

TITOLO DIVULGATIVO: I difetti dell'ippocampo influenzano la memoria sociale nell'autismo e nei disturbi correlati

SOTTOTITOLO SCIENTIFICO: Ruolo del settore ippocampico CA2 nei difetti di memoria sociale correlati all'autismo

GRUPPO DI STUDIO: Sandra Guidi (DIBINEM); Fiorenza Stagni (QUVI), Marco Emili (QUVI), Beatrice Uguagliati (DIBINEM), Enrico Cherubini (EBRI), Brijesh Modi (EBRI)

Il disturbo dello spettro autistico (ASD) si manifesta precocemente ed influenza la comunicazione e il comportamento. Le persone con ASD hanno difficoltà a comunicare e interagire con altre persone, interessi ristretti e comportamenti ripetitivi (1). Vari disturbi del neurosviluppo di origine genetica tra cui la sindrome di Down (DS) sono correlati all'ASD. La DS è il disturbo genetico più comune (incidenza 1:700/1000 nascite) associato a disabilità intellettiva che colpisce circa 6 milioni di persone nel mondo. I difetti cognitivi della DS includono un ritardato sviluppo del linguaggio e deficit nella memoria spaziale e a lungo termine (2). Caratteristica centrale comune tra ASD e i disturbi correlati all'autismo (ARD) è il deficit nel comportamento sociale, non correlato alla disfunzione cognitiva, che comprende l'incapacità di avviare interazioni sociali, uno sviluppo alterato del linguaggio e menomazioni nell'interazione sociale non verbale. I difetti nel corretto stabilirsi dei circuiti cerebrali sono il comune denominatore di diversi disordini del neurosviluppo tra cui gli ARD. Questi difetti sono causati da alterazioni macroscopiche dell'anatomia cerebrale e da modificazioni più sottili nella funzione sinaptica (sbilanciamento di eccitazione/inibizione). L'ippocampo gioca un ruolo centrale in diversi disordini del neurosviluppo, in considerazione delle sue estese connessioni con regioni corticali e sottocorticali e del suo ruolo cruciale nella memoria e nel comportamento adattivo. Ci sono prove crescenti di difetti ippocampali nell'ASD, nella DS ed in molte altre condizioni patologiche. Le alterazioni di questa struttura riguardano la cellularità, l'architettura dendritica, la densità delle spine dendritiche, l'eccessiva inibizione e la compromissione della plasticità sinaptica (3; 4; 5).

Funzionalmente, segnali provenienti da cortecce associative polimodali sono incanalati verso la formazione dell'ippocampo (HF) dalla corteccia entorinale (CE). Questi vengono elaborati dal cosiddetto circuito trisinaptico dell'HF, formato da neuroni del giro dentato e dei settori ippocampici CA3 e CA1. Le proiezioni provenienti da CA1 ritrasmettono segnali elaborati alla CE che, a sua volta, proietta alle cortecce associative polimodali. Questo circuito è fondamentale nella memoria dichiarativa a lungo termine. Oltre a dare origine a questi segnali in uscita i settori CA3 e CA1 sono interconnessi con altre strutture corticali e con numerose strutture sottocorticali (6). Queste estese connessioni spiegano la partecipazione dell'HF ad una grande varietà di funzioni cerebrali. Il settore CA2 ha una popolazione specifica di neuroni, dotati di proprietà funzionali diverse da quelle dei campi vicini e ha connessioni specifiche con strutture corticali e sottocorticali (7). Inoltre, riceve un input diretto dalla CE (8), il che implica che possa funzionare indipendentemente dal circuito trisinaptico e svolgere un ruolo specifico in comportamenti ippocampo-dipendenti.

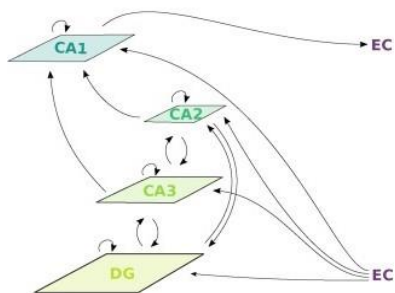


Figura 1. Circuiti ippocampali (DG: fascia dentata ippocampale; EC: corteccia entorinale)

