



**UNIVERSITÀ DI PISA**

**Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale**  
**Direttore Prof. Mario Petri**

**Dipartimento di Patologia Chirurgica, Medica, Molecolare e dell'Area Critica**  
**Direttore Prof. Riccardo Zucchi**

**Dipartimento di Ricerca Traslazionale e delle Nuove Tecnologie in Medicina e Chirurgia**  
**Direttore Prof. Giulio Guido**

---

## CORSO DI LAUREA IN MEDICINA E CHIRURGIA

# Il ruolo della metodica CGH array nella diagnostica delle sindromi dismorfogenetiche con disabilità neuropsichica in età evolutiva

**RELATORE**  
**CHIAR.MO PROF. Giovanni Cioni**

**CANDIDATO**  
**Giulia Gori**

**ANNO ACCADEMICO 2014/ 2015**

# Indice

<i>Riassunto</i> .....	1
<i>Parte generale</i> .....	5
<i>Capitolo 1- Sindromi dismorfogenetiche con disabilità intellettiva in età evolutiva</i> .....	6
1.1 <i>L'iter diagnostico</i> .....	7
1.2 <i>L'analisi genetica</i> .....	9
1.2.1 <i>Le anomalie cromosomiche</i> .....	9
1.2.2 <i>Il cariotipo</i> .....	11
1.2.3 <i>L'analisi array - CGH</i> .....	12
1.2.4 <i>Next generation sequencing</i> .....	17
<i>Capitolo 2- Sindromi dismorfogenetiche più frequenti in neuropsichiatria infantile</i> .....	20
2.1 <i>La sindrome di Down</i> .....	20
2.2 <i>La sindrome di Noonan</i> .....	21
2.3 <i>La sindrome di Angelman</i> .....	22
2.4 <i>La sindrome di Prader- Willi</i> .....	23
2.5 <i>La sindrome di Rett</i> .....	24
2.6 <i>La sindrome dell'X fragile</i> .....	25
2.7 <i>La sindrome di Klinefelter</i> .....	26
2.8 <i>La sindrome di Turner</i> .....	26
2.9 <i>La sindrome da delezione del cromosoma 1p36</i> .....	27
2.10 <i>La sindrome da microdelezione/ microduplicazione 1q21.1</i> .....	28
2.11 <i>La sindrome da delezione del cromosoma 2q37</i> .....	29
2.12 <i>La sindrome da delezione 3q29</i> .....	30
2.13 <i>La sindrome di Wolf-Hirschhorn</i> .....	30
2.14 <i>La sindrome di Williams</i> .....	31
2.15 <i>La sindrome da inversione/ duplicazione del cromosoma 8</i> .....	32
2.16 <i>La sindrome da inversione/ duplicazione del cromosoma 15</i> .....	33
2.17 <i>La sindrome da microdelezione/ microduplicazione 15q11q13</i> .....	34
2.18 <i>La sindrome da microdelezione/microduplicazione 16p11.2</i> .....	35
2.19 <i>La sindrome da microduplicazione 16p13.11</i> .....	36
2.20 <i>La sindrome di Smith- Magenis</i> .....	36
2.21 <i>La sindrome di Phelan-McDermid</i> .....	37

2.22 La sindrome da duplicazione Xq28.....	38
2.23 La sindrome Di George .....	39
2.23.1 Eziopatogenesi.....	39
2.23.2 Quadro clinico .....	41
2.23.3 L'iter diagnostico e la gestione del paziente.....	45
<i>Parte sperimentale</i> .....	47
<i>Capitolo 3- Analisi sperimentale</i> .....	48
3.1 Ipotesi di studio e scopi .....	49
3.2 Analisi del campione .....	49
3.3 La sindrome Di George .....	52
3.3.1 Descrizione del campione.....	52
3.3.2 Pazienti e Metodi .....	54
3.3.3 Analisi dei singoli casi clinici .....	55
3.4 Risultati ottenuti attraverso la metodica array- CGH.....	64
3.5 Analisi del fenotipo neuropsicologico e confronto con la letteratura .....	65
3.6 Discussione.....	67
<i>Conclusioni</i> .....	69
<i>Bibliografia</i> .....	71
<i>Ringraziamenti</i> .....	76

## ***Riassunto***

Le patologie dismorfo-genetiche sono caratterizzate da complessi quadri clinici contraddistinti da dismorfismi, malformazioni congenite multiple e, nella maggior parte dei casi, disabilità intellettiva di grado variabile.

La patologia malformativa complessa mostra un'elevata prevalenza alla nascita (2-4% dei nati vivi).

L'inquadramento clinico e diagnostico del bambino con anomalie congenite multiple è un processo complesso, che può avviarsi già in epoca prenatale e completarsi ben oltre il periodo neonatale, coinvolgendo numerosi e diversi specialisti.

L'iter diagnostico inizia con un'approfondita indagine anamnestica, ponendo particolare attenzione sia sul pedigree familiare che sulle eventuali situazioni di sofferenza pre-perinatale. Si passa poi all'esecuzione dell'esame obiettivo che può evidenziare la presenza di un fenotipo caratteristico: dismorfismi particolari della facies e degli arti, come anche alterazioni di organi o apparati che potranno guidare il sospetto diagnostico. Tuttavia il fenotipo clinico dismorfo-logico può anche non essere presente, non potendosi escludere una patologia malformativa complessa.

L'apporto delle tecniche di citogenetica e genetica molecolare (*array-based comparative genomic hybridization, next generation sequencing, etc.*), negli ultimi anni sempre più estese nell'applicazione clinica, possono rivelarsi determinanti per una precisazione eziologica, soprattutto laddove la clinica sia poco evocativa, ed anche per una valutazione della correlazione genotipo-fenotipo, anche in termini di evoluzione della storia naturale e di follow-up.

Una corretta definizione diagnostica, inoltre, è il presupposto di una consulenza genetica alla famiglia, volta all'identificazione di soggetti a rischio per la ricorrenza della condizione e alle opportunità di prevenzione attraverso procedure di diagnosi preconcezionale o prenatale.

Le patologie dismorfo-genetiche in età evolutiva possono inquadarsi in forme sindromiche definibili con la presenza contemporanea di più difetti della morfogenesi, anomalie minori, difetti antropometrici sulla base di un'unica causa; e forme non sindromiche, in cui il fenotipo clinico sintomatologico può rappresentare l'unica manifestazione della patologia.

In qualche caso, le sindromi malformative possono essere identificate attraverso specifiche caratteristiche fenotipiche, immediatamente riconoscibili nel loro insieme. Tale aspetto è ovviamente modificato dalle caratteristiche peculiari di ciascun individuo che rendono ancora più difficile la diagnosi. Inoltre, alcuni fenotipi sindromici variano con il tempo,

pertanto una determinata diagnosi può risultare agevole in uno specifico momento e più difficile in altri.

Molto importante nell'inquadramento clinico di questi pazienti è il follow up, sia che sia stata raggiunta la diagnosi definitiva genetica sia, a maggior ragione, se così non è stato: si dovrà verificare l'evoluzione clinico-neuropsicologica che nel tempo potrà essere variabilmente disponibile.

In ogni caso, la presenza di dismorfismi o di numerose anomalie minori implica una corretta valutazione dello sviluppo psicomotorio del soggetto.

Nell'ultimo decennio, le tecniche di analisi molecolare (ad esempio la *polymerase chain reaction*, PCR) hanno rappresentato e rappresentano tuttora un valido metodo d'indagine sia in campo clinico sia nella diagnostica di un numero sempre maggiore di malattie genetiche. Soprattutto nel campo dei disordini monofattoriali, cioè nelle sindromi causate dall'alterazione di un singolo gene, le tecniche della biologia molecolare si sono rivelate vincenti. Il numero delle malattie genetiche identificabili mediante l'analisi del DNA cresce parallelamente alla determinazione di nuovi geni responsabili della malattia.

Negli anni, abbiamo assistito anche ad una evoluzione delle tecniche citogenetiche: l'indagine primaria iniziale, costituita dal cariotipo, è andata sostituendosi progressivamente dall'analisi array-based Comparative Genomic Hybridization (array-CGH). Probabilmente, negli anni a venire, ulteriori vantaggi potranno essere apportati dall'ingresso nella pratica clinica delle tecnologie Next Generation Sequencing (NGS): la NGS, conosciuta anche come "sequenziamento profondo" (*deep sequencing*), i cui principali vantaggi sono l'elevata capacità di analisi e l'altissima sensibilità, garantita dall'enorme quantità di dati e dall'accuratezza delle sequenze ottenute. E' una nuova tecnologia che consente, grazie alla produzione di miliardi di sequenze di DNA in forma di corti frammenti, di costruire una "mappa" dei geni alterati nelle patologie. Questo sistema tecnologico è infatti in grado di assicurare la lettura multipla (100.000 letture) e parallela di singoli frammenti di DNA di lunghezza tra 400-500 basi, consentendo quindi, in un'unica corsa di analisi, di ottenere oltre 40 milioni di basi analizzate.

In particolare, la metodica array CGH ha permesso di elevare la soglia diagnostica rispetto al cariotipo rilevando la presenza di microdelezioni e/o microduplicazioni (Copy number variations, CNV) a carico di tutti i cromosomi. Inoltre, permette di analizzare l'intero genoma del soggetto attraverso un'unica indagine.

E' quindi chiaro come l'era genetico-molecolare abbia modificato la diagnostica clinica, sia a livello prenatale che postnatale.

Nella parte sperimentale del presente lavoro si è analizzato:

**A)** L'incidenza di sensibilità e patogenicità dell'array CGH nei pazienti giunti all'IRCCS Stella Maris per disturbi del neurosviluppo e con quadri di anomalie congenite multiple di natura da determinare nel periodo compreso tra il 1 gennaio 2010 e il 31 dicembre 2015, nei quali l'esame CGH array è stato condotto per lo studio patogenetico del loro disturbo. I soggetti sottoposti ad analisi array sono in totale 1045, di cui 351(33.6%) sono risultati portatori di sbilanciamenti cromosomici.

Poiché tra i 351 positivi 87 (24.8%) risultano avere aberrazioni multiple, sia ereditate che de novo, il totale delle CNVs rilevate ammonta a 454.

L'ereditarietà dell'anomalia genetica è stata studiata in 194 CNVs su 454 (42.7%); nei restanti casi il bambino risulta adottato (7 casi, 1.5%) oppure l'analisi genetica a carico dei genitori risulta tuttora da eseguire o in corso di studio (253 casi, 55.7%).

Dei 194 studiati, in 156 (80.4%) è stata confermata l'ereditarietà per via materna o paterna, nei restanti 38 (19.6%) la CNV non è stata ritrovata in nessuno dei genitori; si parla pertanto di aberrazione *de novo*.

Riguardo alla patogenicità delle CNVs, 116 su 454 (25.6%) risultano patogene o probabilmente patogene.

**B)** Approfondimento clinico e valutazione di un piccolo gruppo di pazienti affetti da sindrome Di George diagnosticati con array CGH.

La sindrome Di George è una delle sindromi più frequenti in neuropsichiatria infantile ed è una patologia dismorfogenetica rara dovuta alla delezione del cromosoma 22q11.2, con un'incidenza di 1: 3000 nati vivi.

Dal punto di vista clinico, è caratterizzata principalmente da cardiopatia congenita, immunocompromissione di grado variabile, difetti del palato che determinano deficit nell'alimentazione e nell'acquisizione del linguaggio.

Il fenotipo neuropsicologico comprende un livello cognitivo variabile, generalmente tra i limiti inferiori della norma e un deficit di grado lieve- moderato. Relativamente all'aspetto comportamentale, si presentano spesso quadri caratterizzati da deficit di attenzione ed iperattività (*attention deficit hyperactivity disorder*, ADHD), impulsività, condotte oppositivo- provocatorie, labilità attentiva.

8 pazienti affetti da sindrome Di George diagnosticati all'IRCCS Stella Maris sono stati oggetto di studio attraverso un'analisi retrospettiva dalle cartelle e in due di essi è stato possibile assistere personalmente alle valutazioni cliniche effettuate presso l'istituto.

In tali pazienti, la metodica array CGH permette non solo di fare diagnosi, ma determina anche la dimensione dello sbilanciamento e rileva i geni eventualmente coinvolti.

Su questa base, e anche alla luce del fatto che in alcuni pazienti Di George non c'era un fenotipo suggestivo, si può affermare come questo studio possa supportare le recenti evidenze rispetto alle possibilità diagnostiche nell'ambito della disabilità neuropsichica, anche laddove non ci sia un chiaro orientamento diagnostico.

Si può quindi evincere quale sia l'importanza di implementare nella pratica clinica l'utilizzo dell'array CGH in soggetti con disturbi del neurosviluppo.

Questo studio conferma, inoltre, l'evidenza dell'elevata sensibilità diagnostica della metodica array CGH nei pazienti con disturbi del neurosviluppo e/o anomalie congenite multiple considerati idiopatici, dimostrando come spesso siano in realtà causati da sbilanciamenti cromosomici submicroscopici.

# *Parte generale*



## ***Capitolo 1***

### ***Sindromi dismorfogenetiche con disabilità intellettiva in età evolutiva***

Le patologie dismorfogenetiche sono caratterizzate da complessi quadri clinici contraddistinti da dismorfismi, malformazioni congenite multiple e, nelle maggior parte dei casi, disabilità intellettiva di grado variabile.

La patologia malformativa complessa mostra un'elevata prevalenza alla nascita (2-4% dei nati vivi).<sup>1</sup>

L'inquadramento clinico e diagnostico del bambino con anomalie congenite multiple è un processo complesso, che può avviarsi già in epoca prenatale e completarsi ben oltre il periodo neonatale, coinvolgendo numerosi e diversi specialisti.

Queste patologie sono collocabili o meno all'interno di una sindrome clinica conosciuta; si distinguono in questo modo forme sindromiche (ad esempio, sindrome di Down) e forme non sindromiche.

L'iter diagnostico inizia con una esaustiva e corretta raccolta anamnestica, per continuare con un esame obiettivo volto ad evidenziare le caratteristiche dismorfiche.

In qualche caso, le sindromi malformative possono essere identificate attraverso specifiche caratteristiche fenotipiche, immediatamente riconoscibili nel loro insieme. Tale aspetto è ovviamente modificato dalle caratteristiche peculiari di ciascun individuo che rendono ancora più difficile la diagnosi. Inoltre, alcuni fenotipi sindromici variano con il tempo, pertanto una determinata diagnosi può risultare agevole in uno specifico momento e più difficile in altri. Ecco perché una valutazione seriata del paziente a distanza di intervalli precisi, può essere di notevole ausilio nella formulazione di un sospetto diagnostico.

In ogni caso, la presenza di dismorfismi o di numerose anomalie minori implica una corretta valutazione dello sviluppo psicomotorio del soggetto, poiché spesso è presente una disabilità intellettiva di grado variabile.<sup>2</sup>

Con il termine "disabilità intellettiva" (*Intellectual Disability*, ID) si intende un disturbo del neurosviluppo, caratterizzato da insorgenza in età evolutiva, che include deficit intellettivi e adattivi negli ambiti della concettualizzazione, della socializzazione e delle capacità pratiche.

Il range di deficit spazia da limitazioni pressochè circoscritte dell'apprendimento e del controllo delle funzioni esecutive ad una compromissione globale delle abilità sociali o intellettive.<sup>3</sup>

Per poter formulare una diagnosi di disabilità intellettiva in accordo al DSM-V, devono venir soddisfatti i seguenti 3 criteri:

**A.** Deficit delle funzioni intellettive, come il ragionamento, la soluzione di problemi, la pianificazione, il pensiero astratto, il giudizio, l'apprendimento scolastico o l'apprendimento dall'esperienza, confermato sia da valutazione clinica che da prove d'intelligenza individualizzate e standardizzate.

**B.** Deficit del funzionamento adattivo che si manifesti col mancato raggiungimento degli standard di sviluppo e degli standard socio-culturali per l'indipendenza personale e la responsabilità sociale.

Senza supporto continuativo, i deficit adattivi limitano il funzionamento in una o più attività della vita quotidiana, quali la comunicazione, la partecipazione sociale e la vita indipendente, in più ambiti diversi, come la casa, la scuola, il lavoro e la comunità.

**C.** Insorgenza dei deficit intellettivi e adattivi nell'età evolutiva.<sup>4</sup>

I livelli di gravità vengono definiti sulla base del funzionamento adattivo e non più sui punteggi di quoziente intellettivo (QI); infatti si ritiene che il funzionamento adattivo determini, nelle aree della concettualizzazione, della socializzazione e delle abilità pratiche, il livello di supporto necessario a mantenere una condizione di vita accettabile.

Si continuano a distinguere 4 livelli di gravità (lieve, moderato, grave e profondo) ma, diversamente dal DSM-IV, il QI non rappresenta più il criterio principale. Esso è un punteggio, ottenuto tramite l'utilizzo di test standardizzati, con lo scopo di equiparare lo sviluppo cognitivo dell'individuo (età mentale) alla sua età cronologica.<sup>5</sup>

## ***1.1 L'iter diagnostico***

L'incidenza di disabilità intellettiva nella popolazione generale è stimata intorno all'1-3%.

Ad oggi, solo nel 50% delle forme caratterizzate da disabilità intellettiva si riesce a giungere ad una diagnosi.<sup>6</sup>

Il primo step dell'iter diagnostico è costituito dalla raccolta anamnestica.

Durante la ricostruzione anamnestica, deve essere posta una particolare attenzione verso tutti gli eventi pre- perinatali che potrebbero essere alla base della ID, quali:

- possibile origine lesionale-esitale, conseguente ad infezioni fetali e postnatali, neurotossicità causata da farmaci o alcol, traumi peri- postnatali, eventi vascolari, prematurità.
- cause malformative, riconducibili a disturbi dell'ontogenesi del sistema nervoso centrale.
- cause genetiche, legate principalmente ad errori durante la meiosi o meno frequentemente durante la mitosi post-zigotica. Il meccanismo meiotico in cui possono verificarsi sbilanciamenti genetici è il crossing over e riguarda lo scambio di porzioni omologhe di materiale genetico fra due cromatidi appartenenti a due cromosomi diversi di una coppia di omologhi. Se ci sono delle differenze genetiche tra gli omologhi, il crossing-over può produrre in un cromatidio nuove combinazioni geniche e può quindi favorire la comparsa di alterazioni genetiche. Dopo la formazione dello zigote, raramente si può verificare una non disgiunzione mitotica, cioè la cellula non divide equamente il proprio patrimonio genetico e genera due cellule figlie con un numero diverso di cromosomi; in questo caso, si parla di mosaicismo genetico.

Convenzionalmente, le forme genetiche di disabilità intellettiva sono suddivise in due grandi categorie: le forme sindromiche, associate con caratteristiche cliniche, radiologiche, metaboliche o biologiche, e le forme non sindromiche, in cui il fenotipo comportamentale rappresenta l'unica manifestazione della patologia.<sup>6</sup>

Nelle forme genetiche, per valutare se le mutazioni siano ereditate o meno, risulta importante condurre un'anamnesi familiare volta ad identificare:

- una storia familiare di ID in linea materna, che potrebbe essere ricondotta ad una ereditarietà di tipo X-linked, in cui i soggetti che più spesso esprimono la patologia sono gli individui di sesso maschile. La più frequente di queste è la sindrome dell'X fragile, per quanto occorra considerare anche tutte le altre forme di ID X-linked.
- storie di consanguineità, che potrebbero essere associate a forme autosomico-recessive o a sindromi di tipo metabolico.
- assenza di familiarità, in cui il soggetto in studio rappresenta il primo membro affetto.

