

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO**

Dipartimento di Medicina e Chirurgia



**Scuola di specializzazione in Neuropsichiatria Infantile**

**CARATTERIZZAZIONE DELLO SPETTRO FENOTIPICO  
CORRELATO A VARIANTI LOSS-OF-FUNCTION NEL  
GENE *SCN8A***

Relatore: Chiar.mo Prof. **Pierangelo VEGGIOTTI**

Co-relatore: Chiar.ma Prof.ssa **Elena GARDELLA**

Tesi di specializzazione di:

**Roberto PREVITALI**

Matricola: S63002

Anno Accademico 2021/2022

# Indice

---

|  |    |
|--|----|
| Abstract .....   | 1  |
| Introduzione .....   | 3  |
| Epilessia .....  | 3  |
| Epidemiologia .....  | 4  |
| Classificazioni .....  | 4  |
| Tipi di crisi .....  | 5  |
| Tipi di epilessia .....  | 7  |
| Sindromi epilettiche .....   | 8  |
| Eziologia .....  | 17 |
| Neurosviluppo .....  | 19 |
| Disabilità intellettiva .....  | 19 |
| Disturbo dello spettro autistico .....                                 | 20 |
| Disturbo da deficit di attenzione/iperattività .....                   | 21 |
| Disturbi del linguaggio .....  | 21 |
| Disturbi dell'apprendimento .....                                      | 22 |
| Studi genetici in epilessia e neurosviluppo .....                      | 23 |
| Test genetici .....  | 25 |
| Benefici della diagnosi genetica .....                                 | 26 |
| Ruolo dei canali ionici in epilessia e neurosviluppo .....             | 27 |
| <i>SCN1A</i> .....   | 31 |
| <i>SCN2A</i> .....   | 32 |
| <i>SCN3A</i> .....   | 33 |
| <i>SCN9A</i> .....   | 33 |
| <i>SCN1B</i> .....   | 33 |
| <i>SCN8A</i> .....   | 35 |
| Encefalopatie epilettiche e di sviluppo .....                          | 36 |
| Epilessia intermedia .....   | 36 |
| Epilessia infantile familiare .....                                    | 37 |
| Epilessie generalizzate .....  | 37 |
| Disturbi del neurosviluppo senza epilessia .....                       | 37 |
| Scopo dello studio .....   | 38 |
| Materiali e Metodi .....   | 39 |
| Selezione della coorte e delle varianti per lo studio funzionale ..... | 39 |
| Raccolta dati .....  | 43 |
| Studi funzionali .....   | 43 |

|  |    |
|--|----|
| Risultati .....                              | 47 |
| Caratteristiche cliniche.....                | 47 |
| Descrizione secondo i diversi fenotipi ..... | 49 |
| Background genetico.....                     | 54 |
| Studi funzionali .....                       | 55 |
| Discussione .....                            | 58 |
| Limiti dello studio .....                    | 62 |
| Conclusioni .....                            | 63 |
| Materiali Supplementari.....                 | 64 |
| Bibliografia .....                           | 73 |
| Ringraziamenti .....                         | 85 |

## Abstract

---

**Obiettivo:** lo studio si propone di descrivere il fenotipo dei pazienti portatori di varianti con perdita di funzione (LOF) nel gene *SCN8A*, ricercando dati utili per una precoce diagnosi differenziale rispetto a portatori di varianti con guadagno di funzione (GOF) per la gestione di una terapia mirata.

**Metodi:** a partire da un'ampia coorte di pazienti con varianti patogenetiche del gene *SCN8A*, sono stati selezionati i portatori di varianti con effetto LOF confermato, comprese varianti troncanti e varianti missenso precedentemente testate in vitro. Attraverso l'uso di tre differenti prediction tool sono stati selezionati pazienti con varianti predette LOF e sette varianti geniche che sono state testate con studi funzionali in vitro. Per i pazienti selezionati, sono stati raccolti dati demografici, genetici ed elettroclinici dettagliati, comprese informazioni sullo sviluppo psicomotorio, sull'epilessia, sulla clinica neurologica e sulla risposta ai farmaci anticrisi.

**Risultati:** sono stati inclusi 58 pazienti, con un'età mediana di 10 anni, 9 mesi (range: 18 mesi - 42 anni). Il 70,7% dei pazienti presentava una disabilità intellettiva (ID), lieve-moderata nel 55,2% dei casi, grave-profonda nel 15,5% o un ritardo globale dello sviluppo (13,8%). Nel 15,5% dei casi le abilità cognitive erano nella norma. Nel 50% dei pazienti sono state segnalate problematiche neuropsichiatriche.

L'epilessia era presente nel 55,2% dei casi, con un'età mediana di esordio di 3 anni, 7 mesi (range 1 mese – 14 anni). Il 32,8% dei pazienti presentava un'epilessia generalizzata, il 17,2% un'encefalopatia epilettica e di sviluppo, il 5,2% un'epilessia mioclonica. Durante il follow-up i pazienti hanno presentato diversi tipi di crisi: assenza (50%), crisi tonico-cloniche generalizzate (37,5%), clonico-miocloniche/emicicloniche (37,5%), toniche (9,4%) e atoniche (6,3%). Il 40,6% dei pazienti ha raggiunto la libertà da crisi.

**Discussione:** Dall'analisi dei dati raccolti è stato possibile identificare quattro fenotipi clinici: [1] pazienti senza epilessia con possibili disturbi del neurosviluppo (NDDwoE), [2] pazienti con epilessia generalizzata (GE), [3] pazienti con encefalopatia epilettica e di sviluppo (DEE), [4] pazienti con epilessia mioclonica (MyE). Nel primo gruppo (NDDWoE) i pazienti presentavano un ampio spettro fenotipico, con ID nella maggior parte dei casi, soprattutto lieve-moderata (87%), in alcuni di loro sono state registrate anomalie EEG. Tra i pazienti con GE, circa la metà presentava abilità cognitive in norma

e nel 52,6% dei casi si è raggiunta la libertà da crisi. I pazienti con DEE erano in percentuale maggiore di quanto precedentemente descritto e presentavano tutti ID, il 20% era seizure-free. L'epilessia mioclonica non era stata precedentemente descritta in pazienti con varianti in *SCN8A*.

Conclusioni: considerati come un unico gruppo, l'epilessia generalizzata con assenze, l'insorgenza tardiva dell'epilessia e la scarsa risposta farmaci bloccanti i canali del sodio sembrano essere le caratteristiche principali dei pazienti *SCN8A*-LOF; tuttavia, esistono importanti differenze all'interno dei quattro sottogruppi fenotipici rilevati, che si distinguono per caratteristiche cliniche, tipi di crisi ed età di insorgenza dell'epilessia. Ulteriori studi sono necessari per individuare caratteristiche precoci che permettano di differenziare i pazienti LOF con insorgenza precoce di crisi e quadri di DEE rispetto a quelli con varianti GOF.

## Introduzione

---

### Epilessia

L'epilessia è un disturbo neurologico caratterizzato da una persistente predisposizione a generare crisi epilettiche, ovvero episodi parossistici ricorrenti di disfunzione cerebrale dovuti ad un'attività neuronale improvvisa, disorganizzata ed eccessiva; e dai suoi effetti neurobiologici, cognitivi, psicologici e sociali. La definizione di epilessia richiede l'occorrenza di almeno una crisi epilettica (1).

Nel 2005 la commissione della International League Against Epilepsy (ILAE) ha definito concettualmente una "crisi epilettica" come la presenza di un evento transitorio (con esordio e termine definiti dal punto di vista clinico e/o elettroencefalografico), con segni e/o sintomi (variabili a seconda della regione cerebrale in cui origina la crisi) dovuti ad un'attività neuronale anomala.

Per rendere queste definizioni più facilmente applicabili dal punto di vista clinico, la ILAE ha istituito una Task Force nel 2014 (2), che ha definito l'epilessia come un disturbo cerebrale caratterizzato da uno dei seguenti:

1. almeno due crisi non provocate (o riflesse) separate da un intervallo di almeno 24 ore;
2. una crisi non provocata (o riflessa) e una probabilità di ulteriori crisi, nei successivi 10 anni, simile al rischio generale di recidiva (almeno 60%) che si presenta dopo due crisi non provocate;
3. diagnosi di una sindrome epilettica.

Dato l'ampio spettro di possibilità cliniche ed eziologiche dell'epilessia, questa non deve essere considerata come una singola entità clinica, ma come una gamma di disturbi cerebrali causati da una varietà di cause sottostanti. Pertanto, alcuni autori hanno suggerito sia più corretto parlare di "epilessie" piuttosto che di "epilessia" (1,3).

Nonostante l'elevato numero di farmaci anticrisi (ASMs) a disposizione, fino al 30% di pazienti in età pediatrica continua ad avere crisi, presentando un quadro di farmacoresistenza (4). L'epilessia farmacoresistente è definita da una persistenza di crisi, nonostante l'utilizzo di due o più farmaci anticrisi adeguatamente scelti per tipologia di crisi e posologia, utilizzati sia in monoterapia che in associazione.

### ***Epidemiologia***

L'epilessia è uno dei disturbi neurologici più comuni con circa 50 milioni di persone affette nel mondo (5). Presenta una prevalenza di 0.5-1% e un'incidenza di 50-120 casi anno/100.000 abitanti.

La patologia può colpire qualsiasi età della vita, ma si presenta tipicamente con due picchi di incidenza: durante l'infanzia e nell'età senile (5). In particolare, diversi studi di popolazione hanno rilevato un'incidenza di epilessia molto più elevata nel primo anno di vita rispetto ai bambini più grandi (82,1-118 vs. 46 per 100.000 anni-persona) (6,7).

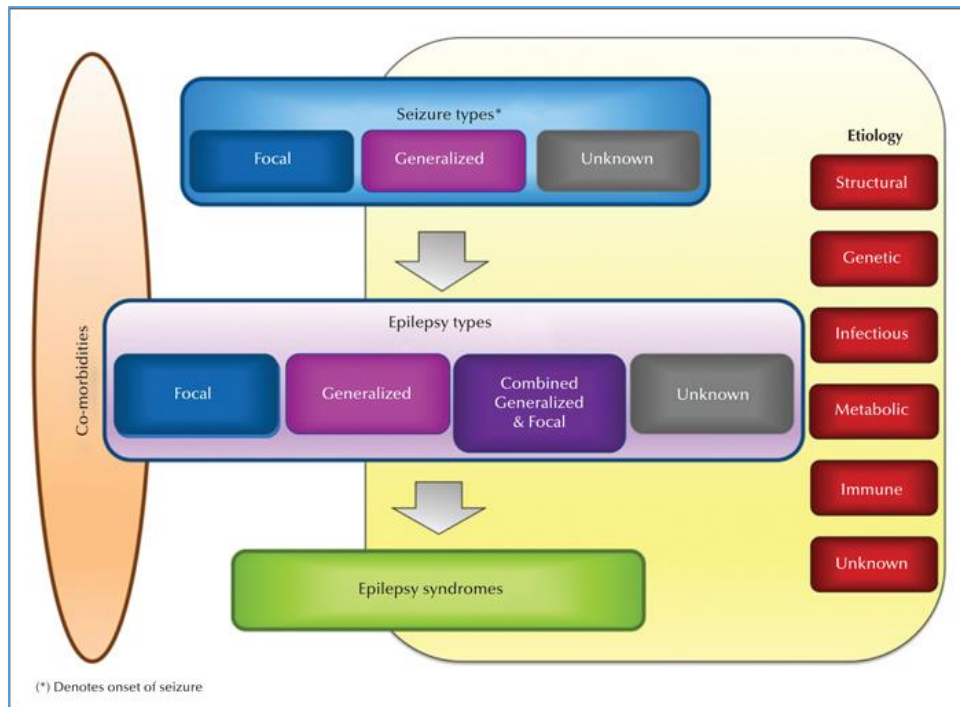
### ***Classificazioni***

Crisi, epilessia e sindromi epilettiche sono state classificate dalla ILAE a partire dalla sua fondazione nel 1909, ma hanno avuto particolare vigore negli anni '60 grazie al lavoro del professor Gastaut. Alla classificazione del professor Gastaut, si sono susseguite le classificazioni ILAE del 1981, e la successiva revisione del 1989 (8).

Nonostante alcuni concetti presenti già in quelle classificazioni siano validi tutt'oggi, le scoperte scientifiche degli ultimi decenni, che hanno permesso di aumentare le conoscenze e la comprensione sulle epilessie e di modificare gli approcci diagnostico-terapeutici, hanno reso evidente la necessità di una continua modifica e revisione delle classificazioni precedenti (9).

Le possibilità del clinico di compiere una classificazione sono correlate alla facoltà di eseguire indagini diagnostiche sempre più accurate. Le prime classificazioni si basavano quasi esclusivamente su aspetti clinici ma, con il miglioramento delle tecniche di indagine diagnostica, è stato possibile integrare gli aspetti clinici con dati provenienti da studi EEG, metodiche di imaging e tecniche di biologia molecolare (10,11).

Una fondamentale revisione dei criteri classificativi è stata portata a termine da parte della 'Commissione per la Classificazione e la Terminologia' della ILAE nel 2017 (12). In questo lavoro il panel di esperti ha ridefinito il percorso clinico del paziente a partire dal presentarsi di una crisi epilettica, definendo la necessità di fornire dapprima una corretta classificazione del tipo di crisi, cui deve seguire l'identificazione del tipo di epilessia per poi giungere, in molti casi, alla definizione di una sindrome epilettica (*Fig.1*).



**Figura 1:** Framework for classification of the epilepsies. Da: Scheffer IE et al. *ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. Epilepsia. 2017;58(4):515.*

In ogni fase di questo processo, il medico dovrebbe cercare di identificare l’eziologia alla base della manifestazione clinica “epilessia”, prendendo sempre in considerazione la possibilità che il paziente possa presentare delle caratteristiche cliniche difficili da classificare o appartenere a più di una categoria diagnostica. Pertanto, il processo diagnostico non deve essere statico e definitivo, ma va interpretato in modo dinamico, anche in considerazione delle modificazioni cliniche rilevabili solo con un attento follow-up clinico-strumentale.

### Tipi di crisi

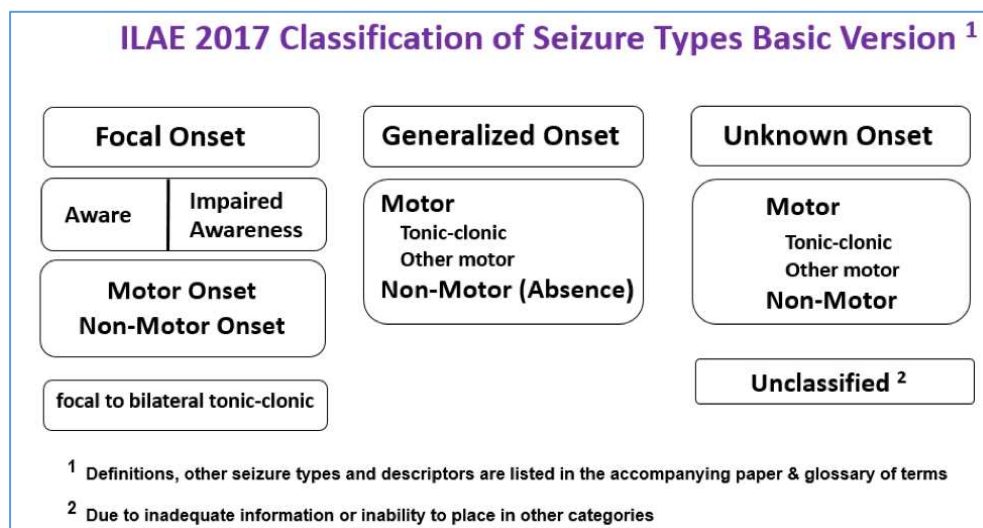
La classificazione della crisi di esordio (primo livello diagnostico) segue una diagnosi definita di epilessia (ovvero il clinico deve aver escluso la possibilità che la manifestazione clinica del soggetto sia da attribuire ad altri disturbi parossistici non epilettici).

Un’accurata descrizione delle crisi è essenziale, poiché in alcuni casi questa può essere l’unica evidenza a sostegno della diagnosi di epilessia (9).

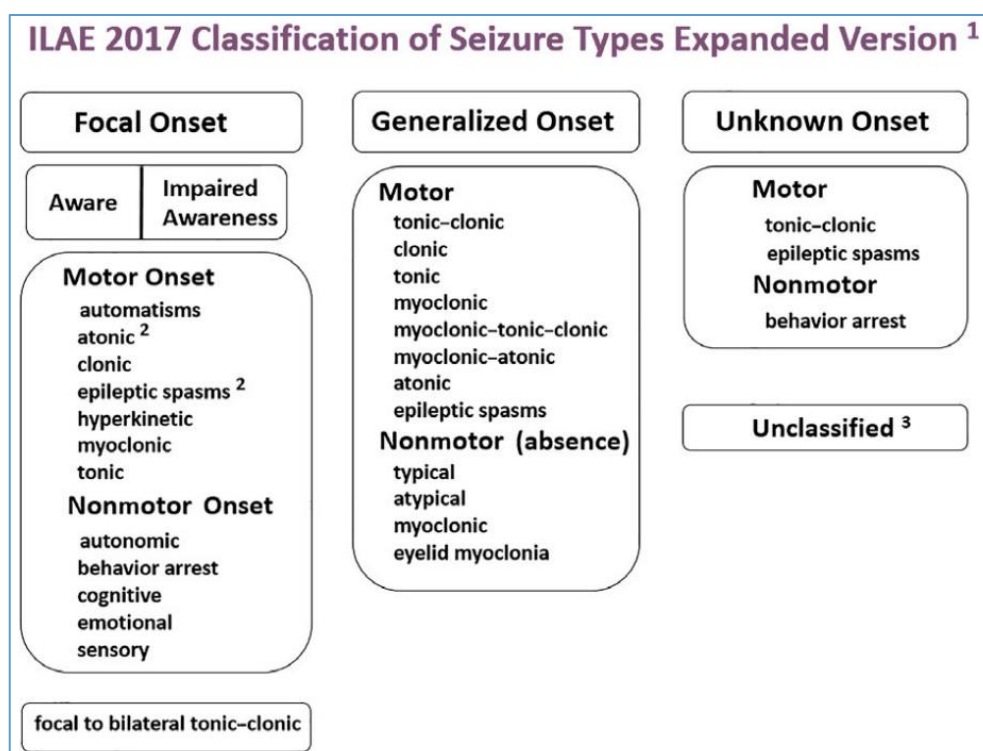
La classificazione delle crisi proposta dalla Commissione ILAE nel 2017 riprende le precedenti, definendo però una “Basic Seizure Classification” (Fig. 2) per i medici non



specialisti in epilessia e una “Expanded Seizure Classification” (Fig. 3) per specialisti con expertise in diagnosi e trattamento di epilessia (12).



**Figura 2:** ILAE 2017 Classification of Seizure Types Basic Version. Da: Fisher RS et al. Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*. 2017;58(4):524.



**Figura 3:** ILAE 2017 Classification of Seizure Types Expanded Version. Da: Fisher RS et al. Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*. 2017;58(4):525.

In accordo con tale classificazione, si identificano:

1. *Crisi focali*: originano da un network neuronale più o meno diffuso, ma limitato ad un solo emisfero, possono poi, con una propagazione lungo vie preferenziali, coinvolgere anche l'emisfero controlaterale (12,13).

Crisi ad esordio focale possono essere classificate in base alla presenza o meno di una compromissione della consapevolezza, che può presentarsi in un momento qualsiasi dell'attacco, non solo e non necessariamente all'esordio della crisi (8).

Le crisi sono poi classificate in base alla presenza di sintomi motori (automatismi, attività tonica, atonica, clonica, spasmi epilettici, movimenti ipercinetici o mioclonie) o di sintomi non motori (sintomatologia autonoma, arresto comportamentale, sintomi cognitivi, emotivi o sensoriali).

2. *Crisi generalizzate*: originano in un punto di un network distribuito bilateralmente nei due emisferi e rapidamente coinvolgono tutto il network stesso. Possono essere interessate strutture sia corticali che sottocorticali, non dovendo necessariamente includere l'intera corteccia (12,13).

Le crisi ad esordio generalizzato possono essere suddivise tra crisi con esordio motorio (tonico-clonico, clonico, tonico, mioclonico, mioclonico-tonico-atonico, mioclonico-atonico, atonico e spasmi) e non motorie, definite assenze, che possono essere tipiche, atipiche, miocloniche o con mioclonie palpebrali.

3. *Crisi ad esordio non noto o non classificabili*: così definite se non ci sono informazioni adeguate o per l'impossibilità di inserirle all'interno di una specifica categoria diagnostica.

## **Tipi di epilessia**

La classificazione del tipo di epilessia (secondo livello diagnostico) si basa su evidenze cliniche in correlazione con reperti EEG, sia critici che intercritici. È possibile che la diagnosi termini a questo livello classificativo, ciò avviene in quei casi in cui non sia possibile da parte del clinico arrivare anche alla definizione della sindrome epilettica (12).

1. *Epilessie focali*: comprendono alterazioni unifocali e multifocali che interessano un solo emisfero. Possono presentare diversi tipi di crisi focali e crisi focali che evolvono in crisi bilaterali tonico-cloniche.

2. *Epilessie generalizzate*: il paziente mostra crisi generalizzate di diverso tipo.

3. *Epilessie combinate generalizzate e focali*: gruppo di epilessie inserito dalla classificazione del 2017.

4. *Epilessie non note*: in questo gruppo sono inserite quelle epilessie di cui il clinico non ha sufficienti informazioni per poter operare una classificazione.

### **Sindromi epilettiche**

La proposta di classificazione delle epilessie e delle sindromi epilettiche, pubblicata dall'ILAE nel 1985, definiva una sindrome epilettica come "un disturbo epilettico caratterizzato da un gruppo di segni e sintomi che si verificano abitualmente insieme. Questi segni e sintomi possono essere clinici (ad esempio, anamnesi, tipo di crisi, modalità di ricorrenza delle crisi e reperti neurologici e psicologici) o reperti rilevati da studi ausiliari (ad esempio EEG, radiografie, TAC e RMN)".

La Revisione della Classificazione, pubblicata nel 1989, definiva una sindrome epilettica in modo simile e osservava che le caratteristiche che la definiscono possono includere il tipo di crisi, l'eziologia, l'anatomia, i fattori precipitanti, l'età di insorgenza, la gravità, la cronicità, la ciclicità diurna o circadiana e talvolta la prognosi. Inoltre, era stato segnalato che alcune sindromi possono evolvere da una all'altra, come gli spasmi infantili che evolvono nella sindrome di Lennox-Gastaut.

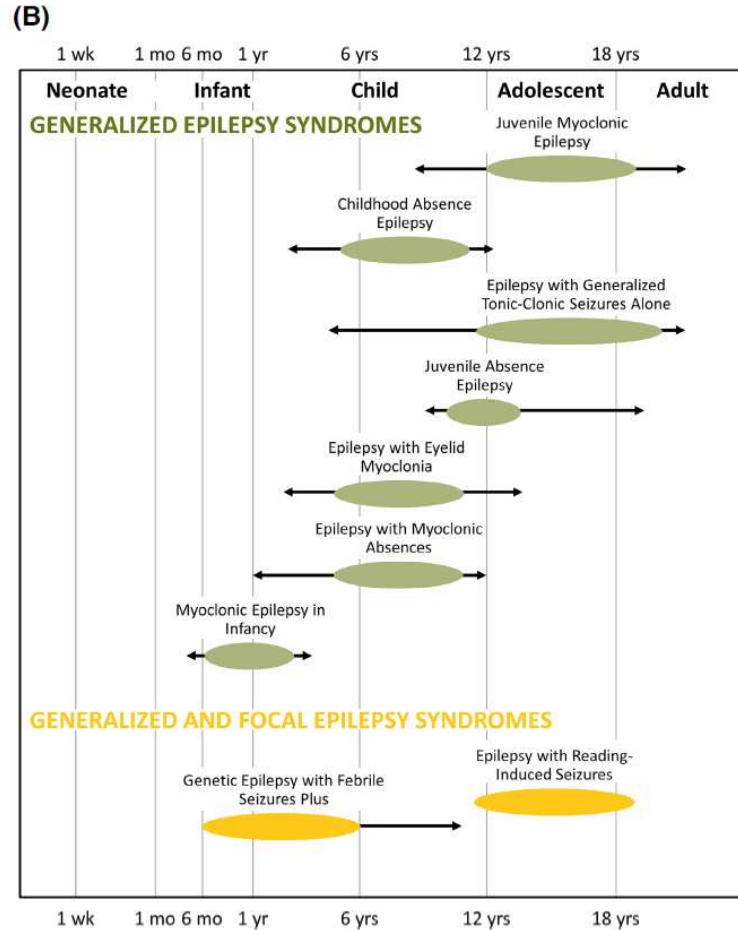
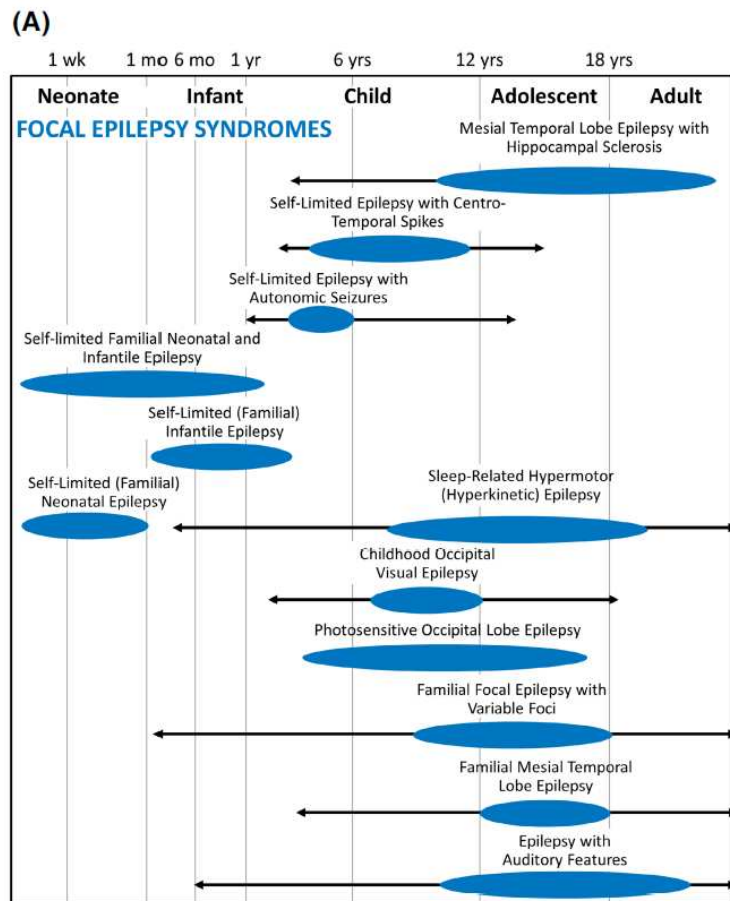
Nei position paper aggiornati sulla Classificazione delle Epilessie del 2017 (8,12) il terzo grado diagnostico era rappresentato dalla sindrome epilettica, definita come "un gruppo di caratteristiche che tendono a verificarsi insieme, tra cui tipi di crisi, EEG e risultati di imaging". Si proponeva inoltre la possibilità di considerare nelle sindromi anche le comorbilità specifiche, come disabilità intellettiva e psichiatrica, insieme a quadri specifici di EEG e neuroimmagini.

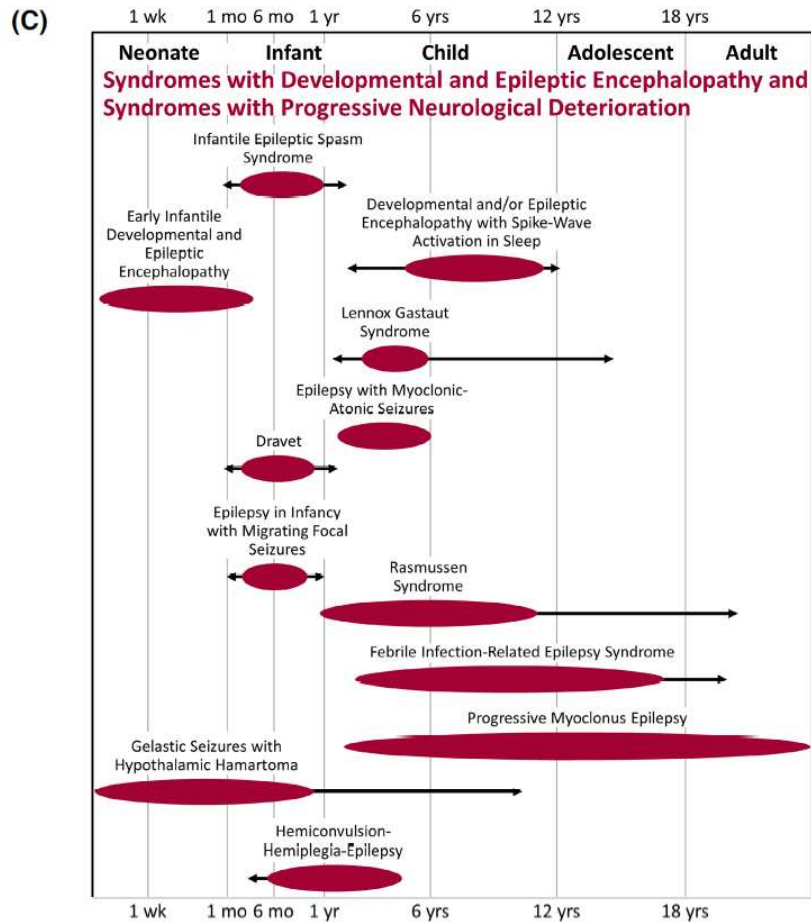
Sebbene molte sindromi ben riconosciute fossero state inserite sia nella classificazione del 1985 che in quella del 1989, le loro definizioni non erano mai state formalmente accettate dalla ILAE fino alla creazione nel 2017 della nuova Task Force "Nosologia e Definizioni", che è stata incaricata di definire una classificazione delle sindromi epilettiche. Tale Task Force ha poi elaborato la nuova classificazione delle sindromi epilettiche, culminata nei Position Paper pubblicati nel 2022 (14–18). In continuità con le classificazioni precedenti, il panel di esperti ha raggruppato le sindromi epilettiche secondo età di insorgenza, suddividendole in: [1] sindromi ad insorgenza neonatale e nella prima infanzia, [2] sindromi ad insorgenza infantile, [3] sindromi con età di

insorgenza variabile e [4] epilessie generalizzate idiopatiche (IGE). In linea con la Classificazione dell'epilessia del 2017, hanno ulteriormente suddiviso le sindromi in ciascuna fascia d'età in generalizzate o focali; in base al tipo di crisi; e stabilito una categoria separata per le sindromi con encefalopatia epilettica e di sviluppo (DEE) e per le sindromi con deterioramento neurologico progressivo (vedi *Fig. 4, Tabella 1*) (14).

