

Effetti dell'alcol sul neurosviluppo: dai meccanismi molecolari alle prospettive terapeutiche

Luigi Tarani*, Elisabetta Gerace**, Esi Domi***,
Valentina Castelli****, Guido Mannaioni*****

*Dipartimento Materno Infantile e Scienze Urologiche, Sapienza Università di Roma,
Centro di Riferimento Regionale di Malattie Rare e Genetica Clinica,
Azienda Ospedaliera-Universitaria Policlinico Umberto I

**Dipartimento di Scienze della Salute, Università degli Studi di Firenze

***Scuola di Scienze del Farmaco e dei Prodotti della Salute, Università di Camerino

****Dipartimento di Biomedicina, Neuroscienze e Diagnostica Avanzata,
Università degli Studi di Palermo

*****Dipartimento di Neuroscienze, Psicologia, Area del Farmaco e Salute del Bambino (NEUROFARBA),
Università degli Studi di Firenze, SOD Tossicologia Medica e Centro Antiveleni
Azienda Ospedaliero Universitaria Careggi, Firenze

L'aumento dell'esposizione perinatale a droghe, sostanze di abuso, agenti patogeni o deficit nutrizionali potrebbe spiegare in parte l'elevata prevalenza dei disturbi neuropsichiatrici che si sono verificati negli ultimi decenni. In particolare, il cervello in via di sviluppo è particolarmente vulnerabile all'alcol: bere durante la gravidanza può portare a una serie di disturbi fisici, dell'apprendimento e del comportamento nel neonato e provocare alterazioni molecolari persistenti dei circuiti neuronali clinicamente definiti con il termine sindrome feto-alcolica (*Fetal Alcohol Spectrum Disorders*; FASD). La FASD è una patologia poco riconosciuta (incidenza globale 0,77%; Lange *et al.*, 2017) che comprende alterazioni dello sviluppo indotte dall'alcol, che persistono nell'età adulta, con meccanismi che non sono ancora completamente chiariti. Durante il 21° Congresso Nazionale della SITOX abbiamo presentato un simposio che ha avuto come obiettivo quello di analizzare gli effetti dell'alcol sul neurosvi-

luppo, dall'età fetale all'adolescenza, attraverso un'analisi clinica e preclinica, fornendo esempi su come l'alcol possa portare alle alterazioni funzionali e comportamentali, attraverso approcci molecolari, elettrofisiologici e analisi comportamentali, dai meccanismi molecolari alle prospettive terapeutiche.

Il simposio è iniziato con la presentazione del Prof. Luigi Tarani (Pediatra, Genetista e Professore Associato di Pediatria presso la Sapienza Università di Roma) che ha descritto le caratteristiche cliniche della FASD. Questa sindrome eterogenea e complessa si manifesta attraverso una serie di sintomi che comprendono alterazioni fisiche, neurologiche, cognitive e comportamentali (Hoyme HE *et al.*, 2016). Nonostante la FASD rappresenti un'importante causa di ritardo mentale, nella maggior parte dei casi è sotto diagnosticata (Rangmar J *et al.*, 2015), e quando possibile, la diagnosi è generalmente tardiva a causa della sua complessità. Spesso la diagnosi è una diagnosi

di esclusione, perché non esiste attualmente un test genetico o biomolecolare che possa confermare questa patologia. La difficoltà nella diagnosi è legata a motivi relativi a stigma sociali, alla complessità della diagnosi della sindrome stessa, all'interpretazione delle anomalie facciali e alla presenza di particolari caratteristiche che possono manifestarsi anche in altre condizioni patologiche, come il deficit dell'attenzione e iperattività (McLennan JD, 2015). Molti individui affetti da sindrome feto alcolica infatti, sviluppano alterazioni neurologiche lievi, come piccoli deficit nel quoziente intellettivo, dell'attenzione o della memoria, che però non richiamano l'attenzione clinica (Rangmar J *et al.*, 2015, Mattson SN *et al.*, 1997), proprio perché sono difficilmente diagnosticabili e spesso in età avanzata. Visto che non si conosce la soglia del danno teratogeno dell'alcol, si consiglia (impone) la tolleranza zero verso il suo uso in gravidanza. Sfortunatamente, non esiste una cura per la FASD e i meccanismi molecolari alla base di questa patologia sono ancora poco conosciuti.

