

# IPOSTESI EZIOLOGICHE ALLA BASE DELL'AUTISMO

Angela Caruso, Maria Luisa Scattoni

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

## Introduzione

I Disturbi dello Spettro Autistico (dall'inglese *Autism Spectrum Disorders*, ASD) sono un insieme relativamente eterogeneo di disturbi dell'età evolutiva dall'eziologia ancora largamente sconosciuta, caratterizzati da anomalie socio comunicative associate alla presenza di comportamenti, attività e interessi ristretti e ripetitivi. La diagnosi clinica viene effettuata esclusivamente mediante l'identificazione di questi due *core* sintomatologici in quanto non sono stati individuati biomarcatori specifici per tali disturbi. Studi recenti hanno evidenziato come le persone con ASD, rispetto alla popolazione generale, presentino alterazioni nel tracciato EEG, nella connettività cerebrale, un maggior peso del cervello, un maggior numero di neuroni nella corteccia pre-frontale, problemi nella funzionalità del sistema immunitario, macroencefalia, comorbilità con disabilità intellettiva e altri sintomi. Purtroppo questi marcatori biologici non sono stati rilevati in tutti i soggetti con ASD e risultano anche associati ad altri disturbi del neurosviluppo. Per questo motivo non possono essere utilizzati come marcatori predittivi di ASD.

Il tasso di incidenza di ASD è decisamente elevato, con un rapporto di 4 ad 1 a favore di individui di sesso maschile ed assenza di sensibili variazioni nei diversi gruppi etnici o socioeconomici. I dati più recenti, secondo uno studio realizzato nel 2010 dall'*Autism and Developmental Disabilities Monitoring*, su bambini di 8 anni campionati in differenti aree degli Stati Uniti, affermano che ad essere affetti da ASD sono circa 1 bambino su 68 (1). L'eziologia dell'autismo rimane tuttora sconosciuta, sebbene si ritenga che sia il patrimonio genetico che l'ambiente, e l'interazione tra i due, siano coinvolti nella manifestazione del disturbo.

## Principali ipotesi eziologiche

Le evidenze scientifiche indicano principalmente cinque ipotesi eziologiche per le quali verrà dato una breve descrizione e i relativi riferimenti bibliografici.

### Componente genetica

Dati recenti indicano un ruolo preponderante dei fattori genetici, come dimostrato dagli studi di concordanza sui gemelli e sulle famiglie che suggeriscono una vulnerabilità genetica di base per gli ASD (2). Infatti tra le patologie neuropsichiatriche, l'autismo presenta il più alto contributo da parte di fattori genetici, con tassi di concordanza nei gemelli monozigoti dell'82-92% contro il 20-30% nei dizigoti e stime di ereditabilità superiori al 90% (3). Recentemente è stata rivista la probabilità di rischio tra fratelli registrando un aumento dal 3% al 18% (4, 5). Studi genetici di associazione su famiglie con un caso di autismo (simplex) o più casi (multiplex) hanno identificato molti geni associati all'ASD. Sono stati identificati geni codificanti per una serie di proteine probabilmente implicate nell'eziologia dell'autismo, tutte coinvolte nel neurosviluppo e molte con un ruolo nell'ambito della funzionalità sinaptica. Tra queste proteine, alcune sono

coinvolte nel rimodellamento della cromatina, nella regolazione genica e nei movimenti del citoscheletro di actina. Nella segnalazione sinaptica, lo studio di alcune proteine probabilmente associate al disturbo autistico ha evidenziato disfunzioni a livello di: molecole di adesione cellulare (6, 7) neurotrasmissione glutammatergica (8), neurotrasmissione GABAergica/sinapsi inibitorie (ciò potrebbe render conto dei casi di epilessia associati all'autismo) (9), sistema serotoninergico (10) e sistema di segnalazione del calcio (a supporto di questa ipotesi è stato rilevato il coinvolgimento di molecole agenti nella segnalazione intracellulare) (11).

Sono stati identificati alcuni geni (alleli comuni, ad esempio RELN, OXTR o En2) che non sono specifici per l'autismo ma sono geni che conferiscono maggiore suscettibilità/vulnerabilità e che, in concomitanza con altri fattori, potrebbero generare l'autismo. Questi geni però sono anche stati rilevati nella schizofrenia, epilessia e altri disturbi del neurosviluppo. L'aver mutazioni in questi geni quindi non può essere direttamente associato all'autismo.

Nell'ASD esiste una grande eterogeneità con una minoranza di casi caratterizzata da mutazioni o riarrangiamenti cromosomici de novo e da una maggioranza di pazienti portatori di una vulnerabilità genetica prodotta dall'interazione tra 25 loci (geni candidati di suscettibilità all'autismo: *Autism Susceptibility Candidate Genes*, ASCG) e potenziali interazioni gene-ambiente (12, 13). Tra le mutazioni mendeliane maggiormente documentate ricorrono le variazioni nel numero di copie (*Copy Number Variations*, CNV) molte delle quali coincidono con loci precedentemente identificati e coinvolti nel ritardo mentale e sindromi cromosomiche come ad esempio i geni SHANK3, NLGN4, NRXN1, tutte proteine della densità postsinaptica implicate anche nella formazione delle sinapsi e nella maturazione delle spine dendritiche (14).

