



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI SASSARI
FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA
SCUOLA DI DOTTORATO IN SCIENZE BIOMEDICHE
Direttore Prof.E.Tolu
INDIRIZZO IN GENETICA MEDICA, NUTRIGENOMICA E MALATTIE DEL METABOLISMO
Responsabile Prof. F.Cucca

**LA METODICA NEXT GENERATION SEQUENCING NELLA DIAGNOSI DI
RITARDO MENTALE SINDROMICO:
PRESENTAZIONE DI DUE FAMIGLIE**

Tutor: Prof. F. Cucca

Dottorando: Dott.ssa Veronica Dessì

Anno accademico: 2010/2011

Questa volta....a me

INDICE

Il Ritardo Mentale	pag 4
Metodiche diagnostiche genetiche	pag 14
Scopo della ricerca	pag 18
Materiale e metodo	pag 20
Risultati	pag 21
Discussione	pag 54
Conclusioni	pag 57
Bibliografia	pag 59
Ringraziamenti	pag 63

IL RITARDO MENTALE

La condizione di ritardo mentale è ampiamente diffusa nella popolazione, con stime che variano a seconda degli autori, tra l'1 e il 3% di prevalenza (American Psychiatric Association) e il 2 e 10% (Majnemer, 1995); tale quota è da intendersi sottostimata, in relazione ai casi di funzionamento cognitivo limite o ritardo mentale di grado lieve che di fatto non sono mai stati sottoposti a controlli specifici, in quanto "funzionanti" socialmente.

Il ritardo mentale (RM) è una condizione clinica estremamente eterogenea che contempla la presenza di un malfunzionamento del Sistema Nervoso Centrale con conseguente difficoltà intellettiva, che comporta turbe di personalità e della capacità di adattamento sociale. E' un disordine del neurosviluppo presente in tutte le popolazioni e in ogni classe sociale.

L'intelligenza è quel complesso sistema che permette il ragionamento logico-deduttivo, la programmazione e risoluzione dei problemi (problem solving), l'astrazione, la comprensione, sia in relazione alla didattica che all'esperienza del quotidiano (generalizzazione delle informazioni).

E' fondamentale infatti considerare che per definirsi un quadro di ritardo mentale devono essere contemporaneamente presenti, non solo il criterio di difficoltà cognitiva strutturata entro i diciotto anni d'età (con intelligenza "pura" almeno due deviazioni standard al di sotto della media), ma anche delle limitazioni del vivere quotidiano, quali comunicazione, cura della persona, vita familiare, interazione sociale, sfruttamento delle risorse della comunità, tutela della propria salute e sicurezza (American Psychiatric Association, 2001); va da sé che la sottostima del fenomeno è riconducibile a quelle fasce di popolazione "ai margini" che faticano a ricondurre la genesi dei propri epifenomeni sociali a vere e proprie turbe organiche.

Per ciò che concerne l'intelligenza è stimata una ereditarietà del 50%, secondo un modello poligenico di almeno 20 geni (Thapar e coll., 1994), su cui incidono numerosi fattori ambientali, quali educazione, alimentazione,

contatti sociali, legami affettivi, ecc (Thizard, 1975; Schiff e Lewontin, 1986; Megue e coll., 1993).

Il ritardo mentale è comunemente classificato in base al livello di Quoziente Intellettivo: il limite inferiore che definisce ai test psicometrici la condizione di RM è 70 (DSM IV-TR) o 75 (ICD-10): circa l'85% dei casi di ritardo mentale osservabili riconosce un livello lieve con Q.I. tra 70 e 50-55; il 10% presenta un ritardo moderato, compreso tra 50 e 35-40; il 3-4% presenta un ritardo mentale grave, con Q.I. compreso tra 35 e 20-25; il rimanente 1-2% dei casi è affetto da ritardo mentale profondo con Q.I. inferiore a 20.

I casi di ritardo mentale profondo, grave e moderato hanno stime estremamente attendibili, venendo diagnosticati nella primissima fase della vita dell'individuo; i casi lievi o limite giungono all'osservazione del clinico per lo più in relazione al disadattamento e all'improduttività scolastica, quindi generalmente tra i 6 e i 12 anni d'età, quando le richieste ambientali sono superiori alle capacità di risposta dell'individuo. E' stimata una prevalenza dei maschi rispetto alle femmine con rapporto di 1,5:1 in relazione verosimilmente alle patologie legate alle forme ereditarie X-linked.

L'eziopatogenesi del ritardo mentale è ascrivibile a condizioni pre-peri o postnatali in un 35% circa di casi: tra queste possono riconoscersi prematurità, infezioni, cromosomopatie, malformazioni congenite del SNC, patologie materne o esposizione a sostanze tossiche. Talvolta si assiste ad un sovrapporsi di eventi, con multicausalità (ad esempio la più facile genesi di prematuranza in corso di patologie gravidiche o abuso di sostanze) con possibile effetto somma dei vari eventi .

Nello specifico tra le cause prenatali i disordini genetici costituiscono una parte considerevole delle cause prenatali, venendo generalmente suddivisi in tre tipi principali: cromosomopatie (4-28%), anomalie di singoli geni e malattie multifattoriali e poligeniche; queste ultime sono le più frequenti

ma anche le meno definite in quanto correlate all'interazione fra fattori ereditari predisponenti e fattori ambientali. Un ultimo gruppo è quello delle malattie monogeniche, quali le malattie metaboliche, neuromuscolari, neurocutanee e malformative autosomiche dominanti, recessive o X-linked. Tra le cause prenatali grande importanza è ricoperta dalle malattie malformative del SNC, sovente associate a quadri multisintomatici quali il grave ritardo mentale, anomalie motorie ed epilessia spesso farmacoresistente (Schafer e Bodensteiner, 1992): tali condizioni derivando da difetti dei processi di sviluppo delle strutture nervose o dall'azione di eventi infettivi esterni. Ancora le malattie della gestante sono causa di quadri complessi, così come l'azione teratogena di tossici, radiazioni o farmaci. Anche il diabete, i distiroidismi, le patologie d'organo e la malnutrizione materna possono determinare malattie croniche associate a RM nel nascituro.

Le cause perinatali che più frequentemente si osservano nella gestione della diagnosi del RM si riconoscono l'asfissia con conseguente danno ipossico-ischemico o emorragico, la prematurità, l'ipoglicemia neonatale, l'insufficienza placentare, i traumi da parto, le infezioni meningitiche ed erpetiche.

Quando la noxa patogena agisce in fase post-natale il più delle volte si riconosce un agente infettivo (meningiti, encefaliti, patologia organica) o traumatico riconoscibile; nelle condizioni in cui il ritardo è conseguenza di patologia comiziale, è da ritenersi comunque riconducibile ad alterazione genetica anche quando non è possibile individuare l'anomalia di base (ovviamente nei casi in cui non vi è secondarietà dell'epilessia). Spesso le neoplasie a carico del SNC può esitare in RM, più o meno associato a deficit motori ed epilessia. Non da ultimo la discuria, l'incuria o i maltrattamenti agiscono con effetto di deprivazione nella genesi del RM; un ulteriore quota di casi, a diagnosi tardiva (spesso adolescenziale) è rappresentata dai decadimenti cognitivi correlati alle psicosi.

La maggior parte delle volte la causa del ritardo mentale rimane sconosciuta a lungo e ricondotta solo dopo lunghi processi diagnostici a causalità genetica di certezza o probabilità.

A tutt'oggi comunque il 30% almeno delle condizioni di ritardo mentale, soprattutto nelle forme lievi, rimane ad eziopatogenesi ignota, in relazione alla difficoltà di individuare sindromologicamente e/o geneticamente il danno alla base, o in quanto il ritardo è da ricondursi a fattori multipli la cui incisività nella genesi della patologia non è determinabile con certezza (ad esempio la deafferentazione psico-fisica, il maltrattamento, ecc).

Tabella 1: cause di RM (da Swaiman e Ashwal, 1999)

CAUSE PRENATALI	CAUSE PERINATALI	CAUSE POSTNATALI
Disordini genetici	Encefalopatia ipossico-ischemica	Infezioni
Teratogenesi	Prematurità	Accidenti cerebrovascolari
Malformazioni congenite	Ipoglicemia neonatale	Danni al SNC
Malattie materne	Insufficienza placentare	Traumi
Malnutrizione materno-fetale	Infezioni /iperbilirubinemia	Neoplasie
	Traumi da parto	Problemi psico-sociali

Tutte le forme di ritardo mentale comportano anomalie comportamentali, spesso di ambito psichiatrico, fino alla presenza di veri e propri "fenotipi comportamentali".

Quadro generale delle cause di ritardo mentale (Curry e coll., 1997)	%
Anomalie cromosomiche	4-28
Sindromi riconoscibili	3-7
Condizioni monogeniche riconosciute	3-9
Anomalie strutturali del SNC	7-17
Complicazioni da prematurità	2-10
Teratogenesi	5-13
RM legato a fattori culturali/familiari	3-12
Sindromi monogeniche	1-5
Cause metaboliche/endocrine	1-5
Sconosciute	30-50

Il ritardo **mentale sindromico** (MCA/MR) è una condizione che si evidenzia come associazione di più segni malformativi maggiori e/o minori, ivi comprese le turbe di accrescimento staturo-ponderale, e le peculiarità della facies, nonché le specificità cognitivo-comportamentali.

Una sindrome è un insieme di sintomi ciascuno dei quali può non essere significativo, ma che unito agli altri può essere ricondotto ad un quadro clinico riconoscibile.

Ovviamente per potersi riconoscere una ipotesi sindromica è fondamentale che si proceda all'applicazione di un attento protocollo di indagine, che parte elettivamente dalla valutazione dismorfologica del probando, dalla analisi dell'albero genealogico, alla ricerca di segnali organici e comportamentali che possano suggerire o corroborare una ipotesi. In genere non esiste un tratto dismorfico patognomonico di una sindrome, ma un insieme di tratti aspecifici possono definire facies o habitus peculiari che di per sé possono "essere sufficienti" alla diagnosi (ad es. Sdr Down).

La distinzione tra RM semplice e RM sindromico è spesso difficile in quanto le anomalie neuologiche, psichiatriche e somatiche possono essere apparentemente poco significative e prendere forma solo dopo attenta ricerca di segni e/o sintomi ricercati ad hoc. E' grazie all'avvento di nuove metodiche di indagine genetica che molte forme di RM dapprima considerati idiopatici hanno attualmente una diagnosi di certezza.

Le sindromi e le malformazioni congenite multiple associate a ritardo mentale (MCA/MR) sono oggetto di studio della dismorfologia, branca della genetica clinica che studia e interpreta i segni dismorfici e malformativi dell'individuo affetto, che determinano fenotipi clinici somatici dissimili da quelli dei familiari non affetti (Hunter, 2002).

La sindromologia è quella branca della neuropsichiatria infantile e della pediatria che studia le correlazioni tra il fenotipo clinico e comportamentale e le cause ad esse sottese, ipotizzando diagnosi genetiche e valutando la

prognosi correlata e il trattamento riabilitativo da intraprendere. Va da sé che la sindromologia e la genetica devono percorrere un cammino comune al fine di stabilire la corretta interpretazione degli epifenomeni individuati negli affetti.

Il RM sindromico può derivare da modificazioni più o meno evidenti a carico del DNA, acquisite de novo dall'individuo o ereditate dai genitori.