La seconda presentazione del simposio, esposta dalla Dr.ssa Elisabetta Gerace, (ricercatrice presso il Dipartimento di Scienze della Salute dell'Università degli Studi di Firenze) ha affrontato proprio questo tema, andando ad analizzare i meccanismi molecolari alterati dall'esposizione all'alcol durante il neurosviluppo in modelli sperimentali *in vitro* e *in vivo*. In questi studi, è stato individuato un meccanismo di regolazione della neurotrasmissione dei recettori per il glutammato di tipo AMPA, recettori canale che regolano la neurotrasmissione eccitatoria rapida del sistema nervoso centrale. È stato osservato infatti che l'esposizione cronica all'etanolo induce la produzione di due specifici microRNA (mir-137 e il mir-501-3p) in fettine di ippocampo di ratto che, attraverso un meccanismo di repressione traduzionale di una delle subunità del recettore AMPA (denominata GluA1) andrebbero a

inibire l'espressione del recettore, portando a una riduzione sia dell'espressione proteica che funzionale (risposta elettrica). Questa inibizione è mediata dal recettore metabotropico del glutammato di tipo 5 (mGlu5). Infatti, l'applicazione dell'antagonista selettivo per l'mGlu5 MPEP ha ripristinato sia la over-espressione dei miRNA indotta dall'alcol che i cambiamenti funzionali AMPA-mediati nei neuroni ippocampali della CA1. Queste alterazioni sono state poi validate in un modello murino di esposizione prenatale all'alcol. Esperimenti condotti in topi pre-adolescenti esposti a etanolo durante il primo trimestre di gestazione, hanno mostrato una riduzione significativa della risposta AMPA mediata registrata in ippocampo, associata ad un'alterata espressione delle proteine sinaptiche eccitatorie. Inoltre, questi topi presentano una significativa riduzione della curva di crescita, in accordo con quanto osservato nei bambini FASD. In particolare, i risultati di questo studio suggeriscono che l'esposizione prenatale all'etanolo porta ad una disfunzione della neurotrasmissione eccitatoria, che potrebbe essere responsabile di alterazioni del neurosviluppo e contribuire alla comprensione della patogenesi della FASD. Inoltre, il meccanismo di regolazione, mediato da specifici microRNA (mir-137 e 501-3p) e dai recettori mGlu5, potrebbe indicare due potenziali target di intervento per la terapia di questa patologia.

La terza presentazione del simposio, esposta dalla Dr.ssa Esi Domi (ricercatrice della Scuola di Scienze del Farmaco e dei Prodotti della Salute, dell'Università di Camerino), ha mostrato come lo stress vissuto durante il periodo postnatale sia un fattore di rischio nello sviluppo del disturbo da uso di alcol in età adulta. Il modello di stress sperimentale è stato quello della separazione materna dei cuccioli di ratto dalla madre, un modello ben consolidato nel contesto della ricerca preclinica sull'alcol. In particolare,

maschi e femmine di ratti geneticamente selezionati per la loro alta preferenza alcolica, i *Marchigian Sardinian alcohol preferring* (mSP), e ratti Wistar sono stati sottoposti a lievi privazioni sociali ripetute durante la terza settimana dopo la nascita. Gli effetti dell'isolamento sociale precoce (ESI) sono stati poi analizzati a livello del sistema dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene, sistema extraipotalamico e sul comportamento di disturbo da alcol in età adulta. Nello specifico sono stati monitorati i livelli di corticosterone, l'espressione genica e proteica dei recettori per i glucocorticoidi (GR) nella corteccia prefrontale (PFC) e l'amigdala (AMG), ed i comportamenti correlati all'alcol dal giorno postnatale 35 (PND35). I risultati hanno mostrato che l'ESI induce una maggiore espressione di GR nella PFC dei ratti mSP maschi e una significativa riduzione dell'espressione di GR nella PFC dei ratti femmina Wistar isolate. A livello dell'AMG, l'isolamento materno non ha indotto cambiamenti di espressione del GR e non ha alterato i livelli di corticosterone. La yohimbina, antagonista dei recettori adrenergici α_2 , utilizzata come fattore di stress farmacologico, ha portato ad un aumento di assunzione di alcol in entrambe le linee di ratto (ratti Wistar e mSP) indipendentemente dall'ESI. Mentre dopo un periodo di estinzione, le femmine di ratto mSP risultano più sensibili agli effetti della ricaduta all'alcol indotta dalla yohimbina. Nel complesso, i risultati di questo studio indicano che l'isolamento sociale precoce, seppur lieve, influenza l'espressione dei recettori GR in maniera dipendente dal ceppo e dal sesso. Una maggiore funzionalità del sistema GR in risposta all'ESI potrebbe conferire invece ai ratti mSP maschi un ruolo protettivo e una risposta adattiva allo stress prevenendo la ricaduta nell'uso di alcol.

