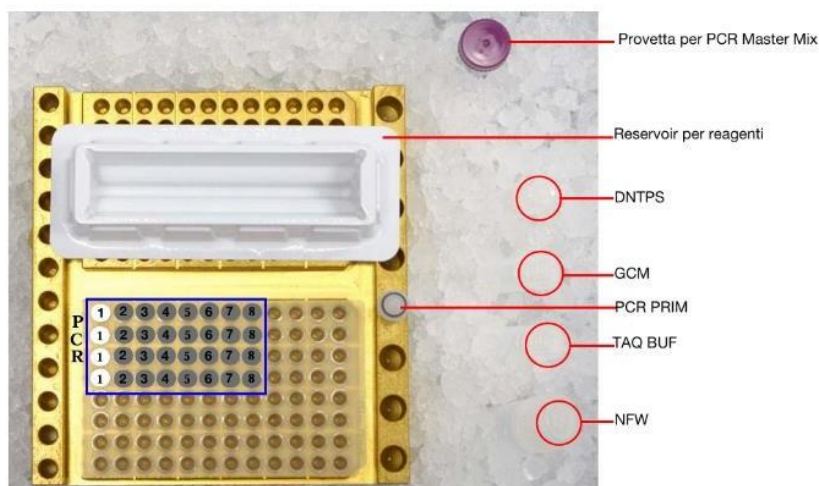


FIGURA 16: preparazione reagenti per la PCR.

La Master Mix viene prima inserita nel reservoir (precedentemente pulito) e poi viene aggiunta con la multicanale nei pozzetti della piastra in cui è presente il DNA ligato diluito. La piastra verrà inserita in termociclatore con il profilo termico sottostante.

Reagente	1 reazione	Temperatura	Durata	Cycles (Cicli)
○ NFW (raffreddato)	39,5 µl	94°C	3 minuti	1X
● TAQ BUF	10,0 µl	94°C	30 secondi	} 30X
● MCG	20,0 µl	60°C	45 secondi	
● DNTPS	14,0 µl	68°C	15 secondi	
● PCR PRIM	4,5 µl	68°C	7 minuti	1X
● TAQ ENZ ¹	2,0 µl	4°C	5 minuti	1X
Totale	90,0 µl	4°C	∞	

FIGURA 17: concentrazioni reagenti per la PCR.

FIGURA 18: profilo termico PCR.

Una volta effettuata la PCR bisogna controllare che il processo di amplificazione sia avvenuto correttamente prima di eseguire i passaggi successivi: si utilizza una strip in cui vengono caricati i campioni della fila A della piastra e con essi viene eseguita una corsa elettroforetica con gel di agarosio al 2%. Il midori viene utilizzato per marcare la doppia elica, alla fine della corsa si verifica la presenza delle bande corrispondenti agli amplificati al GelDoc.

3.5.4 Purificazione degli amplificati

La purificazione prevede inizialmente l'utilizzo di provette eppendorf indipendenti in cui si inseriscono i campioni amplificati: per ogni campione si hanno quattro amplificati sulla stessa colonna, tutti e quattro saranno inseriti nella stessa eppendorf che è stata precedentemente contrassegnata con un numero o il nome del paziente. Viene poi aggiunta una quantità standard di PURIF BDF, una soluzione in cui sono presenti biglie magnetiche a cui viene aggiunto etanolo che precipitando permette la purificazione degli amplificati. Dopo incubazione di 10 minuti, le provette vengono centrifugate. Le provette vengono poi posizionate sul supporto magnetico e deve essere controllato che il pellet dopo poco tempo venga attratto dal magnete, infine viene eliminato il surnatante. Per consentire una purificazione ottimale viene aggiunto il PW BUFFER e viene eseguito il passaggio sul supporto magnetico altre due volte. Il terzo passaggio viene invece svolto utilizzando un tampone di eluizione, in modo tale da rompere il legame presente tra biglie e DNA e, tramite supporto magnetico, vengono separati. Nella soluzione sarà presente il DNA libero.

3.5.5 Quantificazione

Si utilizza uno spettrofotometro UV per quantificazione, in modo da calcolare l'OD e misurare la concentrazione di DNA nel campione. Si utilizza sempre il tampone NFW per diluire il DNA, ovviamente bisogna renderne conto nei calcoli successivi. Se la concentrazione soddisfa i criteri stabiliti dal protocollo, si passa allo step successivo nel minor tempo possibile.

3.5.6 Frammentazione

Avviene, così come per gli step precedenti, grazie all'utilizzo di un enzima che viene utilizzato per ultimo rispetto agli altri reagenti per preservarne l'attività. La preparazione della Master Mix richiede il buffer di frammentazione, l'NFW ed infine

l'enzima. Viene utilizzata una strip in cui in ogni pozzetto verranno aliquotati la Master Mix ed i campioni.

Reagente	1-24 campioni	Temperatura	Durata
○ NFW	271,2 µl	37°C	35 minuti
● FRAG BUF	343,8 µl	95°C	15 minuti
● FRAG RGT	10,0 µl	4°C	5 minuti
Totale	625,0 µl	4°C	∞

FIGURA 19: concentrazioni dei reagenti per la frammentazione.