Compito della genetica è individuare la mutazione causa di patologia, definire le modalità con cui questa determina il danno, verificare l'origine della mutazione e quindi stabilire il meccanismo di trasmissione. La definizione genetica di una condizione comporta da una parte l'esecuzione di una prognosi e la previsione del percorso di prevenzione dei problemi, dall'altra permette lo studio "microscopico" dei meccanismi intracellulari che determinano l'espressione macroscopica della malattia.

Fondamentale ai fini della comprensione dell'eziopatogenesi è la ricerca all'interno delle generazioni antecedenti l'affetto, di condizioni patologiche o para-fisiologiche che possano suggerire un eventuale modello di trasmissione mendeliana; potremmo così osservare patologie ereditate attraverso la X, quindi evidenti nei maschi affetti e presenti in stato di eterozigosi nella femmina (portatrice). Le forme legate all'X possono così apparire recessive nel loro modello di trasmissione, passando di padre in figlia e da madre a figlio (malato) o a figlia (eterozigote o affetta se anche il padre ha l'X patologica): tale evidenza benchè rara, non è insolita nei casi di consanguineità o nelle fasce deboli della popolazione. Sttualmente si conoscono oltre 200 forme di RM legato all'X, con più di 90 geni coinvolti a vario titolo nel determinismo di tali patologie.

Quando la trasmissione è di tipo dominante si dovrà trovare nell'albero genealogico la presenza di segni di malattia nelle linee materna o paterna: il non verificarsi di ciò deve condurre a ipotizzare la presenza di una penetranza incompleta, di una mutazione de novo o di una non paternità.

Le forme autosomiche recessive si verificano quando la malattia è presente

in stato di eterozigosi in entrambe i genitori, addivenendo ad una omozigosi o ad una eterozigosi composta se i due alleli trasmessi contengono mutazioni diverse che rendono il gene disfunzionale.

Per *mutazione* si intende un cambiamento nella sequenza del DNA (organizzato su 23 cromosomi), che talvolta può determinare una relazione di causa effetto tra genotipo e fenotipo, con comparsa di malattia. Talvolta la mutazione si realizza in un polimorfismo, ossia una variante parafisiologica di quanto precedentemente presente (1% circa della popolazione). Più raro è il determinarsi di una mutazione ad effetto positivo (miglioramento dello statu quo ante), che peraltro è un concetto che deve essere preso in considerazione, basti pensare alle teorie evolutive o alla presenza di malattie che ostacolo il comparire di altre. La mutazione è dunque un processo di cambiamento da uno stato ad un altro, a prescindere dall'effetto che determina; tale cambiamento è da intendersi come permanente, a carico della sequenza nucleotidica del DNA. Oltre alla struttura primaria si possono verificare cambiamenti "minori", epigenetici, come ad esempio la metilazione.

E' dato assodato che il DNA è una struttura molto fragile che va incontro a danni e cambiamenti continui, tenuti sotto controllo e quindi riparati costantemente: ogni ciclo cellulare vede circa 6 miliardi di basi duplicare fedelmente al fine di conservare le informazioni in esse contenute. Si potranno quindi osservare mutazioni somatiche o germinali, cromosomiche, subcromosomiche o puntiformi, tutte con o senza effetto fenotipico (sia esso legato al gene mutato o alla funzione lesa).

La trasmissione di una mutazione somatica ai discendenti si traduce in un mosaicismo generalizzato o germinale; in quest'ultimo caso l'ulteriore trasmissione determinerà effetti più evidenti, in quanto tradotti a tutte le linee cellulari. Alcune mutazioni sono tipiche delle linee germinali femminili, sovente con caratteristiche di grossolanità (cromosomiche o subcromosomiche, trisomie), altre sono più frequenti nei maschi e

generalmente sono mutazioni puntiformi, dato l'alto numero di turnover a carico dello spermatozoo (circa 25 volte superiore al ciclo dell'ovocita).

Le mutazioni grossolane, cromosomiche, possono verificarsi a carico del numero o della struttura: saranno numeriche le mutazioni per aumento o riduzione di una intera molecola di DNA (triploide, poliploide, aneuploide); le mutazioni che coinvolgono la struttura derivano da rotture cui consegue un ripristino anomalo (delezioni, inversioni, duplicazioni, traslocazioni) bilanciato o sbilanciato.

Quando la mutazione è puntiforme, l'effetto che determina potrà essere più o meno evidente a seconda della localizzazione, ad esempio se colpisce un sito dinamico o fragile. La maggior parte delle mutazioni ha effetti apparentemente non visibili nel nascituro, determinando ad esempio un aumentato rischio di tumorizzazione in età adulta; in questo caso potremo avere un gene mutato in quanto il gene colpito perde o acquista una funzione (gene oncosoppressore o protooncogene).

Le mutazioni osservabili in base all'effetto che hanno su un individuo, possono essere classificate come dominanti o recessive o X-linked, a seconda che un solo gene o entrambe siano coinvolti nel determinismo dell'effetto. Lo stato di eterozigosi per una mutazione comporta un effetto nullo o paucisintomatico; di contro lo stato di omozigosi o di mutazione dominante è sempre associato ad un effetto evidente sul funzionamento di un dato gene. Di contro un gene sottoposto ad imprinting si comporterà come un effetto dominante o omozigote, pur essendo in emizigosi. Anche l'effetto dominante potrà poi variare per penetranza.

E' altresì fondamentale ricordare che l'effetto varierà anche in base al contesto di inserimento dell'individuo, alla presenza quindi di fattori favorenti l'azione del gene (basti pensare al fumo di sigaretta) secondo un meccanismo multifattoriale e probabilistico.

All'interno del grande capitolo dei RM sindromici ampio rilievo è dato alle **sindromi doppie**, con associazione di un disturbo dello spettro autistico ad

una data sindrome.

L'autismo è una grave alterazione del comportamento caratterizzata da deficit nell'interazione sociale, nella comunicazione verbale e non verbale, ripetitività e stereotipia di interessi e comportamenti. Maggiormente incidente nel sesso maschile, con un rapporto M-F di 4 a 1, l'autismo è spesso associato ad un deficit cognitivo di grado variabile. Tipicamente nelle forme di autismo con Q.I. normale o limite, l'intelligenza risulta danneggiata prevalentemente nella componente delle performance, essendo significativo il divario tra il sapere e il saper fare. Circa il 60% degli affetti da DA presenta peraltro difficoltà maggiori, con compromissione cognitiva evidente.

Nel corso degli anni la scienza ha cercato di risolvere l'enigma dell'eziologia dell'autismo, ipotizzando vari meccanismi poligenici che concorrono al determinismo di tale fenotipo cognitivo-comportamentale.

Spesso l'autismo si associa a condizioni sindromiche note, per le quali è previsto un fenotipo comportamentale non necessariamente autistico, basti pensare alla sindrome di Down o alla sindrome dell'X-fragile; peraltro vi sono condizioni sindromiche dove il comportamento autistico è caratteristica tipica dell'anomalia genica, ma non è ben chiaro se occorra anche ai sensi di Legge, sottolineare l'esistenza di tale patologia o sottintenderla nel quadro patologico globale, basti pensare alla sindrome di Rett.

E' peraltro vero che si ipotizza una genesi genetica anche per le forme non chiaramente sindromiche, in relazione alla sussistenza di elevata concordanza tra gemelli omozigoti, familiarità elevata per patologie dello spettro autistico nei probandi, maggiore rischio di ricorrenza nei fratelli. E' segnalato anche un "comportamento autistico" nella coppia genitoriale, ma è difficile valutare con certezza se si tratti di una causa o piuttosto di una conseguenza adattiva.

Recentemente è dato ampio spazio all'importanza di mutazioni di famiglie

di geni quali le neurologine, neurorexine e ubiquitine coinvolte nei meccanismi di adesione cellulare, nel determinismo delle forme di DA; parimenti la vulnerabilità cellulare allo stress ossidativo con danno conseguente e le disfunzioni a carico di sinapsi e dendriti sono implicati nell'eziopatogenesi dell'autismo non sindromico. Resta però da verificare allora in che modo si sviluppi un fenotipo autistico in una sindrome nota o se si debba considerare indipendenti le due patologie.

Nelle forme di ritardo mentale sindromico associato a disturbo autistico (sindromi doppie) deve esistere un legame genetico tra il determinismo del fenotipo comportamentale autistico e le anomalie cognitive e fisiche, ma tale vincolo non deve essere obbligato, indi per cui la sindrome può presentarsi con fenotipo comportamentale non autistico.

METODICHE DIAGNOSTICHE GENETICHE

Il cariotipo standard è il primo strumento nella diagnosi di RMS: permette di escludere la presenza di anomalie di numero o di struttura dei cromosomi, dalle aneuploidie, alle monosomie, alle trisomie, così come la presenza di ampie delezioni, duplicazioni, inversioni, traslocazioni, cromosomi ad anello.

Viene eseguito su campione di sangue periferico per la verifica dei linfociti, biopsia cutanea per analisi dei fibroblasti, biopsia testicolare per la verifica della meiosi nell'uomo, e nel caso di diagnosi prenatale, su villi coriali o liquido amniotico.

Il cromosoma è organizzato in braccio lungo (q), centromero, braccio corto (p) e i telomeri, ossia le porzioni terminali di ciascun braccio. Le metodiche di più comune utilizzo colorano il cromosoma in bande chiare e scure, G e Q; il bandeggio standard prevede una risoluzione di circa 550 bande per corredo aploide. Il limite del cariotipo standard è la bassa risoluzione, consentendo infatti di riconoscere solo anomalie strutturali superiori a 10-15 Mb.

L'ibridazione in situ con sonda fluorescente (FISH) viene utilizzata per "illuminare" le microalterazioni del DNA attraverso sonde marcate per sequenze note: l'utilizzo di tale tecnica è vincolata a quelle condizioni in cui è posta clinicamente una diagnosi genetica nota, per cui è commercializzata l'apposita sonda.

Recentemente è stato ampliato l'utilizzo della tecnica FISH con l'introduzione della metodica dei riarrangiamenti subtelomerici: l'utilizzo di FISH multiple specifiche per le porzioni terminali dei cromosomi permette di localizzare le anomalie di tali sedi, fortemente cariche di geni e soggette a frequenti riarrangiamenti più o meno patogeni (De Vries BBA et al, 2003).

L'analisi molecolare è una metodica che studia le anomalie di singoli geni

patogeni. Anche in questo caso deve preesistere una specifica diagnosi clinica, per cui è stato individuato il gene (o i geni) responsabile di malattia. Qualora ad una condizione sindromica corrispondano più geni patogeni, l'indagine partirà dal gene maggiormente imputato in termini di frequenza, per procedere ai successivi qualora la gestalt clinica sia fortemente suggestiva per la patologia indicata.

Dato l'elevato numero di malattie genetiche è ad oggi impossibile la conoscenza di tutti i geni responsabili di patologie.

L'ibridazione comparativa genomica CGH-Array è lo studio approfondito dei cromosomi attraverso il cariotipo molecolare: è stata sviluppata al fine di identificare le anomalie di numero o struttura o le numer copy variant di piccole porzioni di cromosomi. La tecnica permette la comparazione quantitativa del DNA in esame con un DNA di riferimento considerato sano. Le molecole di DNA vengono marcate diversamente, generalmente in fluorocromo rosso il probando e in fluorocromo verde il reference; mescolati e fatti incubare (ibridazione) su un microarray, un vetrino sul quale sono poste sonde di DNA rappresentanti una specifica regione del genoma. A seconda del tipo e del numero delle sonde di DNA utilizzate varia il potere risolutivo dell'array, tra 1 e 100 Mb. Una volta posti a contatto e legati tra loro, vengono verificati da uno scanner capace di leggere la fluorescenza prodotta e trasferirla ad un software che la analizza in termini di localizzazione e contenuto genico, verificando quindi la compatibilità con l'effetto fenotipico prodotto.

