

L'elaborazione dell'espressione facciale emozionale in un campione monitorato per l'ansia sociale dall'infanzia all'adolescenza

INDICE

Capitolo 1: ANSIA SOCIALE

1.1 Premessa	pag. 5
1.2 Continuità con la Fobia Sociale	pag. 5
1.3 Influenze genetiche	pag. 7
1.4 Correlati cerebrali	pag. 8
1.5 Gli aspetti cognitivi e comportamentali	pag. 10

Capitolo 2: L'ELABORAZIONE DELLE EMOZIONI ESPRESSE DAI VOLTI

2.1 Premessa	pag.15
2.2 Correlati cerebrali	pag.16
2.3 Differenze individuali e psicopatologia	pag.18
2.4 Influenze genetiche	pag.20
2.5 Endofenotipi	pag.22

Capitolo 3: GLI ESPERIMENTI

3.1 Esperimento 1	pag.27
3.1.1 Premessa	pag.28
3.1.2 Metodo	pag.29
3.1.3 Risultati	pag.32
3.1.4 Discussione	pag.36
3.2 Esperimento 2	pag.39
3.2.1 Premessa	pag.40
3.2.2 Coorte longitudinale e studi preliminari	pag.41
3.2.3 Metodo	pag.44
3.2.4 Risultati	pag.52
3.2.5 Discussione	pag.56
3.3 Conclusioni degli esperimenti	pag.58

Bibliografia	pag.63
---------------------	---------------

CAPITOLO 1: ANSIA SOCIALE

1.1 Premessa

Con il termine Ansia Sociale si fa riferimento ad una dimensione caratterizzata da manifestazioni comportamentali di disagio e timidezza nell'interazione sociale. Tale dimensione è definita da predisposizioni temperamentali e caratteristiche personologiche presenti fin dalla prima infanzia, quali timidezza, temperamento inibito e predisposizione all'ansia interpersonale che spesso portano all'evitamento di situazioni nuove o poco familiari e che tendono a manifestarsi in modo piuttosto stabile nel corso della vita (Battaglia et al., 2004; 2005; Pujol et al., 2009).

Tale predisposizione è stata originariamente nominata con il termine Inibizione Comportamentale ed è stata descritta come un costrutto definito in un'ottica categoriale, quindi come una problematica assente o presente nei soggetti secondo un rapporto di reciproca esclusione (Kagan et al., 1984). Il costrutto può essere invece interpretato in una prospettiva dimensionale dal momento che i parametri comportamentali che lo caratterizzano possono distribuirsi in maniera continua all'interno della popolazione generale (Compton et al., 2000; Battaglia et al., 2004). Il termine Ansia Sociale può pertanto essere riferito ad un costrutto che descrive quantitativamente le differenze individuali nell'approccio alle situazioni poco familiari e agli stimoli sociali, secondo il quale solo le manifestazioni estreme rappresentano dei quadri clinici. Infatti è stato riscontrato che solo le manifestazioni più estreme della predisposizione temperamentale possono portare alla psicopatologia, in un'ottica probabilistica e non deterministica.

A conferma di tali considerazioni nella popolazione americana di razza caucasica è stato rilevato un indice di prevalenza del 10 -20 % (Biedel & Turner, 2000), mentre in un campione appartenente alla popolazione generale di bambini italiani è stata stimata una percentuale del 13% (Battaglia et al., 2004).

1.2 Continuità con la Fobia Sociale

Diversi studi longitudinali (Kagan et al., 1984; Reznick et al., 1986; Hirshfeld et al., 1992; Fox et al. 2001) hanno valutato la stabilità temporale dell'Inibizione Comportamentale /Ansia Sociale durante il corso della vita. Kagan et al. (1998) hanno osservato, attraverso ripetute misurazioni degli indici di Inibizione Comportamentale nel tempo, che il costrutto permane stabile dalla prima infanzia fino alla pre-adolescenza. Questo dato è stato replicato in altri studi effettuati sia su campioni clinici che su campioni estratti dalla popolazione generale (Fox

et al., 2001). La stabilità temporale sembra essere particolarmente confermata per i soggetti che presentano nella prima infanzia manifestazioni estreme di inibizione (Kagan et al., 1988). Parallelamente numerosi studi (Rosembaum et al., 1991; Biederman et al., 1990; 2001; Hayward et al., 1998; Mick & Telch, 1998; Prior et al., 2000) hanno sostenuto l'ipotesi di questa dimensione temperamentale come possibile indicatore di rischio individuale per lo sviluppo di Disturbi d'Ansia in età adulta.

Molti di questi studi sostengono l'esistenza di una specifica associazione con la Fobia Sociale (Hayward et al., 1998; Mick & Telch, 1998; Biederman et al., 2001). In particolare, attraverso studi sulla popolazione generale, è stato ipotizzato che l'Inibizione Comportamentale/Ansia Sociale nell'infanzia possa predire l'esordio di una diagnosi di Fobia Sociale durante l'adolescenza. E' risultato infatti che tale dimensione, non solo correla con la Fobia Sociale durante l'adolescenza ma ne aumenta anche la probabilità di esordio (Mick & Telch, 1998; Hayward et al., 1998).

Questi risultati potrebbero essere interpretati alla luce di un continuum secondo cui una dimensione che si manifesta con una modalità particolare di reazione agli stimoli sociali durante l'infanzia si mantiene stabile nel tempo e può essere riscontrata anche nelle manifestazioni cliniche maggiormente definite della Fobia Sociale (Turner et al., 1996).

La Fobia Sociale, secondo la dicitura nosografica del DSM IV-TR (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorder, IV edizione-Text Revision, APA, 2000), è un disturbo caratterizzato da ansia e paura marcate e persistenti in situazioni di interazione e prestazione sociali, nelle quali la persona è esposta al possibile giudizio altrui, soprattutto di persone non familiari. L'individuo teme la possibile umiliazione o l'imbarazzo per la propria reazione ansiosa.

La Fobia Sociale presenta alcune peculiarità qualora venga osservata in soggetti in età evolutiva. Nei bambini l'ansia si manifesta, sia nell'interazione con i coetanei che con gli adulti, non solo con timidezza ed intenso disagio nelle relazioni sociali e nelle situazioni di prestazione sociale (e.g. rispondere alle domande in classe, parlare di fronte ad altri o con persone che non si conoscono bene, incontrare coetanei, mangiare di fronte ad altri, utilizzare bagni pubblici), ma anche con pianti, scoppi d'ira e irrigidimento. Queste difficoltà conducono di sovente al ritiro sociale ed evitamento delle situazioni temute.