FIGURA 20: profilo termico per la reazione di frammentazione.

La fase di controllo della frammentazione è, così come la quantificazione, un <controllo qualità> e non rientra propriamente nella preparazione del chip del microarray. Per questo si utilizza una piccola aliquota di campione che verrà diluita con un volume maggiore di NFW e verrà fatto correre in un gel di agarosio al 4% (la percentuale di agarosio è elevata perché i frammenti prodotti sono di piccole dimensioni, tra le 25 e le 125 pb).

3.5.7 Marcatura

Per la marcatura si prepara la Master Mix con i seguenti reagenti: TDT buffer, ETICHETTA DNA RGT ed enzima TDT.

Reagente	1 Campione	Temperatura	Durata
● TDT BUF	14,0 µl	37°C	4 ore
● ETICHETTA DNA RGT	2,0 µl	95°C	15 minuti
● TDT ENZ	3,5 µl	4°C	5 minuti
Totale	19,5 µl	4°C	∞

FIGURA 21: concentrazioni dei reagenti per la marcatura.

FIGURA 22: il profilo termico per la marcatura.

3.5.8 Ibridazione

In questo step sono fondamentali sia il termociclatore che il fornello, quest'ultimo presente degli alloggi per chip che ruotano ad una certa velocità e temperatura che possono essere impostate dall'operatore. In questo caso la temperatura è di 50°C, la velocità di 60 giri al minuto. All'inizio bisogna creare una richiesta di test e registrare l'array sul software, in modo tale che quest'ultimo riconosca il codice a barre dei chip e riconosca a quale paziente è stato assegnato (ad ogni paziente è correlato un chip in cui all'interno si dispensa il campione).

Bisogna innanzitutto preparare la Master Mix di ibridazione, in questo caso si hanno quattro buffer di ibridazione e l'OCR (Oligo Control Reagent). Una volta aggiunta la Master Mix nei pozzetti della piastra contenenti i campioni, si deve svolgere la denaturazione del DNA, in termociclatore:

Temperatura	Durata
95°C	10 minuti
49°C	3 minuti
49°C	∞

FIGURA 18: *profilo termico dell'ibridazione.*

In questo modo nel pozzetto, al termine dei 3 minuti a 49°C, si avranno molecole di DNA a singolo filamento, che saranno pronte per legarsi alle molecole complementari presenti nel chip. L'ibridazione avviene nel fornello ed inizia nel momento in cui sono stati riempiti tutti i chip.



FIGURA 19: si deve inserire la punta di un puntale da 200 μ l nel setto in alto a destra di ciascun array, in modo tale da creare aria all'interno. Nel foro in basso a sinistra si inserirà il campione fino a riempimento.

Entrambi i fori devono essere coperti con gli adesivi rotondi che fornisce il kit. I chip andranno nel fornello ad una temperatura di 50°C e con rotazione di 60 giri al minuto per 16/18 ore.

3.5.9 Lavaggio, rivelazione e scansione degli array

Il lavaggio avviene nella stazione fluidica, uno strumento che mette in contatto varie soluzioni con i chip, tra cui acqua, WS A e WS B (questi ultimi sono entrambi buffer). Va prima eseguita l'inizializzazione dello strumento, in cui si prepara svolgendo dei lavaggi autonomi della macchina stessa. Terminati i lavaggi, si possono occupare le quattro postazioni con un alloggiamento ciascuno per ogni array; quindi, dal fornello si tolgono quattro array per volta. In questa fase bisogna utilizzare tre eppendorf, una ambra per SB-1 (in quanto sensibile alla luce), una trasparente per SB-2 ed una blu per il buffer AH. All'interno della stazione fluidica, avviato il programma entreranno in contatto le sonde e gli array in modo tale da permettere la rivelazione. Terminata la fluidica, si procede nello scanner che rileva il segnale luminoso nei chip.

Per quanto riguarda le regioni cromosomiche analizzate, è stato valutato tutto il genoma con una risoluzione pari a 25 kb per le delezioni, 50 kb per le duplicazioni e

3 Mb per regioni con perdita di eterozigotità (LOH). Le prestazioni del test non sono state valutate per i CNV e LOH con dimensioni al di sotto di queste soglie.

Inoltre, la perdita (assenza) di eterozigotità (LOH/AOH) ha impostazioni di filtro di 3 Mb. Le prestazioni del test non sono state valutate per LOH al di sotto di questa impostazione. Il CytoScan Dx Assay non può identificare riarrangiamenti cromosomici bilanciati, come traslocazioni o inversioni.

4. Risultati

In seguito alle CMA effettuate, nei casi 2, 3, 8 e 10 non sono stati evidenziati riarrangiamenti cromosomici sbilanciati dando esito negativo visto il quesito clinico. Non sono state considerate nell'interpretazione dei risultati variazioni del numero di copie di quei loci noti come siti benigni e regioni non contenenti geni noti alla data della refertazione.