Il termine DEE è stato proposto nella Classificazione delle Epilessie del 2017 per indicare un'epilessia associata a un ritardo nello sviluppo che può essere dovuto all'eziologia di base o all'attività epilettica sovrapposta, o ad entrambe (12). Nella maggior parte dei casi di DEE, l'insorgenza dell'epilessia e la compromissione dello sviluppo si manifestano molto precocemente. Tuttavia, il termine DEE può essere applicato quando l'epilessia inizia più tardi nel corso della vita, dopo un periodo prolungato di sviluppo normale. Esempi di quest'ultimo caso sono la sindrome di Rasmussen o l'epilessia mioclonica progressiva in un adolescente o in un adulto precedentemente normale dal punto di vista dello sviluppo. In altri casi, possono essere presenti problemi di sviluppo impercettibili, che diventano gradualmente più evidenti con l'insorgenza delle crisi o con il loro peggioramento (14).

Tradizionalmente, le sindromi sono state definite principalmente in base alle caratteristiche elettrocliniche; tuttavia, negli ultimi due decenni, la scoperta di geni correlati a epilessia ha permesso di studiare coorti di casi con un'eziologia genetica condivisa. Sono emersi fenotipi elettroclinici coerenti, tra cui *CDKL5* (19), *MeCP2* (20), *PCDH19* (21,22), *STXBPI* (23). Inoltre, anche alcune eziologie strutturali, metaboliche, immunitarie e infettive presentano fenotipi elettroclinici caratteristici (14). Pertanto, le epilessie dovute a specifiche eziologie genetiche, strutturali, metaboliche, immunitarie o infettive possono anche soddisfare i criteri per una sindrome, quando sono associate a caratteristiche elettrocliniche coerenti e hanno implicazioni gestionali e prognostiche comuni.





**Figura 4:** Classificazione delle sindromi epilettiche in base all'età di presentazione. Sono riportate le età tipiche di presentazione, con gli intervalli indicati dalle frecce. Le sindromi epilettiche focali sono indicate in blu (pannello A), le sindromi epilettiche generalizzate in verde, le sindromi focali e generalizzate in giallo (pannello B) e le sindromi con encefalopatia evolutiva e/o epilettica o con deterioramento neurologico progressivo in rosso (pannello C). Da: Wirrell EC et al. Methodology for classification and definition of epilepsy syndromes with list of syndromes: Report of the ILAE Task Force on Nosology and Definitions. *Epilepsia*. 2022 Jun;63(6):1333-1348.

| Type of epilepsy  |  | Focal and/or generalized  | Generalized   | Syndromes with DEE or with progressive neurological deterioration   |
|---|--|---|---|---|
| Position paper<br>Epilepsy syndromes with onset in neonates and infants <sup>22</sup> | Focal  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Self-limited (familial) neonatal epilepsy</li> <li>• Self-limited (familial) infantile epilepsy</li> <li>• Self-limited familial neonatal-infantile epilepsy</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Myoclonic epilepsy in infancy</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Early infantile DEE</li> <li>• Epilepsy of infancy with migrating focal seizures</li> <li>• Infantile epileptic spasms syndrome</li> <li>• Dravet syndrome</li> <li>• Etiology-specific DEEs                             <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>KCNQ2</i>-DEE</li> <li>• Pyridoxine-dependent and pyridox(am)ine 5' phosphate deficiency DEE</li> <li>• <i>CDKL5</i>-DEE</li> </ul> </li> <li>• <i>PCDH19</i> clustering epilepsy</li> <li>• GLUT1DS-DEE</li> <li>• Sturge-Weber syndrome</li> <li>• Gelastic seizures with HH</li> </ul> |
|   | Epilepsy Syndromes with onset in childhood <sup>23</sup> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Self-limited focal epilepsies</li> <li>• Self-limited epilepsy with centrotemporal spikes</li> <li>• Self-limited epilepsy with autonomic seizures</li> <li>• Childhood occipital visual epilepsy</li> <li>• Photosensitive occipital lobe epilepsy</li> </ul>                     | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Epilepsy with myoclonic absences</li> <li>• Epilepsy with eyelid myoclonia</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Epilepsy with myoclonic-atonic seizures</li> <li>• Lennox-Gastaut syndrome</li> <li>• DEE or EE with spike-and-wave activation in sleep</li> <li>• Febrile infection-related epilepsy syndrome</li> <li>• Hemiconvulsion-hemiplegia-epilepsy</li> </ul>  |
| Epilepsy syndromes with onset at a variable age <sup>24</sup>                         |  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis</li> <li>• Familial mesial temporal lobe epilepsy</li> <li>• Sleep-related hypermotor (hyperkinetic) epilepsy</li> <li>• Familial focal epilepsy with variable foci</li> <li>• Epilepsy with auditory features</li> </ul> |   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Rasmussen syndrome</li> <li>• Progressive myoclonus epilepsies</li> </ul>  |
|   | Idiopathic generalized epilepsies <sup>21</sup>          |   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Childhood absence epilepsy</li> <li>• Juvenile absence epilepsy</li> <li>• Juvenile myoclonic epilepsy</li> <li>• Epilepsy with generalized tonic-clonic seizures alone</li> </ul> |   |

Abbreviations: DEE, developmental and/or epileptic encephalopathy; EE, epileptic encephalopathy; GLUT1DS, glucose transporter 1 deficiency syndrome; HH, hypothalamic hamartoma.

**Tabella 1:** Tabella riassuntiva delle sindromi epilettiche. Da: Wirrell EC et al. Methodology for classification and definition of epilepsy syndromes with list of syndromes: Report of the ILAE Task Force on Nosology and Definitions. *Epilepsia*. 2022 Jun;63(6):1333-1348.

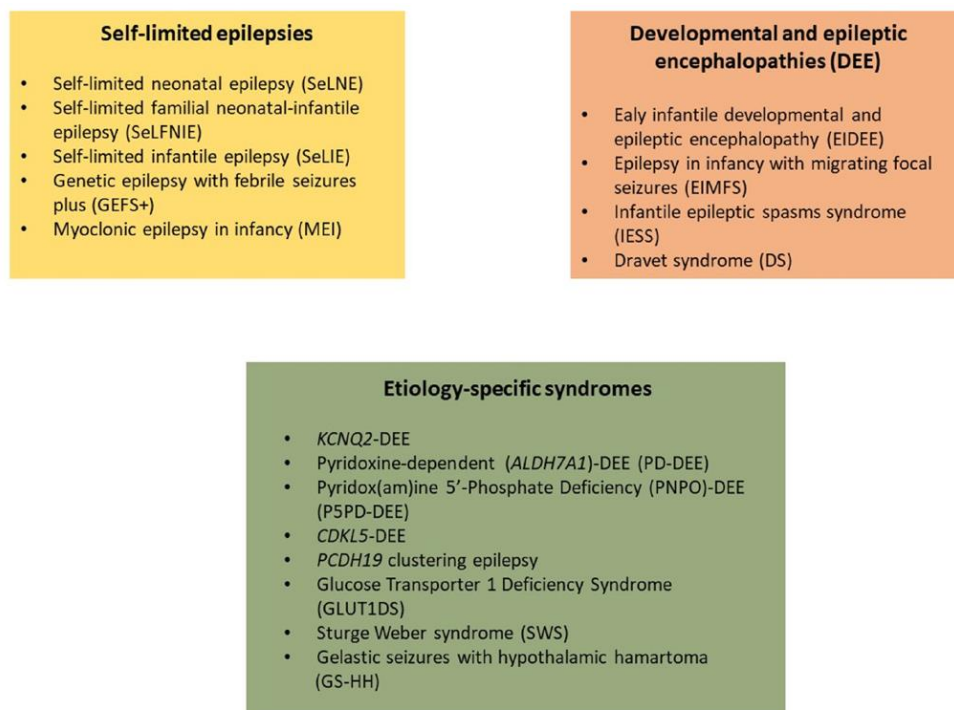


- Sindromi epilettiche con esordio in epoca neonatale e prima infanzia (<2 anni)

I bambini che presentano un esordio di epilessia molto precoce sperimentano tassi più elevati di farmacoresistenza (14), di mortalità (24) e un elevato carico di comorbidità cognitive e comportamentali (25). Fino al 50% di questi mostra un ritardo globale dello sviluppo a due anni dall'esordio di malattia (26). Le comorbidità sono più frequenti tra i bambini che sviluppano crisi resistenti ai farmaci (27) e quelli con un elevato carico di crisi (28).

Nel paper di classificazione delle epilessie ad esordio neonatale e nella prima infanzia (15) le sindromi epilettiche sono state divise in due gruppi principali: le sindromi epilettiche self-limited, in cui è probabile che si verifichi una remissione spontanea, e le DEE (Fig. 5). La maggior parte delle sindromi ad eziologia specifica che iniziano nel periodo neonatale o infantile sono DEE.

All'interno del gruppo delle epilessie self-limited, sia varianti patogeniche *de novo* che ereditarie producono caratteristiche elettrocliniche simili nei casi familiari e non familiari. Nelle sindromi epilettiche self-limited che iniziano sotto i due anni di età, le crisi sono tipicamente responsive ai farmaci e le sindromi sono associate a uno sviluppo intellettuale normale o a una lieve disabilità cognitiva (15).



**Figura 5:** Organizzazione delle sindromi epilettiche che esordiscono nei neonati e nella prima infanzia. Da: Zuberi et al. ILAE classification and definition of epilepsy syndromes with onset in neonates and infants: Position statement by the ILAE Task Force on Nosology and Definitions. *Epilepsia*. 2022 Jun;63(6):1349-1397.



Le DEE sono state ulteriormente classificate in DEE infantili precoci (EIDEE), con esordio esclusivo al di sotto dei tre mesi di età, e altre sindromi che si presentano di solito dopo i tre mesi di vita o hanno uno spettro di età di insorgenza che comprende periodi precoci e tardivi (15).

- Sindromi epilettiche con esordio nell'infanzia (2-12 anni)

Le sindromi a insorgenza infantile possono essere suddivise in tre gruppi principali (Tabella 2): [1] epilessie focali self-limited (SeLFE); [2] sindromi epilettiche generalizzate; [3] encefalopatie dello sviluppo e/o epilettiche (16).

| Self-limited focal epilepsies          |  | Genetic generalized epilepsies               |                               | DEEs   |   |
|--|--|--|-------------------------------|--|---|
| Epilepsy syndromes with focal seizures | Formerly known as  | Epilepsy syndromes with generalized seizures | Formerly known as             | DEEs   | Formerly known as   |
|  |  |  |                               | SeLECTS  | Childhood epilepsy with centrottemporal spikes, (benign) Rolandic epilepsy, (benign) epilepsy with centrottemporal spikes     |
| SeLEAS                                 | Panayiotopoulos syndrome, early onset (benign) occipital epilepsy                              | EEM  | Jeavons syndrome              | LGS  | No changes  |
| COVE                                   | Late onset (benign) occipital epilepsy or idiopathic childhood occipital epilepsy-Gastaut type | EMA  | Bureau and Tassinari syndrome | DEE-SWAS<br>EE-SWAS<br>Landau-Kleffner syndrome (subtype of EE-SWAS) | Epileptic encephalopathy with continuous spike-and-wave in sleep, atypical (benign) partial epilepsy (pseudo-Lennox syndrome) |
| POLE                                   | Idiopathic photosensitive occipital lobe epilepsy  |  |                               | FIRES<br>HHE   | AERRPS, DESC<br>No changes  |

**Tabella 2:** Tabella riassuntiva delle sindromi epilettiche ad esordio nell'infanzia. Da: Specchio N et al. *International League Against Epilepsy classification and definition of epilepsy syndromes with onset in childhood: Position paper by the ILAE Task Force on Nosology and Definitions. Epilepsia. 2022 Jun;63(6):1398-1442*

*Epilessie focali self-limited:* rappresentano fino al 25% di tutte le epilessie pediatriche (29). Condividono le seguenti caratteristiche:

1. Insorgenza dipendente dall'età, specifica per ciascuna sindrome.
2. Nessuna lesione strutturale significativa dell'encefalo.
3. L'anamnesi della nascita, del periodo neonatale e degli antecedenti è di solito irrilevante.
4. Le abilità cognitive e l'esame neurologico sono in genere normali.
5. La remissione avviene solitamente entro la pubertà.

6. Farmacoresponsività se trattata.
7. Predisposizione genetica per il tratto EEG.
8. Semiologia classica delle crisi per ciascuna sindrome: le crisi sono focali motorie o sensoriali con o senza alterazione della coscienza e possono evolvere in crisi tonico-cloniche bilaterali.
9. Caratteristiche specifiche dell'EEG: anomalie epilettiformi con morfologia e localizzazione distintiva (a seconda della sindrome epilettica), spesso attivate con il sonno. L'EEG ha un'organizzazione normale.

Nella maggior parte dei casi, i bambini con SeLFE presentano caratteristiche tipiche di una sindrome specifica. Tuttavia, alcuni presentano un quadro misto o possono evolvere da una sindrome all'altra nel corso del tempo (30). Inoltre, in rari casi si verifica anche una sovrapposizione con le IGE (31,32).

Nell'ambito delle SeLFE, si riconoscono due livelli di sindromi, in base alla prognosi a lungo termine.

Il primo sottogruppo comprende due sindromi:

1. *Epilessia self-limited con punte centrotemporali* (SeLECTS; precedentemente chiamata epilessia infantile con punte centrotemporali, epilessia benigna dell'infanzia con punte centrotemporali o epilessia Rolandica benigna).
2. *Epilessia self-limited con crisi autonome* (SeLEAS; precedentemente chiamata sindrome di Panayiotopoulos o epilessia occipitale benigna a esordio precoce).

Il secondo sottogruppo comprende due sindromi:

1. *Epilessia visiva occipitale infantile* (COVE; precedentemente chiamata epilessia occipitale benigna a esordio tardivo, sindrome di Gastaut o epilessia occipitale infantile idiopatica di tipo Gastaut; in rari casi può esordire intorno alla pubertà/adolescenza).
2. *Epilessia del lobo occipitale fotosensibile* (POLE; precedentemente chiamata epilessia del lobo occipitale fotosensibile idiopatica).

Nel primo gruppo, la remissione sia nelle SeLECTS che nelle SeLEAS è prevista in tutti i casi entro l'adolescenza e, se si inizia il trattamento, non si deve continuare oltre tale età.

In COVE e POLE, la remissione è altamente probabile; tuttavia, alcuni pazienti possono presentare una persistenza delle crisi dopo l'adolescenza. Spesso viene prescritto un trattamento cronico con farmaci anticrisi che, nella maggior parte dei casi, può essere sospeso con successo senza che si verifichi una recidiva delle crisi; tuttavia, in rari casi può essere necessaria una durata maggiore del trattamento.

*Sindromi epilettiche generalizzate:* sostanzialmente tutte le sindromi epilettiche generalizzate con esordio nell'infanzia hanno un'eziologia genetica. Infatti, è frequente un'anamnesi familiare positiva per epilessia e sono considerate a eredità complessa, ovvero hanno una base poligenica, con o senza il contributo di fattori ambientali (16). Il livello cognitivo, l'esame neurologico e la risposta ai farmaci sono variabili. La semiologia delle crisi e le caratteristiche EEG sono specifiche per ciascuna delle sindromi incluse in questo gruppo.

Le epilessie genetiche generalizzate dell'infanzia comprendono l'epilessia con assenze dell'infanzia, l'epilessia con mioclonie palpebrali, l'epilessia con assenze miocloniche e l'epilessia con crisi miocloniche-atoniche. L'epilessia con assenze miocloniche e l'epilessia con mioclonie palpebrali hanno una prognosi variabile. L'epilessia con crisi miocloniche-atoniche è classificata tra le DEE, poiché i bambini mostrano tipicamente una stagnazione o una regressione dello sviluppo (16).

*Encefalopatie epilettiche e di sviluppo:* spesso presentano sia crisi focali che generalizzate, come nel caso della sindrome di Lennox-Gastaut, l'encefalopatia epilettica e di sviluppo con attivazione di punte-onde nel sonno (DEE-SWAS), e l'encefalopatia epilettica con attivazione di punte-onde nel sonno (EE-SWAS). Altre sindromi possono presentare solo crisi generalizzate, come l'epilessia con crisi miocloniche-atoniche (EMAtS), o solo crisi focali/multifocali, come la sindrome con emiconvulsioni-emiplegia-epilessia (HHE) e la sindrome epilettica febbrile da infezione (FIRES) (16).

- Epilessie generalizzate idiopatiche

Le epilessie generalizzate idiopatiche (IGE) sono un gruppo comune di epilessie, che rappresenta circa il 15%-20% delle persone con epilessia (33). Storicamente includono le sindromi dell'epilessia con assenza infantile (CAE), dell'epilessia con assenze giovanile (JAE), dell'epilessia mioclonica giovanile (JME) e dell'epilessia con crisi tonico-cloniche generalizzate (GTCA).

La classificazione dell'ILAE del 2017 ha suggerito di utilizzare il termine "epilessie genetiche generalizzate" (GGE) per l'ampio gruppo di epilessie con tipi di crisi generalizzate, sulla base di una presunta eziologia genetica derivante da dati di studi gemellari e familiari. La Commissione ha suggerito di riservare il termine IGE alle quattro sindromi CAE, JAE, JME e GTCA (17).

Il gruppo delle IGE costituisce un sottogruppo distinto delle GGE, per i seguenti motivi: [1] sono le sindromi più comuni all'interno delle GGE; [2] hanno generalmente una buona prognosi per il controllo delle crisi; [3] non evolvono verso un'encefalopatia epilettica; [4] esiste una sovrapposizione clinica tra CAE, JAE e JME, perciò, possono evolvere con l'età in un'altra sindrome IGE (ad esempio, CAE che evolve in JME); [5] presentano reperti EEG simili.

Sebbene la risposta ai farmaci anticrisi e la necessità di una terapia a lungo termine varino all'interno delle singole sindromi, le IGE sono solitamente responsive ai farmaci, con circa l'80% che risponde ai farmaci usati in modo appropriato.

I pazienti con IGE presentano uno o una combinazione dei seguenti tipi di crisi generalizzate: assenze, crisi miocloniche, tonico-cloniche e mioclonico-atoniche. Le crisi tonico-cloniche generalizzate possono avere come manifestazioni precoci caratteristiche focali o asimmetriche, come la deviazione o la versione della testa e degli occhi, mentre le crisi miocloniche possono essere focali o asimmetriche. I reperti focali spesso cambiano lato da una crisi all'altra. Le crisi generalizzate toniche, atoniche, miocloniche-atoniche, focali e gli spasmi epilettici escludono la diagnosi di IGE (17).

L'EEG mostra il classico riscontro di scariche generalizzate di punta-onda, tipicamente di 2,5-5,5 Hz, che si manifestano spesso durante la sonnolenza, il sonno e al risveglio. Le scariche appaiono spesso frammentate durante il sonno e possono avere caratteristiche focali. Tuttavia, non dovrebbero verificarsi attività epilettiformi focali consistenti o rallentamenti focali. Nella maggior parte dei pazienti non trattati con JME e in una minoranza di pazienti con CAE e JAE, si verifica una risposta fotoparossistica con stimolazione fotonica intermittente (34,35). Anche l'iperventilazione spesso scatena scariche generalizzate di punta-onda (17).

## **Eziologia**

Determinare la causa, indipendentemente dal "livello" di diagnosi raggiunto sulla base del tipo di crisi, epilessia e sindrome epilettica, dovrebbe essere uno degli obiettivi primari che il clinico dovrebbe raggiungere (12).

Già nel 1981 era stata creata una classificazione eziologica, sottolineando come l'eziologia giochi un ruolo determinante nel decorso clinico, nella prognosi e sulle scelte terapeutiche (10). Tale classificazione prevedeva la suddivisione in quattro categorie principali:

1. *Epilessie idiopatiche*: prevalentemente o presumibilmente ad origine genetica, in assenza di evidenti anomalie neuroanatomiche o neuropatologiche;
2. *Epilessie sintomatiche*: acquisite o con cause genetiche, associate a evidenti anomalie neuroanatomiche o neuropatologiche e/o a caratteristiche cliniche indicative di patologie o condizioni patologiche sottostanti;
3. *Epilessie provocate*: un fattore specifico sistemico o ambientale è la causa principale delle crisi e in cui non concomitano evidenti alterazioni neuro-anatomiche/funzionali;
4. *Epilessie criptogeniche*: di presunta natura sintomatica in cui non è identificata la causa.

Nel 2011 Berg e Scheffer (36) proposero una nuova classificazione, che ha sostituito la precedente, e che prevedeva tre principali categorie: [1] *Epilessie Genetiche* (in cui viene identificato il gene la cui variante è alla base del meccanismo patogenetico di malattia); [2] *Epilessie Metabolico-Strutturali* e [3] *Epilessie a eziologia non nota*.

L'uso di queste categorie non permetteva sempre di classificare in maniera rigida i diversi tipi di epilessie, infatti molti difetti strutturali, comprese le malformazioni, e la maggior parte dei disordini metabolici sono di origine genetica.

La classificazione 2017 propone invece sei possibili categorie: epilessia a eziologia strutturale, genetica, infettiva, metabolica, immune e sconosciuta (12).

## **Neurosviluppo**

Nell'ultima versione del Manuale Diagnostico e Statistico dei disturbi mentali (DSM-5) è stata creata la nuova categoria diagnostica dei "Disturbi del neurosviluppo", che ha sostituito la precedente categoria del DSM-IV dei "Disturbi solitamente diagnosticati per la prima volta nell'infanzia o nell'adolescenza". L'aggiunta del termine "neurosviluppo" implica un'origine precoce e un correlato neurobiologico dei disturbi compresi in questa categoria (37).

All'interno di questa categoria si trovano disturbi che possono andare da limitazioni molto specifiche dell'apprendimento a compromissioni globali delle abilità sociali e dell'intelligenza. I disturbi del neurosviluppo comprendono attualmente disabilità intellettiva (ID), disturbi della comunicazione e del linguaggio, disturbi dello spettro autistico (ASD), disturbo da deficit di attenzione e iperattività (ADHD), disturbi specifici dell'apprendimento (DSA) e disturbi del movimento. La diagnosi di molti di questi disturbi ha subito una notevole ridefinizione nel corso del 1900, ma solo nel ventunesimo secolo si è assistito a un massiccio aumento della ricerca e della letteratura.

Le manifestazioni cliniche dei disordini del neurosviluppo si sovrappongono tanto quanto la loro eziologia. Infatti, lo sviluppo di un cervello funzionale dipende da una complessa sequenza di eventi che comprendono la proliferazione e la migrazione delle cellule neuronali e gliali, la maturazione e la sopravvivenza dei neuroni, una connettività efficiente sia a livello assonale che sinaptico (38).

### **Disabilità intellettiva**

La disabilità intellettiva rappresenta un importante problema di salute pubblica. Il DSM-5 descrive la disabilità intellettiva come un difetto nel funzionamento intellettivo e nel comportamento adattivo che inizia nel periodo dello sviluppo e influenza tre domini della vita quotidiana: [1] il dominio concettuale, che comprende la conoscenza, il ragionamento, la memoria e la capacità di scrivere, leggere e fare calcoli; [2] il dominio sociale, che descrive il funzionamento nelle interazioni sociali, come il mantenimento delle amicizie, le capacità di comunicazione e l'empatia; [3] il dominio pratico, che comprende la cura della persona, l'organizzazione della vita quotidiana, la capacità di frequentare la scuola, avere un lavoro e gestire le finanze (39).

La prevalenza riportata di ID nei bambini negli Stati Uniti è stata dell'1,1-1,2% tra il 2014 e il 2016 (40), nella popolazione mondiale la prevalenza è pari al 2-3% (41).

Per gli individui di età inferiore ai cinque anni che non raggiungono le tappe attese dello sviluppo in varie aree del funzionamento intellettuale, è possibile porre diagnosi di ritardo globale dello sviluppo.

### **Disturbo dello spettro autistico**

Il disturbo dello spettro autistico (ASD) è un disturbo del neurosviluppo definito da difficoltà di comunicazione sociale e comportamenti ristretti e ripetitivi (42,43).

È riconosciuto come un insieme di disturbi correlati di diversa eziologia. Le manifestazioni dell'ASD sono eterogenee e possono includere individui con disabilità intellettiva e capacità linguistiche limitate e individui con funzioni intellettive e linguistiche significativamente superiori alla media che hanno difficoltà nella comunicazione sociale. Queste difficoltà si manifestano nella pragmatica o nelle norme sociali associate alla comunicazione, come parlare con un volume appropriato, interagire a una distanza fisica adeguata, rilevare e adattare la comunicazione in risposta ai gesti e alle espressioni facciali. La rigidità, che si manifesta nel richiedere agli altri di parlare o comportarsi in modi specifici o nel dover aderire a programmi o attività prescritte, è comune (43).

I sintomi di presentazione dell'ASD dipendono dall'età, dai livelli di linguaggio (da non verbale a completamente fluente), dalle capacità cognitive e dal sesso. Nei primi due anni di vita, le caratteristiche comuni includono una scarsa acquisizione o un declino delle abilità linguistiche e dei gesti comunicativi o il mancato apprendimento o adozione di queste abilità. L'ASD è inoltre caratterizzato da una minore reattività nelle interazioni sociali e dalla presenza di comportamenti ripetitivi, come la mancata risposta al nome quando viene chiamato, lo sbattere delle mani e l'allineamento dei giocattoli in un modo particolare. La rigidità comportamentale o cognitiva, la mancanza di interesse per la socializzazione, gli interessi limitati e la mancanza di gioco immaginativo diventano tipicamente più evidenti con l'aumentare dell'età del bambino (43).

La prevalenza dell'ASD è aumentata costantemente negli ultimi due decenni. Nel 2000, il Center for Disease Control's Autism and Developmental Disabilities Monitoring (ADDM) Network ha stimato l'incidenza dell'ASD in 1 bambino su 150. Nel 2006, l'incidenza dell'ASD è passata a 1 bambino su 110 e nel 2008 è aumentata ancora, raggiungendo 1 bambino su 88. Nel 2012, la rete ADDM ha rivisto le stime sull'ASD a 1 bambino su 68 (44). Nel 2016, il National Health Center for Health Statistics ha

pubblicato il suo ultimo tasso di prevalenza e ha riportato un nuovo record, affermando che l'ASD potrebbe essere presente in ben 1 bambino su 36 (40). Si ritiene che questo rapporto sia lo stesso in tutti i contesti etnici o socioeconomici, tuttavia esistono variazioni di genere. La prevalenza dell'ASD sembra essere da quattro a cinque volte superiore nei ragazzi rispetto alle ragazze (44). L'aumento della frequenza di screening dell'ASD nei bambini e negli adulti, i migliori criteri diagnostici e le scale comportamentali e neuropsicologiche più accurate possono aver contribuito al costante aumento della prevalenza dell'ASD.

Quasi tre quarti dei bambini con ASD hanno anche un altro disturbo medico, psichiatrico o neurologico che comporta ulteriori danni fisici e/o mentali, maggiori costi di trattamento e maggiori richieste di assistenza da parte delle famiglie dei pazienti (42).

### **Disturbo da deficit di attenzione/iperattività**

Il disturbo da deficit di attenzione/iperattività (ADHD) è il più comune disturbo del neurosviluppo infantile, che colpisce dal 3 al 9% dei bambini in età scolare, e spesso persiste in età adulta (45,46).

I pazienti con ADHD presentano un pattern persistente di disattenzione e/o iperattività che interferisce con il funzionamento o lo sviluppo e sono presenti in due o più contesti di vita dell'individuo. La disattenzione determina il commettere errori di distrazione, difficoltà nel mantenere l'attenzione su compiti o attività, incapacità di seguire le istruzioni o portare a termine compiti o doveri, difficoltà di organizzazione e pianificazione, avversione per compiti che richiedono sforzo mentale protratto, facile distraibilità e sbadataggine. Le caratteristiche di iperattività e impulsività determinano agitazione motoria con continui movimenti di mani e piedi, l'impossibilità di rimanere fermi o al proprio posto in situazioni che lo richiedono, incapacità di svolgere attività ricreative tranquillamente, eloquio eccessivo o incapacità di rispettare i turni conversazionali e di attendere la fine delle domande prima di fornire una risposta o un comportamento invadente (39).

### **Disturbi del linguaggio**

Nella popolazione generale dei bambini di 5 anni, quelli con disturbo del linguaggio sono circa il 7% (47). Sebbene i sintomi siano particolarmente evidenti nei primi anni di



vita, spesso le difficoltà di linguaggio presegono in età scolare (avendo ricadute negative sulle abilità di apprendimento) e oltre (48,49).

I disturbi del linguaggio possono essere eterogenei e presentano difficoltà persistenti nell'acquisizione e nell'uso di diverse modalità di linguaggio (parlato, scritto, gestuale) ed interessare tutte le abilità linguistiche: fono-articolatorie, lessicali, morfo-sintattiche, narrative (39).

### **Disturbi dell'apprendimento**

I disturbi dell'apprendimento comprendono un gruppo eterogeneo di difficoltà nell'apprendimento e nell'uso di abilità scolastiche. Essi comprendono disturbi nelle abilità di decodifica e di velocità di lettura (dislessia); nella comprensione del significato del testo letto; nello spelling e nella correttezza ortografica (disortografia); e nelle capacità di padroneggiare il concetto di numero, i dati numerici, il calcolo ed il ragionamento matematico (discalculia).

Poiché gli attributi di disturbo di apprendimento sono dimensionali e dipendono dalle soglie utilizzate per suddividere le distribuzioni normali (50), le stime di prevalenza e incidenza variano. Le stime di prevalenza della dislessia variano dal 5 al 17% (51,52) ed è stata descritta in ogni gruppo etnico, in ogni linguaggio e in ogni regione geografica. È presente una piccola ma significativa dominanza nel sesso maschile (1,5-3:1) (53). Il disturbo specifico della comprensione del testo è meno frequente (54), ma rappresenta comunque circa il 42% di tutti i bambini mai identificati con DSA in lettura di qualsiasi grado (55). Anche le stime di incidenza e prevalenza della discalculia variano: dal 4 all'8% (52). I tassi di incidenza cumulativa all'età di 19 anni variano dal 5,9% al 13,8%. La disortografia è il DSA meno studiato e le stime di prevalenza variano dal 6% al 22% (56) e l'incidenza cumulativa va dal 6,9% al 14,7% (51).

