

INFLUENZE GENETICHE E AMBIENTALI SUI TRATTI DI TIPO AUTISTICO: UNO STUDIO SU POPOLAZIONE GEMELLARE

Corrado Fagnani (a), Virgilia Toccaceli (a), Valeria Patriarca (b), Emanuele Tarolla (a), Cristina D'Ippolito (a), Sabrina Alviti (a), Silvia Sereni (c), Lorenzo Fantozzi (a), Angelo Picardi (a), Maria Antonietta Stazi (a)

(a) Centro Nazionale di Epidemiologia, Sorveglianza e Promozione della Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma, Italia

(b) Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sanità Alimentare, Istituto Superiore di Sanità, Roma, Italia

(c) ASL RM B, Roma, Italia

Introduzione

I disturbi dello spettro autistico (DSA) rappresentano l'estremo di una costellazione di tratti distribuiti in un *continuum* nella popolazione generale, che riguardano una triade di dimensioni di disabilità sul versante comportamentale: (i) difficoltà nella interazione sociale (IS), (ii) difficoltà nelle capacità di comunicazione (CC), (iii) presenza di modalità ristrette e ripetitive di comportamenti, interessi e attività (CR).

Studi precedenti hanno mostrato un certo grado di familiarità per alcune delle dimensioni dello spettro autistico, con punteggi tendenzialmente più elevati in parenti consanguinei di pazienti autistici. Gli studi familiari, che rappresentano la maggior parte degli studi pubblicati sull'autismo, presentano il grande svantaggio di non poter direttamente stabilire se l'aggregazione familiare osservata ha origine da influenze genetiche o da esposizioni ambientali condivise dai membri della famiglia.

Lo studio dei gemelli permette di chiarire i contributi di queste due componenti per ognuna delle tre dimensioni di disabilità comportamentali di tipo autistico. In breve, il metodo di indagine gemellare è basato sul confronto tra gemelli monozigoti (MZ) e gemelli dizigoti (DZ). Assumendo che le esposizioni ambientali rilevanti per uno specifico tratto multifattoriale in studio siano condivise dai gemelli MZ e dai gemelli DZ nella stessa misura (*equal environments assumption*), una correlazione maggiore tra i MZ rispetto ai DZ può essere considerata come indicazione di effetti genetici sul tratto in questione. La "ereditabilità" del tratto (cioè la proporzione della sua varianza totale spiegata dai fattori genetici) può essere stimata come il doppio della differenza tra le correlazioni nei MZ e nei DZ. Inoltre, considerati più tratti multifattoriali (ad esempio le diverse dimensioni di disabilità dello spettro autistico), se la correlazione tra i gemelli per due diversi tratti (ad esempio, nel caso dello spettro autistico, la correlazione tra la dimensione IS in un gemello e la dimensione CC nel co-gemello) è più elevata nei MZ rispetto ai DZ, ciò suggerisce l'esistenza di una base genetica comune ai due tratti (correlazione genetica) (1).

Il Registro Nazionale Gemelli (RNG, www.iss.it/gemelli) (2) dell'Istituto Superiore di Sanità ha implementato uno studio con la finalità di esplorare le influenze genetiche e ambientali sulla capacità di interazione sociale e di comunicazione, e sulla capacità di avere interessi e attività non ristretti, non ripetitivi e non stereotipati. Lo studio si colloca nell'ambito del Progetto "Un approccio epidemiologico ai disturbi dello spettro autistico" promosso dal Ministro della Salute, ed è stato approvato dal Comitato etico dell'ISS.

Metodi

Popolazione in studio: i soggetti in studio sono gemelli precedentemente arruolati nel RNG, che attualmente contiene informazioni su circa 24.000 gemelli iscritti. Il campione è stato selezionato nell'ambito di una vasta indagine sul benessere psico-fisico tra gli adulti di tre aree metropolitane del Nord, Centro e Sud Italia (Milano, Roma e Palermo). Da febbraio a novembre 2010, circa 5.200 gemelli in età compresa tra 18 e 65 anni, già arruolati nel RNG, sono stati contattati per posta e invitati a partecipare all'indagine. Nello stesso contatto postale, i gemelli hanno ricevuto il modulo di consenso informato, i questionari sui tratti in studio e una richiesta di donazione di un campione di saliva per futuri studi, tramite kit per l'autoraccolta che i gemelli consenzienti dovevano rispedire alla Banca biologica del RNG presso l'Istituto Superiore di Sanità.

