

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI GENOVA  
FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA**



**CORSO DI LAUREA SPECIALISTICA IN MEDICINA  
E CHIRURGIA  
ANNO ACCADEMICO 2021-2022**

**TESI DI LAUREA**

*“Modificazioni circadiane nei pazienti affetti da Epilessia  
Sonno-Relata. Uno studio preliminare”*

**RELATORE**

Prof. Dario Arnaldi

**CANDIDATO**

Edoardo Nizzi

## Sommario

1 Epilessia Ipermotoria sonno-relata (SHE).....	5
1.1 Epidemiologia.....	5
1.2 Caratteristiche cliniche delle SHE.....	5
1.3 Caratteristiche elettrofisiologiche.....	6
1.4 Sicurezza diagnostica.....	7
1.5 Eziologia delle SHE.....	7
1.5.1 Genetica delle SHE.....	8
1.5.2 Malformazioni cerebrali associate alla SHE.....	9
2 Ritmo circadiano.....	10
2.1 Livello molecolare del ritmo circadiano nei mammiferi.....	11
2.2 Regolazione dell'orologio circadiano.....	12
2.3 Organizzazione dell'orologio circadiano nell'organismo.....	12
2.3.1 Il pacemaker centrale nei mammiferi.....	12
2.3.2 Gli orologi circadiani periferici nei mammiferi.....	13
2.4- "Entrainment" del ritmo circadiano nei mammiferi.....	13
2.5 Ritmo circadiano ed epilessia.....	14
3 Il sonno.....	14
3.1 Metodi di studio.....	14
3.1.1 Polisonnografia.....	15
3.1.2 Actigrafia.....	15
3.1.3 Questionari per la valutazione del sonno.....	16
3.1.4- Diari del sonno.....	16
3.2 Struttura fisiologica del sonno.....	16
3.3 Neuroanatomia del sonno.....	17
3.4 Regolazione del ciclo sonno-veglia.....	18
3.4.1 Pressione omeostatica del sonno.....	18

3.4.2	Sonno e ritmo circadiano .....	19
3.5	Sonno ed epilessia.....	19
4	Melatonina .....	20
4.1	Fisiologia e secrezione.....	20
4.2	DLMO ( <i>Dim Light Melatonin Onset</i> ).....	21
4.3	Campionamento dei materiali biologici.....	22
4.3.1	Sangue.....	22
4.3.2	Saliva .....	23
4.3.3	Urina .....	23
4.4	Analisi quantitative della melatonina endogena .....	23
4.4.1	RIA.....	23
4.4.2	ELISA .....	24
4.5	Melatonina ed epilessia.....	24
5	Scopo dello studio.....	24
6	Materiali e metodi.....	25
6.1	Pazienti.....	25
6.2	Metodologia .....	25
6.2.1	Raccolta dei campioni salivari e dosaggio della melatonina .....	25
6.2.2	Studio actigrafico .....	26
6.2.2	<i>Pittsburgh Sleep Quality Index</i> .....	27
6.2.4	<i>Morningness-eveningness questionnaire</i> , forma breve .....	27
6.3	Analisi statistica dei dati .....	27
7	Risultati.....	28
7.1	Melatonina .....	30
7.1.1	Risultati dell'analisi statistica preliminare.....	31
7.2	Actigrafia .....	33
7.2.1	Risultati dell'analisi statistica preliminare.....	33

8 Discussione .....	33
8.1 Limitazioni.....	36
Ringraziamenti.....	59

## 1 Epilessia Ipermotoria sonno-relata (SHE)

L'epilessia ipermotoria sonno relata (*Sleep-related Hypermotor Epilepsy*: SHE), precedentemente nota come “*Nocturnal Frontal Lobe Epilepsy*” (1), è una sindrome epilettica ad esordio focale caratterizzata dall'insorgenza di crisi di breve durata, prevalentemente, anche se non esclusivamente, nel sonno. Le crisi sono solitamente di tipo ipercinetico (2–4).

La SHE è una patologia complessa ed eterogenea le cui crisi possono essere talmente frequenti da portare ad una frammentazione del sonno (5). La deprivazione di sonno ed, in generale, la modificazione della qualità del sonno può portare a disfunzioni cognitive nei domini esecutivo e mnemonico oltre che nelle capacità relazionali (6,7). Inoltre, può favorire lo sviluppo di altre crisi (8).

Le articolate interazioni fra ritmo circadiano, sonno ed epilessia sono note da tempo (9). Alcuni studi, infatti, suggeriscono che le alterazioni strutturali macroscopiche del sonno e l'instabilità del risveglio siano parte integrante della sindrome SHE (5,10).

La SHE è la forma di epilessia sonno-relata più frequente nell'adulto (11).

### 1.1 Epidemiologia

Circa il 12% dei pazienti epilettici presenta la maggioranza delle crisi (>90%) nel sonno (12). Fra coloro che si rivolgono ad un centro di terzo livello per una valutazione video-polisonnografica il 13% si rivela essere affetto da SHE (13). Dal momento che la diagnosi differenziale con le parasonnie può essere ardua, è ragionevole pensare che la prevalenza delle SHE sia sottostimata (2,14). Uno studio epidemiologico condotto sulla popolazione dell'Emilia-Romagna ha rilevato come la minima prevalenza della SHE sia di 1.8/100.000 individui (15). Nella SHE si riscontra un rapporto maschi:femmine di 7:3; le forme in cui non è possibile riconoscere una lesione epilettogena alla RM sono la maggioranza; una storia familiare è possibile, ma non comune e il picco di insorgenza si ha durante l'infanzia (3,15).

### 1.2 Caratteristiche cliniche delle SHE

Le principali caratteristiche cliniche degli episodi ictali delle SHE sono la breve durata (inferiori ai due minuti), la variabilità interindividuale (contrapposta alla marcata stereotipia nello stesso soggetto), l'esordio e la risoluzione brusche, la tendenza ad essere ipermotorie e la prevalente insorgenza durante il sonno (1,2,4), anche se non sono rari i soggetti che sperimentano crisi aggiuntive in veglia (1–3,13).

È meritevole di attenzione il fatto che le crisi avvengono durante il sonno e, di conseguenza, si riscontrano più frequentemente, ma non esclusivamente, di notte. Questa è una delle ragioni per cui si rese necessaria la modifica del nome della patologia da “notturne” a “sonno relate” (1). Hanno la tendenza a raggrupparsi in grappoli, ma ciò non è necessario per la diagnosi. Nonostante avvengano nel sonno, non sono uniformemente distribuite nelle sue varie fasi. Il sonno REM è infatti raramente coinvolto (16). È stato successivamente proposto di stratificare le manifestazioni cliniche in quattro gruppi (*seizure patterns*, SP) a complessità motoria crescente (17). SP1 comprende comportamenti motori elementari senza alterazioni emozionali. SP2 prevede movimenti ipercinetici innaturali con coinvolgimento anche del tronco, ma senza stereotipie distali e comportamenti gestuali complessi. SP3 vede l'esecuzione di pattern motori complessi (come pedalare e dondolare il busto), stereotipie distali e manierismi di utilizzo/manipolazione di oggetti. SP4 è molto simile a SP3 dal punto di vista motorio, ma aggiunge un contenuto emozionale intenso di solito spiacevole oltre che vocalizzi e vagabondaggi in stato epilettico (18).

### 1.3 Caratteristiche elettrofisiologiche

Come in molte altre sindromi epilettiche, nelle SHE l'EEG (almeno a 19 canali secondo il sistema internazionale 10-20) può non essere informativo, specie quando il focus epilettogeno risiede nelle strutture più profonde, lontane dallo scalpo (13,19). Le metodiche di studio più utili sono quelle che per lungo tempo studiano il soggetto nel sonno. Di conseguenza si riducono ad una registrazione prolungata video-EEG o una polisonnografia (PSG) (19). La PSG risulta il migliore strumento di indagine in quanto consente di differenziare le parasonnie del sonno NREM dalle SHE (5,10). Nella valutazione elettrofisiologica delle SHE bisogna sempre considerare che un EEG senza anomalie non esclude la possibilità che si tratti di una SHE (2,13,19). Inoltre è raccomandabile che la registrazione EEG sia combinata con una registrazione video che si protrae per la durata del sonno del soggetto in questione (2,13) (se possibile, da effettuare nel contesto di una polisonnografia (13)). Infine, va tenuto in considerazione che, nonostante il loro esordio sia tipicamente anteriore, la regione responsabile dell'attività epilettogena si può riscontrare anche in altre sedi (20-24).

Infatti, il focus epilettogeno nelle SHE nella maggioranza dei casi si trova nel lobo frontale, sede delle aree corticali deputate al movimento (19,20), ma può anche

trovarsi in una sede extra-frontale e, comunque, esitare in una crisi a prevalenza motoria (23). Le ragioni di questo fenomeno non sono chiare, tuttavia, si ipotizza che vengano reclutati fasci di connessione sottocorticali, i quali attiverebbero circuiti legati a pattern motori innati (25). Alla luce di ciò si possono classificare le SHE come a partenza frontale ed extrafrontale. In quest'ultima categoria si trovano soggetti con il focus epilettogeno risiedente nell'area opercolo-insulare (21), temporale (23) e parietale (24). I *seizure patterns* sopra citati hanno un discreto valore localizzatorio; infatti, presentano un gradiente postero anteriore da SP1 a SP4. Se le crisi a partenza frontale e parietale possono presentare ogni tipologia di *seizure pattern*, le crisi della corteccia opercolo-insulare non si manifestano mai sotto forma di SP4. (17,26).

#### 1.4 Sicurezza diagnostica

Posto che il sospetto diagnostico nasce da un'anamnesi compatibile (19), i gradi di certezza diagnostica si classificano in base alla documentazione presente in:

- SHE possibile, quando il racconto anamnestico soddisfa i criteri clinici (1,27)
- SHE clinicamente documentata, quando sono presenti delle prove video del soggetto in questione, che filmano per intero un evento legato al sonno e compatibile (meglio se in numero di almeno due) (1,27).
- SHE certa, quando è documentata da un'indagine video-EEG eseguita durante il sonno del soggetto con o senza deprivazione di sonno. Il sistema EEG in questione dovrebbe essere almeno a 19 canali (sistema internazionale 10-20) (1).

#### 1.5 Eziologia delle SHE

La maggioranza dei casi la SHE è sporadica, cioè senza una chiara ricorrenza familiare e senza anomalie strutturali visibili alle metodiche di imaging disponibili al momento. Nella restante minoranza si riconoscono SHE ad origine genetica e su base strutturale, con un'ampia sovrapposizione fra le due in quanto spesso anomalie genetiche sono alla base di anomalie strutturali. La più frequente delle anomalie strutturali malformative è la "*Focal Cortical Dysplasia*, FCD", mentre la trasmissione clinica più comune nelle epilessie sonno-relate geneticamente trasmesse è autosomica dominante (AD-SHE). Fra le anomalie strutturali rientrano anche gli esiti di traumi, la cui clinica, quando sfocia in una SHE, è indistinguibile da forme ad eziologia differente.

### 1.5.1 Genetica delle SHE

Le forme di SHE con una trasmissione ereditaria rappresentano circa il 14% del totale (28). Di queste circa il 30% è portatore di mutazioni conosciute (29). Fra le forme geneticamente determinate ricade anche una minoranza delle SHE sporadiche in cui la mutazione è insorta de novo (28,29). La SHE è una malattia geneticamente oltre che fenotipicamente eterogenea in cui alcune mutazioni potrebbero essere causative di un fenotipo clinico più grave di altre (28). Il primo gene correlato alla SHE (CHRNA4, *Cholinergic Receptor Nicotinic Alpha Subunit* MIM \* 118504) venne identificato nel 1995 da un'analisi di linkage su di una famiglia di 21 pazienti con AD-SHE e 4 portatori (30). Poco dopo vennero messe in evidenza mutazioni in altri due geni omologhi al precedente: CHRNB2 (*Cholinergic Receptor Nicotinic Beta2 Subunit*, MIM \* 118507) e CHRNA2 (*Cholinergic Receptor Nicotinic Alpha 2 Subunit*, MIM \* 118502).

Per circa 20 anni non sono state identificate altre mutazioni fino a quando non è stato disponibile il *Next Generation Sequencing* (NGS). Questa metodica, a partire dal 2012, ha permesso di studiare quei pedigree che non sono adatti alle indagini di *linkage* e i casi sporadici, portando all'identificazione di altri quattro geni causativi: KCNT1 (*Potassium Sodium-Activated Channel Subfamily T Member 1*, MIM \* 608167) (45), DEPDC5 (*DEP Domain Containing 5*, MIM \*614191) (46), NPRL2 (*NPR2-like Protein*, MIM \*607072) e NPRL3 (*Nitrogen Permease Regulator-like 3*, MIM \*600928) (33).

Recentemente è stato messo in luce il probabile ruolo di *Circadian Locomotor Output Cycles Kaput* (CLOCK), fattore di trascrizione chiave del ritmo circadiano, e di mTOR. CLOCK risulta essere meno espresso nei tessuti epilettogeni di quanto non sia nei tessuti sani e potrebbe spiegare la correlazione delle crisi con particolari fasi del ritmo circadiano, come quella notturna (34).

Nella quasi totalità dei casi indagati nelle SHE le mutazioni di CHRNA4 e CHRNB2 sembrano causare un'iperattivazione del recettore nicotinic dell'acetilcolina di cui fanno parte come subunità *alpha4* e *beta2*, rispettivamente (35). Ciò porterebbe ad un'aumentata sensibilità nei confronti dell'acetilcolina e alterazioni nel circuito in cui sono inseriti (36). Queste osservazioni suggeriscono che i recettori nicotinici dell'acetilcolina mutati possano essere impropriamente attivi anche quando i livelli di acetilcolina sono fisiologicamente bassi, come nelle fasi del sonno NREM. L'anomala distribuzione della concentrazione in diverse aree cerebrali dei recettori nicotinici



dell'acetilcolina in soggetti AD-SHE con mutazioni in *CHRNA4* e *CHRNA2* potrebbe essere un meccanismo di compenso (37). Contemporaneamente in alcune di queste mutazioni (*alpha4ser280phe* e *alpha4ser284leu*) è stata documentata l'iperattivazione di neuroni inibitori GABAergici, i quali potrebbero sincronizzare i neuroni piramidali della corteccia (38). Più controverso rimane il ruolo di *CHRNA2*, per il quale vengono riportate mutazioni sia "gain of function" (39) sia "loss of function" (40).

Mutazioni in *KCNT1* sono state rilevate in pazienti con AD-SHE e comorbidità psichiatriche oltre che disordini comportamentali e disabilità cognitiva (41). *KCNT1*, quando mutato, non solo porta ad una deregolazione in senso eccitatorio dei circuiti corticali, essendo deputato al controllo del trasporto sodio/potassio (42), ma anche a "mild malformation of cortical development", MCD, fra cui le FCD (43). Pertanto mutazioni in *KCNT1* potrebbero includere sia forme di epilessia lesionale e non lesionale (43).

*DEPDC5*, *NPRL2* e *NRLP3* codificano per le proteine facenti parte di *GATOR1*, un complesso multiproteico con la funzione di inibire mTOR (44). Le mutazioni nelle componenti di *GATOR1* sono la causa più comune di epilessie ad esordio focale geneticamente determinate, di cui la SHE è soltanto una delle molte (33). Nella stessa famiglia la mutazione può essere associata a forme lesionali o non lesionali di epilessia. Le forme lesionali sono di solito rappresentate da MCD e le più frequenti di queste sono le FCD *type IIb* (33). Questo dato suggerisce un'alterazione della via di segnalazione di mTOR. È degno di nota che la via di segnalazione di mTOR è alterata anche in altre condizioni legate allo stesso tipo di MCD, come la TSC (*Tuberous Sclerosis Complex*) (45).