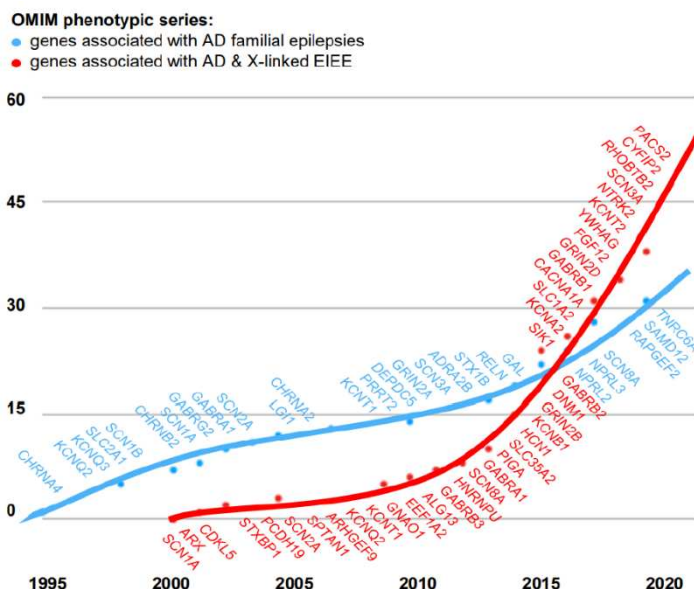
## Studi genetici in epilessia e neurosviluppo

Lo studio degli aspetti genetici in epilessia ha visto il suo inizio a partire dagli anni '90, quando lo studio di alberi genealogici di famiglie con diversi membri affetti da epilessia, permetteva di identificare dei pattern di ereditarietà. In questi casi si avevano per lo più patologie con trasmissione di tipo autosomico dominante con penetranza variabile. Lo studio dei singoli gruppi familiari è però riduttivo, lasciando la maggior parte dei pazienti con epilessie sporadiche o con pattern familiari non chiari privi di una diagnosi eziologica (57).

Le cause genetiche di epilessia comprendono diversi possibili meccanismi (58): anomalie cromosomiche; riarrangiamenti genomici; sostituzioni nucleotidiche e meccanismi di imprinting genomico. La valutazione della patogenicità delle varianti deve sempre prendere in considerazione il tipo di ereditarietà con cui il gene viene trasmesso e l'eventuale presenza della stessa nei genitori.

Dall'identificazione del primo gene correlato ad epilessia nel 1993, più di 500 geni associati allo sviluppo di epilessia sono stati descritti, anche se il ruolo di alcuni di questi non è ancora del tutto definito (59). Si ipotizza che l'intervento di fattori genetici possa rendere conto di circa il 40% dei casi di epilessia (60).

La *figura 6* mostra un grafico dei geni legati ad epilessia scoperti negli anni (61).



**Figura 6:** Geni identificati causativi di epilessia. In blu geni associati ad ereditarietà autosomico dominante. In rossi geni associati a varianti de novo. L'avvento delle metodiche di NGS ha permesso, a partire dal 2010, l'identificazione di un numero crescente di geni con varianti in casi isolati e in piccoli gruppi familiari. Da: Møller RS et al. From next-generation sequencing to targeted treatment of non-acquired epilepsies. *Expert Rev Mol Diagn.* 2019 Mar;19(3):217-228.

Così come per l'epilessia, anche nei disordini del neurosviluppo è presente una forte eziologia genetica (62,63).

Tuttavia, l'ereditarietà dell'ASD familiare rimane meno conosciuta poiché è più difficile accertare i meccanismi molecolari e cellulari alla base dell'ASD. Esistono infatti diverse ipotesi sulla patogenesi dell'ASD, che comprendono l'alterata espressione di canali ionici negli interneuroni corticali; la proliferazione, la differenziazione e la migrazione neuronale aberranti; la formazione di reti anomale e l'alterata plasticità sinaptica durante lo sviluppo corticale. Probabilmente questi fattori giocano un ruolo sinergico nell'alterare la normale funzionalità cerebrale, contribuendo in misura variabile al fenotipo di malattia (64). Pertanto, molti dei geni di rischio per l'autismo influenzano la regolazione dell'espressione genica, la neurogenesi, la modificazione della cromatina e la funzione sinaptica (43).

Gli studi che hanno valutato la prevalenza dell'ASD hanno rilevato che nei gemelli monozigoti, se un gemello ha l'ASD, anche l'altro avrà il 36-95% di probabilità di avere l'ASD. Nei gemelli non monozigoti, se un bambino ha un ASD, la probabilità che anche l'altro gemello abbia lo stesso disturbo scende allo 0-30% (65,66). I fratelli di bambini con ASD hanno un rischio del 2-8% di sviluppare anch'essi il disturbo, che sale al 12-20% se il bambino colpito mostra deficit in uno o due dei tre domini compromessi nell'autismo (67).

L'applicazione estensiva della Whole Exome Sequencing (WES) in ambito clinico negli ultimi anni ha aumentato il ritmo di scoperta di nuove varianti nell'ASD. Questa tecnica ha anche dimostrato che l'ASD è multigenico ed eterogeneo in termini di background genetico, con pochissimi casi di varianti patogene ripetute in un numero sostanziale di casi affetti (68).

L'ereditabilità dell'ADHD è elevata rispetto alla maggior parte dei disturbi psichiatrici se si confronta con i tassi di ereditabilità riscontrati nel disturbo dello spettro autistico, nel disturbo bipolare e nella schizofrenia (69). Tuttavia, la conoscenza dell'architettura genetica alla base dell'ADHD rimane limitata. L'aggregazione familiare del disturbo è forte e i risultati attuali suggeriscono che il rischio relativo di ADHD è da 5 a 10 volte per i parenti di primo grado di persone affette (70,71).

Sulla base di studi familiari e gemellari degli ultimi decenni, l'ereditabilità dell'ADHD è stata stimata al 77-88% (72).

I primi studi di casi di difficoltà di lettura hanno identificato la loro natura familiare. Il rischio relativo di avere la dislessia se almeno un membro della famiglia ne è affetto è più alto rispetto al rischio per gli individui non imparentati; più alto per le famiglie in cui un parente di primo grado è affetto da dislessia; e ancora più alto per i bambini in cui entrambi i genitori sono affetti da dislessia (73). Gli studi genetico-quantitativi stimano che il 30-80% della varianza nei risultati di lettura, matematica o ortografia sia spiegata da fattori ereditabili (74).

### ***Test genetici***

Quando si sospetta una eziologia genetica ci sono diverse analisi che possono essere utilizzate; infatti, non esiste una sola metodica genetica che sia in grado operare uno screening di tutte le possibili alterazioni genetiche (58,75):

- *Cariotipo*: permette la visione di tutti i cromosomi presenti in una cellula, determinando la presenza di alterazione del numero di cromosomi o la presenza di alterazioni strutturali che siano abbastanza grandi da poter essere visualizzate con un microscopio ottico (minimo 10-15 Mb).

- *L'ibridazione fluorescente in situ* (Fluorescent in situ hybridization – FISH): attraverso l'uso di sonde marcate, permette di rilevare la presenza o l'assenza di specifiche regioni cromosomiche. Essa è utile per la conferma di duplicazioni o delezioni di dimensioni maggiori di 5-10 Mb; ha il limite di poter sondare solo sequenze specifiche già note e non analizza l'intero genoma;

- *Analisi dei cromosomi con microarray*: questa metodica permette di individuare duplicazioni o delezione con risoluzione di 100-300 kb analizzando l'intero genoma;

- *Sequenziamento specifico con metodica Sanger*: dopo amplificazione del DNA tramite PCR, permette di individuare la sequenza nucleotidica di un determinato gene, rilevando così la presenza di varianti. Utilizzata per il sequenziamento del singolo gene nei genitori di un probando in cui sia stata rilevata una variante, permettendo di definire l'ereditarietà della stessa;

- *Next Generation Sequencing* (NGS): comprende diversi tipi di tecnologie che permettono un rapido sequenziamento in parallelo di un elevato numero di segmenti di DNA; comprende diverse possibili metodiche:

- *Pannelli genici*: attraverso l'uso di NGS analizzano un pool di geni noti per avere un ruolo causativo in specifiche patologie, permette un'analisi veloce solo di determinati geni senza ricorrere al sequenziamento di tutto il genoma;

- *Sequenziamento dell'esoma* (Whole-exome sequencing – WES): analizza la presenza di alterazioni nell'esoma, ovvero quella parte di geni che codifica per proteine (il genoma umano ha circa 180.000 esoni, che costituiscono circa l'1% del genoma) (76). Essa però non è in grado di rilevare le copy number variations (CNVs), le alterazioni di metilazione e alterazioni nelle regioni non codificanti;
- *Sequenziamento dell'intero genoma* (Whole-genome sequencing – WGS): analizza le sequenze dell'intero genoma, perciò unisce al sequenziamento del WES anche quello delle regioni geniche non codificanti.

I nuovi approcci genomici, in particolare le metodiche NGS, hanno migliorato il tasso e ridotto i costi associati alla diagnosi dell'epilessia genetica, poiché i test tradizionali basati su citogenetica e microarray sono lunghi, costosi e la resa diagnostica più bassa (75,77,78). Negli ultimi anni queste tecniche sono state ampiamente utilizzate per chiarire le sospette malattie neurologiche ereditarie, contribuendo ad aumentare drasticamente il numero di pazienti con diagnosi di epilessia genetica.

### ***Benefici della diagnosi genetica***

L'importanza di identificare la causa genetica del quadro clinico dei pazienti è essenziale per diverse ragioni (3,58):

- evitare ulteriori, costose, laboriose e spesso stressanti procedure diagnostiche;
- offrire consulenza genetica a paziente e genitori rispetto al rischio di ricorrenza della patologia;
- definire la prognosi e il possibile rischio evolutivo;
- lavorare nell'ottica della "medicina di precisione", utilizzando target therapies ed evitando l'utilizzo di principi attivi che possano potenzialmente peggiorare il quadro clinico;
- definire nuove associazioni tra genotipo e fenotipo.

Risultati negativi non implicano che l'epilessia del paziente non abbia un'eziologia genetica, né che il paziente non abbia la variante genetica specifica sospettata sulla base del fenotipo (75).

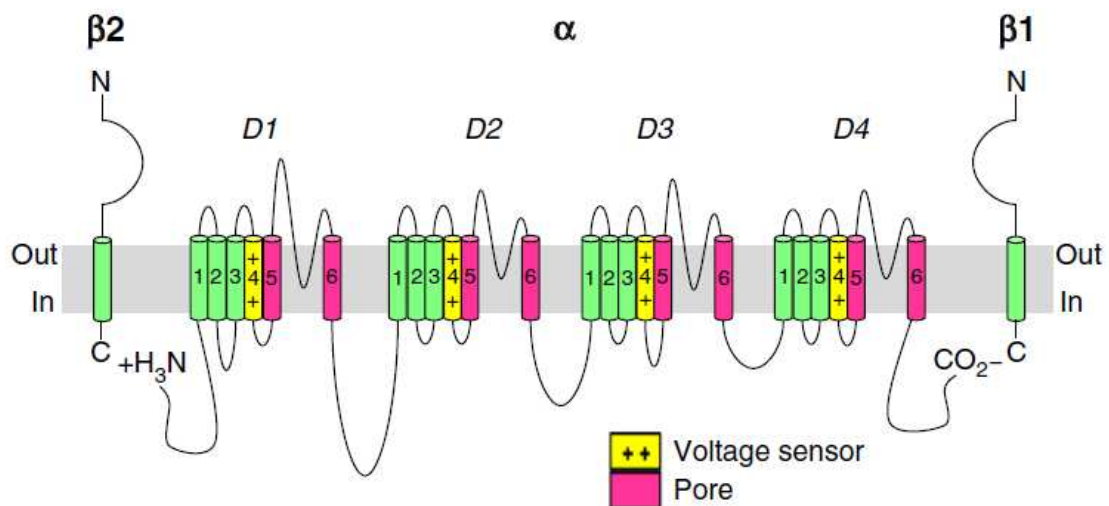
## Ruolo dei canali ionici in epilessia e neurosviluppo

Tutti i canali ionici voltaggio-dipendenti hanno origini evolutive comuni e sono altamente conservati nelle varie specie (79,80). I canali del sodio (SCN) sono i più filogeneticamente recenti tra i canali ionici voltaggio-dipendenti, e sono strettamente imparentati con i canali del calcio, che a loro volta hanno avuto origine dalla duplicazione genica dei canali del potassio.

I membri della famiglia dei canali del sodio voltaggio-dipendenti si sono poi differenziati in nove paraloghi, ciascuno dei quali codifica un canale. Tuttavia, l'organizzazione strutturale di base è rimasta in gran parte conservata in tutti i nove canali, che condividono fino all'85% della somiglianza di sequenza aminoacidica tra loro. I canali del sodio sono tra il 2% delle proteine più conservate nel genoma umano, con un tasso di variazione codificante estremamente basso (4,81,82).

Tutti i canali sono tetrameri di subunità identiche a dominio singolo, unite a formare un poro centrale a conduzione ionica (79,80).

I canali del sodio sono grandi proteine di membrana che comprendono subunità  $\alpha$  e  $\beta$ . Le cinque subunità  $\beta$  dei SCN sono codificate da quattro geni (*SCN1B-SCN4B*). Le isoforme della subunità  $\alpha$  sono codificate da nove geni (*SCN1A-SCN11A*) (83,84) (Fig. 7).



**Figura 7:** Rappresentazione schematica delle subunità alfa e beta del canale del sodio. Domini omologhi (D1-D4); segmenti transmembrana 1, 2 e 3 (indicati in verde); i segmenti 4 (in giallo) sono i sensori di tensione e i segmenti 5 e 6 (in rosa) costituiscono le regioni di rivestimento dei pori; +H<sub>3</sub>N rappresenta l'N-terminale e CO<sub>2</sub>- il C-terminale. Da: Brunklaus A, Lal D. Sodium channel epilepsies and neurodevelopmental disorders: from disease mechanisms to clinical application. *Dev Med Child Neurol.* 2020 Jul;62(7):784-792.

Le subunità  $\alpha$  sono grandi proteine di circa 2000 residui aminoacidici che si ripiegano in quattro domini omologhi (D1-D4). Questi domini, simili tra loro, contengono sei segmenti transmembrana a  $\alpha$ -elica (S1-S6). I segmenti da S1 a S4 costituiscono il dominio voltage-sensing e il segmento S4 ospita il sensore di voltaggio, che presenta residui aminoacidici caricati positivamente in ogni terza posizione. I residui con carica positiva funzionano come sensori di canale e avviano l'attivazione del canale stesso una volta che la membrana cellulare è stata depolarizzata. Il poro è costituito da uno stretto anello tra i segmenti S5-S6 e dal poro interno formato da quattro segmenti S6; esso funziona da filtro selettivo per il sodio. Gli ioni sodio fluiscono attraverso il poro durante l'apertura del canale determinata dal gradiente di sodio esistente tra i lati della membrana, che viene perennemente ripristinato dalla sodio-potassio-ATPasi.

Le eliche transmembrana sono collegate da piccole anse extracellulari e intracellulari, mentre i quattro domini omologhi sono collegati da ampie anse intracellulari (85). L'anello che collega i domini D3 e D4 è altamente conservato ed è essenziale nell'inattivazione del canale, formando il cancello di inattivazione (79).

Ogni subunità  $\alpha$  è legata a una o più subunità  $\beta$  ausiliarie ( $\beta$ 1-4). Le subunità  $\beta$  svolgono un ruolo importante nella cinetica e nell'attivazione voltaggio-dipendente del gating del canale (79).

Nell'uomo, l'espressione dei SCN segue un modello dipendente dal tessuto e ciascun canale del sodio possiede proprietà cinetiche specifiche che sono sia native del tessuto sia correlate alla sua funzione. L'espressione dei canali nelle diverse cellule neuronali è dipendente sia dal tipo di cellule che dallo stadio evolutivo. *SCN1A* (Nav1.1), *SCN2A* (Nav1.2), *SCN3A* (Nav1.3) e *SCN8A* (Nav1.6) sono altamente espressi nel cervello umano (86). *SCN2A*, *SCN3A* e *SCN8A* sono espressi soprattutto nei neuroni eccitatori. Negli interneuroni inibitori invece, *SCN1A* ha un'alta espressione, mentre *SCN8A* è espresso in misura minore (87,88). Durante lo sviluppo tipico, i canali *SCN2A* vengono altamente espressi nelle prime fasi di vita, successivamente vengono sostituiti da canali *SCN8A* a livello del segmento iniziale dell'assone e dei nodi di Ranvier (89). Questo potrebbe spiegare perché le forme più lievi di epilessia *SCN2A* (crisi benigne familiari neonatali/infantili) sono confinate ai primi mesi di vita fino a quando la loro disfunzione non viene compensata dai canali *SCN8A* emergenti (85). Allo stesso modo, in un lavoro su topi knockout per la proteina *Scn8a* è stato dimostrato che Nav1.2 può compensare i neuroni privi di Nav1.6; la capacità di vicariare l'uno la funzione dell'altro illustra quanto

*SCN2A* e *SCN8A* siano strettamente correlati (89). Poiché l'aploinsufficienza può essere vicariata, i portatori di varianti troncanti in *SCN2/8A* potrebbero presentare un fenotipo più lieve e ad insorgenza più tardiva, rispetto all'aploinsufficienza in *SCN1A* che causa epilessia grave. Tuttavia, i meccanismi di compensazione potrebbero non raggiungere il completo ripristino della funzione neuronale e dare origine a disturbi del neurosviluppo (85).

L'equilibrio dell'eccitabilità neuronale nel cervello è mantenuto da due tipi principali di cellule nervose: eccitatorie e inibitorie. Precedenti lavori funzionali avevano portato a ipotizzare che nella neocorteccia e nell'ippocampo gli interneuroni inibitori esprimono in gran parte Nav1.1, mentre i neuroni eccitatori esprimono prevalentemente Nav1.2 e Nav1.6, il che implica differenze nell'espressione dei canali del sodio in base ai tipi di cellule neuronali (90,91). L'analisi del trascrittoma mediante sequenziamento dell'RNA a singola cellula consente di misurare l'espressione genica in centinaia o migliaia di singole cellule contemporaneamente. Questo approccio è stato utilizzato per valutare i profili di espressione degli SCN nei neuroni eccitatori e inibitori in regioni cerebrali umane e di topo e ha mostrato un cambiamento età-dipendente nei rapporti di espressione tra neuroni eccitatori e inibitori (88). L'analisi dei trascrittomi di singole cellule in più regioni cerebrali ha rivelato profili di espressione differenziali degli SCN nei neuroni eccitatori e inibitori. Tutti e quattro i geni SCN sono espressi sia nei neuroni inibitori che in quelli eccitatori; tuttavia, presentano una forza di espressione diversa, evidenziando che è l'equilibrio dei profili di espressione a contare. *SCN1A* ha un'espressione proporzionalmente maggiore nei neuroni inibitori rispetto ai neuroni eccitatori. Pertanto, le varianti con perdita di funzione (LOF) in *SCN1A* disturbano gli interneuroni inibitori che esprimono Nav1.1, determinando un equilibrio alterato verso l'aumento dell'attività neuronale eccitatoria. Ciò è in linea con un precedente lavoro sui topi che dimostra che l'aploinsufficienza di *Scn1a* nei neuroni inibitori porta a una grave epilessia, mentre l'aploinsufficienza di *Scn1a* nei neuroni eccitatori migliora la morte improvvisa associata alle crisi in un modello murino della sindrome di Dravet (92). Le varianti associate a guadagno di funzione (GOF) sono osservate più frequentemente in geni come *SCN2/3/8A*, la cui espressione è arricchita nei neuroni eccitatori, a conferma del loro ruolo principale nei circuiti eccitatori. Pertanto, si prevede che le varianti GOF in *SCN2/3/8A* abbiano un effetto maggiore sui neuroni eccitatori, spostando il rapporto tra eccitazione e inibizione verso l'ipereccitazione.



La frequenza con cui un particolare gene è mutato è indicativa di quanto mutazioni del gene stesso siano tollerate. Quanto minore è il numero di varianti nella popolazione generale, tanto più è probabile che il gene sia sottoposto a selezione evolutiva e, quindi, associato a malattie quando muta. Utilizzando questo approccio, è stato dimostrato che *SCN1/2/3* e *SCN8A* sono altamente intolleranti alle mutazioni, dimostrando che, se le varianti si verificano sono probabilmente causa di malattia (85). Al contrario, le varianti in *SCN4/9/10/11A* si verificano a tassi molto più elevati, che si avvicinano ai tassi di varianti osservati nella popolazione generale. Perciò, è improbabile che *SCN9A* causi una grave malattia dominante rispetto alle varianti in *SCN1/2/3/8A* (93,94).

Varianti patogeniche in geni che codificano per canali ionici possono determinare anomalie di struttura, distribuzione, espressione e funzione dei canali stessi e sono state dimostrate essere collegate a malattie neurologiche (95). In particolare, esse sono tra le più comuni cause monogeniche di epilessia (96,97), probabilmente per il loro fondamentale ruolo nella generazione del potenziale d'azione nell'encefalo umano.

I residui mutati patogeni sono generalmente situati nelle porzioni del canale altamente conservate dal punto di vista evolutivo: i segmenti transmembrana, l'anello di inattivazione intracellulare e i due terzi prossimali del dominio C-terminale (98,99).

Gli studi funzionali hanno dimostrato che diverse varianti possono presentare diverse conseguenze funzionali sulla proteina prodotta. Le modifiche della struttura del canale a livello di sequenza aminoacidica possono determinare alterazioni del folding della proteina (influenzando sulla struttura 3D della stessa) e alterazioni della polarità dei diversi domini. La conseguenza funzionale è che il canale potrà presentare un aumento della propria funzione (meccanismo di gain-of-function, GOF) o, al contrario, una riduzione o perdita della funzione (meccanismo di loss-of-function, LOF).

Prevedere l'impatto di una variante sulla cinetica del canale senza una precedente caratterizzazione funzionale è difficile. Le varianti che si verificano all'interno dello stesso gene mostrano una notevole variabilità fenotipica a seconda della loro posizione e del loro effetto sulle proprietà biofisiche; viceversa, le varianti che si verificano in geni SCN diversi possono dare luogo a fenotipi simili. Tale complessità genetica e clinica ostacola la definizione di nette correlazioni genotipo-fenotipo (85).

Confrontando la distribuzione delle varianti missenso associate a malattia in tutti i nove sottotipi di SCN, Brunklaus et al. (85) hanno osservato somiglianze nelle alterazioni delle proprietà biofisiche dei canali indotte da varianti missenso in posizione analoga nei

diversi paraloghi. Gli autori hanno osservato che le manifestazioni cliniche delle varianti sono dipendenti dall'effetto biofisico sulla proteina, ma anche dal tipo di neurone e dalla distribuzione della rete neuronale.

In particolare, le varianti che si verificano nel pore-loop S5-6 causano prevalentemente perdita di funzione del canale (100,101), determinando epilessia se il gene coinvolto è *SCN1A* (che è prevalentemente espresso in interneuroni inibitori (64)), mentre le corrispondenti varianti LOF in *SCN2A* e *SCN5A* provocano rispettivamente disturbo dello spettro autistico e la sindrome di Brugada, a causa dell'elevata espressione di questi geni nei neuroni eccitatori *SCN2A* espressi a livello cerebrale e nei canali *SCN5A* espressi a livello cardiaco (102).

I siti implicati nel gating di inattivazione ospitano invece prevalentemente varianti con guadagno di funzione. Il corto linker DIII-IV è responsabile dell'inattivazione rapida; perciò, un'interferenza all'interno di questa regione data da una mutazione porta ad un'alterata inattivazione e a un'ipereccitabilità del canale (100). In questa porzione proteica le varianti GOF in *SCN1A* causano l'emigrania emiplegica familiare di tipo 3 (FHM3), mentre le analoghe varianti GOF in *SCN2/8A* causano epilessia. Analogamente, le varianti GOF nei siti di inattivazione che si verificano in *SCN4A* causano miotonia a causa dell'ipereccitabilità del sarcolemma (103), mentre le varianti corrispondenti in *SCN9/10/11A* causano neuropatia periferica poiché espressi nei neuroni periferici (104).

## ***SCN1A***

Il gene *SCN1A* codifica per il canale Nav1.1.

Le epilessie correlate a varianti patogeniche in *SCN1A* comprendono uno spettro che spazia dall'epilessia generalizzata con crisi febbrili (GEFS+) alla sindrome di Dravet (DS). Varianti patogeniche sia ereditate che *de novo* in questo gene sono tra le cause più comuni di epilessia con un'incidenza della DS stimata tra 1:19.000 e 1:22.000 (86,105). *SCN1A* è inoltre uno dei tre geni implicati nell'emigrania emiplegica familiare, un raro disturbo autosomico dominante caratterizzato da emigrania con aura accompagnata da emiplegia transitoria (106).

Uno studio WES su larga scala su individui con disturbo dello spettro autistico ha inoltre identificato *SCN1A* come gene di rischio per l'ASD (107).

Il principale meccanismo molecolare alla base di DS è l'aploinsufficienza di *SCN1A* (108). La maggior parte delle mutazioni è localizzata nelle sequenze codificanti e più della metà risulta in un troncamento precoce della proteina attraverso meccanismi di

frameshift, nonsense o splice site (109). Nelle GEFS+ *SCN1A*-relate, la maggior parte delle mutazioni sono missense, con effetti sulla funzione del canale che vanno dalla perdita parziale di funzione al guadagno di funzione (109). L'analisi funzionale di dieci mutazioni di *SCN1A* associate all'emivrosia emiplegica familiare ha dimostrato effetti GOF (106,110).

### ***SCN2A***

Il gene *SCN2A* è responsabile della codifica del canale del sodio Nav1.2. Esistono due isoforme di *SCN2A*: una è espressa nell'infanzia, l'altra nell'età adulta. L'isoforma adulta ha una soglia di eccitazione più bassa rispetto a quella neonatale, risultando quindi più eccitabile (111).

Varianti patogeniche in questo gene sono state riportate in numerose epilessie di diversa gravità. Nelle SeLFE si osserva una risoluzione delle crisi dipendente dall'età, che è correlata alla riorganizzazione fisiologica del segmento iniziale dell'assone durante lo sviluppo, in cui si verifica un passaggio dall'espressione dell'isoforma neonatale all'isoforma adulta e l'aumento di espressione dei canali Nav1.6 (111). *SCN2A* è stato descritto causativo di encefalopatie epilettiche ad esordio precoce (112) ed è la seconda causa per prevalenza di encefalopatia epilettica precoce con crisi migranti, dopo *KCNT1* (113).

*SCN2A* è stato uno dei primi geni legati a ASD scoperti (114) e mutazioni frameshift sono state riscontrate in bambini con disabilità intellettiva senza storia di crisi epilettiche (115). Si stima che varianti in *SCN2A* siano responsabili di 7,5 casi di ASD/ID ogni 100.000 nascite (116).

Studi funzionali hanno dimostrato che il canale può presentare sia varianti con effetto GOF che LOF. L'insorgenza precoce delle crisi, prima dei 3 mesi di età, è associata a mutazioni GOF, che determinano un aumento delle correnti persistenti e di picco e un'inattivazione ritardata del canale (117). Un'altra condizione causata da mutazioni gain-of-function di *SCN2A* è l'atassia episodica (118). Gli episodi di atassia iniziano dopo i 10 mesi di età, durano da minuti a ore e si verificano su base settimanale o mensile. La maggior parte dei soggetti colpiti presenta anche crisi simili alla SeLFE entro i 3 mesi di età (118).

A differenza dei casi a esordio precoce, la DEE con insorgenza di crisi dopo i 3 mesi di età è associata a una perdita parziale o completa di funzione, comprese mutazioni missense, frameshift, nonsense e splice-site (117,119). Varianti LOF troncanti o missense

sono state associate inoltre a ASD e ID (85,117,119,120), probabilmente perché una ridotta eccitabilità dei neuroni eccitatori corticali e ippocampali durante lo sviluppo sarebbe l'evento precoce che innesca una persistente alterazione successiva dell'attività neuronale (121,122). *SCN2A* è inoltre presente negli assoni non mielinizzati che innervano interneuroni inibitori nel cervello adulto, perciò, è possibile che anche in fasi successive dello sviluppo un ridotto funzionamento degli interneuroni GABAergici dovuto alla disfunzione LOF di Nav1.2, abbia un ruolo nella patogenesi o nel mantenimento dell'alterato funzionamento cerebrale nei disordini del neurosviluppo (120,123).

### ***SCN3A***

Il gene *SCN3A* codifica per il canale Nav1.3, espresso prevalentemente nel SNC durante lo sviluppo embrionale e neonatale in modo simile sia nei principali interneuroni eccitatori che in quelli inibitori. Successivamente, durante l'infanzia, viene gradualmente sostituito da una maggiore espressione dell'isoforma Nav1.1 (124–126).

In passato Nav1.3 era stato descritto come causativo di manifestazioni cliniche legate al dolore neuropatico (104,127,128), ma studi recenti ne hanno dimostrato un legame anche con epilessie focali criptogenetiche (129,130) e encefalopatie epilettiche infantili a esordio precoce, con una percentuale significativa di pazienti che mostrava una polimicrogiria diffusa, suggerendo un ruolo di *SCN3A* nella migrazione neuronale precoce e nello sviluppo corticale cerebrale (123,126).

### ***SCN9A***

Il gene *SCN9A* codifica per il canale Nav1.7, espresso nel tronco cerebrale, nella corteccia cerebrale e nel midollo spinale, ma la sua espressione principale è nel SNP (131,132). Di conseguenza, le varianti patogenetiche in questo canale sono generalmente correlate a disturbi legati alla sensibilità dolorifica (133); tuttavia, è stato descritto il suo ruolo anche nelle epilessie e nei disturbi dello spettro autistico (OMIM #603415).

### ***SCN1B***

Anche le mutazioni nelle subunità  $\beta$  dei geni dei canali del sodio di tipo 1 sono state confermate come causa di epilessia. Wallace et al (134) sono stati i primi a segnalare una mutazione missense patogena, p.(C121W) nel gene *SCN1B* ereditato con un modello

autosomico dominante in un paziente australiano con GEFS+. Da allora sono state identificate molte mutazioni in questo gene causa di encefalopatia epilettica, DS ed epilessia del lobo temporale (92,134,135). Tutte queste mutazioni sono state riscontrate nella porzione extracellulare della proteina (135).

La maggior parte degli studi funzionali su *SCN1B* ha rivelato mutazioni con perdita di funzione, in particolare interferendo con la capacità di aumentare il gating dei SCN (134).