Questi riportati sono solamente alcuni degli innumerevoli geni coinvolti nella patologia. Sono stati identificati finora tra i 300 e i 1000 geni associati all'autismo ma un'analisi più accurata, mediante trascrittomica, ha rilevato che la maggior parte di questi geni partecipano/confluiscono su 5-10 meccanismi biologici e fisiopatologici comuni. Codificano per proteine che regolano l'attività e la plasticità neuronale, il sistema immunitario, i canali del sodio e del calcio, le funzioni mitocondriali etc.

Per quanto riguarda la componente genetica nell'autismo, si parla di due relazioni: a) "molti a uno" ovvero tanti geni coinvolti/identificati ma ognuno di essi responsabile solo dell'1 % dei casi, e b) "uno a molti" cioè un gene associato all'autismo ma che può determinare anche altre patologie. Un esempio di quest'ultima relazione è dato da una famiglia in cui vi sono due figli con ASD con la stessa mutazione nel gene NLG4 ma si presentano fenotipicamente in maniera molto differente. Il primo figlio, infatti, è verbale ma poco comunicativo e il secondo non parla affatto e trascorre le giornate nascondendosi in luoghi ameni. Un ulteriore esempio è descritto in una famiglia con tre individui con mutazioni in NLG4: il probando è stato diagnosticato un disturbo dello spettro autistico con un tic motorio, al fratello la sindrome di Tourette e ADHD e la madre portatrice della stessa mutazione ha un disturbo dell'apprendimento, ansia e depressione.

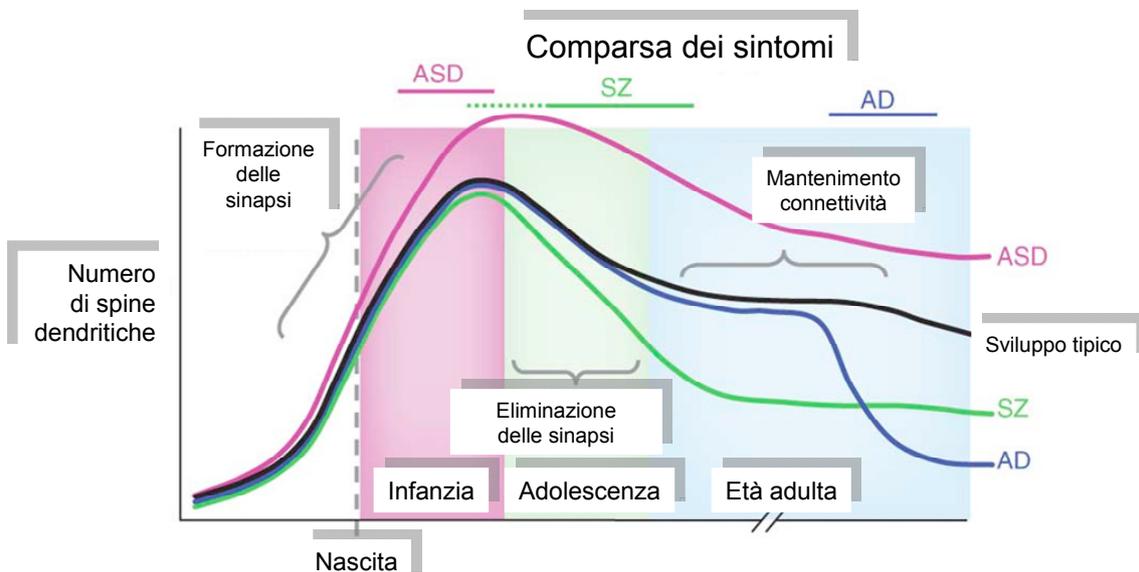
È proprio questa grande eterogeneità, sia a livello genotipico che fenotipico, che rende difficile ai ricercatori studiare e trovare la causa dell'ASD. Attualmente la ricerca clinica e preclinica si sta concentrando sui disturbi monogenici in comorbilità con l'autismo, determinati cioè da mutazioni in un singolo gene (vedi X-fragile, Sindrome di Angelman, ecc.). Le persone affette da queste sindromi sono, infatti, più simili (omogenei) tra loro dal punto di vista genotipico/fenotipico.

Se si studia la mappa dell'espressione spazio temporale di alcuni geni candidati si nota che molti dei geni mostrano un'espressione spazio-temporale ben precisa nel cervello in via di sviluppo: un aumento nella corteccia cerebrale durante il secondo trimestre di gestazione, un periodo cruciale dello sviluppo per la formazione di circuiti neurali precoci (15).

## Alterazioni dei processi neurodifferenziativi: spine dendritiche e sinapsi

Molti dei geni associati/candidati per ASD sono implicati nell'attività e plasticità sinaptica. Per questo motivo, studi recenti si sono dedicati all'analisi strutturale delle sinapsi ponendo particolare attenzione all'identificazione di alterazioni nelle spine dendritiche. L'analisi post-mortem di tessuti cerebrali umani ha portato ad interessanti risultati, dimostrando come soggetti affetti dal disturbo autistico mostrino un aumento della densità di spine dendritiche nei neuroni piramidali della corteccia nei lobi temporali, frontale e parietale. Questo aumento ha luogo subito dopo la nascita ma raggiunge il suo massimo livello all'inizio dell'adolescenza mantenendosi per tutta la durata della vita.