### 1.5.2 Malformazioni cerebrali associate alla SHE

La *Focal Cortical Dysplasia* (FCD) è il reperto patologico più comune nei pazienti refrattari al trattamento farmacologico e, per questo, andati incontro a chirurgia dell'epilessia, in particolare FCD *type II* (17,19). Dalla letteratura emerge che questo tipo di lesione cerebrale è statisticamente associata allo sviluppo di epilessia durante il sonno (46). L'anomala architettura delle reti neuronali all'interno delle FCD *type II* per connessioni sinaptiche e sistemi neurotrasmettitoriali porta ad una spiccata epilettogenicità locale. Ciò è dimostrato dalle anomalie elettriche riscontrabili in tali sedi. L'ipotesi patogenetica alla base è che l'attività elettrica aberrante della corteccia

displastica sia inibita o comunque di minore entità e frequenza in veglia di quanto non sia nel sonno. Raggiungerebbe la massima espressione nel sonno ad onde lente e potrebbe avere una sua periodicità. L'attività elettrica epilettogena riscontrata, tipicamente di basso voltaggio e alta frequenza, si estende alle aree limitrofe alla FCD *type II* (47).

Altre cause strutturali di SHE riportate nei pazienti trattati chirurgicamente comprendono altri tipi di FCD, neoplasie dello sviluppo (come il tumore neuroepiteliale disembrionogenetico), esisti di traumi cerebrali e gangliogliomi (17).

## 2 Ritmo circadiano

La maggior parte degli organismi viventi anticipa le variazioni giornaliere nell'ambiente per sopravvivere, adeguandosi ai cambiamenti nella luce e nella temperatura (48–50). Pattern comportamentali e/o ritmi fisiologici che si ripetono nel corso di una giornata sono stati osservati in tutti gli organismi viventi ad oggi considerati (51). Questi ritmi sono definiti come circadiani dalla locuzione latina “*circa diem*” e sono il risultato di un sistema segnatempo autonomo, conosciuto come orologio circadiano (52). L'orologio circadiano è in grado di mantenere una periodicità di circa 24 ore in condizioni ambientali costanti: in un processo detto “trascinamento” (“*entrainment*”) le fasi del ritmo circadiano sono calibrate sulla base di stimoli esterni, che prendono il nome di “*zeitgebers*”. Gli *zeitgebers* possono trascinare il ritmo circadiano avanti o indietro rispetto alla fase vigente in quel momento, in modo tale da assicurare il sincronismo con il giorno solare. In condizioni ottimali questo meccanismo assicura un notevole vantaggio adattativo per l'organismo che lo segue, ottimizzando i tempi per i fondamentali processi cellulari, fisiologici e comportamentali; tuttavia, l'esposizione agli *zeitgebers* al di fuori della fase in cui il ritmo circadiano è progettato per riceverli può portare ad effetti nocivi sulla salute dell'individuo (53).

L'orologio circadiano è geneticamente determinato e le mutazioni nei cosiddetti “geni-orologio” possono cambiare la ritmicità del comportamento negli animali, nei funghi, nelle piante e nei batteri (51). In sostanza, il ritmo circadiano può essere visto come un susseguirsi di espressione, accumulo e degradazione dei prodotti dei geni-orologio che, nel suo insieme, forma un oscillatore molecolare autonomo capace di autoregolazione. Negli animali, l'orologio molecolare controlla l'espressione dei geni target nell'intero organismo in modo tale che l'attività e la funzione di differenti

cellule ed organi avvengano con tempistiche ben definite (54). La fisiologia del ritmo circadiano vede un network organizzato gerarchicamente con a capo un generatore di pattern centrale, localizzato nel nucleo soprachiasmatico dell'ipotalamo (*Supra-Chiasmatic Nucleus*, SCN), e a seguire vari segnatempo periferici.

## 2.1 Livello molecolare del ritmo circadiano nei mammiferi

Gli elementi fondamentali nel controllo del ritmo circadiano nei mammiferi sono i due fattori di trascrizione BMAL1 (*Brain and Muscle ARNT-1*) e CLOCK (55). Questi formano un eterodimero, la cui funzione è quella di attivare la trascrizione di quei geni che contengono nei loro promotori gli elementi *E/E'-box* (56). Sotto il controllo di BMAL1 e CLOCK cadono i loro regolatori negativi, suddivisi in due famiglie: “*Period*” (PER1, PER2 e PER3) e “*Cryptochrome*” (CRY1 e CRY2). Sebbene la perdita di uno soltanto di questi geni non esista in un totale sovvertimento del ritmo circadiano, i loro ruoli non sono totalmente sovrapponibili, infatti, silenziando CRY1 si ottiene un accorciamento del ritmo a meno di 24h, mentre silenziando CRY2, il contrario. Soltanto il silenziamento simultaneo di CRY1 e CRY2 abolisce completamente la ritmicità (57). Altri target di CLOCK-BMAL1 sono recettori nucleari REV-ERB $\alpha$  e REV-ERB $\beta$  (REV-ERB $\alpha/\beta$ ), che insieme ai “*retinoin-related orphan receptors*” (ROR $\alpha$ , ROR $\beta$  e ROR $\gamma$ ), formano un secondo sistema di controllo per assicurare l'espressione periodica di BMAL1 (58). Una recente scoperta nella complessa fisiologia di CLOCK-BMAL1 è un suo inibitore al pari di CRY sugli *E-boxes*, ma con un meccanismo differente, che prende il nome di CHRONO (*Circadian-Associated Repressor of Transcription*) (59). CHRONO è il gene orologio espresso nel maggior numero di tessuti nei primati diurni, anche più degli altri geni nominati in questo capitolo (60). L'espressione dei geni-orologio BMAL1-CLOCK può anche procedere per una via alternativa a quella che vede convergere il segnale sui promotori dei geni *E/E'-box*. Infatti, si è scoperto che soggiacciono anche alla regolazione mediata da DBP (*albumin D-site-binding protein*), i fattori di trascrizione TEF (*thyrotroph embryonic factor*) e HLF (*hepatic leukemia factor*), i quali hanno come target le zone del DNA conosciute come “*D-boxes promoters*” (61). Un ultimo regolatore negativo degno di nota è PASD1 (*PAS Domain Containing Repressor 1*), il quale a differenza degli altri, presenta un'espressione limitata a quei tessuti in cui il ritmo circadiano è molto attenuato se non nullo ( linea germinale o neoplasie scarsamente differenziate) (62).

## 2.2 Regolazione dell'orologio circadiano

La trascrizione dei geni-orologio dei mammiferi è un processo altamente controllato: studi comparazione genomica hanno dimostrato la presenza di un ciclo trascrizionale che parte da una fase di instabilità, prosegue in una di attivazione, di attiva trascrizione e, infine, di repressione (63). Recenti tecniche di analisi della topologia del DNA hanno stabilito l'inequivocabile interazione fra *enhancer* e *promoter* e trovato zone del genoma che si compattano periodicamente (*Topologically Associated Domains*) (64).

Una volta che BMAL1 e CLOCK sono stati trascritti, dal nucleo vengono traslocati nel citoplasma e lì riarrangiati per modificarne la stabilità e la struttura (65). La durata del ritmo circadiano nei mammiferi dipende prevalentemente dalla fosforilazione di PER e CRY, la quale può avvenire in differenti sedi. A seconda della sede cambia la suscettibilità alla degradazione (66). BMAL1 stesso può subire delle modifiche, potendo essere fosforilato, acetilato o legato a SUMO al fine di essere più o meno stabile e/o suscettibile alla degradazione (67–70). Infine, i repressori principali della funzione di BMAL1-CLOCK (PER1, PER2, PER3, CRY1 e CRY2) sembrano assemblarsi in un unico complesso intranucleare (71).

## 2.3 Organizzazione dell'orologio circadiano nell'organismo

Il pacemaker principale è situato nel sistema nervoso centrale e riceve informazioni dagli *zeitgebers* per elaborarle e distribuirle ai pacemaker secondari, che possono trovarsi nel sistema nervoso centrale come in altre sedi dell'organismo (72). I pacemakers formano una rete bidirezionale che comunica tramite neurotrasmettitori e neuromodulatori (72). La sincronizzazione fra orologi centrali e periferici è raggiunta tramite diverse vie: un controllo nervoso, uno ormonale ed uno basato sulla temperatura (72).

### 2.3.1 Il pacemaker centrale nei mammiferi

La sede del ritmo circadiano nei mammiferi è l'SCN (73). Sebbene sia teoricamente possibile per il SCN gestire autonomamente il ritmo circadiano, nella fisiologia viene riceve continui feedback dal mondo esterno tramite un complesso sistema di neurotrasmettitori e neuromodulatori oltre che dalla temperatura corporea (74). Questa struttura mantiene inalterato il suo ritmo intrinseco grazie alle strette interazioni elettriche e biochimiche che intercorrono fra le cellule che lo compongono. Anatomicamente si divide in un “*core*” e uno “*shell*”, che differiscono per

neurotrasmettitori e vie efferenti. Nel complesso, i neuroni dell'SCN esibiscono un marcato ritmo circadiano nelle loro caratteristiche fisiologiche di base, le quali sono direttamente in grado di influenzare il comportamento (75). Recentemente è stato dimostrato che anche gli astrociti del SCN hanno un loro ritmo circadiano intrinseco e possono trasmetterlo alle popolazioni neuronali adiacenti che ne sono prive (76).

### 2.3.2 Gli orologi circadiani periferici nei mammiferi

Da oltre un ventennio sappiamo che virtualmente ogni tessuto ed organo ha un suo ritmo circadiano (tranne le cellule staminali embrionali e le cellule staminali pluripotenti indotte) (77–79). Sebbene i geni orologio fondamentali siano ubiquitariamente espressi nei mammiferi, i geni a valle degli stessi sono diversi a seconda del tessuto preso in esame e, anche quando uno stesso gene è espresso in più tessuti, può le concentrazioni del suo prodotto possono seguire diversi andamenti circadiani. La letteratura è ormai concorde sul fatto che i ritmi circadiani periferici siano essenziali per il funzionamento degli organi ed apparati nei quali si manifestano. Per esempio, cavie di laboratorio modificate in modo tale da mantenere funzionante il solo controllo centrale mostravano livelli di attività motoria inappropriatamente bassi; al contrario cavie con i ritmi periferici mantenuti e quello centrale abolito mantenevano un peso ed una attività motoria appropriata mentre esibivano una aritmicità comportamentale (80).

### 2.4- “*Entrainment*” del ritmo circadiano nei mammiferi

Lo *zeitgeber* primario dei mammiferi, dai roditori all'uomo, è la luce. L'SCN riceve informazioni sulla quantità di luce presente in quel determinato momento da cellule retiniche intrinsecamente sensibili alla luce per la presenza al loro interno del pigmento melanopsina (81). L'SCN e la retina sono collegati direttamente dal fascio retino-ipotalamico, attraverso cui le afferenze visive giungono al SNC. Il *Central Pattern Generator* le elabora e le trasferisce ai centri circadiani periferici ubiquitariamente espressi nell'organismo. Senza questo controllo, gli orologi periferici andrebbero fuori fase (79). Dal SNC le efferenze principali si portano ad altre zone del sistema nervoso centrale, prevalentemente ipotalamiche, ma non solo. Oltre alla via di comunicazione nervosa l'SNC si avvale di segnali umorali, incluse le oscillazioni giornaliere dei livelli di glucocorticoidi e melatonina, quest'ultima una dei *markers* più solidi dello studio del ritmo circadiano in vivo nell'uomo (74).

Un'altra via per modulare i ritmi circadiani periferici è la temperatura corporea: brevi ondate di calore possono reimpostare gli orologi periferici, mentre non hanno alcun effetto sul SCN (82,83).

L'SNC influenza ed è influenzato dagli altri orologi circadiani periferici, i quali vengono calibrati anche dalle loro funzioni fisiologiche: per esempio il fegato si può allineare all'introduzione di cibo e il muscolo risponde oltre che al SCN anche all'attività fisica (presumibilmente sotto controllo di HIF1 $\alpha$ ) (84–86).

## 2.5 Ritmo circadiano ed epilessia

L'eccitabilità corticale esibisce un ritmo circadiano, in particolare è ridotta nelle ore serali rispetto a quelle del giorno (87).

I principali geni orologio ed i loro regolatori sono chiamati in causa nella genesi di vari tipi di epilessia. CLOCK è ridotto nei neuroni eccitatori ed inibitori nei foci epilettici dei pazienti con FCD e TSC (34). Animali *knock-out* per BMAL1 mostrano un'aberrante eccitabilità corticale rispetto ai controlli (88). Anche i geni a valle e/o regolatori di BMAL1/CLOCK, se mutati, inducono cambiamenti nell'eccitabilità corticale (61). Le interazioni fra la via di segnalazione di mTOR ed epilessia sono già state descritte precedentemente nella patogenesi delle SHE e in questa sede è interessante evidenziare che la via di segnalazione di mTOR controlla in parte l'espressione del complesso BMAL1/CLOCK. Risulta, quindi, ragionevole pensare che, quando alterato, mTOR possa incidere sull'eccitabilità corticale (89).

## 3 Il sonno

Il sonno è uno stato comportamentale di riposo associato ad una bassa responsività agli stimoli esterni di debole entità e pronta reversibilità in seguito a stimoli maggiori (90). Una teoria unitaria di cosa il sonno sia e quali siano le sue funzioni rimane ad oggi lontana. In ogni caso sappiamo che è un processo fisiologico di vitale importanza, come indicato dalle gravi conseguenze fisiche e cognitive e dalla marcata tendenza al recupero in seguito a protocolli di deprivazione, oltre che dalla straordinaria conservazione nella filogenesi (6).

### 3.1 Metodi di studio

I primi tentativi di studiare il sonno risalgono ad oltre un secolo fa e dagli anni 30 del 900 sono evoluti rapidamente. Il primo tracciato EEG di una notte di sonno di un essere umano venne pubblicato nel 1937 (91). Successivamente vennero aggiunti altri

parametri nel monitoraggio fino ad arrivare al gold-standart di oggi, ossia la polisonnografia (PSG) (92).

### 3.1.1 Polisonnografia

La PSG usa diversi strumenti per registrare simultaneamente e continuativamente parametri fisiologici di base, fra cui neurofisiologici e cardiopolmonari, durante diverse ore, spesso un'intera notte (93). Una PSG fornisce documentazioni dettagliate ed affidabili sulle anomalie del sonno e della veglia, sulle transizioni fra i due stati e ci consente di comprendere come l'organismo nella sua totalità sia influenzato dal sonno (93). A seconda delle variabili fisiologiche prese in esame si distinguono quattro livelli di studio (94):

- Livello I. PSG standard: comprende EEG, EOG (elettro-oculo-gramma), EMG (elettromiografia) del mento, ECG (elettrocardiogramma), registrazione del flusso respiratorio, sforzo respiratorio, saturazione di ossigeno e EMG degli arti. Un tecnico vigila costantemente sull'andamento dell'esame (93,94).
- Livello II. Anche detta PSG esaustiva portatile, la principale differenza rispetto ad una PSG standard è che il tecnico non è presente (93,94).
- Livello III. È un monitoraggio cardiorespiratorio che include la registrazione di ventilazione e frequenza cardiaca o ECG e saturazione di ossigeno (93,94).
- Livello IV. È la misurazione in continuo di uno o due parametri. Di solito si prende in esame la sola saturazione arteriosa di ossigeno (93,94).

Sebbene non espressamente richiesto, il monitoraggio video è estremamente utile per aspetti diagnostici e medico-legali. Secondo la AASM (*American Academy of Sleep Medicine*) la registrazione dovrebbe durare almeno 6h (94).

### 3.1.2 Actigrafia

L'actigrafia è un metodo di studio non invasivo del ciclo sonno/veglia. È disponibile da oltre venti anni e si basa sull'entità dei movimenti del polso, registrati da strumenti indossabili, chiamati actigrafi (95). Sebbene la PSG sia considerata il *gold-standard* per lo studio del sonno, è costosa, invasiva e spesso non conciliabile con le abitudini del paziente (96). L'actigrafia è meno costosa e meno invasiva rispetto alla PSG, inoltre, offre il vantaggio di poter essere prolungata per giorni o settimane, teoricamente offrendo stime di maggiore potenza statistica rispetto ad un tracciato polisonnografico di una notte soltanto (96–98). L'actigrafia è già stata confrontata

con la PSG, rispetto alla quale risulta essere un metodo affidabile, in differenti studi (95,99,100). In una *review* comprensiva della letteratura disponibile fino ad allora si riportava che i dati derivanti dalla PSG concordavano con quelli derivanti dall'actigrafia fra il 91% e il 93% (101).