In sintesi, è possibile concludere che un temperamento inibito in modo consistente e persistente e che si manifesta precocemente nella vita dell'individuo, è stato descritto come indice di suscettibilità alla Fobia Sociale o come precursore psicopatologico del disturbo. Tale continuità risulta di grande interesse, in quanto consente di approfondire l'indagine e la comprensione della struttura e dei fattori eziologici del fenotipo psicopatologico ed aumenta la possibilità di riconoscerne precocemente l'esordio.

1.3 Influenze genetiche

Diversi studi presenti in letteratura si sono occupati di indagare l'eziologia sia delle manifestazioni temperamentali dell'Inibizione Comportamentale/Ansia Sociale che della condizione psicopatologica nota come Fobia Sociale.

Da questi studi, effettuati prevalentemente su campioni gemellari, emerge l'importanza della quota di varianza spiegata dalla componente genetica nell'eziologia di tali manifestazioni (Matheny, 1989; Robinson et al., 1992; Goldsmith & Lemery, 2000; Kendler et al., 1999; Nelson et al., 2000).

Alla luce di tali risultati, sono state condotte numerose indagini nell'ambito della genetica molecolare al fine di individuare possibili geni associati alle manifestazioni dell'Ansia Sociale. In particolare l'interesse di tali studi si è focalizzato sul polimorfismo del promotore del trasportatore della serotonina (5-HTTLPR) sul cromosoma umano 17q11.

Da moltissime ricerche, sia sugli animali che sugli umani, effettuate con numerosi approcci tra loro differenti, è stato infatti rilevato un coinvolgimento specifico del neurotrasmettitore della serotonina nella generazione e nella regolazione dei comportamenti emotivi (Lucki 1998). L'implicazione del neurotrasmettitore inoltre è stata confermata dall'efficacia di farmaci che agiscono sul sistema serotoninergico in pazienti affetti da Disturbi dell'Umore e da Disturbi d'Ansia (Blier & Montigny, 1999). Infine il neurotrasmettitore è risultato associato anche a caratteristiche temperamentali e personologiche che rappresentano un fattore di rischio per i disturbi suddetti (Murphy et al., 1998)

Un'attenzione particolare in questi studi è stata pertanto posta sul 5-HTTLPR.

Tale polimorfismo si presenta con due forme alleliche, L (lungo) e s (corto), che influenzano la trascrizione del trasportatore della serotonina. In particolare l'allele s determina una riduzione nel processo di trascrizione tale da portare a livelli più bassi di trasportatore e riducendo la ricaptazione del neurotrasmettitore a livello sinaptico (figura 1.1; Lesch et al., 1996).

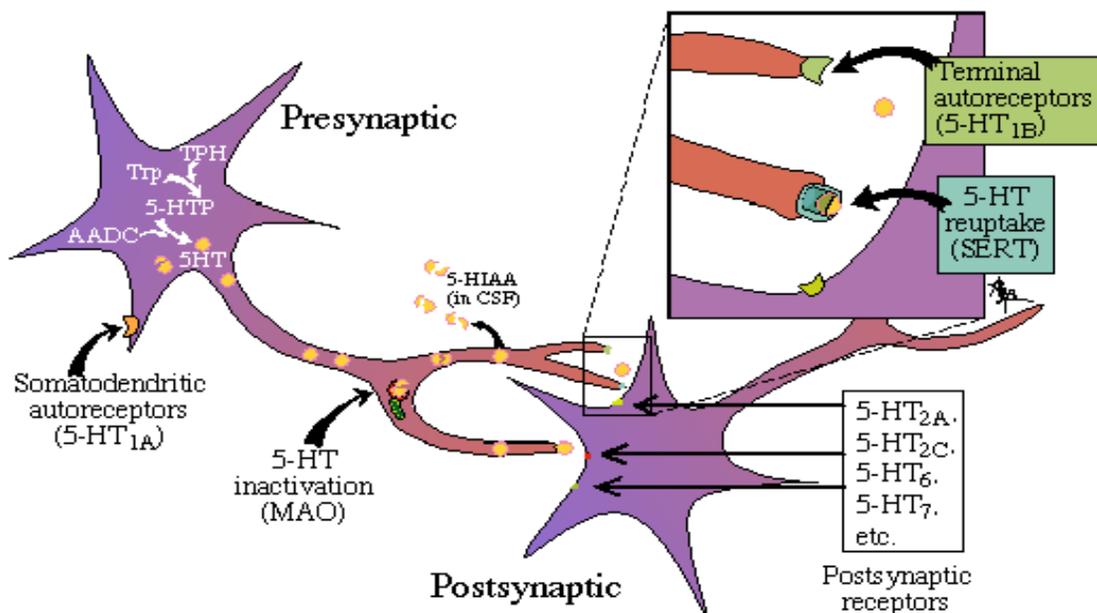


Figura 1.1 Sintesi, attività, re-uptake e metabolismo di una sinapsi serotonergica

Nonostante esistano ancora opinioni discordanti in questo ambito, la presenza di uno o due alleli *s* sul 5-HTTLPR sembra essere associata alla predisposizione all'ansia, ai comportamenti di evitamento e ad uno stile negativo nelle relazioni interpersonali (Munafò et al., 2003). Nello specifico, da uno studio effettuato su bambini estratti dalla popolazione generale, è emerso che alti indici di Ansia Sociale vengono riscontrati nei portatori di una o due coppie dell'allele *s* ("short") nella regione adibita al controllo della trascrizione del gene trasportatore della serotonina (5-HTT; Battaglia et al., 2005).

1. 4 Correlati cerebrali

Parallelamente all'area di indagine genetica, diversi studi di brain imaging sono stati realizzati al fine di rilevare le basi funzionali dell'Ansia Sociale. Da tali studi risulta ormai nota l'implicazione di diverse aree cerebrali, in particolare del sistema limbico, tra le quali l'amigdala ricopre un ruolo cruciale (Adolphs, 2002; Nomura et al., 2004).