Misure: la raccolta dei dati sui vari tratti di tipo autistico è stata condotta tramite il test autosomministrato Autism Spectrum Quotient (AQ) (3, Allegato) proposto da Simon Baron-Cohen e colleghi del Centro di Ricerca sull'Autismo di Cambridge. Il test AQ è un facile strumento che consente di misurare il livello di tratti autistici negli adulti della popolazione generale aventi un quoziente di intelligenza nell'intervallo di normalità. Il test comprende 50 affermazioni che coprono cinque diverse aree (10 item per ciascun area) dello spettro autistico: capacità sociali, capacità di comunicazione, immaginazione, attenzione ai dettagli, cambiamenti di attenzione. Ogni affermazione è codificata su una scala di tipo Likert a 4 modalità (da 1 = 'sono perfettamente d'accordo' a 4 = 'sono del tutto in disaccordo', ad indicare un livello da lieve a grave per il comportamento anormale o di tipo autistico).

Il test AQ non è un mezzo per fare diagnosi ma un valido strumento per quantificare in maniera rapida dove si colloca ogni individuo in un continuum che va da tratti decisamente autistici alla normalità.

La determinazione della zigosità è stata fatta sulla base di un questionario standard che mira a stabilire il grado di somiglianza fisica dei gemelli durante l'infanzia. L'affidabilità di questo metodo, ben affermato negli studi gemellari, è stata stimata in un sottocampione di 58 coppie di gemelli dello stesso sesso su cui è stata effettuata l'analisi genetica su 9 specifici marker; 54 coppie (93,1%) sono risultate correttamente classificate tramite il metodo con questionario.

Analisi statistica

Descrizione del campione: È stata calcolata, tramite il software Stata (versione 9.2), la media e la deviazione standard dei punteggi totali e subtotali del test AQ, per zigosità e sesso, per i gemelli considerati come individui.

Correlazione: Per il punteggio totale AQ, sono state stimate le correlazioni, aggiustate per età e sesso, tra gemello e co-gemello nelle coppie MZ e DZ, utilizzando il software Mx (4).

Modelli di equazioni strutturali: Sono stati utilizzati i modelli di equazioni strutturali e il software Mx per la stima della componente genetica e ambientale del punteggio totale AQ, aggiustate per età e sesso. Tramite questi modelli, la varianza del punteggio totale AQ è stata decomposta nel contributo di (i) fattori genetici, (ii) fattori ambientali condivisi dai gemelli (es. fattori della vita intra-uterina o familiari) e (iii) fattori ambientali specifici per l'individuo (es. infezioni o eventi traumatici).

Il campione attuale non è ancora sufficientemente numeroso per poter effettuare un'analisi multivariata, che quindi verrà condotta solo sul campione finale. Lo scopo di questo tipo di analisi è stimare la correlazione genetica e ambientale tra le diverse dimensioni dello spettro

autistico, confrontando due modelli alternativi (Figura 1). Un dei due modelli è noto come “Independent Pathway” e ipotizza che i fattori genetici e quelli ambientali influenzino direttamente le dimensioni, con un impatto eventualmente diverso su ciascuna di esse. Il modello alternativo, detto “Common Pathway”, assume che le dimensioni riflettano una comune suscettibilità latente, a sua volta influenzata da fattori genetici e ambientali. Entrambi i modelli includono sia influenze (genetiche e ambientali) condivise dalle dimensioni sia influenze specifiche per ciascuna dimensione.

Risultati

Al dicembre 2010, 1.217 gemelli (23,4%) hanno accettato di partecipare e hanno spedito i questionari compilati. Non sono state rilevate differenze significative tra rispondenti e non rispondenti per quanto riguarda zigosità e livello di istruzione, mentre tra i rispondenti è stata registrata una più alta proporzione di femmine.

