

RUOLO DELL'INTERAZIONE TRA RELINA E ORMONI SESSUALI IN UN MODELLO MURINO DI DISORDINI DELLO SPETTRO AUTISTICO ASD (AUTISM SPECTRUM DISORDER)

Emilia Romano, Simone Macrì, Giovanni Laviola

Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze, Istituto Superiore di Sanità, Roma, Italia

Introduzione

L'autismo è una sindrome psichiatrica, classificata dal DSM IV tra i disturbi pervasivi dello sviluppo. Le principali caratteristiche sono: ridotta capacità di stabilire relazioni sociali, difficoltà nel linguaggio e ridotta gamma di interessi a cui possono associarsi stereotipie motorie, perseverazione e rigidità nell'esecuzione di schemi complessi. L'autismo si manifesta molto più frequentemente nel sesso maschile con un rapporto M:F di 4:1. Questa proporzione ha condotto a ipotizzare che gli ormoni sessuali, in particolar modo il testosterone, possano rivestire un ruolo nell'eziologia della patologia. Secondo lo studioso britannico Baron-Cohen, l'autismo rappresenterebbe una "forma estrema del fenotipo maschile" (1). Si ipotizza che tale condizione possa essere una conseguenza dell'esposizione a livelli eccessivamente elevati di testosterone durante le fasi precoci dello sviluppo (prenatale e neonatale) (2). Esistono due fasi durante lo sviluppo maschile nelle quali i livelli di testosterone mostrano un picco. Il primo di questi picchi si verifica durante le fasi precoci della gestazione, coincidenti con il periodo in cui le gonadi maschili cominciano a secernere l'ormone; il secondo si situa intorno alla nascita. Entrambi i picchi possono avere un ruolo importante nella strutturazione organizzativa del cervello maschile. Alla luce di queste considerazioni, lo studioso britannico ha avanzato l'ipotesi che il disturbo dello spettro autistico possa originarsi nel caso in cui le abilità di *systemizing* (organizzare le cose in termini di regole) degli individui sono integre o superiori, mentre le abilità di *empathizing* (rispondere con emozioni appropriate) che normalmente differiscono tra i due sessi, appaiono fortemente deficitarie (3). Nell'ambito del normale profilo maschile, l'autismo apparirebbe quindi come una forma estrema.

Recenti studi neuro-anatomici condotti su gemelli monozigoti (4) suggeriscono che il cervelletto possa avere un ruolo di mediatore tra la predisposizione genetica e il fenotipo comportamentale nell'autismo. In seguito ad analisi *post mortem*, sono state evidenziate, infatti, alcune anomalie a livello della neuro-morfologia del cervelletto in una certa proporzione di individui affetti da disturbi dello spettro autistico (5,6). La principale di tali evidenze consisterebbe nella riduzione del numero di cellule del Purkinje (PC), soprattutto nella regione infero-posteriore dell'emisfero cerebellare, sebbene anche il Verme sembri mostrare in alcuni casi una riduzione del numero di cellule in tutti i lobuli.

Studi di genetica hanno dimostrato che tra numerose altre varianti o mutazioni genetiche, particolari alleli e aplotipi del gene della relina (RELN), posizionato sul braccio lungo del cromosoma 7, rappresentano importanti fattori di vulnerabilità per l'autismo (7). La relina è una glicoproteina della matrice extracellulare, che gioca un ruolo chiave nella migrazione e nel posizionamento dei neuroni durante le prime fasi dello sviluppo (8). Studi *post mortem* hanno dimostrato che è presente una riduzione del 43-44% dei livelli della proteina in una percentuale consistente di pazienti (9). Il gene che codifica per la relina è altamente conservato tra l'uomo e il topo. Il modello del topo *reeler* eterozigote (hz) è caratterizzato da una mutazione a trasmissione

autosomica recessiva che si associa ad una ridotta funzionalità del gene codificante per la relina. Negli ultimi anni questa evidenza ha portato a ritenere il topo hz come un possibile modello animale per lo studio di una sintomatologia isomorfa a quella dai pazienti con ASD (10). È documentato, infatti, che oltre a presentare una riduzione del 50% di relina, il topo maschio hz va incontro a una riduzione progressiva delle PC nel cervelletto nelle prime settimane di vita (11).