Situata in profondità nel lobo temporale di entrambi gli emisferi, l'amigdala può essere

rappresentata come una struttura composta da vari nuclei sottocorticali (figura 1.2). Essa è infatti costituita da nuclei laterali e basolaterali deputati alla ricezione dei messaggi da svariate zone cerebrali, e dai nuclei centrali da cui si diramano connessioni verso diverse aree corticali e sottocorticali (Bear et al., 2002). In particolare riceve afferenze provenienti dalle corteccie associative, dalla corteccia limbica e paralimbica e dall'ipotalamo; da essa inoltre si diramano efferenze dirette all'ipotalamo, all'ippocampo, alle corteccie associative e paralimbiche (Bear et al., 2002).

La struttura sottocorticale risulta inoltre essere densamente innervata da neuroni serotonergici e ricca di recettori del 5-HT (Azmitia & Gannon, 1986).

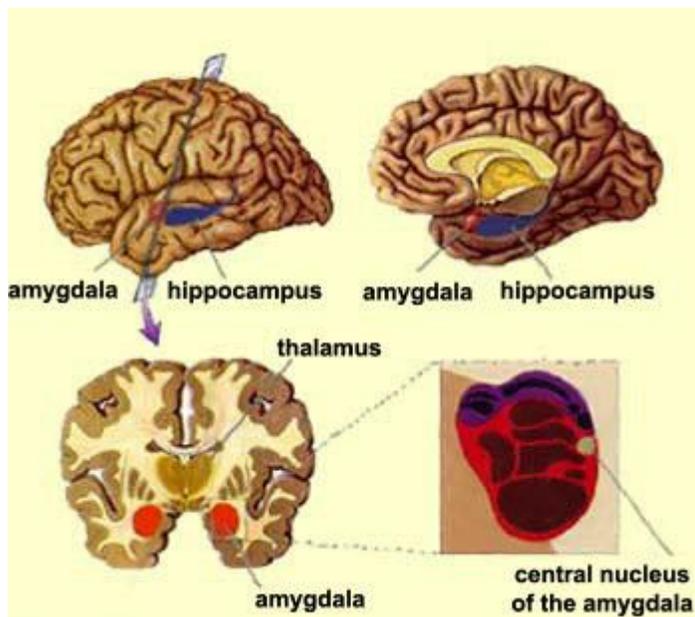


Figura 1.2 Localizzazione cerebrale dell'amigdala.

La funzione dell'amigdala è stata originariamente indagata attraverso studi condotti sugli animali rispetto all'elaborazione di segnali di pericolo e le relative risposte di paura. La struttura è risultata ampiamente coinvolta nella registrazione degli stimoli salienti, in particolare quelli che rappresentano una possibile minaccia, presenti nell'ambiente. Dai risultati di questi studi è stato pertanto possibile iniziare a rintracciare le possibili basi biologiche dell'ansia (Pine, 2007). In particolare da queste ricerche è stato sottolineato il coinvolgimento della struttura amigdaloidica non solo nelle reazioni di paura ma anche nelle

risposte tipiche dell'ansia. Nei primati non umani è stato infatti osservato che lesioni bilaterali dell'amigdala portavano ad una riduzione delle risposte d'ansia anche in situazioni di pericolo (Emery et al., 2001).

Tali evidenze riscontrate sugli animali hanno quindi condotto la ricerca clinica a focalizzare l'attenzione su questa struttura nell'indagine dei Disturbi d'Ansia.

Da questa ricerca è emerso che l'amigdala mostra un'iperattivazione nei soggetti con ansia, specie quando si trovano sottoposti a compiti che potrebbero provocare i sintomi che li caratterizzano. Questa attivazione è stata particolarmente osservata nelle condizioni di Ansia Sociale.

In particolare è stata evidenziata la presenza di una modalità di attivazione cerebrale specifica nei soggetti con Ansia Sociale in situazioni di interazione e prestazione sociale, ossia un decremento dell'attività di specifiche aree corticali (area temporale, area parietale e corteccia dell'insula) a cui corrisponde un aumento dell'attività dell'amigdala (Van Ameringen et al., 2000; Tillfors et al., 2001). Il medesimo pattern di attivazione cerebrale è stato riscontrato in soggetti adulti che sono stati identificati come inibiti da bambini in risposta alla visione di volti non familiari (Schwartz et al., 2003).

Il coinvolgimento dell'amigdala nell'Ansia Sociale è stato riscontrato anche attraverso l'osservazione di pazienti con lesioni della struttura stessa. In particolare è stato osservato che soggetti con lesioni bilaterali all'amigdala manifestano una scarsa intelligenza sociale, mostrando un'evidente difficoltà nell'interpretare i comportamenti sociali dei propri simili, con un pattern di risposta paragonabile ai soggetti con Ansia Sociale (Adolphs et al., 1994).

1.5 Gli aspetti cognitivi e comportamentali

Alle manifestazioni dell'Inibizione comportamentale/Ansia sociale sono stati associati specifici parametri comportamentali osservabili: l'aspetto timido, il marcato attaccamento ad una figura di riferimento in presenza di novità e imprevedibilità, la riluttanza ad iniziare il gioco e la prolungata latenza di vocalizzazioni quando il bambino si trova in ambienti e con persone poco familiari. Tali comportamenti tendono ad assumere forme diverse con lo sviluppo a causa di processi maturativi ma rappresentano la manifestazione di un medesimo fenotipo (Kagan et al., 1988).

L'Inibizione Comportamentale/Ansia Sociale si caratterizza anche per ciò che riguarda le basi cognitive dell'interazione sociale. I bambini inibiti esperiscono quotidianamente pensieri

negativi (Albano et al., 1995; Nelson et al., 2005) che ovviamente interferiscono con le capacità di funzionamento nell'ambiente. Queste "distorsioni" a livello cognitivo sembrano essere influenzate da un'insufficiente capacità di coping e da una notevole sovrastima nella valutazione della pericolosità delle situazioni (Beck et al., 1985; Bogels & Zigterman, 2000).

Tutto ciò si riverbera a livello emotivo in un'estrema preoccupazione e ansia sperimentata in situazioni sociali, in sensazioni di disagio e condotte di evitamento che possono alla lunga inficiare gravemente la vita di relazione del soggetto determinando condizioni prossime al ritiro sociale (Clark & McManus, 2002).