Nel Caso 1, l'analisi ha evidenziato la presenza di:

- un cromosoma X sovrannumerario, compatibile con un quadro di Sindrome di Klinefelter, confermata, successivamente, mediante analisi del cariotipo;
- una microduplicazione sul braccio corto del cromosoma Y, nella regione p11.2, della grandezza di 168 kb, comprendente il gene OMIM *PCDH11Y* (*400022). Secondo i dati attualmente riportati sul database ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>), duplicazioni di questa regione sono da considerarsi come Varianti a Significato Incerto.

Nel Caso 4, l'analisi ha evidenziato la presenza di una microduplicazione sul braccio lungo di un cromosoma 21, nella regione q22.11q22.12, della grandezza di 190 kb, comprendente i geni MORBID *KCNE1* (*176261) e *KCNE2* (*603796) e il gene OMIM *RCANI* (*602917). In base ai dati presenti in letteratura, attualmente tale alterazione risulta classificata come variante a incerto significato (VUS), non utilizzabile a scopo clinico.

Nel Caso 5, l'analisi ha mostrato la presenza di una regione con perdita di eterozigotità (LOH) sul braccio corto di un cromosoma 20, nella regione p12.3p11.23, della grandezza di 11,513 Mb. Tale risultato potrebbe suggerire la segregazione di una condizione recessiva da approfondire con altra tecnica di genetica molecolare.

Nel Caso 6, la CMA ha messo in evidenza la presenza di una microdelezione sul braccio lungo di un cromosoma 22, nella regione q11.21, della grandezza di 108 kb, comprendente i geni OMIM *GSTT1* (*600436), *DGCR5* (*618040), *DGCR2* (*600594) e il gene MORBID *PRODH* (*606810) corrispondente in parte alla regione della Sindrome da delezione 22q11.2. Tuttavia, in base alle conoscenze attuali, tale alterazione è classificata come Variante ad Incerto Significato* e, pertanto, non è possibile correlarla con il quadro clinico della paziente. Tale risultato è stato confermato mediante tecnica MLPA presso lo stesso laboratorio.

Nel Caso 7, sono state evidenziate:

- Una microdelezione sul braccio corto di un cromosoma 2, nella regione p16.3, della grandezza di 71 kb, comprendente il gene *MORBI* *NRXN1* (*600565);
- Una microduplicazione sul braccio corto di un cromosoma 16, nella regione, p11.2, della grandezza di 738kb, corrispondente alla regione della Sindrome da microduplicazione 16p11.2.

Infine, nel Caso 9, L'analisi ha evidenziato la presenza di una microduplicazione sul braccio corto di un cromosoma 16, nella regione p13.11p12.3, della grandezza di 2.978 Mb corrispondente alla regione della Sindrome da microduplicazione 16p13.11.

5. Discussione

Il punto cruciale dell'utilizzo della CMA in pazienti affetti da epilessia è la grande difficoltà, in primo luogo, di discernere i vari tipi di epilessia anche da un punto di vista genetico. Inoltre, è importante sottolineare la correlazione tra le convulsioni epilettiche e i disturbi neurologici di cui il paziente può essere affetto: ad esempio, è stato dimostrato che le persone che presentano un disturbo dello spettro autistico hanno una maggiore probabilità di riscontrare episodi di crisi epilettiche durante la loro vita fino al 60% in più rispetto ai non affetti (Tuchman, R. et al., 2010). In questo lavoro è stato posto come obiettivo la dimostrazione dell'efficacia della CMA nei pazienti affetti da epilessia e di quanto sia d'aiuto nella diagnosi e nella potenziale terapia seguente. Non è possibile, tuttavia, fare un calcolo della detection rate della metodica in quanto i pazienti presi in esame non permettono quantitativamente una stima. Il lato negativo dello studio è stato il grande campo clinico preso in esame, ovvero l'epilessia, che presenta centinaia di aspetti diversi, dal punto sintomatologico, diagnostico e soprattutto genetico. Quest'ultimo è ampliato ancora di più dalla grande capacità di detection della CMA, che produce un'enorme mole di risultati, in quanto segnala sia alterazioni benigne che non benigne. Da segnalare tra le possibili problematiche dell'analisi ci sono sicuramente le VUS, che sono un risultato significativo ma non conclusivo dell'indagine, in quanto vanno documentate e riclassificate dalla letteratura scientifica man mano che la ricerca amplia le conoscenze scientifiche. Nel Caso 1 e nel Caso 7 sono state documentate più di una alterazione cromosomica, esempi lampanti di come la diagnosi genetica può dare una spiegazione dettagliata alla diagnosi del paziente. Il riscontro positivo utilizzando la CMA è sicuramente il risultato esaustivo comprendente non solo le CNVs ma anche la perdita di eterozigotà (LOH), come nel Caso 5. Quattro pazienti sono risultati negativi alla CMA, ma questo non significa che non verrà data una spiegazione delle manifestazioni cliniche dell'epilessia, in quanto esistono tecniche, prima tra tutte l'NGS-ESOMA, che completano l'analisi in quanto studia porzioni più corte del genoma.