Tale evidenza ha condotto a ipotizzare che i topi maschi hz per il gene della relina presentano una sensibilità peculiare agli ormoni sessuali o alterazioni nei loro livelli nel sistema nervoso centrale. Infatti, i topi hz per la relina potrebbero risultare più suscettibili alla perdita delle PC in quanto come maschi presentano ridotti livelli di estrogeni, oppure perché esposti a livelli eccessivamente elevati di testosterone. Queste evidenze suggeriscono che uno sbilanciamento nei livelli di estrogeni vs testosterone, possa associarsi ad alterazioni neuro-morfologiche a carico del cervelletto nei topi hz. L'ipotesi di un equilibrio ormonale alterato negli individui maschi hz, è supportata da uno studio recente che riporta i risultati di un'analisi quantitativa dei neurosteroidi. Tali dati indicano che il cervelletto di topi maschi hz per il gene della relina sarebbe esposto subito dopo la nascita (entro i primi 15 giorni di vita) a livelli più elevati di testosterone e di estradiolo e, invece, ridotti per il DHT (dihydrotestosterone, il metabolita ridotto del testosterone) rispetto a quello dei maschi wt e delle femmine (12).

Dopo aver validato il modello del topo reeler hz per i sintomi di riferimento per i disturbi dello spettro autistico (10), nello studio che presentiamo abbiamo deciso di procedere con un trattamento neonatale con il 17-beta-estradiolo somministrato in singola dose al fine di verificare la capacità di modulazione (cioè ridurre o compensare) di quei profili neuro-morfologici e comportamentali che risultano vulnerabili allo sviluppo della patologia. Tale ipotesi costituisce il naturale proseguimento di uno studio precedente (12) in cui si dimostrava l'efficacia del trattamento in cisterna magna (area disposta tra il cervelletto e la superficie dorsale del midollo allungato) con estradiolo al giorno 5 dalla nascita, sulla sopravvivenza delle PC nei topi maschi hz per il gene della relina.

Materiali e metodi

I protocolli sperimentali utilizzati sono stati approvati dalle autorità istituzionali e sono in accordo con la direttiva della Comunità Europea (86/609) e con le Leggi italiane (DL.vo 116/1992).

Per i nostri esperimenti sono stati utilizzati topi maschi wt e hz di ceppo B6C3Fe. Al giorno 5 post-natale, gli animali sono stati trattati con l'ormone 17- β -estradiolo, iniettato in una somministrazione singola di 1 μ L di volume direttamente in cisterna magna, così come descritto da Sakamoto e colleghi (2003). Dopo un'estesa e accurata analisi comportamentale, gli animali sono stati sacrificati per permettere il prelievo del cervelletto e dell'amigdala.

Studio del comportamento:

- Test dell'*homing*: questo è considerato tradizionalmente atto a fornire un indicatore validato di motivazione sociale nel topo in età neonatale. Il test viene eseguito al giorno post-natale (PND) 9, quando gli occhi sono ancora chiusi e i topolini si servono solo dell'olfatto per potersi orientare e raggiungere l'area dell'apparato definita *nest* (nido, cioè l'area in cui sono presenti gli odori familiari, incluso quello della madre) (13).
- Test dell'*attentional set-shifting*: si tratta di un test cognitivo eseguito in età adulta, analogo al *Wisconsin Card Sorting Task* utilizzato per analizzare i deficit cognitivi in pazienti sia affetti da ASD sia da schizofrenia. Il test consta di tre fasi: discriminazione semplice (SD), discriminazione mista (CD), e infine *reversal* della discriminazione mista (CDR), molto complessa che richiede la formazione di nuove regole per ottenere una ricompensa (14).

Per quanto riguarda sia la procedura istologica sia la stereologia utilizzate in questo lavoro abbiamo fatto riferimento al lavoro di Biamonte (12). In particolare, lo studio di stereologia è stato realizzato grazie alla collaborazione con il laboratorio del Prof. Flavio Keller, Università “Campus Bio-Medico” di Roma. I dati sono stati analizzati con ANOVA a due vie, mediante il programma Stat View (version 4.0). L’analisi dei post-hoc è stata realizzata usando il Tukey Test.

Risultati

– *Crescita ponderale*

Gli animali sono stati monitorati per l’incremento del peso corporeo e, come atteso, il peso aumentava in relazione all’età. Gli animali trattati con l’estradiolo mostravano in generale una riduzione del peso corporeo rispetto ai soggetti di controllo a partire dal giorno dello svezzamento e che permaneva fino all’età adulta [F (3,78)=4.67, p < 0,01].