La tendenza all'isolamento dei bambini inibiti sembra essere riconducibile alla scorretta interpretazione e decodifica dei segnali veicolati dalle interazioni sociali, i soggetti attribuiscono infatti ai comportamenti e alle espressioni del volto degli interlocutori un chiaro segnale di rifiuto sul piano interpersonale (Clark & McManus, 2002). Date queste modalità di interazione problematiche i soggetti inibiti vivono in un ambiente povero di relazioni e corrono il rischio di consolidare nel tempo la compromissione nel funzionamento sociale e di sviluppare un Disturbo d'Ansia (Hirshfield et al., 1992; Rosenbaum et al., 1992).

Per queste ragioni la ricerca clinica ha ritenuto di fondamentale importanza l'indagine dei processi di elaborazione dei messaggi sociali che risultano alla base dell'Ansia Sociale. In particolare come stimoli elettivi sono stati utilizzate le emozioni espresse dai volti in quanto veicolo importante di messaggi di natura sociale.

***CAPITOLO 2: L'ELABORAZIONE DELLE EMOZIONI
ESPRESSE DAI VOLTI***

2.1 Premessa

La capacità di decodificare le espressioni facciali rappresenta un requisito fondamentale per un buon funzionamento sociale (Adolphs et al., 1994; Blair et al., 1999). Il volto umano rappresenta infatti una fonte complessa di segnali emotivi, la cui decodifica consente all'individuo di inferire la tonalità affettiva dell'interlocutore, di coglierne i bisogni e le intenzioni, fornendo quindi indizi utili all'interpretazione e all'anticipazione del comportamento altrui (Camras et al., 1985; Herba & Phillips, 2004). Ciò comporta la possibilità di modificare in modo opportuno i propri comportamenti e di interagire con l'ambiente circostante in modo funzionale ed adattivo (Herba & Phillips, 2004; Battaglia et al., 2004; Batty & Taylor, 2006).

E' stato inoltre possibile individuare come ciascuna emozione veicoli uno specifico messaggio di natura sociale: un'espressione di sorpresa per esempio evoca in chi la guarda la tendenza a cercare maggiori dettagli nell'ambiente circostante, in quanto parzialmente ambigua (Whalen, 1998); la gioia veicola un messaggio di approvazione sociale (Adolphs, 2002); la paura viene generalmente interpretata come minaccia di un possibile pericolo (Adolphs, 2002); mentre la rabbia è tipicamente riferita ad un clima di ostilità e il disgusto di rigetto nelle relazioni interpersonali (Whalen, 1998).

La capacità di percepire e processare gli indizi a contenuto emotivo provenienti dai volti dei propri simili rappresenta pertanto una condizione basilare per un'appropriata comunicazione e per lo sviluppo delle interazioni interpersonali (Battaglia et al., 2004).

L'abilità di elaborazione delle espressioni facciali compare infatti precocemente nella vita dell'individuo e diversi studi in letteratura hanno identificato quelle che vengono ritenute le tappe di sviluppo di tale competenza. È stato in primo luogo osservato che i neonati sono attratti dai volti umani (Field et al., 1982), come dimostrato dal fatto che solitamente essi dirigono lo sguardo o il movimento delle mani verso i volti delle persone attorno a loro, soprattutto se si tratta delle figure di riferimento primarie; nel periodo dello sviluppo compreso tra tre e nove mesi i bambini focalizzano l'attenzione sui singoli elementi emotivi che costituiscono l'espressione facciale: occhi, naso e bocca (Barrera & Maurer, 1981). Entro i dodici mesi viene acquisita la capacità di riconoscere la tonalità affettiva generica dell'espressione facciale, distinguendo le espressioni positive in contrapposizione a quelle negative (Camras et al., 1985). In età pre-scolare il bambino diviene in grado di discriminare le differenti emozioni (Nelson, 1987; Thomas et al., 2007) fino in età scolare in cui si sviluppa la capacità di attribuire un'etichetta verbale all'espressione facciale. In particolare è stato

osservato che tale capacità si sviluppa in un primo momento riguardo alle emozioni facciali positive, ed in seguito per quelle negative (Camras et al., 1985; Vicari et al., 2000).

Oltre agli aspetti comuni legati allo sviluppo, la ricerca si è focalizzata sulla caratteristica di universalità che contraddistingue le emozioni espresse dai volti. Charles Darwin per primo, nel 1892, ha evidenziato il carattere di universalità dell'abilità di decodificare le espressioni del volto: essa infatti è comune a diverse culture e alcune emozioni risultano trasversali all'appartenenza culturale degli individui ed universalmente riconoscibili. Queste emozioni vengono definite fondamentali e sono rappresentate da: gioia, sorpresa, paura, tristezza, rabbia e disgusto (Ekman & Friesen, 1976).

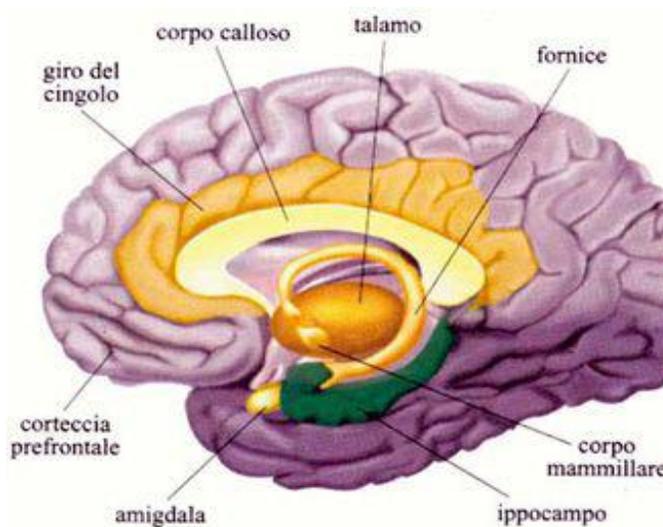
2.2 Correlati cerebrali

Data la rilevanza del processo di decodifica delle espressioni facciali nello sviluppo emotivo e sociale degli individui, numerosi studi si sono occupati di indagare i possibili correlati cerebrali di tale abilità. Dai risultati di questi studi emerge in maniera consistente il ruolo svolto dall'amigdala (vedi paragrafo 1.4) nell'attribuire un significato emotivo agli stimoli (Thomas et al., 2001; Tillfors et al. 2001; Furmark et al., 2004, Hariri et al., 2002; Haxby et al., 2002; Herba & Phillips, 2004, Phan et al., 2006). In particolare è stato osservato che soggetti sani, di fronte ad un compito di identificazione delle espressioni facciali, attivano l'amigdala (Fernandez-Egea, 2009). L'attivazione del corpo amigdaloideo è stata spesso associata a compiti di identificazione delle espressioni facciali negative, specie a fronte delle emozioni di paura e rabbia (Herba & Phillips, 2004, Stein et al., 2002; Haxby et al., 2002).