Una corretta diagnosi ha un'importanza cruciale per la terapia, in quanto indirizza il paziente presso un accertamento genetico, per capire le cause molecolari che possono essere utilizzate come target di un futuro approccio diagnostico/terapeutico. Al giorno d'oggi la targeted therapy viene già utilizzata in molti ambiti clinici e l'epilessia non è

da meno, un esempio classico è l'utilizzo di una dieta chetogenica. Viene prescritta per il trattamento della sindrome da deficit del trasportatore del glucosio 1 (GLUT1): in questi pazienti l'assorbimento del glucosio nel cervello (e quindi il metabolismo ad esso correlato) è compromesso per via della mutazione di *SLC2A1*. La dieta chetogenica, povera di carboidrati, fornisce ai neuroni una fonte alternativa di energia sfruttando per lo più i grassi, in modo tale da non risentire di questa alterazione congenita (Isom L.L. et al., 2021). Ci sono notevoli sviluppi nella ricerca scientifica per quanto riguarda la gene-based therapy, utilizzando vettori virali come lentivirus ed adenovirus, la risposta al trattamento è efficace ma sono in corso studi sulla modulazione del sistema immunitario, il grande limite di questo approccio (Foldvari, M. et al., 2016).

6. Conclusioni

Nello studio è possibile notare l'efficacia della CMA nell'analisi delle alterazioni cromosomiche in pazienti affetti da epilessia. Nonostante la letteratura scientifica al giorno d'oggi non è aggiornata al tal punto da utilizzare la CMA come principale tecnica di riferimento diagnostico, è un'ottima scelta per completare il percorso del paziente che necessita di scoprire la causa scatenante della sua patologia. La CMA può essere utilizzata in molti ambiti diversi, in quanto studia interamente i cromosomi umani e mette a nudo aberrazioni genetiche che con altre tecniche rimangono invisibili, come il cariotipo e il sequenziamento. La maggior parte dei pazienti affetti da epilessia idiopatica, soprattutto in età pediatrica, scopre la causa grazie ai test genetici. Come si può notare da questo studio, in 10 pazienti con epilessia idiopatica solo quattro sono risultati negativi alla CMA; questo non significa necessariamente che la causa non sia genetica, in quanto ci sono alterazioni non visibili con questa tecnica. Tuttavia è possibile ridurre l'utilizzo di tecniche più costose come, l'NGS a pochi casi. Nei sei pazienti risultati positivi, sono state trovate tre VUS, ovvero variazioni di significato incerto, che sono molto frequenti come risultato della CMA. Infine, in tre pazienti sono state osservate tre diverse alterazioni: il Caso 1 presentava un cromosoma X sovrannumerario, compatibile con un quadro di Sindrome di Klinefelter: sin dalla scoperta citogenetica della sindrome di Klinefelter (XXY), questa patologia è stata associata ad una maggiore frequenza di crisi convulsive in pazienti pediatriche (Taki H. et al., 1969). Nel caso 7, una microduplicazione sul braccio corto di un cromosoma 16, nella regione, p11.2, della grandezza di 738kb, corrispondente alla regione della Sindrome da microduplicazione 16p11.2. Tale regione è accomunata dalla letteratura scientifica da molti anni ad un quadro di crisi epilettiche (Leone, R. et al., 2024), così come per il caso 9 in cui è stata segnalata una microduplicazione sul braccio corto di un cromosoma 16, corrispondente alla regione della Sindrome da microduplicazione 16p13.11 (Epi4K Consortium, 2024). In questi casi il paziente ha ricevuto una risposta definitiva dall'analisi genetica che completa la diagnosi medica precedentemente effettuata dal clinico. In definitiva, la CMA ha tutte le carte in regola per essere utilizzata anche nel prossimo futuro come tecnica molecolare per la valutazione eziologica dell'epilessia. Con l'aggiornamento continuo della letteratura scientifica tramite le nuove scoperte si possono andare a diminuire drasticamente i

risultati incerti (VUS), ovvero il più grande limite della CMA, migliorando la resa diagnostica.

7. Bibliografia

Aaron Theisen, Ph.D., 2008. Nature Education. Microarray-based Comparative Genomic Hybridization (aCGH). *Nature Education* 1(1):45

Abdelsamad, A., Kachhadia, M. P., Hassan, T., Kumar, L., Khan, F., Kar, I., Panta, U., Zafar, W., Sapna, F., Varrassi, G., Khatri, M., & Kumar, S. (2023). Charting the Progress of Epilepsy Classification: Navigating a Shifting Landscape. *Cureus*, 15(10), e46470.

Allen, N. M., Conroy, J., Shahwan, A., Ennis, S., Lynch, B., Lynch, S. A., & King, M. D. (2015). Chromosomal microarray in unexplained severe early onset epilepsy - A single centre cohort. *European journal of paediatric neurology: EJPN : official journal of the European Paediatric Neurology Society*, 19(4), 390–394.