Il sequenziamento esonico è una tecnica che rende possibile l'identificazione delle mutazioni casuali nei soggetti con RM sindromico; permette l'identificazione di forme monogeniche attraverso la lettura degli esoni e siti di splicing principalmente coinvolti nelle malattie per cui diventa possibile una mappatura specifica in caso di forte sospetto fenotipico. Un esempio di diagnosi genetica ottenuta attraverso tale metodica è la determinazione della sindrome di Kabuki (MLL2, chr 2).

Purtroppo a tutt'oggi tale metodica tende ancora a perdere informazioni dagli esoni generati, per una incompleta profondità di sequenziamento degli esoni e una discreta frequenza di errori di lettura (falso positivo/negativo) legati alle varianti dei singoli individui.

La metodica next generation sequencing rappresenta un'evoluzione del sequenziamento esonico, attraverso una maggiore capacità di analisi di sequenze nucleotidiche; è basata sull'utilizzo di genechip arrays che permettono di analizzare contemporaneamente più di 1,8 milioni di marcatori per variazioni genetiche. Questa metodica permette di identificare delezioni e/o duplicazioni molto piccole, che verranno successivamente valutate tramite database bioinformatici, al fine di comprendere la patogenicità della mutazione osservata.

Esistono infatti dei database di pubblica utilità, quali ad esempio il Toronto Database of Genomic Variant o lo Human Structural Variation Database per i polimorfismi, e il Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl, che contengono informazioni essenziali circa il contenuto e la funzione lesa di migliaia di mutazioni osservate. L'esistenza di una rete di reciprocità tra i genetisti a livello mondiale permette l'utilizzo e il continuo aggiornamento di queste mappe. Ad oggi è stato istituito un network italiano per l'analisi dei dati NGS, secondo le direttive del Cost Action BM 1006.

Qualora nei nostri probandi venga identificata una mutazione o CNV potenzialmente patogeno, questa verrà validata tramite una tecnica FISH o PCR per confermare il risultato, nonché verificata la correlazione con pari anomalie eventualmente presenti nei genitori; successivamente in base al gene coinvolto e al suo ruolo nella regolazione cellulare, verrà verificata la correlazione eziopatogenetica con il ritardo mentale e le anomalie congenite multiple osservate. La metodica NGS è in grado di riconoscere duplicazioni genomiche molto piccole, microdelezioni, nonché malattie X linked in questo caso attraverso la lettura della intera X.

E' noto che le mutazioni patogene sono nella maggior parte dei casi mutazioni missense che cambiano un aminoacido o introducono un codone di stop o inseriscono un frameshift che altera la sequenza aminoacidica. NGS permette di valutare "alla cieca" la presenza di forme non altrimenti inquadrabili, attraverso l'osservazione comparativa dei dati, tra probando e genitori, in riferimento alla presenza di varianti "fisiologiche" di un gene quindi già note come tali, e geni disfunzionali. Questa metodica peraltro risulta avere problemi e vantaggi: le difficoltà sono riconducibili in primis alla lunga durata dell'indagine; se infatti è possibile riconoscere condizioni già note, qualora compaiano mutazioni non descritte, è necessario dare significatività genotipo-fenotipo a quanto osservato, affidandosi alla difficoltà intrinseca all'interpretazione dei dati ottenuti. Ancora, un problema della tecnica NGS è legata al costo, molto maggiore rispetto al sequenziamento esonico, legato per lo più all'elevato costo di creazione di algoritmi di lettura; inoltre eticamente risulta ancora difficile comprendere come porsi quando si scopre la copresenza di condizioni non oggetto di studio, potenzialmente predisponenti ad altre condizioni patologiche, come ad esempio quelle neoplastiche. Se infatti da un lato la conoscenza anticipata può favorire un percorso di prevenzione, questa può determinare da un lato un severo impatto emotivo, dall'altro limitazioni alla libertà del singolo individuo rispetto alle proprie scelte di vita.

Ovviamente i vantaggi sono legati alla certezza di diagnosi e quindi di terapia in caso di mutazioni genetiche; inoltre NGS permetterà una progressiva crescita e ampliamento delle scoperte in ambito di ricerca scientifica con notevole impatto sulla qualità di vita e sui costi legati alla assistenza sanitaria della popolazione.

SCOPO DELLA RICERCA

Scopo del presente lavoro è quello di verificare l'impatto della nuova metodica di indagine genetica, next generation sequencing, nel processo diagnostico dei ritardi mentali sindromici. La maggior parte delle condizioni di RMS non trova chiare cause eziopatogenetiche, con conseguenti limitazioni in termini di prognosi quoad vitam, interventi diagnostico-terapeutici mirati e possibilità di rischio di ricorrenza. Benchè le sindromi polimalformative con ritardo mentale ad eziologia genetica rappresentino (rispetto ad altre malattie) una condizione rara, determinano sempre un forte impatto sociale, notevole disagio e coinvolgimento emozionale in coloro che a vario titolo devono interagire con esse. Non da ultimo sono causa di costi molto elevati in termini di diagnosi e riabilitazione, per cui la corretta conoscenza dei meccanismi determinanti le stesse può determinare una svolta nella presa in carico dei pazienti affetti.

L'assenza di diagnosi comporta inoltre severe limitazioni nella organizzazione della vita delle famiglie colpite da RMS anche in termini di pianificazione e progettazione futura, nonché spese eccessive per il SSN in termini di indagini diagnostiche e dispersione delle risorse umane.

L'applicazione di protocolli di indagine mirata in termini genetici permette di abbreviare i tempi di indagine, fornire risposte adeguate e procedere alla diagnostica dismorfologica inversa, ossia riconoscere i segni peculiari della malattia a partire dalla sua identificazione chiara in termini di errore genetico. Inoltre la conoscenza del danno genetico può favorire la conoscenza dell'evoluzione della patologia, permettendo un approccio di tipo preventivo sulle complicanze attese.

La situazione di insularità comporta in Sardegna il riscontro di numerosi casi di ritardo mentale sindromico, in relazione alla consanguineità e alla conservazione di mutazioni patogene in relazione alla scarsa modificazione

della "razza" soprattutto in alcune aree geografiche per assenza di flussi migratori.

Inoltre è a tutt'oggi difficile stabilire quanto i tossici ambientali, basti pensare al poligono di Quirra o alla base Nato de La Maddalena, possano aver influito nel determinismo di nuove mutazioni sulle linee germinali.

L'insularità e la crisi economica (reiterata nel tempo) determinano inoltre importanti limitazioni nelle risorse strumentali e laboratoristiche a disposizione degli specialisti ai fini diagnostici.

Il riconoscimento della validità e dell'efficacia di nuove piattaforme di indagine genetica, disponibili in forma di ricerca scientifica in Sardegna (CNR di Cagliari), può rappresentare la soluzione a tali problematiche: qualora infatti venisse riconosciuta l'importanza della metodica *Next Generation Sequencing* nella diagnosi del ritardo mentale sindromico si potrebbe quantificare la disponibilità di tale risorsa e i costi ad essa connessi in relazione ai benefici (con opportuni protocolli tra AOU e Regione), bypassando le spese che attualmente, in termini morali ed economici, conseguono al ricorso continuo alle risorse laboratoristiche di strutture sanitarie extraregionali.

Si è consapevoli che l'utilizzo delle tecnologie per lo studio del genoma umano abbia importanza maggiore in termini di impatto socio-economico per le malattie a larga diffusione (cancro, diabete, ecc), ma l'auspicio è quello di trovare una nicchia capace di "adottare" in termini diagnostici e quindi prognostici le malattie rare.

MATERIALE E METODO

Si ha avuto accesso all'elevata casistica di famiglie con storia di ritardo mentale sindromico, disponibile presso l'Istituto di Neuropsichiatria Infantile di Sassari, con particolare riferimento ai pazienti in carico all'ambulatorio Sindromologico del medesimo Istituto.

Tra questi è stato scelto di selezionare le famiglie dove erano presenti figli affetti da medesima patologia, con espressione quanto più sovrapponibile possibile; criterio di inclusione era la presenza di ritardo mentale nella fratria, la concomitanza di malformazioni e/o anomalie congenite multiple, peculiarità comportamentali. Un secondo fondamentale criterio era la non consanguineità tra i genitori, i quali si dovevano presentare privi di ritardo mentale e esenti dalle peculiarità fisiche individuate nei figli. Per tutti doveva già essere stato attuato un attento protocollo di indagine con insuccesso diagnostico mediante l'esecuzione di cariotipo standard, X-Fragile, CGH-Array. Sono state così selezionate due famiglie: la prima è caratterizzata dalla presenza di RMS nel 50% dei figli (due su quattro), entrambi affetti da malformazioni multiple gravi; la seconda vede la presenza di RMS nel 100% dei figli (due su due) con dismorfismi multipli, epilessia giovanile severa e comportamento gravemente autistico. I figli affetti sono stati così sottoposti a visita neurologica, esame obiettivo e analisi del contenuto delle cartelle cliniche a disposizione. Dei probandi è stata fatta videoregistrazione e mappa fotografica dei dismorfismi, previa autorizzazione dei genitori alla ripresa senza copertura degli occhi.

Ai pazienti, così come ai loro genitori, sono stati prelevati 15 ml di sangue in EDTA e/o eparina al fine di estrarre DNA e RNA presso i laboratori di Genetica dell'Università degli Studi di Sassari; dal materiale estratto si è proceduto a sequenziamento genico, presso i laboratori del INN-CNR di Cagliari, tramite genechip arrays 6.0 Affymetrix per identificare Copy Number Variants (CNVs) o disomie uniparentali (USD)

RISULTATI

Caso clinico 1: fratelli M e G

La prima famiglia che è stata ritenuta significativa ai fini della nostra ricerca è costituita da sei elementi, genitori e quattro figli, di cui due sani e due affetti da ritardo mentale e anomalie congenite multiple, con fenotipo cognitivo-comportamentale non autistico.

All' Anamnesi Familiare i genitori non sono consanguinei; la madre è affetta da discopatia, ipoacusia bilaterale pantonale da otosclerosi, stenosi delle arteria succlavia sn >70%, noduli tiroidei; il padre è affetto da neuropatia tossico-carenziale per pregressa storia di potus. Entrambe i genitori sono cognitivamente normale e inseriti socialmente. La fratria è composta da quattro figli; è riferito un aborto spontaneo prima dell'ultima gravidanza. I due figli maggiori sono in buona salute, di contro gli ultimi due figli sono affetti da ritardo mentale e sindrome polimalformativa. I fratelli maggiori hanno presentato entrambe paralisi transitoria del VII nervo cranico; la secondogenita inoltre presenta dermatite psoriasica e verosimile diatesi allergica, nonché fistola anorettale recidivante.

In linea materna è riferita epilessia (nonno) di nnd, midriasi fissa e cisti poroencefalica (cugina).

In linea paterna è presente ritardo del linguaggio e ipoevolutismo somatico nonché patologia psichiatrica (cugini). E' negata la presenza di familiari e ascendenti con anomalie simili a quelle dei probandi anche in forma attenuata.