La fase successiva nell'approccio alla ID dovrebbe prevedere l'esame obiettivo, durante il quale viene posto rilievo sia sui parametri auxologici (ad es. macro- microsomia, macro-microcefalia), che su eventuali quadri dismorfologici particolarmente evocativi, correlabili ad una sindrome nota (ID sindromica). Viene inoltre sottolineata l'importanza rivestita dalla presenza di eventuali segni neurologici o neuromuscolari che potrebbero orientare la diagnostica verso condizioni specifiche come ad esempio miopatie, distrofie muscolari congenite, distrofie miotoniche, paraplegie spastiche complesse, neuropatie ecc. Oltre a ciò, è importante valutare l'eventuale presenza di un peggioramento del quadro cognitivo del bambino, che potrebbe orientare la diagnosi verso forme metaboliche o ereditarie.<sup>7</sup> Qualora, infine, non sia presente un fenotipo caratteristico sul piano fisico ma comunque degno di nota su quello cognitivo-comportamentale, sono indicate le più moderne tecniche genetiche volte alla definizione eziologica della disabilità intellettiva non sindromica. A questo proposito, negli ultimi anni abbiamo assistito ad un notevole avanzamento in campo diagnostico grazie all'avvento di metodiche quali l'*array-based comparative genomic hybridization* (array-CGH) e la più recente *next generation sequencing* (NGS).

## ***1.2 L'analisi genetica***

### ***1.2.1 Le anomalie cromosomiche***

Le anomalie cromosomiche si distinguono in numeriche e strutturali.

Le anomalie numeriche dei cromosomi o aneuploidie cromosomiche vengono distinte in:

- monosomie, quando è presente una sola copia del cromosoma anziché due
- poliploidie, quando sono presenti più copie di uno stesso cromosoma; le più diffuse sono le trisomie, ossia la presenza di tre copie.

Errori numerici possono risultare a seguito di:

- un'alterata segregazione cromosomica nelle cellule che daranno origine alle cellule germinali
- un processo di non disgiunzione durante la prima o la seconda divisione meiotica, che può portare ad un anomalo numero di cromosomi nello spermatozoo o nell'ovocita
- errori mitotici durante le prime divisioni nello zigote neoformato.

I riarrangiamenti strutturali possono essere bilanciati o sbilanciati, se comportano o meno una perdita o un guadagno di materiale genetico, e possono essere distinti in:

1. Delezioni, che consistono nella perdita più o meno estesa di un frammento di cromosoma. Vengono classificate come terminali, se avvengono nella parte finale del cromosoma (nei telomeri), e interstiziali, quando, in seguito alla rottura di un cromosoma in due punti, avviene la perdita del frammento intermedio e i punti di rottura vengono saldati tra di loro.
2. Duplicazioni, che consistono nella presenza di due copie di uno stesso frammento nello stesso cromosoma; si dicono in tandem quando il segmento è ripetuto nello stesso orientamento, inverse quando il frammento duplicato ha una direzione opposta rispetto al frammento originario.
3. Inversioni, che consistono nella rotazione di  $180^\circ$  di un frammento. Esse non comportano perdite di materiale genetico ma possono determinare la perdita di funzionalità di geni importanti, se i punti di rottura da cui hanno origine ricadono all'interno della struttura di un gene o nelle regioni regolatrici della trascrizione. Le inversioni possono essere di due tipi: pericentriche, se il segmento che subisce la rotazione include il centromero, e paracentriche, se non lo comprende.
4. Traslocazioni, che implicano un trasferimento di materiale tra due o più cromosomi diversi. Possono essere di due tipi: reciproche o Robertsoniane. La traslocazione reciproca consiste in uno scambio bidirezionale di materiale genetico tra due cromosomi non omologhi. Essa avviene sempre in seguito a rotture del DNA, a causa delle quali si formano dei frammenti di cromosoma liberi che, per errori nel processo di riparazione, sono saldati in maniera errata ad un altro cromosoma non omologo, dando così origine a due cromosomi derivati; in questo caso si tratta di traslocazioni bilanciate. Nella traslocazione Robertsoniana, invece, due cromosomi acrocentrici (centromero in posizione subterminale) non omologhi si rompono a livello dei centromeri e i bracci lunghi si ritrovano attaccati a un unico centromero. I bracci corti si uniscono a loro volta a formare il prodotto reciproco, che generalmente contiene geni non essenziali e viene abitualmente perduto entro poche divisioni cellulari.
5. Cromosomi ad anello, detti anche ring, sono originati dalla rottura di entrambi i bracci di un cromosoma, dalla perdita delle regioni distali alla rottura e dalla riunione delle due estremità in una struttura ad anello.<sup>8</sup>

### ***1.2.2 Il cariotipo***

L'analisi del cariotipo rappresenta la tecnica "storica" utilizzata per molti anni come indagine di prima linea nella diagnostica delle patologie dismorfogenetiche e delle ID considerate idiopatiche.

L'analisi del cariotipo è una rappresentazione ordinata del corredo cromosomico di un individuo.

Per la sua determinazione, le cellule vengono trattate con la colchicina, una sostanza che si lega ad una proteina dei microtubuli, la tubulina, e ne causa la depolimerizzazione. Ciò determina un effetto antimitotico sulla cellula che viene bloccata allo stadio di metafase per la mancata genesi del fuso mitotico. In metafase, i cromosomi si presentano come strutture ben definite, facilmente individuabili e riconoscibili al microscopio. A questo punto, si utilizzano sostanze che si fissano selettivamente a determinate zone, dando luogo ad un caratteristico aspetto a bande: bande Q, G o R secondo la tecnica di colorazione utilizzata.

Il bandeggio che ne deriva è specifico e costante per ogni coppia di cromosomi omologhi e riflette il diverso grado di condensazione della cromatina. Si distinguono due fasi:

- denaturazione e/o digestione enzimatica dei cromosomi.
- colorazione con coloranti specifici per il DNA che consente di individuare il braccio p (corto) e q (lungo) dei cromosomi, le regioni e subregioni, cioè le bande e sottobande che riflettono il diverso grado di condensazione dei cromosomi mitotici, con alternanza tra una serie di bande chiare e scure.

La fase seguente comprende l'osservazione al microscopio: i cromosomi vengono contati, analizzati e fotografati. Successivamente, attraverso programmi informatici, i cromosomi vengono selezionati e poi appaiati a due a due in base alle dimensioni, alla posizione del centromero e al bandeggio.

Le coppie quindi sono numerate in ordine decrescente di grandezza e i cromosomi sessuali sono indicati come X e Y. Si arriva così alla determinazione del cariotipo.

Sono state sviluppate tecniche che consentono la valutazione delle cellule in profase o prometafase (high-resolution analysis), aumentando quindi la risoluzione dell'esame a 3 Mb, contro quella di 5 Mb del cariotipo tradizionale.

Questa indagine permette di evidenziare eventuali anomalie cromosomiche, sia numeriche (aneuploidie), che strutturali (traslocazioni, delezioni ed inversioni).<sup>8,9</sup>

Figura 1 Cariotipo umano normale ([//it.wikipedia.org](http://it.wikipedia.org))



### 1.2.3 L'analisi array-CGH

Negli ultimi anni, l'analisi array-CGH ha rivoluzionato l'approccio diagnostico alle patologie dismorfogenetiche. Oggi, anche grazie ad un rapporto costo-beneficio accettabile, questa metodica viene utilizzata come indagine di prima linea nei pazienti con ritardo globale dello sviluppo (*Developmental Delay, DD*), ID, disturbi dello spettro autistico (*Autistic Spectrum Disorder, ASD*) e anomalie congenite multiple considerati idiopatici.<sup>8,10</sup> Tale tecnica non solo identifica anomalie cromosomiche di tipo numerico a carico dei 22 autosomi e dei cromosomi sessuali, ma consente anche un'accurata delineazione di segmenti cromosomici duplicati o deleti (*copy number variations, CNVs*).<sup>10</sup>

Questa metodica ha incrementato la soglia diagnostica del 15- 20% rispetto al cariotipo, la metodica più utilizzata precedentemente in caso di ID, che attualmente dovrebbe essere limitata ad individui con sindromi cromosomiche note (es. sindrome di Down) o con una storia familiare di riarrangiamenti cromosomici o di poliabortività.<sup>11</sup>

La tecnica si basa sulla comparazione quantitativa del DNA del paziente (DNA TEST, ottenuto da prelievo ematico) con un DNA di controllo (REFERENCE DNA), proveniente da un soggetto sano. I due DNA vengono marcati con molecole fluorescenti (verde per il REFERENCE DNA e rossa per il DNA TEST) e fatti incubare su un microarray, costituito da un supporto di vetro ricoperto da frammenti di DNA definiti sonde. Poiché ognuna di queste rappresenta una specifica regione del genoma umano, maggiore è il numero di sonde utilizzate e maggiore sarà l'efficacia della metodica.

Attualmente sono disponibili diverse tipologie di piattaforme array-CGH. Queste possono essere suddivise in due categorie principali, a seconda del tipo di sonde presenti sull'array: "BAC- arrays" e "oligo- arrays".

I BAC- arrays sono considerati arrays di vecchia generazione. Sono caratterizzati da sonde di tipo BAC (*Bacterial Artificial Chromosome*), che si ottengono per clonaggio di frammenti di genoma umano attraverso l'utilizzo di un vettore artificiale di DNA basato sul plasmide F, isolato da *E. coli*. Le sonde hanno dimensioni medie di circa 160.000 paia di basi e danno quindi una bassa specificità e una bassa risoluzione.

Gli oligo-arrays hanno invece un numero molto più elevato di sonde di piccole dimensioni (da 20 a 100 paia di basi), solitamente ottenute per sintesi; grazie alle dimensioni ridotte e alla maggior specificità delle sonde, rappresentano un notevole progresso tecnologico nell'analisi array-CGH.<sup>12</sup>

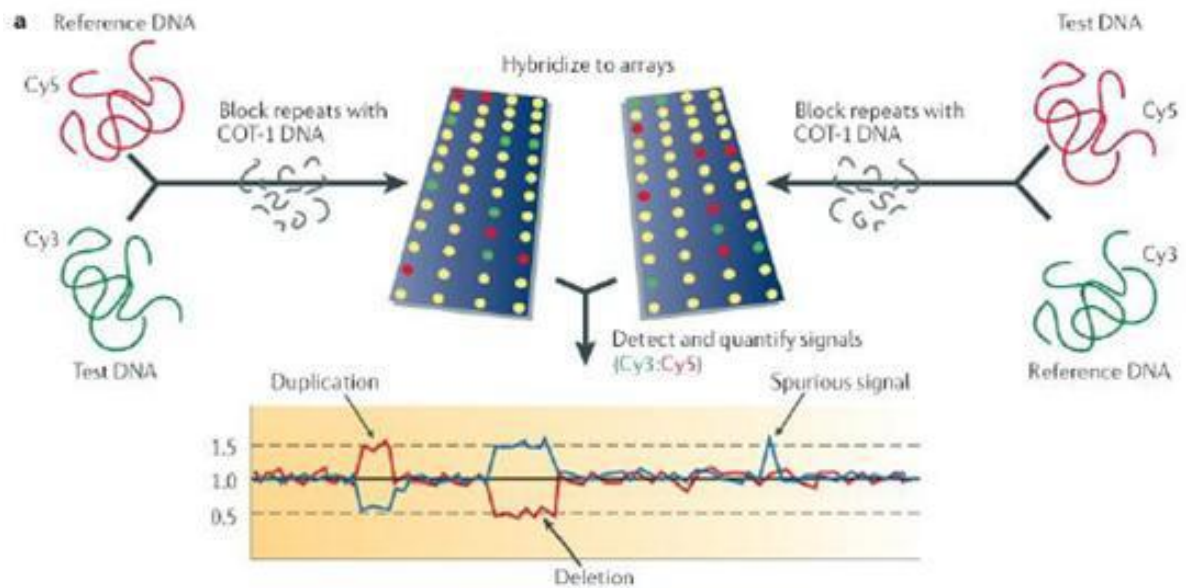
Al termine dell'incubazione, entrambi i tipi di DNA si saranno legati ai cloni presenti sull'array e si procederà quindi all'analisi del segnale fluorescente.

In caso di assetto cromosomico normale, il rapporto tra le due emissioni è bilanciato (1:1). Qualora vi siano nel DNA TEST delle delezioni (assenza di un cromosoma o parte di esso), il rapporto tra quest'ultimo ed il DNA di controllo sarà di 1:2 (monosomia completa o parziale). Nel caso di duplicazioni (presenza di un cromosoma soprannumerario o parte di esso) il rapporto tra il DNA TEST e quello di controllo sarà di 3:1 (trisomia completa o parziale).

A differenza delle tecniche tradizionali utilizzate per indagini mirate a livello di specifici loci cromosomici, l'array-CGH consente l'analisi dell'intero genoma umano, la localizzazione esatta della regione genomica alterata ed i geni in essa contenuti.<sup>11</sup>



Figura 2 Array- based comparative genomic hybridization (riferimento bibliografico n. 8)



Per quanto riguarda le CNVs, studi di popolazione suggeriscono che la maggior parte di esse non è ricorrente.

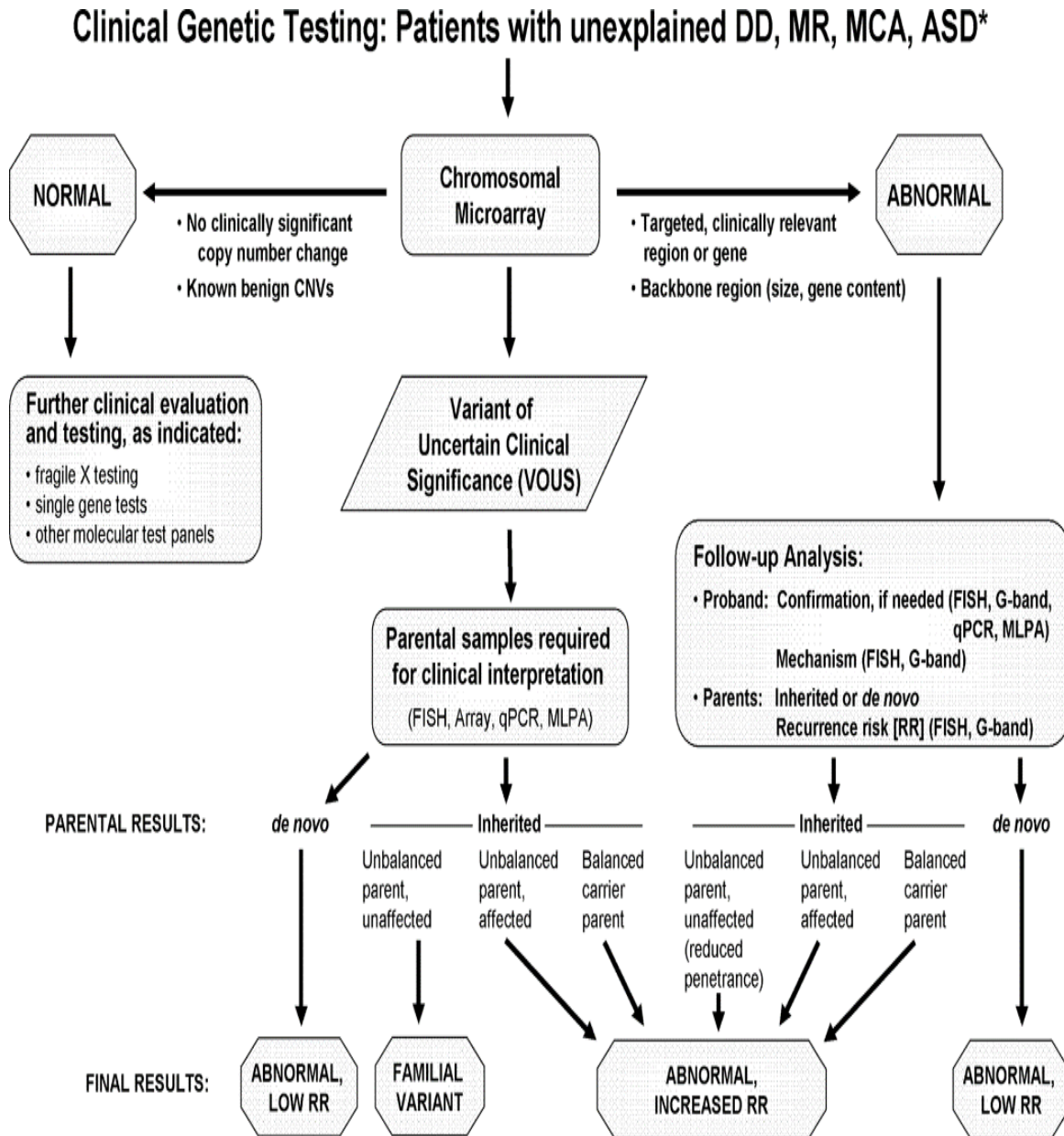
Esse si possono classificare in: <sup>13</sup>

- *Patologiche*, comprendenti anomalie associate a sindromi conosciute, varianti *de novo* o ereditate da un genitore con fenotipo simile, ampi microriarrangiamenti.
- *Probabilmente patologiche*, comprendenti anomalie che interessano geni o regioni genomiche la cui associazione con fenotipi clinici non è ancora stata chiaramente definita ma può essere supposta dai database.
- *Benigne*, comprendenti varianti polimorfiche riportate in molti individui sani in più di uno studio.
- *Probabilmente benigne*, comprendenti microduplicazioni o microdelezioni non precedentemente descritte ma ereditate da un genitore apparentemente sano. In questi casi occorrerebbe effettuare una valutazione cognitivo- comportamentale del genitore portatore dello sbilanciamento.
- *Varianti ad incerto significato clinico (VOUS)*, comprendenti alterazioni non descritte o con definizioni discordanti nei vari database.

La loro interpretazione, ad oggi, risulta difficoltosa in molti casi, ad esempio quando la variazione ritrovata non risulta presente nei database esistenti e la sua patogenicità resta sconosciuta (VOUS) oppure quando la CNV potenzialmente patologica risulta ereditata da un genitore apparentemente sano.<sup>14</sup> Questi dati vanno valutati con cautela, in quanto l'alterazione ritrovata nel genitore può contribuire al fenotipo del figlio attraverso meccanismi di penetranza incompleta, effetti epigenetici o in seguito alla formazione di mosaicismi.<sup>15</sup>

Si stima che circa il 12% del genoma sia coperto da CNVs.<sup>16</sup> Inoltre, la presenza di un numero inaspettatamente grande di varianti strutturali, di dimensioni intermedie (1Kb-3Mb), anche nel genoma di individui sani ha sottolineato che le CNVs costituiscono una grande fonte di variabilità fenotipica nell'uomo e quindi molto probabilmente contribuiscono in modo preponderante alla diversità umana.