Amedeo Bianchi, Francesca Bisulli, Laura Canafoglia, Giuseppe Capovilla, Antonietta Coppola, Maurizio Elia, Silvana Franceschetti, Antonio Gambardella, Giuseppe Gobbi, Roberto Michelucci, Carlo Nobile, Tommaso Pippucci, Dario Pruna, Nicola Specchio, Pasquale Striano, Alessandra Terracciano, Marina Trivisano, Federico Zara, Giugno 2016. Commissione Genetica Lega Italiana Contro l'Epilessia [LICE]

Balestrini, S., Arzimanoglou, A., Blümcke, I., Scheffer, I. E., Wiebe, S., Zelano, J., & Walker, M. C. (2021). The aetiologies of epilepsy. *Epileptic disorders: international epilepsy journal with videotape*, 23(1), 1–16.

Berg, A. T., Berkovic, S. F., Brodie, M. J., Buchhalter, J., Cross, J. H., van Emde Boas, W., Engel, J., French, J., Glauser, T. A., Mathern, G. W., Moshé, S. L., Nordli, D., Plouin, P., & Scheffer, I. E. (2010). Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia*, 51(4), 676–685.

Bhalla, D., Godet, B., Druet-Cabanac, M., & Preux, P. M. (2011). Etiologies of epilepsy: a comprehensive review. *Expert review of neurotherapeutics*, 11(6), 861–876.

Bola Adamolekun, gen 2024, MD, University of Tennessee Health Science Center

Shimizu, H., Morimoto, Y., Yamamoto, N., Tayama, T., Ozawa, H., & Imamura, A. (2022). Overlap Between Epilepsy and Neurodevelopmental Disorders: Insights

from Clinical and Genetic Studies. In S. J. Czuczwar (Ed.), *Epilepsy*. Exon Publications.

BREDA GENETICS, 2016

Charissa Millevert, Sara Weckhuysen, 2023. Commissione Genetica dell'ILAE. Serie di alfabetizzazione genetica ILAE: sindromi epilettiche familiari autolimitanti con esordio in età neonatale e infantile.

Devinsky, O., Vezzani, A., O'Brien, T. J., Jette, N., Scheffer, I. E., de Curtis, M., & Perucca, P. (2018). *Epilepsy. Nature reviews. Disease primers, 4*, 18024.

Dudek, F. E., & Staley, K. J. (2011). The time course of acquired epilepsy: implications for therapeutic intervention to suppress epileptogenesis. *Neuroscience letters, 497(3)*, 240–246.

Ellis, C. A., Petrovski, S., & Berkovic, S. F. (2020). Epilepsy genetics: clinical impacts and biological insights. *The Lancet. Neurology, 19(1)*, 93–100.

Engel J., 2008. *Epilepsy, A Comprehensive Textbook.* Lippincott Williams & Williams, PA, USA

Epi4K Consortium (2024). The role of copy number variants in the genetic architecture of common familial epilepsies. *Epilepsia, 65(3)*, 792–804.

Fisher, R. S., Acevedo, C., Arzimanoglou, A., Bogacz, A., Cross, J. H., Elger, C. E., Engel, J., Jr, Forsgren, L., French, J. A., Glynn, M., Hesdorffer, D. C., Lee, B. I., Mathern, G. W., Moshé, S. L., Perucca, E., Scheffer, I. E., Tomson, T., Watanabe, M., & Wiebe, S. (2014). ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia, 55(4)*, 475–482.

Fisher, R. S., Cross, J. H., French, J. A., Higurashi, N., Hirsch, E., Jansen, F. E., Lagae, L., Moshé, S. L., Peltola, J., Roulet Perez, E., Scheffer, I. E., & Zuberi, S. M. (2017). Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia, 58(4)*, 522–530.

Foldvari, M., Chen, D. W., Nafissi, N., Calderon, D., Narsineni, L., & Rafiee, A. (2016). Non-viral gene therapy: Gains and challenges of non-invasive administration methods. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society, 240*, 165–190.

GBD 2016 DALYs and HALE Collaborators (2017). Global, regional, and national disability-adjusted life-years (DALYs) for 333 diseases and injuries and healthy life

expectancy (HALE) for 195 countries and territories, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet* (London, England), 390(10100), 1260–1344.

Kallioniemi, A., Kallioniemi, O. P., Sudar, D., Rutovitz, D., Gray, J. W., Waldman, F., & Pinkel, D. (1992). Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science (New York, N.Y.)*, 258(5083), 818–821.

Grinton, B. E., Heron, S. E., Pelekanos, J. T., Zuberi, S. M., Kivity, S., Afawi, Z., Williams, T. C., Casalaz, D. M., Yendle, S., Linder, I., Lev, D., Lerman-Sagie, T., Malone, S., Bassan, H., Goldberg-Stern, H., Stanley, T., Hayman, M., Calvert, S., Korczyn, A. D., Shevell, M., & Berkovic, S. F. (2015). Familial neonatal seizures in 36 families: Clinical and genetic features correlate with outcome. *Epilepsia*, 56(7), 1071–1080.

Guerreiro C. A. (2016). Epilepsy: Is there hope?. *The Indian journal of medical research*, 144(5), 657–660.
https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_1051_16

Haeri, M., Gelowani, V., & Beaudet, A. L. (2015). Chromosomal microarray analysis, or comparative genomic hybridization: A high throughput approach. *MethodsX*, 3, 8–18.