Gli actigrafi sono dispositivi a forma di orologio generalmente posizionati nel polso del lato non dominante contenenti un accelerometro per monitorare e registrare i movimenti (101). Di solito sono indossati per più giorni, durante i quali l'actigrafo effettua una registrazione al minuto, risultando in 1440 osservazioni al giorno. I dati vengono poi trasferiti su un computer, dove un software apposito li analizza per determinare il ciclo sonno/veglia (102).

### 3.1.3 Questionari per la valutazione del sonno

I questionari sono spesso il primo strumento usato nella valutazione del sonno. Il loro vantaggio principale è di non richiedere alcun dispositivo o di dover dormire in un luogo particolare. Sono veloci e possono essere sottoposti al paziente nel momento della visita, inoltre non richiedono personale altamente specializzato. Nonostante la loro intrinseca natura soggettiva, molti sono stati validati attraverso studi di comparazione con metodiche oggettive e si sono dimostrati affidabili. Oggi ne sono usati correntemente circa una trentina in quasi ogni centro del sonno (103).

### 3.1.4- Diari del sonno

Un diario del sonno è uno strumento che permette al paziente di auto-monitorare il proprio sonno. I diari sono strumenti di facile utilizzo, che richiedono pochi minuti al giorno per essere compilati. Al pari dei questionari non esiste un unico standard, ma ve ne sono molti modelli in circolazione. La maggioranza di questi contiene informazioni come: quando ci si corica e quando ci si alza dal letto, la latenza di addormentamento, il numero di ore dormite, il numero di risvegli (con annessi durata e cause), come ci si sente prima e dopo aver dormito, le attività svolte prima di coricarsi e le abitudini del giorno (pisolino pomeridiano, esercizio fisico, assunzione di farmaci, droghe, caffeina o alcol) (103).

## 3.2 Struttura fisiologica del sonno

Durante la veglia l'EEG corticale contiene onde di bassa ampiezza, desincronizzate e a basso voltaggio fra i 14 e i 30 Hz (ritmo beta). Nella veglia rilassata si ha già una diminuzione della frequenza a 8-12Hz (ritmo alfa). All'inizio del sonno non-REM le



onde diventano più ampie e la frequenza si riduce ulteriormente come risultato della sincronizzazione corticale.

Il sonno si compone di due stati: REM (*Rapid Eye Movement*) e NREM (*Non-Rapid Eye Movement*) (104). Durante un sonno fisiologico l'attività cerebrale passa attraverso fasi di attività elettrica lenta (NREM) e fasi di attività elettrica rapida (REM) (105). La lunghezza di ogni ciclo cambia mentre il sonno progredisce, in particolare si allungano le fasi REM a discapito di quelle NREM (106). Il sonno NREM è diviso in tre stadi, in cui ogni stadio rappresenta uno stato di sonno progressivamente più profondo (107). Lo stadio N1 si caratterizza per la perdita di contatto con l'ambiente esterno e il rallentamento del ritmo EEG a 4-7Hz (ritmo theta) (107). Lo stadio N2 è caratterizzato dalla perdita completa di consapevolezza, dalla comparsa di fusi del sonno (*sleep spindles*) e complessi K (*K complexes*) all'EEG (107). Lo stadio N3 è conosciuto come "*slow-waves-stage*", stadio ad onde lente, perché qui appaiono onde a 1-3Hz (ritmo delta) (107). Si pensa che le onde delta riflettano la sincronizzazione del sistema talamocorticale piuttosto che della sola corteccia. Infatti, se isolata, la corteccia esprime un'attività oscillatoria intrinseca, ma ad un ritmo più lento (0.5-1Hz) (108).

Durante il sonno REM l'attività elettrica registrata tramite EEG ricorda molto da vicino quella dello stadio N1 del sonno NREM o della veglia (107). Contrariamente a questi stati, l'elettro-oculogramma registra movimenti oculari rapidi, mentre l'elettromiografia segnala la completa atonia muscolare (eccetto per i muscoli estrinseci dell'occhio e il diaframma) (107). Nonostante non siano visibili alle registrazioni di superficie, sono presenti onde theta nell'ippocampo (109). Queste sono dovute alle proiezioni di neuroni localizzati nell'area precerulea del ponte, subito adiacenti alla zona responsabile dell'atonia muscolare (area sottolaterodorsale) (109).

### 3.3 Neuroanatomia del sonno

Lo stato di veglia dipende da eterogenee popolazioni neuronali localizzate alla giunzione fra ponte e mesencefalo (110), classicamente definite "sistema reticolare attivante ascendente". Tale sistema proietta efferenze al talamo e al prosencefalo basale (111). Lesioni selettive del prosencefalo basale portano infatti a coma irreversibile negli animali da esperimento (112). Fra le componenti maggioritarie si annoverano i neuroni colinergici del nucleo peduncolopontino e laterodorsale

tegmentale, che impediscono ai neuroni talamici di relay di iperpolarizzarsi, in modo tale da assicurare l'apertura del cancello talamico e quindi la trasmissione di informazioni dal talamo alla corteccia (113). Oltre alle strutture appena descritte è di primaria importanza il sistema monoaminergico, che dal locus caeruleus (noradrenergico), grigio periacqueduttale (dopanimergico), nuclei del rafe mediano e dorsale (serotoninergici) e dai nuclei tuberomammillari (istaminergici) proiettano al talamo, alla corteccia, al prosencefalo basale e all'ipotalamo laterale. I neuroni del gruppo monoaminergico raggiungono la massima attività durante la veglia, si assestano in una fase di riposo durante il sonno NREM e diventano totalmente inattivi durante il REM (114). L'ipotalamo laterale contiene almeno due popolazioni di neuroni che influiscono sulla veglia: i neuroni contenenti oressina/ipocretina (attivi durante la veglia e attivanti le strutture del sistema monoaminergico) e i neuroni contenenti MCH (*melanin concentrating hormon*). Quest'ultimi sembrano inibire il sistema monoaminergico (115,116).

Lo spegnimento di questo sistema, e quindi l'avvio del sonno, sembra essere imputabile a nucleo preottico ventrolaterale (VLPO), attivo durante il sonno e inibente le strutture di cui sopra (117). Le lesioni selettive di questo nucleo producono insonnia gravissima e deframmentazione del sonno (118).

I due sistemi, quello promuovente la veglia e il VLPO, sono inseriti in un circuito mutualmente esclusivo (119). Questo sistema promuove il rapido cambiamento di stato fra sonno e veglia (119).

### 3.4 Regolazione del ciclo sonno-veglia

L'alternanza del ciclo sonno-veglia segue un ritmo circadiano. Nonostante nel sonno il coinvolgimento dell'orologio biologico sia innegabile, è pensiero comune che sia anche sotto il controllo di un'altra forza, cioè la tendenza all'omeostasi (120).

Le interazioni fra questi due processi, che possono anche essere contrapposti (la pressione omeostatica del sonno aumenta tanto più la veglia si protrae, mentre il ritmo circadiano del sonno aumenta la propensione alla veglia fino alle ore serali) regola la struttura e le tempistiche del sonno, il consolidamento del ciclo sonno-veglia e l'eccitabilità corticale (121).

#### 3.4.1 Pressione omeostatica del sonno

La pressione omeostatica del sonno aumenta durante una veglia prolungata e si riduce dormendo. Quando una persona viene deprivata di sonno, l'organismo cerca di

compensare la perdita con l'aumento della propensione al sonno e/o con una maggiore profondità del sonno nel ciclo successivo (122,123). Il substrato molecolare di tale regolazione rimane ad oggi elusivo e, sebbene le concentrazioni intracerebrali di adenosina sembrano correlare efficacemente con la pressione del sonno, è anche stato dimostrato che la sua assenza nel prosencefalo basale non la altera (124,125).

#### 3.4.2 Sonno e ritmo circadiano

Il sonno è anche regolato dal ritmo circadiano: l'SCN genera un ritmo di 24h di propensione al sonno (104). La tendenza alla veglia dettata dal ritmo circadiano è minima nel momento in cui ci si alza, raggiungendo il massimo nelle ore serali, dopo le quali decresce nuovamente. Il picco della propensione al sonno avviene, invece, nelle primissime ore del mattino, nello stesso momento in cui il ritmo circadiano della temperatura corporea porta la temperatura al suo minimo (126). Nell'uomo è stato dimostrato che il sonno è influenzato dal ritmo circadiano disaccoppiando il ciclo attività/riposo dagli *output* del pacemaker circadiano. Si è ipotizzato che la base di ciò sia da ricercare nelle estese connessioni multisinaptiche che il SCN contrae con diverse aree cerebrali (127). In particolare, dal SCN il segnale sembra convergere prima sulla SPZ (*Sub-Para-ventricular Zone*) e da lì sul DMH (*Dorso-Medial Hypotalamic Nucleus*) (127). Lesioni in queste zone provocano l'abolizione del ritmo circadiano non solo nel ritmo sonno/veglia, ma anche nell'introduzione di cibo, nella regolazione della temperatura corporea e nell'espressione ormonale (di cortisolo nello specifico) (128,129).

#### 3.5 Sonno ed epilessia

Durante il sonno il sistema talamocorticale va incontro ad una progressiva sincronizzazione in seguito all'attività dei nuclei reticolari del talamo e gli stessi circuiti sembrano essere implicati nelle scariche punta-onda dei pazienti con epilessia generalizzata (130). Analisi di stimolazione magnetica transcranica hanno dimostrato che l'eccitabilità corticale aumenta all'aumentare del tempo di veglia (131). La corteccia frontale mostra le più marcate variazioni EEG in seguito alle modificazioni del ritmo sonno-veglia, in particolare in questa regione si riscontrano più frequentemente ritmi lenti in seguito ad una veglia prolungata. Questi vengono considerati il riflesso della sincronizzazione neuronale e della forza sinaptica (132,133). Ciò è di particolare rilevanza nelle SHE, che sono prevalentemente ad insorgenza frontale.

All'EEG le IEDs (*Interictal Epileptiform Discharges*) si notano più frequentemente nel sonno che nella veglia indipendentemente dalla sede in cui gli elettrodi registrano (134) e mostrano un ritmo ultradiano (135). Tuttavia è bene sottolineare che le crisi avvengono con un ritmo circadiano differente a seconda della sindrome epilettica considerata (135).

## 4 Melatonina

La melatonina è un indolo, derivato dal triptofano, isolato e caratterizzato per la prima volta nel 1958 da una ghiandola pineale bovina (136). Il suo nome deriva dalle parole greche μέλας (nero) e τόνος (contrazione) in relazione al fatto che si è dimostrata in grado di indurre la contrazione dei melanofori, organelli presenti nella cute di alcuni anfibi e deputati allo schiarimento della loro pelle.

La melatonina è presente in tutti gli animali e le piante fino ad oggi studiati (all'interno dei quali i suoi recettori sono largamente espressi) e si distingue per la spiccata eterogeneità delle sue funzioni. Probabilmente è comparsa 2.5 miliardi di anni fa per proteggere alcuni batteri dall'ambiente che andava velocemente virando verso uno stato pro-ossidativo in seguito alla “catastrofe dell'ossigeno” (*Great Oxygen Event*) (137). Secondo una recente ipotesi questi batteri probabilmente sono stati fagocitati dai primitivi eucarioti, diventando poi gli odierni mitocondri. A riprova di questa ipotesi c'è il fatto che la melatonina nei mitocondri raggiunge concentrazioni maggiori che nel resto della cellula (137).

Sebbene gli effetti più noti della melatonina riguardino il legame con il fotoperiodo, il ritmo circadiano e, nell'uomo, il sonno, è bene specificare che non si esauriscono qui. Infatti, la straordinaria conservazione nella filogenesi è, probabilmente, da imputare alla sua struttura chimica che le conferisce un'attività antiossidante circa 100 volte maggiore della vitamina E (138–141). Tramite recettori di differenti famiglie è in grado di modulare l'attività del sistema immunitario, esercitare un'azione pro-apoptica su cellule cancerose ed inibire l'apoptosi nelle cellule normali (142–144).

### 4.1 Fisiologia e secrezione

La melatonina è prodotta dalla ghiandola pineale o epifisi a partire dal triptofano e rilasciata seguendo il ritmo circadiano sotto stretto controllo dello *zeitgeber* principale, ossia l'alternanza luce/buio (145). La stimolazione dell'epifisi avviene

nell'oscurità, in altre condizioni l'attività della ghiandola viene inibita dalla luce (145). La via tramite cui stimoli luminosi provenienti dall'esterno vengono trasformati in uno stimolo interno, capace di regolare la produzione di melatonina, segue diversi passaggi obbligati. I quanti di luce sono assorbiti dalle cellule retiniche ganglionari intrinsecamente fotosensibili (ipRGC) le quali contengono il pigmento melanopsina. Il segnale così generato viene trasmesso attraverso il fascio retino-ipotalamico al SCN (145), quindi riverberato al nucleo paraventricolare e, attraverso la colonna intermedio laterale toracica superiore, arriva al ganglio cervicale superiore del simpatico (145). In ultimo; raggiunge l'epifisi attraverso le fibre del simpatico (145). In assenza dello stimolo luminoso la secrezione della melatonina rimane regolata da anse a feedback e mantiene una sua ritmicità, tuttavia di durata maggiore di 24 ore (146,147). La melatonina non presenta siti di stoccaggio nell'organismo e immediatamente dopo la sua secrezione diffonde nel liquor, nel sangue e in ogni comparto dell'organismo grazie alle sue proprietà lipofile e idrofile (148,149).

Fisiologicamente la concentrazione di melatonina extracellulare inizia ad aumentare generalmente fra le 21.00 e le 22.00. Il picco è raggiunto fra le 03.00 e le 04.00 per poi decrescere fino al mattino, divenendo quasi indosabile durante il giorno (150). Ne consegue che i livelli plasmatici sono estremamente variabili. Ad esempio, durante la giornata la concentrazione è mantenuta a 5pg/ml in media e aumenta di oltre dieci volte (50pg/ml) di notte (151). Il ciclo secretivo della melatonina è uno dei più robusti ritmi circadiani; infatti, viene modificato soltanto dalla luce (152), in particolare dalla luce di lunghezza d'onda per la quale la melanopsina è più sensibile, ossia quella compresa fra 460 e 480nm (che viene percepita come blu) (153).

#### 4.2 DLMO (*Dim Light Melatonin Onset*)

Un'oggettiva valutazione del ritmo circadiano può essere effettuata misurando l'attività di quei processi fisiologici sotto la predominante influenza dell'orologio biologico. La secrezione della melatonina è uno di questi e il DLMO è definito come il momento in cui i livelli di melatonina iniziano ad aumentare in risposta al venir meno della luce intensa (154). Permette di caratterizzare la secrezione circadiana di questo ormone basandosi sulle sue concentrazioni solo in campioni di sangue, urina o saliva, ottenute in condizioni di luce ambientale fioca (155). È ipotizzato che un aumento delle concentrazioni di melatonina si abbiano già 2-3 ore prima di coricarsi, che le sue concentrazioni maggiori corrispondano ad una riduzione della vigilanza,

minore temperatura corporea, riduzione delle capacità cognitive. Alla luce di ciò teoricamente, il suo picco dovrebbe coincidere con il momento in cui è maggiore la tendenza a coricarsi a letto (156,157). Non esiste ancora un protocollo condiviso per determinare il DLMO. È pratica comune prelevare i campioni ogni ora (158). La valutazione del DLMO può coprire le 24 ore o, più spesso, essere ristretto ad una finestra di 4-7 ore; in ogni caso l'efficacia di questo metodo è aumentata dall'associazione con il diario del sonno del paziente (159). Non esiste un *cut-off* unico per definire il DLMO, ma ci si basa su concentrazioni differenti a seconda della natura del fluido biologico in cui viene determinato. Nonostante siano accettati in letteratura anche altre metodiche per accertare il DLMO, l'utilizzo di una soglia numerica permette di ottenere risultati più affidabili, specialmente quando il profilo di secrezione della melatonina abbraccia meno di 24 ore (160). Limitatamente ai valori assoluti, il DLMO è definito come il momento in cui le concentrazioni di melatonina superano i 10pg/mL nel sangue e i 4pg/mL nella saliva (161).

