

## LEZIONE 20 – 15.12.2020

Abbiamo il piacere oggi di avere con noi la dott. Sara Mascheretti. Sara ha un dottorato di ricerca, è psicologa, ha studiato a Milano al San Raffaele e ha fatto il dottorato sotto la supervisione di Cecilia Marino e Marco Battaglia, che sono due famosi ricercatori che si occupano da tanti anni di genetica in ambito della psicopatologia. Ho avuto la fortuna di condividere molti lavori con lei, visto che siamo neuropsicologi lei ha una forte competenza in genetica: non solo genetica familiare, ma anche di genetica molecolare di cui oggi ci parla. Ci parla delle diverse tipologie di studi che si possono fare. Lei è all'Eugenio Medea, che è un istituto di ricovero e cura a carattere scientifico, dove si fa ricerca clinica. Sara è leader in un settore dove la parte di neuropsicologia viene applicata alla genetica. Non ci sono tanti che svolgono questo tipo di importante funzione (controllate sempre i vostri docenti su PubMed), che collega la parte cognitiva con quella genetica.

### LA GENETICA DELLA DISLESSIA EVOLUTIVA

So che avete un background di genetica, quindi ho cercato di focalizzarmi su quelli che sono gli orientamenti dell'approccio genetico alla dislessia disponibili ad oggi. Se qualche parte non vi è chiara, chiedete.

Una piccola introduzione all'interno del panorama nel quale ci troviamo. Ci troviamo all'interno della genetica del comportamento, che è quella disciplina che utilizza le tecniche della ricerca genetica allo scopo di studiare le differenze individuali relative a manifestazioni comportamentali osservabili. Per manifestazione comportamentale osservabile definiamo una condizione psicopatologica, un tratto comportamentale e temperamentale. Trattati non dicotomici (presenza/assenza), ma tratti continui complessi, differenti all'interno di ciascuno di noi.

In che modo la ricerca genetica viene applicata allo studio di questi tratti? Con due approcci.

-----

**GENETICA DEL COMPORTAMENTO:** disciplina che utilizza le tecniche della ricerca genetica allo scopo di studiare le differenze individuali relative a manifestazioni comportamentali osservabili (e.g. condizioni psicopatologiche, tratti caratteriali e temperamentali)

#### **GENETICA QUANTITATIVA**

(studi sulle famiglie, sulle adozioni, sui gemelli)

Stimare il contributo che effetti ascrivibili all'azione di determinanti genetiche, ambientali condivise (tra i gemelli) e ambientali uniche (specifiche per ciascun gemello) esercitano sulle differenze tra gli individui per un determinato tratto osservabile e misurabile



#### **GENETICA MOLECOLARE**

(linkage, associazione, GWAS, PRS, path)

Localizzare ed identificare un locus/gene associato ad un determinato tratto osservabile e misurabile (linkage)

Valutare la quota di varianza fenotipica associata e spiegabile da una determinata variante genetica (associazione GWAS) dall'insieme di più varianti genetiche (PRS, pathways)

1. L'approccio della **genetica quantitativa**, che lavora primariamente su campioni gemellari o su campioni di soggetti adottati. L'obiettivo della genetica quantitativa è quello di stimare il contributo che variabili genetiche, ambientali condivise (uguali tra i gemelli, es. l'ambiente intrauterino) e ambientali uniche (individuali, specifiche per ciascun gemello. Es. sport) esercitano sulle differenze tra gli individui per un determinato tratto osservabile e misurabile. Andiamo a stimare in che percentuale la quota genetica, ambientale condivisa e ambientale unica spiega la varianza fenotipica del tratto che stiamo osservando. Fenotipo lo uso come sinonimo di comportamento, di tratto.

2. L'approccio di **genetica molecolare**, con studi di linkage, di associazione e più recentemente con gli studi Genome Wide (GWAS), i PRS (Polygenic Risk Score) e di Pathway analysis. Quale è l'obiettivo? Quello di andare a localizzare tramite gli studi di linkage e poi identificare tramite gli studi di associazione e GWAS quelli che potrebbero essere i loci e i geni coinvolti nell'eziologia di un determinato fenotipo. Per cui vogliamo andare a valutare la quota di varianza fenotipica associata e spiegabile da una determinata variante genetica.

Questi sono i due macro-approcci genetici implementati per lo studio di fenotipi psico-relati. Ho cercato di ripercorrere quelli che sono gli step che hanno guidato la mappatura genetica della dislessia evolutiva fino ad oggi. Allora, come vi dicevo prima negli studi di genetica quantitativa si va a vedere come il disturbo corre all'interno delle famiglie e in che percentuale il tratto preso in considerazione può essere spiegato da variabili generiche o ambientali.

### STEP 1. LA FAMILIARITA' DELLA DISLESSIA EVOLUTIVA

Fin dai primi anni del 1900, è stato osservato che la DE «corre» nelle famiglie.

Successivamente è stato osservato che il rischio per un bambino di essere affetto a un certo momento in cui altri membri della famiglia manifestano DE.

In particolare:

- in bambini appartenenti alla popolazione generale il 9% ha un parente che mostra difficoltà di lettura;
- in bambini con diagnosi di DE il 34% ha un parente che mostra difficoltà di lettura (si sa: 76-78% nei casi in cui il bambino con DE ha sia un fratello che entrambi i genitori con difficoltà di lettura);
- La probabilità per un fratello di un bambino con DE di manifestare a sua volta il disturbo è molto maggiore rispetto a quello riscontrato in popolazione generale.

La prima cosa che si è osservata in termini di ipotesi sulla natura genetica della dislessia evolutiva è che la dislessia evolutiva è un tratto familiare. Cosa vuol dire? Corre nelle famiglie. Questo è stato riscontrato fin dai primi anni del 1900 e quello che è stato visto, poi, negli anni '50 è che il rischio per un bambino di essere affetto, di ricevere una diagnosi di dislessia evolutiva, aumenta nel momento in cui altri membri della famiglia di appartenenza hanno una difficoltà di questo tipo. Questo ci sta dicendo che la componente ereditaria, familiare, sottostante a questo tipo di difficoltà è probabilmente elevata.

Faccio anche questa riflessione. Nel momento in cui due persone che vivono nella stessa famiglia sono più affini, hanno più probabilità di avere la stessa difficoltà, possiamo avere sia la componente genetica, ma come vi dicevo anche una componente ambientale condivisa. Per cui, se ipotizziamo due fratelli, hanno sì un bagaglio genetico condiviso con i genitori, ma hanno anche un ambiente condiviso; nel momento in cui il livello socioculturale, socioeconomico, la stimolazione linguistica/letteraria dell'ambiente familiare è carente, questo può essere un altro elemento che porta i due fratelli ad assomigliarsi di più per la difficoltà di lettura. Non possiamo dire che questo ambiente è indipendente dall'assetto genetico perché verosimilmente l'ambiente che il genitore va a ricreare all'interno della famiglia è anche dettato da quelle che sono le sue caratteristiche biologiche, genetiche, neuro-funzionali, neuro-strutturali. Parlare di somiglianza non implica necessariamente parlare di genetica perché può esserci una quota ambientale che porta due soggetti a essere più simili tra di loro.

## STEP 2. CALCOLARE L'EREDITABILITA' DELLA DISLESSIA EVOLUTIVA

Studi gemellari sono stati utilizzati per valutare il contributo della componenti genetici ambientali nell'eziologia della DE.

In questi studi si utilizzano coppie di gemelli MZ e coppie di gemelli DZ e si compara il concordanza per il tratto preso in esame: un valore di concordanza più elevato nei l suggestivo della presenza di un'eziologia genetica del tratto.

Questa metodologia permette di stimare il valore di ereditabilità del disturbo, ossia proporzione di varianza fenotipica attribuibile alla variazione genetica.

Una volta appurato che la dislessia è un disturbo che corre nelle famiglie, lo step successivo è stato quello di andare a vedere in che misura questo tratto è ereditabile. Questa stima di ereditabilità è stata fatta andando a lavorare su campioni gemellari. Perché si usano i gemelli? Gli studi gemellari permettono di andare a confrontare i gemelli monozigoti con i gemelli dizigoti. Nel momento in cui i gemelli monozigoti sono più simili, tra di loro, rispetto ai gemelli dizigoti questo è suggestivo della presenza di un'eziologia genetica del tratto.