## ***SCN8A***

Il gene *SCN8A* è localizzato a livello del cromosoma 12q13.13 e codifica per la subunità  $\alpha$  del canale del sodio voltaggio-dipendente  $Na_v1.6$ . Tale canale è ampiamente espresso nell'encefalo, sia a livello corticale nell'ippocampo, che sottocorticale, soprattutto a livello del cervelletto. È composto da quattro subunità omologhe (DI-DIV), ognuna delle quali è costituita da sei domini transmembrana (S1-S6) altamente conservati dal punto di vista filogenetico, da un dominio citoplasmatico N-terminale e da un dominio C-terminale (136). I segmenti transmembrana da 1 a 4 costituiscono il sensore di voltaggio del canale, i segmenti 5 e 6 formano il poro del canale (137) i domini 3 e 4 sono collegati da un loop corto, che ha la funzione di inattivatore del canale. L'attività del canale è fondamentale per l'inizio e la propagazione del potenziale d'azione neuronale; infatti, esso è espresso nel segmento prossimale dell'assone e a livello dei nodi di Ranvier (138,139).

Il  $Na_v1.6$  è espresso fin dalla fase prenatale, durante lo sviluppo fetale (140). Poco dopo la nascita, l'espressione inizia ad aumentare, raggiungendo i livelli massimi durante i primi anni di vita.

La presenza di varianti patogenetiche determina alterazioni della funzione del canale, con conseguente insorgenza di uno spettro estremamente variabile di manifestazioni cliniche. Studi funzionali di varianti patogenetiche selezionate hanno dimostrato che l'effetto patogenetico è dato sia da meccanismi di guadagno di funzione, che da perdita di funzione. Le varianti GOF determinano un'iperattività delle correnti di sodio che attraversano la membrana citoplasmatica di neuroni eccitatori attraverso un meccanismo di alterata inattivazione del canale o di uno shifting nell'attivazione voltaggio-dipendente (136). In maniera opposta, varianti LOF causano una ridotta o assente attività del canale (141). Varianti localizzate nel gate di inattivazione sono tipicamente associate ad un effetto GOF, mentre le varianti LOF sono state descritte soprattutto nelle regioni S5-6 (85,142). Le varianti LOF includono quelle che portano a uno stop-gain precoce, a un frameshift o a un'interruzione del sito di splice con conseguente riduzione o abolizione della funzione di  $Na_v1.6$  (141).

L'ipereccitabilità delle varianti GOF è il meccanismo patogenetico più comune per le crisi epilettiche; varianti LOF sono più spesso associate a deficit cognitivi, disturbi del movimento e autismo con o senza crisi epilettiche (141,143,144).

Varianti patogenetiche in *SCN8A* sono state inizialmente descritte in un paziente con disabilità intellettiva, atassia e atrofia cerebellare (145). Successivamente, nel 2012, è stato descritto il caso di una bambina con DEE, atassia e autismo, che è deceduta all'età di 15 anni per morte improvvisa inaspettata in epilessia (Sudden Unexpected Death in Epilepsy – SUDEP) (146). Da allora numerosi paper hanno riportato casi di pazienti con DEE (147–151). In un paper di Johannesen et al. (152) sono stati descritti cinque principali fenotipi clinici nei disturbi correlati a varianti patogenetiche in *SCN8A*: encefalopatie epilettiche e dello sviluppo (DEE), epilessia intermedia (IE), epilessia infantile familiare benigna (BFIE), epilessia generalizzata (GE) e disturbi del neurosviluppo senza epilessia (NDDwoE).

### ***Encefalopatie epilettiche e di sviluppo***

Le DEE *SCN8A*-relate rappresentano l'1% di tutte le DEE (153) e 3% delle DEE ad esordio precoce (154).

I pazienti con DEE tipicamente presentano epilessia farmaco-resistente ad esordio precoce (età mediana di esordio 3-4 mesi) (152,153) e presentano crisi toniche, tonico-vibrotorie e tonico-cloniche, status epilettico non convulsivo (NCSE) o spasmi epilettici. Le crisi possono essere prolungate e presentare caratteristiche autonome, con flushing, tachicardia e/o bradicardia (149). L'epilessia è tipicamente farmaco-resistente, tuttavia si può notare una lieve risposta ai bloccanti dei canali del sodio (SCB) a dosi sovratrapieutiche (149,155).

Il quadro clinico è inoltre caratterizzato da disabilità intellettiva da moderata a grave (147,148,151,156), ipotonia, disturbi del movimento, segni piramidali/extrapiramidali progressivi, cecità corticale acquisita e sintomi gastrointestinali (147–150,157). Spesso questi pazienti presentano un grave peggioramento dell'epilessia e dello stato neurologico nella prima infanzia, con deterioramento cognitivo, mentre si può raggiungere una relativa stabilizzazione in età scolare (153).

### ***Epilessia intermedia***

Un fenotipo intermedio è stato descritto in casi sporadici e familiari che presentano disabilità intellettiva da lieve a moderata (talvolta con cognizione normale), ritardo nel linguaggio, disturbi comportamentali, deficit neurologici lievi o assenti (in particolare tremore, mioclono, ipotonia, disturbi del movimento, atassia, disturbi del cammino e disturbi del sonno). L'epilessia è caratterizzata da crisi ad insorgenza variabile (età

mediana di insorgenza 14 mesi) e da possibili periodi liberi da crisi se trattata con SCB in monoterapia o in combinazione con altri farmaci anticrisi (139,152,153). La semiologia delle crisi comprende crisi tonico-cloniche bilaterali, assenze atipiche, crisi con componente tonica, atonica o mioclonica, spasmi epilettici ed episodi isolati di NCSE (153).

### ***Epilessia infantile familiare***

I pazienti con epilessia infantile familiare (BFIE) presentano crisi autolimitanti nel primo anno di vita (età mediana di insorgenza delle crisi 6 mesi) (152), con crisi tonico-cloniche focali o generalizzate, che si verificano a grappolo o isolate (142). L'esame neurologico e lo sviluppo cognitivo sono normali (142,158,159). Possono anche manifestarsi episodi discinetici/distonici parossistici nella pubertà, descritti come scatenati dallo stiramento, dall'inizio del movimento o da stimoli emotivi, che rispondono a basse dosi di carbamazepina (153).

### ***Epilessie generalizzate***

I soggetti con epilessia generalizzata (GE) presentano un esordio più tardivo delle crisi (età media 42 mesi) e i tipi di crisi descritti sono assenza, crisi tonico-cloniche generalizzate e crisi febbrili. Il controllo delle crisi è descritto con l'uso di SCB e non-SCB. Il livello cognitivo può variare da normale a grave disabilità intellettiva, e possono essere presenti disturbi comportamentali, in particolare autismo, aggressività e ansia. L'esame neurologico può mostrare atassia (152).

### ***Disturbi del neurosviluppo senza epilessia***

I disturbi del neurosviluppo senza epilessia (NDDwoE) sono un fenotipo clinico con ID, in combinazione variabile con il disturbo dello spettro autistico, il disturbo da deficit di attenzione/iperattività e i disturbi del movimento/mioclono (98,141,143,145,153,160). Sono stati riportati altri segni neurologici, tra cui atassia, ipotonia e ritardo del linguaggio (153).



## **Scopo dello studio**

Nonostante l'importante aumento di conoscenze rispetto alle varianti patogeniche in *SCN8A*, le caratteristiche cliniche ed encefalografiche dei pazienti con varianti LOF rimangono in parte sconosciute. Nuovi case-report su questi pazienti hanno mostrato un'ampia variabilità fenotipica che può comprendere epilessia, disturbi del neurosviluppo e disturbi del movimento insieme ad altre comorbidità.

In questo studio, per la prima volta, raccogliamo un'ampia popolazione di pazienti *SCN8A*-LOF, di cui sono stati raccolti dati clinici ed EEG per effettuare una dettagliata caratterizzazione clinica ed elettrofisiologica.

## Materiali e Metodi

---

### Selezione della coorte e delle varianti per lo studio funzionale

La coorte analizzata comprende pazienti con varianti patogenetiche in *SCN8A* raccolti attraverso una collaborazione multicentrica internazionale. È stata effettuata una ricerca sistematica su PubMed fino al 31 marzo 2022, utilizzando il termine "*SCN8A*" e includendo gli articoli disponibili in inglese che descrivevano casi originali con varianti patogeniche o probabilmente patogeniche. I pazienti pubblicati più di una volta sono stati raggruppati attraverso un follow-up clinico con l'autore corrispondente o il medico di riferimento. Per tutti i casi, precedentemente pubblicati e no, è stata effettuata una raccolta dati contattando il clinico di riferimento dei pazienti.

Le varianti osservate nella popolazione generale e trovate in gnomAD sono state eliminate dalle analisi.

I pazienti inclusi nello studio sono stati selezionati utilizzando una flow-chart ad hoc (*Fig. 8*). Partendo dall'intera coorte di 692 pazienti, sono stati esclusi gli individui con varianti precedentemente confermate avere una funzione GOF attraverso studi funzionali. I pazienti con varianti ad effetto LOF confermate in precedenti studi funzionali o con varianti troncati (PTV) sono stati testati per verificare la disponibilità di dati e, se questi erano disponibili, sono stati inclusi per l'analisi clinica. Sono stati esclusi i pazienti con eterozigosi per due varianti LOF.

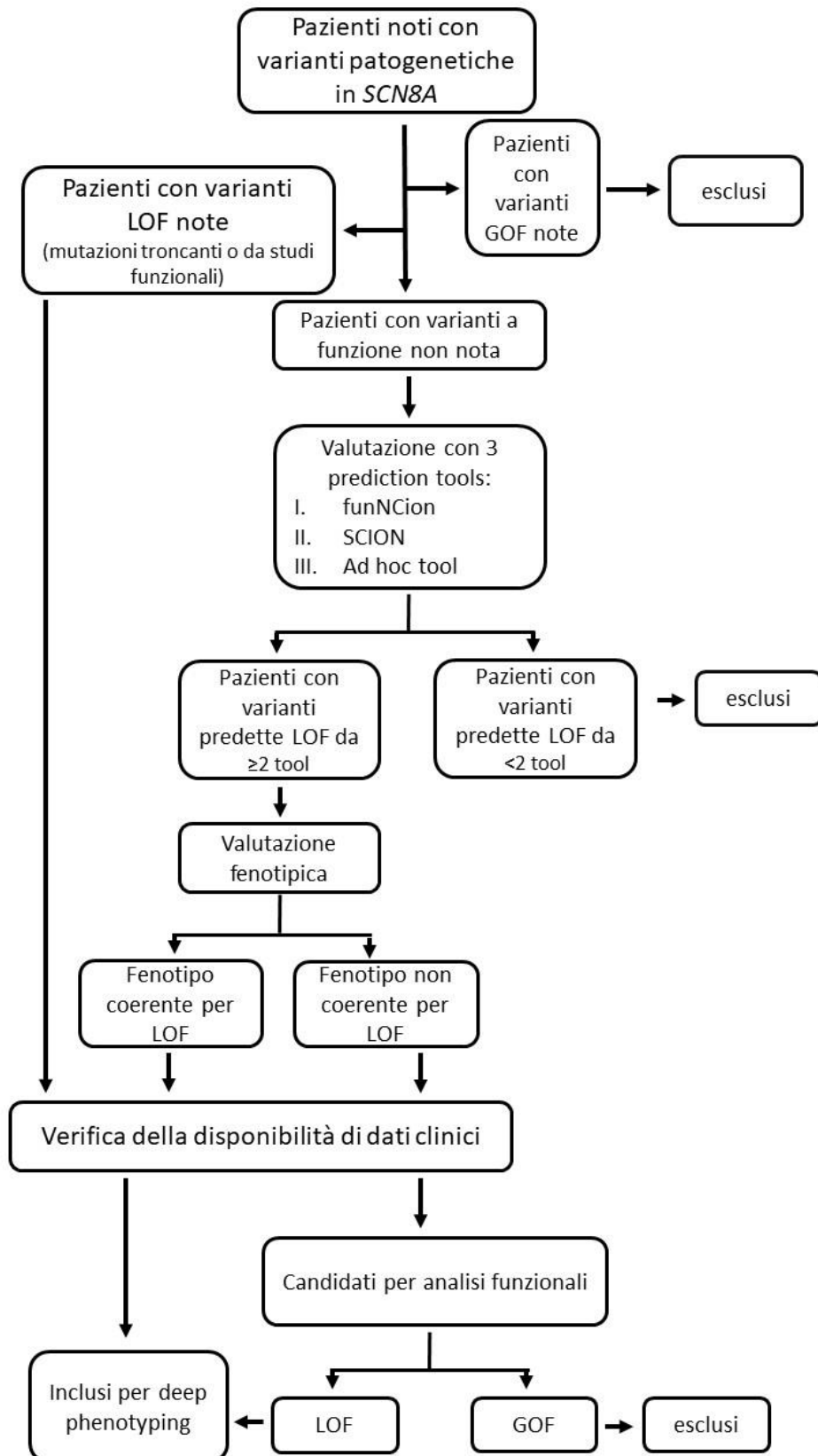


Figura 8: Flow-chart per la selezione dei pazienti inseriti all'interno dello studio

Le varianti con funzione sconosciuta sono state esaminate con tre strumenti di predizione:

I. lo strumento di predizione in-silico "funNCion" (<http://funNCion.broadinstitute.org>), che predice l'effetto funzionale di una variante deducendo la funzione del canale da un set di dati di fenotipi di malattie cliniche applicate ad un modello di machine learning (82).

II. lo strumento di predizione in-silico "Sodium Channel function variant predictiON" (SCION) (<https://cbossmann.shinyapps.io/SCION/>). Questo strumento è stato sviluppato con un algoritmo che integra le informazioni cliniche utilizzando i codici HPO (Human Phenotype Ontology), un vocabolario standardizzato di caratteristiche fenotipiche. Le informazioni cliniche fornite come HPO sono state utilizzate per generare un algoritmo con tecnica di machine learning (161).

III. uno strumento creato ad hoc nel corso di questo studio, che ha adattato la classificazione di patogenicità delle varianti dell'American College of Molecular Genetics and Genomics (ACMG) per stimare l'effetto funzionale molecolare delle nuove varianti in *SCN8A*. Data l'assenza di linee guida esistenti, è stato sviluppato un metodo basato su cinque criteri di evidenza per classificare le varianti con un probabile effetto LOF in *SCN8A*: [1] è stato precedentemente dimostrato che gli effetti funzionali sono spesso conservati tra i canali ionici del sodio, consentendo ai dati provenienti da canali diversi di fornire prove della funzione di varianti non testate (85). Pertanto, per identificare le varianti con una probabile LOF in *SCN8A*, sono state annotate le varianti funzionalmente testate in altri geni SCN e identificate le varianti paraloghe in *SCN8A* situate nelle posizioni proteiche conservate con la variante di interesse. In dettaglio, sono stati aggregati i dati di 377 varianti testate funzionalmente nei nove geni SCN (85). Per ogni variante nel gruppo di pazienti sono state contate le varianti nella stessa posizione proteica in tutti i geni SCN che erano associate a un effetto di perdita o guadagno di funzione. Per determinare se le varianti nella stessa posizione causano probabilmente una GOF o una LOF, è stato calcolato il rapporto tra le varianti LOF e GOF identificate. Una maggiore abbondanza di varianti associate a LOF indica un probabile effetto LOF della nuova variante. [2] Successivamente, è stato identificato il cluster di varianti con sequenze molecolari simili sulla struttura della proteina Nav1.6. Le varianti associate a LOF o GOF sono state mappate sulla struttura della proteina Nav1.6. Ma, a causa dell'assenza di una struttura Nav1.6, è stata utilizzata la struttura conservata della proteina

Nav1.2 come modello adatto. Sono state contate le varianti associate a GOF o LOF entro un raggio di 5Å intorno alla variante di interesse, offrendo una visione dell'impatto funzionale delle varianti in un contesto 3D locale (162). È stato quindi calcolato il rapporto tra varianti LOF e GOF come descritto nel primo criterio. [3] Le varianti funzionalmente testate di tutti i geni SCN (escluso *SCN8A*) sono state aggregate e mappate sulla sequenza di Nav1.6 e sono stati identificati ulteriori cluster di varianti con letture molecolari simili a quelle del secondo criterio. [4] Successivamente, come già fatto in precedenza (163), è stata dedotta la funzione molecolare dalle varianti collegate ai fenotipi clinici (Tabella supplementare 1) e identificate le varianti di *SCN8A* (non precedentemente testate funzionalmente) situate nella stessa posizione di una variante paraloga con una funzione molecolare dedotta dal fenotipo. Sono state raccolte le varianti dei pazienti con varianti di altri canali del sodio con fenotipi associati a un effetto LOF o GOF ed è stato dedotto l'effetto molecolare di conseguenza. Come per il primo criterio, è stato poi contato il numero di varianti con un effetto molecolare GOF e LOF dedotto, situate nella stessa posizione della variante *SCN8A* di funzione sconosciuta. [5] Infine, è stato identificato un cluster di varianti molecolari dedotte (vedi criterio 4) sulla struttura della proteina Nav1.6. È stato contato il numero di varianti associate ai fenotipi tipicamente causati da LOF e GOF, come annotato nel criterio 4, all'interno della struttura 3D locale descritta nel criterio 2 e si è ottenuto il rapporto tra le varianti associate a LOF e GOF nella struttura 3D locale come descritto nel primo criterio. Dopo aver calcolato per ciascuno dei cinque criteri il rapporto tra le varianti osservate associate a LOF e quelle associate a effetti GOF, abbiamo classificato una variante come probabile LOF se almeno due dei cinque criteri indicavano un arricchimento di varianti associate a LOF rispetto a GOF e nessun criterio indicava un arricchimento di varianti GOF.

Utilizzando i tre prediction tools sopra descritti, sono state valutate tutte le varianti e sono state escluse quelle varianti predette LOF da meno di due strumenti di predizione. I pazienti portatori di varianti predette come LOF da almeno due strumenti di predizione sono stati selezionati per la valutazione clinica: i fenotipi considerati coerenti con LOF (come precedentemente descritto da Johannesen et al. (152)) sono stati testati per la disponibilità dei dati e considerati per l'analisi clinica. Quelli con fenotipo incoerente (DEE grave, età di insorgenza < 24 mesi, risposta ai SCBs) sono stati considerati per lo studio funzionale e, dopo essere stati testati per la disponibilità dei dati, sette varianti sono state sottoposte allo studio funzionale.

## **Raccolta dati**

I dati clinici sono stati raccolti retrospettivamente con una tabella fenotipica dettagliata fornita dai medici di riferimento. Le variabili cliniche registrate includevano: età; sesso; tipo, posizione ed ereditarietà della variante genica; età di insorgenza delle crisi; tipo di crisi; classificazione e durata dell'epilessia; caratteristiche EEG all'esordio e al follow-up; risposta agli ASMs; sviluppo motorio e cognitivo; livello di autonomia personale; presenza di altre caratteristiche neurologiche o psichiatriche.

L'epilessia e i tipi di crisi sono stati classificati secondo le linee guida della Lega Internazionale contro l'Epilessia (12). La disabilità intellettiva è stata classificata secondo l'International Classification of Diseases – 10<sup>a</sup> edizione (ICD-10: F70.x - F73.x). La risposta al trattamento è stata riferita dai medici e classificata come libertà dalle crisi, riduzione delle crisi, nessun cambiamento o peggioramento delle crisi. Carbamazepina (CBZ), oxcarbazepina (OXC), lacosamide (LCM), lamotrigina (LTG), fenitoina (PHT) e zonisamide (ZNS) sono stati considerati come SCB. Il livello di autonomia è stato testato attraverso un questionario compilato dai medici, che analizzava la mobilità, la comunicazione, le attività della vita quotidiana (ADL), ovvero la capacità di lavarsi, vestirsi, alimentarsi, la continenza e l'uso del bagno, e la situazione abitativa. I pazienti sono stati raggruppati in base all'età: prescolare (0-6 anni), scolare (7-10 anni), adolescenziale (11-18 anni) e adulta (>18 anni).

Le variabili utilizzate nello studio sono state espresse come media  $\pm$  deviazione standard nel caso delle variabili continue e come frequenze e percentuali nel caso di variabili categoriche.

## **Studi funzionali**

### Mutagenesi

La subunità  $\alpha$  del canale  $Na_v1.6$  umano (Origene) è stata modificata per essere resistente alla tetrodotossina (TTX) introducendo una mutazione puntiforme nota (c.1112A > G, p.Y371C). Le mutazioni *SCN8A* correlate alla malattia sono state ingegnerizzate nel costrutto  $Na_v1.6$  resistente alla TTX eseguendo una mutagenesi sito-diretta con la polimerasi Pfu (Promega). Il cDNA wild-type (WT) e mutante sono stati completamente sequenziati prima di utilizzare i cloni per gli esperimenti elettrofisiologici, per escludere eventuali alterazioni di sequenza aggiuntive.

### Colture cellulari e trasfezioni

Le cellule ND7/23 (Sigma-Aldrich) sono state coltivate a 37°C, in ambiente umidificato con il 5% di CO<sub>2</sub> e cresciute in terreno nutritivo 'Dulbecco's modified Eagle' (Invitrogen) integrato con 10% di siero fetale di vitello (PAN-Biothech) e 200 mM 1% di L-glutamina (Biochrom). Le trasfezioni di cDNA WT o mutanti di *SCN8A* umano insieme alle subunità  $\beta$ 1- e  $\beta$ 2- umane dei canali Na<sup>+</sup> voltaggio-dipendenti (pCLH-h $\beta$ 1-EGFP e pCLH-h $\beta$ 2-CD8) sono state eseguite seguendo il protocollo standard di Lipofectamina 2000 (Invitrogen), come precedentemente descritto per procedura (160). Le registrazioni elettrofisiologiche sono state eseguite 48 ore dopo la trasfezione solo da cellule positive sia alla fluorescenza verde che alle microsfere rivestite di anticorpo anti-CD8.

### Studi elettrofisiologici

Le registrazioni con whole-cell voltage clamp sono state eseguite a temperatura ambiente utilizzando un amplificatore Axopatch 200B, un digitalizzatore Digitata 1440 A e il software di acquisizione dati Clampex 10.2 (Axon Instruments). Le cellule sono state visualizzate con un microscopio invertito (Axio-Vert.A1; Zeiss). Per bloccare le correnti di Na<sup>+</sup> endogene, alla soluzione del bagno è stata aggiunta TTX 500 nM. Le pipette in vetro borosilicato avevano una resistenza finale della punta di 2,5-3,5 M $\Omega$  quando erano riempite con la soluzione di registrazione. Le correnti sono state filtrate a 5kHz e digitalizzate a 20kHz. Le correnti di dispersione e capacitive sono state automaticamente sottratte utilizzando un protocollo di preimpulso (P/4). È stato anche controllato che l'errore massimo di tensione dovuto alla resistenza in serie residua dopo una compensazione fino al 90% fosse sempre <5 mV. La soluzione della pipetta conteneva (in mM): 10 NaCl, 1 EGTA, 10 HEPES, 140 CsF (il pH è stato regolato a 7,3 con CsOH, l'osmolarità è stata regolata a 310 mOsm/kg con mannitolo). La soluzione del bagno conteneva (in mM): 140 NaCl, 3 KCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 1 CaCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 20 TEACl (cloruro di tetraetilammonio), 5 CsCl e 0,1 CdCl<sub>2</sub> (il pH era regolato a 7,3 con CsOH, l'osmolarità era regolata a 320 mOsm/kg con mannitolo).

### Registrazione e analisi dei dati

Per le registrazioni del voltage-clamp nelle cellule ND7/23 trasfettate è stato utilizzato il seguente protocollo. Le cellule sono state mantenute a -100 mV. Una serie di depolarizzazioni a gradino di 100 ms da -80 a +65 mV con incrementi di 5 mV è stata applicata per misurare le correnti di Na<sup>+</sup> mediate dai canali Na<sub>v</sub>1.6 trasfettati WT o

mutanti. La curva di densità di corrente è stata ottenuta dividendo l'ampiezza della corrente di picco di  $\text{Na}^+$  a diversi potenziali di prova per la capacità cellulare. La curva di attivazione (relazione conduttanza-tensione) è stata derivata dalla relazione corrente-tensione ottenuta secondo:

$$g(V) = \frac{I}{V - V_{rev}}$$

dove  $g$  è la conduttanza al potenziale di prova  $V$ ,  $I$  il picco di corrente  $\text{Na}^+$  registrato e  $V_{rev}$  il potenziale di inversione  $\text{Na}^+$  osservato. Alle curve di attivazione è stata applicata una funzione di Boltzmann standard:

$$g(V) = \frac{g_{max}}{1 + \exp[(V - V_{1/2})/k_v]}$$

dove  $g_{max}$  è la conduttanza di picco normalizzata,  $V_{1/2}$  la tensione di attivazione semimassimale e  $k_v$  il fattore di pendenza.

Le correnti di  $\text{Na}^+$  persistenti sono state determinate alla fine degli impulsi di depolarizzazione e normalizzate rispetto al picco di corrente iniziale. Per la costante di tempo dell'inattivazione rapida, è stata utilizzata una funzione esponenziale di secondo ordine adattata all'andamento temporale dell'inattivazione rapida durante i primi 70 ms dopo l'inizio della depolarizzazione, ottenendo due costanti di tempo. Il peso della seconda costante di tempo più lenta era relativamente piccolo. Per la presentazione dei dati è stata quindi utilizzata solo la costante di tempo veloce, denominata  $\tau_h$ .

L'inattivazione rapida allo stato stazionario è stata studiata utilizzando una serie di impulsi di condizionamento di 100 ms seguiti da un impulso di prova di 5 ms a -10 mV, in corrispondenza del quale il picco di corrente rifletteva la percentuale di canali non inattivati. Alle curve di inattivazione rapida è stata applicata una funzione di Boltzmann standard:

$$I(V) = \frac{I_{max}}{1 + \exp[(V - V_{1/2})/k_v]}$$



dove  $I$  è l'ampiezza di corrente registrata al potenziale di condizionamento  $V$ ,  $I_{max}$  l'ampiezza di corrente massima,  $V_{1/2}$  la tensione di inattivazione semimassimale e  $k_V$  un fattore di pendenza.

Il recupero dall'inattivazione rapida è stato registrato utilizzando un impulso di condizionamento depolarizzante a -20 mV, 100 ms, seguito da una ripolarizzazione a -80 o -100 mV con intervalli di tempo crescenti e da un impulso finale di prova a -20 mV. Una funzione esponenziale di primo ordine con un ritardo iniziale è stata adattata al tempo di recupero dall'inattivazione, ottenendo la costante di tempo  $\tau_{rec}$ .

Tutti i dati sono stati analizzati utilizzando il software Clampfit di pClamp 10.6 (Axon Instruments), Microsoft Excel (Microsoft Corporation), Graphpad prism (Graphpad software) o Igor Pro (Wavemetrics). Per la valutazione statistica di due gruppi, è stato applicato il  $t$ -test non accoppiato per i dati normalmente distribuiti e il test di Mann-Whitney per i dati non normalmente distribuiti. Per il confronto di più gruppi, è stata utilizzata l'ANOVA a una via con il test post hoc di Dunnett per i dati normalmente distribuiti e l'ANOVA a ranghi con il test post hoc di Dunn per i dati non normalmente distribuiti. Tutti i dati sono indicati come media  $\pm$  SEM. Per tutti i test statistici, la significatività rispetto ai controlli è indicata nelle figure con i seguenti simboli: \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ .

## Risultati

---

Utilizzando la flow-chart precedentemente descritta (*Fig. 8*), abbiamo selezionato e raccolto i dati elettroclinici di 58 pazienti (18 non pubblicati e 40 precedentemente pubblicati, in 18 dei quali abbiamo raccolto ulteriori dettagli clinici dai medici di riferimento dei pazienti).

La coorte comprende 26 maschi e 31 femmine (sesso non disponibile in 1), in un'età compresa tra 18 mesi e 42 anni (media 13 anni, 1 mese  $\pm$  9 anni, 3 mesi). I dati elettroclinici e genetici dei soggetti sono riassunti nella *Tabella Supplementare 2*.

### Caratteristiche cliniche

Il motivo della prima visita medica è stato un ritardo nello sviluppo o problemi comportamentali in 41/58 (70,7%) e crisi epilettiche in 14/58 (24,1%) soggetti. Due soggetti della stessa famiglia hanno presentato mioclono non epilettico (3,4%) e un paziente con ID moderata è stato testato dopo che la diagnosi è stata fatta nel figlio.

All'ultimo follow-up, 32/58 (55,2%) soggetti soffrivano di epilessia, classificata come GE in 19/32 (59,4%), come DEE in 10/32 (31,3%) e come epilessia mioclonica in 3/32 (9,4%). Ventisei su 58 (44,8%) non avevano una storia personale di epilessia.

L'età mediana all'esordio dell'epilessia era di 3 anni e 7 mesi (range 1 mese – 14 anni). Tre pazienti hanno presentato crisi febbrili prima della diagnosi di epilessia, rispettivamente all'età di 6, 12 e 18 mesi. Il tipo di crisi all'esordio è stato assenze in 17/32 (53,1%), crisi tonico-cloniche generalizzate (GTC) in 11/32 (34,4%), miocloniche/cloniche in 6/32 (18,8%) o toniche in 2/32 (6,3%). Il tipo di crisi all'esordio era sconosciuto in 2/35.

L'EEG all'esordio era disponibile per 22 pazienti ed era normale in 3/22 (13,6%), mostrava un rallentamento dell'attività fondo in 5/22 (22,7%), con scariche epilettiformi (IED) generalizzate in 12/22 (54,5%) e/o IED focali in 9/22 (40,9%) (posteriori, centro-temporali sinistre, centrali, frontali destre, temporali destre e anteriore, bi-temporali indipendenti, bi-frontali e multifocali).

Nei follow-up, sono stati riportati 1-3 tipi diversi di crisi per ciascun paziente, che consistevano in assenze (16/32; 50%), GTC (12/32; 37,5%), crisi miocloniche/cloniche (12/32; 37,2%) e, più raramente, crisi toniche (3/32; 9,4%), atoniche (2/32; 6,3%) o focali non motorie (1/32; 3,2%). Tre pazienti su 32 (9,4%) hanno avuto uno stato epilettico (SE)

convulsivo e una paziente uno SE mioclonico con coinvolgimento del muscolo diaframmatico. Solo in 2/32 (6,3%) sono stati segnalati crisi in grappolo. In quattro pazienti sono stati descritti fattori scatenanti delle crisi: concentrazione, cadute, febbre, eccitazione e infezioni.

Tredici soggetti su 32 (40,6%) erano liberi da crisi all'ultimo follow-up, uno dei quali senza ASM, gli altri trattati con etosuccimide (ETS) (2), levetiracetam (LEV) (2), acido valproico (VPA) (4) o in combinazione con topiramato (TPM)-LTG (1), VPA-LTG (2), VPA-ETS (1) o LEV-TPM (1). L'età media alla scomparsa delle crisi era di 10 anni (range 3-25 anni) e la durata media dell'epilessia era di 9 anni.