– *Test dell’homing*

I soggetti wt e hz di controllo o trattati con 17-beta-estradiolo mostravano a PND 9 livelli simili di attività locomotoria generale, [F(1,31)= 0.863; NS]. L’analisi dei dati basata sul calcolo della percentuale di soggetti che raggiungevano l’area *nest*, ha messo in evidenza una differenza di base fra i due genotipi. Nel gruppo di controllo (iniettato con il veicolo), infatti, un numero minore di soggetti hz raggiungeva l’area *nest* rispetto ai topi wt. Il trattamento neonatale con estradiolo ha contrastato efficacemente questo profilo migliorando la *performance* del gruppo hz in modo tale da renderlo confrontabile con i soggetti wt del gruppo di controllo [genotipo x trattamento, ($\chi^2=9,24$ P < 0,01)] (Tabella 1). Il trattamento con il 17-beta-estradiolo sembra invece aver esercitato un effetto deteriorante nei topi wt e compromettere la loro *performance*.

Tabella 1. Test dell’homing

| Trattamento | wt | hz |
|-------------|--------|--------|
| veicolo | 33 | 19.3** |
| estradiolo | 19.4** | 37.5 |

Percentuale di topi che raggiungono l’area *nest*. ** p<0,01 significativamente differente da wt-veh. Riproduzione parziale e modificata da (15)

– *Test Attentional set-shifting (età adulta)*

I topi appartenenti ai due genotipi e ai due trattamenti neonatali non mostravano alcuna differenza nelle prime due fasi di acquisizione. Nella terza fase, invece, emergevano delle differenze significative in funzione del genotipo in interazione con il trattamento [F(1,16)= 5.1, P<0,05] (Figura1). In particolare, i topi wt del gruppo di controllo (veh) apprendevano il *reversal learning* (CDR) più velocemente rispetto ai soggetti hz. È da notare, inoltre, che il trattamento in fase neonatale con estradiolo migliorava notevolmente la *performance* dei soggetti hz, tanto da renderli assimilabili ai soggetti wt del gruppo di controllo. Infine, i topi wt trattati con l’ormone necessitavano di un numero più elevato di prove per apprendere il CDR rispetto ai wt del gruppo di controllo. In analogia con il test dell’homing, una singola somministrazione intracerebrale con estrogeni in fase neonatale sembra deteriorare la capacità dei soggetti wt e compromettere la loro *performance* in questo test in fase adulta.

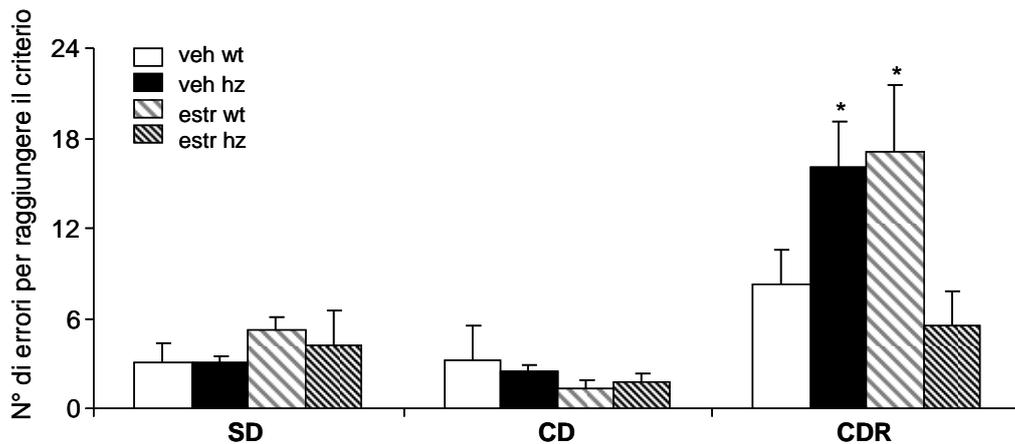


Figura 1. Test dell' *Attentional set-shifting*. Il numero di errori commessi dagli animali prima di raggiungere il criterio è stato misurato per le singole fasi del test. Veh=controlli veicolo. * $p < 0,05$. Riproduzione parziale e modificata da (15)

– Stereologia:

- *Cervelletto*: I topi hz adulti mostrano un numero significativamente ridotto di cellule di PC rispetto ai topi wt, indipendentemente dal trattamento con il 17-beta-estradiolo [genotipo: $(F(1,15) = 142.6, p < 0,01)$] (Figura 2 A).
- *Amigdala*: I topi hz di controllo mostrano una riduzione del numero di interneuroni GABAergici positivi alla parvalbumina (PV+) rispetto ai topi wt [genotipo: $(F(1,12) = 13.0, p < 0,01; p < 0,05)$] (Figura 2 B). Il trattamento con il 17-beta-estradiolo produce un aumento del numero di interneuroni GABAergici PV+ nei topi sia wt sia hz [$F(1,12) = 6.1, p < 0,05$].