Anamnesi fisipatologica M.S.: M. è terzogenito; nasce nel marzo del 1986 quando la madre e il padre hanno rispettivamente 26 e 27 anni. La gravidanza decorre con tabagismo, senza alcuna evidenza di patologia. Il parto viene espletato in urgenza alla 31° settimana di gestazione per rottura delle membrane; si presenta distocico per presentazione podalica e prolasso del funicolo; l'Apgar al 1' minuto è 5 per cui viene intubato e ventilato per

30 minuti circa. Ricoverato per prematuranza per due mesi, il decorso risulta buono, per alimentazione e accrescimento staturò-ponderale valido. Lo sviluppo psicomotorio dimostra lentezza nelle acquisizioni: controlla il tronco intorno ai 6 mesi, a 20 inizia a fare i primi passi. Struttura la frase ai tre anni con povertà di contenuti e dislalie. L'accrescimento staturò-ponderale è scarso in altezza mentre è eccessivo nel peso, per ricerca costante di cibo sin dai primi anni di vita.

M. ha acquisito il controllo sfinterico a tre anni. Ha frequentato le scuole dell'obbligo con ausilio di sostegno a partire dalla prima elementare, essendosi dimostrato un quadro di ritardo mentale lieve-moderato. Ha acquisito le autonomie del quotidiano (lavarsi, vestirsi, mangiare, compiere piccole commissioni, partecipare ai lavori domestici); nel corso nel 2010 sono diventati invalidanti sintomi di tipo ansioso, di conversione somatica e di tipo allucinatorio-psicotico, con miglioramento dopo l'introduzione di risperidone.

L'esame obiettivo dismorfologico ha dimostrato la presenza di trigonocefalia, restringimento del diametro bitemporale, fronte piccola, squadrata. Lo splancnocranio appare più sviluppato del neurocranio, con maggiore evidenza alla luce di guance molto grosse. Le orecchie sono grandi, la destra due mm più lunga della sinistra; la conca è profonda, l'antielice spianato nel 2° superiore, il trago bilobato; la fossa scafoidea è ampia.

Le sopracciglia sono rade, la piramide nasale è sottile ma la radice del naso è slargata, le ali del naso ipoplasiche. Il probando presenta epicanto più a sinistra, il taglio degli occhi è leggermente orientaleggiante, con occhi piccoli.

Il labbro superiore è sottile, delimitato da un orletto rosso; il labbro inferiore è carnoso, senza orletto. Il filtro naso labiale è lungo a goccia. E' presente micrognazia relativa, malocclusione dentaria e morso aperto, denti caratterizzati da anomalie dello smalto.

Il collo è corto con gibbo cervicale. Globalmente è presente obesità ginoide, con strie rubre diffuse, pseudoginecomatia, accumuli di adipe a livello gluteo e sui fianchi. Sono presenti fossette scapolari e sacrali. Il rapporto tra altezza e span è 179 a 178,5.

Lo sterno è leggermente scavato con prominente dell'emitorace sinistro che riflette una scoliosi a esse italice sinistra concava. Microgenitalismo. Si osserva cute glabra, ridondante sul dorso delle mani. Le mani sono grandi, con ipotrofia delle eminenze, dita coniche, con fossette neonatali alle articolazioni interfalangee. Il V° dito delle mani presenta un impianto prossimale bilateralmente; a destra è presente segno delle 4 dita completo; il palmo delle mani si presenta marezzato. A livello dei piedi, che sono grandi e piatti si osserva marcato valgismo degli alluci, sindattilia cutanea (similpalmate) tra 2° e 3° dito bilateralmente; il 4° dito del piede destro è più corto del 5° ed entrambe hanno impianto prossimale. La cute delle piante dei piedi è ridondante, con dermatoglifi semplificati.

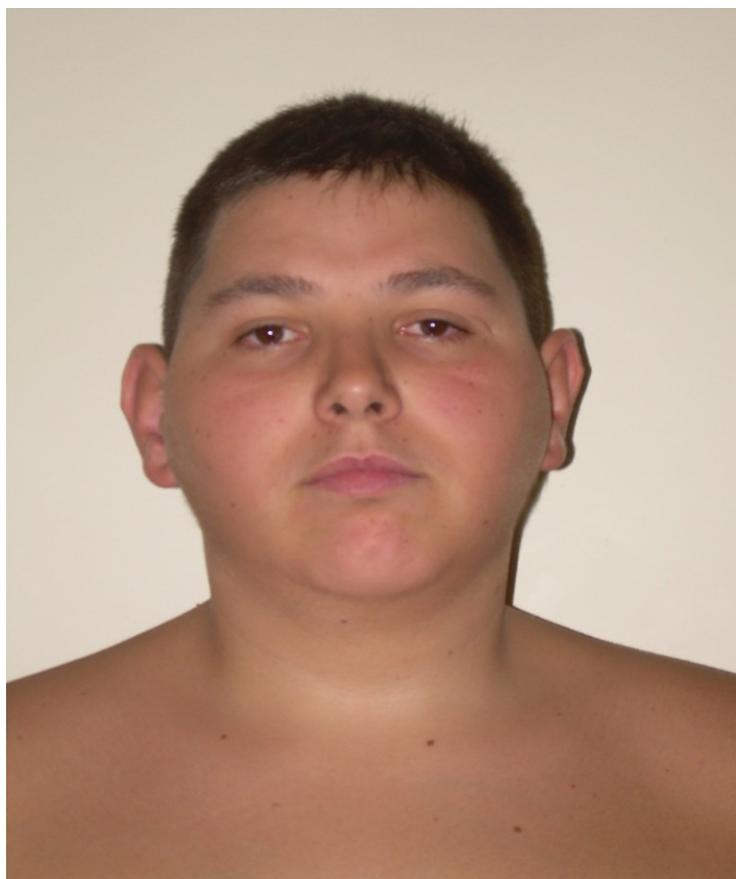


Foto 1: Trigonocefalia e splancocranio maggiormente sviluppato del neurocranio

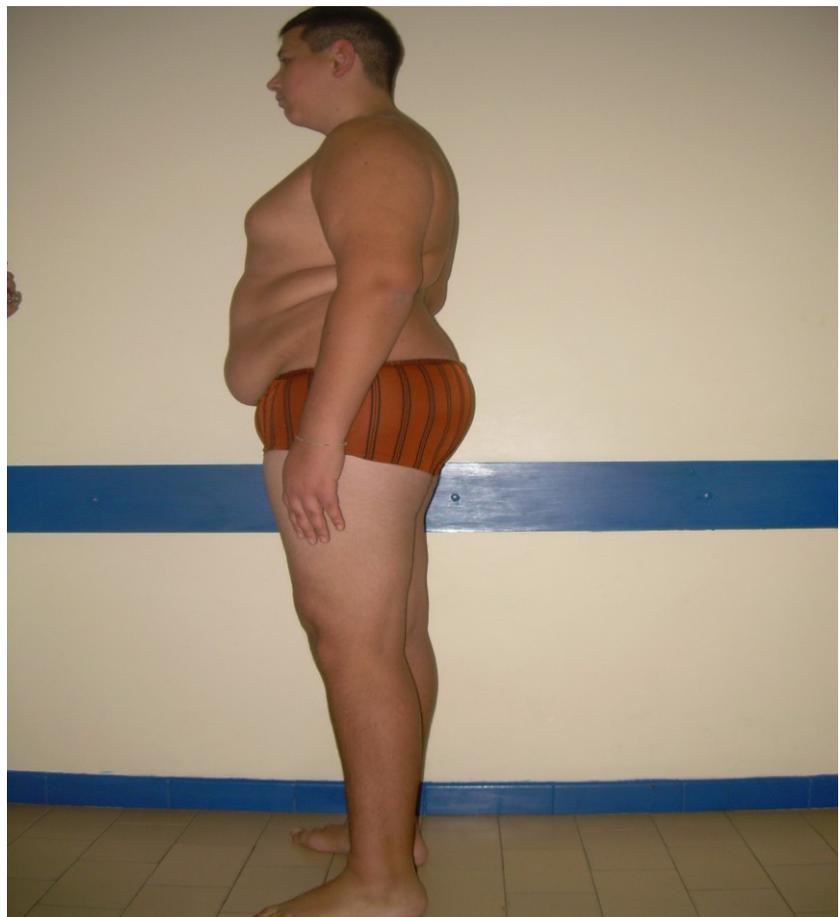


Foto 2 e 3: obesità ginoide, valgismo ginocchia



Foto 4: orecchie grandi, micro-retrognazia



Foto 5: 4° dito a destra più corto

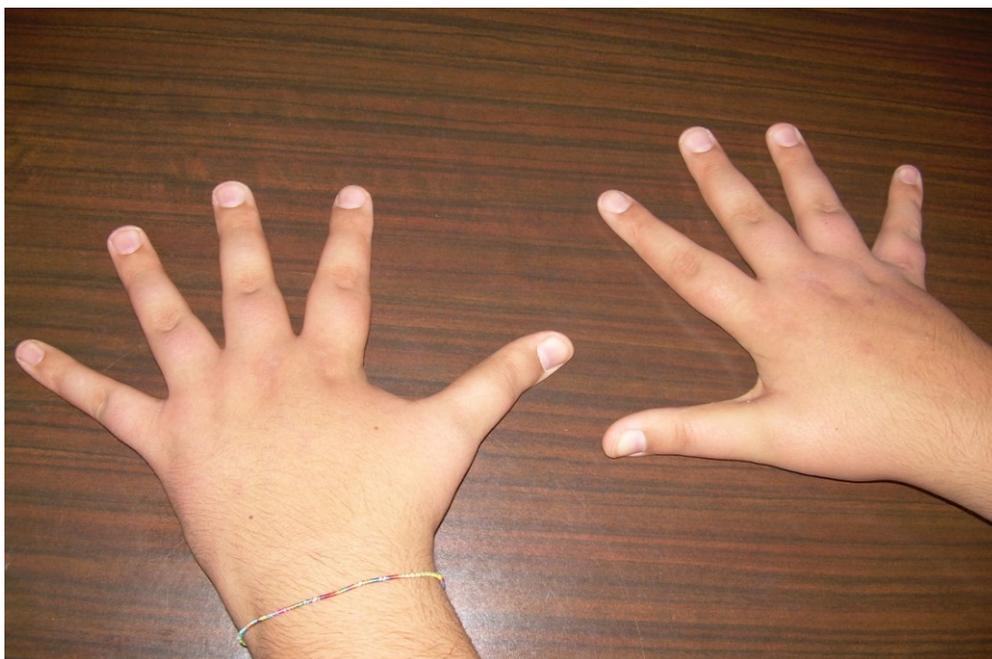


Foto 6: dita coniche

Tabella 4: esame obiettivo di M.S.