Beaudet A. L. (2014). Reaching a CNV milestone. *Nature genetics*, 46(10), 1046–1048.

Harkin, L. A., McMahon, J. M., Iona, X., Dibbens, L., Pelekanos, J. T., Zuberi, S. M., Sadleir, L. G., Andermann, E., Gill, D., Farrell, K., Connolly, M., Stanley, T., Harbord, M., Andermann, F., Wang, J., Batish, S. D., Jones, J. G., Seltzer, W. K., Gardner, A., Infantile Epileptic Encephalopathy Referral Consortium, & Scheffer, I. E. (2007). The spectrum of SCN1A-related infantile epileptic encephalopathies. *Brain : a journal of neurology*, 130(Pt 3), 843–852.

Helbig, I., Swinkels, M. E., Aten, E., Caliebe, A., van 't Slot, R., Boor, R., von Spiczak, S., Muhle, H., Jähn, J. A., van Binsbergen, E., van Nieuwenhuizen, O., Jansen, F. E., Braun, K. P., de Haan, G. J., Tommerup, N., Stephani, U., Hjalgrim, H., Poot, M., Lindhout, D., Brilstra, E. H., & Koeleman, B. P. (2014). Structural genomic variation in childhood epilepsies with complex phenotypes. *European journal of human genetics: EJHG*, 22(7), 896–901.

Heinzen, E. L., Radtke, R. A., Urban, T. J., Cavalleri, G. L., Depondt, C., Need, A. C., Walley, N. M., Nicoletti, P., Ge, D., Catarino, C. B., Duncan, J. S.,

- Kasperaviciūte, D., Tate, S. K., Caboclo, L. O., Sander, J. W., Clayton, L., Linney, K. N., Shianna, K. V., Gumbs, C. E., Smith, J., & Goldstein, D. B. (2010).** Rare deletions at 16p13.11 predispose to a diverse spectrum of sporadic epilepsy syndromes. *American journal of human genetics*, *86*(5), 707–718.
- Hoffman-Andrews L. (2018).** The known unknown: the challenges of genetic variants of uncertain significance in clinical practice. *Journal of law and the biosciences*, *4*(3), 648–657
- Huff JS, Murr N., 2020,** Seizure. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls
- Hunter, S. E., Jalazo, E., Felton, T. R., Heinzen, E. L., & Shiloh-Malawsky, Y. (2022).** Epilepsy Genetics: Advancements in the Field and Impact on Clinical Practice. In S. J. Czuczwar (Ed.), *Epilepsy*. Exon Publications. Chi, W., Kiskinis, E. Analisi integrativa dei geni associati all'epilessia rivela correlazioni espressione-fenotipo. *Sci Rep* *14*, 3587 (2024).
- Isom L.L., Knupp KG.** Dravet Syndrome: Novel Approaches for the Most Common Genetic Epilepsy. *Neurotherapeutics*. **2021** Jul;*18*(3):1524-1534. doi: 10.1007/s13311-021-01095-6. Epub 2021 Aug 10.
- Joynt, A. C. M., Axford, M. M., Chad, L., & Costain, G. (2021).** Understanding genetic variants of uncertain significance. *Paediatrics & child health*, *27*(1), 10–11.
- Kamien, B. A., Cardamone, M., Lawson, J. A., & Sachdev, R. (2012).** A genetic diagnostic approach to infantile epileptic encephalopathies. *Journal of clinical neuroscience: official journal of the Neurosurgical Society of Australasia*, *19*(7), 934–941.
- Leone, R., Zuglian, C., Brambilla, R., & Morella, I. (2024).** Understanding copy number variations through their genes: a molecular view on 16p11.2 deletion and duplication syndromes. *Frontiers in pharmacology*, *15*, 1407865.
- Levy, B., & Wapner, R. (2018).** Prenatal diagnosis by chromosomal microarray analysis. *Fertility and sterility*, *109*(2), 201–212.
- Manning, M., Hudgins, L., & Professional Practice and Guidelines Committee (2010).** Array-based technology and recommendations for utilization in medical genetics practice for detection of chromosomal abnormalities. *Genetics in medicine: official journal of the American College of Medical Genetics*, *12*(11), 742–745.