### 4.3 Campionamento dei materiali biologici

Dato l'andamento circadiano della secrezione di melatonina, i campioni dovrebbero essere ottenuti dalla sera al mattino. Più i campioni sono raccolti frequentemente, più sono accurate le misure, ma i soggetti dovrebbero contemporaneamente essere messi nelle condizioni di riposare una notte in tranquillità, altrimenti i risultati potrebbero essere falsati dallo stress dovuto al campionamento. Mentre possono essere usati cateteri intravenosi e intravesicali per prelevare campioni sanguigni e urinari, non esiste altra soluzione se non quella di svegliare il paziente per il campionamento salivare.

#### 4.3.1 Sangue

La melatonina ha un'emivita breve (fra i 20 e i 60 minuti) per cui campionamenti frequenti permettono una valutazione accurata dei livelli di sintesi dell'ormone e dell'ammontare di melatonina circolante al momento del prelievo (160). I campioni di sangue sono raccolti in provette con EDTA, congelate a -20C° fino ad ulteriori analisi o fatti coagulare a 4C°, successivamente centrifugati per recuperarne il siero e poi congelati nuovamente fino a nuove analisi (162).

#### 4.3.2 Saliva

Le concentrazioni salivari di melatonina sono circa un terzo di quelle plasmatiche e riflettono fedelmente le concentrazioni plasmatiche (163). Infatti, dopo la somministrazione di melatonina esogena, le concentrazioni di questo ormone cambiano quasi simultaneamente nel siero e nella saliva in virtù della sua capacità diffusiva (164). La determinazione della melatonina salivare è un metodo comunemente usato grazie alla sua facilità di campionamento, la bassa invasività e l'accuratezza sostanzialmente equivalente alle misurazioni su sangue (165). I campioni di saliva dovrebbero essere conservati possibilmente a -20C°.

#### 4.3.3 Urina

Il principale metabolita della melatonina (la 6-sulfatossimelatonina, aMT6) riflette fedelmente i livelli plasmatici di melatonina a patto che i valori vengano corretti per la creatinina e si tenga conto dei tempi di metabolizzazione (162,163,166). Sebbene non sia possibile conservare i campioni di urina per il dosaggio della aMT6 per più di cinque giorni a temperatura ambiente, se congelati a -12C°, rimangono inalterati anche per due anni (150).

### 4.4 Analisi quantitative della melatonina endogena

Al momento sono disponibili diverse tecniche per dosare la melatonina. I più frequentemente usati sono i RIA (*radioimmunoassay*) e gli ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*). Entrambi si declinano in diverse varianti disponibili sul mercato.

#### 4.4.1 RIA

Si tratta di un metodo ad elevata specificità e sensibilità che permette una valutazione quantitativa. È basato sulla radioattività di un radioisotopo. Sono usati melatonina marcata, anticorpi anti-melatonina e melatonina non marcata. La melatonina marcata e quella libera competono per il sito di legame dell'anticorpo. Se aumenta la melatonina libera, diminuisce la possibilità della melatonina marcata di formare immunocomplessi con gli anticorpi. Successivamente la melatonina libera è lavata dagli immunocomplessi ed è aggiunto un secondo anticorpo in fase solida. L'ultimo passaggio è misurare la radioattività della frazione selezionata. Maggiore è la radioattività, minore è l'ammontare di melatonina libera (167).

#### 4.4.2 ELISA

Esistono al momento diverse varianti della procedura classica ELISA, le quali hanno in comune il procedimento di base: l'antigene viene immobilizzato su di un supporto solido e successivamente sono aggiunti anticorpi antigene-specifici. Come conseguenza si forma un complesso antigene-anticorpo. Il mezzo viene risciacquato e poi sono aggiunti gli anticorpi marcati con l'enzima. Dopo aver inserito il substrato appropriato, si sviluppa una reazione di viraggio di colore. L'ultima fase del processo è la misurazione spettrofotometrica. La metodica è comparabile in quanto a sensibilità e specificità alla metodica RIA (168).

#### 4.5 Melatonina ed epilessia

Evidenze sperimentali indicano che l'epifisi e la melatonina giocano un ruolo di primaria importanza sul controllo dell'eccitabilità corticale. Nonostante la ghiandola pituitaria e il suo secreto si siano dimostrati coinvolti non solo nel sonno, ma anche nell'epilessia, è difficile stabilire che parte recitino in questi due processi (169). La melatonina a basse concentrazioni ha un ruolo protettivo nei confronti nello sviluppo di crisi epilettiche, aumentando le concentrazioni corticali ed ipotalamiche di GABA (170); tuttavia, dosi elevate sembrano sortire gli effetti opposti (169). In ogni caso, i dati della letteratura sulle relazioni fra concentrazioni di melatonina ed epilessia sono controversi. Uno studio ha rilevato concentrazioni di melatonina nei pazienti con epilessia parziale complessa senza trattamento più elevate rispetto ai controlli, ed una delle ipotesi avanzate è che questo sia un tentativo del cervello di ridurre l'attività epilettiforme (171). D'altro canto, un altro studio ha evidenziato che pazienti con epilessia temporale senza trattamento mostravano livelli di melatonina bassi rispetto ai controlli (172). Un ulteriore studio ha evidenziato che i livelli di melatonina ed il ritmo circadiano non differiscono significativamente fra soggetti con epilessia parziale complessa diurna e notturna (173).

### 5 Scopo dello studio

Si tratta di uno studio osservazionale prospettico monocentrico, condotto presso la Clinica Neurologica, Dipartimento di Neuroscienze (DINO GMI), Università di Genova, IRCCS Ospedale Policlinico San Martino, Genova, Italia.

È ormai nota da anni la relazione bidirezionale tra epilessia e sonno. Infatti, il sonno, in particolare il sonno NREM, è una condizione predisponente le crisi epilettiche e



facilitante le anomalie epilettiformi. Inoltre, la deprivazione di sonno è uno dei più importanti fattori scatenanti le crisi epilettiche. Tuttavia, non è ancora chiaro se i pazienti affetti da epilessia sonno-relata abbiano delle specifiche modificazioni per quanto riguarda il ritmo circadiano, rispetto ai soggetti sani e rispetto ai pazienti con le crisi prevalentemente se non esclusivamente in veglia.

Scopo del presente studio è quello di studiare le caratteristiche circadiane di un gruppo di pazienti con epilessia sonno-relata, e di controntarle con un gruppo di controlli sani e con un gruppo di pazienti affetti da epilessia con crisi in veglia.

## 6 Materiali e metodi

### 6.1 Pazienti

Lo studio si prefigge di raccogliere prospettivamente 15 soggetti con diagnosi di SHE (gruppo A) di età compresa fra i 16 ed i 60 anni e di confrontarli con due gruppi di controllo di eguale grandezza e simili caratteristiche demografiche. Il primo include pazienti con epilessia focale non legata al sonno (gruppo B) e il secondo soggetti sani (gruppo C). La presenza di anomalie cerebrali sospette per epilessia sintomatica remota, incluso, ma non limitato a tumori cerebrali ed esisti cerebrovascolari costituirà un criterio di esclusione ( con l'eccezione di displasie corticali e sclerosi ippocampale). I controlli sani non dovranno presentare patologie neurologiche o psichiatriche di alcun tipo con particolare riferimento all'epilessia e ai disturbi del sonno. La terapia in corso, l'età di esordio dell'epilessia e le caratteristiche semeiologiche (se focale o generalizzata, con presenza/assenza di evoluzione bilaterale, se è presente la perdita di consapevolezza, se motoria o non motoria e la frequenza delle crisi al momento dell'arruolamento) verranno valutate in ogni paziente con diagnosi di epilessia.

### 6.2 Metodologia

Tutti i soggetti effettueranno la raccolta di 5 campioni di melatonina salivare per la determinazione del DLMO, un monitoraggio actigrafico di almeno 7 giorni consecutivi e compileranno i questionari del sonno *Pittsburg Sleep Quality Index* e *Morningness Eveningness Questionnaire* (MEQ) versione breve.

#### 6.2.1 Raccolta dei campioni salivari e dosaggio della melatonina

I cinque campioni salivari verranno prelevati uno ogni ora, partendo da tre ore prima dell'orario tipico di addormentamento. Il quarto coinciderà con il momento in cui il

soggetto si corica abitualmente e il quinto verrà prelevato un'ora più tardi. Ai soggetti in studio verrà raccomandato di evitare il consumo di caffè, di alcol e di aspettare almeno 30 minuti dopo aver mangiato prima di iniziare la raccolta. In ultimo verrà raccomandato loro di evitare di lavarsi i denti. Le raccomandazioni sono volte a evitare di fornire elementi confondenti nella quantificazione della melatonina. Successivamente i campioni vengono conservati fra i +2C° ed i +4C° fino al momento in cui vengono consegnati alla clinica neurologica, dove vengono pretrattati (centrifugati) e conservati a -20C° in attesa della fase di laboratorio.

In laboratorio i campioni vengono trattati con un apposito Kit ELISA competitivo diretto (*Bühlmann Industries*, codice prodotto *EK-EPI*).

In primo luogo viene applicato sulle piastre di microtitolazione l'anticorpo policlonale anti-melatonina provvisto con il kit . Dopo 16-20 ore di incubazione la melatonina presente nella saliva pretrattata, nei controlli e nei pozzetti nel calibratore viene messa a contatto con melatonina esogena biotinilata per 3 ore in modo da saturare i siti di legame disponibili per questo anticorpo altamente specifico. Successivamente è sciacquata la parte in eccesso. Dopo aver lavato il tutto, viene aggiunto l'enzima marcato streptavidina coniugata a perossidasi di rafano. Questo complesso si lega agli immunocomplessi biotina-melatonina rimasti adesi ai pozzetti dopo il lavaggio in un processo dalla durata di 60 minuti. L'enzima marcato in eccesso, e quindi la porzione non legata, viene sciacquata lavando i pozzetti. A questo punto è aggiunto il substrato TMB (*tetramethylbenzidine*), il quale innesca la reazione che porta alla formazione di un cromoforo, la cui quantità è inversamente proporzionale all'ammontare di melatonina presente nel campione. Dopo 30 minuti la reazione è giunta al termine e va fermata aggiungendo una soluzione acida che vira il colore da blu a giallo. Infine l'assorbanza dei campioni viene letta a 450nm entro 30 minuti da uno spettrofotometro. Da questo parametro si evince la quantità di melatonina presente nei campioni.

### 6.2.2 Studio actigrafico

Lo studio actigrafico deve essere protratto per almeno 7 giorni consecutivi. Lo strumento utilizzato è l'*ActTrust* fornito dalla ditta *Condor Instruments*. Tale dispositivo dispone di un accelerometro per lo studio del movimento, di un sensore per la temperatura cutanea e di un sensore per la luce. Inoltre, il paziente ha la possibilità di indicare il momento in cui si corica ed il momento in cui si alza dal letto

attraverso un apposito tasto posto sul dispositivo. Infine, durante i 7 giorni di monitoraggio actigrafico, i pazienti sono invitati a compilare un diario del sonno, per permettere di fare un confronto tra i dati oggettivi registrati dal dispositivo ed i dati soggettivi riportati dal paziente. Tutti i dati vengono utilizzati per calcolare i seguenti parametri: *Bed Time* (l'orario in cui il soggetto si corica a letto), *Get up Time* (l'orario in cui il soggetto si alza dal letto), *Time in Bed* (il tempo, in ore, passato a letto), *Total Sleep Time* (il tempo complessivo, in ore, in cui il soggetto studiato dorme durante una sessione di sonno), *Onset Latency* (il tempo in minuti che il soggetto impiega ad addormentarsi all'inizio di un periodo di sonno), *Sleep Efficiency* (la percentuale trascorsa dormendo rispetto al tempo totale in cui un paziente rimane a letto), *WASO* (*wake time after sleep onset*, ossia l'ammontare di tempo, in minuti, che il soggetto trascorre sveglio da quando si addormenta per la prima volta a quando passa definitivamente alla veglia e non cerca di tornare a dormire), *Awakenings* (numero di transizioni dal sonno alla veglia) e *CFI* (*circadian function index*, cioè un parametro compreso fra 0 e 1, che esprime la robustezza del ritmo circadiano (174)).

#### 6.2.2 *Pittsburgh Sleep Quality Index*

Il *Pittsburgh Sleep Quality Index* è un questionario di autovalutazione del sonno (175). Esplora il periodo di un mese e si compone di 19 *items* che danno luogo a 7 componenti principali: 1) qualità soggettiva del sonno, 2) latenza del sonno, 3) durata del sonno, 4) efficienza del abituale del sonno, 5) disturbi del sonno, 6) uso di farmaci per favorire il sonno, 7) disfunzione durante il giorno.

#### 6.2.4 *Morningness-eveningness questionnaire*, forma breve

Il *Morningness-eveningness questionnaire* è un questionario di autovalutazione del sonno che, nella sua forma breve, si compone di 19 *items* ad ognuno dei quali è affidato un punteggio. In base al totale il questionario si prefissa di stabilire se il soggetto in questione presenta un profilo “serotino”, “intermedio” o “mattutino” (176).

### 6.3 *Analisi statistica dei dati*

I dati di laboratorio dei campioni salivari contenenti la melatonina in pg/mL verranno registrati in una tabella e ordinati secondo la loro progressione cronologica dal primo al quinto. Nelle cinque misurazioni disponibili per ogni soggetto verrà identificato il DLMO, inteso come la misurazione in cui viene superato il valore soglia di 4pg/mL

(154). Successivamente le misurazioni saranno riarrangiate in modo tale essere centrate sul DLMO.

Fra i parametri actigrafici registrati verranno presi in considerazione i valori medi sui 7 giorni di monitoraggi di *Time in Bed*, *Total Sleep Time*, *Sleep Latency*, *Sleep Efficiency*, *WASO*, *Awakenings* e *Calculated CFI*. I valori sessagesimali verranno trasformati in decimali per agevolare i calcoli successivi. Verranno quindi annotati il dato minimo, quello massimo e calcolati media e deviazione standard. Le variabili continue saranno confrontate fra i gruppi mediante T test. Si considererà il dato statisticamente significativo quando  $p\text{-value}<0.05$ .

## 7 Risultati

Allo stato di avanzamento attuale del progetto il gruppo A consta di 9 soggetti, 4 maschi e 5 femmine, la cui età media è  $41.62 \pm 16.72$ . Di questi 7 si sono sottoposti allo studio actigrafico.

Il gruppo B non è attualmente presente.

Il gruppo C si compone di 11 soggetti, 8 maschi e 3 femmine e la loro età media è  $41.27 \pm 12.61$ . Di tutti e 11 sono disponibili i dati della melatonina derivati dai campioni salivari, mentre 4 di questi hanno portato a termine l'analisi actigrafica.

Nella tabella 1 sono riportate le principali caratteristiche demografiche e cliniche del gruppo A.

Mentre nella tabella 2 sono riportate le principali caratteristiche demografiche del gruppo C.

Tabella 1. Principali caratteristiche cliniche e demografiche dei 9 pazienti SHE del gruppo A.

<b>Maschi/Femmine</b>	4/5
<b>Età (media ± deviazione standard)</b>	41.62± 16.72
<b>Epoca di esordio della SHE</b>	
-adolescenza	4
-prima età adulta	2
-età adulta	2
-età adulto/avanzata	1
<b>Terapia:</b>	
-levetiracetam	6
-carbamazepina	1
-valproato	1
-carbamazepina+ peramamel	1
<b>Tipo di epilessia:</b>	
-focale	5
-non noto	4
<b>-evoluzione bilaterale (sì)</b>	8
<b>Perdita di contatto (sì)</b>	7
<b>Motoria (sì)</b>	8
<b>Frequenza crisi:</b>	
<i>seizure-free</i>	3
rare	4
mensili	2
quotidiane	1

Tabella 2. Principali caratteristiche demografiche degli 11 soggetti sani del gruppo C

<b>Maschi/Femmine</b>	8/3
<b>Età (media ± deviazione standard)</b>	41.27±12.61

## 7.1 Melatonina

Nella tabella 3 sono raccolte le concentrazioni della melatonina in pg/mL del gruppo C in ordine cronologico di raccolta. La figura 1 è la rappresentazione box-plot dei dati della tabella 3.