Circonferenza cranica	57 cm
Peso	> 97° percentile
Altezza	179
Cute e annessi	Glabra; ridondanza di cute sul dorso delle mani e la pianta dei piedi
Cranio e facies	Trigonocefalia, riduzione del diametro bitemporale, occipite piatto, sopracciglia rade, taglio mongolico degli occhi, filtro n-l a goccia, labbro superiore sottile, orecchie grandi anteverse con tags negli elici e fossette nei lobi.
Cavo orale	Palato ogivale, policarie, malocclusione, morso aperto, anomalie dello smalto
Addome	Globoso per adipe, strie rubre, obesità ginoide
Apparato scheletrico	Spianamento lordosi lombare, asimmetria triangolo della taglia, ginocchia valghe; gibo cervicale; acromicria relativa, dita tozze. Piedi accenno alla sindattilia 2°-3°, valgismo degli alluci, clinodattilia del 5° dito, che è più lungo rispetto al 4° a destra
Apparato urogenitale	Microgenitalismo, microrchidismo

Le indagini diagnostiche eseguite negli anni hanno permesso di evidenziare in associazione al ritardo mentale, la presenza di una condizione polimalformativa, caratterizzata dall'associazione di dismorfismi e anomalie gravi quali la disgenesia ipofisaria con nanismo ipofisario conseguente, aumentati valori di CPK, anomalie elettroencefalografiche di dubbio significato specifico, in assenza di crisi comiziali, steatosi epatica, splenomegalia, anomalie ossee.

Tabella 5: elenco esami eseguiti

Esami normali	Esami alterati
Cariotipo standard	CPK e CPK-MB (età pediatrica > valori)
X-fragile	Lattato dopo sforzo
CGH-Array 100 MB	Enzimi epatici
ECG	Età ossea (2 anni inferiore)
Rx cranio	EEG (dubbie specifiche anteriori, più a dx)
TAC cranio	V. oculistica (astigmatismo)
ABR	RMN encefalo (ipoplasia ipofisi, assenza peduncolo ipofisario, ectopia della neuroipofisi, ampliamento cisterna sovrasellare)
VCM	Ecoaddome (steatosi epatica, aumento volume milza)
EMG	V. Endocrinol. (ipopituitarismo anteriore)
Biopsia muscolare	Rx colonna (scoliosi lombare)
	Rx gamba dx (fibroma non ossificante)

Anamnesi fisio-patologica G.S.: G. è l'ultima dei quattro fratelli; nasce nel gennaio del 2000 quando i genitori hanno 42 e 41 anni (rispettivamente padre e madre); la gravidanza è decorsa con tabagismo per tutta la durata e assunzione di antiinfiammatori nel primo mese. Eseguita amniocentesi risultata negativa, così come nella norma vengono riferite le ecografie intrauterine.

Il parto si verifica alla 33° settimana per rottura intempestiva delle membrane, con taglio cesareo d'urgenza. Apgar al 1' minuto 2, parametri compresi tra il 3° e il 25° percentile per peso e circonferenza cranica, al 50° per la lunghezza.

Alla nascita venivano riscontrati: atresia esofagea, fistola esofago-tracheale, abnorme dilatazione di un'ansa ileale, dotto di Botallo pervio.

Operata in prima giornata per correzione tracheale e stomizzazione intestinale, due giorni dopo la nascita si riscontrava ad una ecografia transbregmatica emorragia subependimale bilaterale e intraventricolare sinistra. A tre mesi di vita si evidenziava coxartrite e sepsi da Klebsiella, seguite subito dopo da diagnosi RMN encefalo di idrocefalo. A seguito dell'intervento di derivazione ventricolo-peritoneale presentava segni di irritazione meningea con liquorcoltura positiva per Klebsiella Pneumoniae. Venivano eseguiti a causa di un abnorme incremento della circonferenza cranica, sei interventi di derivazione ventricolo-peritoneale nell'arco di otto mesi, con un secondo episodio di infezione meningea questa volta da Stafilococcus Epidermidis. Gli esiti cerebrali ad una successiva indagine TAC cranio erano costituiti da idrocefalo triventricolare multicavitario con asimmetria dei due emisferi cerebrali con strutture mediane depiazzate verso sinistra.

Veniva parallelamente ricostruito il transito intestinale.

Altre indagini eseguite dopo l'anno di vita evidenziavano palato con aspetto di schisi sottomucosa, ipoacusia per assenza di onde replicabili bilateralmente agli ABR con necessità di protesi acustica; strabismo

convergente bilaterale, alterazioni specifiche e aspecifiche all'EEG con assunzione di terapia a base di Luminalette,

Tra i tre e i quattro anni d'età la bambina inizia a pronunciare qualche parola con significato referenziale, continuando a mostrarsi, come da sempre, partecipe all'ambiente. Appaiono acquisiti anche alcuni gesti deittici quali battere le mani e fare "ciao"; parimenti acquisito in tale periodo è il controllo del capo mentre il controllo del tronco appare instabile. Su un quadro di grave ipotonia si iniziano ad evidenziare segni di tetraparesi con iperreflessia generalizzata e clono bilaterale esauribile. La coordinazione mano-mano e occhio-mano è dismetrica, ma la volontà alla manipolazione è valida. All'età di cinque anni presenta il gioco simbolico e di finzione, benchè semplificati. Controlla il tronco in cifosi. Si diagnostica distrofia miopica corioretinica più evidente a sinistra. Inizia a presentare gravi infezioni respiratorie, con episodi di polmonite ab ingestis e insufficienza respiratoria, che richiedono più volte l'assistenza rianimatoria; seguiranno apnee notturne per cui pratica assistenza ventilatoria.

All'età di sei anni è capace di portare il cibo alla bocca con l'utilizzo del cucchiaino, con costante deficit di masticazione e deglutizione. Inizia a camminare con sostegno bilaterale e mantiene la posizione eretta per pochi secondi. Si conferma il quadro di severa anemia sideropenica. Alvo caratterizzato da forte stipsi.

Attualmente la bambina conserva costantemente la capacità di relazionare con l'ambiente, pur in presenza di un grave ritardo mentale: non ha acquisito alcun meccanismo di letto-scrittura e calcolo. Conosce i colori, gli animali; pronuncia frasi nucleari con forti note dislaliche e timbro metallico con note disartriche. Non ha acquisito il controllo sfinterico. Non deambula, non sostiene la stazione eretta in autonomia se non per pochi secondi. La motilità è ridotta in tutte le componenti, con ipodiadococinesia, disprassia ideomotoria e dismetria. E' presente deficit di forza generalizzato e ipotonia grave con maggiore evidenza agli arti inferiori. E' evidente una

iperreflessia generalizzata con achillei policinetici e clono bilaterale esauribile del piede; babinskj a destra.

All'esame obiettivo si osservano: trigonocefalia con maggiore espressione dello splancnocranio sul neurocranio; bossing frontale; fronte piccola, squadrata; sopraciglia rade, epicanto più evidente a sinistra; occhi piccoli infossati. La radice del naso è slargata con punta globosa e filtro nasolabiale leggermente a goccia, corto. Microstomia relativa, con palato fortemente ogivale, anodontia anteriore, policarie. Le guance sono paffute. La facies è leggermente asimmetrica, con l'occhio sinistro più in alto del controlaterale. Le orecchie sono grande con elici semplificati nel terzo medio, conca profonda, fossa scafoidea ampia, trago bilobato. Il collo è corto, con gibbo cervicale. Globalmente la distribuzione del grasso è ginoide, tronculare, con accumuli ai glutei e ai fianchi. E' presente pseudoginecomastia con capezzolo destro introflesso e mammella sinistra più sviluppata; petto scavato nel terzo inferiore. Si evidenziano fossette scapolari. La cute è chiara, glabra, lassa nell'interno delle braccia. Le gambe sono valge e tendono ad assottigliarsi distalmente. Le mani presentano dita coniche con cute ridondante al dorso e fossette neonatali alle articolazioni interfalangee. Le eminenze tenar e ipotenar sono ipotrofiche.

I piedi si presentano piatti, con cute ridondante nella pianta dove i dermatoglifi sono semplificati. E' presente un impianto prossimale del 4° e 5° dito, con il 4° più corto nel piede destro.



Foto 7: facies e ginecomastia

Foto 8: padiglione auricolare





Foto 9: distribuzione troncolare dell'adipe

Foto 10: 4° dito più corto a destra





Foto 11: dita coniche



Foto 12: particolarità della facies e ginecomastia



Foto 13: fronte piccola, sopracciglia rade

In Tabella 6 si riportano le caratteristiche dell' Esame Obiettivo della bambina.

Cute e annessi	Pallore cutaneo, numerosi esiti cicatriziali, capezzolo dx introflesso, lassa nelle braccia
Cranio e facies	Trigonocefalia, restringimento diametro bitemporale, metopica prominente, soparcciglia rade, ciglia lunghe, epicanto, punta del naso globosa, filtro n-l corto, labbro superiore sottile.
Cavo orale	Palato marcatamente ogivale, policarie, microdontia, micrognazia.
Addome	globoso
Apparato scheletrico	Scoliosi, mani allungate con dita coniche; 4° dito corto a dx, gibbo cervicale, valgismo ginocchia
Apparato urogenitale	Fenotipo femminile

Durante gli anni la bambina è stata sottoposta a numerosi accertamenti volti a monitorare il quadro clinico, noto dalla nascita, e determinarne una eziopatogenesi.

Il quadro polimalformativo è andato incontro a correzione chirurgica efficace; i danni cerebrali sono da imputarsi alle sovrainfezioni meningoencefalitiche, pur considerando primario l'idrocefalo, a patogenesi non nota. Le anomalie elettroencefalografiche riscontrate, specifiche e aspecifiche, attualmente sono verosimilmente secondarie ai severi danni cerebrali, ma è impossibile stabilire se queste in parte siano primitive. La bambina è inoltre ipoacusica con necessità di protesizzazione: il danno è di tipo neurosensoriale, ma anch'esso è stato diagnosticato successivamente alle problematiche cerebrali, quindi è difficile valutare se sia primitivo (su base malformativa) o secondario a danno delle vie acustiche.

Tabella 7: Elenco esami eseguiti

Esami normali	Esami alterati
Cariotipo	TC cranio (idrocefalo)
X-fragile	Ecocardiogramma (dotto Botallo)
FISH 22	Ecoaddome (dilatazione ileo alla nascita)
CGH-Array 100 MB	Emocromo (anemia)
Metaboliti urinari	Polisonnogramma (apnee)
Cromatografia AA	EEG (alterazioni spec.e aspec.)
Ecg	ABR (ipoacusia)
	Vis Odontoiatrica (palatoschisi sottomucosa)
	Rx cranio (ipoplasia massiccio facciale e asimmetria orbite per dx>sn)
	EGDS (ernia jatale e Reflusso G-E)

Il quadro clinico dei due pazienti depone per una condizione sindromica, con ereditarietà recessiva, ad andamento fisso. L'espressione clinica più grave presentata dalla bambina appare peggiorata nella sua fenomenologia rispetto al fratello dal sovrapporsi delle infezioni meningoencefalitiche presentate con carattere di iatrogenicità.

Entrambe i fratelli presentano segni riconducibili ad un danno a carico della linea mediana.

Il confronto tra i due esami obiettivi dei fratelli ha permesso di osservare caratteristiche peculiari in comune: nello specifico entrambe anno una disposizione tronculare del grasso con pseudoginecomastia, cute glabra e lassa (foto 2 e 9); le mani (foto 6 e 10) e i piedi (foto 5 e 11) sono assolutamente identiche nla conformazione e nelle anomalie, quali il 4° dito del piede destro più corto del 5°. Entrambe i fratelli hanno una maggior rappresentazione dello splancocranio sul neurocranio con fronte piccola, sopracciglia rade, occhi piccoli e orecchie grandi. Entrambe infine hanno due fossette cutanee a livello delle scapole.

Caso clinico 2: fratelli M e P

La famiglia è costituita da quattro elementi, i genitori e i due figli. All'Anamnesi Familiare i genitori sono viventi, non consanguinei. La madre ha sofferto in adolescenza di imprecisati episodi di restringimento della coscienza. Entrambe i genitori non presentano difficoltà cognitive e/o di inserimento sociale.