Figura 3 Algoritmo per l'interpretazione dei microarray in pazienti con DD, ID, MCA e ASD idiopatici (riferimento bibliografico n. 18)



\* Excludes patients with recognizable syndrome (e.g., Down syndrome), family history of a chromosomal rearrangement or multiple miscarriages



ASD: Disturbo Spettro Autistico; DD: Ritardo globale di Sviluppo; MR: Ritardo Mentale; MCA: Anomalie Congenite Multiple; RR: rischio di ricorrenza in altri membri della famiglia

Quindi i vantaggi diagnostici legati all'utilizzo dell'analisi array-CGH sono rappresentati dalla possibilità di sequenziare l'intero genoma attraverso un unico esame, a differenza delle tecniche precedenti, e dall'individuazione delle CNVs, anche di dimensioni microscopiche. Questa tecnica presenta però anche dei punti deboli, quali la capacità di rilevare anomalie cromosomiche solo se non bilanciate. Questo perché le anomalie cromosomiche bilanciate come le traslocazioni reciproche, le inversioni, o i cromosomi ad anello, non influenzano le CNVs e quindi non determinano una alterazione del segnale fluorescente al momento dell'esame.<sup>17</sup>

Per quanto riguarda i mosaicismi, grazie all'utilizzo di array ad elevata risoluzione (*single nucleotide polymorphism array*, SNP array) si riesce, grazie alla maggior risoluzione della genotipizzazione ottenibile aumentando l'intensità delle sonde, a rilevare livelli inferiori circa al 5%. In questi casi le performance del cariotipo e dell'array risultano comparabili, poiché il cariotipo può comunque perdere molti mosaicismi, sia perché le varianti potrebbero non essere presenti nella popolazione linfocitaria analizzata, sia perché i linfociti portatori della mutazione potrebbero non riprodursi in vitro.<sup>18</sup>

I vantaggi del SNP array includono una maggior flessibilità nella selezione delle sonde e la possibilità di evidenziare aree di omozigosità, per esempio in caso di disomie uniparentali, cioè quando entrambi i cromosomi omologhi derivano da un unico genitore, o in casi di consanguineità non sospettati sulla base dell'anamnesi. Tale metodica è gravata però dalla presenza di un rapporto "segnale-rumore" sfavorevole rispetto alle metodiche che utilizzano sonde oligonucleotidiche più lunghe.<sup>18</sup>

#### ***1.2.4 Next generation sequencing***

Per quanto riguarda il futuro della diagnostica, esso è verosimilmente legato alla next generation sequencing (NGS) che, a differenza delle tecniche tradizionali, consente di sequenziare moltissimi frammenti di DNA in parallelo. Con la NGS è possibile effettuare un'indagine genetica senza dover necessariamente ipotizzare un gene responsabile a priori.

Esistono diversi sistemi NGS:

- Whole genome sequencing (WGS), che permette il sequenziamento dell'intero genoma.

- Whole exome sequencing (WES), che permette il sequenziamento dell'esoma, cioè la porzione di genoma costituita da esoni. Essi rappresentano le strutture codificanti del nostro DNA.
- Targeted sequencing (TS), che può essere focalizzato o esteso a molti geni.<sup>19</sup>

Tutti questi sistemi, condividono almeno tre passi fondamentali: la preparazione e immobilizzazione del DNA (cioè la preparazione della cosiddetta *sequencing library*), la reazione di amplificazione e la reazione di sequenziamento.

Il sistema più utilizzato rimane, ad oggi, il TS o sequenziamento di pannelli di geni; al momento attuale esistono pannelli includenti geni afferenti allo stesso tipo di patologia, ad esempio per encefalopatie epilettiche, ID/ASD, malformazioni corticali, leucopatie, malattie mitocondriali, malattie neuromuscolari. Questi pannelli consentono di analizzare contestualmente più geni possibili cause di quadri patologici, restringendo il campo delle possibili varianti riscontrabili e riducendo le difficoltà di interpretazione.

Il punto di forza di questa metodica è sicuramente rappresentato dalla elevata sensibilità nell'individuazione di alterazioni genetiche; per contro, al momento attuale, rileviamo ancora numerose debolezze, quali il costo molto elevato, la complessità nella preparazione delle sonde e sicuramente la mancanza di infrastrutture adeguate all'analisi della massiva mole di dati ricavati attraverso la NGS.<sup>20</sup>

Per questo motivo, tale metodica è al momento prevalentemente utilizzata con finalità di ricerca.

Un ulteriore svantaggio dipende dal fatto che non sempre questo tipo di analisi riesce ad assicurare il sequenziamento totale dei singoli geni. Ad esempio in caso di regioni ricche in G/C (guanina/ citosina), di ampie delezioni e duplicazioni, di ampie sequenze ripetute, è consigliabile associare la NGS ad una metodica quale l'array-CGH.

Inoltre, risulta indispensabile affrontare anche gli aspetti etici della questione, inerenti principalmente alle tecniche WGS e WES. Infatti, tra i dati potrebbero essere presenti informazioni genetiche sensibili, non previste e non richieste. Queste riguardano varianti predittive di malattie che non si sono ancora manifestate clinicamente o varianti di suscettibilità allo sviluppo di neoplasie. Quest'ultimo aspetto è rilevabile anche attraverso la metodica array-CGH, sebbene l'interpretazione delle alterazioni ritrovate possa spesso risultare difficoltosa. E' dibattuto, pertanto, se sia lecito informare il paziente qualora l'alterazione riscontrata non sia correlata allo scopo principale del test per cui il soggetto ha prestato il proprio consenso. Ancora più complesso è il caso in cui venga rilevata in modo

accidentale una mutazione di cui non si conosce l'effetto, né immediato né futuro. E' necessario quindi, attraverso il consenso informato, lasciare che sia il paziente a decidere quali informazioni vuole ricavare dall'esame.<sup>21</sup>

## ***Capitolo 2***

### ***Sindromi dismorfogenetiche più frequenti in neuropsichiatria infantile***

Di seguito saranno descritte le sindromi più frequenti in assoluto, diagnosticate per la maggior parte attraverso l'analisi del cariotipo e le analisi molecolari; dopodichè, anche in relazione allo studio eseguito sul *database array IRCCS Fondazione Stella Maris* nel quinquennio 2010-2015, saranno approfondite maggiormente quelle identificabili attraverso la metodica array-CGH.

#### ***2.1 La sindrome di Down***

La sindrome di Down, detta anche trisomia 21, è la più comune anomalia cromosomica nell'uomo. Essa è solitamente associata a un deficit sul piano cognitivo e caratterizzata dalla presenza di anomalie congenite multiple.

Il fattore che maggiormente influenza l'incidenza della sindrome di Down è l'età materna. Infatti, oltre i 35 anni di età la probabilità di concepire un figlio affetto da tale condizione aumenta considerevolmente. Tuttavia solo circa 1 caso su cinque ha una madre di età superiore ai 35 anni.

Secondo l'organizzazione mondiale della sanità, l'incidenza della sindrome è di circa 1 su 700 nati vivi. Se tuttavia si dovessero prendere in considerazione i concepimenti con trisomia 21, questi dati sarebbero molto più elevati poiché circa il 75% di queste gravidanze si concludono con un aborto o con la nascita di un feto privo di vita.

Dal punto di vista genetico, ci sono tre situazioni principali che possono dare origine a questa sindrome:

- Trisomia 21 (94% dei casi), causata da una non- disgiunzione durante la prima o la seconda divisione meiotica.
- Traslocazione Robertsoniana in uno dei genitori (4% dei casi), generalmente si assiste ad una traslocazione 14;21. In questi soggetti esiste un'alta probabilità che si crei un gamete con cromosoma 21 sovrannumerario.
- Mosaicismo (2% dei casi), è un evento postzigotico e la condizione è presente in un numero variabile di cellule.

Gli individui con la sindrome possono avere alcune o tutte le seguenti caratteristiche fisiche: microgenia (mento piccolo), fessure degli occhi oblique con pieghe della pelle all'angolo interno degli occhi (epicanto), ipotonia muscolare, ponte nasale piatto, un'unica piega palmare, macroglossia, viso piatto e largo, collo corto, macchie bianche su occhio e iride (macchie di Brushfield), eccessiva lassità articolare, spazio eccessivo tra alluce e il secondo dito, e dita corte.

I parametri di crescita, come altezza, peso e circonferenza cranica risultano inferiori nei bambini affetti rispetto ai loro coetanei.

La maggior parte delle persone con sindrome di Down presenta una disabilità intellettiva che va da lieve a moderata. Comunemente questi individui hanno una buona comprensione del linguaggio, ma mostrano un ritardo nell'esprimersi verbalmente. Anche le abilità motorie mostrano dei ritardi e questo può interferire sullo sviluppo cognitivo del bambino.

La metodica che attualmente si utilizza per la diagnosi è il cariotipo, che può essere effettuato anche a livello prenatale.<sup>22</sup>

## ***2.2 La sindrome di Noonan***

La Sindrome di Noonan (SN) è caratterizzata da bassa statura, dismorfismi facciali tipici e difetti cardiaci congeniti.

L'incidenza della SN è stimata tra 1/1.000 e 1/2.500 nati vivi.

La sindrome si trasmette come carattere autosomico dominante. Nel 50% circa dei casi, la malattia è causata dalle mutazioni missenso nel gene PTPN11 (12q24.1). Recentemente, mutazioni in altri geni della via metabolica di RAS-MAPK (KRAS, SOS1, NRAS e RAF1) sono stati identificati in una piccola percentuale di pazienti con SN. L'analisi delle mutazioni può essere effettuata sui campioni di sangue e dovrebbe essere raccomandata ai soggetti con sospetto diagnostico di SN. Ad ogni modo, la diagnosi non può essere esclusa sulla base del test molecolare, in quanto la sensibilità dello screening combinato di tutti i geni noti permette la conferma in meno del 75% dei pazienti.

I principali segni facciali della SN sono l'ipertelorismo con rime palpebrali rivolte verso il basso, ptosi e orecchie a basso impianto retrorotate con elice ispessito. I difetti cardiaci più comunemente associati con questa condizione sono la stenosi polmonare e la cardiomiopatia ipertrofica. Altri segni associati sono collo corto, deformità della gabbia toracica, ritardo



mentale lieve, criptorchidismo, difficoltà di alimentazione durante l'infanzia, tendenza al sanguinamento e displasia linfatica.

La diagnosi viene in genere effettuata attraverso l'utilizzo di tecniche molecolari (ad es PCR), volte ad identificare la presenza della mutazione.

Con cure e consulenze specialistiche, la maggior parte dei bambini con SN ha crescita e funzioni normali nell'età adulta. Segni e sintomi si attenuano con l'età e molti adulti con SN non richiedono cure mediche specialistiche.<sup>23,24</sup>

### ***2.3 La sindrome di Angelman***

La sindrome di Angelman (AS) è una malattia neurologica, di origine genetica, caratterizzata da grave disabilità intellettiva e dismorfismi facciali caratteristici.

La sua prevalenza è stimata tra 1/10.000 e 1/20.000.

La AS è causata da diversi meccanismi genetici, come la delezione nella regione critica 15q11.2-q13 (60-75% dei casi), la disomia uniparentale paterna (2-5%), un difetto dell'imprinting (2-5%) e la mutazione del gene UBE3A (10%). Nel 5-26% dei pazienti non è stato identificato il difetto genetico.

I pazienti appaiono normali alla nascita. Nei primi 6 mesi di vita possono manifestarsi disturbi dell'alimentazione e ipotonia, seguiti da ritardo dello sviluppo tra i 6 mesi e i 2 anni.

In genere i sintomi caratteristici della AS si manifestano a partire dal primo anno di vita, con grave ID, assenza del linguaggio, crisi di riso associate a movimenti stereotipati delle mani. Sono spesso presenti microcefalia, macrostomia, ipoplasia mascellare, prognatismo e disturbi neurologici con andatura da 'burattino', atassia e attacchi epilettici. Altri segni clinici comprendono l'iperattività senza aggressività, il basso livello di attenzione, l'eccitabilità, i disturbi del sonno associati ad una riduzione della necessità di dormire. Sono spesso presenti tratti autistici.

Con l'avanzare dell'età, i segni tipici della malattia diventano meno accentuati e si caratterizzano per l'aspetto grossolano del viso, la scoliosi a livello delle vertebre toraciche e i disturbi del movimento. E' comune l'iperpigmentazione dell'iride e della coroide.<sup>25,26</sup>

## ***2.4 La sindrome di Prader-Willi***

La sindrome di Prader-Willi è una malattia genetica rara, caratterizzata da anomalie ipotalamo-ipofisarie, che esita nel rischio di obesità patologica durante l'infanzia e nell'età adulta. Risulta spesso associata a disabilità intellettiva, difficoltà di apprendimento e a disturbi comportamentali o problemi psichiatrici.

La malattia colpisce circa 1/25.000 nati.

Questa patologia è eterogenea sia dal punto di vista clinico che da quello genetico. E' causata da diversi meccanismi genetici, come la delezione nella regione critica 15q11.2-q13 (75-80% dei casi), la disomia uniparentale materna (2-5%), un difetto dell'imprinting (2-5%). Questi meccanismi risultano molto simili a quelli causanti la AS, ma in questo caso viene a mancare il contributo genetico paterno; nella Angelman, invece, è la componente materna a venir meno.

Dal punto di vista clinico, è associata a grave ipotonia nel periodo neonatale e nei primi due anni di vita e alla insorgenza di iperfagia; l'ipotonia grave alla nascita comporta problemi alla deglutizione e all'allattamento e un ritardo dello sviluppo psicomotorio, ma tende ad attenuarsi parzialmente con l'età. Sono stati spesso segnalati aspetti fenotipici peculiari (fronte stretta, occhi a mandorla, labbro superiore sottile e bocca rivolta verso il basso) e mani e piedi molto piccoli (mani <25° centile e piedi <10° centile).

Dopo questa fase iniziale, i segni principali sono l'iperfagia e la mancanza di sazietà che causa spesso, a partire circa dall'età di due anni, obesità grave. In assenza di controlli esterni adeguati, la condizione può peggiorare rapidamente. L'obesità è la causa più importante di morbilità e mortalità di questi pazienti.

Altre anomalie endocrine correlate, quali l'ipogonadismo, contribuiscono a un quadro clinico caratterizzato da bassa statura, deficit dell'ormone della crescita, e sviluppo puberale incompleto.

Il deficit cognitivo è estremamente variabile e si associa a difficoltà di apprendimento e a uno sviluppo anomalo del linguaggio, spesso aggravati da disturbi comportamentali e psicologici. Caratteristiche comportamentali tipiche sono eccessi di collera, violenti scatti d'ira e comportamento ossessivo-compulsivo.

La diagnosi precoce, la terapia multidisciplinare precoce e la terapia con l'ormone della crescita (GH) hanno migliorato sensibilmente la qualità della vita di questi bambini. <sup>23, 24</sup>

## ***2.5 La sindrome di Rett***

La sindrome di Rett è una grave malattia neurologica, che colpisce nella maggior parte dei casi soggetti di sesso femminile ed è una delle cause più comuni di deficit cognitivo grave nelle ragazze.

La malattia è congenita, anche se non subito evidente, e si manifesta in genere durante il secondo anno di vita e comunque entro i primi quattro anni.

Colpisce circa una persona su 10.000.

Nella maggior parte dei casi, la sindrome di Rett è causata da mutazioni nel gene MECP2, localizzato sulla parte distale del cromosoma X (precisamente nella zona Xq28), deputato alla produzione di una proteina omonima. In meno del 10% dei casi, la sindrome è causata da mutazioni nei geni CDKL5 o Foxg1. La Sindrome di Rett viene inizialmente diagnosticata mediante osservazione clinica, ma la diagnosi è definitiva solo quando si individua un difetto in uno dei suddetti geni.

Dato che la maggior parte delle mutazioni patogeniche di MECP2 nei pazienti affetti da Rett sono de novo, il rischio di ricorrenza è basso, anche se sono stati descritti casi di mosaicismo germinale.

Dopo una fase iniziale di sviluppo normale, si assiste a un arresto dello sviluppo e poi a una regressione, o perdita delle capacità acquisite. Si osserva un rallentamento dello sviluppo del cranio (di grandezza normale alla nascita) rispetto al resto del corpo tra i primi 5 e i 48 mesi di vita; uno sviluppo psicomotorio normale entro i primi 5 mesi di vita, con successiva perdita delle capacità manuali precedentemente sviluppate e comparsa di movimenti stereotipati delle mani. Si possono osservare gravi ritardi nell'acquisizione del linguaggio; spesso la sindrome è associata a ritardo mentale grave o profondo. La perdita delle capacità di prestazione è generalmente persistente e progressiva.

Possono essere anche presenti: irregolarità nella respirazione; anomalie dell'EEG; epilessia (oltre il 50% delle persone affette ha avuto almeno una crisi epilettica); aumento della rigidità muscolare con l'età, che può anche provocare deformità e atrofie muscolari; deambulazione a base allargata (in circa il 50% dei soggetti); scoliosi; ritardo della crescita.<sup>27</sup>

## ***2.6 La sindrome dell'X fragile***

La sindrome dell'X fragile (FXS) è una malattia genetica rara caratterizzata da ritardo mentale lieve-grave, che può associarsi a disturbi comportamentali e segni fisici tipici.

La prevalenza è compresa tra 1/2.500 e 1/4.000 nei due sessi.

La FXS è dominante legata all'X con penetranza ridotta nelle femmine.

La FXS è dovuta al silenziamento trascrizionale del gene FMR1 (Xp27.3), da espansione progressiva e conseguente metilazione delle ripetizioni trinucleotidiche polimeriche (CGG) all'interno della regione non tradotta al 5' del gene. In rari casi, la FXS è dovuta a mutazioni puntiformi di FMR1 piuttosto che all'espansione delle ripetizioni CGG. Il gene FMR1 codifica per la proteina FMRP e quella legante l'RNA, che regola la sintesi proteica e altri pathway di segnalazione nei dendriti neuronali. Il silenziamento del gene FMR1 riduce la plasticità e la modulazione sinaptica da una parte all'altra del cervello, compreso l'ippocampo.

Il quadro clinico è variabile. Nei maschi esordisce nell'infanzia con ritardo dello sviluppo motorio e/o del linguaggio. Nei maschi e nel 50% delle femmine sono presenti deficit cognitivi con disturbi del comportamento e/o dismorfismi.

Il deficit cognitivo varia da lievi disturbi dell'apprendimento, con QI normale, a ritardo mentale grave, e si associa a disturbi della memoria a breve termine e di lavoro, delle funzioni esecutive e delle abilità visuospatiali e matematiche. I disturbi del comportamento sono lievi (instabilità dell'umore) o gravi (autismo o tratti autistici). Sono presenti disturbi dell'umore, d'ansia e comportamento aggressivo. Nelle femmine i disturbi cognitivi e del comportamento sono lievi e di solito consistono in disturbi emotivi e dell'apprendimento.

In entrambi i sessi i segni fisici sono sfumati: faccia stretta e allungata, orecchie e fronte prominenti, iperestensibilità delle articolazioni delle dita, piedi piatti e macroorchidismo nei maschi in età postpuberale.

La diagnosi non si basa sul quadro clinico, in quanto i segni fisici possono essere lievi o assenti. Si basa sui test genetici eseguiti su tutti i pazienti con ritardo mentale o autismo.<sup>23</sup>

## ***2.7 La sindrome di Klinefelter***

La sindrome di Klinefelter (SK) definisce un gruppo di anomalie cromosomiche in cui vi è almeno un extra cromosoma X rispetto al cariotipo maschile normale (46,XY).

L'aneuploidia 47,XXY è l'anomalia dei cromosomi sessuali più frequente, con una prevalenza di 1 su 500 maschi.

L'esame del cariotipo standard è necessario per confermare la diagnosi.

Gli effetti sulle caratteristiche fisiche e sullo sviluppo fisico e cognitivo aumentano con il numero degli X in soprannumero, ognuno dei quali si associa a una riduzione media del quoziente intellettivo (QI) di 15-16 punti, con un maggiore interessamento del linguaggio, in particolare di quello espressivo.

Nell'infanzia, il cariotipo 47,XXY può essere diagnosticato nel corso della valutazione di una ipospadia, di un pene ipoplasico, di un criptorchidismo o di un ritardo psicomotorio. I bambini in età scolare possono presentare ritardo del linguaggio, difficoltà di apprendimento o disturbi comportamentali. I bambini più grandi o gli adolescenti possono essere diagnosticati nel corso di una valutazione endocrinologica per un ritardo dello sviluppo puberale o per uno sviluppo incompleto, con habitus eunucoide, ginecomastia e ipoplasia dei testicoli. Gli adulti spesso vengono valutati per infertilità o per tumori maligni del seno. La terapia sostitutiva con androgeni può essere instaurata alla pubertà (intorno ai 12 anni).<sup>24</sup>

## ***2.8 La sindrome di Turner***

La sindrome di Turner è una malattia cromosomica associata alla delezione parziale o alla monosomia del cromosoma X.