Tabella 3: concentrazione di melatonina nei campioni provenienti dal gruppo C.  
Tutti i dati sono espressi in pg/mL.

Gruppo C	Time 1	Time 2	Time 3	Time 4	Time 5
1	1.19	0.96	1.94	14.97	22.80
2	0.33	1.33	4.59	9.55	8.92
3	0.01	2.93	4.33	9.12	19.16
4	0.88	1.49	7.27	5.00	6.80
5	2.43	2.03	2.89	3.75	6.54
6	0.78	1.89	2.75	3.94	4.52
7	0.71	0.63	1.16	7.69	14.26
8	11.01	17.68	16.04	16.22	20.22
9	1.10	1.18	1.20	8.42	34.01
10	18.37	17.48	17.48	25.01	23.99
11	1.52	7.12	19.44	22.03	23.31
<b>Media</b>	3.48	4.97	7.19	11.43	16.78
<b>Deviazione Standard</b>	5.81	6.48	6.98	7.22	9.32

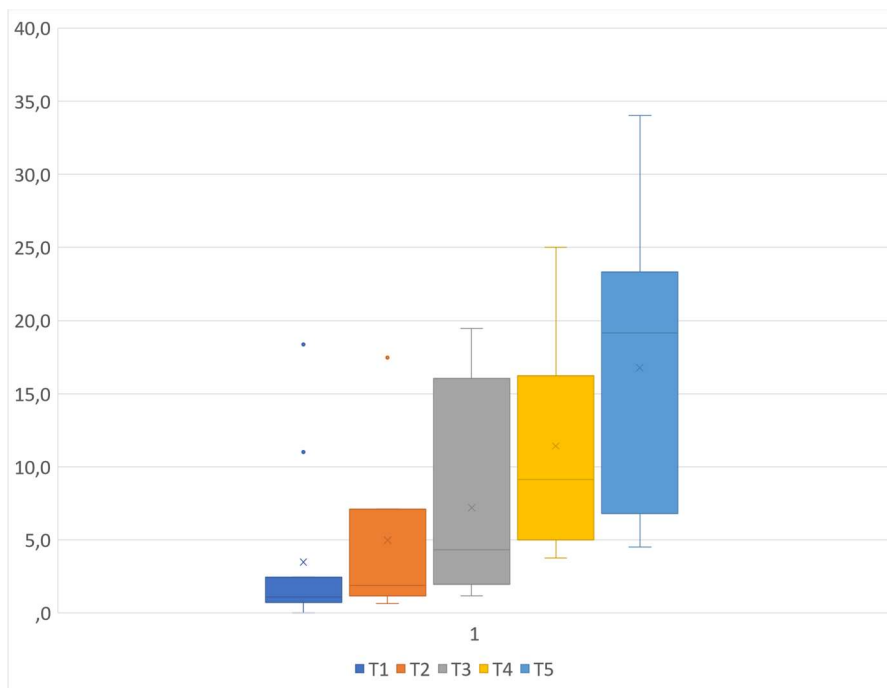


Figura 1: grafico box plot delle concentrazioni di melatonina (pg/mL) nei controlli in ordine cronologico di raccolta

### 7.1.1 Risultati dell'analisi statistica preliminare

Per ogni soggetto del gruppo C preso in esame è stato prima identificato il DLMO, inteso come il campione in cui la concentrazione di melatonina supera i 4 pg/mL, poi i valori delle misurazioni sono stati allineati su questo valore (tabella 4).

La figura 2 è il grafico box-plot della tabella 4.

Tabella 4: determinazione del DLMO nei controlli sani del gruppo C

Gruppo C	Time -4	Time -3	Time -2	Time -1	DLMO	Time 1	Time 2	Time 3	Time 4
1		1.19	0.96	1.94	14.97	22.80			
2			0.33	1.33	4.59	9.55	8.92		
3			0.01	2.93	4.33	9.12	19.16		
4			0.88	1.49	7.27	5.00	6.80		
5	2.43	2.03	2.89	3.75	6.54				
6	0.78	1.89	2.75	3.94	4.52				
7		0.71	0.63	1.16	7.69	14.26			
8					11.01	17.68	16.04	16.22	20.22
9		1.10	1.18	1.20	8.42	34.01			
10					18.37	17.48	17.48	25.01	23.99
11				1.52	7.12	19.44	22.03	23.31	
Media	1.61	1.38	1.20	2.14	8.62	16.59	15.07	21.51	22.11
Deviazione Standard	1.17	0.56	1.06	1.11	4.49	8.64	5.97	4.66	2.67

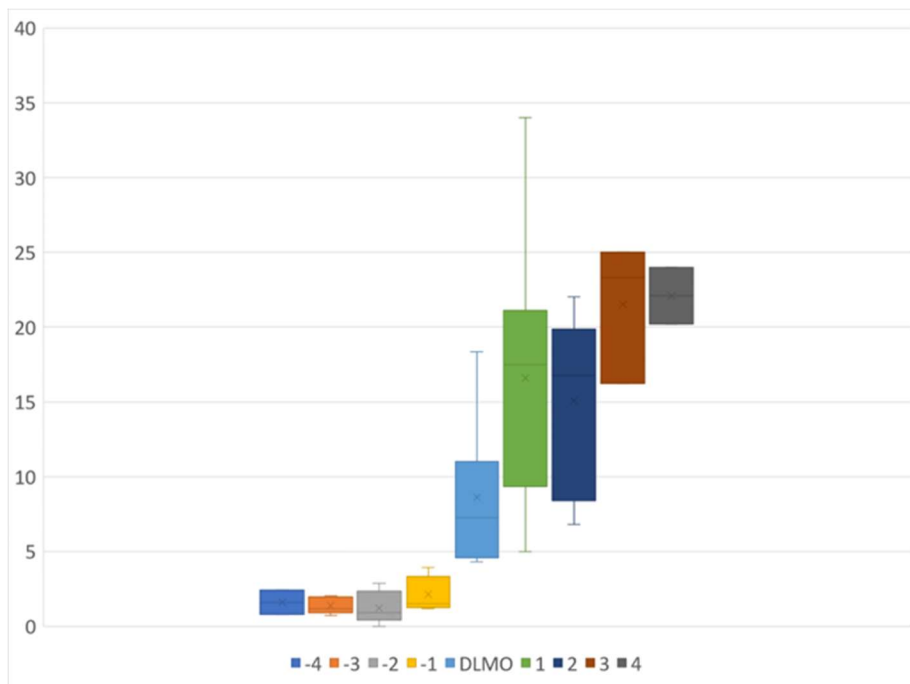


Figura 2: grafico box plot del DLMO dei controlli sani del gruppo C



## 7.2 Actigrafia

Nella tabella 5 sono riportati i parametri actigrafici dei pazienti SHE e dei controlli.

Tabella 5: parametri actigrafici del gruppo A, del gruppo C e comparazione statistica dei dati.  
NB: i valori sessagesimali sono stati trasformati in decimali

	Gruppo A				Gruppo C				P value
Parametri actigrafici:	Media	Deviazione Standard	Massimo	Minimo	Media	Deviazione Standard	Massimo	Minimo	
<i>Time in bed</i>	8.12	0.90	9.21	6.93	7.52	1.13	8.51	6.10	0.18
<i>Total sleep time</i>	7.05	0.72	7.98	6.32	7.01	0.96	7.77	5.77	0.47
<i>Sleep latency</i>	24.29	14.78	50.28	7.33	2.29	1.88	5.10	1.17	0.009
<i>Sleep efficiency</i>	87.00	5.12	92.80	77.92	93.25	1.18	94.93	91.82	0.021
<i>WASO</i>	36.19	23.30	75.62	9.28	25.84	9.23	33.42	14.10	0.21
<i>Awakenings</i>	8.12	5.21	16.14	3.00	6.33	1.76	8.86	4.78	0.26
<i>Calculated CFI</i>	0.71	0.08	0.82	0.58	0.80	0.02	0.82	0.79	0.035

### 7.2.1 Risultati dell'analisi statistica preliminare

Dall'analisi preliminare emerge che il gruppo A, rispetto al gruppo C ha *sleep latency* più elevata con un *p value* di 0.009, *sleep efficiency* minore con un *p value* di 0.021, e *CFI* minore con un *p-value* di 0.035.

## 8 Discussione

Nell'analisi preliminare del presente studio abbiamo analizzato il ritmo circadiano di un gruppo di pazienti consecutivi con diagnosi di SHE e ne abbiamo confrontato i dati con un gruppo di soggetti sani. Lo studio nella sua interezza prevede di includere anche pazienti affetti da epilessia con crisi in veglia come ulteriore gruppo di controllo e di raggiungere in tutti e tre i gruppi di studio un campione di 15 soggetti.

Dalla comparazione dei dati actigrafici dei pazienti SHE e dei controlli sani è emerso che i pazienti SHE hanno una qualità del sonno peggiore della controparte sana in particolare mostrando una ridotta *sleep efficiency* ed una aumentata *sleep latency*.

È ormai nota la relazione bidirezionale fra sonno ed epilessia in cui le due condizioni si influenzano a vicenda. Si sa anche da molto tempo che le suddette relazioni

cambiano a seconda dell'entità nosologica considerata all'interno delle epilessie stesse. Molteplici studi hanno riscontrato disturbi della struttura del sonno in diverse tipologie di pazienti epilettici, fra cui i pazienti JME (*Juvenile Myoclonic Epilepsy*) e quei pazienti che seguono uno stato epilettico generalizzato e convulsivo (177,178). I disturbi del sonno riscontrabili nei pazienti con epilessia sono eterogenei inclusi aumentata *sleep onset*, aumentato numero di *awakenings* e un più elevato *WASO*, diminuita *sleep efficiency*, complessi K anomali e diminuito o frammentato sonno REM (179). Tuttavia, dati precisi in merito riguardanti la SHE mancano in letteratura. Una maggiore *sleep latency* è l'unica evidente alterazione della macrostruttura del sonno riportata nello spettro delle epilessie benigne con spikes ad origine centro-temporale (180).

Uno studio effettuato su pazienti con epilessia temporale con crisi prevalentemente in veglia e studiati con una metodica video EEG ha dimostrato non solo che la struttura del sonno cambia dopo una crisi, ma anche che l'entità della disregolazione dipende dal momento del ciclo sonno-veglia in cui occorre. Infatti, i pazienti dopo una crisi in veglia dimostrano una diminuzione del sonno REM rispetto al loro basale e dopo una crisi nel sonno la diminuzione della fase REM si fa più pronunciata a favore dello stadio 1, mentre, contestualmente, diminuisce la *sleep efficiency* (181). Questo dato suggerisce che le crisi in sonno determinino conseguenze diverse, probabilmente più importanti, sul normale ciclo sonno-veglia.

I dati actigrafici dei pazienti affetti da epilessia, in particolare nelle SHE, sono ancora limitati in letteratura. Esiste un case report in cui si propone il monitoraggio actigrafico come metodica di controllo aggiuntiva per registrare le crisi a domicilio nelle SHE, ma in cui non viene preso in considerazione lo studio del sonno in sé stesso né la comparazione di questi dati con soggetti sani (182). Pertanto il presente lavoro è uno dei primi a valutare i dati sopra menzionati in questo ambito, sfruttando le tecnologie ad oggi disponibili, ed offre interessanti spunti sulla comprensione della sindrome SHE nella sua globalità. Se successivamente confermati, questi dati potrebbero aggiungere un ulteriore tassello alla comprensione della sindrome SHE. Infatti, si potrebbero definire le alterazioni della struttura del sonno come parte integrante della patologia, come già precedentemente suggerito da altri Autori (5,10). Dall'analisi statistica dei dati ottenuti mediante analisi actigrafica emerge anche una differenza significativa del *CFI* tra pazienti SHE e controlli sani. Il *CFI* è un dato derivato dal *TAP* (acronimo di *Thermometry, Actimetry and Body Position*),

parametro recentemente messo a punto, agilmente ottenibile mediante l'attrezzatura actigrafica. Il suo obiettivo è investigare lo stato del sistema circadiano in maniera non invasiva (174). La sua accuratezza rispetto ad altre metodiche è incoraggiante e potrebbe rappresentare un metodo aggiuntivo di studio non invasivo anche in questa categoria di pazienti. Inoltre, nonostante più volte teorizzate in altre tipologie di epilessia, le alterazioni della robustezza del ritmo circadiano non sono state ancora dimostrate nei pazienti SHE tramite questa tecnica (183). I dati preliminari del presente studio sembrano suggerire che, in effetti, i pazienti affetti da SHE abbiano un ritmo circadiano alterato rispetto ai controlli sani.

Il dosaggio della melatonina e la determinazione del DLMO rappresentano una metodica di rilevazione affidabile e robusta per la valutazione del ritmo circadiano in soggetti sani. Le concentrazioni di melatonina aumentano nelle ore serali in risposta alla diminuzione della intensità luminosa dell'ambiente.

I dati del presente studio sono in accordo con tale riscontro. La curva di secrezione della melatonina fisiologicamente non presenta una crescita lineare, ma al venir meno della luce intensa, mostra un repentino aumento di concentrazioni, in particolare intorno alla soglia dei 4pg/mL, dato che rappresenta il DLMO. Dai dati grezzi raccolti nel presente studio la tendenza appena descritta non è immediatamente identificabile. Tuttavia l'andamento diventa più chiaro quando è stato determinato per ogni soggetto il DLMO e le misurazioni di ogni partecipante allo studio sono state centrate su questo parametro. In tal modo, anche nel presente lavoro, la curva di secrezione della melatonina si contraddistingue per il brusco aumento delle concentrazioni al passaggio fra luce intensa e buio nel pieno rispetto delle dinamiche fisiologiche precedentemente valutate altrove (154). I dati preliminari del presente studio confermano che il dosaggio della melatonina salivare può essere un valido strumento per quantificare il ritmo circadiano. Sarà pertanto interessante osservare i risultati di questa metodica nei pazienti affetti da SHE e nei pazienti con epilessia in veglia.

Uno studio precedente ha comparato l'andamento circadiano della secrezione di melatonina nei pazienti con crisi parziali complesse ad esordio diurno e notturno con controlli sani, giungendo alla conclusione che i livelli di melatonina alle ore 10.00 A.M. risultano statisticamente più bassi nei pazienti rispetto ai controlli, inserendosi nel filone di pensiero che vede minori livelli di melatonina nei soggetti epilettici rispetto ai soggetti senza patologie neurologiche. Tuttavia, non sono state rilevate differenze fra pazienti con epilessia notturna e pazienti con epilessia diurna (184). C'è

da sottolineare che si tratta di uno studio ormai datato (quasi venti anni fa), la misurazione della melatonina era stata fatta su sangue e le curve della melatonina non erano state allineate utilizzando il DLMO. Pertanto, sono necessari ulteriori studi per valutare la secrezione di melatonina nei pazienti con epilessia sonno-relata.

Nelle epilessie generalizzate idopatiche si riscontra un avanzamento di fase del ritmo circadiano, determinato sulla base della curva di secrezione della melatonina e sul DLMO indipendentemente dal fatto che le crisi abbiano esordio nel sonno o in veglia (185). Anche in questo studio, però, non sono presenti pazienti con epilessia sonno-relata.

Nei soggetti pediatrici con punte ed onde continue durante il sonno i livelli di melatonina alle 09.00 A.M. sono statisticamente più bassi rispetto ai soggetti epilettici senza anomalie epilettiformi nel sonno e rispetto ai controlli sani (186). È degno di nota che, nonostante non fosse stata raggiunta nello studio in questione la significatività statistica, anche la melatonina dei soggetti epilettici era più bassa dei controlli sani. Anche questo studio suggerisce che la valutazione delle curve della melatonina nei pazienti affetti da epilessia sonno-relata potrebbe fornire informazioni importanti per una migliore comprensione della patologia.