Nell'autismo vi è un'eccessiva produzione di spine dendritiche/sinapsi al quale non segue uno specifico processo di rimozione delle spine in eccesso tramite apoptosi (o *pruning*) e lo stabilirsi di connessioni funzionali. Per questo motivo il numero di sinapsi resta molto alto e potrebbe spiegare l'eccessiva risposta sensoriale delle persone con autismo a stimoli sonori, visivi etc. Come si può vedere dalla Figura 1, nella schizofrenia, un altro disturbo del neurosviluppo con esordio durante l'adolescenza, è invece presente un eccessivo processo apoptotico concomitante all'insorgenza dei primi sintomi (16).



**Figura 1. Variazioni del numero di spine dendritiche durante tutto il corso della vita: la linea più scura indica un normale profilo di variazione del numero spine dendritiche dalla nascita all'invecchiamento, le altre linee suggeriscono il profilo per gli ASD, per la schizofrenia (SZ), per l'Alzheimer (AD)**

## Alterazione dell'equilibrio tra sistema eccitatorio e inibitorio nel sistema nervoso centrale

Questa ipotesi è una delle più accreditate in quanto diversi studi hanno evidenziato alterazioni nel sistema GABAergico o glutammatergico sia in soggetti con ASD che in modelli animali di autismo. Il neurotrasmettitore GABA è generalmente responsabile dell'inibizione nel sistema

nervoso centrale ma nelle primissime fasi dello sviluppo embrionale e perinatale ha una funzione eccitatoria, regolando molti processi quali la proliferazione, la differenziazione e la morte cellulare. Studi preclinici su modelli animali di ASD e con mutazioni nei geni che codificano per recettori GABA (GABRB3) o del glutammato hanno rilevato alterazioni nell'attività inibitoria/eccitatoria e un fenotipo simil-autistico. Inoltre, molti dei geni coinvolti nell'autismo sono implicati nel pathway molecolare di questi due sistemi neurotrasmettitoriali (ad es. la famiglia delle neuroleghine).

La prima volta che si è parlato di questa ipotesi è stata nella sindrome dell'X fragile, in cui mutazioni nel gene *Fmr1* (fragile X mental retardation 1) sul braccio lungo del cromosoma X (Xq27.3) non consentono l'espressione della proteina FMRP determinando disabilità intellettiva, disturbi del linguaggio, iperattività, comportamenti simil-autistici e attacchi epilettici. Dal punto di vista molecolare, in assenza di FMRP, si ha un'eccessiva sintesi di proteine sinaptiche, l'attivazione dei recettori metabotropici del glutammato (mGluR5), il danneggiamento dei circuiti GABAergici e una diminuita espressione delle subunità dei recettori GABAA. Tutto questo determina la diminuzione della funzionalità GABAergica e un'ipereccitabilità. A supporto di questa ipotesi ci sono diversi studi in cui è stata trovata un'alterazione dell'equilibrio eccitazione/inibizione in modelli animali di autismo (con mutazioni in geni candidati per ASD).

Un importante studio ha rilevato come l'incrocio tra topi *Fmr1*-KO e un topo transgenico in cui i livelli di mGluR5 sono ridotti del 50%, sia in grado di ridurre sensibilmente la densità delle spine dendritiche e la plasticità della dominanza oculare nella progenie. In questi topi non risultano più presenti né il fenotipo simil-autistico né i deficit cognitivi prima evidenziati. Questi studi hanno dato il via a trial clinici con antagonisti dei recettori mGluR5 e agonisti GABAergici in soggetti con disturbi dello spettro autistico e non solo in quelli affetti dalla sindrome dell'X fragile. Come già detto, la ricerca sugli ASD è attualmente concentrata sullo studio delle sindromi monogeniche in cui vi è un unico gene coinvolto e quindi sono meno complesse dei disturbi dello spettro autistico con un'origine multifattoriale. L'ipotesi che si persegue è che i trattamenti farmacologici efficaci nelle sindromi monogeniche possano essere valide anche nell'ASD.

Ulteriori evidenze a carico dello squilibrio tra eccitazione/inibizione si sono avute tramite l'uso dell'optogenetica, una tecnica con cui è possibile "accendere" alcune aree cerebrali tramite la stimolazione luminosa di alcune proteine fotosensibili. La sovraeccitazione della corteccia prefrontale ha indotto la manifestazione di comportamenti tipici del fenotipo autistico in un topo di controllo, suggerendo un ruolo della sovraeccitazione neuronale nel disturbo autistico (17).