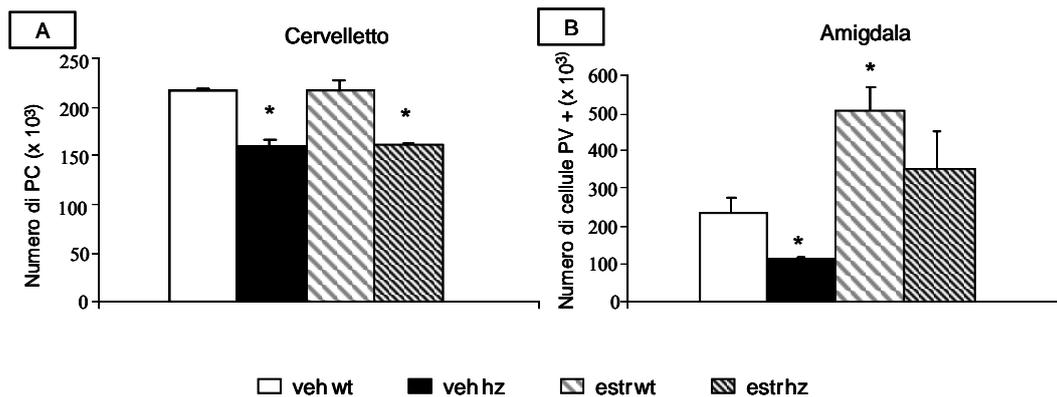


Figura 2. Numero di cellule di Purkinje nel cervelletto (pannello A) e di cellule positive alla parvalbumina in amigdala (pannello B). Veh=controlli veicolo * $p < 0,05$. Riproduzione parziale e modificata da Macri S, et al. (15)

Discussione

Il primo degli obiettivi del presente lavoro era quello di fornire ulteriore dimostrazione che i topi hz per la relina possano costituire un modello valido per studiare i meccanismi patogenetici coinvolti nell'insorgenza dell'ASD. Per questo obiettivo abbiamo fatto riferimento alle risposte individuali dei controlli wt e degli hz nei diversi esperimenti valutando i domini comportamentali tipicamente associati ai soggetti con ASD (16). In linea con le nostre previsioni, abbiamo osservato che i topi hz (i) mostrano una alterazione importante della motivazione nella ricerca dell'area *nest* a PND 9 (ii) presentano in età adulta un aumentato numero di risposte di perseverazione nel *reversal learning* misurato nel test dell'*attentional set-shifting*.

Il test dell'*homing* fornisce indicatori validati di motivazione sociale nel topo in età neonatale (17). I livelli di locomozione generale misurati durante questo test sono apparsi indistinguibili fra i gruppi, così da escludere la possibilità che gli effetti osservati siano dovuti ad alterazioni importanti della locomozione.

I topi eterozigoti adulti, infine, realizzano un numero elevato di errori prima di completare la fase del *reversal learning*, in un paradigma sperimentale analogo al *Wisconsin Card Sorting Task*. Quest'ultimo è comunemente utilizzato per valutare nell'uomo le abilità dipendenti dalla corteccia prefrontale. Tale test, è stato adattato permettendo di distinguere tra gli aspetti discriminatori semplici (discriminazione semplice e combinata) e la maggior parte dei processi cognitivi complessi (18).

Di qui, in accordo con quanto affermato da Brigman e colleghi (19), abbiamo osservato che i topi hz mostrano un disturbo selettivo nel *reversal learning* della discriminazione composita. In linea con i dati ottenuti in pazienti con ASD, anche i topi hz mostrano un aumento delle risposte perseveranti, messo in evidenza da un alto numero di errori realizzati prima di raggiungere il criterio (19).