Voi direte: eh no! Ci hai appena detto che la somiglianza può essere anche riferita all'ambiente condiviso. Gli studi gemellari permettono di separare queste due quote sulla base del principio dell'Equal Environmental Assumption, tale per cui nel modellizzare il modello gemellare imponiamo che l'ambiente condiviso per i gemelli monozigoti e dizigoti è identico, non può generare differenze. Quindi tramite il confronto gemellare tra gemelli omozigoti e dizigoti, riusciamo a stimare la componente genetica sottostante l'eziologia di un tratto. Studi gemellari ne sono stati fatti parecchi, il dato che vi riporto qui a lezione è un dato che abbiamo recentemente pubblicato, che Chiara (ha lavorato con me e con Andrea, sta facendo un dottorato di ricerca a Parigi con Irene Altarelli) sono i dati di una metanalisi che Chiara ha condotto e abbiamo recentemente pubblicato, prendendo in considerazione le stime riportate in 49 studi gemellari pubblicati fino a settembre 2019.

Meta-analysis contenente 49 studi gemellari pubblicati fino a Settembre 2019 (totale soggetti inclusi 38.670) e condotti in campioni dai 4 ai 18 anni

Meta-analytic estimates for the different neurocognitive components.				
Cognitive ability	Number of studies	Heritability	Shared environment	Non-shared environment
General Reading	48	66%	13%	21%
Letter-Word Knowledge	32	62%	17%	21%
Phonological Decoding	13	68%	10%	22%
Reading Comprehension	32	68%	11%	21%
PA	13	52%	23%	25%
RAN	11	46%	15%	39%
Spelling	15	80%	0%	20%
Language	10	34%	47%	19%

PA=phonological awareness; RAN=rapid automatized naming.

La varianza fenotipica delle componenti legate alla lettura segue la seguente equazione:  
Heritability > Non-shared environment > Shared environment



Per un campione totale di 38670 di soggetti inclusi in un range d'età che va dai 4 ai 18 anni. I risultati di questa metanalisi hanno permesso di calcolare le seguenti stime. Quello che noi abbiamo fatto è stato prendere in considerazione tutti questi studi e poi dividere per tratti neuropsicologici correlati alla disabilità di lettura. Abbiamo considerato quella che viene chiamata General Reading (l'unione degli studi che prendevano in considerazione o Letter-Word Knowledge o Phonological

Decoding), dopodiché abbiamo diviso la componente di Letter-Word Knowledge, Phonological Decoding, Reading Comprehension, Phonological Awareness, Denominazione Rapida (RAN), Spelling e Linguaggio. Nelle colonne vedete le stime che abbiamo calcolato di ereditabilità, di ambiente condiviso e di ambiente non condiviso. Prima di condividere con voi quelle che sono state le nostre conclusioni proviamo insieme a commentare questa tabella. Quali sono i primi commenti che vi vengono in mente? – Facchetti: Che in media l’ereditabilità di questi tratti è intorno al 50%, mi stupisce questo 80% nello spelling però 15 studi non mi sembrano neanche male per una metanalisi. – Come soglia minima abbiamo tenuto almeno 5 lavori. Lo spelling è la funzione che ha la componente ereditaria più alta in assoluto e so dai colleghi canadesi che fanno gemellare che la cosa interessante è che la stabilità genetica sottostante lo spelling è altissima e addirittura le abilità di spelling sono predette dalle abilità di linguaggio valutate ai 3 o ai 5 anni. – Facchetti: Impressiona l’alta quota di varianza dello spelling, il fatto che ci sia 0 quota di varianza spiegata dall’ambiente condiviso e solo il 20% dall’ambientale puro. – L’ambiente unico, quello proprio del singolo soggetto. Balza all’occhio che per tutte le componenti lettura relate la quota di ereditabilità è quella preponderante e già si era iniziato a vedere con gli studi familiari (correva nelle famiglie). Un’altra riflessione riferendoci ai primi studi familiari è che con gli studi gemellari possiamo dire che la somiglianza è dettata più da questioni genetiche ereditabili piuttosto che non dall’ambiente condiviso. Perché come vedete per ciascuna misura l’ambiente condiviso è quello che spiega la minor quota di varianza fenotipica. C’è un’eccezione che è quella del linguaggio. Già descritta in letteratura è che la varianza fenotipica delle componenti legate alla lettura segue la seguente equazione: l’ereditarietà è più forte dell’ambiente unico non condiviso che a sua volta è più forte dell’ambiente condiviso. Avendo condotto una metanalisi l’abbiamo rafforzata.

In più rispetto agli studi già pubblicati siamo andati a vedere se dei potenziali moderatori in qualche modo influenzano questo pattern.

Analisi dell’effetto di potenziali moderatori:

- Livello scolastico frequentato (preschool/kindergarten vs. elementary school vs. middle school)
  - Lingua parlata (inglese vs. altre lingue)
  - Sesso

Results for the univariate moderator analyses.										
Neurocognitive component	Moderator	Category	Number of Studies	MZ		DZ		Meta-analytic estimates		
				F(df)	p-value	F(df)	p-value	Heritability	Shared environment	Non-shared environment
General Reading	School grade level	Elementary	25	5.49 <sub>(1,120)</sub>	0.02	9.89 <sub>(1,128)</sub>	0.002	0.56	0.20	0.24
		Middle	8					0.54	0.14	0.32
	Sex	Girls	8	0.01 <sub>(1,28)</sub>	0.91	1.62 <sub>(1,28)</sub>	0.21	-	-	-
		Boys	8	-	-	-	-	-	-	
Letter-Word Knowledge	Spoken Language	English	44	0.10 <sub>(1,181)</sub>	0.75	0.70 <sub>(1,194)</sub>	0.40	-	-	-
		Non-English	5					-	-	-
Reading Comprehension	Sex	Girls	6	0.32 <sub>(1,12)</sub>	0.58	0.39 <sub>(1,12)</sub>	0.55	-	-	-
		Boys	6					-	-	-
PA	School grade level	Elementary	15	18.38 <sub>(1,46)</sub>	<0.001	19.43 <sub>(1,49)</sub>	<0.001	0.52	0.24	0.24
		Middle	7					0.46	0.16	0.38
PA	School grade level	Preschool/Kindergarten	5	8.91 <sub>(1,21)</sub>	0.01	10.27 <sub>(1,22)</sub>	0.004	0.52	0.34	0.14
		Elementary	5					0.42	0.20	0.38

Il livello scolastico frequentato è l’unico moderatore che ha dimostrato avere un effetto significativo sulle componenti legate alla lettura

La quota genetica diminuisce lasciando spazio alla quota ambientale unica



Abbiamo preso in considerazione il livello scolastico frequentato e abbiamo diviso in asilo, elementari e medie. Se ricordate il campione d’età aveva un range che andava dai 4 ai 18 anni, i lavori su ragazzi che frequentano le superiori sono molto pochi e non l’abbiamo inserito come livello scolastico perché erano 3 o 4 lavori e quindi qualsiasi risultato sarebbe stato veramente difficile da interpretare e da considerare solido e valido. Poi la lingua parlata facendo una divisione secca tra studi condotti sulla lingua inglese e studi condotti in altre lingue, che sono state unite in

un'unica categoria per il ridotto numero dei dati e che sono il francese, il cinese, l'olandese e il finlandese. E poi il sesso, quindi se maschio o femmina. Le componenti che abbiamo considerato sono state General Reading, Letter-Word Knowledge, Reading Comprehension e Phonological Awareness. Sono meno rispetto a quelle presentate nella prima tabella per un motivo statistico ovvero che per tutte le altre componenti non c'era un numero di studi sufficiente per poter prendere in considerazione l'effetto di questi moderatori. Abbiamo perso il Linguaggio, lo Spelling, il Phonological Decoding e il RAN. Per il General Reading siamo riusciti ad analizzare tutti i moderatori che ci eravamo prefissati e quello che vedete è che sia nei monozigoti che nei dizigoti c'è un effetto significativo di questo moderatore e nelle ultime colonne vedete qual è l'effetto di questa modifica delle componenti. L'ereditabilità rimane praticamente stabile, l'ambiente condiviso diminuisce ma aumenta l'ambiente unico perché passa dal 24% al 32%. Non c'è un effetto significativo né rispetto al genere né rispetto alla lingua parlata. Il genere non influenza nemmeno la componente di Letter-Word Knowledge, ma di nuovo il livello scolastico influenza sia l'abilità di comprensione di lettura (RA) che la Phonological Awareness (PA). A differenza di comprensione e General Reading per Phonological Awareness abbiamo diviso gli studi in asilo vs elementari, misurare la Phonological Awareness nelle medie non ha esattamente senso per cui non esistono studi fatti su bambini più grandi delle elementari e anche per le elementari l'età massima degli studi andava attorno agli 8-9 anni, non di più. Sia per Reading Comprehension che per Phonological Awareness osservate un pattern già visto per General Reading per cui l'ereditabilità rimane tutto sommato stabile, c'è un forte incremento dell'ambiente unico non condiviso. Secondo voi quali possono essere le interpretazioni relative a questa tabella? Come mai c'è una variabilità di questo ambiente unico, perché aumenta il peso di questo ambiente unico? Sappiate che le interpretazioni che abbiamo dato nell'articolo sono solo ipotesi, non ci sono dei dati certi. – Facchetti: È intrigante che col passare del tempo c'è una leggera riduzione della componente genetica, potrebbe essere che le diverse esperienze comincino a giocare un ruolo più importante?