## **Alterazioni morfoanatomiche del sistema nervoso centrale**

Vi sono evidenze di una riduzione nell'estensione della regione del tronco compresa tra ponte e midollo allungato (o bulbo). In questa regione vengono regolate funzioni basilari, quali respirazione, alimentazione, equilibrio e coordinazione motoria. Alcuni sintomi frequenti nell'autismo come ipersensibilità al contatto e ai suoni e disturbi del sonno, sembra abbiano origine proprio nelle regioni cerebrali deputate alle funzioni di base. Una delle osservazioni anatomiche maggiormente documentate nell'autismo riguarda una crescita cerebrale anomala (18): alla nascita viene registrata una ridotta dimensione cerebrale, seguita da un periodo di crescita eccessiva tra gli 1-2 mesi e 6-14 mesi di età. Modalità anomale di sviluppo cerebrale si verificano poi tra i 2 e i 4 anni di età nelle regioni del lobo frontale, del cervelletto e delle strutture limbiche, seguite da un rallentamento esasperato della crescita cerebrale. Le regioni cerebrali colpite (Tabella 1) sono strettamente coinvolte nello sviluppo di capacità sociali, comunicative e motorie, ovvero capacità di cui i pazienti autistici sono deficitari (19).

**Tabella 1. Aree cerebrali coinvolte nella regolazione dei comportamenti relativi a sintomi principali degli ASD**

Sintomi principali degli ASD	Aree cerebrali coinvolte
Deficit sociali	Corteccia orbito-frontale Corteccia cingolata anteriore Giro fusiforme Solco temporale superiore Neuroni a specchio dell'amigdala Giro frontale inferiore Corteccia parietale posteriore
Deficit comunicativi	Giro frontale inferiore (area di Broca) Solco temporale superiore Area motoria supplementare Gangli della base Sostanza nera Talamo Nuclei pontini del cervelletto
Comportamenti ripetitivi	Corteccia orbito-frontale Corteccia cingolata anteriore Gangli della base Talamo

Studi di *neuroimaging* (20) hanno dimostrato: un aumento del volume cerebrale associato all'incremento di materia bianca subcorticale nel lobo frontale, e modelli anomali di sviluppo nella corteccia cerebrale, nell'amigdala e nella formazione ippocampale. Studi di dissociazione della corteccia cerebrale concorrono a supportare le evidenze di un incremento di volume della materia bianca sottocorticale, suggerendo, per i pazienti con autismo e disturbi dello sviluppo associati al linguaggio, un eccessivo sviluppo di connessioni intraemisferiche e cortico-corticali piuttosto che interemisferiche.

Ulteriori osservazioni aventi come oggetto la sostanza bianca sono a favore dell'ipotesi di una disconnettività tra regioni. Tecniche recenti di *neuroimaging*, quali il tensore di diffusione (*Diffusion Tensor Imaging*, DTI) e la risonanza magnetica funzionale (*functional Magnetic Resonance Imaging*, fMRI), hanno evidenziato una distruzione di tratti di materia bianca e disconnessione tra regioni cerebrali corticali e sottocorticali (21), probabilmente coinvolte in compiti di ordine elevato, come linguaggio e cognizione sociale. Inoltre soggetti autistici presentano, nella regione temporale e frontale, minicolonne corticali (catene di neuroni che si estendono verticalmente tra gli strati 2 e 6 della corteccia e costituenti unità anatomiche e funzionali) di minore larghezza e maggiore densità rispetto ad individui (19-24). Questi cambiamenti favoriscono la formazione di fibre connessione più corte incrementando in questo modo la connettività locale (iperconnettività locale) a spese della connettività tra le diverse regioni corticali (ipoconnettività) causando così una più lenta trasmissione di segnali. La teoria della connettività (25); ha evidenziato una mancanza di sincronizzazione nella attivazione di regioni cerebrali in individui autistici, indicando un diminuito livello di comunicazione e quindi di connettività tra queste regioni con conseguente mancanza di integrazione delle informazioni. I pazienti affetti da ASD mostrano ridotti livelli di attenzione causata probabilmente da problemi di connettività tra le regioni prefrontali e anteriori. Delle anomalie sono state riscontrate anche nella ridotta attività dei neuroni specchio (26) stimolata dall'osservare o immaginare un movimento corporeo, prospettando per tali neuroni un coinvolgimento nell'imitazione.

## Alterazioni del sistema immunitario

Studi svolti a partire dagli anni '90 hanno evidenziato come nella maggior parte dei casi in cui mutazioni o riarrangiamenti cromosomici sono assenti, la predisposizione genetica potrebbe esprimersi soprattutto attraverso il sistema immunitario. Questa tesi scaturisce da diverse osservazioni tra cui: a) la macrocefalia nei soggetti autistici presenta dimensioni della circonferenza cranica che correlano con una storia pregressa di disturbi allergici/immunitari nel paziente e nei suoi familiari; b) associazione tra autismo e varianti del gene paraoxonasi-1 (PON1), responsabili di spiccate riduzioni dei livelli di attività arilesterasica (connessa ad un essenziale ruolo antiossidante nei confronti delle LDL, *Low Density Lipoprotein*), rilevate sia nell'uomo sia in modelli animali, solo in corso di infezioni virali accompagnate da intensa reazione immunitaria; c) studi *post-mortem*, che hanno evidenziato una massiccia attivazione trascrizionale di geni codificanti per citochine e fattori coinvolti nei processi immunitari; d) diversi studi clinici hanno rilevato elevati livelli di citochine proinfiammatorie circolanti in madri di soggetti ASD (nel liquido amniotico o nel sangue prelevato mentre erano in gravidanza) o nel plasma, sangue e sezioni cerebrali prelevate da tessuti *post-mortem* di bambini e adulti con ASD (27).