Tuttavia, sono necessari ancora studi per valutare le curve di secrezione di melatonina nei soggetti adulti affetti da epilessia sonno-relata.

### 8.1 Limitazioni

Il presente lavoro ha alcuni limiti.

La limitazione principale della tesi è il ristretto numero di soggetti (7 casi e 11 controlli). Tuttavia, si tratta di dati preliminari di un progetto ancora in corso d'opera che, per la bassa prevalenza della patologia oggetto di studio, richiede diversi anni per completare la fase di raccolta dati. Sempre per le stesse ragioni ancora non è presente il gruppo B e non si è riusciti a comparare l'andamento della secrezione della melatonina dei casi del gruppo A con i controlli del gruppo C. Inoltre, per quanto omogenei per età, i gruppi A e C non lo sono per sesso.

Infine, non sono ancora presenti i risultati dei questionari di valutazione del sonno, che potrebbero fornire una valutazione utile, per quanto soggettiva, di autovalutazione della qualità del sonno da correlare con i dati actigrafici.

Tuttavia, nonostante i limiti sopra esposti e la natura preliminare del presente studio, i risultati ottenuti sono incoraggianti e confermano l'importanza di studiare e

quantificare oggettivamente il sonno ed in particolare il ritmo circadiano nei pazienti affetti da epilessia sonno-relata.

1. Tinuper P, Bisulli F, Cross JH, Hesdorffer D, Kahane P, Nobili L, et al. Definition and diagnostic criteria of sleep-related hypermotor epilepsy. *Neurology*. 2016 May 10;86(19):1834–42. Available from: <https://moh-it.pure.elsevier.com/en/publications/definition-and-diagnostic-criteria-of-sleep-related-hypermotor-ep>
2. Scheffer IE, Berkovic SF, Bhatia KP, Fish DR, Marsden CD, Lopes-Cendes I, et al. Autosomal dominant frontal epilepsy misdiagnosed as sleep disorder. *Lancet*. 1994 Feb 26;343(8896):515–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7906762/>
3. Oldani A, Zucconi M, Asselta R, Modugno M, Bonati MT, Dalprà L, et al. Autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. A video-polysomnographic and genetic appraisal of 40 patients and delineation of the epileptic syndrome. *Brain*. 1998 Feb;121(2):205–23.
4. Bisulli F, Vignatelli L, Naldi I, Pittau F, Provini F, Plazzi G, et al. Diagnostic accuracy of a structured interview for nocturnal frontal lobe epilepsy (SINFLE): A proposal for developing diagnostic criteria. *Sleep Medicine*. 2012 Jan;13(1):81–7. Available from: <https://moh-it.pure.elsevier.com/en/publications/diagnostic-accuracy-of-a-structured-interview-for-nocturnal-front>
5. Zucconi M, Oldani A, Smirne S, Ferini-Strambi L. The macrostructure and microstructure of sleep in patients with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *J Clin Neurophysiol*. 2000;17(1):77–86. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10709813/>
6. Durmer JS, Dinges DF. Neurocognitive consequences of sleep deprivation. *Seminars in Neurology*. 2005 Mar;25(1):117–29.
7. Killgore WDS. Effects of sleep deprivation on cognition. *Prog Brain Res*. 2010;185(C):105–29. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21075236/>
8. Kotagal P. The relationship between sleep and epilepsy. *Seminars in Pediatric Neurology*. 2001 Dec 1;8(4):241–50.
9. Epilepsy and other chronic convulsive diseases : their causes, symptoms & treatment : Gowers, W. R. (William Richard), 1845-1915 : Free Download, Borrow, and Streaming : Internet Archive. Available from: <https://archive.org/details/100954847.nlm.nih.gov>

10. Parrino L, de Paolis F, Milioli G, Gioi G, Grassi A, Riccardi S, et al. Distinctive polysomnographic traits in nocturnal frontal lobe epilepsy. *Epilepsia*. 2012 Jul;53(7):1178–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22578113/>
11. Yaqub BA, Waheed G, Kabiraj MMU. Nocturnal epilepsies in adults. *Seizure*. 1997;6(2):145–9.
12. Derry CP, Duncan S. Sleep and epilepsy. *Epilepsy Behav*. 2013 Mar;26(3):394–404. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23465654/>
13. Provini F, Plazzi G, Tinuper P, Vandi S, Lugaresi E, Montagna P. Nocturnal frontal lobe epilepsy. A clinical and polygraphic overview of 100 consecutive cases. *Brain*. 1999 Jun;122 ( Pt 6)(6):1017–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10356056/>
14. Weinstock A, Giglio P, Kerr SL, Duffner PK, Cohen ME. Hyperkinetic seizures in children. *Journal of Child Neurology* [Internet]. 2003 Jul 2;18(8):517–24. Available from: <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/08830738030180080801>
15. Vignatelli L, Bisulli F, Giovannini G, Licchetta L, Naldi I, Mostacci B, et al. Prevalence of Nocturnal Frontal Lobe Epilepsy in the Adult Population of Bologna and Modena, Emilia-Romagna Region, Italy. *Sleep*. 2015 Mar 1;38(3):479. Available from: </pmc/articles/PMC4335531/>
16. Wang X, Marcuse L v., Jin L, Zhang Y, Zhang W, Chen B, et al. Sleep-related hypermotor epilepsy activated by rapid eye movement sleep. *Epileptic Disorders*. 2018 Feb 1;20(1):65–9.
17. Gibbs SA, Proserpio P, Francione S, Mai R, Cardinale F, Sartori I, et al. Clinical features of sleep-related hypermotor epilepsy in relation to the seizure-onset zone: A review of 135 surgically treated cases. *Epilepsia*. 2019 Apr 1;60(4):707–17.
18. Bonini F, McGonigal A, Trébuchon A, Gavaret M, Bartolomei F, Giusiano B, et al. Frontal lobe seizures: from clinical semiology to localization. *Epilepsia*. 2014 Feb;55(2):264–77. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24372328/>
19. Nobili L, Francione S, Mai R, Cardinale F, Castana L, Tassi L, et al. Surgical treatment of drug-resistant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Brain*. 2007

- Feb;130(Pt 2):561–73. Available from:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17124189/>
20. Rheims S, Ryvlin P, Scherer C, Minotti L, Hoffmann D, Guenot M, et al. Analysis of clinical patterns and underlying epileptogenic zones of hypermotor seizures. *Epilepsia* [Internet]. 2008 Dec;49(12):2030–40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18503559/>
  21. Proserpio P, Cossu M, Francione S, Tassi L, Mai R, Didato G, et al. Insular-opercular seizures manifesting with sleep-related paroxysmal motor behaviors: a stereo-EEG study. *Epilepsia*. 2011 Oct;52(10):1781–91. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21883183/>
  22. Ryvlin P, Minotti L, Demarquay G, Hirsch E, Arzimanoglou A, Hoffman D, et al. Nocturnal hypermotor seizures, suggesting frontal lobe epilepsy, can originate in the insula. *Epilepsia*. 2006 Apr;47(4):755–65. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16650142/>
  23. Nobili L, Cossu M, Mai R, Tassi L, Cardinale F, Castana L, et al. Sleep-related hyperkinetic seizures of temporal lobe origin. *Neurology*. 2004 Feb 10;62(3):482–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14872038/>
  24. Montavont A, Kahane P, Catenoix H, Ostrowsky-Coste K, Isnard J, Guénot M, et al. Hypermotor seizures in lateral and mesial parietal epilepsy. *Epilepsy Behav*. 2013 Sep;28(3):408–12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23872083/>
  25. Tassinari CA, Cantalupo G, Högl B, Cortelli P, Tassi L, Francione S, et al. Neuroethological approach to frontolimbic epileptic seizures and parasomnias: The same central pattern generators for the same behaviours. *Rev Neurol (Paris)*. 2009 Oct;165(10):762–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19733874/>
  26. Gibbs SA, Proserpio P, Terzaghi M, Pigorini A, Sarasso S, lo Russo G, et al. Sleep-related epileptic behaviors and non-REM-related parasomnias: Insights from stereo-EEG. Vol. 25, *Sleep Medicine Reviews*. W.B. Saunders Ltd; 2016. p. 4–20.
  27. Derry CP, Harvey AS, Walker MC, Duncan JS, Berkovic SF. NREM arousal parasomnias and their distinction from nocturnal frontal lobe epilepsy: a video EEG analysis. *Sleep*. 2009 Dec 1;32(12):1637–44. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20041600/>



28. Licchetta L, Bisulli F, Vignatelli L, Zenesini C, di Vito L, Mostacci B, et al. Sleep-related hypermotor epilepsy: Long-term outcome in a large cohort. *Neurology*. 2017 Jan 3;88(1):70–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27881627/>
29. Kurahashi H, Hirose S. Autosomal Dominant Nocturnal Frontal Lobe Epilepsy. *GeneReviews®*. 2018 Mar 15; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1169/>
30. Steinlein OK, Mulley JC, Propping P, Wallace RH, Phillips HA, Sutherland GR, et al. A missense mutation in the neuronal nicotinic acetylcholine receptor alpha 4 subunit is associated with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Nat Genet*. 1995;11(2):201–3. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7550350/>
31. Heron SE, Smith KR, Bahlo M, Nobili L, Kahana E, Licchetta L, et al. Missense mutations in the sodium-gated potassium channel gene *KCNT1* cause severe autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Nat Genet*. 2012 Nov;44(11):1188–90. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23086396/>
32. Picard F, Makrythanasis P, Navarro V, Ishida S, de Bellescize J, Ville D, et al. *DEPDC5* mutations in families presenting as autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Neurology*. 2014 Jun 10;82(23):2101–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24814846/>
33. Ricos MG, Hodgson BL, Pippucci T, Saidin A, Ong YS, Heron SE, et al. Mutations in the mammalian target of rapamycin pathway regulators *NPRL2* and *NPRL3* cause focal epilepsy. *Ann Neurol*. 2016 Jan 1; 79(1):120–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26505888/>
34. Li P, Fu X, Smith NA, Ziobro J, Curiel J, Tenga MJ, et al. Loss of *CLOCK* Results in Dysfunction of Brain Circuits Underlying Focal Epilepsy. *Neuron*. 2017 Oct 11;96(2):387–401.e6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29024662/>
35. Becchetti A, Grandi LC, Colombo G, Meneghini S, Amadeo A. Nicotinic receptors in sleep-related hypermotor epilepsy: Pathophysiology and pharmacology. Vol. 10, *Brain Sciences*. MDPI AG; 2020. p. 1–20.
36. Phillips HA, Favre I, Kirkpatrick M, Zuberi SM, Goudie D, Heron SE, et al. *CHRNA2* is the second acetylcholine receptor subunit associated with

- autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Am J Hum Genet.* 2001;68(1):225–31. Available from:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11104662/>
37. Picard F, Bruel D, Servent D, Saba W, Fruchart-Gaillard C, Schöllhorn-Peyronneau MA, et al. Alteration of the in vivo nicotinic receptor density in ADNFLE patients: a PET study. *Brain.* 2006 Aug;129(Pt 8):2047–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16815873/>
  38. Klaassen A, Glykys J, Maguire J, Labarca C, Mody I, Boulter J. Seizures and enhanced cortical GABAergic inhibition in two mouse models of human autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Dec 12;103(50):19152–7. Available from:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17146052/>
  39. Aridon P, Marini C, Resta C di, Brilli E, de Fusco M, Politi F, et al. Increased sensitivity of the neuronal nicotinic receptor alpha 2 subunit causes familial epilepsy with nocturnal wandering and ictal fear. *Am J Hum Genet.* 2006;79(2):342–50. Available from:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16826524/>
  40. Villa C, Colombo G, Meneghini S, Gotti C, Moretti M, Ferini-Strambi L, et al. CHRNA2 and Nocturnal Frontal Lobe Epilepsy: Identification and Characterization of a Novel Loss of Function Mutation. *Front Mol Neurosci.* 2019 Feb 1; 12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30809122/>
  41. Derry CP, Heron SE, Phillips F, Howell S, MacMahon J, Phillips HA, et al. Severe autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy associated with psychiatric disorders and intellectual disability. *Epilepsia.* 2008 Dec;49(12):2125–9. Available from:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18479385/>
  42. Lim CX, Ricos MG, Dibbens LM, Heron SE. KCNT1 mutations in seizure disorders: the phenotypic spectrum and functional effects. *J Med Genet.* 2016 Jan 6;53(4):217–25. Available from:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26740507/>
  43. Rubboli G, Plazzi G, Picard F, Nobili L, Hirsch E, Chelly J, et al. Mild malformations of cortical development in sleep-related hypermotor epilepsy due to KCNT1 mutations. *Ann Clin Transl Neurol.* 2018 Feb ;6(2):386–91. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30847371/>

44. Bar-Peled L, Chantranupong L, Cherniack AD, Chen WW, Ottina KA, Grabiner BC, et al. A Tumor suppressor complex with GAP activity for the Rag GTPases that signal amino acid sufficiency to mTORC1. *Science*. 2013 May 31;340(6136):1100–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23723238/>
45. Curatolo P, Moavero R, Roberto D, Graziola F. Genotype/Phenotype Correlations in Tuberous Sclerosis Complex. *Semin Pediatr Neurol*. 2015 Dec 1;22(4):259–73. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26706013/>
46. Chassoux F, Landré E, Mellerio C, Turak B, Mann MW, Daumas-Duport C, et al. Type II focal cortical dysplasia: electroclinical phenotype and surgical outcome related to imaging. *Epilepsia*. 2012 Feb;53(2):349–58. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22221288/>
47. Nobili Y, Cardinale F, Magliola Z, Cicolin Z, Didato Y, Bramerio X, et al. Taylor’s focal cortical dysplasia increases the risk of sleep-related epilepsy. Available from: <http://www.R-project.org>].
48. Hurd MW, Ralph MR. The significance of circadian organization for longevity in the golden hamster. *J Biol Rhythms*. 1998 13(5):430–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9783234/>
49. Ouyang Y, Andersson CR, Kondo T, Golden SS, Johnson CH. Resonating circadian clocks enhance fitness in cyanobacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Jul 21;95(15):8660–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9671734/>
50. Pittendrigh CS, Minis DH. Circadian systems: longevity as a function of circadian resonance in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1972;69(6):1537–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4624759/>
51. Young MW, Kay SA. Time zones: a comparative genetics of circadian clocks. *Nat Rev Genet*. 2001 Sep;2(9):702–15. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11533719/>
52. Sehgal A. Physiology Flies with Time. *Cell*. 2017 Nov;171(6):1232–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29195066/>

53. Roenneberg T, Mellow M. The Circadian Clock and Human Health. *Curr Biol*. 2016 May 23;26(10):R432–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27218855/>
54. Zhang R, Lahens NF, Ballance HI, Hughes ME, Hogenesch JB. A circadian gene expression atlas in mammals: implications for biology and medicine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Nov 11;111(45):16219–24. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25349387/>
55. Allada R, White NE, So WV, Hall JC, Rosbash M. A mutant *Drosophila* homolog of mammalian Clock disrupts circadian rhythms and transcription of period and timeless. *Cell*. 1998 May 29;93(5):791–804. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9630223/>
56. Cyran SA, Buchsbaum AM, Reddy KL, Lin MC, Glossop NRJ, Hardin PE, et al. vrille, Pdp1, and dClock form a second feedback loop in the *Drosophila* circadian clock. *Cell*. 2003 Feb 7;112(3):329–41. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12581523/>
57. van der Horst GTJ, Muijtjens M, Kobayashi K, Takano R, Kanno SI, Takao M, et al. Mammalian Cry1 and Cry2 are essential for maintenance of circadian rhythms. *Nature*. 1999 Apr 15;398(6728):627–30. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10217146/>
58. Sato TK, Panda S, Miraglia LJ, Reyes TM, Rudic RD, McNamara P, et al. A functional genomics strategy reveals Rora as a component of the mammalian circadian clock. *Neuron*. 2004 Aug 19;43(4):527–37. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15312651/>
59. Goriki A, Hatanaka F, Myung J, Kim JK, Yoritaka T, Tanoue S, et al. A novel protein, CHRONO, functions as a core component of the mammalian circadian clock. *PLoS Biol*. 2014;12(4). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24736997/>
60. Mure LS, Le HD, Benegiamo G, Chang MW, Rios L, Jillani N, et al. Diurnal transcriptome atlas of a primate across major neural and peripheral tissues. *Science*. 2018 Mar 16;359(6381). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29439024/>
61. Gachon F, Fonjallaz P, Damiola F, Gos P, Kodama T, Zakany J, et al. The loss of circadian PAR bZip transcription factors results in epilepsy. *Genes*