Dalla coppia nascono due figli, il primo quando padre e madre hanno rispettivamente 27 e 26 anni; la seconda undici anni dopo. Non interruzioni di gravidanza. In linea materna è presente familiarità per malformazione atrio-ventricolare, Sdr Leoni; in linea paterna è riferita familiarità per patologie psichiatriche. Si segnala consanguineità tra i nonni paterni.

Anamnesi fisiopatologica di M.P.:

M. è primogenito, nasce nel gennaio del 1982 da gravidanza fisiologica; parto spontaneo, Apgar al 1' minuto 9. Nessuna patologia perinatale. Anamnesticamente viene riconosciuto un lieve ritardo nello sviluppo psicomotorio: a 6 mesi controlla il capo, a 9 il tronco; a 20 mesi deambula con sostegno. Da sempre presenta scarsa partecipazione all'ambiente; non sorride, non è attratto da alcuna stimolazione ambientale. All'età di 23 mesi giungeva a visita neuropsichiatrica per la presenza di episodi caratterizzati da revulsione dei globi oculari, clonie palpebrali, clonie del capo in estensione: eseguito EEG significativo per epilessia, introduceva frisium, associato dopo due anni a Depakin. Gli episodi comiziali continuavano a peggiorare fino a 60-70/die, con associata caduta a terra: lo sviluppo motorio non veniva compromesso in modo significativo; di contro lo sviluppo psichico risultava particolarmente alterato, in quanto pronunciava le prime parole a 4 anni con partecipazione all'ambiente molto ridotta. Dato il persistere delle crisi si modifica più volte la terapia con parziale beneficio. Progressivamente si dimostra sempre più evidente un quadro di severo autismo con ritardo mentale grave (i test non sono somministrabili),

auto ed eteroaggressività, inversione del ritmo sonno-veglia, partecipazione all'ambiente quasi assente. Il paziente non ha mai acquisito il controllo sfinterico. Non si è riusciti a dare significatività eziopatogenetica al quadro clinico del ragazzo.

Inserito in struttura riabilitativa all'età di 18 anni data la gravità del fenotipo cognitivo-comportamentale, a tutt'oggi il ragazzo presenta un quadro di autismo severo, assenza di linguaggio spontaneo con produzione di soli suoni vocalici e gutturali e urla. La deambulazione è pitecoide, con dorso curvo, assenza di pendolarità degli arti che sono prevalentemente addotti al petto. Le ginocchia sono tenute prevalentemente flesse e spesso si osservano balzi sulle stesse con lesioni da contatto e deformità traumatica. Le mani parimenti sono deformate da lesioni continue da morsicatura.

Il giovane trascorre il tempo in modo afinalistico, camminando negli ambienti o seduto. Non partecipa ad alcuna attività, non è autonomo in alcuna prassia pur collaborando talvolta dietro ordine semplice. La masticazione è presente anche se tende ad ingoiare il cibo intero. Il contatto di sguardo è quasi assente; le reazioni emotive sono ipovalide con scoppi di agitazione e aggressività poco prevedibili. Assume una politerapia antiepilettica (dintoina, frisium, tegretol) e antipsicotica (seroquel, entumin) con assenza di crisi comiziali. Presente pica.

All'esame obiettivo si dimostrano numerosi dismorfismi della facies e dell'apparato osteoarticolare.

Il giovane presenta forte magrezza e ipotrofia muscolare severa. Le unghie sono a vetrino d'orologio.

La cute è molto chiara con numerose discromie e lesioni di difficile interpretazione (discromiche, da grattamento, fungine?); i capelli sono folti, con basso impianto sulle tempie; al volto si osserva pallore con occhi infossati e fortemente segnati da occhiaie. Le orecchie sono anteverse con elici segnati da pits a sinistra; la facies è asimmetrica con fronte sfuggente, arcate sopraccigliari spesse, sopracciglia rade e allungate, sinofris; gli occhi

sono chiari, infossati, con taglio antimongolico; presente epicanto, sclere blu, radice del naso depressa, ponte slargato, narici ipoplasiche, filtro naso labiale corto, ipoplasia malare. L' occipite è piatto; a livello del mento è osservabile una fossetta.

La bocca è tenuta beante e si osserva ipertofia gengivale probabilmente legata all'assunzione di Dintoina; i denti sono piccoli con diastema dentario e anomalie dello smalto,. Le labbra sono cianotiche e il palato ogivale, la lingua si presenta sepimentata sulla linea mediana,

A livello osteoarticolare si osserva gibbo cervicale e dorsale, collo lungo, scoliosi a esse italica, torace a botte; alle mai segno delle 4 dita completo bilateralmente, noche grosse con deformità osteoarticolari.



Foto 14: pits in orecchio sinistro



Foto 15: mani grandi con deformazione a carico delle articolazioni interfalangee

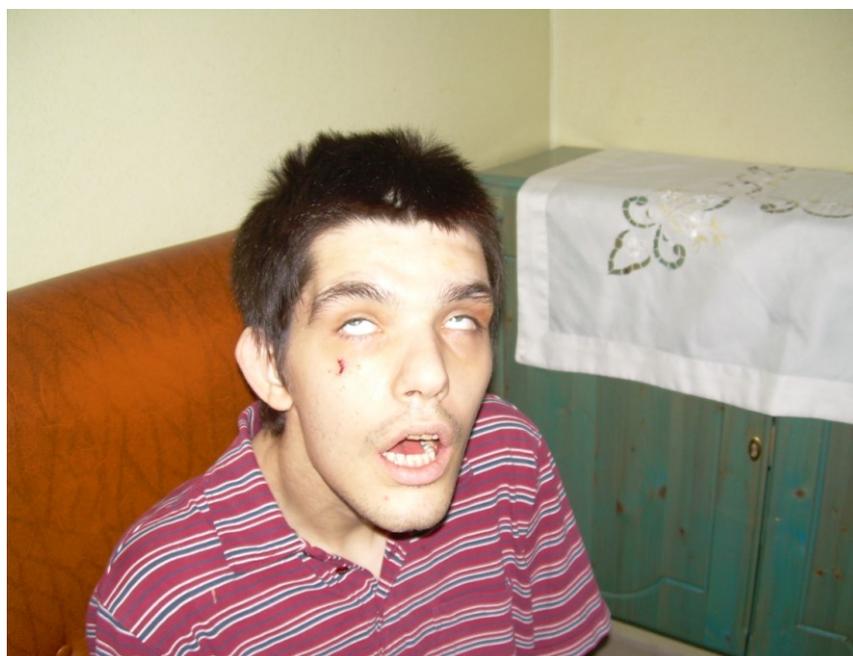


Foto 16: facies con i dismorfismi

Foto 17: atteggiamento pitecoide con dorso curvo





Foto 18: occhi infossati, chiari, iperostosi arcate sopraccigliari, bocca beante



Foto 19: orecchie anteverse

Tabella 6: esame obiettivo M.P.

Circonferenza cranica	54 cm
Peso	<3°
Altezza	168 cm
Cute e annessi	Cute chiara con numerose discromie, ipotrofia, basso impianto dei capelli sulle tempie, capelli folti, unghie a vetrino d'orologio,
Cranio e facies	Orecchie anteverse, asimmetria della facies, fronte sfuggente, arcate sopraccigliari spesse, sopracciglia rade e allungate, sinofris, occhi chiari infossati con taglio antimongolico, epicanto, sclere blu, radice del naso depressa, ponte slargato, narici ipoplasiche, filtron-l corto, ipoplasia malare, pits in orecchio sinistro, occipite piatto, fossetta nel mento
Cavo orale	Bocca beante, ipertrofia gengivale, denti piccoli, diastema dentario, anomalie dello smalto, labbra cianotiche, palato ogivale, lingua sepimentata sulla linea mediana,
Apparato respiratorio	ndr
Apparato linfoghiandolare	ndr
Apparato cardiocircolatorio	ndr
Addome	ndr
Apparato scheletrico	Gibbo cervicale, collo lungo, segno delle 4 dita completo bilateralmente, noche grosse con deformità osteoarticolari, gibbo dorsale, scoliosi a esse italica, torace a botte
Apparato urogenitale	Fenotipo maschile adulto

Il grave fenotipo cognitivo-comportamentale ha limitato la possibilità di seguire in termini di diagnostica strumentale il giovane, sia in relazione alla non collaborazione, che alla precoce istituzionalizzazione dello stesso.

Gli esami strumentali eseguiti hanno permesso di verificare un quadro di severa epilessia mioclonica giovanile, con anomalie elettroencefalografiche spesso recrudescenti in corso di farmacoterapia. L'epilessia peraltro, nonostante in una prima epoca di sviluppo abbia rappresentato il più

difficile dei problemi da controllare, con aspetti di farmacoresistenza, ha trovato una soluzione, che attualmente non è possibile ricondurre all'efficacia del farmaco o ad una risoluzione spontanea, in quanto sarebbe necessario un wash-out farmacologico, che è impensabile alla luce del rischio epilettogeno e del grave quadro comportamentale del paziente.

Sotto il profilo organico, affianco ai numerosi dismorfismi osservati, con "abbruttimento" progressivo del ragazzo, non sono state riconosciute vere e proprie malformazioni, anche se, a parere della scrivente, rappresenta un quadro malformativo lo stesso progressivo deformarsi a livello fisico del ragazzo. E' altresì difficile stabilire l'evoluzione cerebrale del giovane, avendo eseguito un solo esame neuroradiologico in età infantile.

Tabella 7: elenco esami eseguiti M.P.

Esami normali	Esami alterati
Cariotipo	EEG
X-fragile	CEA (7.1 ng/ml)
RMN encefalo	
Ecografia addome completo	
Rx mani	
ECG	
Profilo tiroideo	
Rx torace	

Anamnesi fisiopatologica di P.P.

P. è secondogenita, nasce da gravidanza fisiologica; parto a termine, eutocico. Non patologia perinatale. Sviluppo psicomotorio riferito entro i limiti della norma per quanto riguarda il controllo del capo e del tronco; la deambulazione autonoma avviene a 18 mesi; le prime parole sono pronunciate a due anni con evoluzione successiva del linguaggio stentata, fino alla frase a due elementi, acquisita intorno ai 5 anni d'età.

All'età di due anni e tre mesi inizia a presentare episodi comiziali caratterizzati da revulsione dei globi oculari, restringimento della

coscienza, caduta all'indietro. Inserita terapia specifica, la bambina presenta periodi di remissione e di recrudescenza delle crisi comiziali, fino alla comparsa di episodi tonico-clonici generalizzati durante la prima infanzia.

Il peggioramento delle crisi coincide con la costante regressione delle acquisizioni, già insufficienti per età. Si delinea un quadro cognitivo-comportamentale di autismo associato a ritardo mentale grave. Attualmente P. non è autonoma in alcun atto del quotidiano fatto salvo della capacità di mangiare con il cucchiaino; non ha acquisito il controllo degli sfinteri. Presenta auto ed eteroaggressività ingravescente. Assume nel tempo politerapia antiepilettica con controllo delle crisi dall'età di otto anni.