Parallelamente studi su pazienti con lesioni bilaterali dell'amigdala hanno mostrato una significativa compromissione nella capacità di decodifica delle emozioni, specialmente per quanto riguarda le emozioni veicolanti segnali negativi (Adolphs et al. 1994; Calder et al., 1996).

Nonostante il ruolo svolto dall'amigdala nell'elaborazione degli stimoli emotivi facciali sembra essere più rilevante per l'elaborazione della paura o di potenziali minacce, è provato altresì il suo coinvolgimento in aspetti riguardanti le cognizioni sociali che non sono direttamente connesse alla paura (Haxby et al., 2002). Infatti l'amigdala sembra svolgere un ruolo più generalmente connesso all'elaborazione delle emozioni cruciali per il raggiungimento di una consapevolezza sociale, come il giudizio dello stato emotivo altrui (Haxby et al., 2002).

Strettamente legate all'amigdala risultano le aree corticali prefrontali (ventromediale, dorsolaterale e cingolata anteriore) che interagiscono con essa nella processazione di stimoli emotivi (figura 2.1). È stato riscontrato un ruolo di controllo inibitorio di alcune aree corticali rispetto all'attivazione emozionale autonoma dell'amigdala (Timms, 1977; Lévesque et al., 2003; Ridderinkhoff et al., 2004; Barrett et al., 2007). L'attività corticale prefrontale modulerebbe la risposta "istintiva", dando origine ad una risposta maggiormente consapevole ed elaborata cognitivamente, evitando reazioni comportamentali abnormi (Lewis et al., 2008; Moser et al., 2009).



2.1 Alcune delle aree maggiormente implicate nell'elaborazione delle espressioni facciali

Altre strutture associate all'amigdala nell'elaborazione degli stimoli emotivi risultano essere: l'ippocampo, il giro paraippocampale e il giro fusiforme.

La formazione dell'ippocampo, anch'essa situata nei lobi temporali, è la struttura grazie alla quale vengono memorizzati e appresi i dettagli legati all'emozione e la conseguente gradazione affettiva (piacevole/spiacevole) dipendente da ricordi antichi sia trasmessi geneticamente che legati all'esperienza (Bear et al., 2002). Ulteriore regione connessa alle suddette formazioni è il giro paraippocampale. Adiacente all'ippocampo il giro paraippocampale si estende dal solco ippocampale all'istmo della corteccia del cingolo. Strutturalmente simile all'ippocampo è anch'esso connesso con la parte basolaterale del nucleo amigdaloidale (Bear et al., 2002). E' noto il coinvolgimento di entrambe queste

strutture nella formazione e nella rievocazione della memoria dichiarativa. In particolare, recenti studi sostengono che i neuroni della regione paraippocampale risponderebbero con un notevole aumento dell'attivazione durante l'esposizione a stimoli nuovi e che questa amplificata attivazione subirebbe un decremento già alla seconda presentazione dei medesimi stimoli; ciò starebbe ad indicare il coinvolgimento del giro paraippocampale nella memoria di "riconoscimento" (Viskontas et al., 2006).

Il giro fusiforme risulta invece implicato nella processazione automatica (non cosciente) dei volti (Morris et al., 2007): studi di neuroimaging funzionale hanno evidenziato che una specifica area del giro fusiforme si attiva in modo selettivo maggiormente di fronte ad immagini di volti rispetto ad immagini di oggetti (per esempio una casa) (Kanwisher et al., 1997).

2.3 Differenze individuali e psicopatologia

La maggior parte degli studi presenti in letteratura, sia di neuroimaging che di osservazione comportamentale, che indagano l'elaborazione delle espressioni facciali focalizzano l'interesse sull'indagine delle caratteristiche che rendono simili gli individui tra loro. Tuttavia esistono numerose evidenze del fatto che il processo di decodifica delle emozioni espresse dai volti e la sua accuratezza vengano influenzati da tratti di personalità, predisposizioni temperamentali e variabili psicopatologiche (Feinberg et al., 1986; Gur et al., 1992; Birbaumer et al., 1998).

In particolare dai dati in letteratura emerge che gran parte delle patologie psichiatriche negli adulti e nei bambini sono associate ad un deficit di identificazione delle espressioni facciali (Blair et al., 2001; Herba & Phillips, 2004).

Risulta centrale, in tale ambito, la ricerca che coinvolge le caratteristiche di Ansia Sociale. La considerazione principale è che soggetti ansiosi presentano un malfunzionamento nelle relazioni sociali e ciò può essere dovuto ad un inaccurato riconoscimento delle informazioni emozionali (Leber et al., 2009). È stato osservato per esempio che soggetti adulti con caratteristiche di Ansia Sociale tendono a compiere errori di decodifica di uno stimolo emotivamente neutro identificandolo come negativo (Winton et al., 1995) e che soggetti con Fobia Sociale presentano maggiori difficoltà nello svolgere compiti d'identificazione delle espressioni di rabbia e disgusto (Stein et al., 2002).

Risultati analoghi sono stati riscontrati in soggetti di età evolutiva (Leber et al., 2009).

Bambini con alti indici di Ansia Sociale commettono infatti un maggior numero di errori rispetto ai coetanei in compiti di identificazione delle emozioni espresse dai volti. In particolare l'espressione di rabbia risulta essere la più difficile da riconoscere e viene spesso interpretata come un segnale di rigetto sociale (Battaglia et al., 2004). La presenza di caratteristiche di Ansia Sociale è risultata influenzare anche la latenza di risposta nella classificazione delle emozioni: bambini con alti livelli di Ansia Sociale mostrano tempi di risposta maggiori rispetto ai loro coetanei (Melfsen & Florin, 2002).