Domanda da Zoom: *“Potrebbe essere che le diverse esperienze inizino a giocare un ruolo più importante?”*

Prof Mascheretti: *“Secondo te quali possono essere queste esperienze uniche che iniziano a giocare un ruolo nello spiegare le differenze?”*

Risposta da Zoom: *“A scuola, ovvero appartenere ad una classe con diverse caratteristiche che portino l'insegnante ad adottare tecniche e rapidità diverse nello spiegare.”*

Sempre relata all'ambiente della scuola, l'interpretazione che in letteratura ha ricevuto il maggior consenso è legata al fatto che, nel passaggio elementari-medie e nel passaggio asilo-elementari, le richieste poste dall'ambiente scuola cambino in modo considerevole. Dall'asilo alle elementari si passa da un ambiente ludico, per quanto di apprendimento, ad un ambiente formale di apprendimento; dunque, le richieste cognitive fatte ai bambini aumentano in modo importante. Nel passaggio elementari-medie la spiegazione deriva dal fatto che aumenta il carico cognitivo, le funzioni coinvolte non cambiano, nel senso che comunque i bambini continuano a leggere e a dover comprendere i testi che leggono, ma l'obiettivo delle funzioni cambia: alle elementari i bambini imparano a leggere, per cui è la fase che viene definita “learning to read”, alle medie invece la lettura diventa uno strumento per imparare, si passa dunque nella fase definita “reading to learn”. Quindi, probabilmente quest'ambiente unico, che emerge in modo così preponderante, può essere legato e spiegato proprio tramite una diversa richiesta di carico cognitivo, che l'ambiente all'interno del quale il bambino è inserito pone al bambino stesso.



Come diceva prima Facoetti, per comprensione e Phonological Awareness il calo dell'ereditabilità è comunque importante e sicuramente molto più importante che nel General Reading. Questo è vero, se però si fa un rapporto tra i due valori, ci si rende conto che la stabilità anche per questi tratti è pari circa al 70%, per quanto comunque sembri esserci un'oscillazione importante, nel momento in cui si fa il rapporto si nota che la quota di stabilità è comunque tanta. Questi sono i risultati che da tutti gli studi gemellari presi in considerazione sono emersi. E dunque: l'equazione "ereditabilità-ambiente condiviso-ambiente unico" è verosimilmente l'equazione che spiega l'eziologia della dislessia, inoltre l'unico moderatore che sembra avere un effetto su queste percentuali è il livello scolastico.

Domanda di Facoetti: *"Non potrebbero essere fenomeni epigenetici collegati all'accumulo di variazioni epigenetiche che si manifestano dopo nello sviluppo?"*

Prof Mascheretti: "Da questo lavoro ciò non si può dire, perché i lavori presi in considerazione sono tutti di tipo cross-sectional, dunque non sono lavori con stime di ereditabilità longitudinali. Da questi dati non si può perciò affermare. L'epigenetica è una modifica del gene, si può solo ipotizzare nel momento in cui si applica un approccio del genere su studi longitudinali e si vede com'è il variare della componente ereditaria e della componente di ambiente unico per ogni time point. Se si vede uno stabilizzarsi della genetica per i diversi time point ed un aumentare dell'ambiente unico, allora forse ci si può speculare sopra."

Domanda Facoetti: *"Com'è stato misurato in questi studi gemellari il linguaggio?"*

Risposta Mascheretti: "Innanzitutto, sono dieci studi in cui per forza di cose sono stati inseriti sia il linguaggio recettivo, che quello espressivo. È stata inserita anche una prova di comprensione, quindi è un fattore molto variegato quello del linguaggio. Non mi stupirebbe se venissero rilevati dei trend diversi tra comprensione e produzione, nel senso che sulla produzione è comprensibile che ci sia una componente ambientale molto più forte, legata tanto alla stimolazione, mentre sulla comprensione si potrebbe ritenere più importante una componente biologicamente determinata."

Facoetti: "Siamo un po' senso-motori, quindi dove c'è un problema di ricezione, poi spesso c'è anche un problema di produzione, considerando anche l'eventuale presenza di doppie dissociazioni. Però stupisce il fatto che questa varianza sia invertita, dove l'ambiente condiviso ha la faccia del modulo linguistico recettivo o espressivo che è geneticamente predeterminato. In questo caso fa tanto l'ambiente, mi piaceva sottolinearlo. Si dice sempre che il linguaggio è stato selezionato evolutivamente o che abbiamo pattern cerebrali con un determinato compito, però una buona quota di varianza è spiegata anche dalla stimolazione che esperiscono entrambi i gemelli. Questo è anche un po' paradossale, perché spesso pensiamo che ci dovrebbero essere delle strutture del cervello che controllano e quindi dovrebbe essere molto più stabile dal punto di vista ereditario, mentre la forma visiva delle parole, che vediamo nello spelling e che suggerisce l'ordine e l'identità delle lettere è invece fortemente condizionata da una componente genetica. Dunque, la forma visiva non può essere evolutivamente selezionata, dato che sono pochi anni che come specie leggiamo e scriviamo."

Prof Mascheretti: "Però saper leggere e scrivere non è puramente una funzione linguistica e fonologica, ma ha alle sue basi delle funzioni cognitive e sensoriali, che possono avere evolutivamente avuto un ruolo. Basti pensare al processo visivo sottostante all'apprendimento della lettura, può essere quella visiva una funzione sensoriale che evolutivamente non era adibita alla lettura, ma che poi è stata funzionale anche a quello?"

Facchetti: “Va contro tutti i modelli attuali, cioè quello che troviamo nelle prime righe di tutti i lavori di Dehaene, dove si dice che il linguaggio è stato evolutivamente selezionato, invece la lettura e la scrittura sono delle funzioni recenti. Quindi la componente genetica dovrebbe essere molto più alta nel linguaggio.”

#### CALCOLARE LA STABILITA' DEI FATTORI EZIOLOGICI SOTTOSTANTI LA DISLESSIA EVOLUTIVA

Pochi studi hanno indagato il ruolo esercitato dalle variabili genetiche ed ambientali negli anni pre-scolari e scolari.

I risultati ottenuti mostrano una stabilità delle influenze genetiche ed ambientali condivise.

TUTTAVIA, tra gli studi ad oggi disponibili:

- pochi considerano anche fenotipi pre-scolari
- i time-points considerati sono “pochi” (range 3-6) e non coprono un range evolutivo ampio



A partire dall’analisi dei moderatori, vediamo che la componente genetica è stabile attorno al 70-80%. Gli studi gemellari che valutano la stabilità della componente ereditaria ed ambientale lungo il tempo sono pochi (circa una decina) e prendono in considerazione pochi time-point, focalizzandosi o solo sul passaggio dall’asilo alle elementari o solo durante gli anni delle elementari fino ai primi anni delle medie, non permettono quindi di avere una prospettiva longitudinale nel vero senso della parola (dall’asilo, quando si hanno le “pre-reading skills”, all’età adolescenziale, in cui la lettura è funzionale all’apprendimento).

Io adesso vi mostro questa tabella dove vi metterete le mani nei capelli. Ma perché ve la presento? Perché ho la fortuna di lavorare con un gruppo di ricercatori canadesi di Quebec che hanno da anni uno studio longitudinale su gemelli e su popolazione generale. Quando vi dico da anni, vuol dire che questi colleghi stanno monitorando gli stessi ragazzi (2000 soggetti) dalla nascita. Al momento sono arrivati ai 20 anni, e hanno una presa dati all’incirca ogni 2/3 anni. Questa presa dati, i time point, è stata fatta anche per le abilità di lettura. Quindi con questi dati possiamo veramente applicare una prospettiva longitudinale sulla stabilità della componente ereditaria o ambientale sottostante l’eziologia di questo tratto.