## Impegno internazionale per lo studio dell'ASD

Nonostante tutte queste ipotesi/osservazioni, non esistono attualmente dei marcatori precoci per l'autismo. La difficoltà di identificazione di uno o più marcatori del disturbo è legata al fatto che i pochi biomarcatori candidati non sono stati rilevati in tutti i pazienti autistici e in molti casi sono stati trovati associati con altri disturbi del neurosviluppo. Emerge pertanto un'estrema eterogeneità nell'ASD che non consente l'identificazione di una base eziologica comune né tantomeno di un marcatore biologico 'univoco' del disturbo.

Attualmente in America e in Europa ci sono diversi studi dedicati allo studio delle basi eziologiche dell'ASD. Il CHARGE (*Childhood Autism Risks from Genetics and the Environment*) ad esempio, il primo grande studio sui fattori ambientali e sull'interazione gene-ambiente nell'ASD, sta raccogliendo molti dati relativi alla mamma, al bambino, alla loro esposizione a pesticidi, metalli, virus, e a fattori nutrizionali potenzialmente implicati. Sono stati finora individuati, nel CHARGE come in altri studi su questa tematica, diversi fattori di rischio 'ambientali': l'esposizione in utero al virus della rosolia, a livelli elevati di testosterone, ed a sostanze come l'alcool etilico, l'acido valproico (un farmaco antiepilettico) e la talidomide (un farmaco tranquillante ed antiemetico). In tale direzione si muove anche lo studio SEED (*Study to Explore the Early Development*), nato con il patrocinio dei *Centers for Disease Control and Prevention* americani, in cui viene studiata la componente ambientale in interazione con la componente genetica in bambini tra i 2 e i 5 anni di età. In corso di studi è anche una possibile relazione con l'esposizione prenatale ad organofosfati, sostanze chimiche comunemente utilizzate come pesticidi in agricoltura e come insetticidi ad uso domestico (28). Sono stati evidenziati altri fattori ambientali tra cui l'età avanzata dei genitori e dei nonni, e l'aver parti multipli a distanza ravvicinata (meno di 12 mesi).

In Europa si è costituito di recente CROME (<http://www.crome-life.eu/>), un network dedicato alla salute e all'ambiente, il quale valuta l'impatto sulla salute umana dell'esposizione ad agenti chimici derivanti dalla contaminazione ambientale, o dai prodotti per consumatori (materiali a contatto con gli alimenti, materiali da costruzione, cosmetici, indumenti, etc.) in quattro distinte aree del bacino del Mediterraneo (Grecia, Slovenia, Italia e Spagna). Gli inquinanti oggetto di studio in CROME-LIFE sono metalli, composti organici persistenti e pesticidi, i cui effetti avversi

sulla salute umana sono stati evidenziati in una grande quantità di studi. In particolare, l'esposizione durante la gravidanza e nella prima infanzia a metalli quali il mercurio e il piombo, anche se a basse dosi, è associata a effetti neurotossici, e può significativamente influenzare lo sviluppo motorio, cognitivo e linguistico dei bambini (29, 30). Tra i metalloidi, l'arsenico risulta associato a diversi tipi di tumore, ad effetti endocrini e a patologie croniche quali il diabete di tipo II, mentre rimane da chiarire la sua potenziale neurotossicità durante lo sviluppo (31). Sostanze organiche come i policlorobifenili (PCB) e gli inquinanti organici persistenti come i policlorobifeniliteri (PDBE) sono stati associati a disturbi di apprendimento e ritardo intellettivo, ma anche a patologie croniche a base endocrina-metabolica come il diabete (32). I pesticidi (es. composti organoclorurati, organobromine e organofosfati), soprattutto se in seguito ad esposizione occupazionale, sono associati a un ampio spettro di condizioni cliniche quali tumori, danno epatico, disturbi della tiroide e della riproduzione, diabete, neuropatie; destano particolare allarme gli effetti della esposizione prolungata e a basse dosi ai pesticidi sullo sviluppo neuropsicologico e sul sistema immunitario soprattutto quando coinvolgono donne in gravidanza, bambini e adolescenti (33). Ad oggi, un'alterazione del neurosviluppo in età prenatale viene riconosciuta essere l'origine neuropatologica della malattia. Recenti studi hanno rilevato una correlazione tra livelli di testosterone fetale e punteggi elevati ottenuti in base a scale di valutazione di tratti autistici (34). Anche studi *post-mortem* hanno evidenziato alterazioni con esordio precoce: ridotta apoptosi e/o aumentata proliferazione cellulare, alterata migrazione cellulare, anomalie del differenziamento (con neuroni di dimensioni inferiori alla norma), della citoarchitettura e della sinaptogenesi (35) e alterazioni della trascrizione sinaptica (36). Ciò che si pensa è che non c'è un effetto nell'immediatezza nelle prime fasi dello sviluppo, ma che ci sia un effetto massivo a lungo andare.