I SCBs sono stati provati in 16 pazienti; un peggioramento della frequenza delle crisi è stato descritto in 2/16 (12,5%) (con LTG o OXC). I SCB sono stati inefficaci in 2/16 (12,5%) pazienti e il controllo parziale delle crisi è stato riportato in 8/16 (50%) (con CBZ, LTG e ZNS). Il controllo completo delle crisi mediante SCB è stato riportato in 2/16 (12,5%) pazienti, con LTG in combinazione con VPA o TPM. Un paziente ha risposto in modo variabile agli SCB, con LCM e OXC inefficaci, mentre LTG, PHT e ZNS hanno avuto un effetto parziale. Un paziente è stato trattato con LTG per anomalie dell'EEG, senza aver mai avuto crisi, e si è registrato un miglioramento del tracciato. Un paziente è stato trattato con OXC a causa dei suoi problemi comportamentali e si è registrato un peggioramento dell'EEG. Un ulteriore paziente è in trattamento con OXC per l'ADHD, senza un chiaro miglioramento clinico.

Il livello cognitivo era nella norma in 9/58 (15,5%), mentre 12/58 (20,7%) avevano una ID lieve, 20/58 (34,5%) una ID moderata e 9/58 (15,5%) una ID grave/profonda. Otto/58 sono stati classificati come disturbo generalizzato dello sviluppo, poiché erano troppo piccoli per essere diagnosticati come affetti da ID (*Fig. 9*).

L'esame neurologico ha documentato ipotonia in 17/58 (29,3%), spasticità degli arti in 3/58 (5,2%), atassia in 16/58 (27,6%), goffaggine o scarsa coordinazione in 6/58 (10,3%) e microcefalia in 2/58 (3,4%).

Trentanove su 58 (67,2%) hanno presentato problemi di linguaggio, da un lieve ritardo (n=18) all'assenza di linguaggio (n=6). In 11/58 (19%) sono stati segnalati disturbi del movimento, tra cui distonia (n=2), corea (n=3), mioclono (n=2), tremore (n=2) e discinesia (n=3). Un paziente ha presentato paroxysmal tonic upgaze.

Problemi neuropsichiatrici sono stati segnalati in 29/58 (50%): 10/58 (17,2%) avevano una diagnosi di disturbo dello spettro autistico, 22/58 (37,9%) avevano problemi comportamentali.

In nessuno caso è stata riportata una morte prematura.

La risonanza magnetica cerebrale era disponibile per 42 soggetti ed era normale in 28/42 (66,7%), mentre mostrava ipoplasia/atrofia cerebellare in 5/42 (11,9%), anomalie della sostanza bianca periventricolare o sottocorticale in 4/42 (6,9%), mega cisterna magna (n=3), atrofia cerebrale (n=2) e ipoplasia del corpo calloso (n=1).

### ***Descrizione secondo i diversi fenotipi***

I pazienti con epilessia generalizzata (n=19) avevano un'età mediana al momento dell'inclusione di 13 anni e 7 mesi (range 4-37 anni) e un'età mediana all'esordio delle crisi di 5 anni, 2 mesi (range 10 mesi-14 anni). I tipi di crisi riportati erano assenze (63,2% dei pazienti), GTC (21,1%), crisi miocloniche/cloniche (15,8%) e crisi atoniche (5,3%). (Fig. 10). L'EEG al follow-up ha mostrato scariche epilettiformi interictali generalizzate e crisi generalizzate (Fig. 11.A). Dieci soggetti su 19 (52,6%) erano liberi da crisi con un'età mediana alla scomparsa delle crisi (disponibile solo in otto soggetti) di 10 anni (range 3-25 anni).

Il 36,8% dei soggetti presentava un livello cognitivo nella norma, mentre gli altri presentavano una ID da lieve a moderata (42,1%) o un disturbo generalizzato dello sviluppo (21,1%) (Fig. 9). Problemi comportamentali sono stati segnalati in 9/19 (47,4%).

I pazienti con DEE grave (n=10) avevano un'età mediana all'inclusione di 9 anni e 9 mesi (range 3-33 anni) e un'età mediana all'esordio delle crisi di 1 anno e 1 mese (range 1 mese-6 anni). Hanno mostrato 1-3 diversi tipi di crisi nel corso della malattia, tra cui GTC (70% dei pazienti), crisi miocloniche/cloniche (60%), toniche (30%), assenze (30%), atoniche (10%) e focali non motorie (10%) (Fig. 10). Due hanno presentato SE convulsivo e uno SE convulsivo e non convulsivo. L'EEG al follow-up mostrava un rallentamento diffuso dell'attività di fondo e IED multifocali in quasi tutti i casi (Fig. 11.B). L'epilessia era farmacoresistente nella maggior parte dei soggetti (7/10), sia agli SCB che ai non SCB. Otto soggetti su dieci presentavano crisi epilettiche con una frequenza che varia da giornaliera a mensile. Un paziente è libero da crisi dall'età di 17 anni ed è stato trattato con una combinazione di LEV e TPM. Un paziente ha un buon

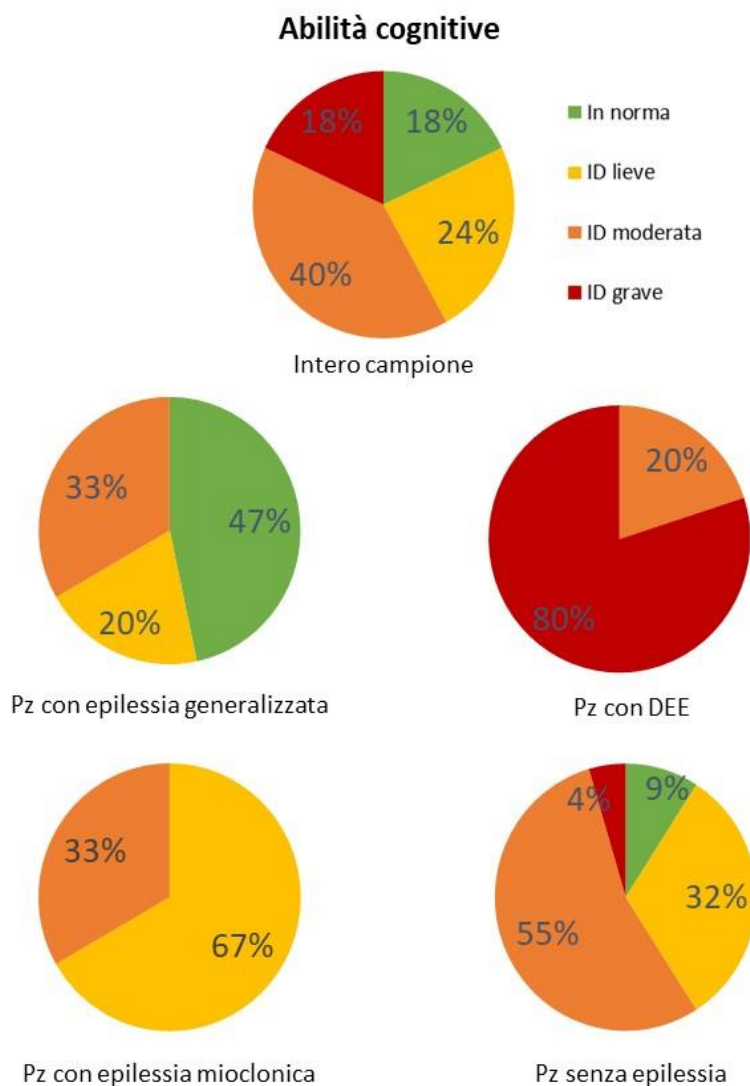
controllo delle crisi, anche se non completamente libero da crisi, con la CBZ. Uno dei pazienti farmacoresistenti ha avuto un periodo libero da crisi con fenobarbital (PB).

In tutti i soggetti, tranne uno, è stato notato un ritardo nello sviluppo prima dell'insorgenza delle crisi. All'ultimo follow-up, tutti i soggetti presentavano una ID moderata (20%) o grave (80%) (*Fig. 9*).

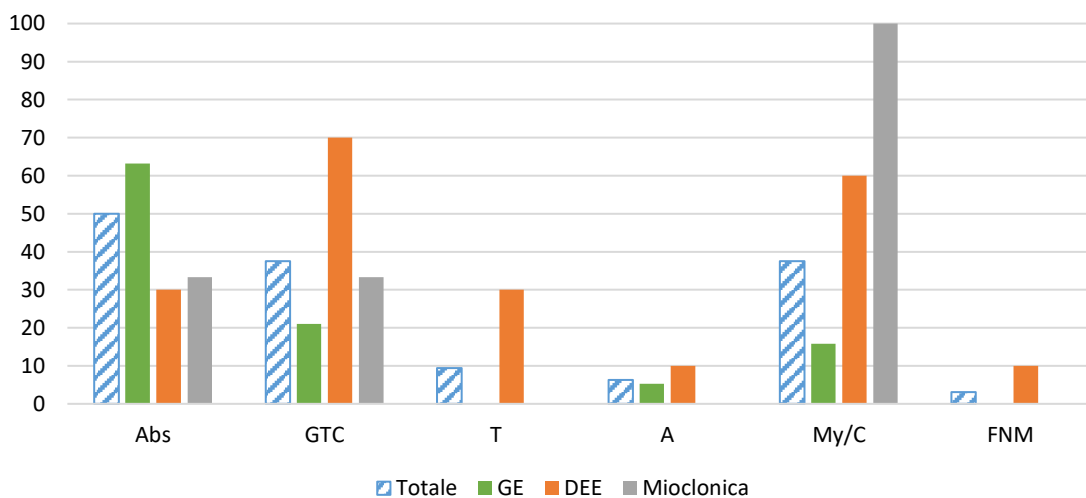
I pazienti con epilessia mioclonica (n=3) avevano un'età mediana di 10 anni e 5 mesi (range 5 anni, 10 mesi – 25 anni). L'età mediana all'esordio dell'epilessia era di 14 mesi (range 3 mesi – 14 anni). Tutti hanno presentato crisi miocloniche/cloniche registrate durante le registrazioni EEG (*Fig. 11.C*), uno aveva anche assenze (atipiche) e uno GTCS. Un paziente è libero da crisi dall'età di cinque anni con un'associazione di LTG e TPM, mentre gli altri due presentano ancora crisi, uno dei quali è stato trattato con LTG, mentre l'altro non assume alcun farmaco per volontà dei genitori.

Due avevano una ID lieve e uno ID moderata (*Fig. 9*).

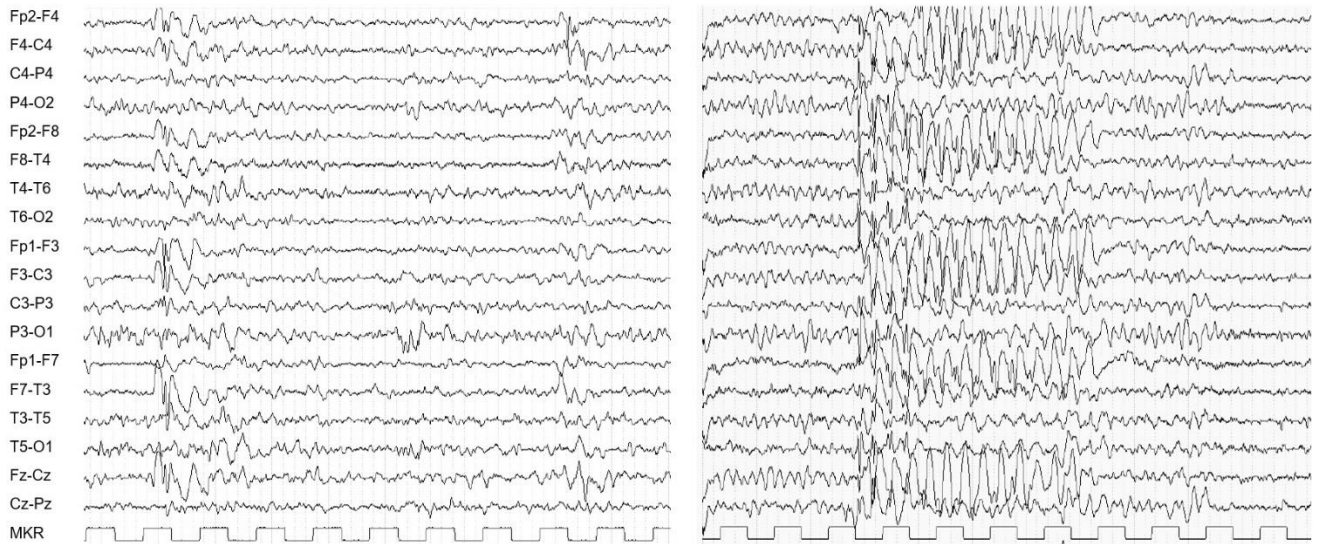
I soggetti senza epilessia (n=26) avevano un'età mediana al momento dell'inclusione di 10 anni (range 1 anno, 6 mesi – 4anni). Uno di loro ha avuto un episodio di convulsione febbrile all'età di 18 mesi. Cinque soggetti sono stati sottoposti a EEG e in due di essi sono state registrate scariche epilettiformi (*Fig. 11.D*). Due pazienti imparentati presentavano mioclono sottocorticale senza altre caratteristiche cliniche. Uno presentava anche una lieve atassia e uno corea. Una disabilità intellettiva da lieve a moderata è stata riferita in 19 soggetti, che presentavano anche problemi di linguaggio (n=15), disturbi del cammino (n=4), disturbi del movimento in due casi (uno con mioclono e distonia e uno con movimenti coreiformi) e problemi neuropsichiatrici in 11, che comprendevano ADHD, ASD, e comportamento aggressivo. Solo un paziente di questo gruppo era affetto da ID grave, con disturbi del linguaggio e atassia.



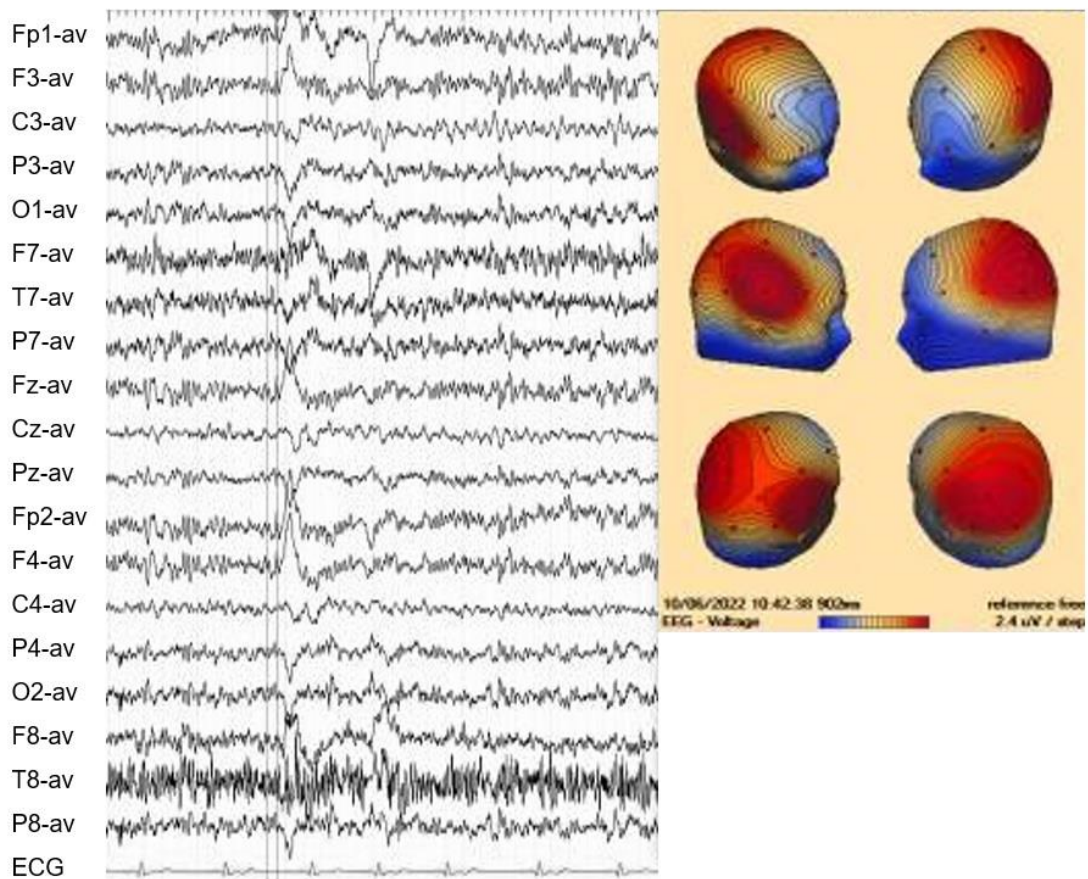
**Fig 9:** Abilità cognitive nel campione totale (primo grafico in alto) e nei diversi sottogruppi.



**Fig 10:** Percentuali di pazienti con diversi tipi di crisi in base al fenotipo clinico

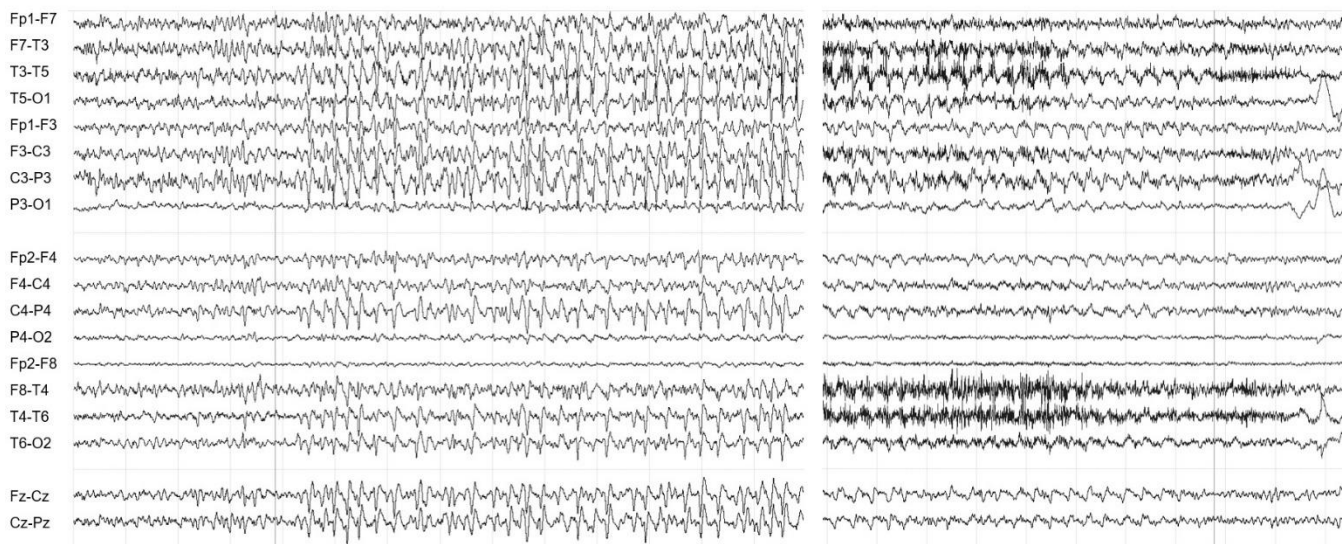


**Fig 11, panel A:** EEG registrati in pazienti con epilessia generalizzata. Pattern intercritico (sinistra) e pattern critico (destra).

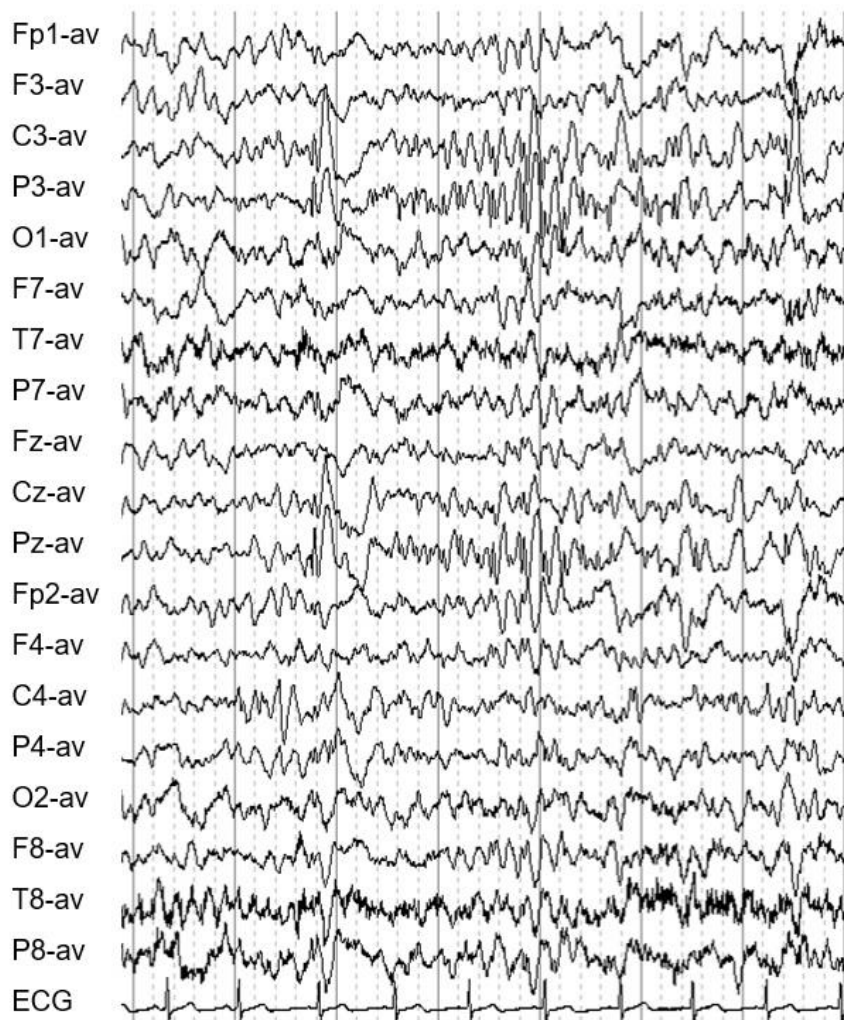


**Fig 11, panel B.1:** EEG registrati in pazienti con DEE. Pattern EEG intercritico (sinistra) e analisi di sorgente delle anomalie (destra)





**Fig 11, panel B.2:** EEG registrati in pazienti con DEE.



**Fig 11, panel C:** EEG registrati in paziente con epilessia mioclonica



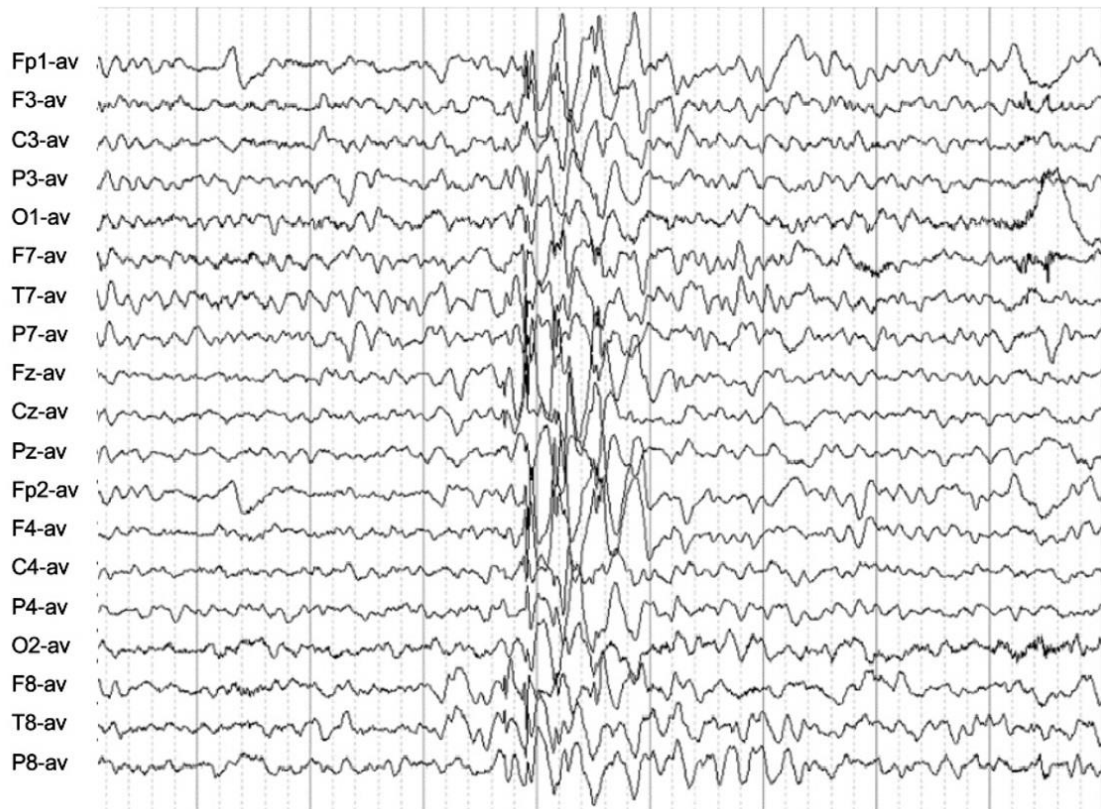


Fig 11, panel D: EEG registrato in paziente senza diagnosi di epilessia

## Background genetico

Ventuno soggetti su 58 (36,2%) erano portatori di 14 diverse varianti missenso; una di queste non riportata in precedenza in letteratura. Varianti troncanti sono state riportate in 10/58 (17,2%); varianti frameshift in 14/48 (24,1%), (frameshift da delezione (n=9), frameshift da delezione-inserzione (n=1), frameshift da duplicazione (n=4)); delezioni inframe in 4/58 (6,9%), delezione-inserzioni inframe in 1/58 (1,7%), delezioni esoniche in 2/58 (3,4%), ed exon skipping in 6/58 (10,3%).

Varianti *de novo* sono state riportate in 25/58 (43,1%), varianti ereditate in 22/58 (37,9%). Per 11 soggetti l'ereditarietà non era nota.

In nessuno dei gruppi è stato possibile identificare un'unica tipologia di variante tra tutti i soggetti.

Nel gruppo DEE 9/10 varianti erano troncanti e 7/10 presentavano una variante localizzata in residui aminoacidici tra la posizione 1451 e 1481. Tre pazienti non imparentati presentavano una variante splice-site causante lo skipping dell'esone 24. Tutti

e tre hanno presentato epilessia farmaco-resistente e un fenotipo clinico grave caratterizzato da un ritardo nello sviluppo prima dell'insorgenza delle crisi, linguaggio assente, scarso contatto visivo e ipotonia.

Alcune varianti sono state rilevate in più pazienti. In particolare, la variante p.Met412Ilefs è stata rilevata in tre membri della stessa famiglia, tutti con ID moderata. Il padre non presentava altri sintomi, mentre un figlio presentava anche ASD e problemi comportamentali e l'altro figlio GE.

La variante p.Gly1451Ser è stata riscontrata in tre pazienti non imparentati, uno dei quali con GE farmaco-responsiva, ritardo di sviluppo e ADHD. Gli altri due pazienti avevano una DEE grave e farmaco-resistente.

La variante p.Ala1622Asp è stata riportata in due pazienti non imparentati con NDDwoE.

## **Studi funzionali**

Seguendo il protocollo riportato nella sezione di Materiali e Metodi, è stato eseguito lo studio funzionale di sette varianti geniche del gene *SCN8A*: Met367Val, Thr368Ile, Arg931Gln, Arg1188Gln, Arg1305Thr, Ala1323Ser e Asp1683Asn.

Le varianti sono state divise in due gruppi maggiori: quelle associate ad un fenotipo clinico con epilessia generalizzata (Thr368Ile, Arg931Gln, Arg1188Gln, Arg1305Thr) e quelle associate ad un fenotipo con DEE (Met367Val, Ala1323Ser e Asp1683Asn).

Lo studio funzionale nelle cellule ND7/23 transfettate con la variante Arg931Gln non ha mostrato alcuna corrente di sodio, suggerendo quindi un chiaro effetto di perdita di funzione, lo stesso è stato registrato per la variante Thr368Ile. Pertanto, i portatori di queste varianti sono stati inseriti nella coorte di pazienti analizzati in questo studio. I dati funzionali di queste varianti sono mostrati in *Fig. 12* e in *Tabella 3*.

Le varianti Arg1188Gln e Arg1305Thr hanno mostrato uno shift con iperpolarizzazione della curva di attivazione e inattivazione rapida del canale, avendo quindi un effetto misto sulla funzione del canale, sia GOF che LOF. Pertanto, i pazienti con queste varianti sono stati esclusi dalla raccolta dati. I dati funzionali di queste varianti sono mostrati in *Fig. 12* e in *Tabella 3*.

Le varianti Met367Val e Ala1323Ser hanno mostrato uno shift depolarizzante nella curva di inattivazione rapida, indicando un effetto di guadagno di funzione del canale.

Anche questi pazienti non sono stati inclusi nella coorte di studio. I dati funzionali di queste varianti sono mostrati in Fig. 13 e in Tabella 4.

La variante Asp1683Asn non ha mostrato alcun cambiamento nelle proprietà fisiche del canale.