Dal punto di vista neurologico si rileva paratonia diffusa, riflessi osteotendinei difficilmente evocabili ma presenti e simmetrici; disprassia. Il linguaggio spontaneo è scarso, caratterizzato dalla produzione di frasi semplici ecolaliche. Scialorrea marcata. E' presente iperattività stereotipata e afinalistica. La paziente presenta andatura pitecoide, con dorso gravemente curvo da scoliosi. Tiene la bocca beante con introduzione subcontinua delle mani, si rotola per terra, ride e urla. L'interpretazione dei suoi bisogni è garantita dall'intercessione della madre che la anticipa in tutte le necessità. Il contatto di sguardo è valido; presenta cherfull disposition.

All'esame obiettivo si riscontra ipotrofia diffusa e un fenotipo longilineo. E' presente una gravissima scoliosi a esse italica con gibbo dorsale destro convesso nel tratto toracico. Il colorito cutaneo è roseo; è presente ipertricosi marcata. I capelli sono folti, a basso impianto sulle tempie e sull'occipite. La fronte è piccola, squadrata, con sopracciglia folte. Il naso è prominente con ponte slargato, narici spesse e solco al di sotto della punta. Gli occhi sono grandi, con taglio orizzontale, ciglia lunghe e folte; le palpebre sono succulente. Il viso è ovale; il filtro naso labiale è corto e spianato; le gengive sono ipertrofiche, i denti grandi e diastasi; si evidenzia microretrognazia con bocca beante. Le orecchie presentano elici

recurvati, antielice ampio e conca profonda; il trago è triangolare. Le mani e i piedi sono grandi con semplificazione dei dermatoglifi; ai palmi è evidente lo spianamento delle eminenze tenar e ipotenar: il pollice è ad alto impianto. Le dita sono lunghe, con lieve slargamento delle articolazioni interfalangee e aspetto leggermente palmeto; le unghie sono a vetrino d'orologio. I piedi sono piatti con valgismo degli alluci, secondo dito più lungo dell'alluce, terzo quarto e quinto dito clino sul secondo, quinto dito corto. Il fenotipo femminile è conservato.

Tabella 8: esame obiettivo di P.P.

Circonferenza cranica	56 cm
Peso	45 kg
Altezza	162 cm
Cute e annessi	Ipertricosi, unghie a vetrino d'orologio
Cranio e facies	Facies ovale, occhi orizzontalizzati, sopracciglia folte, naso prominente
Cavo orale	Ipertrofia gengivale, retromicrognazia, denti diastasi, labbra carnose
Apparato respiratorio	ndr
Apparato linfoghiandolare	ndr
Apparato cardiocircolatorio	ndr
Apparato scheletrico	Grave scoliosi a esse italiana, mani e piedi grandi sottili, spianamento eminente, semplificazione dei dermatoglifi

La valutazione diagnostica nel tempo ha permesso di osservare per la minore un progressivo miglioramento del severo quadro di epilessia mioclonica diagnosticata in età pediatrica, anche in questo caso ad andamento poco chiaro. Se da un lato può ipotizzarsi l'efficacia terapeutica, dall'altra l'evoluzione migliorativa dell'epilessia potrebbe essere riconducibile alla sindrome sottostante. Per la minore è stato possibile osservare un'evoluzione peggiorativa del quadro neuroradiologico, con asimmetria dei ventricoli cerebrali diagnosticata a distanza di pochi anni dalla prima RMN encefalo, negativa. Anche la minore presenta un decorso deformativo dell'assetto osteoarticolare e del fenotipo facciale.

Tabella 9: elenco esami eseguiti

Esami normali	Esami alterati
Cariotipo standard-X-fragile	EEG
Ecocardiogramma	2°RMN encefalo (asimmetria dei ventricoli per prevalenza dx)
Cromatografia AA	Rx colonna (scoliosi)
Riarrangiamenti subtelomerici	
Lattato	
Ammoniemia	
ECG	
TC cranio	
Enzimi lisosomiali	
1°RMN encefalo	
Acidi organici urinari	
Piruvato	
Biotinidasi	
Biopsia cutanea	
Biopsia muscolare	
PEV	
Beta-glucoridasi	

Foto 20 : piedi grandi con dita lunghe e clinodattilia





Foto 21 e 22: piedi lunghi, piatti



Foto 23: facie ovale, sopracciglia folte, naso prominente



Foto 24: ipertrofia gengivale, diastema dentario



Foto 25 e 26: retro-micrognazia, orecchie ad alto impianto, antielice slargato





Foto 27: comportamento atipico

Foto 28: mani grandi con slargamento delle articolazioni interfalangee, alto impianto del pollice



Foto 29: grave scoliosi a esse italice

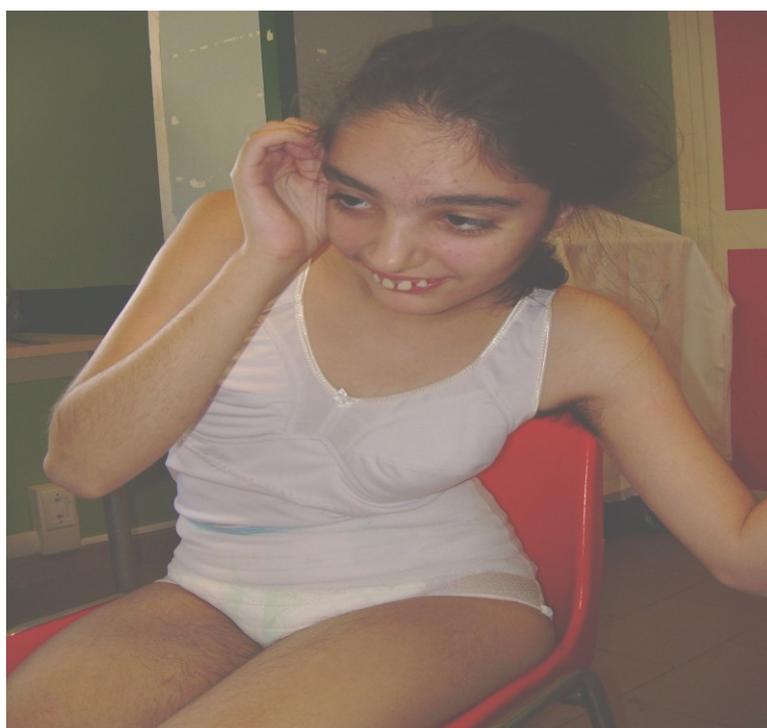


Foto 30: scoliosi in visione anteriore

Entrambe i fratelli presentano una condizione sindromica con ereditarietà verosimilmente recessiva, che si esprime in forma di grave encefalopatia epilettica nei primi anni di vita, per risolvere il suo aspetto di farmacoresistenza e lasciare posto a segni di grave alterazione cognitivo-comportamentale, peraltro ipotizzabili già nella prima infanzia, caratterizzata da autismo e ritardo mentale grave.

Sono presenti alcune caratteristiche fisiche comuni, quali la grossolanità della facies, con ovale allungato, retro-micrognazia, ipertrofia gengivale e diastema dentario, sopracciglia folte (foto 16 e 18, vs 23). Le mani e i piedi sono in entrambe i casi grandi, con dermatoglifi semplificati, slargamento delle articolazioni interfalangee, con maggiore evidenza per il maschio (foto 15 e 28). La comparazione dei profili evidenzia in entrambe i fratelli fronte sfuggente, orecchie grandi, retro-micrognazia (foto 14 e 25-26).

In entrambe i casi la malattia si esprime con un fenotipo autistico severo e con un impatto visivo del fenotipo longilineo deformato nell'assetto osteoarticolare, in quest'ultimo caso con maggiore riopercussione della femmina dove il rachide è deforme (foto 17 e 29).

Il maschio ha un comportamento maggiormente compromesso nella relazione interpersonale, di contro la femmina ricerca il contatto con l'interlocutore sia attraverso il contatto di sguardo che l'attività sensomotoria; ancora, il maschio risulta ombroso mentre la femmina è sorridente.

In entrambe i fratelli le caratteristiche sessuali secondarie e l'aspetto generale è conforme al genere e nonostante la grossolanità fenotipica potrebbero essere esteticamente piacevoli, fatto salvo delle anomalie ossee.

DISCUSSIONE

La valutazione delle due famiglie ha visto l'applicazione del pressochè medesimo protocollo di indagine nelle due coppie di probandi.

Per i quattro probandi è sicura l'assenza di un modello di trasmissione mendeliano di tipo dominante, giacchè l'analisi dell'albero genealogico non ha permesso di osservare espressioni mutevoli di una patologia similare, anche solo considerando la parte organico-malformativa. Parimenti è escludibile la trasmissione legata all'X: infatti nel caso dei due fratelli S., la presenza di fratelli sani di cui uno maschio e l'altra femmina depone per l'improbabilità del caso, alla luce del fatto che il padre sarebbe trasmettitore obbligato, nel caso di due linee mutate e una delle due figlie femmine risulta essere fenotipicamente e cognitivamente sana. Nel caso della famiglia P. è escludibile la patologia X-linked data la severità pressochè sovrapponibile della patologia espressa dalla femmina rispetto a quella del maschio.

Impossibile considerare in entrambe le famiglie una mutazione de novo data la sovrapponibilità della patologia, per cui andrebbe considerata una casualità dentro la casualità.

E' quindi altamente possibile che si tratti di una condizione a carattere recessivo.

Per tutti e quattro i probandi le indagini genetiche standard (cariotipo, X-fragile) nonchè l'analisi CGH-Array hanno dato esito negativo. Da qui è possibile affermare che il danno genetico causa di malattia sia di dimensioni piccolissime, all'interno di geni fortemente patogeni.

I quadri clinici dei fratelli S. risulta dissimile in gravità verosimilmente in relazione al danno riportato dalla femmina in seguito al reiterarsi di affezioni meningo-encefalitiche iatrogene: per entrambe si ipotizza una condizione che colpisce la linea mediana, essendo lesi, nel maschio l'ipofisi, nella femmina gli organi cuore, esofago, trachea e intestino. Si è

così cercata una condizione che vedesse implicata tale linea, verificando le sindromi coinvolgenti l'asse CHARGE; tra le esaminate è risultata negativa per FISH la sdr Di George, nonché le forme di craniostenosi (si ricorda la trigonocefalia del maschio), non confermate all'Rx cranio nè dalle misurazioni della circonferenza cranica.

Tra i dati da non considerare come fattori fenotipici di ricerca è l'elevata statura del maschio, correlata alla lunga terapia ormonale successiva alla diagnosi di nanismo ipofisario.

Si è quindi certi che entrambe i fratelli siano affetti da una condizione genetica "fissa" e non evolutiva, ipotesi avallata dall'assenza di modificazioni neuroradiologiche, assenza di accumuli negli organi e quadro stabile dal punto di vista neurologico e cognitivo-comportamentale. Anzi, i miglioramenti osservati nel corso degli anni in riferimento alle acquisizioni della femmina hanno permesso di confermare la non evolutività del quadro clinico.

Un ulteriore conferma alla non dominanza genetica del quadro clinico, è la recente nascita del figlio della sorella maggiore, valutato presso l'INPI di Sassari e risultato sano sia sul piano neurologico che cognitivo.