E i dati che vi mostro sono dati che vanno dai 5 ai 15 anni per cui vedete che il primo time point è a 5 anni, il secondo è a 6 anni, il terzo e il quarto a 7/8, poi 9, 10, 12, 15. Vi dico che i colleghi hanno anche i dati di linguaggio, presi attorno ai 18 mesi. Anche nel momento in cui, nelle analisi, viene inserito quel time point a 18 mesi, il pattern che adesso vi mostrerò viene mantenuto. Quindi anche se anticipiamo ai 18 mesi l’andamento è sempre uguale.

Nella prima riga ho riportato i time point e dovete leggerli alla luce di questa tabella:

	T1	T2	T3-T4	T5	T6	T7	T8
<b>Age range</b>	5,30±0,26	6,56±0,26	7 and 8	9,08±0,26	10,00±0,28	12,09±0,28	15,08±0,26
<b>Phenotypes</b>	Letter knowledge	1) Reading, and 2) writing	Reading Skills Test (THAL: Pépin & Loranger, 1999): 1) phonological decoding, 2) reading comprehension, 3) reading total	Teachers rated the level of reading and writing			Alouette-R Test d'analyse de la lecture et de la dyslexie (Lefavrais, 2005): 1) reading accuracy, and 2) reading speed  Wechsler Individual Achievement Test (Wechsler, 2005): 1) word reading, and 2) writing

Per cui 5,6,7,8,9,10,12,15.

Nelle righe successive, andate a vedere qual è la componente genetica (la riga in giallo), la componente ambientale condivisa (riga in verde) e la componente ambientale unica (azzurro) che spiega la varianza fenotipica osservata ad ogni time point.

Ages	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	
<b>WAVE</b>	<b>A1</b>	<b>A2</b>	<b>A3</b>	<b>A4</b>	<b>A5</b>	<b>A6</b>	<b>A7</b>	<b>A8</b>	<b>Total a<sup>2</sup></b>
T1	.39**								.39
T2	.19**	.23**							.42
T3	.24**	.00	.16**						.40
T4	.10*	.00	.05	.19*					.33
T5	.34**	.09	.06	.06	.11*				.66
T6	.26**	.05	.05	.14*	.06	.02			.57
T7	.30**	.03	.07	.21*	.00	.04	.00		.66
T8	.17**	.02	.15*	.00	.02	.02	.15	.00	.67
<b>WAVE</b>	<b>C1</b>	<b>C2</b>	<b>C3</b>	<b>C4</b>	<b>C5</b>	<b>C6</b>	<b>C7</b>	<b>C8</b>	<b>Total c<sup>2</sup></b>
T1	.43**								.43
T2	.10*	.06							.16
T3	.00	.07	.22*						.29
T4	.01	.01	.00	.30**					.31
T5	.00	.01	.05	.00	.00				.07
T6	.01	.00	.12*	.00	.03	.00			.15
T7	.00	.02	.04	.01	.01	.00	.00		.09
T8	.00	.00	.04	.00	.00	.00	.00	.00	.07
<b>WAVE</b>	<b>E1</b>	<b>E2</b>	<b>E3</b>	<b>E4</b>	<b>E5</b>	<b>E6</b>	<b>E7</b>	<b>E8</b>	<b>Total e<sup>2</sup></b>
T1	.18**								.18
T2	.01*	.41**							.42
T3	.01	.00	.30**						.31
T4	.02*	.04	.00	.32					.36
T5	.01	.00	.01*	.02*	.24**				.28
T6	.01*	.01	.00	.00	.26**	.00			.27
T7	.01*	.01	.00	.01	.00	.08	.14		.25
T8	.00	.00	.00	.02	.01*	.04	.01	.12	.26

Facoetti: cos'è A1, A2, A3 eccetera?

A1: componente genetica che spiega la varianza fenotipica al time point 1 (5anni)

A2: quota genetica time point 2, e via dicendo

Idem per C1: ambiente condiviso time point 1...C2, e via dicendo

Cosa vedete? La componente genetica che spiega la varianza a T1 rimane significativa nello spiegare la varianza anche a T8, quindi a 15 anni. Quindi la prima cosa che vedete è una stabilità dell'effetto genetico.



Perché vi dico questo? Perché la quota genetica che spiega il 39% della varianza a T1 spiega anche il 19% della varianza a T2, il 24% della varianza a T3, il 10% della varianza a T4 e così via.

Facoetti: su quale variabile?

Mascheretti: Devi sempre fare riferimento qui, il fenotipo ve l'ho messo qui (*in riferimento alla tabella 1, piccola*), per cui la quota genetica che spiega il 40% di letter knowledge (rimappaggio grafema fonema) spiega in media anche il 20% degli altri fenotipi presi negli altri time point.

Facoetti: Il T8?

Mascheretti: Il T8 è reading accuracy, speed, word reading

Facoetti: Quindi quando io vi dicevo “se avete da prendere un unico predittore, prendete rimappaggio grafema-fonema”, è perché vedete che anche longitudinalmente è cattivo (piglia tanto) e la componente genetica è stabile.

Mascheretti: E influenza poi gli altri fenotipi.

L'altra cosa che notate, sempre rimanendo sulla sezione genetica, è che in praticamente ogni time point fino a T5 ci sono spot delle nuove componenti genetiche che spiegano la varianza. La varianza fenotipica a T2 è spiegata per il 19% da quella che spiegava T1, più un nuovo 23% che si accende in concomitanza dei 6 anni.

Sulla colonna finale vedete qual è la quota di varianza genetica spiegata per ciascun time point dove vedete che a T2, 42 è dato da 19 più 23.

Andiamo a vedere l'ambiente condiviso. È time point specifico. Non c'è nessun ambiente condiviso che ha un effetto longitudinale che si trasmette negli altri time point. Vedete come è puntiforme ed emerge tra l'altro in punti specifici, come a 5, a 8 e 9 anni. Per quanto riguarda l'ambiente unico, anche qui c'è un pattern più simile a quello dell'ambiente condiviso e anche qui ci sono dei time point specifici che se voi vi ricordate l'età di corrispondenza dei vari time point coincidono con il cambio di grado scolastico. In questo senso andiamo a confermare i risultati trovati nel lavoro di metanalisi.

Con gli studi gemellari abbiamo portato a casa che la componente genetica è la componente preponderante e che rimane stabile nel tempo. Qual è stato lo step successivo? Quello di individuare quelli che possono essere i geni e i loci candidati per la dislessia evolutiva.

Studi di Linkage: studi fatti su pedigree familiari estesi (almeno 3 generazioni), in cui compaiono sia soggetti affetti che non affetti. Questo permette di vedere qual è la tipologia di trasmissione genetica nelle famiglie. Da questi studi condotti in famiglie con soggetti affetti da dislessia evolutiva si è dedotto che esistono 9 loci di suscettibilità che sono collocati su 8 cromosomi differenti.

Una volta che abbiamo localizzato dove sono le aree di interesse qual è l'obiettivo? Andare a identificare quali possono essere i geni coinvolti. Quali approcci possiamo implementare?

- 1) Approccio secondo geni candidati: fondamentalmente va a vedere quali sono gli effetti esercitati da varianti genetiche all'interno di specifici geni di interesse per il fenotipo

considerato tendenzialmente per far questi studi si prendono campioni di “piccole” dimensioni e la tipologia di studio implementata è o un caso controllo o uno studio familiare.

2) Molto più recenti rispetto agli studi “gene candidato” abbiamo gli studi GWAS (GENOME-WIDE ASSOCIATION STUDY), studi di associazione che permettono però di andare ad analizzare l’associazione che c’è tra migliaia di varianti genetiche e il fenotipo preso in considerazione in campioni molto ampi. Siamo sulle decine di migliaia di unità. Quando dico centinaia di migliaia di variabili intendo (e mi riferisco al campione canadese con cui ho la fortuna di lavorare) che siamo veramente in termini di milioni di varianti.

A partire dagli studi di GWAS che vanno a vedere la singola associazione tra tutte queste varianti genetiche e il fenotipo, si possono creare degli score cumulativi.

Facoetti: Le medie tra variabili, giusto?

Mascheretti: Più che medie qui è un discorso additivo

Che sono essenzialmente di due tipi:

PRS: somma additiva degli effetti esercitati dalle singole varianti genetiche

Pathway analysis: questo non è esattamente un punteggio additivo. Quello che andiamo a fare è vedere se un determinato pathway genico, coinvolto in una determinata funzione (ad esempio crescita assonale), è significativamente arricchito (quindi associato) con il fenotipo analizzato nel nostro campione di interesse. Fondamentalmente andiamo a raggruppare all’interno del pathway (crescita assonale) tutti i geni coinvolti in questo pathway e andiamo a vedere se l’additività all’interno, è associata con il fenotipo osservato.