L'incidenza della sindrome è di 1 su 2000/ 2500 femmine nate. Si stima però che il 99% di tutti gli embrioni affetti muoia prima della nascita.

La monosomia del cromosoma X (X0) è conseguente ad una non disgiunzione meiotica dei cromosomi sessuali, ma questa anomalia risulta responsabile in meno della metà dei casi di sindrome di Turner e molti di essi sono dovuti alla presenza di un mosaicismo (con una linea 45,X), oppure di un cromosoma X o Y anomalo (delezione, isocromosoma X, cromosoma dicentrico).

I segni e i sintomi variano tra le persone colpite; i più comuni sono un collo corto e con pterigio, attaccatura delle orecchie bassa, bassa attaccatura dei capelli nella parte posteriore del collo, bassa statura e mani e piedi gonfi, sono visti fin alla nascita. In genere le donne con la sindrome non hanno il ciclo mestruale (insufficienza ovarica), non sviluppano le mammelle e non sono in grado di avere figli.

La maggior parte delle persone affette dalla condizione hanno un quoziente di intelligenza normale; molti, tuttavia, presentano deficit per la visualizzazione spaziale, necessaria per l'applicazione della matematica.

Sono meno comuni gli altri segni clinici a carico di visceri diversi (anomalie scheletriche, linfedema, sordità, coinvolgimento cardiovascolare, tiroideo e gastrointestinale), la cui presenza deve essere verificata durante l'adolescenza e nell'età adulta.

La diagnosi viene in genere effettuata attraverso il cariotipo.<sup>23,24</sup>

## ***2.9 La sindrome da delezione del cromosoma 1p36***

La sindrome da delezione 1p36 è un'anomalia cromosomica con dismorfismi facciali caratteristici, ipotonia, ritardo dello sviluppo, deficit cognitivo, convulsioni, cardiopatie, sordità e ritardo della crescita a esordio prenatale.

È considerata una delle più comuni sindromi da delezione cromosomica, con un'incidenza di circa 1/5.000-10.000 nati vivi. Colpisce in uguale misura entrambi i sessi, in tutte le etnie.

È causata da una delezione a livello della parte distale del braccio corto del cromosoma 1, con punti di rottura tra 1p36.13 e 1p36.33. Circa il 50% dei casi è dovuto ad una delezione *de novo* 1p36 terminale, circa il 29% ad una delezione interstiziale; gli altri casi riguardano riarrangiamenti cromosomici più complessi.

I pazienti condividono un fenotipo craniofaciale caratteristico con sopracciglia diritte, occhi infossati, ponte/sella nasale larga e piatta, ipoplasia mediofaciale, filtro lungo, mento appuntito e, spesso, fontanella anteriore ampia con chiusura tardiva (maggiore di 3 cm alla nascita), microbrachicefalia, orecchie anomale, ruotate posteriormente, a basso impianto.

Sono anche caratteristici la brachidattilia, la camptodattilia e i piedi corti.

Quasi tutti i pazienti presentano ipotonia congenita, che concorre alle difficoltà nell'alimentazione, nel ritardo dello sviluppo motorio e della motricità fine, nel ritardo o

nell'assenza del linguaggio. In tutti i pazienti è presente disabilità intellettiva di grado variabile.

Altri segni comprendono ritardo della crescita a esordio prenatale, anomalie strutturali dell'encefalo, convulsioni, cardiopatie congenite, disturbi oculari/della vista, sordità (neurosensoriale o di conduzione), anomalie scheletriche, anomalie dei genitali esterni.

La diagnosi si basa sul quadro clinico ed è confermata dall'analisi cromosomica. Le tecniche molecolari sono utilizzate per caratterizzare la delezione (FISH, CGH-array).

La sindrome da delezione 1p36 dimostra una notevole variabilità interindividuale. Le convulsioni e gli altri problemi medici sembrano migliorare con il tempo. I pazienti dipendono dalle altre persone per la maggior parte delle attività della vita quotidiana e richiedono un supporto medico per tutta la vita.<sup>23, 28</sup>

## ***2.10 La sindrome da microdelezione/ microduplicazione 1q21.1***

Le sindromi da microdelezione e microduplicazione del cromosoma 1q21.1 sono patologie genetiche riconosciute recentemente.

Esse sono caratterizzate da ritardi nello sviluppo, caratteristiche dismorfiche e malformazioni congenite.

In molti casi analizzati in letteratura (circa il 50%), lo sbilanciamento era stato ereditato da uno dei due genitori che aveva avuto un normale sviluppo cognitivo. Quindi il reperto che alcuni portatori della microdelezione 1q21.1 non presentano un fenotipo patologico, implica la presenza di penetranza incompleta o di fattori modificatori che possono agire su questo locus.<sup>29</sup>

Il fenotipo dei pazienti con microdelezione o microduplicazione è estremamente variabile ed include disabilità intellettiva di grado lieve-moderato, dismorfismi, micro- o macrocefalia, disturbi dello spettro autistico, anomalie cardiache congenite, epilessia, cataratta, lassità dei legamenti, ipotonia.

Le caratteristiche fondamentali della sindrome da microdelezione sono rappresentate da ritardo globale di sviluppo, microcefalia, dismorfismi soprattutto a livello del volto, cataratta e cardiopatie congenite (che rappresentano spesso la ragione principale per cui si ricorre all'analisi array CGH).

I pazienti con sindrome da microduplicazione, invece, presentano più spesso ID, ASD, macrocefalia e caratteristiche dismorfiche.

Comunque, negli individui portatori di questi sbilanciamenti sono stati documentati una notevole variabilità clinica interindividuale e, in alcuni casi, la mancanza dei dismorfismi caratteristici.

E' indicata l'analisi della regione 1q21.1 in pazienti con forme isolate di cardiopatia congenita (inclusa la stenosi della valvola polmonare) e storia familiare di disabilità intellettiva, cardiopatie e/o dismorfismi.<sup>29</sup>

## ***2.11 La sindrome da delezione del cromosoma 2q37***

La delezione 2q37 o monosomia 2q37 è un'anomalia cromosomica che comporta la delezione della banda cromosomica 2q37 e si manifesta con tre sintomi principali: ritardo dello sviluppo, malformazioni scheletriche e dimorfismi facciali.

L'incidenza è stimata in meno di 1/ 10.000.

La banda 2q37 contiene tre sottobande con più di 80 geni nella regione 2q37.1-q37.3. Sono state identificate poche correlazioni genotipo-fenotipo e possibili geni candidati per la brachimesofalanga, l'obesità e lo spettro autistico. La monosomia può essere pura o associarsi ad altri sbilanciamenti cromosomici.

La maggior parte dei pazienti presenta un quadro clinico associato a ritardo dello sviluppo o deficit cognitivo, bassa statura (23% dei casi), tendenza all'obesità con l'avanzare dell'età e brachimesofalanga (50%), cioè la presenza di una falange intermedia più breve. Sono anche frequenti la clinodattilia del quinto dito e le mani e i piedi piccoli, la sindattilia delle dita delle mani e dei piedi, la persistenza dei cuscinetti adiposi fetali sui polpastrelli, la piega palmare unica, la microcefalia o la macrocefalia.

I dismorfismi facciali sono caratteristici e comprendono il viso arrotondato, i capelli radi, la fronte prominente, le rime palpebrali oblique verso l'alto, gli occhi infossati, le sopracciglia rade e arcuate, l'ipoplasia della porzione media del viso, la radice nasale infossata, le anomalie delle pinne nasali, la columella prominente, l'aspetto a V della punta del naso, l'assottigliamento delle labbra e il palato ogivale.

Malformazioni diverse sono presenti nel 30% dei pazienti, in particolare cardiopatie, difetti gastrointestinali (30%), urogenitali (11%) e del sistema nervoso centrale (6%). È spesso



presente ipotonia. Sono state riportate convulsioni in circa il 35% dei pazienti e anomalie del comportamento in circa il 30%.

La diagnosi si basa sulle analisi citogenetiche e sulla caratterizzazione molecolare.<sup>23,24</sup>

## ***2.12 La sindrome da delezione 3q29***

La sindrome da microdelezione 3q29 è una malattia da delezione subtelomerica ricorrente, associata a un quadro clinico variabile, che comprende deficit cognitivo e dismorfismi.

È stata descritta in 23 pazienti.

La sindrome è dovuta alla delezione ricorrente della regione subtelomerica 3q. La microdelezione è in genere di 1,6 Mb e interessa più di 20 geni; è probabile che il meccanismo che la determina sia una ricombinazione omologa non allelica. La maggior parte delle delezioni origina *de novo*, ma in alcuni casi sono ereditate da genitori lievemente sintomatici o non affetti.

Il fenotipo è estremamente variabile. I segni clinici più comuni sono il deficit cognitivo lieve-moderato e la facies lievemente dismorfica con microcefalia, viso allungato e stretto, filtro corto, orecchie grandi ruotate posteriormente e sella nasale prominente. Occasionalmente sono stati osservati autismo e andatura atassica.

I difetti congeniti non sono comuni: sono stati descritti raramente il rene a ferro di cavallo, l'ipospadia e le cardiopatie congenite (dotto arterioso pervio).

Viene identificata mediante analisi array-CGH o ibridazione in situ a fluorescenza (Fluorescent In Situ Hybridization, FISH).<sup>23,24</sup>

## ***2.13 La sindrome di Wolf-Hirschhorn***

La sindrome di Wolf-Hirschhorn (WHS) è una malattia dello sviluppo caratterizzata da un fenotipo craniofaciale caratteristico, ritardo della crescita prenatale e postnatale, deficit cognitivo, grave ritardo dello sviluppo psicomotorio, convulsioni e ipotonia.

La prevalenza è di 1:50.000 nati. Interessa più spesso le femmine rispetto ai maschi (2:1).

La WHS è dovuta a una delezione del braccio corto del cromosoma 4 (regione 4p16.3). Le delezioni superiori a 3 Mb sembrano associarsi a un rischio più elevato di cardiopatie e

palatoschisi. La maggior parte dei casi è sporadica, anche se una traslocazione sbilanciata può di rado essere ereditata da un genitore portatore di un riarrangiamento bilanciato.

Dal punto di vista clinico, si osserva un fenotipo facciale caratteristico, definito ad "elmo da guerriero greco" (radice del naso larga che continua sulla fronte) molto più evidente prima della pubertà, microcefalia, fronte alta con glabella prominente, ipertelorismo, epicanto, sopracciglia molto arcuate, filtro corto, bocca rivolta verso il basso, micrognatia, orecchie poco formate con fossette/appendici e, in alcuni casi, labiopalatoschisi.

Sono presenti anomalie scheletriche, come la cifosi o scoliosi con malformazione dei corpi vertebrali, coste fuse o accessorie, piedi torti e schisi delle mani. È presente ipotonia con ipoplasia delle masse muscolari, che può associarsi a difficoltà alimentari e contribuire al ritardo della crescita.

Il ritardo dello sviluppo è grave: molti pazienti non imparano a controllare gli sfinteri, a mangiare e vestirsi autonomamente, e meno del 50% cammina, con o senza sostegni, tra i 2 e i 12 anni di età. Il deficit cognitivo è moderato-grave, di rado lieve. Il linguaggio si limita a suoni gutturali o bisillabici e, in alcuni casi, a semplici frasi.

In oltre il 95% dei pazienti si osservano convulsioni ad esordio tra il periodo neonatale e i 36 mesi, spesso scatenate dalla febbre. Nella metà dei pazienti può determinarsi uno stato epilettico vero e proprio. Oltre il 30% dei bambini sviluppa assenze atipiche all'età di 1-6 anni. In circa il 50%, le convulsioni si interrompono nell'infanzia. Sono spesso presenti difetti del sistema nervoso centrale (assottigliamento del corpo calloso).

Nel 50% dei casi, si osservano cardiopatie, in particolare il difetto del setto interatriale. Sono descritte spesso alterazioni dell'udito, degli occhi e dei denti. Possono presentarsi infezioni ricorrenti delle vie respiratorie ed otite media da deficit di anticorpi di tipo IgG. Sono state descritte malformazioni delle vie urinarie e la metà dei pazienti maschi presenta ipospadia e criptorchidismo.

La diagnosi si basa sull'esame clinico ed è confermata dalle analisi molecolari o citogenetiche.<sup>24, 30</sup>

## ***2.14 La sindrome di Williams***

La sindrome di Williams è una malattia genetica rara caratterizzata da disturbi dello sviluppo, associati, nel 75% dei casi, a cardiopatie (di solito stenosi sopraaortale dell'aorta,

SSA), ritardo psicomotorio, dismorfismi facciali caratteristici e profilo cognitivo e comportamentale specifico.

L'incidenza delle forme tipiche è 1/20.000 alla nascita; esistono forme parziali, ma la loro incidenza non è nota.

La sindrome di Williams è dovuta a una microdelezione cromosomica della regione 7q11.23.

Questi bambini presentano una facies caratteristica con setto nasale appiattito e punta del naso globosa, bocca larga, con labbro inferiore anteverso, guance prominenti, edema periorbitale, epicanto e, spesso, iride 'a stella'.

Con l'età, il viso diventa più stretto e assume lineamenti grossolani.

Il profilo cognitivo è caratterizzato da deficit visuo-spaziale, che contrasta con le buone capacità di linguaggio. I bambini affetti presentano un livello di interazione sociale molto spiccato e si rapportano bene con le altre persone.

Dal punto di vista oftalmologico, il 40% di questi bambini presenta strabismo e/o difetti di rifrazione. Si possono osservare già alla nascita malformazioni vascolari come la SSA e la stenosi dell'arteria renale, che può causare ipertensione arteriosa reno-vascolare. L'ipercalcemia può evolvere in nefrocalcinosi.<sup>23,24</sup>

## ***2.15 La sindrome da inversione/ duplicazione del cromosoma 8***

La sindrome da inversione/duplicazione del cromosoma 8 è una anomalia cromosomica rara caratterizzata da deficit cognitivo lieve-grave, grave ritardo dello sviluppo (psicomotorio e del linguaggio), ipotonia con tendenza allo sviluppo di un'ipertonia progressiva e gravi problemi ortopedici che insorgono con il tempo, lievi anomalie facciali e agenesia del corpo calloso.

Sono stati descritti circa 50 casi. La prevalenza stimata è tra 1/22.000 e 1/30.000 nati.

In genere è presente una duplicazione invertita associata ad una delezione terminale del braccio corto del cromosoma 8. L'impatto della delezione 8p sul quadro clinico sembra essere meno significativo rispetto a quello della duplicazione invertita 8p. Tutti i casi di invdupdel(8p) noti sono originati *de novo*.

I segni clinici più comuni comprendono il ritardo dello sviluppo, il deficit cognitivo lieve-grave, l'assenza o il ritardo del linguaggio espressivo e l'ipotonia, che concorrono al grave ritardo psicomotorio. È stato segnalato che la maggior parte dei bambini affetti da invdupdel(8p) ha una natura gioviale, socievole e comunicativa, nonostante non riesca ad esprimersi verbalmente. Tuttavia, alcuni possono presentare deficit dell'attenzione, impulsività e iperattività. Il 30-50% dei pazienti affetti presenta autismo di grado estremamente variabile.

I dismorfismi facciali, più evidenti nell'infanzia, sono sfumati e spesso comprendono fronte prominente, calvizie temporale, narici anteverse, labbro inferiore anteverso, bocca e orecchie grandi, collo corto.

Le cardiopatie, le anomalie oculari e dell'apparato urinario, la pubertà precoce, il palato ogivale, le anomalie dei denti e degli arti e la dislocazione dell'anca sono stati segnalati in alcuni pazienti.

La diagnosi si basa sui segni clinici e sull'agenesia del corpo calloso, identificata con la risonanza magnetica, che suggeriscono l'analisi cromosomica. Per la caratterizzazione genetica dello sbilanciamento, possono essere utilizzate tecniche molecolari.<sup>23,24</sup>

## ***2.16 La sindrome da inversione/ duplicazione del cromosoma 15***

La duplicazione/inversione 15q11 è una malattia cromosomica caratterizzata clinicamente da ipotonia centrale precoce, ritardo nella crescita, disabilità intellettiva, epilessia e autismo.

L'incidenza alla nascita è circa 1/30.000, con un rapporto maschi/femmine di 1:1.

La regione 15q11/q13, nota per la sua instabilità, è soggetta a modificazioni genomiche clinicamente rilevanti, come i cromosomi marker soprannumerari originati dalla duplicazione invertita del cromosoma 15. Questa alterazione genetica causa quindi tetrasomia parziale 15q. In genere la sindrome è sporadica.<sup>31</sup>

Il quadro clinico è caratterizzato da ritardo dello sviluppo e disabilità intellettiva che interessano, in forma più o meno importante, tutti i pazienti. Il linguaggio è limitato e inespressivo e spesso c'è ecolalia. Le capacità di comprensione e di comunicazione risultano molto limitate e circoscritte. I disturbi comportamentali dei bambini e degli adolescenti affetti sono stati classificati come autistici o simil-autistici.

L'epilessia, che si associa a numerose crisi di tipologia diversa, può esordire tra i 6 mesi e i 9 anni di vita. Quasi tutti i pazienti presentano ipotonia muscolare, che, nella maggior parte dei casi, si associa a iperlassità articolare e scialorrea. I dismorfismi, quando presenti, sono lievi.

L'array CGH costituisce un sistema altamente affidabile in grado di individuare l'estensione della duplicazione.<sup>31</sup>

### ***2.17 La sindrome da microdelezione/ microduplicazione 15q11q13***

La sindrome da microdelezione/ microduplicazione 15q11-q13 è caratterizzata da disturbi neurocomportamentali, ipotonia, deficit cognitivo, ritardo del linguaggio ed epilessia.

La prevalenza non è nota. La segregazione è prevalentemente materna. Le duplicazioni paterne di rado sono sintomatiche (ritardo dello sviluppo/disturbi del comportamento).

La sindrome è dovuta a delezioni/duplicazioni interstiziali nella regione critica Prader-Willi/Angelman, le cui delezioni causano le sindromi di Prader-Willi/Angelman. La regione prossimale del cromosoma 15q è instabile e ricca in duplicazioni segmentali (*Low Copy Repeat*, LCR). È spesso la sede di riarrangiamenti clinicamente rilevanti, associati a diversi effetti, di origine parentale, come le duplicazioni che prediligono il cromosoma materno. La maggior parte delle duplicazioni interstiziali è di 4 Mb e ha gli stessi punti di rottura delle delezioni; circa i 2/3 delle duplicazioni derivano da un riarrangiamento intercromosomico, mentre le altre da un riarrangiamento intracromosomico. Le triplicazioni interstiziali sono rare. Le duplicazioni interstiziali di solito originano *de novo* e sono meno frequenti delle duplicazioni inverse, che causano la sindrome da inv dup(15).

Esordisce nella prima infanzia con disturbi dello sviluppo (di solito del linguaggio), ipotonia, epilessia spesso resistente alla terapia, disturbi del comportamento, che a volte rientrano nello spettro autistico (ASD), dismorfismi lievi e incostanti (macrocefalia, rime palpebrali verso il basso, epicanto, facies inespressiva, clinodattilia, sindattilia) e bassa statura.

Il quadro clinico varia molto, anche nella stessa famiglia. La diagnosi è sospettata in neonati con ipotonia precoce, lievi dismorfismi, ritardo dello sviluppo/deficit cognitivo, ASD ed epilessia.