## Modelli sperimentali per lo studio eziologico

L'autismo è contraddistinto da una grande eterogeneità che rende difficoltosa la validazione di teorie eziopatologiche capaci di sintetizzare gli aspetti cognitivi, comportamentali e fisiologici. L'identificazione di geni candidati ha comportato la messa a punto di modelli sperimentali per lo studio del ruolo fisiologico giocato da questi singoli geni nell'eziologia dei disturbi del neurosviluppo. Sono state quindi generate diverse linee genetiche murine di cui sono stati caratterizzati aspetti neurobiologici e comportamentali. Questi modelli sperimentali sono stati realizzati soprattutto nella specie topo poiché preferibilmente in questa specie è possibile effettuare manipolazioni genetiche selettive dell'oocita che esitano in linee genetiche stabili e riproducibili. Inoltre la specie umana e murina condividono il 99% del loro corredo genetico, presentano somiglianze nella anatomia delle strutture cerebrali, nella biochimica e nei parametri elettrofisiologici del sistema nervoso centrale, consentendo quindi la valutazione di questi modelli sperimentali in un'ottica traslazionale (37).

Attualmente i modelli murini sono considerati uno strumento fondamentale nello studio non solo dei fattori eziopatologici di natura genetica (mutazioni, CNV, ecc.), ma anche dello studio del contributo di altri fattori epigenetici e ambientali (inclusi insulti prenatali, attivazione immunitaria materna, esposizione durante lo sviluppo a farmaci o a contaminanti ambientali (38-41). Indubbiamente, i modelli animali forniscono informazioni essenziali per lo studio di molte patologie consentendo un'analisi dei meccanismi disfunzionali e lo sviluppo di strategie di trattamento, ma è necessario riconoscere, soprattutto nel caso dei disturbi neuropsichiatrici dell'età evolutiva, che nessun modello sarà mai in grado di "ricapitolare" integralmente le caratteristiche con cui la patologia si manifesta nella specie umana.

In generale, la validità dei modelli animali può essere stabilita sulla base di tre criteri fondamentali (42): il primo criterio è basato sulla *face validity* che stabilisce quanto i sintomi osservati nel modello animale somiglino a quelli causati dalla patologia. Il secondo criterio, la *construct validity*, in cui si valuta quanto il modello e la sindrome umana condividano le stesse cause d'insorgenza, come per esempio mutazioni genetiche o anomalie anatomiche, stabilendo il grado di coerenza tra il modello animale e la malattia. Il terzo criterio è la *predictive validity*, che rappresenta quanto il modello risponda alle stesse manipolazioni terapeutiche utilizzate in clinica. Come è facile immaginare, la messa a punto di un modello animale affidabile presenta notevoli problematiche, soprattutto nel caso delle patologie neuropsichiatriche e in particolare per quelle dell'età evolutiva: all'eziologia spesso multifattoriale (e quando monofattoriale, e.g. genetica comunque spesso caratterizzata da più polimorfismi, più CNV) non sempre del tutto nota, si aggiunge l'estrema variabilità fenotipica. Inoltre trattandosi di patologie che compaiono nelle prime fasi dello sviluppo postnatale sarebbe anche assai utile essere in grado di identificare alterazioni neurocomportamentali già prima dello stadio adulto, ma questi aspetti ontogenetici sono generalmente trascurati nell'ambito dello studio del fenotipo neuro comportamentale (43). Infine, è onesto ammettere che pur essendo possibile studiare nel topo anomalie nelle capacità cognitive di diversa natura, nell'interazione sociale reciproca e, forse, nella comunicazione, non si potrà mai giungere a identificare nel topo l'intero repertorio del comportamento umano, inclusi, ad esempio alcuni aspetti complessi quali ad esempio applicazioni della teoria della mente, o fenomeni di empatia, ecc.).

Si arriva quindi a concludere che al momento, per la maggior parte dei disturbi neuropsichiatrici del neurosviluppo non si dispone di caratteristiche patognomiche davvero univoche, che permettano, per fare un esempio volutamente complesso, di sviluppare modelli murini di schizofrenia che non si sovrappongano in parte con quelli dei disturbi dello spettro autistico (44).

In assenza di marcatori biologici di patologia, la diagnosi dei disturbi neuropsichiatrici dell'età evolutiva è attualmente basata sull'identificazione di comportamenti anomali. I modelli animali quindi si focalizzano sul fenotipo comportamentale con caratteristiche di *face validity*, cioè con caratteristiche fenotipiche simili a quelle identificate nella patologia umana in studio. Ad esempio, nel caso di modelli murini di Disturbi dello Spettro Autistico, la validazione si basa sulla identificazione di uno o più segni clinici caratteristici attraverso la "somministrazione" di test comportamentali che misurano i livelli di interazione e comunicazione sociale e comportamenti di natura ripetitiva. Poiché numerosi dati indicano un ruolo di fattori genetici nell'eziologia dell'autismo, nella ricerca preclinica del settore sono state generate linee murine geneticamente modificate (e più recentemente anche linee di ratti) con le stesse mutazioni riscontrate in alcune famiglie con soggetti ASD con l'intento di: valutare il ruolo di questi geni nell'eziologia del disturbo, analizzare i meccanismi biologici che sottendono il profilo comportamentale autistico osservato in queste linee mutanti e testare l'efficacia di potenziali trattamenti. Topi e ratti possono essere un valido modello sperimentale nel caso di patologie del neurosviluppo in cui siano evidenti alterazioni del comportamento sociale: entrambe le specie (ma soprattutto il ratto) esibiscono un ampio repertorio sociale, che va dal comportamento parentale con nidi anche comuni a più femmine, al gioco (in soggetti giovani), al comportamento aggressivo, di esplorazione sociale di soggetti non familiari, a risposte di corteggiamento. La ricerca preclinica deve tenere anche in considerazione eventuali cambiamenti nei criteri diagnostici identificativi: ad esempio sono state recentemente introdotte delle modifiche nei criteri diagnostici per ASD nel popolare manuale *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM 5)*. Due dei criteri diagnostici della precedente versione del testo (deficit nella qualità dell'interazione sociale reciproca e deficit di tipo comunicativo) sono stati fusi nel criterio "Deficit persistenti nella comunicazione sociale e nella interazione sociale in diversi contesti". È