Il campione considerato per questo studio preliminare include 332 gemelli (88 coppie, 156 gemelli “spaiati”), il cui test AQ è stato codificato e validato a fine dicembre 2010. Dopo l’esclusione di 8 gemelli con zigosità sconosciuta a causa di risposte mancanti al questionario sulla somiglianza fisica o risposte discordanti rispetto ai co-gemelli, 324 gemelli (118 maschi e 206 femmine, 165 MZ e 159 DZ) sono stati considerati per l’analisi tramite il metodo gemellare. La correlazione per il punteggio totale AQ risulta leggermente più alta tra i gemelli MZ (0.53) rispetto ai DZ (0.41), il che suggerisce un moderato contributo dei fattori genetici nell’espressione dei tratti dello spettro autistico. La stima di ereditabilità ottenuta è del 24%, con un contributo simile (29%) stimato per le influenze ambientali condivise dai gemelli. I fattori ambientali specifici per l’individuo spiegano quasi la metà (47%) della varianza nel punteggio totale AQ.

Discussione

Questa analisi preliminare mostra un moderato contributo dei fattori genetici nelle differenze inter-individuali osservate per i tratti di tipo autistico. Si evidenzia una possibile sostanziale influenza dei fattori ambientali sia condivisi dai gemelli (es. esposizioni nella vita intrauterina o familiari) sia specifici dell’individuo (es. infezioni o eventi traumatici) su questi tratti. Le nostre correlazioni e la stima della componente genetica e ambientale dei tratti sono in linea con quelle ottenute da Hoekstra e colleghi (5) in un precedente studio gemellare nella popolazione generale olandese in cui sono stati considerati anche dati su fratelli non gemelli.

La raccolta dei dati sui tratti in studio e la loro registrazione nel database del RNG è ancora in corso. A compimento, un ampio campione gemellare e quindi un’elevata potenza statistica sarà disponibile per molte analisi.

Sarà quindi quantificato il ruolo dei fattori genetici (ereditabilità) e delle influenze ambientali nel determinare le differenze inter-individuali osservate nel punteggio totale AQ e nel punteggio di ogni sotto-dimensione comportamentale di tipo autistico. Inoltre, verrà eseguita l’analisi multivariata per stimare la correlazione genetica e ambientale tra le differenti sotto-dimensioni, utilizzando i modelli sopra descritti. Ulteriori ipotesi che verranno testate si riferiscono alle eventuali differenze per sesso ed età nella componente genetica e ambientale delle dimensioni dello spettro autistico, e alle possibili modificazioni dell’effetto di tali componenti da parte di specifiche esposizioni ambientali.

Per le analisi multivariate, potranno essere adottate diverse strategie sul numero delle dimensioni dello spettro autistico, poiché i risultati degli studi sulla struttura fattoriale del questionario AQ sono stati piuttosto inconsistenti.