- Dev. 2004 Jun 15;18(12):1397–412. Available from:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15175240/>
62. Michael AK, Harvey SL, Sammons PJ, Anderson AP, Kopalle HM, Banham AH, et al. Cancer/Testis Antigen PASD1 Silences the Circadian Clock. *Mol Cell*. 2015 Nov 23;58(5):743–54. Available from:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25936801/>
63. Koike N, Yoo SH, Huang HC, Kumar V, Lee C, Kim TK, et al. Transcriptional architecture and chromatin landscape of the core circadian clock in mammals. *Science*. 2012 Oct 19;338(6105):349–54. Available from:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22936566/>
64. Kim YH, Marhon SA, Zhang Y, Steger DJ, Won KJ, Lazar MA. Rev-erba dynamically modulates chromatin looping to control circadian gene transcription. *Science*. 2018 Mar 16;359(6381):1274–7. Available from:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29439026/>
65. Fustin JM, Doi M, Yamaguchi Y, Hida H, Nishimura S, Yoshida M, et al. RNA-methylation-dependent RNA processing controls the speed of the circadian clock. *Cell*. 2013 Nov 7;155(4):793. Available from:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24209618/>
66. Eide EJ, Woolf MF, Kang H, Woolf P, Hurst W, Camacho F, et al. Control of mammalian circadian rhythm by CKIepsilon-regulated proteasome-mediated PER2 degradation. *Mol Cell Biol*. 2005 Apr;25(7):2795–807. Available from:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15767683/>
67. Sahar S, Zocchi L, Kinoshita C, Borrelli E, Sassone-Corsi P. Regulation of BMAL1 protein stability and circadian function by GSK3beta-mediated phosphorylation. *PLoS One*. 2010 Jan ;5(1). Available from:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20049328/>
68. Tamaru T, Hirayama J, Isojima Y, Nagai K, Norioka S, Takamatsu K, et al. CK2alpha phosphorylates BMAL1 to regulate the mammalian clock. *Nat Struct Mol Biol*. 2009 Apr;16(4):446–8. Available from:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19330005/>
69. Cardone L, Hirayama J, Giordano F, Tamaru T, Palvimo JJ, Sassone-Corsi P. Circadian clock control by SUMOylation of BMAL1. *Science*. 2005 Aug 26;309(5739):1390–4. Available from:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16109848/>

70. Hirayama J, Sahar S, Grimaldi B, Tamaru T, Takamatsu K, Nakahata Y, et al. CLOCK-mediated acetylation of BMAL1 controls circadian function. *Nature*. 2007 Dec 13;450(7172):1086–90. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18075593/>
71. Aryal RP, Kwak PB, Tamayo AG, Gebert M, Chiu PL, Walz T, et al. Macromolecular Assemblies of the Mammalian Circadian Clock. *Mol Cell*. 2017 Sep 7;67(5):770–782.e6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28886335/>
72. Patke A, Young MW, Axelrod S. Molecular mechanisms and physiological importance of circadian rhythms. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2020 Feb 1;21(2):67–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31768006/>
73. Ralph MR, Foster RG, Davis FC, Menaker M. Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science*. 1990;247(4945):975–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2305266/>
74. Schibler U, Gotic I, Saini C, Gos P, Curie T, Emmenegger Y, et al. Clock-Talk: Interactions between Central and Peripheral Circadian Oscillators in Mammals. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2015;80:223–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26683231/>
75. Hastings MH, Maywood ES, Brancaccio M. Generation of circadian rhythms in the suprachiasmatic nucleus. *Nat Rev Neurosci*. 2018 Aug 1;19(8):453–69. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29934559/>
76. Brancaccio M, Edwards MD, Patton AP, Smyllie NJ, Chesham JE, Maywood ES, et al. Cell-autonomous clock of astrocytes drives circadian behavior in mammals. *Science*. 2019 Jan 11;363(6423):187–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30630934/>
77. Balsalobre A, Damiola F, Schibler U. A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell*. 1998 Jun 12;93(6):929–37. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9635423/>
78. Paulose JK, Rucker EB, Cassone VM. Toward the beginning of time: circadian rhythms in metabolism precede rhythms in clock gene expression in mouse embryonic stem cells. *PLoS One*. 2012 Nov 14;7(11). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23155474/>
79. Yoo SH, Yamazaki S, Lowrey PL, Shimomura K, Ko CH, Buhr ED, et al. PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals

- persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004 Apr 13;101(15):5339–46. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14963227/>
80. McDearmon EL, Patel KN, Ko CH, Walisser JA, Schook AC, Chong JL, et al. Dissecting the functions of the mammalian clock protein BMAL1 by tissue-specific rescue in mice. *Science*. 2006 Nov 24 ;314(5803):1304–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17124323/>
  81. Hughes S, Jagannath A, Hankins MW, Foster RG, Peirson SN. Photic regulation of clock systems. *Methods Enzymol*. 2015;552:125–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25707275/>
  82. Buhr ED, Yoo SH, Takahashi JS. Temperature as a universal resetting cue for mammalian circadian oscillators. *Science*. 2010 Oct;330(6002):379–85. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20947768/>
  83. Tamaru T, Hattori M, Honda K, Benjamin I, Ozawa T, Takamatsu K. Synchronization of circadian *Per2* rhythms and HSF1-BMAL1:CLOCK interaction in mouse fibroblasts after short-term heat shock pulse. *PLoS One*. 2011;6(9). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21915348/>
  84. Wolff G, Esser KA. Scheduled exercise phase shifts the circadian clock in skeletal muscle. *Med Sci Sports Exerc*. 2012 Sep;44(9):1663–70. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22460470/>
  85. Kornmann B, Schaad O, Bujard H, Takahashi JS, Schibler U. System-driven and oscillator-dependent circadian transcription in mice with a conditionally active liver clock. *PLoS Biol*. 2007 Feb;5(2):0179–89. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17298173/>
  86. Stokkan KA, Yamazaki S, Tei H, Sakaki Y, Menaker M. Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding. *Science*. 2001 Jan 19;291(5503):490–3. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11161204/>
  87. Ly JQM, Gaggioni G, Chellappa SL, Papachilleos S, Brzozowski A, Borsu C, et al. Circadian regulation of human cortical excitability. *Nat Commun*. 2016 Jun 24;7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27339884/>
  88. Gerstner JR, Smith GG, Lenz O, Perron IJ, Buono RJ, Ferraro TN. BMAL1 controls the diurnal rhythm and set point for electrical seizure threshold in mice. *Front Syst Neurosci*. 2014 Jun 26;8(JUNE). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25018707/>

89. Lipton JO, Yuan ED, Boyle LM, Ebrahimi-Fakhari D, Kwiatkowski E, Nathan A, et al. The Circadian Protein BMAL1 Regulates Translation in Response to S6K1-Mediated Phosphorylation. *Cell*. 2015 May 21;161(5):1138–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25981667/>
90. Campbell SS, Tobler I. Animal sleep: a review of sleep duration across phylogeny. *Neurosci Biobehav Rev*. 1984;8(3):269–300. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6504414/>
91. Cerebral states during sleep, as studied by human brain potentials. – *PsycNET*.. Available from: <https://psycnet.apa.org/record/1937-05464-001>
92. Gastaut H, Tassinari CA, Duron B. Polygraphic study of the episodic diurnal and nocturnal (hypnic and respiratory) manifestations of the pickwick syndrome. *Brain Research*. 1966;1(2):167–86.
93. Jafari B, Mohsenin V. Polysomnography. *Clin Chest Med*. 2010 Jun;31(2):287–97. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20488287/>
94. Ferber R, Millman R, Coppola M, Fleetham J, Murray CF, Iber C, et al. Portable recording in the assessment of obstructive sleep apnea. *ASDA standards of practice*. *Sleep*. 1994;17(4):378–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7973323/>
95. Cole RJ, Kripke DF, Gruen W, Mullaney DJ, Gillin JC. Automatic sleep/wake identification from wrist activity. *Sleep*. 1992;15(5):461–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1455130/>
96. Blackwell T, Redline S, Ancoli-Israel S, Schneider JL, Surovec S, Johnson NL, et al. Comparison of sleep parameters from actigraphy and polysomnography in older women: the SOF study. *Sleep*. 2008;31(2):283–91. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18274276/>
97. Rupp TL, Balkin TJ. Comparison of Motionlogger Watch and Actiwatch actigraphs to polysomnography for sleep/wake estimation in healthy young adults. *Behav Res Methods*. 2011 Dec;43(4):1152–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21512871/>
98. Berger AM, Farr LA, Kuhn BR, Fischer P, Agrawal S. Values of sleep/wake, activity/rest, circadian rhythms, and fatigue prior to adjuvant breast cancer



- chemotherapy. *J Pain Symptom Manage*. 2007 Apr;33(4):398–409. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17397701/>
99. Sadeh A. The role and validity of actigraphy in sleep medicine: an update. *Sleep Med Rev*. 2011 Aug;15(4):259–67. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21237680/>
  100. de Souza L, Benedito-Silva AA, Pires MLN, Poyares D, Tufik S, Calil HM. Further validation of actigraphy for sleep studies. *Sleep*;26(1):81–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12627737/>
  101. Ancoli-Israel S, Cole R, Alessi C, Chambers M, Moorcroft W, Pollak CP. The role of actigraphy in the study of sleep and circadian rhythms. *Sleep*. 2003 May 1;26(3):342–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12749557/>
  102. Martin JL, Hakim AD. Wrist actigraphy. *Chest*. 2011 Jun 1;139(6):1514–27. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21652563/>
  103. Ib V, Nez ~, Silva J, Cauli O. A survey on sleep questionnaires and diaries. 2017; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.sleep.2017.08.026>
  104. Fisher SP, Foster RG, Peirson SN. The Circadian Control of Sleep. *Handbook of Experimental Pharmacology*. 2013;217:157–83. Available from: [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-25950-0\\_7](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-25950-0_7)
  105. Saper CB, Fuller PM, Pedersen NP, Lu J, Scammell TE. Sleep State Switching. *Neuron*. 2010 Dec 22;68(6):1023–42.
  106. Carskadon MA, Dement WC. Normal Human Sleep: An Overview. *Principles and Practice of Sleep Medicine*. 2005 Jan 1;13–23.
  107. Boulos MI, Jairam T, Kendzerska T, Im J, Mekhael A, Murray BJ. Normal polysomnography parameters in healthy adults: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Respir Med*. 2019 Jun 1;7(6):533–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31006560/>
  108. Crunelli V, Hughes SW. The slow (. *Nat Neurosci*. 2010 Jan 17;13(1):9–17. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19966841/>
  109. Kocsis B, Kaminski M. Dynamic changes in the direction of the theta rhythmic drive between supramammillary nucleus and the septohippocampal system. *Hippocampus*. 2006;16(6):531–40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16598710/>

110. Fuller JH. Brain stem reticular units: Synaptic responses to stimulation within the ascending reticular pathways. *Brain Research*. 1976 Aug 13;112(2):299–312.
111. Saper CB, Lu J, Chou TC, Gooley J. The hypothalamic integrator for circadian rhythms. *Trends Neurosci*. 2005;28(3):152–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15749169/>
112. Buzsaki G, Bickford RG, Ponomareff G, Thal LJ, Mandel R, Gage FH. Nucleus basalis and thalamic control of neocortical activity in the freely moving rat. *J Neurosci*. 1988;8(11):4007–26. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3183710/>
113. Levey AI, Hallanger AE, Wainer BH. Cholinergic nucleus basalis neurons may influence the cortex via the thalamus. *Neurosci Lett*. 1987 Feb 10;74(1):7–13. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2436108/>
114. Saper CB. Organization of cerebral cortical afferent systems in the rat. II. Magnocellular basal nucleus. *J Comp Neurol*. 1984;222(3):313–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6699210/>
115. Broberger C, de Lecea L, Sutcliffe JG, Hökfelt T. Hypocretin/orexin- and melanin-concentrating hormone-expressing cells form distinct populations in the rodent lateral hypothalamus: relationship to the neuropeptide y and agouti gene-related protein systems. *Journal of Comparative Neurology*. 1998 Dec 28;402(4):460–74.
116. Kilduff TS, Peyron C. The hypocretin/orexin ligand–receptor system: implications for sleep and sleep disorders. *Trends in Neurosciences*. 2000 Aug 1;23(8):359–65.
117. Gallopin T, Fort P, Eggermann E, Cauli B, Luppi PH, Rossier J, et al. Identification of sleep-promoting neurons in vitro. *Nature*. 2000 Apr 27;404(6781):992–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10801127/>
118. Lu J, Greco MA, Shiromani P, Saper CB. Effect of lesions of the ventrolateral preoptic nucleus on NREM and REM sleep. *J Neurosci*. 2000 May 15;20(10):3830–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10804223/>

119. Lu J, Sherman D, Devor M, Saper CB. A putative flip-flop switch for control of REM sleep. *Nature*. 2006 Jun 1;441(7093):589–94. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16688184/>
120. Borbely AA. A two process model of sleep regulation. *Human Neurobiology*. 1982;1(3):195–204.
121. Borbély AA, Daan S, Wirz-Justice A, Deboer T. The two-process model of sleep regulation: a reappraisal. *J Sleep Res*. 2016 Apr 1;25(2):131–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26762182/>
122. Dement WC. Sleep Extension: Getting as Much Extra Sleep as Possible. *Clinics in Sports Medicine*. 2005 Apr 1;24(2):251–68.
123. Czeisler CA, Weitzman ED, Moore-Ede MC, Zimmerman JC, Knauer RS. Human Sleep: Its Duration and Organization Depend on Its Circadian Phase. *Science* (1979). 1980 Dec 12;210(4475):1264–7. Available from: <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.7434029>
124. Radulovacki M. Adenosine and sleep homeostasis in the basal forebrain: commentary on Blanco-Centurion et al. (2006). *Sleep*. 2006 Nov 1;29(11):1381–2. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17162981/>
125. Porkka-Heiskanen T, Strecker RE, Thakkar M, Bjørkum AA, Greene RW, McCarley RW. Adenosine: a mediator of the sleep-inducing effects of prolonged wakefulness. *Science*. 1997 May 23;276(5316):1265–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9157887/>
126. Dijk DJ, Czeisler CA. Contribution of the circadian pacemaker and the sleep homeostat to sleep propensity, sleep structure, electroencephalographic slow waves, and sleep spindle activity in humans. *J Neurosci*. 1995;15(5 Pt 1):3526–38. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7751928/>
127. Deurveilher S, Semba K. Indirect projections from the suprachiasmatic nucleus to major arousal-promoting cell groups in rat: implications for the circadian control of behavioural state. *Neuroscience*. 2005;130(1):165–83. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15561433/>
128. Lu J, Zhang YH, Chou TC, Gaus SE, Elmquist JK, Shiromani R, et al. Contrasting effects of ibotenate lesions of the paraventricular nucleus and subparaventricular zone on sleep-wake cycle and temperature regulation. *J*