Infine, anche bambini con diagnosi di Fobia Sociale dimostrano di avere minori capacità di identificazione delle emozioni del volto rispetto a bambini non affetti da psicopatologia (Simonian et al., 2001).

Recentemente si è osservata una crescita di interesse da parte degli studi di brainimaging rispetto ai correlati cerebrali evocati dalle espressioni del volto in soggetti caratterizzati dalla presenza di Ansia Sociale e di Fobia Sociale. Soggetti con caratteristiche di Ansia Sociale e Fobia Sociale evidenziano, infatti, una notevole compromissione del funzionamento in situazioni di interazioni sociali e ciò rende tale area fenotipica un ambito di ricerca particolarmente significativo (Horley 2003; Tillfors, 2001; Stein 2007).

Sono presenti studi molto eterogenei, che indagano sia campioni clinici (Stein et al., 2002; Evans et al., 2008), sia soggetti di popolazione generale (Thomas et al., 2001; Stein et al., 2008), adottando misure di Ansia Sociale sia di stato (diagnosi di Fobia Sociale) che di tratto (misura quantitativa di caratteristiche di Ansia Sociale).

Per quanto riguarda i correlati cerebrali, in soggetti con Ansia Sociale è stato riscontrato un ampio coinvolgimento dell'amigdala a fronte di compiti di elaborazione delle espressioni facciali (Stein et al., 2002; Blair et al., 2008; Evans et al., 2008). Recentemente, è stato per esempio osservata in un campione di soggetti di popolazione generale caratterizzati per il grado di Ansia Sociale, un'associazione tra l'attivazione dell'amigdala di fronte ad un compito di riconoscimento di espressioni facciali e numero di sintomi psicopatologici manifestati (Pujol et al., 2009). E' stato infatti osservato che in presenza di caratteristiche di Ansia Sociale vi sia un'attivazione esagerata della struttura amigdaloidea a fronte delle emozioni espresse dai volti (Stein et al., 2002; Blair et al., 2008; Furmark et al., 2009) e ciò avverrebbe in modo particolare per gli stimoli a connotazione negativa rispetto a stimoli neutri o positivi (Stein et al., 2002, 2007; Evans et al., 2008). Inoltre, in soggetti adulti con Fobia Sociale esposti ad un

compito di riconoscimento di emozioni facciali è stata riscontrata una maggiore attivazione di aree sottocorticali, tra cui i giri paraippocampali e l'amigdala, rispetto a soggetti sani, e con un'attivazione maggiore di fronte ad espressioni ostili (Stein et al., 2002).

La maggior parte di questi dati presenti in letteratura riguarda ancora una volta lo studio di soggetti adulti (Morris et al., 1996, Pujol et al., 2009; Monk et al., 2003), ma sono stati parzialmente riscontrati anche in soggetti in età evolutiva (Baird, 1999; Monk et al., 2008; Guyer et al., 2008). In particolare, in soggetti pediatrici con Ansia Sociale è stato riscontrato che una ridotta accuratezza in un test di identificazione di espressioni facciali rispecchia un malfunzionamento della struttura amigdaloidica (Easter et al., 2005).

2.4 Influenze genetiche

Diversi studi hanno indagato l'associazione tra alcuni polimorfismi genetici e specifici pattern di attivazione cerebrale a fronte di stimoli a valenza sociale, quali le emozioni espresse dai volti. In particolare molti dati in letteratura sostengono l'esistenza di una correlazione tra uno specifico polimorfismo del gene che codifica per il trasportatore della serotonina 5-HTTLPR (5-HT Transporter gene linked polymorphic region; vedi paragrafo 1.3), del quale sono state individuate le varianti alleliche s (short) ed L (long) (Lesch et al., 1996), e la soglia di eccitabilità dell'amigdala. In particolare è stata riscontrata una maggiore risposta dell'amigdala di fronte ad espressioni facciali nei soggetti portatori dell'allele s rispetto agli omozigoti L (figura 2.2; Hariri et al., 2002, 2005; Munafò et al., 2008; Furmark et al., 2009).

Il ruolo del polimorfismo genetico in questione nell'influenzare l'attivazione sottocorticale, in particolare dell'amigdala, di fronte a compiti e stimoli emotivi, è stato confermato in studi che utilizzano tecniche di neuroimaging differenti (PET, fMRI), paradigmi sperimentali eterogenei e popolazioni sia cliniche che non (Munafò et al., 2008).

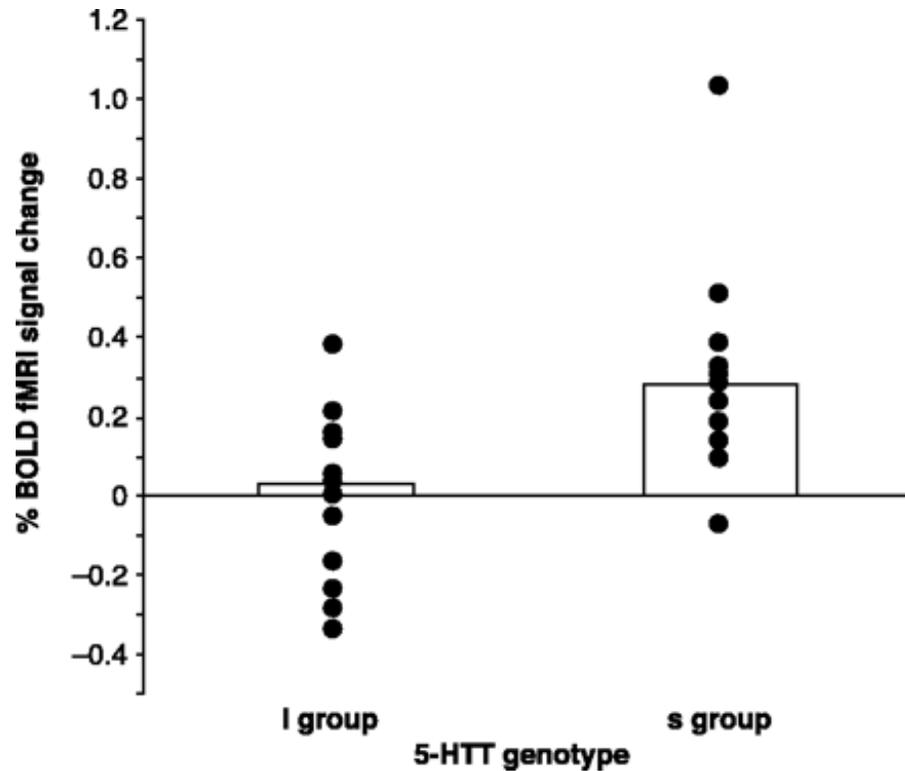
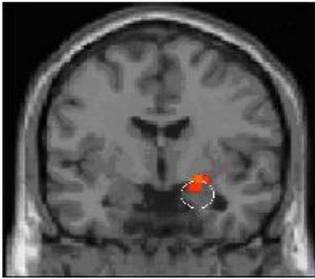