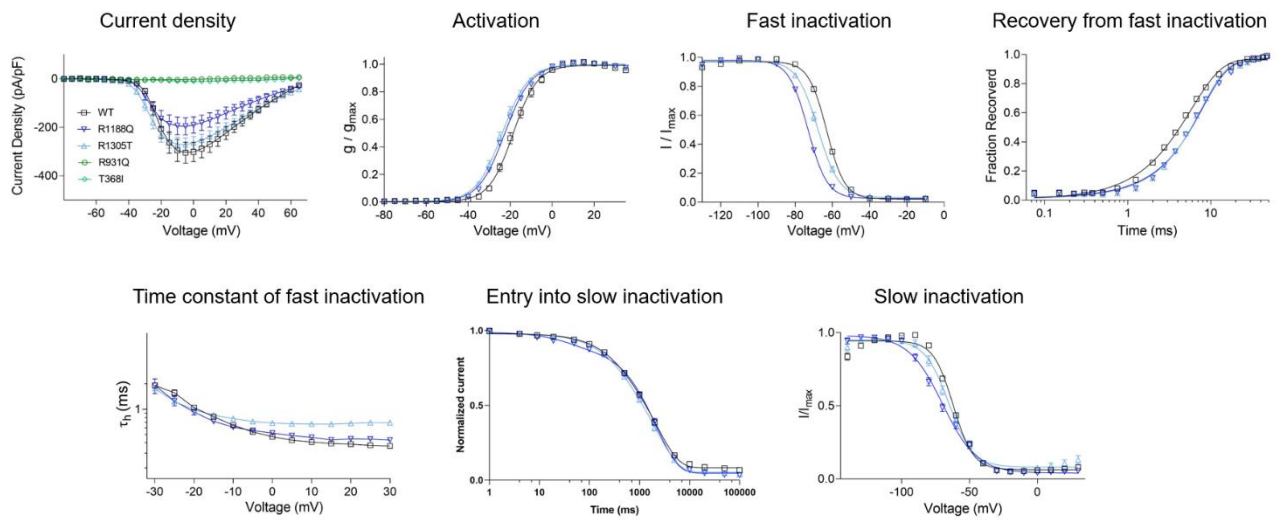


Fig 12: Proprietà elettrofisiologiche delle varianti associate a fenotipo con epilessia generalizzata

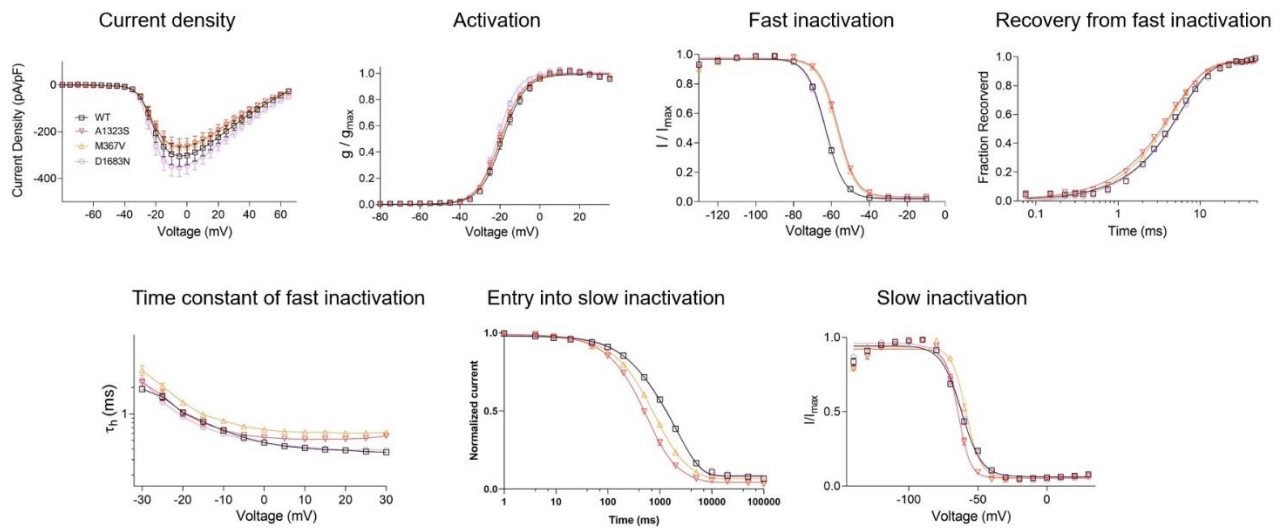


Fig 13: Proprietà elettrofisiologiche delle varianti associate a fenotipo con DEE

|           | Steady- state activation |          | Steady- state inactivation |                 | Th at 0 mV, ms    | Trec at -100 mV, ms | Persistent current, % of Ipeak | Current density, pA/pF | n  |
|-----------|--------------------------|----------|----------------------------|-----------------|-------------------|---------------------|--------------------------------|------------------------|----|
|           | V ½, mV                  | k        | V ½, mV                    | k               |                   |                     |                                |                        |    |
| Wild-type | -18.1±0.9                | -5.3±0.2 | -63.3±0.4                  | 4.9±0.1         | 0.47±0.02         | 5.2±0.2             | 0.3±0.1                        | -319.3±32.8            | 25 |
| R1305T    | -24.0±0.9<br>****        | -5.9±0.3 | -67.8±0.7<br>****          | 5.4±0.1<br>**** | 0.69±0.02<br>**** | 6.6±0.3<br>***      | 1.6±0.2<br>****                | -275.5±28.1            | 18 |
| R1188Q    | -22.2±1.4<br>*           | -5.8±0.4 | -73.2±0.5<br>****          | 5.1±0.1         | 0.52±0.02         | 6.8±0.2<br>***      | 0.3±0.2                        | -199.7±35.8<br>*       | 15 |
| T368I     | -                        | -        | -                          | -               | -                 | -                   | -                              | -11.2±2.5<br>****      | 13 |
| R931Q     | -                        | -        | -                          | -               | -                 | -                   | -                              | -7.3±0.4<br>****       | 11 |

**Tab 3:** Proprietà elettrofisiologiche delle varianti associate a fenotipo con epilessia generalizzata

|           | Steady- state activation |          | Steady- state inactivation |         | Th at 0 mV, ms    | Trec at -100 mV, ms | Persistent current, % of Ipeak | Current density, pA/pF | n  |
|-----------|--------------------------|----------|----------------------------|---------|-------------------|---------------------|--------------------------------|------------------------|----|
|           | V ½, mV                  | k        | V ½, mV                    | k       |                   |                     |                                |                        |    |
| Wild-type | -18.1±0.9                | -5.3±0.2 | -63.3±0.4                  | 4.9±0.1 | 0.47±0.02         | 5.2±0.2             | 0.3±0.1                        | -319.3±32.8            | 25 |
| D1683N    | -21.1±0.6                | -4.9±0.1 | -63.7±0.6                  | 4.9±0.1 | 0.47±0.02         | 5.3±0.3             | 0.3±0.1                        | -355.9±40.6            | 17 |
| M367V     | -18.9±1.0                | -5.4±0.2 | -56.4±0.4<br>****          | 4.7±0.1 | 0.66±0.02<br>**** | 4.3±0.1<br>*        | 0.8±0.1                        | -273.4±25.6            | 17 |
| A1323S    | -19.6±1.0                | -5.5±0.2 | -56.6±0.5<br>****          | 4.6±0.1 | 0.54±0.02         | 4.3±0.2<br>*        | 1.9±0.2<br>****                | -268.2±35.6            | 16 |

**Tab 4:** Proprietà elettrofisiologiche delle varianti associate a fenotipo con DEE

## Discussione

---

In questo studio forniamo una descrizione clinica ed elettrofisiologica dettagliata dei pazienti con varianti LOF nel gene *SCN8A*.

La presenza di una variante patogena in *SCN8A* può determinare un ampio spettro di fenotipi clinici (152). Lo studio delle caratteristiche elettrofisiche delle proteine mutate ha aggiunto un'ulteriore sottoclassificazione con varianti che possono avere una funzione GOF o LOF, aggiungendo ulteriori difficoltà nel determinare un'esatta correlazione genotipo-fenotipo e, di conseguenza, rendendo più difficili le scelte terapeutiche.

In accordo con quanto precedentemente descritto (98,152), all'interno del gruppo di studio abbiamo riscontrato la presenza di caratteristiche cliniche molto variabili ma che, nel complesso, potevano essere assimilate in quattro grandi gruppi fenotipici, uno senza epilessia e tre con la presenza di diverse sindromi epilettiche.

Il fenotipo clinico caratterizzato da disturbi del neurosviluppo e assenza di crisi epilettiche è stato precedentemente descritto (139,152) e confermato nel nostro campione, in cui rappresenta il gruppo più numeroso (44,8%). In questo gruppo, abbiamo raccolto i dati EEG di cinque pazienti, tre dei quali avevano un EEG normale, mentre gli altri due presentavano anomalie EEG. È interessante notare che i due pazienti con anomalie EEG sono stati trattati con SCB, in un caso c'è stato un miglioramento dell'EEG con l'uso di LTG, nell'altro caso la somministrazione di OXC ha portato a un peggioramento dell'EEG. La presenza di anomalie EEG in questi pazienti pone le basi per ipotizzare l'esistenza di uno spettro clinico che va da pazienti senza epilessia a pazienti con EEG anormale a pazienti con crisi cliniche manifeste.

Il gruppo di soggetti con epilessia, considerato nel suo complesso, ha un'età mediana all'esordio delle crisi superiore rispetto a quella dei pazienti portatori di varianti GOF. All'interno del gruppo, le caratteristiche epilettiche sono molto variabili. I tipi di crisi più frequentemente registrati sono assenze, crisi tonico-cloniche bilaterali e crisi miocloniche, mentre le crisi toniche e atoniche sono state riportate solo in pochi casi. Anche il grado di resistenza ai farmaci è variabile, e la libertà dalle crisi è stata raggiunta nel 40,6% dei pazienti; di questi, uno, che presentava un'epilessia generalizzata, non assume più ASMs. I farmaci più efficaci sembrano essere VPA e LTG; l'efficacia della lamotrigina nei pazienti con varianti con perdita di funzione non è ancora del tutto

spiegata e necessita di ulteriori studi per capire come i SCB possano avere un effetto positivo sulle varianti LOF.

Studiando le caratteristiche elettrocliniche dei pazienti con epilessia, è stato possibile identificare tre fenotipi clinici, ovvero pazienti con epilessia generalizzata, pazienti con DEE e pazienti con epilessia mioclonica.

Il gruppo di pazienti con epilessia generalizzata rappresenta il secondo fenotipo clinico più frequente (32,8%). Rispetto agli altri tipi di epilessia LOF (DEE e mioclonica), i pazienti con GE hanno un'età di insorgenza dell'epilessia più avanzata (62 mesi contro 14 mesi per gli altri due gruppi). Inoltre, sembra essere il gruppo con la percentuale più alta di libertà di crisi, poiché circa la metà di loro era in remissione all'ultimo follow-up. Uno di loro non assumeva ASMs all'ultimo follow-up, mentre gli altri hanno raggiunto il controllo delle crisi in monoterapia con VPA, ETS o LEV, uno solo in bi-terapia con VPA e LTG. I pazienti senza controllo completo delle crisi hanno una bassa frequenza di crisi, con crisi per lo più mensili o annuali. Dal punto di vista del neurosviluppo, la loro disabilità intellettiva sembra essere meno grave rispetto agli altri: la metà di loro presentava un funzionamento cognitivo normale, gli altri presentavano una disabilità intellettiva lieve o moderata, ma in nessun caso la disabilità intellettiva era grave.

Casi di DEE tra i pazienti con varianti LOF sono descritti solo sporadicamente (152,164). Nella nostra coorte abbiamo riscontrato un numero considerevole di pazienti con DEE (17,2%), superiore a quanto riportato in precedenza. Tutti i pazienti sono affetti da epilessia con un'età mediana di insorgenza di 13,5 mesi. Nonostante questa età sia più precoce rispetto a quella dei pazienti con GE, è superiore all'età mediana di insorgenza dei pazienti con DEE determinate dalle varianti GOF, la cui età mediana di insorgenza è riportata essere di 3-4 mesi (152,160). Sebbene molti di questi pazienti sono farmacoresistenti, due di loro sono liberi da crisi, uno dall'età di 17 anni (trattato con LEV e TPM) e uno trattato con VPA (età al momento dell'offset non disponibile). La percentuale di pazienti senza crisi nel nostro gruppo è del 20%, superiore al 9% dei pazienti con DEE-GOF riportato da Gardella et al. (149). Nella raccolta di casi di DDE-GOF, Gardella ha riportato uno scarso controllo critico nell'81% dei casi, mentre nella nostra coorte la frequenza critica sembra essere più bassa, con crisi settimanali o mensili in tutti i pazienti tranne uno, che ha crisi quotidiane. NCSE è stato segnalato fino al 64% dei soggetti con DDE-GOF (149), mentre nella nostra coorte solo un paziente (10%) ne

ha sofferto. Pertanto, tenendo conto che la dimensione del campione dei due gruppi di pazienti con DEE è diversa, le caratteristiche dell'epilessia di questi pazienti sembrano essere complessivamente più lievi rispetto a quelle dei pazienti con DEE causata da varianti GOF. Nonostante l'apparente miglior decorso epilettologico, questi pazienti hanno presentato un quadro clinico grave, con una grave disabilità intellettiva nell'80% dei casi, un grave ritardo posturale-motorio con difficoltà di deambulazione e atassia. L'esame neurologico ha evidenziato alterazioni del tono muscolare (spasticità in tre casi e ipotonia in quattro) e disturbi del movimento in quattro soggetti. Nei pazienti DEE-LOF nessuno è deceduto, mentre nei casi DDE-GOF decessi sono stati riportati nel 18% (149). La *Tabella 5* pone a confronto le caratteristiche cliniche di pazienti con DEE causate da varianti GOF e LOF rispettivamente.

|                                    | DEE da varianti LOF  | DEE da varianti GOF  |
|------------------------------------|--|--|
| Età mediana di insorgenza          | 14 mesi (range 1 mese – 6 anni)                              | 4 mesi (range 0,5 – 36 mesi)                                 |
| Tipi di crisi                      | TC bilaterali, miocloniche multifocali                       | Focali motorie, focali non motorie, TC bilaterali            |
| Pz seizure-free                    | 20%  | 9%   |
| Frequenza critica                  | Giornaliera 14%<br>Settimanale – mensile 72%<br>Annuale 14%  | Giornaliera 25%<br>Settimanale – mensile 70%<br>Annuale 5%   |
| NCSE                               | 10%  | 64%  |
| ASM più efficaci                   | LEV, TPM, VPA, ZNS, CLB                                      | PHT, CBZ, OXC  |
| ASM che hanno peggiorato il quadro | OXC (1)  | LEV (2)  |
| Esame neurologico                  | Ipotonia 40%<br>Spasticità 30%<br>Disturbi del movimento 40% | Ipotonia 64%<br>Spasticità 50%<br>Disturbi del movimento 55% |
| Abilità cognitive                  | ID severa 80%  | ID severa 91%  |
| Morte                              | Nessuna  | 18%  |

**Tabella 5:** Confronto delle caratteristiche cliniche dei pazienti con DEE dati da varianti LOF e GOF.

Quando ci si trova di fronte a un quadro clinico caratterizzato da un esordio precoce di crisi in pazienti con varianti *SCN8A*, la scelta terapeutica può essere un problema importante. La conoscenza dell'impatto funzionale di una variante SCN può informare la gestione clinica e la scelta terapeutica. Come è noto, e in parte intuitivo, i pazienti con DEE-GOF rispondono ai SCB, soprattutto ad alte dosi (149,152,155). Tra i nostri pazienti DDE-LOF, invece, LEV, TPM, VPA, CLB e ZNS sono stati descritti come più efficaci.

La scelta inavvertita di un trattamento errato senza conoscere la funzione può essere dannosa per i sintomi clinici (117); pertanto, il riconoscimento precoce del tipo funzione del canale potrebbe avere implicazioni per la gestione clinica del paziente. La differenza delle caratteristiche cliniche da noi riscontrate può avere un valore prognostico una volta che venga identificato il tipo di funzione del canale mutato, tuttavia, il riconoscimento precoce della funzione a partire dalle sole caratteristiche cliniche all'esordio resta una questione aperta. Infatti, presi come gruppo, i pazienti con DEE dati da varianti LOF presentano un'età media di esordio più elevata, ma il range entro il quale possono presentare esordio di malattia risulta essere ampiamente sovrapposto a quello presentato da pazienti con varianti GOF. Perciò, l'identificazione di elementi clinici che permettano di porre da subito una diagnosi differenziale tra i due fenotipi necessita ulteriori studi.

Il terzo fenotipo clinico che abbiamo riscontrato, l'epilessia mioclonica, non è stato descritto in precedenza. Questo rappresenta il gruppo più piccolo, essendo solo il 5,2% della coorte. L'esordio dell'epilessia si colloca ad un'età mediana di 14 mesi, simile a quella dei pazienti con DEE; tuttavia, va considerato che i pazienti in questo gruppo sono molto pochi e la loro età di esordio varia tra i tre mesi e l'adolescenza; quindi, questo dato non può essere interpretato come rappresentativo del gruppo. Tutti i pazienti hanno continuato a presentare crisi miocloniche nella loro storia di malattia, uno di loro ha presentato anche crisi TC bilaterali e uno assenze atipiche. La libertà dalle crisi è stata raggiunta in un paziente dall'età di cinque anni con una terapia combinata di LTG e TPM. La LTG ha risolto le crisi TC bilaterali in un altro paziente, ma le crisi miocloniche persistono. Il terzo paziente non assume terapia farmacologica per volontà della famiglia. Il fenotipo clinico dell'epilessia mioclonica, che sembra avere un profilo di disabilità intellettiva più lieve, potrebbe rappresentare un nuovo fenotipo non descritto in precedenza; tuttavia, il numero di pazienti è ancora troppo esiguo e necessita quindi di ulteriori studi e report per essere meglio caratterizzato.

Non abbiamo trovato una chiara correlazione tra un fenotipo clinico e un tipo specifico di varianti genetiche; l'assenza di una sindrome epilettica definita nelle PTV è già stata descritta (123). Tuttavia, tre pazienti portatori di varianti splice-site causative di delezione nella regione del poro del dominio III, hanno tutti presentato un quadro clinico di DEE grave. Inoltre, sette dei dieci pazienti con DEE presentavano una variante in posizione



compresa tra 1451 e 1481, sembrando quindi una porzione della proteina altamente coinvolta in processi epilettogenici.

La mancanza di una correlazione certa tra il fenotipo ed il tipo di alterazione funzionale può essere attribuita a effetti diversi delle stesse varianti in popolazioni neuronali distinte in diversi stadi di sviluppo. Inoltre, l'azione dei geni modificatori può influenzare la gravità clinica.

***Limiti dello studio***

Lo studio è stato condotto in maniera retrospettiva e non tutti i tipi di dati raccolti erano disponibili in tutti i pazienti; perciò, sarà necessario confermare i risultati ottenuti con una raccolta prospettica all'interno di uno studio di storia naturale.

## Conclusioni

---

Questo studio è il primo ad operare una raccolta dettagliata di dati clinici ed elettroencefalografici in una coorte di pazienti con varianti patogeniche in *SCN8A* causative di perdita di funzione del canale Nav1.6.

I dati raccolti hanno permesso di identificare quattro principali fenotipi clinici: pazienti senza epilessia con disordini del neurosviluppo (il gruppo più numeroso), pazienti con epilessia generalizzata, pazienti con encefalopatie epilettiche e di sviluppo (in una percentuale maggiore di quanto descritto in precedenza) e pazienti con epilessia mioclonica (mai descritta in precedenza).

Il riconoscimento di caratteristiche cliniche precoci per la determinazione del tipo di funzione del canale (GOF vs LOF) rappresenta una priorità per un adeguato trattamento precoce dell'epilessia. In questo modo, infatti, sarebbe possibile evitare l'uso di farmaci ad azione potenzialmente dannosa, come nel caso dei farmaci bloccanti i canali del sodio in caso di varianti con perdita di funzione. Una definizione precisa di tali caratteristiche non è ancora possibile, ma ulteriori ricerche, che comprendano raccolte prospettiche all'interno di studi di storia naturale, permetteranno di trattare i pazienti secondo scelte terapeutiche mirate e di conoscere le possibili evoluzioni cliniche e prognostiche.

## Materiali Supplementari

---

| <b>Phenotypes from other sodium channels associated with LoF</b>    |                              |
|---|------------------------------|
| Phenotype   | Reference                    |
| Dravet Syndrome   | Brunklaus et al., 2022 (165) |
| Autism  | Crawford et al., 2021 (166)  |
| <b>Phenotypes from other sodium channels associated with LoF</b>    |                              |
| Phenotype   | Reference                    |
| Early onset (< 3 months) epileptic and developmental encephalopathy | Brunklaus et al., 2022 (167) |
| Familial Hemiplegic migraine  | Brunklaus et al., 2022 (167) |
| Early onset (<3 months) epileptic and developmental encephalopathy  | Wolff et al., 2017 (117)     |

**Tabella Supplementare 1:** Correlazioni tra fenotipo e funzione in diversi canali del sodio voltaggio-dipendenti

| Pt       | Sex/<br>age  | SCN8A variant ( <i>inheritance</i> )                               | Phenotype<br>( <i>First symptom</i> ) | Epilepsy        |                                 |  |               |  | Neuropsychiatric<br>features (latest FU)     | Neurological and general<br>examination (latest FU)                   | Treatment ( <b>BOLD: most effective</b> )  |
|----------|--------------|--|---------------------------------------|-----------------|---------------------------------|--|---------------|--|--|---|--|
|          |              |  |                                       | age at<br>onset | Sz onset<br>( <i>modality</i> ) | sz at FU ( <i>frequency</i> )                                  | outcome       | EEG  |  |   |  |
| 1        | M/12y<br>8mo | c.324delC, p.Thr109Argfs*7<br>( <i>de novo</i> )                   | DEE<br>( <i>sz</i> )                  | 1mo             | T<br>( <i>stormy</i> )          | F sec GTC, GTC, eyelid<br>My, T, FIAS > FC<br>( <i>daily</i> ) | Ongoing<br>sz | BGS multifocal IED<br>Ictal: hypomotor and focal<br>clonic L post quadrant > gen | sev ID, no speech,<br>ASD                    | ataxia, spasticity,<br>dyskinesias, cortical<br>blindness, strabismus | BRV, CBZ, CLB, ETS, FEN, LCM,<br>LEV, LTG, OXC, PB, PER, PHT,<br>RUF, TPM, VPA, <b>ZNS</b> , KD, |
| 2        | F/17y<br>9mo | c.(485+1_486-1)_(706+1_707-1)del, del exons 5-6 ( <i>de novo</i> ) | No eps<br>( <i>GDD</i> )              | No sz           | -                               | -  | -             | normal   | mod ID, limited<br>language                  | poor coordination, facial<br>dysmorphism, overgrowth                  | none   |
| 3        | M/16y<br>3mo | c.1141C>T, p.Arg381*<br>( <i>unk</i> )                             | GE<br>( <i>GDD</i> )                  | 3y 8mo          | aAbs<br>( <i>NA</i> )           | aAbs, My<br>( <i>multiple/month</i> )                          | Ongoing<br>sz | biFr, biO SpW, post delta.<br>Ictal: 3 Hz SpW                                    | mod ID, language dis<br>aggressiveness, ADHD | normal  | CLB, CZP, LEV, <b>LTG</b> , VPA  |
| 4<br>5   | M/5y<br>10mo | c.1229_1237del, p.Val410_Met412del ( <i>de novo</i> )              | Myoclonic<br>( <i>GDD</i> )           | 1y<br>2mo       | F My<br>( <i>gradual</i> )      | F My, aAbs<br>( <i>daily</i> )                                 | sz-free       | BGS, posterior delta and<br>SW. Ictal: 2.5 Hz SpW                                | mild ID, speech delay                        | hypotonia, ataxia, PTU,<br>microcephaly                               | <b>LTG, TPM</b> , VPA  |
| 5<br>#   | F/15y        | c.1236_1251del,<br>p.Met412Ilefs*47 ( <i>pat</i> )                 | GE<br>( <i>GDD</i> )                  | 7y              | TC, CSE<br>( <i>stormy</i> )    | TC<br>( <i>&lt;1/y</i> )                                       | sz-free       | diffuse BGS  | mod ID, speech delay,<br>learning dis        | gait disturbance  | <b>VPA, LTG</b>  |
| 6        | F/14y        | c.1236_1251del,<br>p.Met412Ilefs*47 ( <i>patl</i> )                | No eps<br>( <i>GDD</i> )              | No sz           | -                               | -  | -             | -  | mod ID, speech delay,<br>ASD                 | normal, somnambulism  | none   |
| 7        | M/42y        | c.1236_1251del,<br>p.Met412Ilefs*47 ( <i>unk</i> )                 | No eps<br>( <i>NA</i> )               | No sz           | -                               | -  | -             | -  | mod ID                                       | normal  | none   |
| 8        | F/5y         | c.1631dup, p.Asn544Lysfs*39<br>( <i>mat</i> )                      | GE<br>( <i>sz</i> )                   | 3y 6mo          | Abs<br>( <i>NA</i> )            | Abs<br>( <i>NA</i> )   | NA            | 3 Hz gen SpW, bilat Cz-Temp<br>SpW   | normal>GDD, speech<br>delay                  | normal  | <b>VPA</b>   |
| 9<br>* # | M/4y         | c.1631dup, p.Asn544Lysfs*39<br>( <i>matl</i> )                     | GE<br>( <i>sz</i> )                   | 2y 9mo          | Abs<br>( <i>NA</i> )            | Abs<br>( <i>NA</i> )   | NA            | 3-4 Hz gen SpW, irreg slow<br>wave discharges                                    | normal>GDD, ADHD,<br>aggressiveness          | normal  | <b>VPA, ETS, amantidine</b>  |
| 10       | F/36y        | c.1631dup, p.Asn544Lysfs*39<br>( <i>de novo</i> )                  | GE<br>( <i>sz</i> )                   | 7y              | Abs<br>( <i>NA</i> )            | Abs<br>( <i>NA</i> )   | NA            | 3 Hz gen SpW   | normal IQ, specific<br>learning dis          | normal  | VPA, ETS   |

|           |              |  |                    |              |                  |                   |               |                          |   |  |   |  |
|-----------|--------------|--|--------------------|--------------|------------------|-------------------|---------------|--------------------------|---|--|---|--|
| 11<br>#   | M/16y        | c.1730del, p.Pro577Argfs*61<br>(mat)                 | No eps<br>(GDD)    | No sz        | -                | -                 | -             | -                        | -   | mild ID, speech delay, aggressiveness, ADHD        | normal, GERD                                    | No ASMs (risperidone for behavioural issues) |
| 12        | M/12y        | c.1730del, p.Pro577Argfs*61<br>(mat)                 | No eps<br>(GDD)    | (FS<br>18mo) | -                | -                 | -             | -                        | -   | mod ID, speech delay, autistic features            | normal  | none   |
| 13<br>^   | M/15y        | c.1759G>T, p.Glu587*<br>(de novo)                    | GE<br>(GDD)        | 4y           | aAbs<br>(NA)     | aAbs<br>(few/day) | ongoing<br>sz | generalized IED and BGS  | GDD, speech delay, ADHD, anxiety                          | ataxia, hypotonia, dystonia, constipation          | CLB, ETS, LEV, LTG, <b>VPA</b> , ZNS            |  |
| 14        | F/3y         | c.1860_1861del, p.Tyr620*<br>(unk)                   | No eps<br>(GDD)    | No sz        | -                | -                 | -             | normal                   | mod ID, ADHD, limited language, stereotypes               | hypotonia, mild imbalance                          | none  |  |
| 15<br>∞ # | M/7y         | c.2371G>T p.Val791Phe<br>(de novo)                   | GE<br>(sz)         | 7y           | Abs<br>(stormy)  | Abs               | sz-free       | 3 Hz gen SpW             | normal  | normal   | <b>VPA</b>                                      |  |
| 16<br>>   | F/25y        | c.2544+1G>A, p(?) [skipping<br>exon 15] (unk)        | Myoclonic<br>(GDD) | No sz        | -                | -                 | -             | diffuse theta, focal IED | mod ID, speech impairment                                 | stuttering, cortical myoclonus                     | none  |  |
| 17        | F/8y<br>10mo | c.2548C>T, p.Arg850*<br>(unk)                        | No eps<br>(GDD)    | No sz        | -                | -                 | -             | -                        | GDD, ADHD   | auditory processing disorder                       | dexamethylphenidate, guanfacine, OXC (for ADHD) |  |
| 18<br>#   | F/10y<br>1mo | c.2566A>G p.Lys856Glu (unk)                          | No eps<br>(GDD)    | No sz        | -                | -                 | -             | -                        | mild ID   |  | none  |  |
| 19        | F/16y        | c.2582T>C, p.Leu861Pro<br>(de novo)                  | GE<br>(speech dis) | 11y          | Abs<br>(gradual) | Abs               | sz-free       | 3 Hz gen SpW             | ADHD, learning dis  | normal   | <b>VPA</b> , (methylphenidate for ADHD)         |  |
| 20<br>#   | M/9y         | c.2664_2675del,<br>p.Ile888_Val892delinsMet<br>(mat) | No eps<br>(GDD)    | No sz        | -                | -                 | -             | -                        | mod ID, speech delay, attention and learning dis, anxiety | hypermetropic strabismus, encopresis, constipation | none  |  |
| 21<br>D   | F/12y        | c.2791C>T, p.Arg931*<br>(unk)                        | No eps<br>(GDD)    | No sz        | -                | -                 | -             | -                        | mod ID  | strabismus, lumbar lordosis, dysmorphisms          | NA  |  |
| 22<br>#   | F/4y         | c.2792G>A, p.Arg931Gln<br>(pat)                      | No eps<br>(GDD)    | No sz        | -                | -                 | -             | -                        | mod ID, limited language                                  | NA   | none  |  |

|           |              |                                      |                    |        |                  |                  |               |   |   |  |                               |
|-----------|--------------|--------------------------------------|--------------------|--------|------------------|------------------|---------------|---|---|--|-------------------------------|
| 23<br>#   | M/26y        | c.2792G>A, p.Arg931Gln<br>(pat)      | No eps<br>(GDD)    | No sz  | -                | -                | -             | BGS, 1-2 Hz gen SpW                         | sev ID, limited<br>language                     | dysarthria, ataxia                             | LEV, TPM (given for IED)      |
| 24        | F/16y        | c.2792G>A, p.Arg931Gln<br>(pat)      | No eps<br>(GDD)    | No sz  | -                | -                | -             | -   | mod ID, speech delay                            | cardiopathy, short stature,<br>hexadactyly     | none                          |
| 25<br>#   | F/10y<br>9mo | c.2792G>A, p.Arg931Gln<br>(de novo)  | GE<br>(GDD)        | 6y 6mo | Abs<br>(gradual) | Abs<br>(daily)   | Ongoing<br>sz | 3 Hz gen SpW                                | mod ID  | NA   | VPA, <b>ETS</b>               |
| 26<br>" # | F/7y         | c.2890G>C, p.Gly964Arg<br>(de novo)  | No eps<br>(GDD)    | No sz  | -                | -                | -             | -   | mild ID, ADHD,<br>language dis                  | hypotonia                                      | none                          |
| 27<br>#   | M/20y        | c.3226A>T, p.Lys1076*<br>(mat)       | GE<br>(GDD)        | 14y    | Abs<br>(gradual) | Abs<br>(NA)      | sz-free       | 3 Hz gen SW                                 | mild ID   | normal   | <b>LEV</b> , VPA              |
| 28<br>#   | M/3y         | c.3552G>A, p.Trp1184*<br>(pat)       | No eps<br>(GDD)    | No sz  | -                | -                | -             | -   | GDD, limited language<br>skills, ASD, tantrums  | normal, overgrowth                             | none                          |
| 29        | M/15y        | c.3597G>A, p.Trp1199*<br>(mat)       | No eps<br>(GDD)    | No sz  | -                | -                | -             | IED   | mild ID, speech delay,<br>learning difficulties | impaired fine motor skills,<br>short stature   | LTG (given for IED)           |
| 30<br>" # | M/10y        | c.3652G>A, p.Glu1218Lys<br>(unk)     | No eps<br>(GDD)    | No sz  | -                | -                | -             | -   | mod ID, sev speech<br>delay, tantrums           | unstable gait                                  | none                          |
| 31<br>#   | F/22y        | c.3955G>A, p.Ala1319Thr<br>(unk)     | GE<br>(sz)         | 6y     | Abs<br>(NA)      | Abs<br>(NA)      | ongoing<br>sz | 2.5 Hz gen SW                               | mild ID, behav issues                           | hypotonia                                      | CLB, ESM, STM, VPA            |
| 32        | F/12y        | c.4351G>A, p.Gly1451Ser<br>(unk)     | GE<br>(sz)         | NA     | NA               | NA               | sz-free       | IED   | GDD, speech delay,<br>learning dis, ADHD        | gait disturbance, hypotonia                    | <b>ETS</b>                    |
| 33<br>/ # | M/33y        | c.4351G>A, p.Gly1451Ser<br>(de novo) | DEE<br>(GDD)       | 1y 6mo | Abs, GTC<br>(NA) | Abs, GTC<br>(NA) | ongoing<br>sz | NA  | sev ID, sev speech<br>delay                     | spastic tetraplegia,<br>dysphagia, nystagmus   | <b>CBZ</b>                    |
| 34<br>€ # | M/15y        | c.4351G>A, p.Gly1451Ser<br>(de novo) | DEE<br>(hypotonia) | 2mo    | My<br>(gradual)  | My<br>(frequent) | ongoing<br>sz | BGS and IED with bi-Fr or O<br>predominance | sev ID, no speech,<br>aggressiveness            | instable gait, postural<br>tremor, dysmorphism | <b>LTG, TPM, CNZ, PB, VPA</b> |