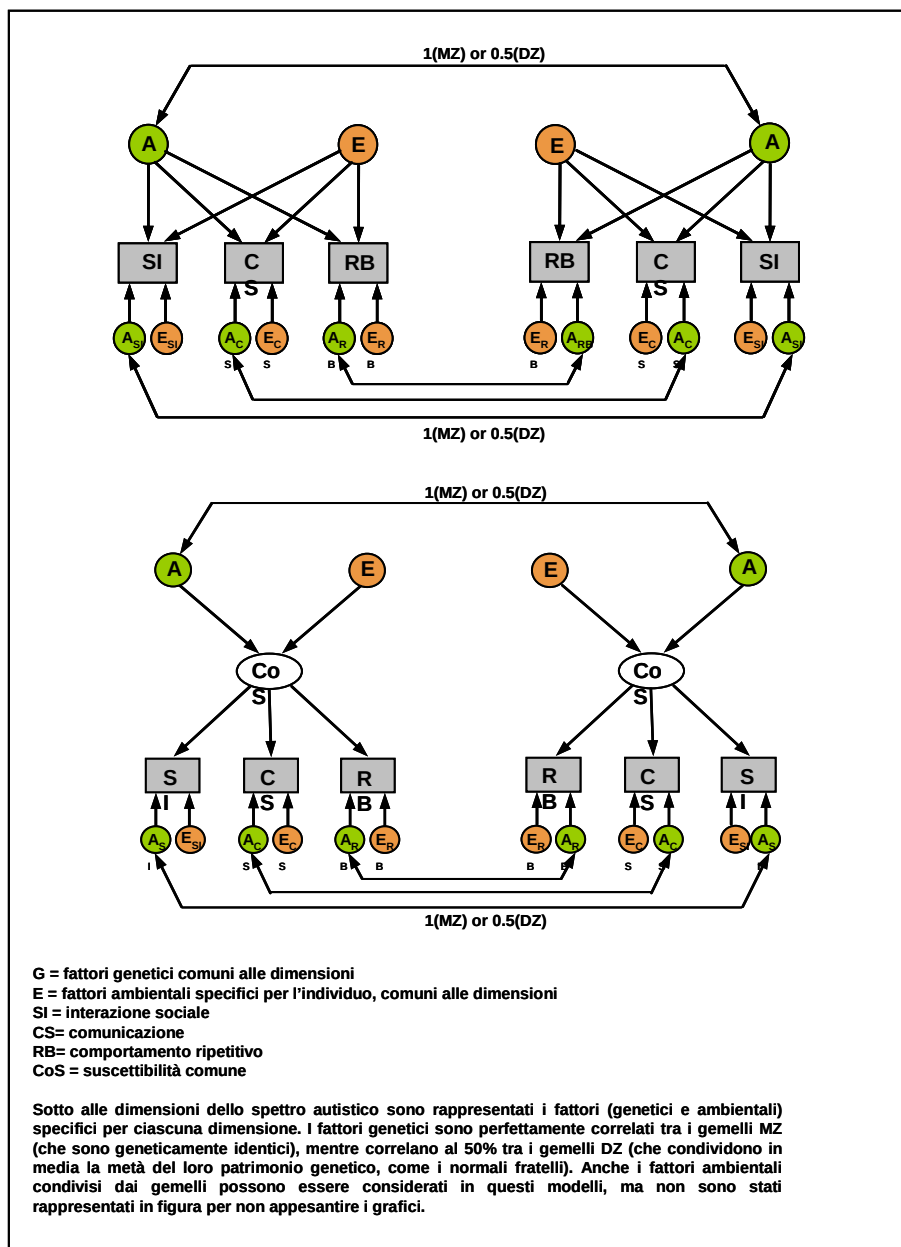


Figura 1. Modelli multivariati *Independent Pathway* e *Common Pathway* per lo studio delle dimensioni dello spettro autistico nel gemello (sinistra) e nel co-gemello (destra)

Bibliografia

1. Neale MC, Cardon LR. *Methodology for Genetic Studies of Twins and Families*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publisher; 1992.
2. Fagnani C, Brescianini S, Cotichini R, D'Ippolito C, Dukic T, Giannantonio L, Medda E, Nisticò L, Patriarca V, Pulciani S, Rotondi D, Toccaceli V, Stazi MA. The Italian twin register: new cohorts and tools, current projects and future perspectives of a developing resource. *Twin Res Hum Genet*. 2006;9:799-805.
3. Baron-Cohen S, Wheelwright S, Skinner R, Martin J, Clubley E. The autism-spectrum quotient (AQ): evidence from Asperger syndrome/high-functioning autism, males and females, scientists and mathematicians. *J Autism Dev Disord*. 2001; 31:5-17. Erratum in: *J Autism Dev Disord* 2001;31:603.
4. Neale MC, Boker SM, Xie G, Maes H (2006). *Mx: Statistical Modeling*, 7th ed. Richmond, Department of Psychiatry, Virginia Commonwealth University, 2006.
5. Hoekstra RA, Bartels M, Verweij CJ, Boomsma DI. Heritability of autistic traits in the general population. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2007;161:372-7.

Allegato

II Test AQ

AQ Test (Autism-Spectrum Quotient).

Da: Baron-Cohen S. *et al.* Autism Research Centre, Cambridge University. MRC-SBC/SJW Feb 1998. Traduzione validata Ruta L, Università di Catania.