interessante notare che questi cambiamenti nei criteri diagnostici dei clinici hanno certamente favorito il recente sviluppo di metodologie precliniche volte alla simultanea registrazione e valutazione di due aspetti del repertorio sociale, motivazione sociale e comunicazione bioacustica delle vocalizzazioni, che in passato erano stati solitamente analizzati separatamente. In assenza di marcatori diagnostici di altra natura, l'analisi comportamentale ha assunto un ruolo assai rilevante nel validare modelli murini di disturbi neuropsichiatrici dell'età evolutiva. In generale ci si focalizza sui quei domini comportamentali alterati nei pazienti, ma vengono effettuati spesso anche altri test comportamentali che possano fornire informazioni aggiuntive su altri aspetti comportamentali, per meglio definire la specificità dei domini compromessi, e/o eventuali comorbidità.

Complessivamente, i modelli animali preclinici possono fornire un contributo importante alla valutazione delle complesse interazioni tra gene-sviluppo e ambiente nell'eziopatogenesi dei disturbi neuropsichiatrici dell'età evolutiva e per la valutazione di potenziali interventi farmacologici e non.

## Bibliografia

1. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Prevalence of autism spectrum disorder among children aged 8 years - autism and developmental disabilities monitoring network, 11 sites, United States, 2010. *MMWR Surveill Summ.* 2014; 63(2):1-21.
2. Korvatska E, Van de Water J, Anders TF, Gershwin ME. Genetic and immunologic considerations in autism. *Neurobiology of Disease* 2002;9:107-25.
3. Folstein SE, Rosen-Sheidley B. Genetics of autism: complex aetiology for a heterogeneous disorder. *Nature Reviews Genetics* 2001; 2: 943-955.
4. Ozonoff S, Young GS, Carter A, Messinger D, Yirmiya N, Zwaigenbaum L, *et al.* Recurrence risk for autism spectrum disorders: a baby siblings research consortium study. *Pediatrics* 2011;128 (3):e488-e495.
5. Rutter M. Incidence of autism spectrum disorders: changes over time and their meaning. *Acta Paediatrica* 2005;94 (1):2-5.
6. Jamain S, Quach H, Betancur C, Råstam M, Colineaux C, Gillberg CI, *et al.* Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism. *Nature Genetics* 2003;34: 27-29.
7. Yan J, Oliveira G, Coutinho A, Yang C, Feng J, Katz C. Analysis of the neuroligin 3 and 4 genes in autism and other neuropsychiatric patients. *Molecular Psychiatry* 2005; 10: 329–332.
8. Bear M, M Huber, Warren ST. The mGluR theory of fragile X mental retardation. *Trends in Neuroscienze* 2004;27(7):370-7.
9. Tabuchi K, Blundell J, Etherton MR, Hammer RE, Liu X, Powell CG Südhof TC. A Neuroligin-3 Mutation Implicated in Autism Increases Inhibitory Synaptic Transmission in Mice. *Science* 2007;318 (5847):71-6.
10. Chugani DC. Serotonin in autism and pediatric epilepsies. *Developmental Disabilities Research Reviews* 2004;10(2):112-6.
11. Philippi A, Roschmann E, Tores F, Lindenbaum P, Benajou A, Germain-Leclerc L, *et al.* Haplotypes in the gene encoding protein kinase c-beta (PRKCB1) on chromosome 16 are associated with autism. *Molecular Psychiatry* 2005;10:950-60.
12. Persico AM, Bourgeron T. Searching for ways out of the autism maze: genetic, epigenetic and environmental clues. *Nature and Nurture in Brain Development and Neurological Disorders* 2006;29 (7):349-58.