La differenza tra Polygenic risk score e Pathway analysis è essenzialmente la tipologia di approccio teorico che ci sta sotto.

Nel Polygenic risk score, se abbiamo mille varianti genetiche associate, allora andiamo a sommare il loro contributo e vediamo se la somma associa con il fenotipo. Non ci interessa il ruolo esercitato da queste varianti.

Invece, nella Pathway analysis, dobbiamo chiederci se queste mille varianti sono incluse in pathway genici specifici. Se lo sono (ad es. 100 sono incluse nella crescita assonale, 50 sono incluse nella morfogenesi, ecc.), allora raggruppiamo le 100 varianti incluse nella crescita assonale e andiamo a testare qual è l’associazione con il fenotipo.

## CANDIDATE GENE STUDIES

Tra tutti i geni identificati (circa 22), nove geni candidati sono stati replicati in almeno un campione indipendente: *DYX1C1*, *DCDC2*, *KIAA0319*, *C2ORF3*, *MRPL19*, *ROBO1*, *GRIN2B*, *FOXP2* e *CNTNAP2*.

Cosa ci dicono gli studi gene candidato? Ci dicono che ci sono ad oggi circa 22 geni identificati, tra questi 22 geni solo 9 sono stati replicati almeno in un campione indipendente (ovvero, pochi).

## GWAS

Nessuno dei geni identificati dagli studi candidate gene è risultato essere significativo.

Al contrario questi studi hanno identificato nuovi geni come associati ai tratti di lettura: *CCDC136/FLNC*, *RBFOX2*, *MIR924HG*, *NKAIN3*, *RNLS*, *LOC388780*, *VEPH1*

A partire da questi studi

- PRS: associazione significativa con PGSs per ADHD, bipolar disorder, schizophrenia, psychiatric cross-disorder susceptibility, educational attainment, and intelligence
- Pathways: associazione significativa con steroid-related pathways e RAS signaling pathway (composto da 20 geni e coinvolto nella trasduzione del segnale cellulare)

Cosa ci dicono gli studi GWAS? Ci dicono che nessuno dei geni identificati dagli studi gene candidato è risultato essere significativo. Al contrario, gli studi GWAS hanno identificato nuovi geni che sembrano essere associati al tratto di lettura.

In questi geni GWAS sono state poi condotte delle analisi, sia di Polygenic risk score che di Pathways analysis.

Le analisi di Polygenic risk score mostrano che il tratto di lettura risulta essere associato a score poligenici che sono stati precedentemente associati a ADHD, disturbo bipolare, schizofrenia, educational attainment e intelligenza. Si tratta quindi di score poligenici molto aspecifici.

Le Pathway analysis condotte negli studi di GWAS hanno permesso di trovare delle associazioni, che non tengono la correzione per test multipli (per cui vanno prese con le pinze), con pathway relati agli steroidi e con pathway RAS signaling (un pathway coinvolto nella trasmissione intracellulare). Si tratta dunque di risultati veramente aspecifici.

### COME POSSIAMO SPIEGARE QUESTA DISCREPANZA?

#### CANDIDATE GENE STUDIES

Non hanno sufficiente statistical power per rilevare gli effetti dei geni significativi

#### GWAS

Devono applicare soglie di significatività statistica molto stringenti al fine di «controllare» per i numerosi test condotti ( $P\text{-value} < 5 \times 10^{-8}$ ) e quindi SNPs con effetto modesto non raggiungono questa soglia

Lavorano su campioni in cui vengono uniti campioni con origini differenti (population stratification), che parlano differenti lingue, che applicano diversi criteri di inclusione, che misurano lo stesso tratto con tests diversi

CANDIDATE GENE STUDIES e GWAS devono quindi essere considerati come approcci complementari, e non come mutuamente esclusivi, al fine di raggiungere una migliore comprensione dell'eziologia dei tratti complessi (come i disturbi del neurosviluppo)

Qui sorge la grande domanda: come possiamo spiegare le differenze tra questi due approcci?

Sono due approcci molto diversi tra di loro, che hanno obiettivi molto diversi tra di loro.

La critica che viene avanzata rispetto agli studi geni candidati è che non hanno sufficiente potere statistico per rilevare l'effetto dei geni, poiché i sample size su cui vengono condotti gli studi geni candidati sono moderati e sicuramente sono inferiori rispetto a quelli su cui vengono condotti gli studi GWAS.

Dall'altra parte, però, gli studi GWAS hanno a loro volta dei limiti. Ovvero, dal momento che devono andare a controllare per un numero molto elevato di test (che vengono condotti perché stiamo lavorando su migliaia di varianti genetiche), devono applicare una soglia di significatività molto stringente e quelle varianti genetiche che non raggiungono questa soglia (che per convenzione è stata settata a  $5 \times 10^{-8}$ ) vengono considerate non significative. Però, ad esempio, quando abbiamo un p-value di  $5 \times 10^{-6}$ , che statisticamente non è significativo, forse si può pensare che un effetto lo abbia anche quella variante.

L'altra critica che viene mossa agli studi GWAS è che, proprio perché devono mettere insieme dei campioni molto numerosi, vengono uniti dei campioni che:

- ! hanno origini differenti ! e questo in termini genetici causa un fenomeno che viene definito population stratification, perché sappiamo che nelle differenti popolazioni ci sono delle frequenze alleliche differenti);
- ! parlano lingue differenti ! se stiamo parlando di schizofrenia questo può non essere un problema, ma se stiamo parlando di lettura può rappresentare un ostacolo, un limite;

- ! applicano diversi criteri di inclusione ! ad esempio, nei criteri di selezione di "che cosa è dislessia", noi come gruppo nei nostri lavori lo teniamo a -2 deviazioni standard, mentre altri gruppi in altri gruppi lo pongono a -1 o a -1,5 deviazioni standard (così facendo però si mette insieme anche chi così dislessico non è);
- ! in cui lo stesso tratto viene misurato con test diversi ! il modo in cui la phonological decoding viene misurato in italiano forse è diverso da come viene misurato in inglese, eppure poi questi vengono uniti (perché la funzione sottostante è sempre la phonological decoding).

Tutto questo per dire che io non ho personalmente una propensione verso un tipo di approccio piuttosto che l'altro: vengo da studi geni candidati e sto analizzando dei dati di GWAS, perciò non ho alcuna preclusione. Indipendentemente dal mio pensiero, ciò che la letteratura ci dice è che non ha senso contrapporre gli studi geni candidati con gli studi GWAS, semplicemente essi devono essere considerati due approcci complementari, che portano ad una migliore comprensione di quella che è l'eziologia dei tratti complessi (come il disturbo di lettura o qualsiasi altro disturbo del neurosviluppo).

*Facoetti ! Questo dibattito è molto importante, perché è come se si dicesse che tutti gli studi di neuropsicologia condotti su casi singoli fossero da buttare (che non valgono nulla), e che valgono soltanto gli studi condotti su gruppi molto numerosi. È però assurdo pensare che non si possano trarre delle buone informazioni anche dagli studi sui casi singoli (qui paragonati agli studi sui geni candidati). Sono due approcci diversi che però ci portano verso la medesima direzione (il problema è che esiste un po' di fanatismo quando uno adotta un certo approccio).*

*La parte più interessante che si può fare ora potrebbe essere quella di spiegare come questi geni candidati siano legati alle varie funzioni cognitive di cui abbiamo parlato.*

## E NOI QUALE APPROCCIO ABBIAMO SEGUITO?

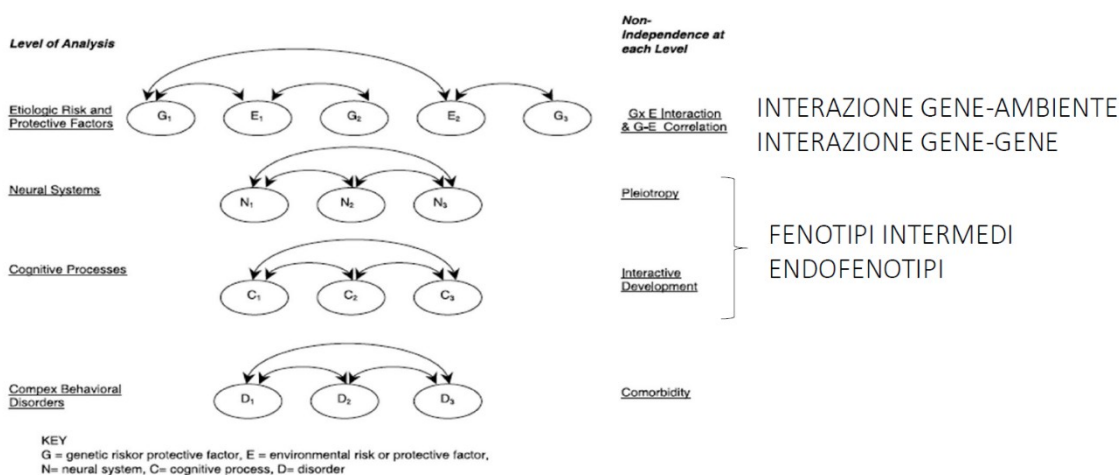


Fig. 2. Multiple deficit model.