Effetti compensatori dell'estradiolo somministrato in fase neonatale

Il 17-beta-estradiolo in unica somministrazione a 5 giorni dalla nascita (PND) ha compensato alcune delle alterazioni comportamentali osservate nei topi hz. In particolare, i topi wt iniettati con veicolo e i topi hz trattati con estradiolo appaiono confrontabili per l'*homing*. Data la tipologia di questi test comportamentali, che valutano anche la *performance* motoria, tali dati vanno a corroborare l'ipotesi di una disfunzione cerebellare presente nei topi hz (13) e un potenziale ruolo regolatore della somministrazione di estradiolo. Inoltre, in età adulta i topi hz trattati con estrogeni e i topi appartenenti al gruppo di controllo mostrano analoghe *performance* nel test dell'*attentional set-shifting*.

Il coinvolgimento del cervelletto nelle funzioni cognitive superiori è stato dimostrato attraverso studi di *imaging* e di lesioni nell'uomo (20). In particolare le anomalie cerebellari sono state associate a specifici deficit dell'attenzione (20). L'effetto compensatorio del trattamento neonatale con estradiolo sulle *performance* cognitive evidenziato nel modello animale potrebbe, dunque, essere associato agli effetti osservati sulle PC (12). In particolare Biamonte e colleghi hanno osservato in uno studio precedente che il trattamento neonatale con estradiolo – secondo le stesse modalità utilizzate per il presente studio 0150 – ha controbilanciato efficacemente la riduzione delle PC presente tipicamente nei topi hz a PND 15. I dati mostrano, però, che questi effetti sulle PC sarebbero solo transienti, non permanendo fino all'età adulta. Rispetto a quanto detto per il cervelletto, abbiamo osservato che l'alterazione dell'amigdala presente nei topi hz adulti viene efficacemente neutralizzata dalla

somministrazione neonatale di estradiolo. Si è dunque ipotizzato che le conseguenze di breve durata a seguito della somministrazione di estradiolo potrebbero risultare in una compensazione funzionale a lungo termine delle abilità cognitive probabilmente coinvolgendo altre aree cerebrali come l'amigdala. Infatti, sebbene le disfunzioni cerebellari siano riferite ai disturbi cognitivi, questi deficit sono stati associati con la componente motoria dei test cognitivi (21). In particolare, è stato proposto che il cervelletto potrebbe esercitare effetti negativi sulle performance cognitive attraverso un'interazione alterata corteccia-amigdala-cervelletto (22).

L'obiettivo principale del presente studio era quello di dimostrare un'interazione funzionale tra ormoni gonadici e il gene della relina, la natura del nostro disegno sperimentale ci ha tuttavia permesso di osservare anche gli effetti di tale trattamento nel gruppo dei wt. Mentre il trattamento con estradiolo neonatale è in grado di compensare i deficit comportamentali e neuro-morfologici presenti nei topi hz, esso sembra indurre alterazioni comportamentali quando somministrato a soggetti "normali". Tali risultati supportano indirettamente l'importanza di un equilibrio del rapporto testosterone/estrogeni all'interno dei disturbi del neurosviluppo (2). Tale ipotesi è sostenuta anche dal fatto che gli hz trattati con estradiolo mostrano risposte simili a quelle dei soggetti wt trattati con veicolo in test comportamentali caratterizzati dall'assenza di differenze dipendenti dal genotipo. I test comportamentali nei quali la vulnerabilità genetica non è presente, rivelano che i soggetti hz sono apparentemente protetti dalle conseguenze "negative" dell'alterato rapporto testosterone/estradiolo a livello cerebrale.

La convergenza delle anomalie cerebrali (in particolare cervelletto e amigdala), l'alterazione di meccanismi cellulari che sono alla base dell'espressione di geni candidati e le disfunzioni del comportamento, conferiscono al modello qui presentato (il topo *reeler* eterozigote) un alto grado di validità di costruito e di facciata, risultando valido per poter studiare le interazioni tra la vulnerabilità genetica e i modulatori epigenetici, come ad esempio gli ormoni sessuali (10).

Ringraziamenti

Desideriamo ringraziare: F. Biamonte, R. Marino e F. Keller del Laboratorio di Neuroscienze dello Sviluppo, Università Campus Bio-Medico, Roma; il contributo da parte della Foundation Jerome Lejeune (Francia).