Figura 2.2 Attivazione dell'amigdala a fronte di espressioni di rabbia nei portatori dell'allele L vs portatoti dell'allele s del 5-HTTLPR.

Queste osservazioni nascono dal fatto l'amigdala è densamente innervata di neuroni serotoninergici ed i recettori 5-HT sono presenti in numero abbondante in tutti i nuclei che compongono la struttura (Azmitia & Gannon, 1986). Per tale motivo l'attività dell'amigdala potrebbe essere particolarmente sensibile alle alterazioni nella neurotrasmissione serotoninergica e la variabilità nell'eccitabilità dell'amigdala può verosimilmente contribuire alle differenze tra soggetti, specie nelle disposizioni all'Ansia Sociale (Hariri et al., 2003; vedi paragrafo 1.3).

2.5 Endofenotipi

I dati finora presentati riflettono una notevole sovrapposizione tra polimorfismi genetici e correlati cerebrali associati all'Ansia Sociale e all'elaborazione delle emozioni espresse dai volti. Ciò suggerisce la possibilità di utilizzare pattern di attivazione di specifiche aree

cerebrali evocati dalle espressioni facciali come possibili endofenotipi della condizione clinica dell'Ansia sociale.

Tale necessità nasce dal fatto che i disturbi psicopatologici e le manifestazioni temperamentali, tra cui l'Ansia Sociale si presentano fenotipicamente in modo complesso probabilmente a causa della loro origine multifattoriale (Plomin, 1986; Moffitt et al., 2005; Rutter et al., 2006).

Nella maggior parte dei casi, rispetto all'eziologia di una caratteristica comportamentale osservabile, la combinazione di più geni dà origine ad un fenotipo complesso, sia esso patologico o meno. Infatti, generalmente, un determinato genotipo dirige il proprio contributo attraverso molteplici espressioni differenti, dando luogo ad esiti comportamentale di vario genere; allo stesso modo una stessa manifestazione genotipica può derivare da substrati genotipici differenti (Gould & Gottesman, 2003).

La relazione tra una manifestazione comportamentale e la componente genetica che rappresenta parte della sua eziologia non può essere, quindi, rappresentata in modo lineare, né si può ipotizzare una sua facile identificazione.

Per tali ragioni viene ritenuta di grande utilità l'indagine dell'eziologia delle caratteristiche fenotipiche psicopatologiche attraverso lo studio di fenotipi intermedi o endofenotipi.

Gli endofenotipi sono definiti come costrutti che mediano tra i geni di suscettibilità di un tratto psicologico o psicopatologico e l'espressione fenotipica del tratto stesso. La loro indagine risulta importante in quanto, essendo spesso rappresentati da markers biologici, essi risultano maggiormente in relazione con il corredo genetico dell'individuo di quanto non lo sia una determinata caratteristica psicopatologica (Gottesman & Gould, 2003).

Lo studio degli endofenotipi si è rivelato di estrema importanza rispetto alla possibilità di cogliere le componenti genetiche che contribuiscono alla suscettibilità per i disturbi psichiatrici. Infatti si tratta di un livello di analisi strettamente legato al complesso substrato genetico, ma empiricamente osservabile e misurabile direttamente. Secondo quest'ottica, a partire dalle basi genetiche che accomunano alcune caratteristiche psicopatologiche e gli endofenotipi, strutturalmente più semplici, dovremmo essere in grado di approfondire le nostre conoscenze rispetto alla biologia dei disturbi psichiatrici stessi (Flint & Munafò, 2007).

I fenotipi intermedi comprendono misure neurofisiologiche, neuroanatomiche, biochimiche, endocrinologiche, cognitive e neuropsicologiche (Leboyer et al., 1998), che sono state osservate in associazione a particolari condizioni psicopatologiche ed è stato ormai

riscontrato che l'attivazione cerebrale, sia in termini di attivazione elettrocorticale che di specifiche aree cerebrali, può essere considerata un valido endofenotipo.

Pertanto, parallelamente agli studi di brain imaging precedentemente descritti (paragrafi 2.3 e 2.4), l'indagine degli endofenotipi si è focalizzata anche sulla ricerca di pattern di attivazione elettrocorticale rilevati attraverso la tecnica dei Potenziali Evocati (ERP).

La tecnica degli ERP è stata ampiamente utilizzata per analizzare l'attivazione elettrocorticale sia durante lo svolgimento di un compito cognitivo o motorio specifico, sia durante l'elaborazione implicita di stimoli a connotazione emotiva che vengono presentati al soggetto senza richiesta di un compito esplicito (Balconi, 2004).

La registrazione avviene attraverso elettrodi posti sullo scalpo, che rilevano le variazioni di potenziale elettrico in concomitanza a stimolazioni sensoriali o a processi motori e cognitivi (Balconi, 2004).

Per questi studi sono state utilizzate diverse componenti, che riflettono gli stadi di elaborazione dell'informazione.

In particolare tra le componenti più studiate si trova la N170 in quanto identificata come specifica nell'elaborazione dei volti umani, sembra cioè riflettere in modo specifico le prime fasi di analisi degli stimoli che consentono di distinguere un volto da qualsiasi altro oggetto (Bentin et al., 1996; Sagiv e Bentin, 2001; Taylor et al., 2001).