|             |               |  |                          |        |                               |  |               |  |  |  |  |
|-------------|---------------|--|--------------------------|--------|-------------------------------|--|---------------|--|--|--|--|
| 35<br>#     | F/12y         | c.4360_4362delTTC,<br>p.Phe1454del ( <i>pat</i> )                                    | DEE<br>( <i>GDD</i> )    | 2y 2mo | aAbs,<br>( <i>NA</i> )        | aAbs, T, MyAbs, A<br>( <i>sporadic</i> )               | sz-free       | generalized and bi-Fr<br>slowing                                   | sev ID, regression,<br>limited speech                | hypotonia, ataxia, uses<br>wheelchair                                      | <b>LEV, TPM</b>  |
| 36<br>€ #   | F/7y<br>7mo   | c.4419G>A, p.(Lys1473Lys)<br>[predicted inframe exon<br>skipping] ( <i>de novo</i> ) | DEE<br>( <i>GDD</i> )    | 1y 5mo | GTC, CSE<br>( <i>stormy</i> ) | GTC<br>( <i>multiple/week</i> )                        | ongoing<br>sz | progressive BGS, rare<br>diffuse and bilateral (O/Cz)<br>Sp        | regression, sev ID,<br>produce only<br>vocalizations | hypotonia, progressive<br>pyramidal syndrome,<br>retinopathy, hip luxation | LTG (worsening), KD, LEV,<br>VGB, CLB, VPA, ZNS, CBZ               |
| 37<br>< ! # | F/7y          | c.4419+1_4del, p.(?)<br>[predicted inframe exon<br>skipping] ( <i>unk</i> )          | DEE<br>( <i>GDD</i> )    | 10mo   | HC<br>( <i>gradual</i> )      | C, T, GTC, CSE<br>( <i>multiple/months</i> )           | ongoing<br>sz | 18mo: bi-Fr delta rhythms +<br>Sp. 3y8mo: Fr-Temp or post<br>delta | sev ID, no speech                                    | gait disturbance, dyskinesias<br>PEG, microcephaly                         | <b>LEV, LTG, VPA</b>   |
| 38<br>#     | F/3y<br>5mo   | c.4419+1A>G, p.(?) [predicted<br>inframe exon skipping]<br>( <i>de novo</i> )        | DEE<br>( <i>GDD</i> )    | 5mo    | My<br>( <i>NA</i> )           | My, F, T<br>( <i>monthly cluster of daily<br/>sz</i> ) | ongoing<br>sz | BGS posterior slow wave,<br>FrCz polySpW                           | mod/sev ID, no<br>speech                             | poor eye contact, gait<br>disturbance, hypotonia,<br>dyskinesias           | <b>CBZ, CZP, VPA, LEV</b>  |
| 39          | M/13y<br>4mo  | c.4419+2_4419+3del, p.(?)<br>[predicted inframe exon<br>skipping] ( <i>pat</i> )     | GE<br>( <i>GDD</i> )     | 7y 7mo | Abs<br>( <i>gradual</i> )     | Abs<br>( <i>multiple/day</i> )                         | sz-free       | L C-T-P slowing  | mild ID, speech delay,<br>ADHD                       | clumsiness, hypotonia  | LTG, <b>VPA, ETS</b>   |
| 40          | F/10y 4<br>mo | c.4419+2_4419+3del, p.(?)<br>[predicted inframe exon<br>skipping] ( <i>pat</i> )     | GE<br>( <i>sz</i> )      | 5y 4mo | Abs<br>( <i>gradual</i> )     | Abs<br>( <i>multiple/day</i> )                         | ongoing<br>sz | F-C theta activity   | mod ID, speech delay,<br>ADHD                        | Clumsiness, hypotonia  | <b>VPA, LTG, CBZ</b>   |
| 41<br>#     | F/3y          | c.4443_4444delinsT,<br>p.Met1481Ilefs*12 ( <i>de novo</i> )                          | DEE<br>( <i>sz</i> )     | 5mo    | T<br>( <i>NA</i> )            | GTC<br>( <i>weekly</i> )                               | ongoing<br>sz | multifocal IED<br>Ictal: L Temp                                    | normal>mod ID, no<br>speech, autistic behav          | regression, poor eye contact   | <b>PB, LEV, OXC (worsening)</b>                                    |
| 42          | M/6y<br>9mo   | c.4832T>A, p.Val1611Asp<br>( <i>de novo</i> )  | No eps<br>( <i>GDD</i> ) | No sz  | -                             | -  | -             | -  | mild ID, language<br>delay, ASD                      | broad based gait, dystonia,<br>non-epileptic myoclonus                     | none   |
| 43<br>D     | F/10y         | c.4848_4852del,<br>p.Arg1617Hisfs*66 ( <i>unk</i> )                                  | No eps<br>( <i>GDD</i> ) | No sz  | -                             | -  | -             | -  | mod ID   | precocious puberty, joint<br>hypermobility                                 | NA   |
| 44          | M/7y<br>10mo  | c.4849C>T, p.Arg1617*<br>( <i>de novo</i> )  | No eps<br>( <i>GDD</i> ) | No sz  | -                             | -  | -             | Bi-Fr and generalized 2.5-3Hz SW                                   | mild ID, speech delay,<br>ADHD, stereotypes          | mild hypotonia   | CBD, OXC (given for behavior<br>disorder) – OXC worsened EEG trace |

|             |              |   |                             |            |                   |  |              |   |   |   |  |                                |
|-------------|--------------|---|-----------------------------|------------|-------------------|--|--------------|---|---|---|--|--------------------------------|
| 45<br>§ * # | M/11y        | c.4859G>T, p.Arg1620Leu<br>( <i>de novo</i> )           | No eps<br>(GDD)             | No sz      | -                 | -  | -            | -   | - | mod ID, ASD behav,<br>ADHD, language dis      | hypotonia, chorea,<br>hyperreflexia                  | none                           |
| 46<br>#     | M/4y         | c.4860_4863dup,<br>p.Ala1622Ilefs*64 ( <i>de novo</i> ) | DEE<br>(GDD)                | 3y<br>10mo | GTC<br>(NA)       | GTC<br>(only 2 GTC)                              | sz-free      | BGS   | - | sev ID, no speech,<br>autistic features       | hypotonia, ataxia, Babinski<br>sign                  | VPA                            |
| 47<br>#     | NA/2y        | c.4865C>A, p.Ala1622Asp<br>( <i>de novo</i> )           | No eps<br>(GDD)             | No sz      | -                 | -  | -            | -   | - | GDD, ASD                                      | hypotonia, chorea,<br>clumsiness, fasciculations     | none                           |
| 48<br>#     | F/7y<br>6m   | c.4865C>A, p.Ala1622Asp<br>( <i>de novo</i> )           | No eps<br>(GDD)             | No sz      | -                 | -  | -            | -   | - | mild ID, speech delay,<br>ASD, oral dyspraxia | hypotonia, discrete<br>choreiform movements          | none                           |
| 49<br>#     | F/14y        | c.4961T>A, p.Ile1654Asn<br>( <i>de novo</i> )           | GE<br>(GDD)                 | 2y 8mo     | aAbs<br>(gradual) | -  | sz-free      | NA  | - | mod ID, short<br>attention span               | hypotonia, ataxia                                    | VPA + LTG                      |
| 50<br>~ #   | F/35y        | c.5156C>G, p.Pro1719Arg<br>( <i>familial</i> )          | No eps<br>(myoclonus)       | No sz      | -                 | -  | -            | -   | - | normal  | upper limb action-induced<br>non epileptic myoclonus | none                           |
| 51<br>~     | M/7y         | c.5156C>G, p.Pro1719Arg<br>( <i>pat</i> )               | No eps<br>(myoclonus)       | No sz      | -                 | -  | -            | -   | - | normal  | upper limb action-induced<br>non epileptic myoclonus | none                           |
| 52<br>#     | M/9y         | c.5156_5157delCT,<br>p.Pro1719Argfs*6 ( <i>mat</i> )    | No eps<br>(GDD)             | No sz      | -                 | -  | -            | -   | - | GDD, ADHD                                     | mild ataxia, bilateral<br>esophoria, amblyopia       | none                           |
| 53<br>* #   | F/8y         | c.5273T>C, p.Val1758Ala<br>( <i>de novo</i> )           | GE<br>(sz)                  | 2y         | Abs<br>(stormy)   | Abs  | sz-free      | NA  | - | normal IQ, learning<br>difficulties           | normal   | LEV, ETS                       |
| 54          | M/5y<br>4mo  | c.5322_5333del,<br>p.Glu1774_Ala1777del ( <i>mat</i> )  | GGE<br>(sz)                 | 10mo       | GTC<br>(gradual)  | My, A ( <i>clusters of My,<br/>few A/month</i> ) | few<br>sz/mo | Gen polySpW. Ictal: gen<br>SpW in massive myoclonus | - | normal IQ, language<br>delay, learning dis    | normal   | LEV, VPA                       |
| 55<br>#     | F/6y<br>3mo  | c.5322_5333del,<br>p.Glu1774_Ala1777del ( <i>mat</i> )  | GGE<br>(sz)                 | 2y 7mo     | GTC<br>(gradual)  | GTC<br>(4 episodes)                              | sz-free      | normal  | - | Normal IQ, language<br>delay, learning dis    | clumsiness   | VPA (now sz-free without ASMs) |
| 56          | F/37y<br>5mo | c.5322_5333del,<br>p.Glu1774_Ala1777del ( <i>unk</i> )  | GGE<br>( <i>dev delay</i> ) | 1y         | FS<br>(gradual)   | GTC, MySE<br>( <i>&lt; 1/year</i> )              | sz-free      | Bilateral Fr-Temp SpW                               | - | bordeline IQ,<br>agoraphobia                  | hypothyroidism, hollow<br>feet, scoliosis            | LEV, LTG, VGB, VPA             |



|                |              |   |                   |     |             |                            |                  |   |  |             |               |
|----------------|--------------|---|-------------------|-----|-------------|----------------------------|------------------|---|--|-------------|---------------|
| 57<br>@ *<br># | M/10y<br>5mo | c.5458C>T, p.Arg1820*<br>( <i>de novo</i> )                                   | Myoclonic<br>(sz) | 3mo | My<br>(NA)  | My, F, GTC<br>(NA)         | Ongoing<br>My sz | P SpW rapid and delta<br>activity, Cz-P slowing<br>Ictal: bi.P polySpW> gen                                   | mild ID, language<br>delay                                   | gait ataxia | LEV, LTG, VPA |
| 58<br>ø #      | F/23y        | Ex 2-4 deletion, p.(?) (multi-<br>exon deletion)<br>( <i>mosaic de novo</i> ) | DEE<br>(sz)       | 6mo | Abs<br>(NA) | Abs, aAbs, GTC, My<br>(NA) | NA               | BGS, bi-Fr theta-delta<br>activity. Ictal aAbs: bilateral<br>synchronous gen high<br>voltage polyS-slowW. PPR | moderate ID, severe<br>attention problems,<br>aggressiveness | rigidity    | ETS, LTG, VPA |

### Tabella Supplementare 2: Dati Elettro-clinici completi

**Abbreviations:** A: atonic seizure, aAbs: atypical absence, Abs: absence, ADHD: attention deficit hyperactivity disorder, ASD: autism spectrum disorder, ASM: antiseizure medication, behav: behavior, BGS: background slowing, BRV: brivaracetam, C: clonic seizure, Cz: central, CBD: cannabinoid, CBZ: carbamazepine, CLB: clobazam, CZP: clonazepam, CSE: convulsive status epilepticus, DEE: developmental and epileptic encephalopathy, dis: disorder, eps: epilepsy, ETS: ethosuximide, F: female, F sec GTC: focal evolving to generalized tonic-clonic seizure, FEN: fenfluramine, FIAS: focal impaired awareness seizure, Fr: frontal, Fs: focal seizure, FS: febrile seizure, FU: follow-up, GDD: global developmental delay, GE: generalized epilepsy, gen: generalized, GERD: Gastroesophageal reflux disease, GTC: generalized tonic-clonic seizure, HC: hemiclonic seizure, ID: intellectual disability, IED: interictal epileptic discharges, IQ: intelligence quotient, irreg: irregular, KD: ketogenic diet, L: left, LCM: lacosamine, LEV: levetiracetam, LTG: lamotrigine, M: male, mo: months, mod: moderate, mov: movements, My: myoclonic seizure, MyAbs: myoclonic absence, NA: not available, O: occipital, OXC: oxcarbazepine, P: parietal, PB: phenobarbital, PEG: percutaneous endoscopic gastrostomy, PER: perampanel, PHT: phenytoin, post: posterior, PPR: photo paroxysmal response, pt: patient, PTU: paroxysmal tonic upgaze, RUF: rufinamide, sev: severe, Sp: spike, SpW: spike and wave, SW: sharp wave, sz: seizure, T: tonic seizure, Temp: temporal, y: years, TPM: topiramate, VGB: vigabatrin, VNS: vagal nerve stimulation, VPA: valproic acid, ZNS: zonisamide.

**Patient published in:** S: PMID 34259158 - Solazzi 2021; #: PMID 34431999 - Johannesen 2021; \*: PMID 30968951 - Johannesen 2019; ^: PMID 31887642 - Schreiber 2020; ∞: PMID 31054517 - Xie 2019; >: PMID 33007625 - Canafoglia 2020; D: Decipher; ": PMID 28702509 - Wagnon 2017; /: PMID 25725044 - Blanchard 2015; €: PMID 31026061 - Denis 2019; <: PMID 25568300 - Larsen

2015; !: PMID 30171089 - Gardella 2018; §: PMID 30615093 - Liu 2019; ~: PMID 29726066 - Wagnon 2018; ¨: PMID 16236810 - Trudeau 2006; @: PMID 27781031 - Moller 2016; ø: PMID 26220391 - Berghius 2015.

**Tabella Supplementare 3**

| Pt  | Sex/<br>age  | SCN8A variant ( <i>inheritance</i> )        | Phenotype<br><i>(First symptom)</i> | Epilepsy        |                               |  |               |   | Neuropsychiatric<br>features (latest FU) | Neurological and general<br>examination (latest FU) | Treatment ( <b>BOLD</b> : most effective) |
|-----|--------------|---|-------------------------------------|-----------------|-------------------------------|--|---------------|---|--|---|---|
|     |              |   |                                     | age at<br>onset | Sz onset<br><i>(modality)</i> | sz at FU<br><i>(frequency)</i>           | outcome       | EEG   |  |   |   |
|     | M/24y<br>7mo | c.5047G>A, p.Asp1683Asn<br><i>(unknown)</i> | DEE<br><i>(sz)</i>                  | 9y              | GTC<br><i>(NA)</i>            | GTC, T                                   | Ongoing<br>sz | Cz or gen sharp transients.<br>Ictal: GTC with flattening ><br>Cz rhythmic activity | sev ID,                                  | ataxia, L hemiparesis                               | <b>OXC, LCM, ZNS, PER</b>                 |
| + # | NA/NA        | c.1099A>G; p.Met367Val<br><i>(unknown)</i>  | NA                                  | NA              | NA                            | NA                                       | NA            | NA  | NA                                       | NA  | NA  |
| # # | NA/NA        | c.1099A>G; p.Met367Val<br><i>(unknown)</i>  | NA                                  | NA              | NA                            | NA                                       | NA            | NA  | NA                                       | NA  | NA  |
| α   | M/2y<br>3mo  | c.1099A>G; p.Met367Val<br><i>(de novo)</i>  | DEE<br><i>(GDD)</i>                 | 1 mo            | F<br><i>(stormy)</i>          | F sec GTC, T<br><i>(daily or weekly)</i> | sz-free       | multi-F SW, SpW and sharp<br>slow waves   | sev GDD, absent<br>speech                | normal  | <b>OXC, VPA</b>                           |
|     | M/8y         | c.3563G>A, p.Arg1188Gln<br><i>(pat)</i>     | GE<br><i>(GDD)</i>                  | 3y<br>9mo       | GTC<br><i>(NA)</i>            | GTC                                      | sz-free       | normal  | mild ID, language dis                    | normal  | <b>LEV</b>                                |
|     | M/7y         | c.3563G>A, p.Arg1188Gln<br><i>(de novo)</i> | NA                                  | 22mo            | Abs, GTC<br><i>(NA)</i>       | Abs, GTC<br><i>(NA)</i>                  | NA            | multifocal IED  | normal                                   | NA  | <b>PB, CBD, LEV, VNS</b>                  |
|     | M/25y        | c.3563G>A, p.Arg1188Gln<br><i>(mat)</i>     | NA                                  | 18mo            | FS                            | NA                                       | NA            | NA  | absent speech, ASD,<br>behav issues      | gait impairment, dysphagia                          | NA  |

|     |            |                                      |                 |      |             |                        |               |        |         |                                   |     |
|-----|------------|--------------------------------------|-----------------|------|-------------|------------------------|---------------|--------|---------|-----------------------------------|-----|
|     | F/14y      | c.3914G>C, p.Arg1305Thr<br>(unknown) | GE<br>(GDD)     | 10 y | GTC<br>(NA) | GTC<br>(multiple/year) | Sz-free       | Normal | mild ID | clumsiness, intentional<br>tremor | LEV |
| D # | M/29<br>mo | c.3967G>T, p.Ala1323Ser<br>(de novo) | No eps<br>(GDD) | -    | -           | -                      | -             | -      | sev ID  | microcephaly                      | NA  |
| % # | M/NA       | c.3967G>T, p.Ala1323Ser<br>(de novo) | DEE<br>(sz)     | 2 mo | NA<br>(NA)  | C, T<br>(in cluster)   | ongoing<br>sz | NA     | sev ID  | NA                                | NA  |

**Tabella Supplementare 3: Dati elttro-clinici dei pazienti esclusi perché portatori di varianti GOF o con funzione mista testati nello studio**

**Abbreviations:** behav: behavior, C: clonic seizure, Cz: central, DEE: developmental and epileptic encephalopathy, eps: epilepsy, F: female, F sec GTC: focal evolving to generalized tonic-clonic seizure, FU: follow-up, GDD: global developmental delay, GE: generalized epilepsy, GTC: generalized tonic-clonic seizure, ID: intellectual disability, L: left, LCM: lacosamine, LEV: levetiracetam, M: male, mo: months, NA: not available, OXC: oxcarbazepine, pt: patient, sev: severe, SpW: spike and wave, SW: sharp wave, sz: seizure, T: tonic seizure, VPA: valproic acid, y: years, ZNS: zonisamide.

**Patient published in:** +: PMID 31335965 - Encinas 2019; #: PMID 34431999 - Johannesen 2021; †: PMID 29655203 - Lindy 2018; α: PMID 34979445 - Hu 2021; %: PMID 26993267 - Trump 2016.

## Bibliografia

---

1. Fisher RS, Boas WVE, Blume W, Elger C, Genton P, Lee P, et al. Epileptic Seizures and Epilepsy: Definitions Proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia*. 2005 Apr;46(4):470–2.
2. Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, Bogacz A, Cross JH, Elger CE, et al. ILAE Official Report: A practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*. 2014 Apr;55(4):475–82.
3. Myers CT, Mefford HC. Advancing epilepsy genetics in the genomic era. *Genome Med*. 2015 Dec;7(1):91.
4. Mercimek-Mahmutoglu S, Patel J, Cordeiro D, Hewson S, Callen D, Donner EJ, et al. Diagnostic yield of genetic testing in epileptic encephalopathy in childhood. *Epilepsia*. 2015 May;56(5):707–16.
5. WHO Data Epilepsy [Internet]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs999/en/>
6. Wirrell EC, Grossardt BR, Wong-Kisiel LCL, Nickels KC. Incidence and classification of new-onset epilepsy and epilepsy syndromes in children in Olmsted County, Minnesota from 1980 to 2004: A population-based study. *Epilepsy Res*. 2011 Jun;95(1–2):110–8.
7. Eltze CM, Chong WK, Cox T, Whitney A, Cortina-Borja M, Chin RFM, et al. A population-based study of newly diagnosed epilepsy in infants: *Newly Diagnosed Epilepsy in Infants*. *Epilepsia*. 2013 Mar;54(3):437–45.
8. Fisher RS. An overview of the 2017 ILAE operational classification of seizure types. *Epilepsy Behav*. 2017 May;70:271–3.
9. Lüders HO, Amina S, Baumgartner C, Benbadis S, Bermeo-Ovalle A, Devereaux M, et al. Modern technology calls for a modern approach to classification of epileptic seizures and the epilepsies: Classification of Epilepsies. *Epilepsia*. 2012 Mar;53(3):405–11.
10. Shorvon SD. The etiologic classification of epilepsy: Etiologic Classification of Epilepsy. *Epilepsia*. 2011 Jun;52(6):1052–7.
11. Berg AT, Blackstone NW. Concepts in classification and their relevance to epilepsy. *Epilepsy Res*. 2006 Aug;70:11–9.
12. Scheffer IE, Berkovic S, Capovilla G, Connolly MB, French J, Guilhoto L, et al. ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*. 2017;58(4):512–21.
13. Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ, Buchhalter J, Cross JH, Van Emde Boas W, et al. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: Report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia*. 2010;51(4):676–85.
14. Wirrell EC, Nabbout R, Scheffer IE, Alsaadi T, Bogacz A, French JA, et al. Methodology for classification and definition of epilepsy syndromes with list of syndromes: Report of the ILAE Task Force on Nosology and Definitions. *Epilepsia*. 2022 Jun;63(6):1333–48.
15. Zuberi SM, Wirrell E, Yozawitz E, Wilmshurst JM, Specchio N, Riney K, et al. ILAE classification and definition of epilepsy syndromes with onset in neonates and infants: Position statement by the ILAE Task Force on Nosology and Definitions. *Epilepsia*. 2022 Jun;63(6):1349–97.

16. Specchio N, Wirrell EC, Scheffer IE, Nabbout R, Riney K, Samia P, et al. International League Against Epilepsy classification and definition of epilepsy syndromes with onset in childhood: Position paper by the ILAE Task Force on Nosology and Definitions. *Epilepsia*. 2022 Jun;63(6):1398–442.
17. Hirsch E, French J, Scheffer IE, Bogacz A, Alsaadi T, Sperling MR, et al. ILAE definition of the Idiopathic Generalized Epilepsy Syndromes: Position statement by the ILAE Task Force on Nosology and Definitions. *Epilepsia*. 2022 Jun;63(6):1475–99.
18. Riney K, Bogacz A, Somerville E, Hirsch E, Nabbout R, Scheffer IE, et al. International League Against Epilepsy classification and definition of epilepsy syndromes with onset at a variable age: position statement by the ILAE Task Force on Nosology and Definitions. *Epilepsia*. 2022 Jun;63(6):1443–74.
19. Bahi-Buisson N, Nectoux J, Rosas-Vargas H, Milh M, Boddaert N, Girard B, et al. Key clinical features to identify girls with CDKL5 mutations. *Brain*. 2008 Oct 1;131(10):2647–61.
20. Tarquinio DC, Hou W, Berg A, Kaufmann WE, Lane JB, Skinner SA, et al. Longitudinal course of epilepsy in Rett syndrome and related disorders. *Brain*. 2017 Feb;140(2):306–18.
21. Trivisano M, Pietrafusa N, Terracciano A, Marini C, Mei D, Darra F, et al. Defining the electroclinical phenotype and outcome of PCDH19-related epilepsy: A multicenter study. *Epilepsia*. 2018 Dec;59(12):2260–71.
22. Kolc KL, Sadleir LG, Scheffer IE, Ivancevic A, Roberts R, Pham DH, et al. A systematic review and meta-analysis of 271 PCDH19-variant individuals identifies psychiatric comorbidities, and association of seizure onset and disease severity. *Mol Psychiatry*. 2019 Feb;24(2):241–51.
23. Stamberger H, Nikanorova M, Willemsen MH, Accorsi P, Angriman M, Baier H, et al. STXBP1 encephalopathy: A neurodevelopmental disorder including epilepsy. *Neurology*. 2016 Mar 8;86(10):954–62.
24. Moseley BD, Wirrell EC, Wong-Kisiel LC, Nickels K. Early onset epilepsy is associated with increased mortality: A population-based study. *Epilepsy Res*. 2013 Aug;105(3):410–4.
25. Berg AT, Langfitt JT, Testa FM, Levy SR, DiMario F, Westerveld M, et al. Residual cognitive effects of uncomplicated idiopathic and cryptogenic epilepsy. *Epilepsy Behav*. 2008 Nov;13(4):614–9.
26. Symonds JD, Elliott KS, Shetty J, Armstrong M, Brunklaus A, Cutcutache I, et al. Early childhood epilepsies: epidemiology, classification, aetiology, and socio-economic determinants. *Brain*. 2021 Oct 22;144(9):2879–91.
27. Wirrell E, Wong-Kisiel L, Mandrekar J, Nickels K. Predictors and course of medically intractable epilepsy in young children presenting before 36 months of age: A retrospective, population-based study: Predicting Intractability in Young Children. *Epilepsia*. 2012 Sep;53(9):1563–9.
28. Berg AT, Zelko FA, Levy SR, Testa FM. Age at onset of epilepsy, pharmacoresistance, and cognitive outcomes: A prospective cohort study. *Neurology*. 2012 Sep 25;79(13):1384–91.
29. Panayiotopoulos CP, Michael M, Sanders S, Valeta T, Koutroumanidis M. Benign childhood focal epilepsies: assessment of established and newly recognized syndromes. *Brain*. 2008 Aug 21;131(9):2264–86.

30. Taylor I, Berkovic SF, Kivity S, Scheffer IE. Benign occipital epilepsies of childhood: clinical features and genetics. *Brain*. 2008 Sep;131(9):2287–94.
31. Caraballo RH, Sologuestua A, Grañana N, Adi JN, Cersósimo RO, Mazza E, et al. Idiopathic occipital and absence epilepsies appearing in the same children. *Pediatr Neurol*. 2004 Jan;30(1):24–8.
32. Verrotti A, Casciato S, Spalice A, Carotenuto M, Striano P, Parisi P, et al. Coexistence of childhood absence epilepsy and benign epilepsy with centrotemporal spikes: A case series. *Eur J Paediatr Neurol*. 2017 May;21(3):570–5.
33. Jallon P, Latour P. Epidemiology of Idiopathic Generalized Epilepsies. *Epilepsia*. 2005 Nov;46(s9):10–4.
34. Kasteleijn-Nolst Trenité D, Rubboli G, Hirsch E, Martins Da Silva A, Seri S, Wilkins A, et al. Methodology of photic stimulation revisited: Updated European algorithm for visual stimulation in the EEG laboratory: Methodology of Photic Stimulation Revisited. *Epilepsia*. 2012 Jan;53(1):16–24.
35. Wirrell EC. Predicting pharmacoresistance in pediatric epilepsy. *Epilepsia*. 2013 May;54(s2):19–22.
36. Berg AT, Scheffer IE. New concepts in classification of the epilepsies: Entering the 21st century: New Concepts in Classification. *Epilepsia*. 2011 Jun;52(6):1058–62.
37. Cainelli E, Bisiacchi P. Neurodevelopmental Disorders: Past, Present, and Future. *Children*. 2022 Dec 24;10(1):31.
38. Chiurazzi P, Kiani AK, Miertus J, Paolacci S, Barati S, Manara E, et al. Genetic analysis of intellectual disability and autism. *Acta Bio Medica Atenei Parm*. 2020 Nov 9;91(13-S):e2020003.
39. American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders (5th ed.). 2013.
40. Zablotsky B, Black LI, Blumberg SJ. Estimated Prevalence of Children With Diagnosed Developmental Disabilities in the United States, 2014-2016. *NCHS Data Brief*. 2017 Nov;(291):1–8.
41. Maulik PK, Mascarenhas MN, Mathers CD, Dua T, Saxena S. Prevalence of intellectual disability: A meta-analysis of population-based studies. *Res Dev Disabil*. 2011 Mar;32(2):419–36.
42. Sharma SR, Gonda X, Tarazi FI. Autism Spectrum Disorder: Classification, diagnosis and therapy. *Pharmacol Ther*. 2018 Oct;190:91–104.
43. Hirota T, King BH. Autism Spectrum Disorder: A Review. *JAMA*. 2023 Jan 10;329(2):157.
44. Christensen DL, Bilder DA, Zahorodny W, Pettygrove S, Durkin MS, Fitzgerald RT, et al. Prevalence and Characteristics of Autism Spectrum Disorder Among 4-Year-Old Children in the Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network. *J Dev Behav Pediatr*. 2016 Jan;37(1):1–8.
45. Polanczyk G, Rohde LA. Epidemiology of attention-deficit/hyperactivity disorder across the lifespan. *Curr Opin Psychiatry*. 2007 Jul;20(4):386–92.