La memoria di riconoscimento sociale è una funzione gravemente compromessa nell'autismo. Recentemente è stato dimostrato che topi con lesioni di CA2 presentano compromissione nel riconoscimento sociale (9). Questo suggerisce che la regione CA2 dell'HF faccia parte dei circuiti neuronali coinvolti nella memoria sociale. Al fine di ottenere dirette informazioni sulla funzione di CA2 è stato creato un modello di topo in cui silenziare specificamente i suoi neuroni inducendo una compromissione della memoria sociale (7). Il ruolo di CA2 nelle diverse sfaccettature dell'autismo non è ancora noto. Molto poco si sa del ruolo della stessa regione nei difetti comportamentali della DS correlati all'autismo. Scopo del nostro studio era valutare i difetti anatomici e funzionali di questa regione in due

modelli murini differenti, il topo Ts65Dn, modello di DS utilizzato dal gruppo di UNIBO, ed un topo knock-out per le neuroligine (NLG3) allevato ad EBRI, modello di una forma non sindromica di autismo. Il sopraggiungere della pandemia COVID-19 non ci ha permesso di collaborare come previsto con il gruppo del Prof. Cherubini all'EBRI. Abbiamo comunque caratterizzato la regione CA2 nel topo Ts65Dn.

PIANO SPERIMENTALE

Per studiare il coinvolgimento di CA2 nei deficit di memoria sociale abbiamo utilizzato 6 maschi Ts65Dn e 6 maschi euploidi di 3 mesi di età. Abbiamo testato il comportamento degli animali utilizzando una batteria di test riconosciuti dalla comunità scientifica per l'analisi dell'attività ippocampica. Abbiamo eseguito il test Open Field, il test di riconoscimento di oggetti nuovi (Novel Object Recognition, NOR) e il test Morris Water Maze (MWM). Per l'analisi statistica del comportamento, è stata utilizzata un'ANOVA per misure ripetute elaborando dati comportamentali riordinati in blocchi di prove. I confronti post hoc sono stati eseguiti utilizzando test-T appaiati con la correzione di Bonferroni. I dati non parametrici sono stati analizzati utilizzando il test di Kruskal-Wallis. Abbiamo anche valutato l'architettura neuronale di questa regione analizzando l'estensione dell'albero dendritico nel cervello dei topi dopo l'impregnazione con il metodo Golgi-Cox. Questa è una tecnica istologica in grado di marcare l'albero dendritico di alcune cellule in modo casuale. Abbiamo ottenuto sezioni (90 μ m) dall'emisfero cerebrale impregnato che sono state analizzate con l'aiuto di un software dedicato (Image Pro-Plus) collegato ad un microscopio ottico (ingrandimento finale 450X) con cui abbiamo tracciato le ramificazioni dendritiche nei neuroni piramidali della regione CA2.

RISULTATI

L'Open Field test è usato per valutare i livelli di attività locomotoria generale, il comportamento legato all'ansia e la volontà di esplorare negli animali. Diversi modelli murini di autismo hanno mostrato deficit del livello di attività e ridotto interesse nell'esplorazione dello spazio rispetto agli animali euploidi (EU). In questo test gli animali vengono posti in un'arena per 10 minuti. Vengono misurati gli attraversamenti dei diversi quadranti dell'arena, le impennate al muro (movimenti alternati di posizionamento degli arti anteriori sul muro) e il grooming (strofinamento delle zampe anteriori e lavaggio del viso). I risultati indicano che i topi Ts65Dn mostrano una riduzione di grooming rispetto all'EU. Questa riduzione è associata con lo stato di depressione e con il ridotto interesse per il comportamento sociale (Fig. 2).

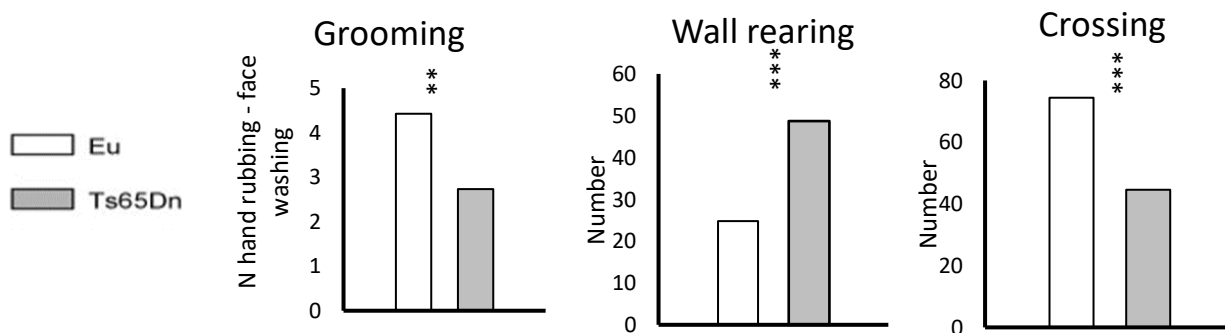


Figura 2. Numero medio di sfregamento delle zampe e di lavaggio del muso, di sollevamento al muro e di attraversamento dell'arena dell'Open Field test di 6 topi Ts65Dn e 6 topi euploidi. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$ (Test di Bonferroni dopo ANOVA).