E quindi noi cosa stiamo facendo? Un po' per questioni economiche, un po' per questioni logistiche, un po' per altre questioni, noi abbiamo scelto di percorrere la strada dei geni candidati, focalizzandoci primariamente su alcuni meccanismi che sono quello di interazione gene-ambiente,



quello di interazione gene-gene, e su quello che è l'approccio basato sui fenotipi intermedi o endofenotipi.

*Tutta la parte di interazione gene-ambiente e gene-gene la salteremo, per passare direttamente all'approccio fenotipi intermedi/endofenotipi.*

#### FENOTIPI INTERMEDI / ENDOFENOTIPI

*“Very specialized, relatively straightforward and putatively more elementary, neurophysiological, biochemical, endocrinological, neuroanatomical, cognitive and neuropsychological measures than the related neurodevelopmental disorder”.*

Fenotipi connessi ad una specifica funzione neurocognitiva e/o marcatori elettrofisiologici o neuroanatomici di uno specifico sistema cognitivo, che possono manifestarsi prima dell'insorgere della patologia e che sono presenti nei membri di uno stesso nucleo familiare

Utili nell'indagine dei meccanismi eziopatogenetici del disturbo e valide alternative rispetto ai fenotipi neuropsicologici attualmente presi in considerazione.

È infatti possibile ipotizzare che la determinazione genetica di uno specifico sistema neurale sia meno complessa rispetto a quella sottostante ai fenotipi clinici caratterizzanti il disturbo, dal momento che la manifestazione del disturbo rappresenta l'esito dell'interazione di molteplici influenze di diversa natura che agiscono a diversi livelli.

**Anzitutto, che cosa sono i fenotipi intermedi/endofenotipi?**

Sono fenotipi connessi ad una specifica funzione neurocognitiva che possono manifestarsi prima dell'insorgere della patologia e che sono presenti nei membri di uno stesso nucleo familiare.

Sono tratti che possono essere neurofisiologici, biochimici, endocrinologici, neuroanatomici, cognitivi o neuropsicologici. Per essere definiti fenotipi intermedi, l'importante è che questi tratti si manifestino prima dell'insorgere della patologia e siano presenti nei membri di uno stesso nucleo familiare che non presentano la patologia.

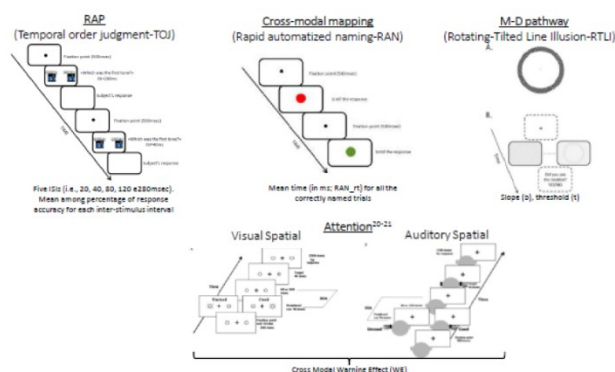
Sono utili nell'indagine dei meccanismi eziopatogenetici del disturbo e sono delle valide alternative ai fenotipi neuropsicologici. E questo perché dai geni al comportamento di strada ce n'è molta, se noi però ci focalizziamo sui livelli intermedi, ecco che la strada che c'è dal gene al livello intermedio si accorcia sempre di più. Perciò, è per questo motivo che essi rappresentano delle valide alternative, perché in qualche modo possono essere influenzati più direttamente dall'effetto genetico.

## FENOTIPI INTERMEDI / ENDOFENOTIPI

### Processi cognitivi e sensoriali

Rapid auditory processing (RAP)  
 Rapid automatized naming (RAN)  
 Visual and auditory attention  
 Visual motion perception

**Campione:** 100 famiglie nucleari italiane con DE (229 offspring) + 83 lettori tipici



Visual motion and rapid auditory processing are solid endophenotypes of developmental dyslexia

Nel nostro studio siamo andati ad analizzare in 312 soggetti (100 famiglie nucleari e 83 lettori tipici) 4 diversi processi cognitivi e sensoriali (il Rapid auditory processing, il Rapid automatized naming, la Visual and auditory attention e la Visual motion perception).

		To be heritable	To be associated with the illness	To be independent of clinical state	Impairment must co-segregate with the illness within a family	To represent reproducible measurements
RAP	TOJ	✓	✓	NOT FEASIBLE IN THIS STUDY	✓	✓
RAN	RAN_rt	✓	✓		✓	✓
ATTENTION	WE		✓		(✓)	✓
VISUAL MOTION PERCEPTION	RTL_i_b	✓	✓		✓	✓
	RTL_t	✓	✓		✓	✓

Visual Motion Perception and RAP soddisfano tutti i criteri e possono quindi essere considerati come solidi ed affidabili endofenotipi della DE

CRITERIO 1: Le stime di ereditabilità sono di 0.43 (Visual motion processing) e 0.66 (RAP)

CRITERIO 2: I bambini con DE mostrano deficit in Visual motion perception e RAP

CRITERIO 4: I Fratelli non affetti mostrano deficit in Visual motion perception e RAP rispetto ai lettori tipici

Multisensory non-spatial attention soddisfa 3 dei 4 criteri testabili e rappresenta un potenziale endofenotipo della DE

CRITERIO 2: I bambini con DE mostrano deficit in multisensory non-spatial attention

CRITERIO 4: sia I bambini con DE che I Fratelli non affetti mostrano deficit in multisensory non-spatial attention rispetto ai lettori tipici

RAN mostra una stima di ereditabilità pari a 0.40 (CRITERIO 1)

Visual motion and rapid auditory processing are solid endophenotypes of developmental dyslexia

Siamo andati a prendere quelli che sono i criteri che definiscono un endofenotipo e li abbiamo testati su ognuna delle funzioni che abbiamo descritto prima.

Abbiamo trovato che la Visual motion perception e il Rapid auditory processing soddisfano tutti i criteri per essere considerati degli endofenotipi, in quanto sono ereditabili, i bambini con dislessia evolutiva hanno dei deficit in queste due funzioni, e soprattutto i fratelli non affetti hanno deficit simili a quelli dei fratelli affetti sia nella Visual motion perception che nel Rapid auditory processing.

Per quanto riguarda la Multisensory non-spatial attention, abbiamo visto che i bambini con dislessia evolutiva hanno dei deficit in questa funzione, e soprattutto che anche i fratelli non affetti mostrano dei deficit in questo senso.

Il Rapid automatized naming, che in letteratura è descritto come un fenotipo sufficientemente reliable predittore di dislessia, nel nostro caso è risultato solo essere ereditario (il motivo qui è verosimilmente legato a questioni metodologiche).

Dunque, ciò che noi abbiamo concluso è che, su un campione italiano, il processamento visivo e il processamento uditivo rapido possono essere considerati dei validi fenotipi intermedi per la dislessia evolutiva. A questo punto come facciamo a mettere insieme la componente genetica con questo dato più neuropsicologico? Siamo andati a vedere se varianti specifiche in geni candidati per dislessia evolutiva associano con qualcuno di questi fenotipi intermedi. Ci siamo focalizzati sulla delezione dell'introne 2 del gene DCDC2 e siamo andati a vedere se in qualche modo era specificatamente associata con uno dei fenotipi intermedi che abbiamo trovato. La risposta è sì, abbiamo trovato che la presenza della delezione su questo gene risulta essere associata a deficit nel sistema visivo magnocellulare indipendentemente dalla presenza o meno di una diagnosi di dislessia evolutiva. Ciò vuol dire che anche nei normo lettori che hanno questa variante genetica di rischio ci sono dei deficit nel sistema visivo magnocellulare analoghi a quelli riscontrati nei soggetti con dislessia. Questo non è un limite perché sappiamo che in tutti i disturbi del neurosviluppo tra cui i disturbi specifici di apprendimento sono probabilistici e il fatto che questo endofenotipo sia presente anche nei fratelli non affetti potrebbe sembrare un limite, ma quella funzione è dal punto di vista probabilistico importante per la determinazione ma non causale e unico fattore che determina (logica probabilistica). Il sistema magnocellulare non spiega tutta la dislessia.