La diagnosi è confermata dalle analisi citogenetiche, quali cariotipo, FISH ed array-CGH.<sup>23,24</sup>

## ***2.18 La sindrome da microdelezione/microduplicazione 16p11.2***

La sindrome da microdelezione/microduplicazione 16p11.2 è un'anomalia cromosomica caratterizzata da ritardo dello sviluppo e del linguaggio, deficit cognitivo lieve, disturbi dello spettro autistico, lievi dismorfismi variabili e predisposizione all'obesità.

La prevalenza della sindrome è stimata in 1/5.000 nella popolazione generale. La sindrome è una causa comune di disturbo dello spettro autistico (ASD), stimata in circa 1:150 soggetti con diagnosi di ASD.

La sindrome da microdelezione/microduplicazione 16p11.2 riguarda di solito una delezione/duplicazione caratteristica di circa 593 kb che comprende 24 geni. Il rapporto tra il genotipo e il fenotipo clinico rimane non chiaro. La microdelezione 16p11.2 prossimale è una sindrome da geni contigui. Queste microdelezioni insorgono quasi sempre *de novo* ma possono, in un numero ristretto di casi, essere ereditate da genitori affetti in maniera autosomica dominante.

Il quadro clinico può essere estremamente variabile: dal deficit cognitivo con anomalie congenite multiple, autismo, disturbi cognitivi e linguistici, ad un fenotipo normale.

Quasi tutti i pazienti presentano ritardo dello sviluppo di una certa entità, compreso il deficit cognitivo e del linguaggio, in particolare per quanto attiene il suo inizio e lo sviluppo del linguaggio espressivo (aprassia verbale infantile) e, in misura minore, difficoltà nell'alimentazione associate ad ipotonia e ritardo dello sviluppo motorio grossolano e fine e delle capacità di coordinazione. Inoltre, i pazienti presentano spesso tratti autistici. La disabilità intellettiva è di solito lieve, ma può essere anche assente. Circa la metà delle persone affette mostra sovrappeso. Possono essere presenti dismorfismi, per lo più lievi e inconsistenti.

Altre caratteristiche meno comuni sono le anomalie all'EEG, una malattia psichiatrica diversa dall'ASD e le cardiopatie minori.

La diagnosi si basa sul quadro clinico che suggerisce l'analisi cromosomica. Le tecniche molecolari utilizzate per caratterizzare la microdelezione/ microduplicazione 16p11.2 prossimale comprendono la FISH e la metodica array CGH.<sup>32</sup>

## ***2.19 La sindrome da microduplicazione 16p13.11***

La sindrome da microduplicazione 16p13.11 è una condizione descritta di recente, associata a segni clinici variabili, che comprendono i disturbi del comportamento, il ritardo dello sviluppo, le cardiopatie congenite e le anomalie scheletriche.

È stata identificata a livello clinico e molecolare in meno di 20 pazienti.

La sindrome è dovuta alla duplicazione interstiziale della regione 16p13.11. Le dimensioni dei riarrangiamenti sono variabili.

Le microduplicazioni originano *de novo* o sono ereditate da genitori lievemente affetti o normali, suggerendo che la microduplicazione abbia una penetranza incompleta e un'espressività variabile. Il meccanismo di base è una ricombinazione omologa non allelica.

I disturbi del comportamento comprendono il deficit dell'attenzione/iperattività, l'aggressività e tratti di tipo autistico. I segni clinici della sindrome sono l'ipermobilità, la craniosinostosi e la polidattilia.

Le duplicazioni vengono identificate con array- CGH e con la FISH.<sup>33</sup>

## ***2.20 La sindrome di Smith- Magenis***

La sindrome di Smith-Magenis (SMS) è una malattia genetica complessa caratterizzata da deficit cognitivo variabile, disturbi del sonno, anomalie craniofacciali e scheletriche, disturbi psichiatrici, ritardo motorio e del linguaggio.

La prevalenza mondiale è di 1/15.000-25.000, ma è probabile che sia sottodiagnosticata. Maschi e femmine sono affetti in eguale misura.

È una malattia sporadica da delezione 17p11.2 del gene RAI1 (retinoic acid-induced 1; 90%) o da mutazione del gene stesso (10%).

Il quadro clinico riconoscibile comprende:

- dismorfismi craniofacciali, ad esempio brachicefalia, fronte bombata, ipertelorismo, sinofria (fusione delle sopracciglia), rime palpebrali oblique verso l'alto, ipoplasia mediofacciale, faccia quadrata larga con sella nasale depressa, labbro superiore rovesciato a "tenda", micrognatia neonatale.

- anomalie scheletriche, quali brachidattilia, scoliosi, clinodattilia del V dito delle mani, sindattilia delle dita dei piedi, movimenti limitati dell'avambraccio e del gomito, anomalie vertebrali, persistenza dei rigonfiamenti fetali sui polpastrelli delle dita delle mani, polidattilia.
- disturbi otorinolaringoiatrici, come insufficienza velofaringea, voce profonda e rauca, noduli/polipi sulle corde vocali.
- segni oftalmologici, ad esempio miopia, anomalie iridee e, raramente, distacco della retina spesso in seguito a comportamenti violenti.

Sono comuni il deficit cognitivo lieve-moderato, il ritardo significativo del linguaggio, la ridotta sensibilità al dolore, la neuropatia periferica, i disturbi del sonno (caratteristici) e i comportamenti disadattivi (capricci/scatti d'ira, ricerca costante dell'attenzione, aggressività, disobbedienza, distrazione e comportamenti autolesionistici). Le malformazioni più frequenti a livello degli organi interni (30-40% dei casi) sono le cardiopatie, le anomalie renali, urinarie e del SNC.<sup>23,24</sup>

## ***2.21 La sindrome di Phelan-McDermid***

La sindrome di Phelan-McDermid è una sindrome da microdelezione a livello del cromosoma 22, caratterizzata da ipotonia neonatale, ritardo globale dello sviluppo, crescita accelerata o normale, linguaggio assente o gravemente ritardato e dismorfismi.

Data la difficoltà della diagnosi clinica e la scarsa disponibilità di test di laboratorio, la sindrome è sottodiagnosticata e la sua reale incidenza non è ancora nota. La delezione ha una frequenza analoga nei maschi e nelle femmine.

La perdita della regione 22q13.3 può essere causata da una semplice delezione, da una traslocazione, dalla formazione di un cromosoma ad anello o, meno frequentemente, da alterazioni di struttura che interessano il braccio lungo del cromosoma 22.

Le caratteristiche cliniche comuni comprendono le ciglia lunghe, le orecchie grandi o dismorfiche, le mani relativamente grandi, le unghie dei piedi displasiche, le sopracciglia folte, la dolicocefalia, le guance piene, il naso globoso e il mento appuntito.

Il comportamento è simil-autistico con diminuzione della percezione del dolore e frequente masticazione e movimenti della bocca.



La diagnosi della sindrome da monosomia 22q13 deve essere presa in considerazione in tutti i casi di ipotonia a eziologia non nota e nelle persone con assenza del linguaggio. Anche se la delezione può a volte essere individuata con l'analisi cromosomica ad alta risoluzione, la conferma della diagnosi deve essere effettuata con la FISH o con array-CGH.<sup>24, 33</sup>

## ***2.22 La sindrome da duplicazione Xq28***

La sindrome da duplicazione Xq28 fa riferimento a patologie cromosomiche che coinvolgono la parte distale del braccio lungo del cromosoma X.

La prevalenza delle duplicazioni Xq è tuttora sconosciuta.

La sindrome da duplicazione Xq28 può essere causata da una duplicazione intracromosomica o da una traslocazione sbilanciata X/Y o X/autosoma. Nei maschi XY, la disomia strutturale del cromosoma X produce sempre una disomia funzionale. Nelle femmine, la perdita della compensazione della dose genica del cromosoma X può dipendere da vari meccanismi, compresa l'inattivazione sfavorevole, la presenza di un punto di rottura che separa un tratto dell'X dal centro di inattivazione in cis, o un piccolo cromosoma ad anello. Il gene MECP2 localizzato in Xq28 è il gene più importante sensibile all'effetto di dose che è responsabile del fenotipo della duplicazione distale Xq.

L'anomalia più comune riguarda una duplicazione intracromosomica ereditata dalla madre.

I sintomi clinici sono molto variabili nei singoli pazienti, soprattutto in rapporto al contenuto genico del segmento duplicato. La duplicazione Xq28 produce un quadro clinico riconoscibile con dismorfismi facciali caratteristici, ipotonia assiale, grave ritardo dello sviluppo, gravi difficoltà dell'alimentazione, anomalie dei genitali e suscettibilità alle infezioni.

Si può manifestare con chiusura prematura delle fontanelle, sutura metopica prominente, faccia ampia, epicanto, orecchie larghe, labbra piccole e aperte, naso appuntito, anomalie del palato. Sono spesso presenti ipotonia facciale ed assiale.

Dal punto di vista neuropsichico, si evidenzia un grave ritardo dello sviluppo, spesso associato a disabilità intellettiva.

La diagnosi clinica si basa sulle caratteristiche dismorfologiche e funzionali ed è confermata da metodiche di caratterizzazione molecolare. Il rischio di ricorrenza è dipendente dalla

presenza di un riarrangiamento strutturale in uno dei genitori, motivo per il quale è consigliata l'analisi molecolare in entrambi i genitori del probando. La morte precoce non è rara nei pazienti con duplicazione del gene MECP2, talora a causa delle infezioni.<sup>33</sup>

## ***2.23 La sindrome Di George***

Tale sindrome verrà descritta in maniera più dettagliata poiché sarà parte essenziale dello studio sperimentale.

La sindrome Di George è stata descritta per la prima volta (1965) dal dr. Angelo Di George, che effettuò degli studi su un gruppo di bambini con assenza congenita di timo e paratiroidi. Negli anni precedenti, questa patologia veniva spesso definita “sindrome velocardiofacciale”, sulla base delle caratteristiche fenotipiche maggiormente evidenti (cardiopatie, insufficienza velofaringea, dismorfismi facciali).

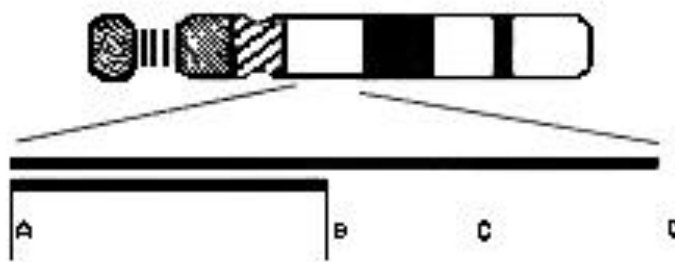
Col passare del tempo, sono state notate altre caratteristiche correlate, come ritardo nello sviluppo del linguaggio, ritardo nello sviluppo motorio e alterazioni comportamentali. Attualmente, si preferisce parlare quindi di “sindrome da delezione del cromosoma 22q11.2”, poiché è stato dimostrato che il quadro clinico varia ampiamente tra un paziente e l'altro e non c'è quindi un fenotipo clinico costante.

Si stima che la patologia abbia un'incidenza di circa 1: 3000 nati vivi, anche se le forme lievi possono spesso rimanere misconosciute.<sup>34</sup>

### ***2.23.1 Eziopatogenesi***

La delezione del cromosoma 22q11.2 è strettamente correlata alla presenza di duplicazioni segmentali (note anche come dupliconi o *Low Copy Repeats*, LCRs). A livello della regione 22q11.2, sono presenti quattro blocchi diversi di LCR, i quali si distinguono in LCR A- D, dove A rappresenta quello più prossimale (verso il centromero).

Figura 4 LCRs a livello del cromosoma 22q11.2 (modificato da <http://rmu.fcm.uncu.edu.ar>)



Le duplicazioni segmentali sono blocchi di poche sequenze ripetute con omologia reciproca molto alta (94-99%), grandi 200-400kb. Queste regioni rappresentano circa il 6% del genoma umano e sono rilevabili in tutto il genoma, ma maggiormente concentrate nelle regioni pericentromeriche e subteleriche. La presenza delle LCR predispone ad una ricombinazione omologa non allelica (*non-allelic homologous recombination*, NAHR), portando più facilmente a delezioni o duplicazioni a livello delle regioni contigue.

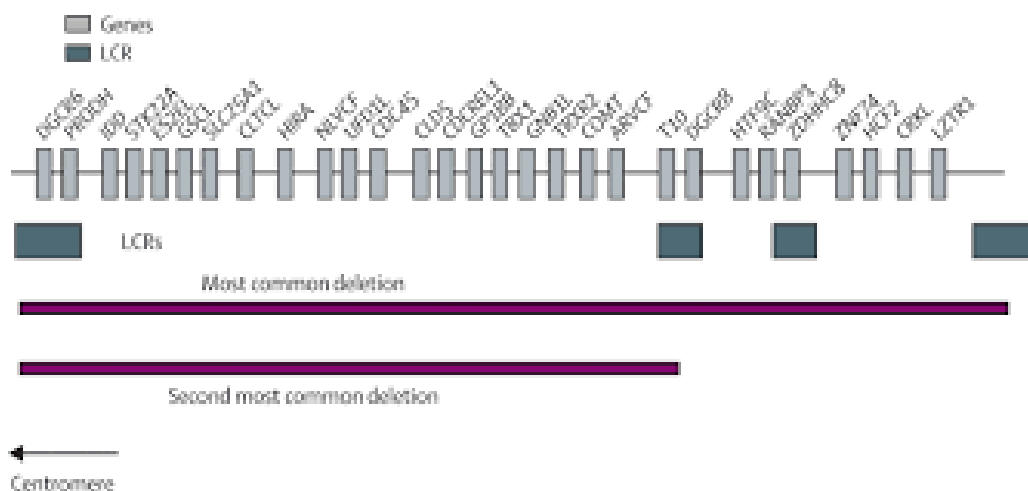
La NAHR avviene esattamente con lo stesso meccanismo della ricombinazione omologa (appaiamento dei filamenti omologhi, formazione del chiasma, risoluzione del crossing-over) con l'eccezione che, nella NAHR, l'alta omologia di sequenza dei segmenti cromosomici che costituiscono ad esempio le LCRs, fa sì che il meccanismo cellulare di controllo della ricombinazione non sia in grado di riconoscere l'appaiamento errato di segmenti non perfettamente identici.<sup>34</sup>

L'appaiamento può avvenire fra LCRs appartenenti a cromosomi omologhi (intercromosomico), fra cromatidi fratelli (intracromosomico), all'interno di un singolo cromatidio (intracromatide).

E' stato dimostrato che le LCRs presenti a livello del cromosoma 22 sono più lunghe, più complesse ed hanno un maggior grado di omologia rispetto a quelle presenti a qualsiasi altro livello del genoma umano.<sup>35</sup>

Inoltre, il fatto che questa delezione sia almeno dieci volte più frequente rispetto alle altre sindromi da delezione, suggerisce che a questo livello le LCR siano intrinsecamente instabili. Più di 35 geni sono presenti all'interno della regione più comunemente deleta che si verifica tra i due blocchi LCR più distanti, per una lunghezza di circa 3 Mb (70-80% dei pazienti). Dal 15% al 30% dei pazienti presenta, invece, una delezione atipica (1,5 Mb).

Figura 5 Delezioni più comuni (adattato da riferimento bibliografico n. 32)



Il gene maggiormente coinvolto nella delezione è *TBX1* (T- box 1). Lo sviluppo di modelli murini knockout per *TBX1* ha dimostrato l'importanza di questo gene nel processo di sviluppo cardiaco e ha evidenziato l'anomala formazione dell'arteria del quarto arco branchiale, un precursore del ventricolo destro, e del tratto di efflusso, come un punto critico dello sviluppo patologico.<sup>36</sup>

Il gene *TBX1* sembra inoltre essere necessario per il corretto sviluppo di ossa e muscoli a livello della faccia e del collo, per le strutture dell'orecchio interno e per le strutture ghiandolari, in particolare timo e paratiroidi.

Secondo numerosi studi, l'alterazione a carico di *TBX1* è responsabile per molte delle caratteristiche cliniche che si ritrovano in questi pazienti<sup>37</sup>; altri studi suggeriscono che la perdita di questo gene possa essere associata anche con i problemi comportamentali eventualmente presenti.<sup>38</sup>

### 2.23.2 Quadro clinico

#### Anomalie cardiache

I difetti cardiaci si ritrovano circa nel 77% dei bambini affetti da questa sindrome. Quelli più frequenti sono rappresentati da:

- Tetralogia di Fallot (difetto del setto interventricolare, aorta a cavaliere, stenosi a carico della valvola polmonare ed ipertrofia del ventricolo destro); si ritrova in circa il 20% dei pazienti.
- Difetti del setto ventricolare (21%)
- Atresia dell'arteria polmonare
- Tronco arterioso (in questa malformazione dal cuore origina una sola arteria, il tronco arterioso comune da cui partono sia le arterie polmonari che le arterie coronarie e che poi si continua nell'aorta).
- Arco aortico interrotto (l'interruzione più frequente risulta tra la carotide e la succlavia sinistra); costituisce il 12% dei casi

Queste alterazioni possono essere associate ad altre anomalie che complicano ulteriormente la correzione chirurgica, quali anomalie valvolari, anomalie polmonari ecc.

### **Sistema immune**

Il sistema immunitario risulta affetto nel 75% dei casi ed è ampiamente ritenuto che il suo interessamento sia secondario all'ipoplasia timica che determina un ridotto numero di linfociti T a livello del sangue periferico. Si va da quadri in cui l'agenesia del timo determina un'assenza completa dei linfociti T, a quadri con una conta linfocitaria assolutamente normale.

La maggior parte dei pazienti presenta una lieve immunocompromissione e non sviluppa infezioni opportunistiche; tuttavia, le infezioni virali possono risultare prolungate.

Dal 25% al 30% dei pazienti presenta sinusiti o otiti medie ricorrenti, il 5% presenta invece frequenti infezioni a carico delle vie aeree inferiori.

Una conseguenza secondaria all'immunodeficienza è rappresentata dalla possibilità di sviluppare patologie autoimmuni, che si ritrovano approssimativamente nel 10% dei casi, quali artrite idiopatica giovanile, patologie ematologiche, malattia celiaca.

In casi più rari, si può osservare una drammatica espansione oligoclonale a carico dei linfociti T, che possono arrivare ad infiltrare organi e tessuti.<sup>39</sup>

### **Difetti del palato**

Il palato risulta interessato nella maggioranza dei pazienti e contribuisce a difficoltà nell'alimentazione, nell'acquisizione e nella qualità del linguaggio.

Il difetto più comune è rappresentato da un'insufficienza velare, che rende difficoltoso il sollevamento del velo palatino, necessario per la chiusura del rinofaringe durante la deglutizione o la fonazione. Questo si evidenzia spesso nel periodo neonatale a causa di frequenti rigurgiti nasali di latte.

Difetti più importanti includono la palatoschisi, ma la labioschisi risulta infrequente.

La fonazione può risultare alterata anche in seguito alla presenza di membrane laringee o paralisi delle corde vocali; sono spesso presenti raucedine e rinolalia (voce nasale). Nella maggior parte dei casi si riesce comunque ad acquisire una buona proprietà di linguaggio, seppur tardivamente.

Studi anatomici hanno dimostrato che in questi soggetti la base cranica risulta più breve e l'angolo palatino maggiore rispetto alla norma.<sup>40</sup>

### **Aspetti neuropsichici**

Il ritardo dello sviluppo è spesso presente ma altamente variabile. Il ritardo motorio è in genere la prima caratteristica identificata dai genitori; infatti la deambulazione autonoma è acquisita mediamente a 18 mesi.