46. Ogundele MO, Ayyash HF. ADHD in children and adolescents: Review of current practice of non-pharmacological and behavioural management. *AIMS Public Health*. 2023;10(1):35–51.
47. Tomblin JB, Records NL, Buckwalter P, Zhang X, Smith E, O'Brien M. Prevalence of Specific Language Impairment in Kindergarten Children. *J Speech Lang Hear Res*. 1997 Dec;40(6):1245–60.
48. Conti-Ramsden G, Botting N, Faragher B. Psycholinguistic Markers for Specific Language Impairment (SLI). *J Child Psychol Psychiatry*. 2001 Sep;42(6):741–8.
49. Tomblin JB, Zhang X, Buckwalter P, O'Brien M. The Stability of Primary Language Disorder: Four Years After Kindergarten Diagnosis. *J Speech Lang Hear Res*. 2003 Dec;46(6):1283–96.
50. Hulme C, Snowling MJ. The interface between spoken and written language: developmental disorders. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 2014 Jan 19;369(1634):20120395.
51. Katusic SK, Colligan RC, Barbaresi WJ, Schaid DJ, Jacobsen SJ. Incidence of Reading Disability in a Population-Based Birth Cohort, 1976–1982, Rochester, Minn. *Mayo Clin Proc*. 2001 Nov;76(11):1081–92.
52. Moll K, Kunze S, Neuhoff N, Bruder J, Schulte-Körne G. Specific Learning Disorder: Prevalence and Gender Differences. Kroesbergen E, editor. *PLoS ONE*. 2014 Jul 29;9(7):e103537.
53. Rutter M, Caspi A, Fergusson D, Horwood LJ, Goodman R, Maughan B, et al. Sex Differences in Developmental Reading Disability: New Findings From 4 Epidemiological Studies. *JAMA*. 2004 Apr 28;291(16):2007.
54. Etmanskie JM, Partanen M, Siegel LS. A Longitudinal Examination of the Persistence of Late Emerging Reading Disabilities. *J Learn Disabil*. 2016 Jan;49(1):21–35.
55. Catts HW, Compton D, Tomblin JB, Bridges MS. Prevalence and nature of late-emerging poor readers. *J Educ Psychol*. 2012 Feb;104(1):166–81.
56. Morgan PL, Li H, Farkas G, Cook M, Pun WH, Hillemeier MM. Executive functioning deficits increase kindergarten children's risk for reading and mathematics difficulties in first grade. *Contemp Educ Psychol*. 2017 Jul;50:23–32.
57. Myers KA, Johnstone DL, Dymont DA. Epilepsy genetics: Current knowledge, applications, and future directions. *Clin Genet*. 2019 Jan;95(1):95–111.
58. El Achkar CM, Olson HE, Poduri A, Pearl PL. The Genetics of the Epilepsies. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2015 Jul;15(7):39.
59. Weber YG, Biskup S, Helbig KL, Von Spiczak S, Lerche H. The role of genetic testing in epilepsy diagnosis and management. *Expert Rev Mol Diagn*. 2017 Aug 3;17(8):739–50.
60. Thomas P, Guerrini R, Arzimanoglou A. *Le epilessia: Diagnosi e trattamento*. 2nd ed. Milan: Elsevier; 2001.
61. Møller RS, Hammer TB, Rubboli G, Lemke JR, Johannesen KM. From next-generation sequencing to targeted treatment of non-acquired epilepsies. *Expert Rev Mol Diagn*. 2019 Mar 4;19(3):217–28.
62. Tuchman R, Rapin I. Epilepsy in autism. *Lancet Neurol*. 2002 Oct;1(6):352–8.

63. Hoischen A, Krumm N, Eichler EE. Prioritization of neurodevelopmental disease genes by discovery of new mutations. *Nat Neurosci*. 2014 Jun;17(6):764–72.
64. Mantegazza M, Broccoli V. SCN1A NaV1.1 channelopathies: Mechanisms in expression systems, animal models, and human iPSC models. *Epilepsia* [Internet]. 2019 Dec <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/epi.14700>
65. Hallmayer J. Genetic Heritability and Shared Environmental Factors Among Twin Pairs With Autism. *Arch Gen Psychiatry*. 2011 Nov 1;68(11):1095.
66. Rosenberg RE, Law JK, Yenokyan G, McGready J, Kaufmann WE, Law PA. Characteristics and Concordance of Autism Spectrum Disorders Among 277 Twin Pairs. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2009 Oct 5;163(10):907.
67. Bolton P, Macdonald H, Pickles A, Rios P, Goode S, Crowson M, et al. A Case-Control Family History Study of Autism. *J Child Psychol Psychiatry*. 1994 Jul;35(5):877–900.
68. Rylaarsdam L, Guemez-Gamboa A. Genetic Causes and Modifiers of Autism Spectrum Disorder. *Front Cell Neurosci*. 2019 Aug 20;13:385.
69. Sullivan PF, Daly MJ, O'Donovan M. Genetic architectures of psychiatric disorders: the emerging picture and its implications. *Nat Rev Genet*. 2012 Aug;13(8):537–51.
70. Biederman J, Faraone SV, Keenan K, Knee D, Tsuang MT. Family-Genetic and Psychosocial Risk Factors in DSM-III Attention Deficit Disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 1990 Jul;29(4):526–33.
71. Biederman J, Fried R, Petty C, Mahoney L, Faraone SV. An Examination of the Impact of Attention-Deficit Hyperactivity Disorder on IQ: A Large Controlled Family-Based Analysis. *Can J Psychiatry*. 2012 Oct;57(10):608–16.
72. Faraone SV, Larsson H. Genetics of attention deficit hyperactivity disorder. *Mol Psychiatry*. 2019 Apr;24(4):562–75.
73. Snowling MJ, Melby-Lervåg M. Oral language deficits in familial dyslexia: A meta-analysis and review. *Psychol Bull*. 2016 May;142(5):498–545.
74. Willcutt EG, Pennington BF, Duncan L, Smith SD, Keenan JM, Wadsworth S, et al. Understanding the Complex Etiologies of Developmental Disorders: Behavioral and Molecular Genetic Approaches. *J Dev Behav Pediatr*. 2010 Sep;31(7):533–44.
75. Sands TT, Choi H. Genetic Testing in Pediatric Epilepsy. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2017 May;17(5):45.
76. Ng SB, Turner EH, Robertson PD, Flygare SD, Bigham AW, Lee C, et al. Targeted capture and massively parallel sequencing of 12 human exomes. *Nature*. 2009 Sep;461(7261):272–6.
77. Veeramah KR, Johnstone L, Karafet TM, Wolf D, Sprissler R, Salogiannis J, et al. Exome sequencing reveals new causal mutations in children with epileptic encephalopathies. *Epilepsia*. 2013 Jul;54(7):1270–81.
78. Allen NM, Conroy J, Shahwan A, Lynch B, Correa RG, Pena SDJ, et al. Unexplained early onset epileptic encephalopathy: Exome screening and phenotype expansion. *Epilepsia*. 2016 Jan ;57(1). <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/epi.13250>



79. Catterall WA. From Ionic Currents to Molecular Mechanisms. *Neuron*. 2000 Apr;26(1):13–25.
80. Anderson PAV, Greenberg RM. Phylogeny of ion channels: clues to structure and function. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 2001 May;129(1):17–28.
81. Petrovski S, Wang Q, Heinzen EL, Allen AS, Goldstein DB. Correction: Genic Intolerance to Functional Variation and the Interpretation of Personal Genomes. Williams SM, editor. *PLoS Genet* [Internet]. 2013 Aug 23 [cited 2023 Oct 14];9(8). Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/annotation/32c8d343-9e1d-46c6-bfd4-b0cd3fb7a97e>
82. Heyne HO, Artomov M, Battke F, Bianchini C, Smith DR, Liebmann N, et al. Targeted gene sequencing in 6994 individuals with neurodevelopmental disorder with epilepsy. *Genet Med*. 2019 Nov;21(11):2496–503.
83. Dib-Hajj SD, Waxman SG. Diversity of composition and function of sodium channels in peripheral sensory neurons. *Pain*. 2015 Dec;156(12):2406–7.
84. Dib-Hajj SD, Tyrrell L, Waxman SG. Structure of the Sodium Channel Gene SCN11A: Evidence for Intron-to-Exon Conversion Model and Implications for Gene Evolution. *Mol Neurobiol*. 2002;26(2–3):235–50.
85. Brunklaus A, Feng T, Brünger T, Perez-Palma E, Heyne H, Matthews E, et al. Gene variant effects across sodium channelopathies predict function and guide precision therapy. *Brain*. 2022 Dec 19;145(12):4275–86.
86. Ademuwagun IA, Rotimi SO, Syrbe S, Ajamma YU, Adebisi E. Voltage Gated Sodium Channel Genes in Epilepsy: Mutations, Functional Studies, and Treatment Dimensions. *Front Neurol*. 2021 Mar 24;12:600050.
87. Dutton SB, Makinson CD, Papale LA, Shankar A, Balakrishnan B, Nakazawa K, et al. Preferential inactivation of *Scn1a* in parvalbumin interneurons increases seizure susceptibility. *Neurobiol Dis*. 2013 Jan;49:211–20.
88. Du J, Simmons S, Brunklaus A, Adiconis X, Hession CC, Fu Z, et al. Differential excitatory vs inhibitory SCN expression at single cell level regulates brain sodium channel function in neurodevelopmental disorders. *Eur J Paediatr Neurol*. 2020 Jan;24:129–33.
89. Van Wart A, Matthews G. Impaired Firing and Cell-Specific Compensation in Neurons Lacking  $\text{Na}_v 1.6$  Sodium Channels. *J Neurosci*. 2006 Jul 5;26(27):7172–80.
90. Yu XM. The Role of Intracellular Sodium in the Regulation of NMDA-Receptor-Mediated Channel Activity and Toxicity. *Mol Neurobiol*. 2006;33(1):063–80.
91. Ogiwara I, Miyamoto H, Morita N, Atapour N, Mazaki E, Inoue I, et al. Nav1.1 Localizes to Axons of Parvalbumin-Positive Inhibitory Interneurons: A Circuit Basis for Epileptic Seizures in Mice Carrying an *Scn1a* Gene Mutation. *J Neurosci*. 2007 May 30;27(22):5903–14.
92. Ogiwara I, Iwasato T, Miyamoto H, Iwata R, Yamagata T, Mazaki E, et al. Nav1.1 haploinsufficiency in excitatory neurons ameliorates seizure-associated sudden death in a mouse model of Dravet syndrome. *Hum Mol Genet*. 2013 Dec 1;22(23):4784–804.
93. Nassar MA, Stirling LC, Forlani G, Baker MD, Matthews EA, Dickenson AH, et al. Nociceptor-specific gene deletion reveals a major role for  $\text{Na}_v 1.7$  (PN1) in acute and inflammatory pain. *Proc Natl Acad Sci*. 2004 Aug 24;101(34):12706–11.

94. Yang Y. Mutations in SCN9A, encoding a sodium channel alpha subunit, in patients with primary erythralgia. *J Med Genet.* 2004 Mar 1;41(3):171–4.
95. Rush AM, Dib-Hajj SD, Liu S, Cummins TR, Black JA, Waxman SG. A single sodium channel mutation produces hyper- or hypoexcitability in different types of neurons. *Proc Natl Acad Sci.* 2006 May 23;103(21):8245–50.
96. Parrini E, Marini C, Mei D, Galuppi A, Cellini E, Pucatti D, et al. Diagnostic Targeted Resequencing in 349 Patients with Drug-Resistant Pediatric Epilepsies Identifies Causative Mutations in 30 Different Genes: HUMAN MUTATION. *Hum Mutat.* 2017 Feb;38(2):216–25.
97. Lindy AS, Stosser MB, Butler E, Downtain-Pickersgill C, Shanmugham A, Retterer K, et al. Diagnostic outcomes for genetic testing of 70 genes in 8565 patients with epilepsy and neurodevelopmental disorders. *Epilepsia.* 2018 May;59(5):1062–71.
98. Blanchard MG, Willemsen MH, Walker JB, Dib-Hajj SD, Waxman SG, Jongmans MC, et al. De novo gain-of-function and loss-of-function mutations of *SCN8A* in patients with intellectual disabilities and epilepsy. *J Med Genet.* 2015 May;52(5):330–7.
99. Wagon JL, Korn MJ, Parent R, Tarpey TA, Jones JM, Hammer MF, et al. Convulsive seizures and SUDEP in a mouse model of SCN8A epileptic encephalopathy. *Hum Mol Genet.* 2015 Jan 15;24(2):506–15.
100. Brunklaus A, Ellis R, Reavey E, Semsarian C, Zuberi SM. Genotype phenotype associations across the voltage-gated sodium channel family. *J Med Genet.* 2014 Oct;51(10):650–8.
101. Zuberi SM, Brunklaus A, Birch R, Reavey E, Duncan J, Forbes GH. Genotype-phenotype associations in SCN1A-related epilepsies. *Neurology.* 2011 Feb 15;76(7):594–600.
102. Shi S, Carattino MD, Kleyman TR. Role of the Wrist Domain in the Response of the Epithelial Sodium Channel to External Stimuli. *J Biol Chem.* 2012 Dec;287(53):44027–35.
103. Jurkat-Rott K, Holzherr B, Fauler M, Lehmann-Horn F. Sodium channelopathies of skeletal muscle result from gain or loss of function. *Pflüg Arch - Eur J Physiol.* 2010 Jul;460(2):239–48.
104. Waxman SG. Painful Na-channelopathies: an expanding universe. *Trends Mol Med.* 2013 Jul;19(7):406–9.
105. Symonds JD, Zuberi SM, Stewart K, McLellan A, O'Regan M, MacLeod S, et al. Incidence and phenotypes of childhood-onset genetic epilepsies: a prospective population-based national cohort. *Brain.* 2019 Aug 1;142(8):2303–18.
106. Shao N, Zhang H, Wang X, Zhang W, Yu M, Meng H. Familial Hemiplegic Migraine Type 3 (FHM3) With an SCN1A Mutation in a Chinese Family: A Case Report. *Front Neurol.* 2018 Nov 15;9:976.
107. Satterstrom FK, Kosmicki JA, Wang J, Breen MS, De Rubeis S, An JY, et al. Large-Scale Exome Sequencing Study Implicates Both Developmental and Functional Changes in the Neurobiology of Autism. *Cell.* 2020 Feb;180(3):568–584.e23.
108. Scheffer IE, Nabbout R. SCN1A-related phenotypes: Epilepsy and beyond. *Epilepsia* [Internet]. 2019 Dec [cited 2023 Oct 15];60(S3). Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/epi.16386>

109. Escayg A, Goldin AL. Sodium channel SCN1A and epilepsy: Mutations and mechanisms: Sodium Channel SCN1A and Epilepsy. *Epilepsia*. 2010 Sep;51(9):1650–8.
110. Dhifallah S, Lancaster E, Merrill S, Leroudier N, Mantegazza M, Cestèle S. Gain of Function for the SCN1A/hNav1.1-L1670W Mutation Responsible for Familial Hemiplegic Migraine. *Front Mol Neurosci*. 2018 Jul 9;11:232.
111. Kaplan DI, Isom LL, Petrou S. Role of Sodium Channels in Epilepsy. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2016 Jun;6(6):a022814.
112. Nakamura K, Kato M, Osaka H, Yamashita S, Nakagawa E, Haginoya K, et al. Clinical spectrum of SCN2A mutations expanding to Ohtahara syndrome. *Neurology*. 2013 Sep 10;81(11):992–8.
113. Barcia G, Fleming MR, Deligniere A, Gazula VR, Brown MR, Langouet M, et al. De novo gain-of-function KCNT1 channel mutations cause malignant migrating partial seizures of infancy. *Nat Genet*. 2012 Nov;44(11):1255–9.
114. Sanders SJ, Murtha MT, Gupta AR, Murdoch JD, Raubeson MJ, Willsey AJ, et al. De novo mutations revealed by whole-exome sequencing are strongly associated with autism. *Nature*. 2012 May;485(7397):237–41.
115. Rauch A, Wieczorek D, Graf E, Wieland T, Ende S, Schwarzmayr T, et al. Range of genetic mutations associated with severe non-syndromic sporadic intellectual disability: an exome sequencing study. *The Lancet*. 2012 Nov;380(9854):1674–82.
116. Buxbaum JD, Daly MJ, Devlin B, Lehner T, Roeder K, State MW. The Autism Sequencing Consortium: Large-Scale, High-Throughput Sequencing in Autism Spectrum Disorders. *Neuron*. 2012 Dec;76(6):1052–6.
117. Wolff M, Johannesen KM, Hedrich UBS, Masnada S, Rubboli G, Gardella E, et al. Genetic and phenotypic heterogeneity suggest therapeutic implications in SCN2A-related disorders. *Brain*. 2017 May 1;140(5):1316–36.
118. Schwarz N, Bast T, Gaily E, Golla G, Gorman KM, Griffiths LR, et al. Clinical and genetic spectrum of SCN2A-associated episodic ataxia. *Eur J Paediatr Neurol*. 2019 May;23(3):438–47.
119. Wolff M, Brunklaus A, Zuberi SM. Phenotypic spectrum and genetics of SCN2A-related disorders, treatment options, and outcomes in epilepsy and beyond. *Epilepsia* [Internet]. 2019 Dec [cited 2023 Oct 15];60(S3). Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/epi.14935>
120. Sanders SJ, Campbell AJ, Cottrell JR, Moller RS, Wagner FF, Auldridge AL, et al. Progress in Understanding and Treating SCN2A-Mediated Disorders. *Trends Neurosci*. 2018 Jul;41(7):442–56.
121. Ben-Shalom R, Keeshen CM, Berrios KN, An JY, Sanders SJ, Bender KJ. Opposing Effects on Na V 1.2 Function Underlie Differences Between SCN2A Variants Observed in Individuals With Autism Spectrum Disorder or Infantile Seizures. *Biol Psychiatry*. 2017 Aug;82(3):224–32.
122. Ogiwara I, Miyamoto H, Tatsukawa T, Yamagata T, Nakayama T, Atapour N, et al. Nav1.2 haploinsufficiency in excitatory neurons causes absence-like seizures in mice. *Commun Biol*. 2018 Jul 19;1(1):96.

123. Brunklaus A, Lal D. Sodium channel epilepsies and neurodevelopmental disorders: from disease mechanisms to clinical application. *Dev Med Child Neurol.* 2020 Jul;62(7):784–92.
124. Whitaker WRJ, Clare JJ, Powell AJ, Chen YH, Faull RLM, Emson PC. Distribution of voltage-gated sodium channel  $\alpha$ -subunit and  $\beta$ -subunit mRNAs in human hippocampal formation, cortex, and cerebellum. *J Comp Neurol.* 2000 Jun 19;422(1):123–39.
125. Cheah CS, Westenbroek RE, Roden WH, Kalume F, Oakley JC, Jansen LA, et al. Correlations in timing of sodium channel expression, epilepsy, and sudden death in Dravet syndrome. *Channels.* 2013 Nov 2;7(6):468–72.
126. Zaman T, Helbig I, Božović IB, DeBrosse SD, Bergqvist AC, Wallis K, et al. Mutations in SCN3A cause early infantile epileptic encephalopathy. *Ann Neurol.* 2018 Apr;83(4):703–17.
127. Hains BC, Klein JP, Saab CY, Craner MJ, Black JA, Waxman SG. Upregulation of Sodium Channel  $\text{Na}_v 1.3$  and Functional Involvement in Neuronal Hyperexcitability Associated with Central Neuropathic Pain after Spinal Cord Injury. *J Neurosci.* 2003 Oct 1;23(26):8881–92.
128. Black JA, Nikolajsen L, Kroner K, Jensen TS, Waxman SG. Multiple sodium channel isoforms and mitogen-activated protein kinases are present in painful human neuromas. *Ann Neurol.* 2008 Dec;64(6):644–53.
129. Chen YJ, Shi YW, Xu HQ, Chen ML, Gao MM, Sun WW, et al. Electrophysiological Differences between the Same Pore Region Mutation in SCN1A and SCN3A. *Mol Neurobiol.* 2015 Jun;51(3):1263–70.
130. Vanoye CG, Gurnett CA, Holland KD, George AL, Kearney JA. Novel SCN3A variants associated with focal epilepsy in children. *Neurobiol Dis.* 2014 Feb;62:313–22.
131. Toledo-Aral JJ, Moss BL, He ZJ, Koszowski AG, Whisenand T, Levinson SR, et al. Identification of PN1, a predominant voltage-dependent sodium channel expressed principally in peripheral neurons. *Proc Natl Acad Sci.* 1997 Feb 18;94(4):1527–32.
132. Chen XS, Reader RH, Hoischen A, Veltman JA, Simpson NH, Francks C, et al. Next-generation DNA sequencing identifies novel gene variants and pathways involved in specific language impairment. *Sci Rep.* 2017 Apr 25;7(1):46105.
133. Doty C. SCN9A: another sodium channel excited to play a role in human epilepsies. *Clin Genet.* 2010 Apr;77(4):326–8.
134. Wallace RH, Wang DW, Singh R, Scheffer IE, George AL, Phillips HA, et al. Febrile seizures and generalized epilepsy associated with a mutation in the  $\text{Na}^+$ -channel  $\beta 1$  subunit gene SCN1B. *Nat Genet.* 1998 Aug;19(4):366–70.
135. Scheffer IE, Harkin LA, Grinton BE, Dibbens LM, Turner SJ, Zielinski MA, et al. Temporal lobe epilepsy and GEFS+ phenotypes associated with SCN1B mutations. *Brain.* 2006 Nov 21;130(1):100–9.
136. Wagnon JL, Barker BS, Hounshell JA, Haaxma CA, Shealy A, Moss T, et al. Pathogenic mechanism of recurrent mutations of *SCN8A* in epileptic encephalopathy. *Ann Clin Transl Neurol.* 2016 Feb;3(2):114–23.
137. Talwar D, Hammer MF. SCN8A Epilepsy, Developmental Encephalopathy, and Related Disorders. *Pediatr Neurol.* 2021 Sep;122:76–83.

138. Caldwell JH, Schaller KL, Lasher RS, Peles E, Levinson SR. Sodium channel Nav1.6 is localized at nodes of Ranvier, dendrites, and synapses. *Proc Natl Acad Sci*. 2000 May 9;97(10):5616–20.
139. Johannesen KM, Gardella E, Encinas AC, Lehesjoki A, Linnankivi T, Petersen MB, et al. The spectrum of intermediate SCN8A-related epilepsy. *Epilepsia*. 2019 May;60(5):830–44.
140. Plummer NW, McBurney MW, Meisler MH. Alternative Splicing of the Sodium Channel SCN8A Predicts a Truncated Two-domain Protein in Fetal Brain and Non-neuronal Cells. *J Biol Chem*. 1997 Sep;272(38):24008–15.
141. Wagnon JL, Barker BS, Ottolini M, Park Y, Volkheimer A, Valdez P, et al. Loss-of-function variants of SCN8A in intellectual disability without seizures. *Neurol Genet*. 2017 Aug;3(4):e170.
142. Gardella E, Becker F, Møller RS, Schubert J, Lemke JR, Larsen LHG, et al. Benign infantile seizures and paroxysmal dyskinesia caused by an SCN8A mutation. *Ann Neurol*. 2016 Mar;79(3):428–36.
143. Wagnon JL, Mencacci NE, Barker BS, Wengert ER, Bhatia KP, Balint B, et al. Partial loss-of-function of sodium channel *SCN8A* in familial isolated myoclonus: WAGNON ET AL. *Hum Mutat*. 2018 Jul;39(7):965–9.
144. Meisler MH. SCN8A encephalopathy: Mechanisms and models. *Epilepsia* [Internet]. 2019 Dec [cited 2023 Oct 15];60(S3). Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/epi.14703>
145. Trudeau MM. Heterozygosity for a protein truncation mutation of sodium channel SCN8A in a patient with cerebellar atrophy, ataxia, and mental retardation. *J Med Genet*. 2006 Jun 1;43(6):527–30.
146. Veeramah KR, O'Brien JE, Meisler MH, Cheng X, Dib-Hajj SD, Waxman SG, et al. De Novo Pathogenic SCN8A Mutation Identified by Whole-Genome Sequencing of a Family Quartet Affected by Infantile Epileptic Encephalopathy and SUDEP. *Am J Hum Genet*. 2012 Mar;90(3):502–10.
147. Ohba C, Kato M, Takahashi S, Lerman-Sagie T, Lev D, Terashima H, et al. Early onset epileptic encephalopathy caused by de novo SCN8A mutations. *Epilepsia*. 2014 Jul;55(7):994–1000.
148. Larsen J, Carvill GL, Gardella E, Kluger G, Schmiedel G, Barisic N, et al. The phenotypic spectrum of SCN8A encephalopathy. *Neurology*. 2015 Feb 3;84(5):480–9.
149. Gardella E, Marini C, Trivisano M, Fitzgerald MP, Alber M, Howell KB, et al. The phenotype of SCN8A developmental and epileptic encephalopathy. *Neurology*. 2018 Sep 18;91(12):e1112–24.
150. Wang J, Gao H, Bao X, Zhang Q, Li J, Wei L, et al. SCN8A mutations in Chinese patients with early onset epileptic encephalopathy and benign infantile seizures. *BMC Med Genet*. 2017 Dec;18(1):104.
151. Vaher U, Nõukas M, Nikopensus T, Kals M, Annilo T, Nelis M, et al. De Novo SCN8A Mutation Identified by Whole-Exome Sequencing in a Boy With Neonatal Epileptic Encephalopathy, Multiple Congenital Anomalies, and Movement Disorders. *J Child Neurol*. 2014 Dec;29(12):NP202–6.

152. Johannesen KM, Liu Y, Koko M, Gjerulfson CE, Sonnenberg L, Schubert J, et al. Genotype-phenotype correlations in SCN8A-related disorders reveal prognostic and therapeutic implications. *Brain*. 2022 Sep 14;145(9):2991–3009.
153. Gardella E, Møller RS. Phenotypic and genetic spectrum of SCN8A-related disorders, treatment options, and outcomes. *Epilepsia* [Internet]. 2019 Dec [cited 2023 Oct 15];60(S3). Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/epi.16319>
154. Denis J, Villeneuve N, Cacciagli P, Mignon-Ravix C, Lacoste C, Lefranc J, et al. Clinical study of 19 patients with *SCN 8A* -related epilepsy: Two modes of onset regarding EEG and seizures. *Epilepsia*. 2019 May;60(5):845–56.
155. Musto E, Gardella E, Møller RS. Recent advances in treatment of epilepsy-related sodium channelopathies. *Eur J Paediatr Neurol*. 2020 Jan;24:123–8.
156. Estacion M, O'Brien JE, Conravey A, Hammer MF, Waxman SG, Dib-Hajj SD, et al. A novel de novo mutation of SCN8A (Nav1.6) with enhanced channel activation in a child with epileptic encephalopathy. *Neurobiol Dis*. 2014 Sep;69:117–23.
157. De Kovel CGF, Meisler MH, Brilstra EH, Van Berkestijn FMC, Slot RV 'T, Van Lieshout S, et al. Characterization of a de novo SCN8A mutation in a patient with epileptic encephalopathy. *Epilepsy Res*. 2014 Nov;108(9):1511–8.
158. Bagnasco I, Dassi P, Blé R, Vigliano P. A relatively mild phenotype associated with mutation of SCN8A. *Seizure*. 2018 Mar;56:47–9.
159. Anand G, Collett-White F, Orsini A, Thomas S, Jayapal S, Trump N, et al. Autosomal dominant SCN8A mutation with an unusually mild phenotype. *Eur J Paediatr Neurol*. 2016 Sep;20(5):761–5.
160. Liu Y, Schubert J, Sonnenberg L, Helbig KL, Hoei-Hansen CE, Koko M, et al. Neuronal mechanisms of mutations in SCN8A causing epilepsy or intellectual disability. *Brain*. 2019 Feb 1;142(2):376–90.
161. Boßelmann CM, Hedrich UBS, Lerche H, Pfeifer N. Predicting functional effects of ion channel variants using new phenotypic machine learning methods. Niederer SA, editor. *PLOS Comput Biol*. 2023 Mar 6;19(3):e1010959.
162. Iqbal S, Brünger T, Pérez-Palma E, Macnee M, Brunklaus A, Daly MJ, et al. Delineation of functionally essential protein regions for 242 neurodevelopmental genes. *Brain*. 2023 Feb 13;146(2):519–33.
163. Heyne HO, Baez-Nieto D, Iqbal S, Palmer DS, Brunklaus A, May P, et al. Predicting functional effects of missense variants in voltage-gated sodium and calcium channels. *Sci Transl Med*. 2020 Aug 12;12(556):eaay6848.
164. Berghuis B, De Kovel CGF, Van Iterson L, Lamberts RJ, Sander JW, Lindhout D, et al. Complex SCN8A DNA-abnormalities in an individual with therapy resistant absence epilepsy. *Epilepsy Res*. 2015 Sep;115:141–4.
165. Brunklaus A, Pérez-Palma E, Ghanty I, Xinge J, Brilstra E, Ceulemans B, et al. Development and Validation of a Prediction Model for Early Diagnosis of SCN1A-Related Epilepsies. *Neurology*. 2022 Mar 15;98(11):e1163–74.
166. Crawford K, Xian J, Helbig KL, Galer PD, Parthasarathy S, Lewis-Smith D, et al. Computational analysis of 10,860 phenotypic annotations in individuals with SCN2A-related disorders. *Genet Med*. 2021 Jul;23(7):1263–72.

167. Brunklaus A, Brünger T, Feng T, Fons C, Lehtikoinen A, Panagiotakaki E, et al. The gain of function SCN1A disorder spectrum: novel epilepsy phenotypes and therapeutic implications. *Brain*. 2022 Nov 21;145(11):3816–31.

## Ringraziamenti

---

Con questo lavoro si conclude un percorso di crescita professionale e personale, per il quale ringrazio tutti coloro che ne hanno preso parte.

Ringrazio il professor Pierangelo Veggiotti per avermi permesso di seguire le mie inclinazioni personali e approfondire i miei interessi durante questi anni di formazione, e per la possibilità di proseguire gli studi con un dottorato di ricerca.

Ringrazio le professoresse Aglaia Vignoli e Maria Paola Canevini per gli insegnamenti, per i consigli e per avermi sostenuto nei progetti a cui ho preso parte.

Ringrazio la professoressa Elena Gardella, mentore durante e dopo il mio periodo di ricerca presso il Filadelfia Epilepsy Hospital di Dianalund, che ha saputo ispirarmi e trasmettermi la passione per il lavoro di ricerca e l'impegno e la dedizione nella cura dei pazienti. La ringrazio anche per le possibilità che mi ha dato nel partecipare a congressi internazionali e per i progetti futuri che abbiamo in cantiere.

Ringrazio la professoressa Rikke Møller per l'aiuto e gli insegnamenti in materia di genetica e per la disponibilità e simpatia con cui mi ha accolto nel suo dipartimento.

Ringrazio i dottori Dennis Lal e Tobias Brünger per la collaborazione per la creazione di un metodo di lavoro e per la disponibilità alla discussione dei risultati.

Ringrazio il professor Holger Lerche e i dottori Yuanyuan Liu e Hang Liu per aver effettuato gli studi funzionali.

Ringrazio tutti i clinici che hanno partecipato a questa raccolta dati internazionale.

Ringrazio il professor Pierluigi Foglio Bonda e l'Associazione Italiana Epilessie Farmacoresistenti per l'interesse per il mio lavoro e per il premio che mi hanno conferito.