Il topo Ts65Dn mostra un aumento del tempo trascorso nelle vicinanze della parete rispetto ai topi EU, comportamento riconducibile a quello stereotipato tipico dei soggetti con ASD. L'analisi dell'attraversamento dell'area dimostra che il topo Ts65Dn è meno attivo dell'EU. Questo è un comportamento correlato con l'ansia che induce una riduzione della curiosità di esplorare un'area aperta. Il topo EU mostra una maggiore curiosità nell'esplorare l'ambiente rispetto al topo Ts65Dn. La regione CA2 è coinvolta nel fenomeno dell'abitudine ad un luogo; più l'animale acquisisce familiarità con un ambiente più si riduce la componente ansiosa. I dati ci indicano che il comportamento ansioso nel topo Ts65Dn è fortemente accentuato.

Con il NOR test si valutano diverse fasi di apprendimento e memoria. Il test si svolge in tre sessioni: una sessione di abitudine all'ambiente, una sessione di allenamento e una sessione di test. L'addestramento comporta l'esplorazione visiva di due oggetti identici; la sessione di test comporta la sostituzione di uno degli oggetti precedentemente esplorati con un oggetto nuovo. Poiché i roditori hanno una preferenza innata per la novità, chi ricorda l'oggetto familiare passerà più tempo ad esplorare l'oggetto nuovo.

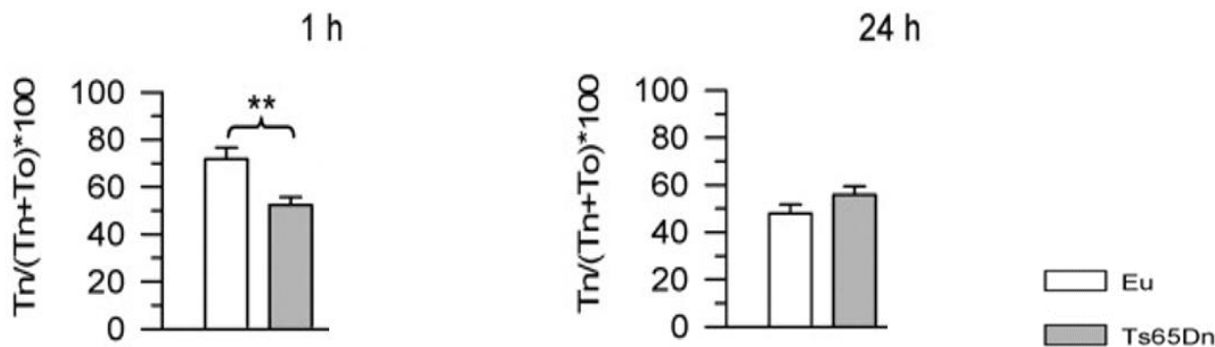
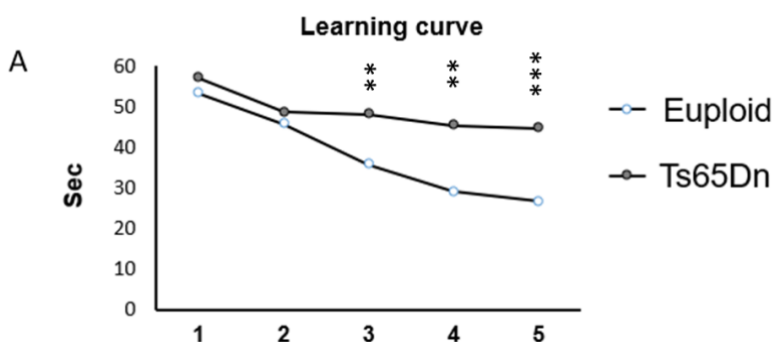


Figura 3. Indice di discriminazione del nuovo oggetto dopo un periodo di 1 ora e 24 ore dalla somministrazione dell'addestramento con due oggetti identici. ** $p < 0.01$ (Test di Bonferroni dopo ANOVA). Abbreviazioni: Tn, tempo di esplorazione del nuovo oggetto; To, tempo di esplorazione del vecchio oggetto.