- Neurosci. 2001 Jul 1;21(13):4864–74. Available from:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11425913/>
129. Chou TC, Scammell TE, Gooley JJ, Gaus SE, Saper CB, Lu J. Critical role of dorsomedial hypothalamic nucleus in a wide range of behavioral circadian rhythms. *J Neurosci*. 2003 Nov 19;23(33):10691–702. Available from:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14627654/>
  130. Bazhenov M, Timofeev I, Steriade M, Sejnowski T. Spiking-bursting activity in the thalamic reticular nucleus initiates sequences of spindle oscillations in thalamic networks. *J Neurophysiol*. 2000;84(2):1076–87. Available from:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10938329/>
  131. Badawy RAB, Curatolo JM, Newton M, Berkovic SF, Macdonell RAL. Sleep deprivation increases cortical excitability in epilepsy: syndrome-specific effects. *Neurology*. 2006 Sep 67(6):1018–22. Available from:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17000971/>
  132. Vyazovskiy V v., Cirelli C, Pfister-Genskow M, Faraguna U, Tononi G. Molecular and electrophysiological evidence for net synaptic potentiation in wake and depression in sleep. *Nat Neurosci*. 2008 Feb;11(2):200–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18204445/>
  133. Münch M, Knoblauch V, Blatter K, Schröder C, Schnitzler C, Kräuchi K, et al. The frontal predominance in human EEG delta activity after sleep loss decreases with age. *European Journal of Neuroscience*. 2004 Sep;20(5):1402–10.
  134. Spencer DC, Sun FT, Brown SN, Jobst BC, Fountain NB, Wong VSS, et al. Circadian and ultradian patterns of epileptiform discharges differ by seizure-onset location during long-term ambulatory intracranial monitoring. *Epilepsia*. 2016 Sep 1;57(9):1495–502. Available from:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27396544/>
  135. Nzwalo H, Menezes Cordeiro I, Santos AC, Peralta R, Paiva T, Bentes C. 24-hour rhythmicity of seizures in refractory focal epilepsy. *Epilepsy Behav*. 2016 Feb 1;55:75–8. Available from:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26773673/>
  136. Lerner AB, Case JD, Takahashi Y, Lee TH, Mori W. Isolation of melatonin, the pineal factor that lightens melanocytes. *J Am Chem Soc* 80: 2587– 2592, 1958 - Search Results - PubMed. Available from:

- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=Lerner+AB%2C+Case+JD%2C+Takashi+Y%2C+Lee+TH%2C+Mori+W.+Isolation+of+melatonin%2C+the+pineal+factor+that+lightens+melanocytes.+J+Am+Chem+Soc+80%3A+2587%E2%80%93+2592%2C+1958>
137. Tan DX, Manchester LC, Liu X, Rosales-Corral SA, Acuna-Castroviejo D, Reiter RJ. Mitochondria and chloroplasts as the original sites of melatonin synthesis: a hypothesis related to melatonin's primary function and evolution in eukaryotes. *J Pineal Res.* 2013 Mar;54(2):127–38. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23137057/>
  138. Galano A, Tan DX, Reiter RJ. Cyclic 3-hydroxymelatonin, a key metabolite enhancing the peroxy radical scavenging activity of melatonin. *Roy Soc Chem Adv* 4: 5220–5227, 2014. - Search Results - PubMed. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=Galano+A%2C+Tan+DX%2C+Reiter+RJ.+Cyclic+3-hydroxymelatonin%2C+a+key+metabolite+enhancing+the+peroxy+radical+scavenging+activity+of+melatonin.+Roy+Soc+Chem+Adv+4%3A+5220+%E2%80%93+5227%2C+2014.>
  139. Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Plummer BF. Cyclic 3-hydroxymelatonin: a melatonin metabolite generated as a result of hydroxyl radical scavenging. *Biol Signals Recept.* 1999 Mar 19;8(1–2):70–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10085465/>
  140. Galano A. On the direct scavenging activity of melatonin towards hydroxyl and a series of peroxy radicals. *Phys Chem Chem Phys.* 2011 Apr 21;13(15):7178–88. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21409256/>
  141. Reiter RJ, Paredes SD, Manchester LC, Tan DX. Reducing oxidative/nitrosative stress: a newly-discovered genre for melatonin. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2009;44(4):175–200. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19635037/>
  142. Bizzarri M, Proietti S, Cucina A, Reiter RJ. Molecular mechanisms of the pro-apoptotic actions of melatonin in cancer: a review. *Expert Opin Ther Targets.* 2013 Dec;17(12):1483–96. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24032643/>

143. Mao L, Dauchy RT, Blask DE, Slakey LM, Xiang S, Yuan L, et al. Circadian gating of epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer cells via melatonin-regulation of GSK3 $\beta$ . *Mol Endocrinol*. 2016;26(11):1808–20. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23002080/>
144. Proietti S, Cucina A, Reiter RJ, Bizzarri M. Molecular mechanisms of melatonin's inhibitory actions on breast cancers. *Cell Mol Life Sci*. 2013 Jun;70(12):2139–57. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23007844/>
145. Ostrin LA. Ocular and systemic melatonin and the influence of light exposure. *Clin Exp Optom*. 2019 Mar 1;102(2):99–108. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30074278/>
146. Czeisler CA, Allan JS, Strogatz SH, Ronda JM, Sánchez R, David Ríos C, et al. Bright Light Resets the Human Circadian Pacemaker Independent of the Timing of the Sleep-Wake Cycle. *Science (1979)*. 1986;233(4764):667–71. Available from: <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.3726555>
147. Flynn-Evans EE, Tabandeh H, Skene DJ, Lockley SW. Circadian Rhythm Disorders and Melatonin Production in 127 Blind Women with and without Light Perception. *J Biol Rhythms*. 2014;29(3):215–24. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24916394/>
148. Tricoire H, Locatelli A, Chemineau P, Malpoux B. Melatonin Enters the Cerebrospinal Fluid through the Pineal Recess. *Endocrinology*. 2002 Jan 1;143(1):84–90. Available from: <https://academic.oup.com/endo/article/143/1/84/2988986>
149. Legros C, Chesneau D, Boutin JA, Barc C, Malpoux B. Melatonin from Cerebrospinal Fluid but Not from Blood Reaches Sheep Cerebral Tissues Under Physiological Conditions. *Journal of Neuroendocrinology*. 2014 Mar 1;26(3):151–63. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jne.12134>
150. Bojkowski CJ, Arendt J, Shih MC, Markey SP. Melatonin secretion in humans assessed by measuring its metabolite, 6-sulfatoxymelatonin. *Clinical Chemistry*. 1987 Aug 1;33(8):1343–8. Available from: <https://academic.oup.com/clinchem/article/33/8/1343/5653482>
151. Lüdemann P, Zwernemann S, Lerchl A. Clearance of melatonin and 6-sulfatoxymelatonin by hemodialysis in patients with end-stage renal disease.

- Journal of Pineal Research. 2001 Oct 1;31(3):222–7. Available from:  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1034/j.1600-079X.2001.310305.x>
152. Carlson LA, Pobocik KM, Lawrence MA, Brazeau DA, Koch AJ. Influence of Exercise Time of Day on Salivary Melatonin Responses. *International Journal of Sports Physiology and Performance*. 2019 Mar 1 14(3):351–3. Available from:  
<https://journals.humankinetics.com/view/journals/ijssp/14/3/article-p351.xml>
153. Souman JL, Borra T, de Goijer I, Schlangen LJM, Vlaskamp BNS, Lucassen MP. Spectral Tuning of White Light Allows for Strong Reduction in Melatonin Suppression without Changing Illumination Level or Color Temperature. *Journal of Biological Rhythms*. 2018 Aug 1;33(4):420–31. Available from:  
<https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0748730418784041>
154. Gunn PJ, Middleton B, Davies SK, Revell VL, Skene DJ. Sex differences in the circadian profiles of melatonin and cortisol in plasma and urine matrices under constant routine conditions. <https://doi.org/10.3109/0742052820151112396>. 2016 Jan 2;33(1):39–50. Available from:  
<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/07420528.2015.1112396>
155. Wehr TA. The Durations of Human Melatonin Secretion and Sleep Respond to Changes in Daylength (Photoperiod). *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1991 Dec 1;73(6):1276–80. Available from:  
<https://academic.oup.com/jcem/article/73/6/1276/2653594>
156. Claustrat B, Brun J, Chazot G. The basic physiology and pathophysiology of melatonin. *Sleep Med Rev*. 2005;9(1):11–24. Available from:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15649735/>
157. Hartley S, Dauvilliers Y, Quera-Salva MA. Circadian Rhythm Disturbances in the Blind. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2018 Oct 1;18(10). Available from:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30083814/>
158. Molina TA, Burgess HJ. Calculating the dim light melatonin onset: the impact of threshold and sampling rate. *Chronobiol Int*. 2011 Oct;28(8):714–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21823817/>
159. Crowley SJ, Suh C, Molina TA, Fogg LF, Sharkey KM, Carskadon MA. Estimating the dim light melatonin onset of adolescents within a 6-h sampling

- window: the impact of sampling rate and threshold method. *Sleep Med.* 2016 Apr 1;20:59–66. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27318227/>
160. Zlotos DP, Jockers R, Cecon E, Rivara S, Witt-Enderby PA. MT1 and MT2 melatonin receptors: Ligands, models, oligomers, and therapeutic potential. *Journal of Medicinal Chemistry* [Internet]. 2014 Apr 24 [cited 2022 Feb 22];57(8):3161–85. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jm401343c>
161. Rzepka-Migut B, Paprocka J. Melatonin-Measurement Methods and the Factors Modifying the Results. A Systematic Review of the Literature. Available from: [www.mdpi.com/journal/ijerph](http://www.mdpi.com/journal/ijerph)
162. Graham C, Cook MR, Kavet R, Sastre A, Smith DK. Prediction of nocturnal plasma melatonin from morning urinary measures. *Journal of Pineal Research.* 1998 May 1;24(4):230–8. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1600-079X.1998.tb00538.x>
163. NOWAK R, MCMILLEN IC, REDMAN J, SHORT R v. THE CORRELATION BETWEEN SERUM AND SALIVARY MELATONIN CONCENTRATIONS AND URINARY 6-HYDROXYMELATONIN SULPHATE EXCRETION RATES: TWO NON-INVASIVE TECHNIQUES FOR MONITORING HUMAN CIRCADIAN RHYTHMICITY. *Clinical Endocrinology.* 1987 Oct 1;27(4):445–52. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2265.1987.tb01172.x>
164. Vakkuri O, Leppäluoto J, Kauppila A. Oral administration and distribution of melatonin in human serum, saliva and urine. *Life Sciences.* 1985 Aug 5;37(5):489–95.
165. Touitou Y, Auzéby A, Camus F, Djeridane Y. Daily profiles of salivary and urinary melatonin and steroids in healthy prepubertal boys. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism.* 2009 Nov ;22(11):1009–15. Available from: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/JPEM.2009.22.11.1009/html>
166. Klante G, Brinschwitz T, Secci K, Wollnik F, Steinlechner S. Creatinine is an appropriate reference for urinary sulphatoxymelatonin of laboratory animals and humans. *Journal of Pineal Research.* 1997 Nov 123(4):191–7. Available



from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1600-079X.1997.tb00354.x>

167. Alves de Almeida E, di Mascio P, Harumi T, Warren Spence D, Moscovitch A, Hardeland R, et al. Measurement of melatonin in body fluids: Standards, protocols and procedures. *Child's Nervous System* 2010 27:6. 2010 Nov 21;27(6):879–91. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00381-010-1278-8>
168. Ferrua B, Masseyeff R. Immunoassay of Melatonin with Enzyme-Labeled Antibodies. <http://dx.doi.org/10.1080/01971528508063022>. 2006 Mar 1;6(1–2):79–94. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01971528508063022>
169. Sandyk R, Tsagas N, Anninos PA. Melatonin as a proconvulsive hormone in humans. *Int J Neurosci*. 1992;63(1–2):125–35. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1342024/>
170. Lapin IP, Mirzaev SM, Ryzov I v., Oxenkrug GF. Anticonvulsant activity of melatonin against seizures induced by quinolinate, kainate, glutamate, NMDA, and pentylenetetrazole in mice. *J Pineal Res*. 1998;24(4):215–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9572530/>
171. Schapel GJ, Beran RG, Kennaway DL, McLoughney J, Matthews CD. Melatonin response in active epilepsy. *Epilepsia*. 1995;36(1):75–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8001514/>
172. Bazil CW, Short D, Crispin D, Zheng W. Patients with intractable epilepsy have low melatonin, which increases following seizures. *Neurology*. 2000 Dec 12;55(11):1746–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11113238/>
173. Yalın Ö, Arman F, Erdoğan F, Kula M. A comparison of the circadian rhythms and the levels of melatonin in patients with diurnal and nocturnal complex partial seizures. *Epilepsy Behav*. 2006 May;8(3):542–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16524783/>
174. Ortiz-Tudela E, Martinez-Nicolas A, Campos M, Rol MÁ, Madrid JA. A new integrated variable based on thermometry, actimetry and body position (TAP) to evaluate circadian system status in humans. *PLoS Comput Biol*. 2010 Nov; 6(11). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21085644/>

175. Buysse DJ, Reynolds CF, Monk TH, Berman SR, Kupfer DJ. The Pittsburgh Sleep Quality Index: a new instrument for psychiatric practice and research. *Psychiatry Res.* 1989;28(2):193–213. Available from:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2748771/>
176. Horne JA, Ostberg O. A self-assessment questionnaire to determine morningness-eveningness in human circadian rhythms. *Int J Chronobiol.* 1976;4(2):97–110. Available from:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1027738/>
177. Bazil CW, Anderson CT. Sleep structure following status epilepticus. *Sleep Med.* 2001;2(5):447–9. Available from:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14592395/>
178. Roshan S, Puri V, Chaudhry N, Gupta A, Rabi SK. Sleep abnormalities in juvenile myoclonic epilepsy-A sleep questionnaire and polysomnography based study. *Seizure.* 2017 Aug 1;50:194–201. Available from:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28704743/>
179. Sudbrack-Oliveira P, Lima Najjar L, Foldvary-Schaefer N, da Mota Gomes M. Sleep architecture in adults with epilepsy: a systematic review. *Sleep Med.* 2019 Jan 1;53:22–7. Available from:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30388678/>
180. Miano S, Datta AN. The role of sleep-related cognitive functions in the spectrum of benign epilepsy with centro-temporal spikes. *Eur J Pediatr.* 2019 Aug 1;178(8):1129–37. Available from:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31227889/>
181. Bazil CW, Castro LHM, Walczak TS. Reduction of rapid eye movement sleep by diurnal and nocturnal seizures in temporal lobe epilepsy. *Arch Neurol.* 2000;57(3):363–8. Available from:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10714662/>
182. Pérez-Carbonell L, Silva C, Matos N, Gaig C, Iranzo A, Santamaria J. Actigraphy: a useful tool to monitor sleep-related hypermotor seizures. *Sleep Med.* 2017 Dec 40:1–3. Available from:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29221769/>
183. Khan S, Nobili L, Khatami R, Loddenkemper T, Cajochen C, Dijk DJ, et al. Circadian rhythm and epilepsy. Vol. 17, *The Lancet Neurology.* Lancet Publishing Group; 2018. p. 1098–108.

184. Yalın Ö, Arman F, Erdoğan F, Kula M. A comparison of the circadian rhythms and the levels of melatonin in patients with diurnal and nocturnal complex partial seizures. *Epilepsy and Behavior*. 2006 May;8(3):542–6.
185. Manni R, de Icco R, Cremascoli R, Ferrera G, Furia F, Zambrelli E, et al. Circadian phase typing in idiopathic generalized epilepsy: Dim light melatonin onset and patterns of melatonin secretion—Semicurve findings in adult patients. *Epilepsy and Behavior*. 2016 Aug 1;61:132–7.
186. Ayça S, Aksoy HU, Taştan İ, Polat M. Levels of Melatonin in Continuous Spikes and Waves During Sleep. *Journal of Child Neurology*. 2019 May 1;34(6):309–12.

## Ringraziamenti

Vorrei ringraziare il Prof Dario Arnaldi per la sua competenza, gentilezza e disponibilità, senza il quale questo lavoro non sarebbe stato possibile. Un posto di rilievo spetta anche agli specializzandi Pietro e Andrea che con passione mi hanno accompagnato nella scoperta dell'ampio mondo dei disturbi del sonno e delle epilessie nei pomeriggi di ambulatorio.

E vorrei ringraziare anche la mia famiglia, che non mi ha mai fatto mancare supporto ed affetto, gli amici di una vita, conosciuti ben prima dell'inizio del percorso universitario e con cui spero di continuare il mio cammino, le fantastiche persone che ho incontrato in questi anni e chiunque mi sia stato vicino non solo durante la stesura della tesi, ma durante questa faticosa, ma emozionante strada.

Grazie a tutti!