Bibliografia

1. Baron-Cohen S. The extreme male brain theory of autism. *Trends in Cognitive Sciences* 2002;6:248-54.
2. Knickmeyer RC, Baron-Cohen S. Fetal testosterone and sex differences in typical social development and in autism. *Journal of Child Neurology* 2006;21:825-45.
3. Baron-Cohen S, Wheelwright S. The empathy quotient: an investigation of adults with Asperger syndrome or high functioning autism, and normal sex differences. *Journal of Autism and Developmental Disorders* 2004;34:163-75.
4. Kates N, George L. Organizational and environmental factors can influence effectiveness of new care models. *Healthcare Papers* 2004;5:68-71.
5. Bauman M, Kemper TL. Histoanatomic observations of the brain in early infantile autism. *Neurology* 1985;35:866-74.
6. Lee M, Martin-Ruiz C, Graham A, Court J, Jaros E, Perry R, Iversen P, Bauman M, Perry E. Nicotinic receptor abnormalities in the cerebellar cortex in autism. *Brain* 2002;125:1483-95.
7. Persico AM, D'Agruma L, Maiorano N, Totaro A, Militerni R, Bravaccio C, et al. Reelin gene alleles and haplotypes as a factor predisposing to autistic disorder. *Molecular Psychiatry* 2001;6:150-9.

8. Keller F, Persico AM. The neurobiological context of autism. *Molecular Neurobiology* 2003;28:1-22.
9. Fatemi SH, Stary JM, Halt AR, Realmuto GR. Dysregulation of Reelin and Bcl-2 proteins in autistic cerebellum. *Journal of Autism and Developmental Disorders* 2001;31:529-35.
10. Laviola G, Ognibene E, Romano E, Adriani W, Keller F. Gene-environment interaction during early development in the heterozygous reeler mouse: clues for modelling of major neurobehavioral syndromes. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 2009;33(4):560-72.
11. Hadj-Sahraoui N, Frederic F, Delhaye-Bouchaud N, Mariani J. Gender effect on Purkinje cell loss in the cerebellum of the heterozygous reeler mouse. *Journal of Neurogenetics* 1996;11:45-58.
12. Biamonte F, Assenza G, Marino R, D'Amelio M, Panteri R, Caruso D, Scurati S, Yague JG, Garcia-Segura LM, Cesa R, Strata P, Melcangi RC, Keller F. Interactions between neuroactive steroids and reelin haploinsufficiency in Purkinje cell survival. *Neurobiology of Disease* 2009;36(1):103-15.
13. Laviola G, Adriani W, Gaudino C, Marino R, Keller F. Paradoxical effects of prenatal acetylcholinesterase blockade on neuro-behavioral development and drug-induced stereotypies in reeler mutant mice. *Psychopharmacology (Berl)* 2006;187:331-44.
14. Colacicco G, Welzl H, Lipp HP, Wurbel H. Attentional set-shifting in mice: modification of a rat paradigm, and evidence for strain-dependent variation. *Behavioural Brain Research* 2002;132:95-102.
15. Macri S, Biamonte F, Romano E, Marino R, Keller F, Laviola G. Perseverative responding and neuroanatomical alterations in adult heterozygous reeler mice are mitigated by neonatal estrogen administration. *Psychoneuroendocrinology* 2010;35:1374-87.
16. Crawley JN. Mouse behavioral assays relevant to the symptoms of autism. *Brain Pathology* 2007;17:448-59.
17. Alleva E, Bignami G. Prenatal benzodiazepine effects in mice: postnatal behavioral development, response to drug challenges, and adult discrimination learning. *Neurotoxicology* 1986;7:303-17.
18. Garner JP, Thogerson CM, Wurbel H, Murray JD, Mench JA. Animal neuropsychology: validation of the Intra-Dimensional Extra-Dimensional set shifting task for mice. *Behavioural Brain Research* 2006;173:53-61.
19. Brigman JL, Padukiewicz KE, Sutherland ML, Rothblat LA. Executive functions in the heterozygous reeler mouse model of schizophrenia. *Behavioral Neuroscience* 2006;120:984-8.
20. Steinlin M. Cerebellar disorders in childhood: cognitive problems. *Cerebellum* 2008;7:607-10.
21. Haarmeier T, Thier P. The attentive cerebellum - myth or reality? *Cerebellum* 2007;6:177-83.
22. Leggio MG, Tedesco AM, Chiricozzi FR, Clausi S, Orsini A, Molinari M. Cognitive sequencing impairment in patients with focal or atrophic cerebellar damage. *Brain* 2008;131:1332-43.