- McTague, A., Howell, K. B., Cross, J. H., Kurian, M. A., & Scheffer, I. E. (2016).** The genetic landscape of the epileptic encephalopathies of infancy and childhood. *The Lancet. Neurology*, *15*(3), 304–316.
- Mefford H. C. (2014).** CNVs in Epilepsy. *Current genetic medicine reports*, *2*(3), 162–167.
- Mikhail, F. M., & ACMG Laboratory Quality Assurance Committee (2021).** Chromosomal microarray analysis, including constitutional and neoplastic disease applications, 2021 revision: a technical standard of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genetics in medicine: official journal of the American College of Medical Genetics*, *23*(10), 1818–1829.
- Miller, D. T., Adam, M. P., Aradhya, S., Biesecker, L. G., Brothman, A. R., Carter, N. P., Church, D. M., Crolla, J. A., Eichler, E. E., Epstein, C. J., Faucett, W. A., Feuk, L., Friedman, J. M., Hamosh, A., Jackson, L., Kaminsky, E. B., Kok, K., Krantz, I. D., Kuhn, R. M., Lee, C., & Ledbetter, D. H. (2010).** Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *American journal of human genetics*, *86*(5), 749–764.
- Montalvo, M., Khattak, J. F., Redenbaugh, V., Britton, J., Sanchez, C. V., Datta, A., Tillema, J. M., Chen, J., McKeon, A., Pittock, S. J., Flanagan, E. P., & Dubey, D. (2022).** Acute symptomatic seizures secondary to myelin oligodendrocyte glycoprotein antibody-associated disease. *Epilepsia*, *63*(12), 3180–3191.
- M. ELIA, G. GOBBI, 2006,** Unità Operativa di Neurologia e Neurofisiopatologia Clinica e Strumentale, IRCCS <Associazione Oasi Maria SS.=, Troina (EN); * Unità Operativa di Neuropsichiatria Infantile, Ospedale Maggiore <C.A. Pizzardi=, Bologna, Epilessia ed anomalie cromosomiche
- Nicita, F., De Liso, P., Danti, F. R., Papetti, L., Ursitti, F., Castronovo, A., Allemand, F., Gennaro, E., Zara, F., Striano, P., & Spalice, A. (2012).** The genetics of monogenic idiopathic epilepsies and epileptic encephalopathies. *Seizure*, *21*(1), 3–11.
- Noebels J. (2015).** Pathway-driven discovery of epilepsy genes. *Nature neuroscience*, *18*(3), 344–350. <https://doi.org/10.1038/nn.3933> Jessica Falco-Walter, , Stanford University School of Medicine, Palo Alto, California Semin Neurol 2020

- Oliver, K. L., Scheffer, I. E., Bennett, M. F., Grinton, B. E., Bahlo, M., & Berkovic, S. F. (2023).** Genes4Epilepsy: An epilepsy gene resource. *Epilepsia*, *64*(5), 1368–1375.
- Olson, H., Shen, Y., Avallone, J., Sheidley, B. R., Pinsky, R., Bergin, A. M., Berry, G. T., Duffy, F. H., Eksioglu, Y., Harris, D. J., Hisama, F. M., Ho, E., Irons, M., Jacobsen, C. M., James, P., Kothare, S., Khwaja, O., Lipton, J., Loddenkemper, T., Markowitz, J., & Poduri, A. (2014).** Copy number variation plays an important role in clinical epilepsy. *Annals of neurology*, *75*(6), 943–958.
- Orsini, A., Zara, F., & Striano, P. (2018).** Recent advances in epilepsy genetics. *Neuroscience letters*, *667*, 4–9. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.05.014>
- Hoffman-Andrews L. (2018).** The known unknown: the challenges of genetic variants of uncertain significance in clinical practice. *Journal of law and the biosciences*, *4*(3), 648–657.
- Pal, D. K., Pong, A. W., & Chung, W. K. (2010).** Genetic evaluation and counseling for epilepsy. *Nature reviews. Neurology*, *6*(8), 445–453.
- Pearl P. L. (2018).** Epilepsy Syndromes in Childhood. *Continuum (Minneapolis, Minn.)*, *24*(1, Child Neurology), 186–209.
- Perucca, P., Bahlo, M., & Berkovic, S. F. (2020).** The Genetics of Epilepsy. *Annual review of genomics and human genetics*, *21*, 205–230.
- Pinkel, D., Se Graves, R., Sudar, D. et al., (1998).** Analisi ad alta risoluzione della variazione del numero di copie del DNA mediante ibridazione genomica comparativa su microarray. *Nat Genet* **20** , 207–211
- Pratte-Santos, R., Ribeiro, K. H., Santos, T. A., & Cintra, T. S. (2016).** Analysis of chromosomal abnormalities by CGH-array in patients with dysmorphic and intellectual disability with normal karyotype. *Einstein (Sao Paulo, Brazil)*, *14*(1), 30–34.
- Rastin, C., Schenkel, L. C., & Sadikovic, B. (2023).** Complexity in Genetic Epilepsies: A Comprehensive Review. *International journal of molecular sciences*, *24*(19),
- Ruggiero, Sarah M.a,b,c; Xian, Julia,b,c; Helbig, Ingo,a,b,c,d. April 2023.** The current landscape of epilepsy genetics: where are we, and where are we going?. *Current Opinion in Neurology* *36*(2):p 86-94,

Sayoni Roy Chowdhury MD, DM (Neurologia pediatrica) ^a, Robyn Whitney MD, CSCN (EEG) ^b, Rajesh Ramachandran, Nair MD, DM, CSCN (EEG) ^b, Sunita Bijarnia Mahay DCH, DNB (Ped) ^c, Suvasini Sharma MD, DM (Neurologia pediatrica)

Shao, L., Akkari, Y., Cooley, L. D., Miller, D. T., Seifert, B. A., Wolff, D. J., Simone Rossi, *Il cervello elettrico*, 2020

Xia, M., Yang, X., Fu, J., Teng, Z., Lv, Y., & Yu, L. (2020). Application of chromosome microarray analysis in prenatal diagnosis. *BMC pregnancy and childbirth*, 20(1), 696.