Il livello cognitivo risulta variabile, compreso generalmente tra i limiti inferiori della norma e un deficit di grado lieve-moderato. Circa il 65% degli individui, presenta una disabilità intellettiva di tipo non verbale, con una discrepanza tra l'ambito delle performance e l'ambito verbale, che risulta migliore. Si rilevano inoltre difficoltà nelle aree della matematica, della memoria visuospatiale e del ragionamento astratto. In alcuni casi, la disabilità intellettiva può essere l'unica manifestazione della sindrome.

Per quanto riguarda il linguaggio, la forma espressiva risulta difficoltosa, mentre le funzioni ricettive sono molto simili alla norma. L'età media di acquisizione del linguaggio è intorno ai 30 mesi. In rari casi, il ritardo può essere legato ad una sordità congenita, correlata a difetti dello sviluppo a carico delle strutture dell'orecchio interno o alla elevata frequenza di otiti ricorrenti.

Relativamente all'aspetto comportamentale, si presentano spesso quadri caratterizzati da ADHD nel 25- 46% dei casi, impulsività, condotte oppositivo- provocatorie (16- 43%), labilità attentiva. In circa il 50% dei casi, sono rilevabili tratti autistici, ad esempio interessi ristretti e ripetitivi, comportamenti stereotipati, difficoltà nelle interazioni sociali, condotte di isolamento.<sup>41</sup>

Si possono inoltre avere comorbidità per difetti psichiatrici veri e propri, quali bipolarismo, schizofrenia/ disordini schizoaffettivi, disturbo d'ansia generalizzato (17- 29%) e disturbo ossessivo- compulsivo (4- 33%).

La causa del ritardo globale di sviluppo è stata a lungo studiata. Circa il 10% dei pazienti presenta microcefalia, con un interessamento prevalente a carico del lobo parietale. Inoltre, in questi bambini è spesso rilevabile un verme cerebellare di dimensioni ridotte, in maniera simile ai bambini affetti da ASD; il verme è implicato particolarmente negli aspetti legati alla condotta sociale.

Studi di risonanza magnetica hanno inoltre dimostrato che la sostanza grigia è ridotta, soprattutto a livello della corteccia frontale, del giro del cingolo e del cervelletto. Questi reperti sembrano essere correlati con un deficit a livello attentivo e delle funzioni esecutive.<sup>42</sup>

Studi di risonanza magnetica funzionale hanno dimostrato un diverso interessamento cerebrale durante l'esecuzione di compiti matematici rispetto ai controlli, suggerendo che le connessioni cerebrali possano essere alterate.<sup>43</sup>

L'elevata frequenza di questi aspetti nei pazienti con delezione del cromosoma 22q11.2 suggerisce che la delezione stessa possa condurre ad una specifica predisposizione allo sviluppo di patologie comportamentali o psichiatriche.<sup>44</sup>

### **Aspetti clinici minori**

In alcuni bambini si possono evidenziare caratteristiche meno frequenti, ma non meno rilevanti dal punto di vista medico. Tra queste ritroviamo:

- Patologie gastrointestinali, quali morbo di Hirschprung, atresia esofagea, malrotazioni intestinali, fistole tracheo-esofagee, ernia diaframmatica congenita.
- Ipocalcemia, legata all' ipoplasia delle paratiroidi
- Difetti renali, che raramente richiedono terapia medica o chirurgica
- Dismorfismi, come ipoplasia della regione malare, ptosi palpebrale, ipertelorismo, epicanto, radice nasale prominente, padiglioni auricolari retroversi.

### ***2.23.3 L'iter diagnostico e la gestione del paziente***

La gestione di questo tipo di pazienti varia in base all'età e al fenotipo. La maggior parte di questi bambini viene identificata immediatamente dopo la nascita, a causa della presenza di cardiopatie congenite.

Durante l'infanzia, la problematica che può orientare verso questo tipo di patologia è sicuramente la difficoltà nell'alimentazione e nella fonazione; importante risulta anche la presenza di tratti autistici.

Con l'ingresso a scuola, si pone invece maggiormente l'accento sulla disabilità intellettiva del soggetto. Gli aspetti comportamentali saranno invece più evidenti nell'adolescente e nell'adulto.

Oltre agli aspetti internistici e comportamentali che possono facilitare la diagnosi, risulta importante l'utilizzo di tecniche genetiche per evidenziare la delezione causale.

La tecnica FISH è stata utilizzata come esame diagnostico di routine in questi pazienti a partire dal 1992.

La FISH rappresenta un indispensabile complemento della citogenetica tradizionale in quanto è caratterizzata da un maggiore potere di risoluzione: ciò vuol dire che tale tecnica consente di caratterizzare anomalie cromosomiche di numero e di struttura non definibili attraverso le tecniche di citogenetica classica e di identificare riarrangiamenti criptici, non visibili neppure dopo bandeggio ad alta risoluzione.<sup>45</sup>

La FISH prevede il legame tra una sonda molecolare (frammento di DNA specifico per la regione di interesse marcato con composti fluorescenti) e la sequenza di DNA complementare del preparato che è stato fissato e montato su un vetrino portaoggetti: la regione cromosomica di interesse risulta così facilmente individuabile ad un microscopio a fluorescenza.

Nella sindrome Di George, ci si avvale dell'utilizzo di due tipi di sonde<sup>8, 46</sup>:

- una specifica per l'identificazione del cromosoma 22
- la seconda per verificare l'assenza della regione più comunemente deleta

Ovviamente, se la sonda specifica per il locus deletato non si lega al DNA in studio, viene confermata la diagnosi di "sindrome da microdelezione del cromosoma 22q11.2".



Il vantaggio principale della FISH è che essa non dipende dalla ricombinazione e così può essere utilizzata nelle regioni cromosomiche dove questa è soppressa, come nel centromero.

Sebbene questa metodica permetta la rilevazione di sbilanciamenti cromosomici con grande accuratezza, essa ha il grosso limite di rilevare solo particolari mutazioni a livello di precisi loci cromosomici, poiché può sondare solo sequenze specifiche che sono note o sospettate essere associate a sindromi note e non fornisce un'analisi dell'intero genoma.

Un ulteriore svantaggio è rappresentato dal fatto che la delezione atipica (1.5 Mb) non viene evidenziata dalle sonde standard.<sup>46</sup>

Per quest'ultimo motivo e per la possibilità di analizzare il genoma nella sua interezza, attualmente viene utilizzata la metodica array-CGH. Questa riesce ad identificare sia le delezioni tipiche che quelle atipiche e soprattutto i geni in esse coinvolte.

L'analisi array-CGH ha evidenziato che circa il 15-30% delle delezioni a livello del cromosoma 22 sono atipiche, elevando quindi la soglia diagnostica.<sup>47, 48</sup>

# *Parte sperimentale*

## *Capitolo 3*

### *Analisi sperimentale*

Il presente studio prende in considerazione l'analisi CGH-array svolta nel periodo compreso tra il 1 gennaio 2010 e il 31 dicembre 2015 sui pazienti giunti all'IRCCS Stella Maris con disturbi del neurosviluppo e con quadri di anomalie congenite multiple di natura da determinare, allo scopo di individuare la possibile causa patogenetica del loro disturbo.

I disturbi del neurosviluppo, secondo il DSM-V, sono patologie dello sviluppo che insorgono entro i primi anni di vita, hanno cause multiple e possono produrre deficit funzionali che permangono per tutta la vita del soggetto. Poiché hanno origine da disturbi nell'ontogenesi del sistema nervoso centrale, spesso si presentano in comorbidità.

I disturbi del neurosviluppo comprendono le seguenti categorie: la disabilità intellettiva, i disturbi della comunicazione, i disturbi dello spettro autistico (ASD), il disturbo da deficit di attenzione e iperattività (ADHD), i disturbi specifici dell'apprendimento e i disturbi del movimento, intesi come disturbo dello sviluppo della coordinazione.

Inoltre, come esemplificazione di uno studio neuropsichiatrico su una sindrome dismorfogenetica, è stato osservato un piccolo gruppo di pazienti affetti da sindrome Di George.

Come già descritto al termine del capitolo 2, la sindrome Di George è una patologia dismorfogenetica, dovuta alla delezione del cromosoma 22q11.2.

Si stima che abbia un'incidenza di circa 1: 3000 nati vivi, anche se le forme lievi possono spesso rimanere misconosciute.

Dal punto di vista clinico, è caratterizzata principalmente da anomalie cardiache (tetralogia di Fallot, difetto del setto interventricolare, ecc), immunocompromissione di grado variabile, difetti del palato (insufficienza velare, palatoschisi), che favoriscono deficit nell'alimentazione e nell'acquisizione del linguaggio.

Il fenotipo neuropsicologico comprende un livello cognitivo variabile, generalmente tra i limiti inferiori della norma e un deficit di grado lieve-moderato. La maggior parte dei soggetti, presenta una disabilità intellettiva di tipo non verbale, con una discrepanza tra l'ambito delle performance e l'ambito verbale, che risulta migliore. Per quanto riguarda il

linguaggio, la forma espressiva risulta difficoltosa, mentre le funzioni ricettive sono molto simili alla norma.

Relativamente all'aspetto comportamentale, si presentano spesso quadri caratterizzati da ADHD, impulsività, condotte oppositivo-provocatorie, labilità attentiva. In circa il 50% dei casi, sono rilevabili tratti autistici, ad esempio interessi ristretti e ripetitivi, comportamenti stereotipati, difficoltà nelle interazioni sociali, condotte di isolamento.

Il quadro clinico comprende anche aspetti minori, quali patologie gastro-intestinali, ipocalcemia, patologie renali, dismorfismi facciali.

### ***3.1 Ipotesi di studio e scopi***

#### **Scopi primari della tesi:**

1. Verifica di incidenza della positività dell'esame array nei pazienti studiati
2. Verifica della patogenicità dell'esame in relazione al quadro clinico
3. Incidenza della diagnosi di sindrome Di George tra i pazienti studiati e loro valutazione neuropsicologica

#### **Scopi secondari dello studio:**

1. Comparazione tra i dati di positività array all'IRCCS Stella Maris nel quinquennio esaminato e i dati riportati in letteratura
2. Comparazione del fenotipo neuropsicologico identificato nei pazienti Di George oggetto di studio e quello riportato in letteratura

### ***3.2 Analisi del campione***

Gli array analizzati sono in totale 1045; di questi 694 (66.4%) sono risultati negativi e 351 (33.6%) sono risultati positivi, cioè i soggetti in questione sono portatori di anomalie genetiche sbilanciate (CNVs).

Le CNV sono state considerate patogenetiche in caso di sindrome nota, di aberrazione verificatasi *de novo* e/o in seguito alla loro comparazione con articoli e database preesistenti.

Nei 351 pazienti positivi, le motivazioni di ricorso all'array CGH sono state molto variabili:

- 118 (33.6%): presenza di ASD con/senza ID di grado variabile, disturbi del linguaggio o dismorfismi corporei
- 21 (6%): presenza di disturbi del linguaggio e/o dell'apprendimento (solo specifici)
- 153 (43.6%): presenza di ID con/ senza dismorfismi facciali e disturbi del linguaggio
- 32 (9.1%): epilessia con/senza ID
- 27 (7.7%): altro (es. ADHD, disturbi del movimento, disturbi psichiatrici ecc)

Poiché tra i 351 positivi 87 (24.8%) risultano avere aberrazioni multiple, sia ereditate che *de novo*, il totale delle CNVs rilevate ammonta a 454.

In Tabella 1 è riportata l'incidenza nel *database array IRCCS Fondazione Stella Maris* (2010-2015) delle principali sindromi identificate e descritte in breve al Capitolo 2.

Tabella 1 Analisi del database

SINDROME	MUTAZIONE	CASI EVIDENZIATI/ CASI POSITIVI
S. da microdelezione 1p36	Del 1p36.13- p36.33	2 (0.57%)
S. da microduplicazione 1q21.1	Dup 1q21.1	4 (0.88%)
S. da microdelezione 2q37	Del 2q37.1- q37.3	3 (0.85%)
S. da delezione/ duplicazione 3q29	Del/ Dup 3q29	3 (0.85%)
S. Wolf- Hirschhorn	Del 4p16.3	2 (0.57%)
S da inversione/ duplicazione cromosoma 8	Del/ inv/ dup 8p	2 (0.57%)
S. da inversione/ duplicazione cromosoma 15	Inv/dup 15q11- q13	13 (3.70%)
S. da duplicazione/ delezione 15q11.2	Dup/ del 15q11.2q13.5	6 (1.71%)
S. da microdelezione/ microduplicazione 16p11.2	Del/ dup 16p11.2	7 (1.99%)
S. da microduplicazione 16p13.11	Dup 16p13.11	3 (0.85%)
S. Smith Magenis	Del 17p11.2	5 (1.42%)
S. Di George	Del 22q11.21	8 (2.28%)
S. di Phelan- McDermid	Del 22q13.3	3 (0.85%)
S. da duplicazione Xq28	Dup Xq28	5 (1.42%)

### ***3.3 La sindrome Di George***

Lo studio è stato rivolto maggiormente ai pazienti affetti da sindrome Di George, avendo assistito ad alcune visite ed osservazioni cliniche durante il periodo di internato elettivo, frequentato presso l'istituto.

All'interno del *database array IRCCS Fondazione Stella Maris*, sono stati rilevati 8 casi di pazienti affetti da sindrome Di George; sul totale dei soggetti portatori di sbilanciamento, questi costituiscono circa il 2.3% dei casi.

#### ***3.3.1 Descrizione del campione***

Il campione di studio è rappresentato da 8 pazienti, di età compresa tra i 2 e i 13 anni al momento della presa in carico in Istituto: 5 soggetti di sesso femminile e 3 soggetti di sesso maschile. Età media alla diagnosi: 7 anni e 6 mesi

In Tabella 2 sono riportate le caratteristiche cliniche del campione oggetto di studio.

Tabella 2 Descrizione del campione

PAZIENTE	SESSO	ETA' ALLA DIAGNOSI	LIVELLO COGNITIVO	PROBLEMATICHE COMPORTAMENTALI
A.L. 5a 5m	M	5a 5m	Livello cognitivo in area limite	Disturbo della relazione e della comunicazione, interessi ristretti e selettivi, disturbo del linguaggio, esauribilità attentiva, atteggiamenti oppositori
A.M. 7a 8m	F	6a 6m	ID grado lieve	ADHD di grado moderato, disturbo d'ansia misto, aspetti oppositivo-provocatori
A.E. 13a 5m	F	13a 5m	ID grado lieve	Difficoltosa integrazione coi pari
C.G. 3a	F	1a	ID grado lieve	Condotte oppositorie, ritardo del linguaggio
F.M. 2a	M	3a	ID grado lieve-moderato	Aspetti oppositivo-provocatori, labilità attentiva, condotte di isolamento, movimenti ripetitivi, ritardo linguaggio
M.S. 12a 4m	F	12a 10m	Livello cognitivo in area limite	Interessi ristretti, ritiro sociale, condotte oppositivo-provocatorie, appiattimento affettivo, labilità attentiva
S.M.G. 9a 7m	F	11a 6m	ID grado lieve	Inibizione comunicativa con chiusura comportamentale, ritardo del linguaggio
V.G. 4a 8m	M	5a 6m	Livello cognitivo nella norma	Disturbo dello spettro autistico, labilità attentiva, difficoltà del linguaggio

ID: (intellectual disability): disabilità intellettiva

ADHD: disturbo da deficit di attenzione e iperattività



### **3.3.2 Pazienti e Metodi**

Per la valutazione degli 8 pazienti, è stata effettuata un'analisi retrospettiva delle loro cartelle cliniche.

Due pazienti (A.L. e A.M.) sono stati osservati anche personalmente durante la loro valutazione in Istituto, coincidente con il periodo di elaborazione della mia tesi.

Oltre all'esame obiettivo neurologico, all'osservazione psicopedagogica ed alla valutazione logopedica dei soggetti, vengono utilizzati dei test che vanno a valutare le loro capacità in vari ambiti:<sup>5</sup>

- *Child Behaviour Check List (CBCL)*: è uno dei questionari più utilizzati per la valutazione delle competenze e dei problemi emotivi e comportamentali dei bambini e degli adolescenti. Viene compilato dai genitori ed è disponibile in due versioni a seconda della fascia d'età del bambino (prescolare 1 ½ -5 anni e scolare 6-18 anni). I questionari indagano un ampio spettro della psicopatologia in età evolutiva attraverso scale che valutano dimensioni specifiche (es. Isolamento/ Depressione, Lamentele Somatiche, Comportamenti Aggressivi ecc) e generali (Internalizzazione e Esternalizzazione).
- *K-SADS*: è un'intervista semistrutturata per la valutazione dei disturbi psicopatologici (attuali e pregressi) nei bambini e negli adolescenti in base ai criteri del DSM III-R e del DSM-IV. Viene somministrata ai ragazzi e ai loro genitori.
- *Social Communication Questionnaire (SCQ)*: è un questionario che aiuta a valutare le capacità comunicative, sociali e relazionali in bambini con sospetto disturbo dello spettro autistico. Fornisce un punteggio di cut-off che individua sia i soggetti che hanno probabilità di essere affetti da ASD, sia coloro che necessitano di valutazioni più approfondite con ADOS.
- *Autism Diagnostic Observation Schedule (ADOS)*: prevede varie attività che permettono all'esaminatore di osservare i comportamenti sociali e comunicativi ai fini della diagnosi di disturbo pervasivo dello sviluppo. L'ADOS è articolata in quattro moduli, ognuno costituito da un proprio protocollo contenente un elenco di attività. Il soggetto viene valutato attraverso un solo modulo a seconda della sua età cronologica e dello sviluppo linguistico.
- *Repetitive Behaviour Scale (RBS)*: contiene 43 voci organizzate in sottodomini, quali compulsioni, rituali, monotonia, autolesionismo, comportamenti ripetitivi e stereotipati.

- *Wechsler Preschool and Primary Scale of Intelligence (WPPSI)*: è volto alla valutazione cognitiva in età compresa tra i 2 anni e 6 mesi e i 7 anni e 7 mesi. Comprende test per la valutazione cognitiva a livello verbale e delle performance. In bambini più grandi, si utilizza la WISC (Wechsler Intelligence Scale for Children).
- *Matrici di Raven*: test utilizzato per la misurazione dell'intelligenza non verbale. In ogni scheda viene richiesto di completare una serie di figure con quella mancante. Ogni gruppo di item diventa sempre più difficile, richiedendo una sempre più elevata capacità di analisi, codifica, interpretazione e comprensione degli item.
- *Sensory profile*: test utilizzato per valutare i parametri principali del processo di sviluppo sensoriale.
- *Early developmental questionnaire (EADQ)*: valuta le competenze socio-comunicative del soggetto.
- *Vineland Adaptive Behavior Scales*: intervista semistrutturata rivolta ai genitori che permette di individuare punti di forza e di debolezza del soggetto in specifiche aree del comportamento adattivo (comunicazione, abilità quotidiane, socializzazione, abilità motorie), favorendo la programmazione di interventi individuali educativi o riabilitativi.
- *ADHD Rating Scale (ADHD- RS)*: si richiede al genitore la frequenza di sintomi suggestivi di ADHD (impulsività, inattenzione e iperattività) negli ultimi 6 mesi.

### ***3.3.3 Analisi dei singoli casi clinici***

#### Paziente 1

A.L. ha avuto un unico ricovero presso la fondazione Stella Maris all'età di 5 anni e 5 mesi.

I genitori richiedono un inquadramento psicopatologico in un bambino con disturbo della relazione e della comunicazione, cardiopatia congenita corretta chirurgicamente e insufficienza velo-faringea.