Per quanto attiene la famiglia P. il primo dato che è stato considerato negli anni è l'evolutività dell'epilessia come causa di ritardo e autismo. In realtà questa ipotesi risulta essere potenzialmente fallace per due ordini di motivi: in primo luogo il ritardo delle acquisizioni risultava presente già prima della comparsa delle crisi così come un tratto comportamentale simil-autistico. Secondariamente, benchè l'epilessia sembrasse in fase infantile estremamente refrattaria alla terapia farmacologica, quindi altamente invalidante in termini di funzionalità cerebrale, in adolescenza entrambe i ragazzi hanno iniziato a mostrare responsività alla terapia e/o scomparsa delle crisi epilettiche, lasciando come quadro cronico un profondo ritardo mentale con autismo. Per entrambe le acquisizioni del quotidiano sono praticamente assenti. La mancanza di evolutività a livello cerebrale

dimostrata dalle indagini neuroradiologiche (benchè sarebbe stato auspicabile un controllo RMN più recente) permette di escludere condizioni genetiche di tipo degenerativo/metabolico, essendo assenti gli accumuli a livello d'organo. Anche il fenotipo comportamentale non ha dimostrato negli anni una evoluzione, dimostrandosi "fisso" e immutevole. La ricerca sindromologica è stata quindi condotta sia attraverso le indagini genetiche standard, negative, che attraverso la dismorfologia: il fenotipo fisico dei due giovani, benchè di forte impatto, non presenta caratteristiche così salienti da permettere una ipotesi sindromologica certa. Tra le forme caratterizzate da severo autismo, utilizzando il fenotipo cognitivo-comportamentale come primo carattere, la sindrome di Cornelia de Lange è stata esclusa data l'assenza di malformazioni ossee e l'elevata statura dei due probandi. Parimenti non si è proceduto a indagine genetica per sindrome di Rett essendo entrambe i probandi privi delle caratteristiche di evolutività e miglioramento seguito da ulteriore peggioramento come tipico della sindrome, così come delle caratteristiche somatiche.

E' comunque plausibile che i fratelli S. Abbiano una patologia implicante un dismetabolismo che dimostri la sua espressione nella modificazione severa del comportamento e nell'apparato osteoscheletrico: di fatto soprattutto la femmina dimostra un quadro scoliotico gravissimo, a comparsa precoce (prepubere) non giustificabile dal solo atteggiamento posturale autistico. Peraltro appare complicato ricercare un quadro dismetabolico che non determini affezioni d'organo, come dimostrabile dalle numerose indagini strumentali e laboratoristiche fatte alla femina (non eseguite nel maschio per l'estrema difficoltà di accesso).

Attualmente non è stato possibile ottenere responso dall'indagine NGS in quanto il sequenziamento risulta essere una procedura estremamente lenta ed indaginosa. Non è possibile quindi presentare risultati al presente lavoro.

CONCLUSIONI

Il RM sindromico rappresenta una parte significativa delle condizioni di ritardo mentale, soprattutto per le forme di gravità da moderata a severa. Parimenti è ipotizzabile ma ancora incerto, che sia causa significativa anche delle forme di ritardo mentale lieve associata ad anomalie fenotipiche minori.

Anche per le forme di Disturbo Autistico, oltre alle ipotesi multifattoriali poligeniche, si affianca sempre più insistentemente il binomio sindrome doppia, con copresenza di quadri sindromici e autismo.

Il presente lavoro vuole dimostrare come la presenza di più figli affetti da medesima patologia all'interno di un nucleo familiare, crea gravissimi problemi non solo in termini di assistenza al malato, ma anche di pianificazione di vita in relazione all'elevato rischio di ricorrenza.

Si è presentato il caso di una famiglia dove la malattia esprime le sue gravi difficoltà in relazione agli epifenomeni malformativi e alle difficoltà di organizzare l'assistenza al domicilio e il follow-up di salute medica generale.

La seconda famiglia dimostra minori problemi legati a patologia d'organo, ma esprime il suo dramma dapprima nell'approccio alla patologia epilettica invalidante e imprevedibile nel suo decorso; successivamente dimostra come a fronte di un fisico "sano", la presenza di alterazioni comportamentali gravissime comporta scelte durissime come quelle della istituzionalizzazione.

Va da sé che in questi due casi, la presenza di una diagnosi di certezza potrebbe comportare da un lato una parziale rasserenzione dei familiari, legata alla comprensione del meccanismo eziopatogenetico del danno. Parimenti potrebbe permettere di verificare la presenza di rischio di ricorrenza all'interno della famiglia allargata, con minori costi in termini di sofferenza ed economia.

Una diagnosi di certezza permetterebbe altresì al clinico di programmare una assistenza congrua alle necessità dei probandi, eliminando eventuali controlli medici inutili e/o inserendo visite necessarie. Ciò si ripercuoterebbe sul SSN con riduzione di costi, nonché sui Comuni che potrebbero programmare una assistenza congrua ai bisogni dei probandi.

Si auspica una tempestiva risoluzione dei due casi attraverso l'analisi Next Generation Sequencing tutt'ora in corso, al fine di rispondere alle domande di salute di queste famiglie e permettere ai clinici e ai genetisti di comprendere i meccanismi che hanno portato all'espressione di queste due malattie, utilizzando queste nuove conoscenze per i numerosi altri casi clinici che a tutt'oggi mancano di diagnosi.

BIBLIOGRAFIA

Aicardi J: The etiology of developmental delay. *Semin Pediatr Neurol* 1998, 5: 15-20

American Association on Mental Retardation: *Mental Retardation: definition, classification, and system, of supports*. Washington, DC: American Association on Mental Retardation 1992

American Psychiatric Association: *Diagnostic and statistical manual of mental disorders*, 1994

Anne M, Slovtinek A: Novel microdeletion syndrome detected by chromosome microarrays. *Hum Genet*, 2008; 124: 1-17

Battaglia A, Bianchini E, Carey JC: Diagnostic yield of the comprehensive assesment of developmental delay barramental retardation in an istitute of child neuropsychiatry. *AM J Med Genet*, 1999, 82: 60-66

Battaglia A, Carey JC: Dianostic evaluation of developmental delay barramental retardation: an overview. *Am J Med Genet*, 2003; 117 c: 3-14

Benedetti P: *Neurologia dell'età evolutiva*. Roma: il pensiero scientifico editore, 1988

Borgatti R, Cannao M, Moretti G: *Modelli cognitivi del ritardo mentale*. *Psichiatria dell'Infanzia e dell'Adolescenza*. 1991; 58: 653-663

Cao, Notarangelo, Dallapiccola: *Malattie Genetiche*, Piccin

Chee-Seng K, Nasheen N, Yudi Pawitan: Revisiting mendelian disorders through exome sequencing. *Hum Genet*, 2011, 129: 351-370

Cirulli ET, Goldstein DB: Uncovering the roles of rare variants in common disease through whole-genome sequencing. *Nat Rev Genetics* 2010, 11: 415-425

Crome L, Stem J: The pathology of mental retardation. J & A.Churchill/LTD 1967

Curry CJ, Sandhu A, Frutos L, Wells R: Diagnostic yield of genetic evaluation in developmental delay/ mental retardation. *Clin Res*, 1996, 44: 130 A

De Negri M: *Neuropsichiatria Infantile* IV ed. Padova 1990: Piccin

De Negri M: *Neuropsichiatria dell'età evolutiva*, 2004: Piccin

Felix TM, Leite JCL, Maluf W, Coelho JC: A genetic diagnostic survey in a population of 202 mentally retarded institutionalized patients in the south of Brazil. *Clin Genet* 1998, 54: 219-223

Hunter AGW. *Medical genetics: 2.The diagnostic approach to the child with dysmorphic signs*. *Canad Med Ass J* 2002, 167: 367-372

Kuhlebaumer G, Hullman J: Novel genomic techniques open new avenues in the analysis of monogenic disorders. *Human Mutation* 2011, vol 3, 2: 144-151

Marinaretti MR, Rosemberg MI, Stone D, Ried T, Schrock E, Ning Y, Biesecker LG: Detection of a cryptic traslocation by subtelomeric microsatellite screening and spectral kariotyping. Am J Hum Genet, 1996, 59: A 65

Majnemer MR, Shevell MI Diagnostic yeld of the neurologic assessment of the developmentally delayed child. J Pediatr. 1995; 137: 193-199

O'Brien, Yule W: Caratteristiche comportamentali delle malattie genetiche. McGraw-Hill, 2000

Russel P J: iGenetica, 2°edizione

Schaefer GB, Bodensteiner JB. Evaluation of the child with idiopatic mental retardation. Pediatr. Clin Am, 1992; 39: 929-943.

Schiff M, Lewontin R. Education and class: the irrlevance of IQ genetic studies. 1986 Oxford: Claredon Press

Serra G, Mastropaolo C: L'eziopatogenesi del ritardo mentale: importanza e ruolo delle cause gentiche. Gior Neuropsich età evol; 2003, 23: 169-184

Serra G, Mastropaolo C, Demelas L: Il ritardo mentale. M.De Negri, Neuropsichiatria dell'età evolutiva, 2004: 519-538

Slavotinek A, Rosemberg M, Knigth B, Gaunt L, Fergusson W, Killoran C, Clayton-Smith J, Kingston H, Campbell RI, Flint J, Donnai D, Biesecker L: Screening by submicroscopic chromosome rearrangements in children with idiopathic mental retardation using microsatellite markers for the chromosome telomeres. J Med Genet, 1999; 36: 405-411

Smith's: Recognizable pattern of human malformation, Jones 6°ed

Srsen S, Misovicova N, Srsnova K, Volna J: Chromosomal aberration in a group of mentally retarded person. Cesk Psych 1989; 85: 9-11

Swaiman KF: Pediatric Neurology. Principle and practice. 1994 St Louis-Mosby Year Book

Thapar A, Gottesman I, Owen MJ, O'Donovan MC, Mc Guffin P. The genetics of mental retardation. British Journal of Psychiatr, 1994; 164: 747-758

Tizard J. Race and IQ: the limits of probably. New Behaviour. 1975; 1: 6-9

Topper S, Ober C, Das S: Exome sequencing and the genetics of intellectual disability. Clin Gen 2011: 1-10

www.omim.com

www.geneclinics.org

www.orpha.net

www.malattierare.iss.it

www.malattieraresardegna.it

RINGRAZIAMENTI

Voglio ringraziare per prime (in ordine alfabetico) le colleghe Antonella Amadori, Chiara Perria, Valentina Pes e Silvia Sini, per il loro prezioso aiuto. E' grazie al loro entusiasmo, alla loro disponibilità e all'amore che dimostrano per il lavoro che questa tesi è stata possibile.

Grazie a Gigliola Serra, che brontola sempre per i miei "casini", ma tanto c'è sempre.....

Grazie a Mirko, Giada, Martino e Patrizia e alle loro famiglie, che con la loro serenità e la loro dignità mi hanno insegnato tanto.

Grazie Silvia Festa e a Valeria Perria, vi voglio bene.

Grazie ai miei colleghi, che nel momento del bisogno sono sempre stati all'altezza della situazione.

Grazie a Prof. Cucca, che non mi ha cacciato con ignominia.....

Grazie a quelli che fanno davvero male il loro lavoro, perchè mi ricordano cosa non voglio essere nella vita.

Grazie ai miei suoceri, a Pasqualino, a Dario, ad Arianna, perchè sanno amarmi nel bene e nel male.....

Grazie ai miei genitori che mi hanno reso così ordinariamente folle.

Grazie a Cristiano, il miglior fratello che avrei mai potuto desiderare.

Grazie a mia figlia Lidia, che col suo essere "sussinca" mi tiene in allenamento ma soprattutto mi tiene viva, con l'augurio che pian piano arrivi ad essere fiera dei suoi genitori e soprattutto di sè stessa.

Grazie a Paolo.....ti amo.