Questa associazione tra la delezione del DCDC2 e il sistema visivo magnocellulare è stata riscontrata in due studi indipendenti. Siamo andati a vedere se la stessa variante genetica di rischio è in qualche modo associata con misure strutturali e funzionali connesse al funzionamento della via visiva magnocellulare in ragazzi con e senza dislessia. Per quanto riguarda il dato funzionale abbiamo trovato che delezione del gene DCDC2 è associata con alterazioni della FA (Fractional anisotropy), una misura di dispersione dell'acqua indipendentemente dalla diagnosi di dislessia. Nei normo lettori i pattern neuroanatomici associati alla presenza di delezione possono andare a identificare una vulnerabilità cognitiva ai disturbi specifici di apprendimento senza comunque implicarlo. Nei soggetti con dislessia evolutiva la presenza di questa variabile genetica di rischio era associata ad alterazioni sia comuni ritrovate quindi nei soggetti dislessici senza delezione ma anche con alterazioni specifiche legate alla presenza di delezione. Stando agli studi neuropsicologici condotti sulla delezione del gene DCDC2 associata ad anomalie del funzionamento della via visiva magnocellulare siamo andati a vedere con uno studio fMRI se è vero, ossia se anche in termini di attivazione vi sono delle alterazioni. Prima di andare a dividere i soggetti in base alla presenza di delezione, abbiamo fatto uno studio caso controllo dislessici vs normo lettori per andare a vedere se vi è una differenza nella via dorsale ma fino alle sue proiezioni frontali, questo anche perché ci si è focalizzati sempre in aree specifiche del cervello, mentre noi volevamo andare a mappare tutta la via. Si è cercato appunto di vedere se a seguito di questa delezione vi è un effetto sulla via dorsale e soggetti con la delezione della DCDC2 mostrano un'attivazione ridotta in V1 sinistra e una attivazione maggiore nel precuneo destro, giro fusiforme, giro temporale sinistro e insula (risultati preliminari e non corretti, ma ci dicono che vi è un effetto sul funzionamento della via).

I geni associano con il comportamento e i fenotipi intermedi, ma questi fenotipi intermedi possono mediare l'effetto che i geni hanno sul comportamento? È stato preso in nostro solito campione (100 famiglie nucleari italiane con DF + 83 lettori tipici) e siamo andati a testare questo modello di

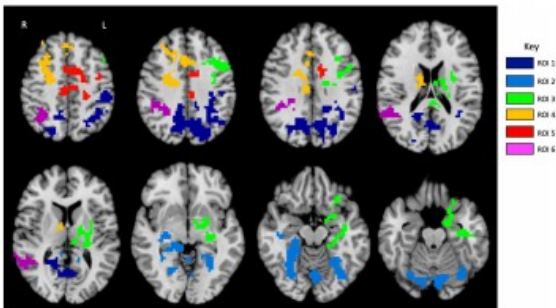
mediazione. Abbiamo preso 20 varianti genetiche all'interno di 5 geni candidati e siamo andati a vedere se i 4 processi cognitivi essenziali già misurati vanno a mediare l'effetto che le varianti genetiche nei geni candidati hanno sulle abilità di lettura. Una variante genetica propria del gene ROBO1 è associata alle abilità di lettura solo tramite l'effetto mediatore esercitato dal processamento uditivo di tipo rapido e dal visual motion processing. Quindi non solo i geni candidati sono associati al comportamento lettura, ma anche agli endofenotipi della lettura che mediano l'effetto che i geni hanno sul comportamento.

Lo stesso tentativo è stato fatto con delle misure di imaging, abbiamo preso delle attivazioni durante la presentazione di parole e non parole e ci siamo focalizzati sulle attivazioni di sei aree cerebrali e siamo andati ad analizzare il gene BDNF non è un gene prettamente candidato per la lettura, ma è un gene generalista coinvolto anche nella lettura e quello che siamo andati a testare è un modello di mediazione sequenziale. Ci siamo chiesti: il gene BDNF in qualche modo influenza l'attività cerebrale che a sua volta influenza la funzione fonologica che a sua volta influenza le competenze di lettura? La risposta è sì.

**Campione:** 94 lettori tipici

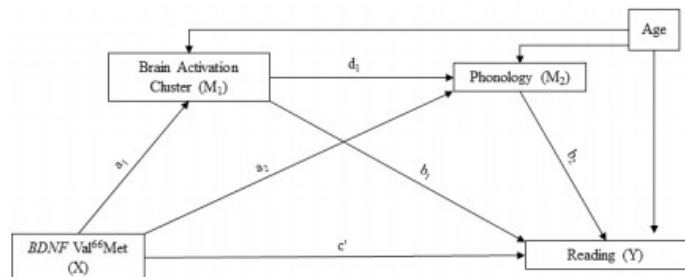
**Imaging data**

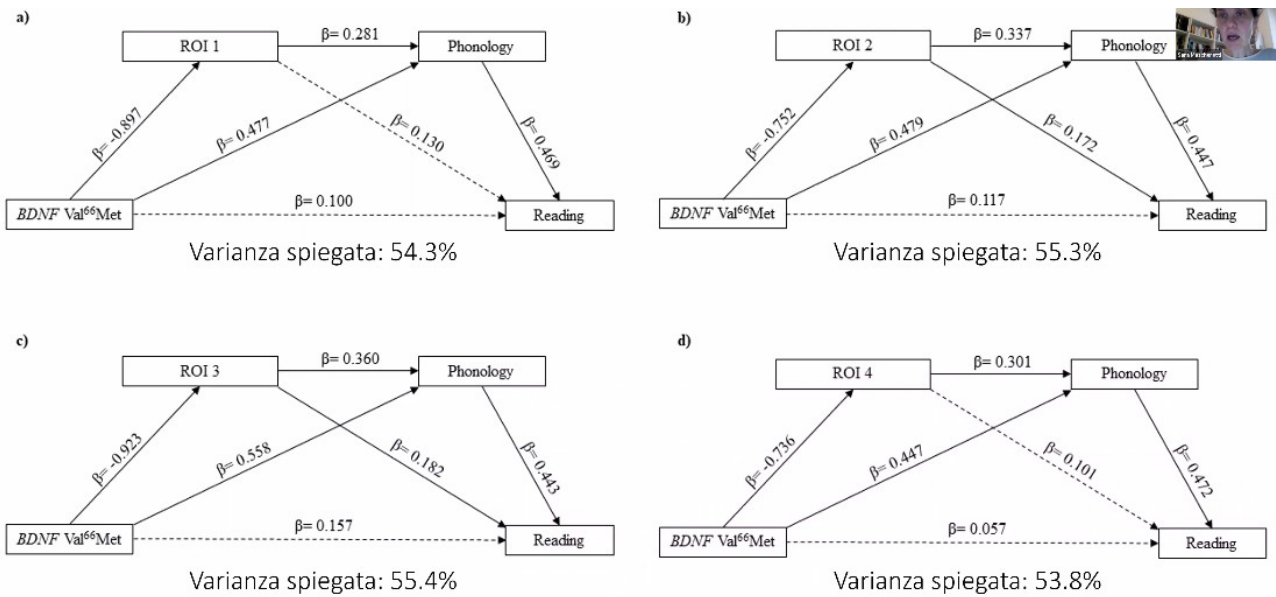
Attivazione durante la presentazione di words e pseudowords



1. bilateral precuneus extending into left inferior parietal lobule,
2. bilateral hippocampus/parahippocampal gyrus/fusiform gyrus/cerebellum,
3. left middle frontal gyrus/inferior frontal gyrus/thalamus,
4. right cingulate/middle frontal gyrus/superior frontal gyrus,
5. left cingulate/medial frontal gyrus/middle frontal gyrus/precentral gyrus,
6. right superior temporal gyrus/inferior parietal lobule/superior parietal lobule

**Geni**  
*BDNF*





Per cui l'attivazione nelle prime quattro aree, per cui il precueno bilaterale, ippocampo, para-ippocampo... insomma non ve le leggo, media l'associazione che in gene BDNF ha con la lettura passando attraverso la fonologia. Andrea ti anticipo che qui tutto teneva anche nel momento in cui invertiamo l'ordine dei fattori fonologia-reading, e mettiamo il reading come mediatore su fonologia.