L'indice di discriminazione per il test di riconoscimento degli oggetti ha mostrato un deficit nei topi Ts65Dn dopo un periodo di attesa di 1h dall'addestramento che scompare dopo un periodo di attesa di 24h (Fig. 3). L'indice di discriminazione è indicativo della curiosità comportamentale dei topi. Nelle patologie ASD la riduzione della curiosità è legata alla compromissione della funzione della memoria sociale. Il nostro modello con questi comportamenti è rappresentativo di questo aspetto patologico.

Il MWM è utilizzato per testare i meccanismi dell'apprendimento e della memoria spaziale. Gli animali sono posti in una piscina in posizioni di partenza differenti nei diversi giorni di addestramento e hanno il compito di nuotare per trovare una piattaforma nascosta sotto il livello dell'acqua. I topi imparano rapidamente a nuotare verso la piattaforma con latenze di ricerca decrescenti e percorsi di nuoto più diretti. Il sistema di tracciamento misura la latenza di ricerca della piattaforma, la lunghezza del percorso, la velocità di nuoto e la direzionalità in relazione alla posizione della piattaforma. Dopo 5 giorni di formazione, nel test finale la piattaforma viene rimossa e l'animale ha 60 secondi di tempo per nuotare. Un topo ben addestrato nuoterà verso il quadrante della piscina dove era posta la piattaforma nei giorni di addestramento. Nuoterà ripetutamente attraverso quel quadrante cercando la piattaforma per poi cercarla negli altri quadranti.



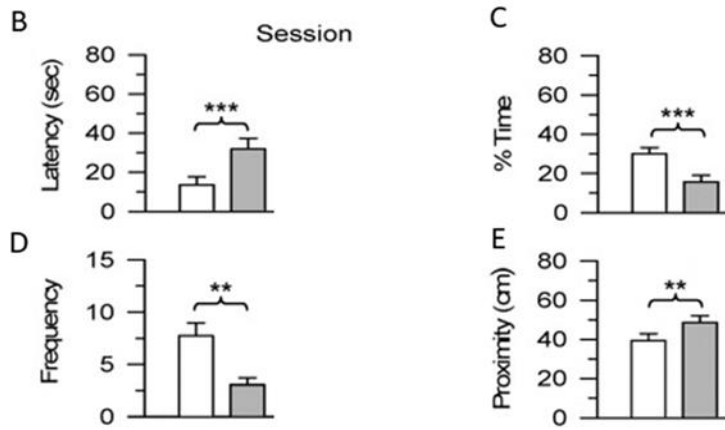


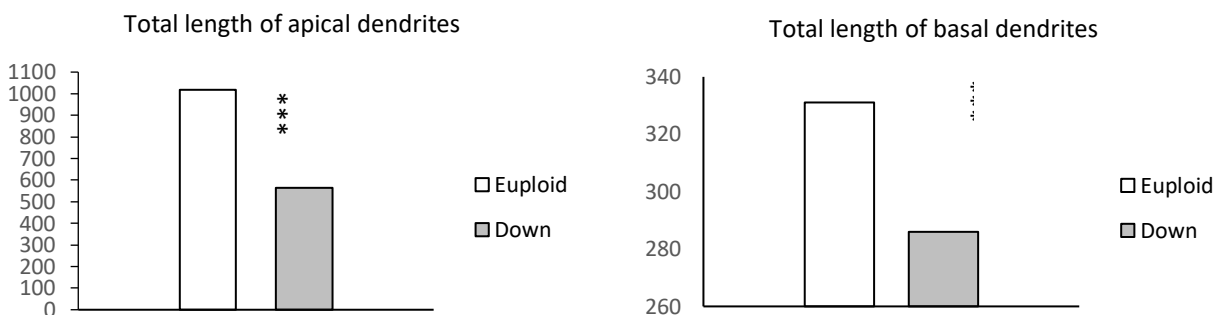
Figura 4. (A) tempo medio speso dai topi Ts65Dn ed euploidi per trovare la piattaforma durante i 5 giorni di addestramento. (B) latenza durante il test dell'ultimo giorno quando la piattaforma viene eliminata. (C) tempo medio speso nel quadrante della piattaforma nascosta. (D) Frequenza media di ingressi nel quadrante dove era posizionata la piattaforma nascosta. (E) Media della vicinanza (in cm) alla piattaforma. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$ (Test di Bonferroni dopo ANOVA).