13. Bill BR, Geschwind DH. Genetic advances in autism: heterogeneity and convergence on shared pathways. *Current Opinion in Genetics and Development* 2009;19(3):271-8.
14. Durand CM, Betancur C, Boeckers TM, Bockmann J, Chaste P, Fauchereau F, *et al.* Mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 are associated with autism spectrum disorders. *Nature Genetics* 2006;39:25-7.
15. State MW, Šestan N. Neuroscience. The emerging biology of autism spectrum disorders. *Science* 2012;337(6100):1301-3.
16. Penzes P, Cahill ME, Jones KA, Van Leeuwen JE, Woolfrey KM. Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders. *Nature Neuroscience* 2011;14:285-93.
17. Deisseroth K. Optogenetics and psychiatry: applications, challenges, and opportunities. *Biology Psychiatry* 2012;71:1030-2.
18. Courchesne E. Brain development in autism: Early overgrowth followed by premature arrest of growth. *Developmental Disabilities Research Reviews* 2004;10(2):106-11.
19. Amaral DG, Schumann CM, Nordahl CW. Neuroanatomy of autism. *Trends in Neuroscience* 2008;31(3):137-45.
20. Herbert MR. Large brains in autism: the challenge of pervasive abnormality. *Neuroscientist* 2005;11(5):417-40.
21. Minshew NJ, Williams DL. The new neurobiology of autism. Cortex, connectivity, and neuronal organization. *Archives of Neurology* 2007;64(7):945-50.
22. Mountcastle VB. The columnar organization of the neocortex. *Brain* 1997;120:701-22.
23. Bauman ML, Kemper TL. Neuroanatomic observations of the brain in autism: a review and future directions. *International Journal of Developmental Neuroscience* 2005;23(2-3):183-7.
24. Casanova MF, Van Kooten IAJ, Switala AE, Van Engeland H, Heinsen H, Steinbusch HWM. Minicolumnar abnormalities in autism. *Acta Neuropathologica* 2006;112(3):287-303.
25. Holt R, Monaco AP. Links between genetics and pathophysiology in the autism spectrum disorders. *EMBO Molecular Medicine* 2011;3:438-50.
26. Dapretto M, Davies MS, Pfeifer JH, Scott AA, Sigman M, Bookheimer SY, *et al.* Understanding emotions in others: mirror neuron dysfunction in children with autism spectrum disorders. *Nature Neuroscience* 2005;9:28-30.
27. Goines PE, Ashwood P. Cytokine dysregulation in autism spectrum disorders (ASD): Possible role of the environment. *Neurotoxicology and Teratology* 2013;36:67-81.
28. D'Amelio M, Ricci I, Sacco R, D'Agruma L, Muscarella LA, *et al.* Paraoxonase gene variants are associated with autism in North America, but not in Italy: possible regional specificity in gene-environment interactions. *Molecular Psychiatry* 2005;10:1006-16.
29. Needleman HL, Gunnoe C, Leviton A, Reed R, Peresie H, Maher C, *et al.* Deficits in psychologic and classroom performance of children with elevated dentine lead levels. *New England Journal of Medicine* 1979;300:689-95.
30. Oken E, Bellinger DC. Fish consumption, methylmercury and child neurodevelopment. *Current Opinion in Pediatric* 2008;20(2):178-83.
31. Marisa F, Naujokas MF, Anderson B, Ahsan H, Aposhian HK, Graziano JH. The broad scope of health effects from chronic arsenic exposure: update on a worldwide public health problem. *Environmental Health Perspectives* 2013;121(3) :295.
32. Eskenazi B, Rosas LG, Marks AR, Bradman A, Harley K, Holland N, *et al.* Pesticide Toxicity and the Developing Brain. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology* 2008;102(2):228-36.
33. Auyeung B, Baron-Cohen S, Ashwin E, Knickmeyer R, Taylor K, Hackett G. Fetal testosterone and autistic traits. *British Journal of Psychology* 2009;100(1):1-22.

34. Perera F, Herbstman J. Prenatal exposures, epigenetics, and disease. *Reproductive Toxicology* 2011;31(3):363-73.
35. Pickett J, London E. The neuropathology of autism: a review. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 2005;64(11):925-35.
36. Kelleher III RJ, Bear MF. The autistic neuron: troubled translation? *Cell* 2008;135(3):401-6.
37. Tecott LH. The genes and brains of mice and men. *The American Journal of Psychiatry* 2003;160(4):646-56.
38. Abrahams BS, Geschwind DH. Advances in autism genetics: on the threshold of a new neurobiology. *Nature Reviews Genetics* 2008;9:341-55.
39. Berman RF, Pessah IN, Mouton PR, Mav D, Harry J. Low-level neonatal thimerosal exposure: further evaluation of altered neurotoxic potential in SJL mice. *Toxicology Science* 2008;101(2):294-309.
40. Buxbaum JD. Multiple rare variants in the etiology of autism spectrum disorders. *Dialogues in Clinical Neuroscience* 2009;11(1):35-43.
41. Singer HS, Morris C, Gause C, Pollard M, Zimmerman AW, Pletnikov M. Prenatal exposure to antibodies from mothers of children with autism produces neurobehavioral alterations: a pregnant dam mouse model. *Journal of Neuroimmunology* 2009;211(1-2):39-48.
42. Crawley JN. Mouse behavioral assays relevant to the symptoms of autism. *Brain Pathology* 2007;17(4):448-59.
43. Branchi I, Alleva E, Costa LG. Effects of perinatal exposure to a polybrominated diphenyl ether (PBDE 99) on mouse neurobehavioural development. *NeuroToxicology* 2002;(3):375-84.
44. Papaleo F, Lipska BK, Weinberger DR. Mouse models of genetic effects on cognition: Relevance to schizophrenia. *Neuropharmacology* 2012;62(3):1204-20.