## CONCLUSIONI

Nuovi studi **candidate gene-candidate phenotype** permetterebbero di sviluppare **indagini interdisciplinari innovative** volte ad indagare gli effetti esercitati da **specifiche varianti genetiche** su **pathway neuroanatomici** sottostanti **gli specifici processi cognitivi e sensoriali associati alla lettura**.

In questo modo, **sarebbe possibile studiare gli effetti esercitati da una variabilità genetica presente in popolazione** e determinare se una delle sue forme **può influenzare la funzionalità di un fenotipo intermedio neuroanatomico, funzionale, cognitivo/sensoriale** e quindi **rendere le persone più vulnerabili** allo sviluppo di disturbi del neurosviluppo.

Quindi take home message: è quello che vi dicevamo prima. Noi pensiamo fortemente che l'approccio geni candidati combinato con fenotipi intermedi/enodfenotipi abbia in qualche modo una validità per spiegare in qualche modo quelli che sono i pathway eziopatologici sottostanti alla dislessia evolutiva.

La vera utilità di portare avanti questi studi, e questo forse è un'utopia non lo so ma lo scopriremo, è che se le nostre ipotesi sono vere, questo può anche portare a un'identificazione di una variabilità genetica a rischio che in qualche modo rende probabilistica mente più suscettibili dei bambini piuttosto che altri e quindi può avere un impatto e una significatività in termini di intervento e riconoscimento precoce appunto di bambini a rischio per sviluppare una difficoltà specifica dell'apprendimento.




Io ringrazio tutte le persone che lavorano con me tante di diverse formazioni e di diverse parti del mondo

Alla fine vi ho lasciato dei riferimenti bibliografici che possono sostenere tutti i dati che vi ho presentato

Facoetti: sui messaggi da portarsi a casa. Allora abbiamo scoperto che ci sono dei geni che sono associati principalmente ad alcune funzioni, queste funzioni sono quelle che vi ho un po' raccontato io tutta la parte più neuropsicologica, quindi il collegamento tra le funzioni cognitive e il disturbo è stato con il tuo contributo e di tutti i collaboratori quello di aggiungere diciamo il ruolo giocato dalla genetica nella determinazione probabilistica di queste funzioni neuropsicologiche.

Quello che mi chiedevo che forse si stanno chiedendo anche gli studenti è: sono apparentemente gli studi che ci hai presentato, sono sia ROBO che DCDC2 ad essere legati a funzioni che noi abbiamo chiamato di attenzioni multisensoriale, capacità di agganciare velocemente l'attenzione si auditiva che visiva che poi misuriamo con la percezione del movimento. Ci sta che siano... è normale che una funzione così complessa non sia determinata da un unico gene ma probabilmente.. e forse siamo ancora lontani dall'avere il disegno completo però quei due geni lì sembrano essere legati a quelle funzioni multisensoriali che anche longitudinalmente sono legate poi all'acquisizione della lettura. Questo un oip' il messaggio

Mascheretti: sì esatto, e ragazzi, l'altro messaggio che ho salato per questioni di tempo. Occhio sempre agli studi animali, nel senso che i modelli animali possono cose che noi umani non possiamo per ovvi motivi e la risposta vera probabilmente ci può arrivare da loro. Un dato secondo me interessantissimo è il dato sull'animale che ha portato a casa la Holly Fitch per cui cosa hanno fatto?

Precedenti studi mostrano la presenza di varianti genetiche funzionali che  influenzano l'espressione di alcuni dei geni precedentemente descritti

GENES	FUNCTIONAL VARIANTS	EFFECTS	ASSOCIATION WITH READING
<i>DYX1C1</i>	rs3743205 (-3G → A) and rs57809907 (1249C → T)	They affect the translation process and disrupt functionality of the coded protein.	Both clinical and epidemiological samples
<i>DCDC2</i>	An highly polymorphic, short-tandem repeat, i.e., READ1	It could substantially act as a modifier of the gene expression.	Both clinical and epidemiological samples.
<i>KIAA0319</i>	A three-SNPs risk haplotype, i.e., rs4504469, rs2038137 and rs2143340, and rs9461045	They influence the gene's expression, splicing, or transcript stability of the gene.	Both clinical and epidemiological samples.
<i>CNTNAP2</i>	An homozygous point mutation 3709delG	It produces a non-functional protein.	-

oro sono andati a manipolare quella porzione di DCDC2 che noi abbiamo trovato associato alla componente visiva e sono andati a misurare la funzione visiva magnocellulare nel topolino e per noi è stato bingo perché quello che loro trovano nel topo è esattamente questo.

Facoetti: quello che noi abbiamo trovato nei dislessici. Avete capito cosa fanno nei modelli animali? Riescono a manipolare i geni candidati e a vedere poi a livello funzionale comportamentale quell'alterazione del gene come si ripercuote sul comportamento. E quella mutazione lì, quella delezione di quella porzione del gene, porta proprio delle alterazioni nella percezione del movimento

Mascheretti: e anche proprio nel numero di neuroni nelle aree visive del cervello del topo

Facoetti: e poi fare post mortem vai a vedere quanti neuroni c'erano e trovano anche il discorso degli strati.. vero è uscito recentemente

Mascheretti: io li ho saltati ma sì, soprattutto il dato della Fitch che lo conferma sull'animale ha fatto tirare a tutti un respiro di sollievo

Facoetti: perché lì è la manipolazione, nel modello animale quel gene è collegato a quel fenotipo. E cosa dicono quei rompiscatole che fanno solo GWAS? Dicono che hanno pochi topolini diranno, pochi neuroni, hanno misurato pochi

Mascheretti: loro non fanno animale. Quindi io ho saltato tante slide ma ci sono tutte e se ci dovesse essere qualcosa scrivete a me o ad andrea

Facoetti: Vanessa chiede se con interventi riabilitativi.... Eh questa parte volevo anche aggiungere che è un tentativo che vogliamo fare, cioè il rapporto tra genetica e la risposta e la risposta al trattamento riabilitativo. Domanda: *Quindi interventi riabilitativi che abbiamo visto stiamo andando a cercare di migliorare tramite esperienza ambientale un'alterazione genetica che provoca deficit alla via dorsale*

Mascheretti: brava per l'intuizione. Complimenti per l'intuizione. È stato uno dei miei ultimi grant, ovvero cercare di vedere tramite il modello umano e animale se esistono delle componenti ambientali che in qualche modo fungono come funzioni di rescue di alcune abilità. Questo lo possiamo fare solo con l'animale. È stato fatto per altri disturbi, prettamente per l'ansia ad esempio, però sì è un futuro non lo so io ci ho provato ma non mi hanno mai finanziata ma a me piacerebbe tanto vedere se non tanto qual è l'effetto del gene sulla funzione cognitiva perché ci sono già dei modelli animali che ci dicono questo, ma vedere se a fronte di questo effetto del gene su quella funzione cognitiva, se io inserisco un ambiente stimolante, e possiamo parlare di quale può essere un ambiente stimolante un topo, in qualche modo limito l'effetto che il gene ha su quella funzione cognitiva? Quindi c'è una funzione di rescue dell'ambiente? Questo ad oggi non lo sappiamo, quantomeno sui tratti di dislessia. Però sarebbe super interessante, proprio sempre nell'ottica di intervento e prevenzione precoce.

Facoetti: quello che posso aggiungere è che dalle evidenze diciamo scientifiche non è così assurdo pensare che ci possa essere un legame. Nel senso che noi abbiamo visto che attraverso esperimenti di selezione genetica riusciamo a creare dei disturbi, però poi l'ambiente arricchito è in grado di annullare quell'effetto della selezione genetica. Cioè ti vengono in mente gli studi sulle abilità delle abilità spaziali nei topolini iper selezionati e super stupidi dal punto di vista spaziali e super intelligenti, e poi la genetica selezionata nei topolini "più stupidi" dal punto di vista spaziali viene completamente annullata da un ambiente arricchito. E quindi è lì dove..

Mascheretti: sì questo sarebbe super figo

Facoetti: e dà la forza alla materia che insegniamo qui e che è il concetto di riabilitazione: riuscire ad andare ad annullare, non dico completamente ma mitigare gli effetti di un'alterazione di un pattern genetico complicatissimo che ci sta dietro a dei semplici comportamenti

Domanda: *come environmental enrichment in soggetti autistic o nei topini manipolati per essere autistici sulla dislessia? Sì esattamente così ragazzi.* Questa è l'idea, infatti è un'idea che io personalmente ho mutuato da studi di autismo, ansia e via dicendo.

Facoetti: la strada è quella! (Forse GWAS era più un problema nostro concettuale)