La quarta presentazione del simposio, presentata dalla Dr.ssa Valentina Castelli (assegnista di ricerca presso il Dipartimento

di Biomedicina, Neuroscienze e Diagnostica Avanzata dell'Università degli Studi di Palermo) è stata centrata sui recenti dati ottenuti dal gruppo di ricerca in Neuropsicofarmacologia, diretto dalla Prof.ssa Carla Cannizzaro, sull'impatto dell'*alcohol binge drinking* (ABD) sulla reattività emotiva e la risposta allo stress psicosociale in adolescenza. L'*engagement* del *binge drinking* tra gli adolescenti, il modello di bevuta tipico delle regioni del Nord-Europa caratterizzato dal consumo di alcolici fuori pasto in quantità intossicanti, mette a rischio il neurosviluppo di regioni cruciali per il controllo emotivo e strategie di *coping* al contesto socio-culturale. La ricerca finanziata dalla *European Foundation for Alcohol Research*, ha catturato un'istantanea delle abitudini di consumo di alcol e le relative motivazioni, nonché la vulnerabilità a un profilo psicopatologico negli studenti delle scuole superiori del Sud Italia. L'*Alcohol Use Disorder Identification Test – Consumption* (AUDIT-C) ha permesso di rilevare che del totale di 759 studenti intervistati di entrambi i sessi, dai 18 ai 20 anni, l'85% consuma alcol e, tra questi, il 28% è *binge drinker*, con prevalenza simile tra i due sessi. I dati ottenuti dal *Drinking Motives Questionnaire-Revised Short Form* mostrano che l'input verso il *binge drinking* è generato da *Coping drinking motive* – dalla necessità di attenuare le emozioni negative – *Conformity motive* – per evitare il rifiuto sociale – e *Enhancement motive* – dalla necessità di migliorare il proprio umore. Questi dati, i primi del capoluogo Siciliano, confermano che anche nel territorio del mediterraneo con il più forte core tradizionale e culturale, il *pattern* di bevuta si sta allineando al modello nordico. Infine, elevato score AUDIT-C, indicativo del *pattern* di *binge-drinking*, è predittivo del profilo psicopatologico rilevato mediante il *Millon Clinical Multiaxial Inventory-Third Ed.* Il dato clinico ottenuto non permette di indicare una relazione temporale dell'insorgenza del *pat-*

tern di bevuta *binge* e del profilo psicopatologico, ostacolando l'implementazione di interventi specifici. Pertanto, è stato impiegato il modello animale in cui i ratti maschi adolescenti sono stati esposti all'alcol mediante un paradigma intermittente *binge-like* e testati per un fenotipo vulnerabile alla disregolazione emotiva durante l'astinenza prolungata. Nello specifico, dopo 10 giorni dall'ultima esposizione all'alcol, i ratti sono stati valutati per il comportamento *anxiety-like* nel test di interazione sociale e nel *novelty suppressed feeding test* e per i livelli di resilienza tramite il *forced swimming stress test*. Infine, una coorte separata di ratti maschi adolescenti è stata valutata per la reattività dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene mediante esposizione al paradigma di stress sociale. I ratti adolescenti esposti al *binge-like* alcol mostrano un elevato *integrated z-score* per l'ansia, indotta dall'interazione sociale e da un contesto ambientale nuovo; una riduzione del numero dei tentativi di fuga nel *forced swimming stress* che suggerisce una ridotta resilienza all'ambiente avverso; livelli di corticosterone basali più elevati, contro una blanda risposta allo stress sociale, rispetto ai rispettivi controlli. Nel complesso, i risultati preclinici suggeriscono che l'ABD in adolescenza induce il verificarsi di una disregolazione emozionale e di un'alterata risposta allo stress, sia da un punto di vista comportamentale che neurobiologico. Questi dati hanno una grande rilevanza traslazionale, poichè forniscono una chiave interpretativa per considerare il *binge drinking* come un fattore di vulnerabilità nell'affrontare le sfide tipiche della giovane età, consolidando la necessità dell'implementazione di strategie di prevenzione e di recupero.