Parametri neonatali e tappe dello sviluppo:

- Peso: 3150g
- Lunghezza: 48.5 cm
- Circonferenza cranica: 33 cm

- Indice di Apgar: 9
- Deambulazione autonoma: 12 mesi
- Acquisizione linguaggio: circa 24 mesi

Segni e sintomi suggestivi per sindrome Di George:

- Soffio sistolico, suggestivo di difetto interventricolare (DIV) perimembranoso (corretto chirurgicamente nel 2010)
- Insufficienza velo- faringea con rinolalia e difficoltà nutritive

Esame obiettivo neurologico nei limiti della norma.

L'analisi array-CGH, richiesta durante il ricovero, mostra la presenza di una delezione a livello del cromosoma 22q11.21 estesa circa 2.5 Mb, confermando l'ipotesi clinica suggestiva.

Le analisi a carico dei genitori risultano attualmente in corso di studio.

Test eseguiti: SCQ (negativo per l'intero arco di vita), CBCL (punteggi altamente significativi per ansia- depressione), RBS- R (si segnalano comportamenti routinari al momento del sonno, del gioco e delle interazioni sociali), ADOS 2 (punteggio che si colloca al di sotto del cut- off per lo spettro autistico), WPPSI- III (cognitivo in area limite), scala Vineland (funzionamento adattivo non del tutto in linea con l'età), Sensory profile (punteggi che si discostano moderatamente dallo sviluppo tipico), EADQ (non riporta regressione delle competenze socio- comunicative), EO neurologico (non si rilevano segni specifici), valutazione logopedica e osservazione psicopedagogica.

**Fenotipo cognitivo-comportamentale:** Presenza di interessi selettivi e ripetitivi, disturbo del linguaggio sia di tipo recettivo che di tipo espressivo, facile esauribilità attentiva, presenza di un livello cognitivo collocabile in area limite. All' esame obiettivo neurologico non si rilevano segni specifici. Le prassie di igiene ed abbigliamento necessitano del supporto di un adulto.

## Paziente 2

A.M. è stata ricoverata per la prima volta nel 2012, all'età di 7 anni e 8 mesi; sono seguiti ricoveri a cadenza annuale per controlli clinico-funzionali ed eventuali modifiche a livello terapeutico.

Parametri neonatali e tappe dello sviluppo:

- Gravidanza gemellare
- Nascita pretermine (34 settimana) per distacco placentare
- Peso 2150 g
- Lunghezza 46 cm
- Circonferenza cranica 30 cm
- Indice Apgar 8- 10
- Deambulazione autonoma 17 mesi
- Lallazione (produzione pre- linguistica) 10 mesi, con successiva lenta evoluzione dello sviluppo linguistico.

Segni e sintomi suggestivi per sindrome Di George:

- Suzione poco valida all'allattamento al seno
- Infezioni polmonari ricorrenti

Si associa una stenosi a livello del bronco lobare superiore destro di origine vascolare con conseguente subatelettasia lobare.

L'esame neurologico non evidenzia segni neurologici specifici.

Alla bambina era già stata diagnosticata la sindrome Di George nel 2011, presso l'ospedale Meyer di Firenze, attraverso la conferma della delezione 22q11.21 tramite analisi array-CGH.

L'esame è stato effettuato anche sulla madre e sulla sorella che sono risultate negative, ma non sul padre poiché deceduto.

Test eseguiti: CBLC (punteggi significativi per ansia), ADHD- RS (prevalgono iperattività ed inattenzione), K- SADS, prova MT di calcolo (svolta con difficoltà), EO neurologico (non evidenzia deficit specifici), WISC (ID grado lieve), valutazione logopedica, osservazione psicopedagogica.

**Fenotipo cognitivo-comportamentale:** sono emerse irritabilità marcata con crisi di collera e pianto prolungato in seguito a frustrazioni, anche di lieve entità, scarsa interiorizzazione delle regole con provocatorietà e atteggiamenti di sfida nei confronti dell'adulto e tirannici nei confronti della sorella gemella (in apparente buona salute). Si rileva inoltre ADHD di grado moderato (con prevalente deficit attentivo ed impulsività) e un disturbo d'ansia misto, sia generalizzato che da separazione, soprattutto nei confronti della madre. E' presente anche un ID di grado lieve; le competenze risultano maggiormente deficitarie in ambito logico-matematico.

Nei ricoveri successivi, viene evidenziato un miglioramento sul piano comportamentale e scolastico ed un'attenuazione della componente ADHD.

Nel 2013, viene diagnosticato un disturbo dell'umore di tipo ipotimico.

Nel 2015, si nota un'attenuazione del disturbo d'ansia da separazione materna ed un miglioramento nel rapporto con la sorella, che viene spesso utilizzata come intermediario per i rapporti coi coetanei.

### Paziente 3

A.E. effettua il primo ricovero presso l'Istituto Stella Maris nel 2012 (13 anni e 5 mesi), per una crisi focale secondariamente generalizzata in corso di registrazione EEG presso altro Istituto.

Segni e sintomi suggestivi per sindrome Di George:

- Ipocalcemia

Si associa Ipotiroidismo

L'analisi array-CGH avviata nel 2013 ha identificato una delezione del cromosoma 22q11.21; entrambi i genitori risultano negativi per questo sbilanciamento.

Dopo l'inizio della terapia con Depakin, non si verificano più episodi critici, ad eccezione di uno verificatosi in associazione ad una virosi gastro-intestinale, nel 2015.

Test eseguiti: WISC (ID grado lieve), osservazione psicopedagogica.

**Fenotipo cognitivo-comportamentale:** si rileva una difficoltosa integrazione coi pari, durante l'osservazione psicopedagogica, e la necessità di sostegno scolastico per una ID di grado lieve.

#### Paziente 4

C.G. ha effettuato il primo ricovero nel 2012, all'età di 3 anni; si è poi presentata annualmente per valutazioni clinico-funzionali ripetute.

Parametri neonatali e tappe dello sviluppo:

- Peso 2950 gr
- Lunghezza 47 cm
- Indice Apgar 9- 9
- Deambulazione autonoma 18 mesi
- Lallazione 6 mesi, ma produzione delle prime parole a 18 mesi

Segni e sintomi suggestivi per sindrome Di George:

- DIV e stenosi polmonare riscontrate in II giornata (eseguito intervento ad un anno)
- Facile affaticabilità nella suzione
- Ipoacusia di media entità, timpanogramma piatto bilateralmente per la presenza di otiti medie ricorrenti
- Difficoltà nella motricità oro- buccale che determina un quadro di disprassia.
- Immunocompromissione; agli esami ematochimici si evidenziano CD4 23.8% (v.n. 36-50%), CD3 46.8% (v.n. 65-77%), CD19 21.8% (v.n. 5-14%), NK 30.5% (v.n.3-15%).

La diagnosi di Sindrome Di George era già stata effettuata precedentemente presso l'ospedale S. Chiara di Pisa, attraverso analisi FISH (microdelezione del cromosoma 22q11.21 *de novo*) e successivamente ricaratterizzata attraverso array-CGH. Entrambi i genitori risultano negativi.

Test eseguiti: WPPSI- III (ID lieve con migliori competenze in ambito verbale rispetto a quello delle performance), valutazione logopedica (difficoltà della motricità oro-buccale), valutazione psicopedagogica.

**Fenotipo cognitivo-comportamentale:** si rilevano ID di grado lieve con un profilo disomogeneo per migliori competenze nell'ambito verbale rispetto all'ambito delle performance. Si osservano inoltre difficoltà di separazione dalle figure genitoriali, condotte oppositorie, scarsa tolleranza alla frustrazione.

Ai controlli successivi, si nota un aumento della loquacità e delle capacità comunicative, verosimilmente associata ad un miglioramento delle prassie oro-motorie. Permane comunque un ritardo del linguaggio con caduta maggiore su aspetti fonetico-fonologici.

La bambina mostra inoltre aumentati livelli di tolleranza alle frustrazioni e agli insuccessi.

Nell'ultimo ricovero (aprile 2015), la paziente appare socievole, con una riduzione dell'atteggiamento oppositorio e collaborante alle attività proposte.

Viene evidenziato un aumento dell'insufficienza velo-faringea, presumibilmente ascrivibile all'accrescimento scheletrico.

#### Paziente 5

F.M. effettua il primo ricovero in regime di Day Hospital nel 2010, all'età di 2 anni. Viene seguito annualmente per i due anni successivi.

Il bambino è nato a termine, ma risulta piccolo per l'età gestazionale (Small for Gestational Age, SGA).

Segni e sintomi suggestivi per sindrome Di George:

- Nessuno

L'iter diagnostico è stato inizialmente orientato a forme di tipo metabolico (dosaggio creatina e suoi metaboliti e dosaggio amminoacidi su sangue ed urine), dopodichè è stata effettuata l'analisi del cariotipo, che non ha mostrato nessuna anomalia.

Si è quindi effettuata l'analisi array-CGH che ha dimostrato la delezione caratteristica con dimensioni di circa 2.5 Mb; entrambi i genitori risultano negativi.

Test eseguiti: WPPSI (ID grado medio- lieve), CBCL (atteggiamenti tirannici e provocatori), valutazione logopedica, osservazione psicopedagogica.

**Fenotipo cognitivo-comportamentale:** si rilevano atteggiamenti tirannici e provocatori di fronte a richieste ostacolanti le proprie intenzioni, instabilità motoria ed attentiva. Il paziente mostra, inoltre, condotte di isolamento in situazioni sconosciute e scarsa tolleranza al contatto fisico. Si diagnostica una ID di grado medio-lieve; le competenze appaiono migliori nel linguaggio ricettivo e negli aspetti visuo-percettivi, piuttosto che nel linguaggio espressivo e negli aspetti visuo-costruttivi.

Nei controlli successivi, i genitori riferiscono un miglioramento globale del bambino, con minore tendenza all'isolamento.

### Paziente 6

M.S. viene ricoverata nel luglio 2015 presso l'Istituto Stella Maris, all'età di 12 anni e 10 mesi, per la presenza di un episodio psicotico in atto.

Parametri neonatali e tappe dello sviluppo:

- Deambulazione autonoma a 14 mesi
- Sviluppo del linguaggio lento e difficoltoso.

Segni e sintomi suggestivi per sindrome Di George:

- Dismorfismi facciali quali micrognatia, basso impianto auricolare, palato alto.

Nonostante il fenotipo clinico non sia fortemente suggestivo, viene avviata l'analisi array-CGH che evidenzia una delezione del cromosoma 22q11.21 estesa circa 2.5 Mb. L'analisi a carico dei genitori risulta tuttora in corso di studio.

Test eseguiti: WISC- 4 (profilo cognitivo in area limite), matrici di Raven (cognitivo intorno al 40° percentile), K-SADS, CBCL (evidenziano un appiattimento affettivo), valutazione psicopedagogica, scala Vineland (scarse competenze nell'area delle abilità quotidiane), ADHD-RS (evidenzia una lieve positività nell'ambito del deficit attentivo).

**Fenotipo cognitivo-comportamentale:** l'affettività è apparsa fortemente appiattita con ridotta partecipazione emotiva e mimica scarsamente modulata, per lo più fissa. La



produzione verbale spontanea è apparsa limitata a frasi semplici, prodotte in maniera ripetitiva, con finalità richiestiva ma più frequentemente acontestuali e bizzarre. Le capacità cognitive e adattative sembrano complessivamente regredite con importanti difficoltà nelle abilità strumentali (la ragazza ha smesso di leggere e scrivere, permane un discreto investimento nel disegno che tuttavia appare ripetitivo). E' presente un deficit maggiore in ambito logico-matematico, correlato anche ad una facile esauribilità attentiva. Si segnalano condotte oppositorie per richieste anche semplici, con attivazione di condotte coprolaliche.

A settembre 2015, i genitori riferiscono un significativo miglioramento della sintomatologia dopo l'introduzione del risperidone, con una maggiore organizzazione del comportamento e del pensiero. Si segnala inoltre regressione dell'episodio psicotico e una maggiore stabilità sul piano dell'umore.

#### Paziente 7

S.M.G. viene ricoverata per la prima volta nel 2011, all'età di 9 anni e 7 mesi.

Parametri neonatali e tappe dello sviluppo:

- Peso 2850 gr
- Cianosi ed ittero alla nascita
- Deambulazione autonoma a 14 mesi
- Lallazione a 5 mesi, ma le prime parole non sono comparse prima dei 3 anni.

Segni e sintomi suggestivi per sindrome Di George:

- Suzione ipovalida
- Pervietà del setto interatriale
- Lieve ipertelorismo oculare

E' stata effettuata la valutazione array-CGH sulla base del quadro clinico presente. Essa ha evidenziato la presenza di una delezione a livello del cromosoma 22q11.2, della lunghezza di circa 2.5 Mb; le analisi a carico dei genitori sono in corso di studio.

Test eseguiti: WISC III (ID grado lieve), valutazione logopedica (non sembrano presenti difficoltà fonologiche), osservazione psicopedagogica.

**Fenotipo cognitivo-comportamentale:** la bambina presenta un'importante inibizione comunicativa che si accompagna a chiusura comportamentale e rallentamento motorio.

Il tono dell'umore risulta ridotto con scarsa iniziativa comunicativa, ma con spiccata sensibilità alla gratificazione. La valutazione cognitiva, sebbene risulti inficiata dagli aspetti emotivo-comportamentali segnalati, depone per una ID di grado lieve; le strategie di pensiero logico risultano deficitarie per l'età.

Nel 2013, i familiari riferiscono un lieve miglioramento a livello relazionale, ma l'interazione sociale rimane poco presente, pur migliorando in piccoli gruppi o in presenza della madre. Il tono dell'umore rimane ipotimico, con apatia e abulia; vengono riferiti atteggiamenti di iperfagia e tendenza al “*binge eating*”.

### Paziente 8

V.G. viene preso in carico nel 2011, all'età di 4 anni e 8 mesi.

Il quadro clinico è caratterizzato da difficoltà comunicative e linguistiche e disagio nell'interazione sociale.

Segni e sintomi suggestivi di sindrome Di George:

- Dismorfismi minori

In questo bambino, l'analisi array-CGH evidenzia la presenza di microdelezione a carico del cromosoma 22q11.21, di dimensioni pari a 148 kb; la delezione è presente anche nella madre che non risulta però affetta dalla patologia.

Test eseguiti: ADOS (diagnosi ASD), valutazione logopedica, WPPSI (cognitivo nella norma), osservazione psicopedagogica.

**Fenotipo cognitivo-comportamentale:** si delineano impulsività, labilità attentiva con facile distraibilità; sono presenti interessi ripetitivi. Il contatto oculare è presente ma spesso sfuggente, sono presenti il pointing ed i principali gesti referenziali. Dal punto di vista del funzionamento adattivo, appaiono discretamente adeguate le autonomie personali, mentre appaiono ancora poco adeguate le autonomie nell'ambito della comunità e delle regole sociali. Il linguaggio espressivo non sempre è corretto, si rileva inoltre ecolalia.

Nel ricovero successivo (2012), dopo aver eseguito le opportune valutazioni, si fa diagnosi di “disturbo dello spettro autistico”

Nel 2014, vengono riferiti dai familiari comportamenti stereotipati e ritualistici. Inoltre, le autonomie di socializzazione risultano inferiori a quanto atteso in base all'età cronologica. Le abilità espressive e di scrittura appaiono buone; le abilità ricettive si delineano, invece, in ritardo per l'età cronologica. Il livello cognitivo risulta nella norma, omogeneo per performance e verbale.

### ***3.4 Risultati ottenuti attraverso la metodica array-CGH***

Dall'analisi generale del *database array IRCCS Fondazione Stella Maris*, il totale delle CNVs rilevate ammonta a 454.

Per quanto riguarda la patogenicità delle CNVs rilevate, 116 su 454 (25.6%) risultano patogene o probabilmente patogene, in base all'analisi del quadro clinico relativo e alla loro comparazione a database e studi preesistenti.<sup>50,51,52,53,54</sup>

Come si può evincere dall'analisi dei casi clinici affetti da sindrome Di George precedentemente riportati, le delezioni ritrovate variano in base alle loro dimensioni; quasi tutte, rientrano nel range delle delezioni tipiche (2.5- 3 Mb).

Per quanto riguarda l'ereditarietà, risulta essere stata al momento studiata soltanto in 5 casi, (A.M, A.E, C.G, F.M, V.G.) uno dei quali (V.G.) a segregazione materna, sebbene la madre sia asintomatica, ossia non presenti nessuna delle caratteristiche cliniche ascrivibili alla sindrome.

In 3 casi (A.E, C.G, F.M.) invece la delezione risulta *de novo*.

In un caso (A.M.), invece, è stata condotta l'indagine solo sulla madre, risultata negativa, mentre non è stato possibile estenderla al padre in quanto deceduto, per cui non è possibile definire se l'aberrazione sia originata *de novo*.

In un paziente (C.G.) è stata utilizzata la metodica FISH, poiché l'indagine è stata eseguita in un periodo antecedente all'ingresso sistematico in clinica della metodica array-CGH e poiché presentava un fenotipo clinico fortemente indicativo per questo tipo di patologia; successivamente si è comunque effettuata una miglior caratterizzazione della regione deleta attraverso l'array-CGH.

I risultati ottenuti dalle valutazioni neuropsicologiche e linguistiche evinte dall'analisi dei dati in cartella sono stati riportati nella presentazione dei singoli casi clinici e verranno discussi attraverso la comparazione dei dati della letteratura nel paragrafo seguente.

### ***3.5 Analisi del fenotipo neuropsicologico e confronto con la letteratura***

Andando a confrontare il fenotipo neuropsicologico del campione con quello riportato in letteratura, otteniamo i dati riportati in Tabella 3.

*Tabella 3 Confronto casi- letteratura*

<b>CARATTERISTICA</b>	<b>CAMPIONE</b>	<b>LETTERATURA</b> <sup>34,42,45</sup>
ID	5/8 (62.5%)	65% dei casi
Ritardo acquisizioni motorie	4/8 (50%)	50% dei casi
ADHD/ esauribilità attentiva	5/8 (62.5%)	25- 46% dei casi
Condotte oppositivo-provocatorie	5/8 (62.5%)	16- 43% dei casi
Tratti autistici	3/8 (37.5%)	50% dei casi
ASD	2/8 (25%)	14% dei casi
Disturbo del linguaggio	6/8 (75%)	79- 84% dei casi
Disturbo d'ansia	1/8 (12.5%)	17- 29% dei casi

Per quanto riguarda il fenotipo cognitivo-comportamentale emerso da questa analisi, si evince che è presente ID in 5 pazienti (A.M, A.E, C.G, F.M, S.M.G) di cui uno (F.M.) di grado lieve-moderato e gli altri di grado lieve. Il QI risulta migliore nell'ambito verbale piuttosto che in quello delle performance. In tutti è evidente un'area di debolezza maggiore in ambito logico-matematico e del ragionamento astratto, con conseguente difficoltà degli apprendimenti scolastici.

In letteratura, la ID è rilevabile nel 65% dei pazienti affetti da sindrome Di George. Le prestazioni risultano maggiormente deficitarie in ambito verbale piuttosto che in ambito non verbale.

L'esauribilità attentiva è rilevabile in 5 pazienti (A.L, A.M, F.M, M.S, V.G.), di cui uno (A.M.) con un quadro conclamato di ADHD, con prevalente deficit attentivo ed impulsività.

Le condotte oppositivo-provocatorie sono presenti in 5 pazienti (A.L, A.M, C.G, F.M, M.S.); si evidenziano soprattutto di fronte a richieste ostacolanti le proprie intenzioni oppure in seguito alla somministrazione di prove strutturate.

Questi aspetti (esauribilità attentiva e condotte oppositivo-provocatorie) risultano lievemente più frequenti nel campione in studio rispetto ai dati riportati in letteratura.

A 2 pazienti (A.L, V.G.) è stato diagnosticato un disturbo dello spettro autistico, mentre altri 3 (F.M, M.S, S.M.G.) mostrano solo la presenza di tratti autistici, quali tendenza all'isolamento e/o aspetti di inibizione sociale e/o interessi ristretti e ripetitivi.