Shearer, B. M., Thorland, E. C., Gonzales, P. R., & Ketterling, R. P. (2007). Evaluation of a commercially available focused aCGH platform for the detection of constitutional chromosome anomalies. *American journal of medical genetics. Part A*, 143A(20), 2357–2370.

Snijders, A. M., Nowak, N., Segraves, R., Blackwood, S., Brown, N., Conroy, J., Hamilton, G., Hindle, A. K., Huey, B., Kimura, K., Law, S., Myambo, K., Palmer, J., Ylstra, B., Yue, J. P., Gray, J. W., Jain, A. N., Pinkel, D., & Albertson, D. G. (2001). Assembly of microarrays for genome-wide measurement of DNA copy number. *Nature genetics*, 29(3), 263–264.

Taki H, Asaka A, Kurihara R, Saito S. A case of Klinefelter's syndrome with epileptic seizures. *Jpn J Psychiatry Neurol* **1969**;46:61-5

Thomas, R. H., & Berkovic, S. F. (2014). The hidden genetics of epilepsy—a clinically important new paradigm. *Nature reviews. Neurology*, 10(5), 283–292.

Thijs, R. D., Surges, R., O'Brien, T. J., & Sander, J. W. (2019). Epilepsy in adults. *Lancet (London, England)*, 393(10172), 689–701.

Tubi, M. A., Lutkenhoff, E., Blanco, M. B., McArthur, D., Villablanca, P., Ellingson, B., Diaz-Arrastia, R., Van Ness, P., Real, C., Shrestha, V., Engel, J., Jr, & Vespa, P. M. (2019). Early seizures and temporal lobe trauma predict post-traumatic epilepsy: A longitudinal study. *Neurobiology of disease*, 123, 115–121.

Twele, F., Töllner, K., Brandt, C., & Löscher, W. (2016). Significant effects of sex, strain, and anesthesia in the intrahippocampal kainate mouse model of mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsy & behavior: E&B*, 55, 47–56.

Wapner, R. J., Martin, C. L., Levy, B., Ballif, B. C., Eng, C. M., Zachary, J. M., Savage, M., Platt, L. D., Saltzman, D., Grobman, W. A., Klugman, S., Scholl, T., Simpson, J. L., McCall, K., Aggarwal, V. S., Bunke, B., Nahum, O., Patel, A.,

Lamb, A. N., Thom, E. A., & Jackson, L. (2012). Chromosomal microarray versus karyotyping for prenatal diagnosis. *The New England journal of medicine*, *367*(23), 2175–2184.

Zhang, M. W., Liang, X. Y., Wang, J., Gao, L. D., Liao, H. J., He, Y. H., Yi, Y. H., He, N., Liao, W. P., & China Epilepsy Gene 1.0 Project (2024). Epilepsy-associated genes: an update. *Seizure*, *116*, 4–13.

Zuberi, S. M., Brunklaus, A., Birch, R., Reavey, E., Duncan, J., & Forbes, G. H. (2011). Genotype-phenotype associations in SCN1A-related epilepsies. *Neurology*, *76*(7), 594–600.

Wang, J., Lin, Z. J., Liu, L., Xu, H. Q., Shi, Y. W., Yi, Y. H., He, N., & Liao, W. P. (2017). Epilepsy-associated genes. *Seizure*, *44*, 11–20.

Tuchman, R., Cuccaro, M., & Alessandri, M. (2010). Autism and epilepsy: historical perspective. *Brain & development*, *32*(9), 709–718.

RINGRAZIAMENTI

Un ringraziamento speciale va al mio laboratorio. Fani, Marisa e Rosa, siete state delle sorelle maggiori, mi avete insegnato cosa significa creare un'amicizia in un ambiente difficile come quello lavorativo. Vi siete prese cura di me e non è scontato, niente del rapporto che si è formato è scontato. Nonostante a volte le diverse posizioni lavorative creano contrasti, vi siete impegnate al massimo per rendere ogni giorno un'esperienza fantastica. Con voi ho imparato tantissimo e non vi ringrazierò mai abbastanza. Anche se non lavoreremo più nello stesso laboratorio ci sarò sempre per voi, perché vi meritate questo ed altro.

Un ringraziamento va anche a mio padre e mia sorella, anche se spesso siamo stati lontano ho sentito la vostra presenza ogni giorno, così come il vostro supporto in ogni difficoltà

Marzia e Vittoria, avete sofferto anche voi il mio periodo pre-esame, non so come abbiate fatto ma siete riuscite a capirmi. Non sono facile come coinquilino, spero che il futuro, non più come studente, sarà più leggero e spensierato anche con voi.

A Sonia, che mi ha aiutato come una madre. Insieme a Giuseppe e Paride, mi ha sempre aiutato e accolto come fa una famiglia, da anni mi supportano e questo mi rende immensamente felice di far parte di loro.