1. Preferisco svolgere le attività con gli altri piuttosto che da solo.
2. Preferisco fare le cose sempre nello stesso modo.
3. Se cerco di immaginare qualcosa, trovo molto semplice creare un'immagine nella mia mente.
4. Frequentemente vengo così fortemente assorbito da una cosa che perdo di vista le altre cose.
5. Spesso noto piccoli suoni che gli altri non notano.
6. Di solito noto i numeri di targa delle macchine o simili sequenze di informazioni.
7. Frequentemente le altre persone mi dicono che quanto ho detto è scortese, anche quando io penso sia cortese.
8. Quando leggo una storia, riesco facilmente a immaginare come i personaggi potrebbero apparire.
9. Sono affascinato dalle date.
10. In un gruppo sociale, riesco facilmente a seguire le conversazioni di parecchie persone.
11. Trovo le situazioni sociali semplici.
12. Ho la tendenza a notare dettagli che gli altri non notano.
13. Preferisco andare in biblioteca piuttosto che ad una festa.
14. Trovo semplice inventare racconti.
15. Mi trovo attratto più fortemente dalle persone che dalle cose.
16. Tendo ad avere interessi molto forti e mi innervosisco se non posso perseguirli.
17. Mi piace chiacchierare.
18. Quando parlo, non è sempre facile per gli altri inserirsi nella conversazione.
19. Sono affascinato dai numeri.

20. Quando leggo una storia, trovo difficile capire le intenzioni dei personaggi.
21. Non amo particolarmente leggere romanzi.
22. Trovo difficile fare nuove amicizie.
23. Noto costantemente degli schemi nelle cose.
24. Preferisco andare al teatro piuttosto che al museo.
25. Non mi infastidisco se le mie routine quotidiane vengono disturbate.
26. Mi capita frequentemente di non sapere come continuare una conversazione.
27. Trovo semplice "leggere tra le righe" quando qualcuno mi parla.
28. Di solito mi concentro di più sull'intera figura che su piccoli dettagli.
29. Non sono molto bravo a ricordare i numeri telefonici.
30. Di solito non noto piccoli cambiamenti in una situazione o nell'aspetto di una persona.
31. So distinguere se chi mi ascolta si sta annoiando.
32. Trovo semplice fare più di una cosa contemporaneamente.
33. Quando parlo al telefono, non sono sicuro quando è il mio turno di parlare.
34. Amo fare le cose spontaneamente.
35. Sono spesso l'ultimo a capire il punto di una battuta.
36. Trovo semplice capire cosa una persona sta pensando o provando, semplicemente guardandola in faccia.
37. Se c'è un'interruzione, io posso ritornare a ciò che stavo facendo molto velocemente.
38. Sono bravo nella conversazione sociale.
39. Le persone spesso mi dicono che persevero sempre sulla stessa cosa.
40. Quando ero piccolo, mi piaceva fare giochi di finzione con altri bambini.
41. Mi piace raccogliere informazioni su categorie di cose (es. tipi di macchine, tipi di uccelli, tipi di treni, tipi di piante, ecc.).
42. Trovo difficile immaginarmi nei panni di qualcun altro.
43. Mi piace pianificare attentamente ogni attività a cui partecipo.
44. Mi piacciono gli eventi sociali.
45. Trovo difficile capire le intenzioni delle persone.
46. Le situazioni nuove mi rendono ansioso.
47. Mi piace incontrare persone nuove.
48. Sono un buon diplomatico.
49. Non sono molto bravo a ricordare la data di nascita delle persone.
50. Trovo semplice fare giochi di finzione con i bambini.

Algoritmo per il calcolo della zigosità - solo per coppie dello stesso sesso

Durante l'infanzia

- | | | |
|--|----|----|
| 1. Sentivate dire che eravate uguali come due gocce d'acqua? | NO | SI |
| 2. Il colore dei vostri capelli era uguale? | NO | SI |
| 3. il colore dei vostri occhi era uguale? | NO | SI |
| 4. I vostri genitori vi confondevano l'uno con l'altro? | NO | SI |
| 5. I vostri amici vi confondevano l'uno con l'altro? | NO | SI |
| 6. Gli insegnanti vi confondevano l'uno con l'altro? | NO | SI |

I gemelli che rispondono SÌ agli item 1, 2, 3 e SÌ all'item 4 o 5 o 6, sono classificati come Monozigoti.