In letteratura la percentuale di presenza del disturbo autistico sembra minore rispetto al nostro campione, ma la presenza di tratti autistici viene invece evidenziata più frequentemente.

Il disturbo del linguaggio è molto frequente in questi soggetti (A.L, C.G, F.M, M.S, S.M.G, V.G.): A.L. mostra deficit sia di tipo recettivo che espressivo con ecolalia, C.G. ha maggiori cadute su aspetti fonetico-fonologici (anche correlato alla presenza di disprassia oro-motoria), F.M. ha un deficit maggiore sul piano espressivo (limitato a suoni gutturali e raddoppiamenti sillabici) piuttosto che su quello ricettivo, M.S. presenta una produzione verbale spontanea limitata a frasi semplici, prodotte in maniera ripetitiva, con finalità richiestiva ma più frequentemente acontestuali e bizzarre, S.M.G. presenta un'importante inibizione comunicativa, per cui il linguaggio risulta difficilmente valutabile ma si evidenziano tratti di immaturità formale nel linguaggio espressivo, V.G. presenta deficit morfosintattico e fonologico, soprattutto sul piano espressivo.

Comparando il nostro dato sul linguaggio con quello della letteratura, appare in piena linea con quanto riportato.

Per quanto riguarda le comorbidity psichiatriche, A.M. presenta un disturbo d'ansia misto, sia generalizzato che di separazione, elicitato prevalentemente nei confronti della figura materna; si rileva inoltre un disturbo dell'umore ipotimico. M.S. si caratterizza per un'importante appiattimento affettivo con ampie oscillazioni del tono dell'umore e per un episodio psicotico regredito. S.M.G. presenta, invece, un tono dell'umore ridotto associato ad apatia e abulia; si rileva inoltre iperfagia con tendenza al "*binge eating*".

### **3.6 *Discussione***

Gli array analizzati sono in totale 1045; di questi 694 (66.4%) sono risultati negativi e 351 (33.6%) sono risultati positivi, cioè i soggetti in questione sono portatori di anomalie genetiche sbilanciate (CNVs).

Poiché tra i 351 positivi 87 (24.8%) risultano avere aberrazioni multiple, sia ereditate che *de novo*, il totale delle CNVs rilevate ammonta a 454.

L'ereditarietà dell'anomalia genetica è stata studiata in 194 CNVs su 454 (42.7%); nei restanti casi il bambino risulta adottato (7 casi, 1.5%) oppure l'analisi genetica a carico dei genitori risulta tuttora da eseguire o in corso di studio (253 casi, 55.7%).

Dei 194 studiati, in 156 (80.4%) è stata confermata l'ereditarietà per via materna o paterna, nei restanti 38 (19.6%) la CNV non è stata ritrovata in nessuno dei genitori; si parla pertanto di aberrazione *de novo*.

Rapportando questi dati alla letteratura<sup>10,11,49</sup>, in cui le percentuali di individuazione delle CNVs risultano comprese tra il 20% e il 25%, possiamo evidenziare come i nostri dati risultino lievemente superiori alla media.

Questo risultato potrebbe verosimilmente essere attribuito alla presenza di un campione molto ampio, essendo la IRCCS Stella Maris un centro di riferimento per questo tipo di patologie, e all'utilizzo di piattaforme array ad elevata risoluzione.

Riguardo alla patogenicità delle CNVs rilevate, 116 su 454 (25.6%) risultano patogene o probabilmente patogene, in base all'analisi del quadro clinico relativo e alla loro comparazione a database e studi preesistenti.<sup>50,51,52,53,54</sup>

Analizzando studi analoghi in letteratura<sup>10,11,49,55,56</sup>, si evidenziano dati molto differenti tra loro, compresi in una forbice molto ampia che va dal 5% al 35% dei casi. Le percentuali più basse risultano da studi condotti su popolazioni molto ampie e attraverso l'utilizzo di BAC-array<sup>55</sup>; le percentuali più elevate derivano, invece, da studi condotti su campioni molto ristrette e attraverso l'utilizzo di oligo-array.<sup>56</sup>

Avendo condotto uno studio su una popolazione vasta e con l'utilizzo di piattaforme array ad elevata risoluzione, si può pertanto affermare che i risultati ottenuti siano lievemente superiori a quelli riscontrati in letteratura. Si potrebbe comunque ampliare questo risultato,

con lo studio a carico delle figure genitoriali, poiché circa la metà risulta ancora da eseguire o in corso di studio.

Per quanto riguarda la sindrome Di George, in questa analisi è stata rilevata un'incidenza del 2.3%. Valutando studi analoghi in letteratura<sup>10,11,49</sup>, si evidenziano percentuali comprese tra il 1.5% e il 2.5%; va però sottolineato il fatto che tutti questi studi esaminano un campione più esiguo di pazienti. Si può quindi affermare che la sensibilità diagnostica ottenuta risulta maggiore, verosimilmente per la presenza di una popolazione selezionata.

Andando a confrontare i fenotipi neuropsicologici descritti nel paragrafo precedente con quelli presenti in letteratura<sup>34,42,45</sup>, si evince come gli aspetti maggiormente rilevanti siano la ID, il ritardo nell'acquisizione del linguaggio e delle tappe motorie, gli aspetti comportamentali e le comorbidità psichiatriche.

In letteratura, viene descritto un livello cognitivo variabile, compreso generalmente tra i limiti inferiori della norma e un deficit di grado lieve-moderato. Circa il 65% degli individui, presenta una disabilità intellettiva di tipo non verbale, con una discrepanza tra l'ambito delle performance e l'ambito verbale, che risulta migliore. Si rilevano inoltre difficoltà nelle aree della matematica, della memoria visuospatiale e del ragionamento astratto, che si associano frequentemente a ritardo negli apprendimenti scolastici. Questo è risultato anche dall'analisi dei casi sovrastanti.

Per quanto riguarda il linguaggio, la forma espressiva risulta difficoltosa, mentre le funzioni ricettive sono molto simili alla norma. Abbiamo evidenziato come facciano eccezione a questo i pazienti che presentano ASD, in quanto dimostrano in entrambi i casi anche un deficit di tipo espressivo.

Relativamente all'aspetto comportamentale, si presentano spesso quadri caratterizzati da ADHD, impulsività, condotte oppositivo-provocatorie, labilità attentiva. In circa il 50% dei casi, sono rilevabili tratti autistici, ad esempio interessi ristretti e ripetitivi, comportamenti stereotipati, difficoltà nelle interazioni sociali, condotte di isolamento. Nei casi in studio, i tratti autistici risultano meno frequenti, ma in due pazienti è stata fatta diagnosi di ASD.

Si possono inoltre avere comorbidità per difetti psichiatrici veri e propri, quali bipolarismo, schizofrenia/ disordini schizoaffettivi, disturbo d'ansia generalizzato. In questo studio è stata evidenziata la presenza di comorbidità psichiatriche quali disturbo d'ansia, riduzione del tono dell'umore e un episodio di tipo psicotico.

## ***Conclusioni***

L'analisi del *database array IRCCS Fondazione Stella Maris* ha rilevato la presenza di sbilanciamenti cromosomici in circa un terzo dei pazienti studiati, affetti da disturbi del neurosviluppo; la patogenicità delle CNV si evidenzia in circa il 25% dei casi.

Questo studio conferma l'evidenza dell'elevata sensibilità diagnostica della metodica array CGH nei pazienti con disturbi del neurosviluppo e/o anomalie congenite multiple considerati idiopatici, dimostrando come spesso siano in realtà causati da sbilanciamenti cromosomici submicroscopici.

Questo tipo di esame risulta molto utile, soprattutto in quei pazienti che non hanno un quadro clinico caratteristico (forme non sindromiche) e in cui altri esami volti alla caratterizzazione della patologia si siano rivelati negativi.

Su questa base, e anche alla luce del fatto che in alcuni pazienti Di George non c'era un fenotipo suggestivo, si può affermare come questo studio possa supportare le recenti evidenze rispetto alle possibilità diagnostiche nell'ambito della disabilità neuropsichica, anche laddove non ci sia un chiaro orientamento diagnostico. L'esame array può infatti svelare sia sindromi note ma con presentazione atipica che CNV di incerto significato (VOUS), che tuttavia potrebbero diventare significative qualora risultassero ricorrenti in una popolazione selezionata come ad esempio quella dell'IRCCS Stella Maris.

Si può quindi evincere quale sia l'importanza di allargare sempre più il test nella pratica clinica in soggetti con disturbi del neurosviluppo non meglio precisati

E' infine essenziale sottoporre a questo tipo di analisi anche i genitori dei pazienti affetti, per verificare la presenza di ereditarietà e quindi anche il rischio relativo di trasmettere lo sbilanciamento ad eventuali altri figli in un adeguato counseling genetico.



## ***Bibliografia***

1. Corsello G, Giuffrè M, Piccione M. (2013) Il neonato con anomalie congenite multiple: inquadramento e nosologia. *Prospettive in pediatria* 43: 149- 157
2. Priolo M, Laganà C. (2005) L'approccio al bambino con ritardo mentale e dismorfismi: la dismorfologia. *Quaderni acp online*:1- 8
3. Redin C, Gerard B, Lauer J, et al. (2014) Efficient strategy for the molecular diagnosis of intellectual disability using targeted high- throughput sequencing. *J Med Genet* 51: 724- 736
4. DSM-5. Manuale diagnostico e statistico dei disturbi mentali, Cortina 2014; da AIRiM, Linee guida per la definizione degli standard di qualità nei servizi per le disabilità in Italia. Assessment, interventi, outcomes, Aprile 2010.
5. Franco Fabbro, Manuale di neuropsichiatria infantile. Una prospettiva psicoeducativa, Carocci editore 2012
6. Chelly J, Khelifaoui M, Francis F, et al. (2006) Genetics and pathophysiology of mental retardation. *European Journal of Human Genetics* 14: 701- 713
7. Van Esch H, Bauters M, Ignatius J, et al. (2005) Duplication of the MECP2 region is a frequent cause of severe mental retardation and progressive neurological symptoms in males. *American Journal of Human Genetic* 77: 442- 453
8. Jones K.L, Jones M.C, Del Campo M. Smith's recognizable patterns of human malformation. 7 edition. Elsevier saunders 2013
9. [www.microgenomics.it/tecnologie/cariotipo-molecolare-array-cgh](http://www.microgenomics.it/tecnologie/cariotipo-molecolare-array-cgh)
10. Shoukier M, Klein N, Auber B, et al. (2013) Array CGH in patients with developmental delay or intellectual disability: are there phenotypic clues to pathogenic copy number variants? *Clinical Genetics* 83: 53- 65

11. Battaglia A, Doccini V, Bernardini L, et al. (2013) Confirmation of chromosomal microarray as a first- tier clinical diagnostic test for individuals with developmental delay, intellectual disability, autism spectrum disorders and dysmorphic features. *European journal of paediatric neurology* 17: 589- 599
12. Strachan T, Read AP (2010) Human Molecular Genetics: Garland Science.
13. Manning M, Hudgins L, et al. (2010) Array- based technology and recommendations for utilization in medical genetics practice for detection of chromosomal abnormalities. *Genet Med* 12: 742- 745
14. Freeman J.L, Perry G.H, Feuk L et al. (2006) Copy number variation: New insights in genome diversity. *Genome Research* 16: 949- 961
15. Hehir-Kwa JY, Pfundt R, Veltman JA, de Leeuw N. (2013) Pathogenic or not? Assessing the clinical relevance of copy number variants. *Clinical Genetics* 84: 415- 421
16. NP Carter (2007) Methods and strategies for analyzing copy number variation using DNA microarrays. *Nature genetics* 39: S16- S21
17. Freeman J.L, Perry G.H, Feuk L et al. (2006) Copy number variation: New insights in genome diversity. *Genome Research* 16: 949- 961
18. Miller D.T, Adam M.P, Aradhya S. et al. (2010) Consensus statement: chromosomal microarray is a first- tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *The American journal of human genetics* 86: 749- 764
19. [www.laboratorigenoma.it](http://www.laboratorigenoma.it)
20. [www.dnamicroarray.com/services\\_genomics\\_ngs.html](http://www.dnamicroarray.com/services_genomics_ngs.html)
21. Nigro V. (2015) La Next Generation Sequencing è entrata nella pratica pediatrica? *Prospettive in pediatria* 178: 137-142

22. Gregory S Liptak, (2008) Down Syndrome (Trisomy 21), su Merck Manual.
23. [www.orpha.net](http://www.orpha.net)
24. Giovanni Neri, Maurizio Genuardi, *Genetica umana e medica*, Elsevier, 2010
25. Yamada KA, Volpe JJ (1990) Angelman's Syndrome in Infancy. *Developmental Medicine & Child Neurology* 32: 1005–1011
26. Pelc K, Cheron G, Dan B. (2008) Behavior and neuropsychiatric manifestations in Angelman syndrome. *Neuropsychiatric Disease and Treatment* 4: 577–584
27. Weaving LS, Ellaway CJ, Gécz J, et al. (2005) Rett syndrome: clinical review and genetic update. *J. Med. Genet.* 42: 1–7.
28. Digilio M.C, Silvestri L.M, Dallapiccola B, et al. (2014) Le basi genetiche delle cardiopatie congenite. *Prospettive in pediatria* 175: 173- 186
29. Digilio M.C, Bernardini L, Consoli F, et al. (2013) Congenital heart defects in recurrent reciprocal 1q21.1 deletion and duplication syndromes: Rare association with pulmonary valve stenosis. *European Journal of Medical Genetics* 56: 144- 149
30. A. Battaglia (2005) Wolf-Hirschhorn (4p-) Syndrome. Management of genetic syndromes. Wiley Online Library
31. A. Battaglia (2008) The inv dup (15) or idic (15) syndrome (Tetrasomy 15q). *Orphanet Journal of Rare Diseases* 3: 30
32. Busè M, Giuffrè M, Martines M, et al. (2013) 16p11.2 microdeletion/microduplication syndrome: further characterization of a critical region for neuropsychiatric development. *Acta Medica Mediterranea* 29: 241
33. [www.netgene.it](http://www.netgene.it)
34. McDonald-McGinn D.M. and Sullivan K.E. (2011) Chromosome 22q11.2 Deletion Syndrome (DiGeorge Syndrome/Velocardiofacial Syndrome) *Medicine* 90, Number 1.

35. Shaffer L.G and Lupski J.L (2000). Molecular mechanisms for constitutional chromosomal rearrangements in humans. *Annu. Rev Genet* 34: 297- 329
36. Shaikh TH, O'Connor RJ, Pierpont ME et al. (2007) Low copy repeats mediate distal chromosome 22q11.2 deletions: sequence analysis predicts breakpoint mechanisms. *Genome Res* 17:482- 491.
37. Lindsay EA, Vitelli F, Su H, et al (2001) Tbx1 haploinsufficiency in the DiGeorge syndrome region causes aortic arch defects in mice. *Nature* 410:97- 101.
38. Xu H, Cerrato F, Baldini A. (2005) Timed mutation and cell-fate mapping reveal reiterated roles of Tbx1 during embryogenesis, and a crucial function during segmentation of the pharyngeal system via regulation of endoderm expansion. *Development* 132: 4387- 4395.
39. <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/TBX1>
40. Markert ML, Alexieff MJ, Li J, Sarzotti M et al. (2004) Complete DiGeorge syndrome: development of rash, lymphadenopathy, and oligoclonal T cells in 5 cases. *J Allergy Clin Immunol* 113: 734- 741.
41. Wang K, Yang Y, Shen F, et al. (2009) Utilization of three-dimensional computed tomography for craniofacial phenotypic analysis in children with velocardiofacial syndrome. *J Craniofac Surg.* 20: 2013- 2019.
42. Antshel KM, Aneja A, Strunge L, et al. (2007) Autistic spectrum disorders in velocardio facial syndrome (22q11.2 deletion). *J Autism Dev Disord.* 37: 1776- 1786.
43. Shashi V, Kwapil TR, Kaczorowski J, et al. (2010) Evidence of gray matter reduction and dysfunction in chromosome 22q11.2 deletion syndrome. *Psychiatry Res.* 181: 1- 8.

44. Simon TJ, Ding L, Bish JP, et al. (2005) Volumetric, connective, and morphologic changes in the brains of children with chromosome 22q11.2 deletion syndrome: an integrative study. *Neuroimage* 25: 169- 180.
45. Jansen PW, Duijff SN, Beemer FA, et al. (2007) Behavioral problems in relation to intelligence in children with 22q11.2 deletion syndrome: a matched control study. *Am J Med Genet A*.143: 574- 580.
46. “Fibre FISH protocol” dal Progetto Genoma Umano
47. Sorensen KM, Agergaard P, Olesen C, et al. (2010) Detecting 22q11.2 deletions by use of multiplex ligation-dependent probe amplification on DNA from neonatal dried blood spot samples. *J Mol Diagn*.12: 147-151.
48. McDonald-McGinn DM, Zackai EH. (2008) Genetic counseling for the 22q11.2 deletion. *Dev Disabil Res Rev*. 14: 69- 74.
49. Caramaschi E, Stanghellini I, Magini P et al. (2014) Predictive diagnostic value for the clinical features accompanying intellectual disability in children with pathogenic copy number variations: a multivariate analysis. *Italian journal of Pediatrics* 40: 39.
50. Caliebe A, Kroes HY, Van der Smagt JJ, et al. (2010) Four patients with speech delay, seizures and variable corpus callosum thickness sharing a 0.440 Mb deletion in region 1q44 containing the HNRPU gene. *Eur J Med Genet* 53: 179- 185.
51. Striano P, Malacarne M, Cavani S, et al. (2006) Clinical phenotype and molecular characterization of 6q terminal deletion syndrome: five new cases. *Am J Med Genet* 140: 1944- 1949.
52. Berg JS, Brunetti- Pierri N, Peters SU et al. (2007) Speech delay and autism spectrum behaviors are frequently associated with duplication of 7q11.23 William-Beuren syndrome region. *Genet Med* 9: 427- 441.

53. Dolan M, Mendelsohn NJ, Pierpont ME, et al. (2010) A novel microdeletion/microduplication syndrome of 19p13.13. *Genet Med* 12: 503- 511.
54. Giorda R, Bonaglia MC, Beri S et al. (2009) Complex segmental duplications mediate a recurrent dup (X) (p11.22- p11.23) associated with mental retardation, speech delay, and EEG anomalies in males and females. *Am J Hum Genet* 85: 394-400.
55. Ballif B.C, Rorem E.A, Sundin K, et al. (2006) Detection of low- level mosaicism by array CGH in routine diagnostic specimen. *Am. J. Med. Genet* 140: 2757- 2767.
56. Aradhya S, Manning M.A, Splendore A, et al. (2007) Whole- genome array CGH identifies novel contiguous gene deletions and duplications associated with developmental delay, mental retardation, and dysmorphic features. *Am. J. Med. Genet* 143A: 1431- 1441

## ***Ringraziamenti***

Al termine del mio percorso di studi, colgo l'occasione per ringraziare tutti coloro che ne hanno fatto parte.

In primis, ringrazio il professor Giovanni Cioni che, già dal periodo in cui ho seguito le sue lezioni, mi ha trasmesso la sua infinita passione verso la Neuropsichiatria Infantile e mi ha poi incoraggiato ad avvicinarmi a questo mondo.

Vorrei inoltre ringraziare la dott.ssa Roberta Battini e la dott.ssa Roberta Milone che mi hanno seguita con molta disponibilità in questo periodo e, nonostante i numerosi impegni, hanno contribuito attivamente alla realizzazione e alla stesura di questa tesi.

Infine, voglio ringraziare tutti coloro che hanno creduto in me.