I grafici mostrano che i topi Ts65Dn non hanno imparato a ricordare la posizione della piattaforma nel periodo di addestramento rispetto agli EU (Fig. 4 A). Nel test finale i topi Ts65Dn hanno cercato la piattaforma con una latenza più lunga rispetto agli EU (Fig. 4 B), hanno trascorso una quantità ridotta di tempo nel quadrante della piattaforma (Fig. 4 C), sono entrati nel quadrante con una frequenza ridotta (Fig. 3 D) e hanno nuotato ad una distanza maggiore dalla piattaforma (Fig. 3 E). L'ippocampo svolge un ruolo chiave nella risoluzione del compito legato al test MWM. La regione CA3 è coinvolta nell'autolocalizzazione e nella riproduzione del percorso. Conosciamo la correlazione tra l'attività della CA3 e il suo potenziamento giocato dall'influenza della CA2.

Presi insieme, tutti i risultati comportamentali mostrano che la memoria sociale dipendente dall'attività dell'ippocampo nei topi adulti Ts65Dn è fortemente compromessa. Questa attività è normalmente supportata dal loop ippocampale dove l'area CA2 gioca un ruolo fondamentale nel rinforzo di una traccia di memoria sociale fortemente compromessa in questi animali.

Per correlare i difetti comportamentali con un alterato sviluppo anatomico della CA2 abbiamo studiato l'architettura neuronale di questa regione. Abbiamo misurato la lunghezza totale dell'albero dendritico basale e apicale e la lunghezza dei diversi ordini di ramificazione in entrambe le porzioni di albero dendritico e valutato il numero di ramificazioni in ogni ordine.

In tutte le nostre analisi abbiamo trovato una crescita ridotta delle ramificazioni dendritiche e del numero di rami nei neuroni CA2 nel topo Ts65Dn rispetto all'EU. In particolare, abbiamo notato una riduzione della lunghezza totale dell'albero dendritico in entrambe le porzioni apicale e basale (Fig. 5).



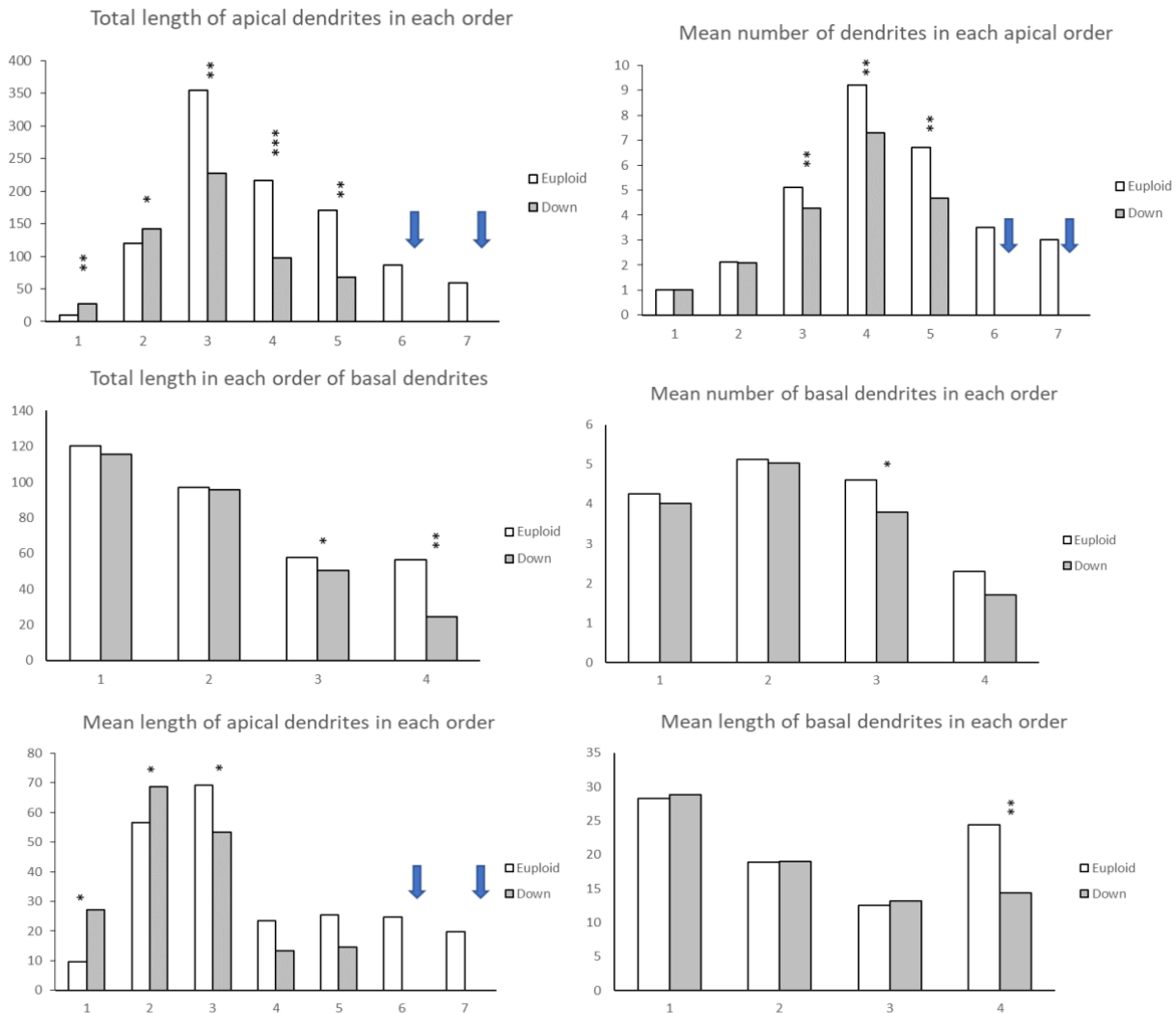


Figura 5. Caratterizzazione morfologica dell'arborizzazione dendritica dei neuroni piramidali della regione ippocampale CA2 del topo Ts65Dn.

Abbiamo analizzato la lunghezza totale dei rami e il numero di rami presenti in ogni ordine di ramificazione; entrambi mostrano una riduzione nei topi Ts65Dn rispetto all'EU. In particolare, i topi trisomici mostrano la porzione apicale con un ridotto numero di ordini di ramificazione e una riduzione della lunghezza totale in ogni ordine. Nei dendriti basali, sia topi trisomici che EU hanno lo stesso ordine di ramificazioni ma topi Ts65Dn mostrano una riduzione del numero e della lunghezza dei rami nella porzione distale. L'ultima analisi effettuata è il confronto della lunghezza media dei rami in ogni ordine di ramificazione apicale e basale dell'albero dendritico. Abbiamo notato il mantenimento di una riduzione nei topi Ts65Dn rispetto all'EU. Tutti questi risultati mostrano un'alterazione nello sviluppo e nella maturazione dei neuroni piramidali che formano la regione CA2. È ipotizzabile che questi difetti siano legati alla compromessa memoria sociale dei topi Ts65Dn rispetto agli EU. La maturazione difettosa dei neuroni piramidali nei topi trisomici potrebbe indurre una riduzione dell'attività sinaptica di quell'area. La ridotta attività dell'area CA2 porterebbe ad una necessaria riduzione del loop ippocampale che induce una compromissione nella formazione della memoria sociale che caratterizza il modello murino di sindrome di Down.

BIBLIOGRAFIA

1. Park HR, Lee JM, Moon HE, Lee DS, Kim BN, Kim J, Kim DG, Paek SH. A Short Review on the Current Understanding of Autism Spectrum Disorders. *Exp Neurobiol*. 2016 Feb;25(1):1-13.
2. Karimi A, Nelson EL. Motor-language links in children with Down syndrome: a scoping review to revisit the literature with a developmental cascades lens. *Front Psychol*. 2023 Oct 2;14:1275325.
3. Guidi S, Ciani E, Bonasoni P, Santini D, Bartesaghi R. Widespread proliferation impairment and hypocellularity in the cerebellum of fetuses with down syndrome. *Brain Pathol*. 2011 Jul;21(4):361-73.
4. Chapleau CA, et al. Dendritic spine pathologies in hippocampal pyramidal neurons from Rett syndrome brain and after expression of Rett-associated MECP2 mutations. *Neurobiol Dis*. 2009 Aug;35(2):219-33.
5. Bostrom C, Yau SY, Majaess N, Vetrici M, Gil-Mohapel J, Christie BR. Hippocampal dysfunction and cognitive impairment in Fragile-X Syndrome. *Neurosci Biobehav Rev*. 2016 Sep;68:563-574.