Un'altra componente recentemente utilizzata per valutare l'elaborazione delle espressioni facciali è rappresentata dalla N400. Appartiene ai cosiddetti potenziali evocati endogeni o secondari, quelli che riflettono le operazioni cognitive di elaborazione dell'informazione e che non dipendono solo dalle caratteristiche fisiche dello stimolo ma dall'interazione del soggetto con esso (Picton et al., 2000).

Questa componente è stata descritta prevalentemente in associazione a compiti di comprensione semantica (Kutas e Hillyard, 1980). Più recentemente, alcuni autori hanno analizzato questa componente dei potenziali evocati anche in relazione alla processazione dei volti umani. La N400 è stata individuata sia negli adulti che nei bambini a partire dai 10 anni di età (Batty e Taylor, 2002; Coch et al., 2002), sottoposti all'osservazione di volti esprimenti diverse emozioni.

Diversi autori concordano nel ritenere che questa componente rifletta il processo cognitivo di analisi delle informazioni specifiche veicolate da un volto (Schweinberger e Burton, 2003;

Posamentier e Abdi, 2003; Olivares et al., 2003), in particolare la sua valenza emotiva (Williams et al., 2004).

Infine, la componente in assoluto più studiata è stata la P300, specie nell'indagine di associazioni tra ERP e psicopatologia. Alcuni hanno sottolineato che l'ampio utilizzo di questa componente deriva probabilmente per la sua grande ampiezza e per la facilità con cui può essere elicitata ed osservata attraverso un paradigma di oddball visivo o uditivo.

Per quanto riguarda la componente P300 in questo ambito è stata particolarmente utilizzata nell'indagine sulla relazione tra i potenziali evocati ed i fenotipi esternalizzanti (ADHD, problemi di condotta, aggressività, ecc) e non tanto con le manifestazioni di Inibizione Comportamentale o Ansia Sociale.

CAPITOLO 3: GLI ESPERIMENTI

3.1 ESPERIMENTO 1

IDENTIFICATION OF GRADUALLY CHANGING EMOTIONAL EXPRESSIONS IN SCHOOLCHILDREN: THE INFLUENCE OF THE TYPE OF STIMULI AND OF SPECIFIC SYMPTOMS OF ANXIETY

We investigated in two hundred twenty-eight schoolchildren aged 8_11 years whether: (a) the ease of identification of gradually changing emotional expressions varies across different types of expressions; (b) “accurate” and “inaccurate” identifications imply different compromises between speed and accuracy; (c) different forms of anxiety (generalised, separation, somatic/panic, social) affect expressions’ identification. In all ten trials, presented in the form of a videogame, a neutral face gradually morphed through fourteen steps into one of the five basic facial expressions of joy, anger, fear, disgust and surprise. Analysis of variance showed that the number of mistakes in categorising the anger expression was significantly higher than for any other expression. Survival analyses showed that “anger” was associated with delayed identification, and that accurate and fast performances coincided. Cox’s survival function showed that social anxiety was the only anxiety dimension to predict delayed identification of anger. Social anxiety/ phobia predicts biased decoding of signs of interpersonal hostility/rejection.

Battaglia M., Zanoni Q., et al. Cognition and Emotion. Epub ahead of print

3.1.1 PREMESSA

Gli studi presenti in letteratura sia sugli umani che sui networks neurali, hanno rilevato con forte concordanza che alcune emozioni espresse dai volti vengono riconosciute più accuratamente rispetto ad altre (Dailey et al., 2002). Risulta però importante sottolineare che tale processo non risente esclusivamente delle caratteristiche degli stimoli bensì che parte della variabilità nella decodifica delle espressioni facciali è dovuta alle differenze individuali (Elfenbein & Ambady, 2002; Battaglia et al., 2004; 2005). In particolare sia profili temperamentali (Battaglia et al., 2004; 2005) sia esperienze di vita negative precoci (Fries & Pollak, 2004) risultano influenzare l'abilità dei bambini di identificare accuratamente le emozioni espresse dai volti.

In letteratura sono ampiamente presenti studi che hanno indagato, dal punto di vista comportamentale (Camras & Allison, 1985) ed elettrofisiologico (Batty & Taylor, 2006), lo sviluppo di tale abilità che risulta essere pienamente presente già intorno agli 8 anni di età. Le ricerche relative alle differenze individuali invece sono state meno numerose e prevalentemente incentrate su piccoli campioni, peraltro clinici (Southam-Gerow & Kendall, 2000). Inoltre la maggior parte di questi studi ha preso in considerazione come principale condizione clinica l'ansia, trattando tutti i Disturbi d'Ansia come unica categoria, trascurando di conseguenza l'eterogenità che li caratterizza. Diversi studi hanno infatti rilevato che tra queste condizioni cliniche, l'Ansia Sociale è sicuramente quella che più interferisce sul processo di decodifica delle espressioni facciali (Simonian et al., 2001; Battaglia et al., 2004; Stirling et al., 2006).

A partire da tali considerazioni, il presente esperimento è stato ideato al fine di rispondere ai seguenti quesiti:

1. L'accuratezza nella decodifica delle emozioni espresse dai volti differisce tra le diverse emozioni?
2. L'accuratezza risulta in qualche modo associata e/o influenzata dalla rapidità nel processo di decodifica?
3. Differenti dimensioni d'Ansia in età evolutiva possono influenzare tale processo?

Per poter rendere tale indagine il più verosimile possibile, nel presente studio sono stati utilizzati volti di coetanei in evoluzione, in modo da rendere gli stimoli più ecologici e rappresentativi di quanto accade durante le interazioni umane.

In letteratura infatti i risultati sull'elaborazione delle emozioni espresse dai volti derivano per la

maggior parte da paradigmi che hanno utilizzato stimoli statici, in natura invece i volti degli interlocutori con cui interagiamo si modificano continuamente fornendo quantità di informazione emotiva in ogni momento differente. Per tali ragioni per il presente esperimento sono stati ideati stimoli ad hoc che attraverso evoluzioni cinematiche mimino il più possibile le modificazioni degli elementi emotivi dei volti. Inoltre per l'ideazione del set di stimoli sono stati ritratti soggetti in età evolutiva, e non volti adulti, per due ragioni principali: i bambini in età scolare trascorrono la maggior parte del loro tempo in compagnia dei pari più che degli adulti, inoltre è stato osservato che bambini e adolescenti con caratteristiche di Ansia Sociale considerano tra le più temibili le situazioni di rifiuto da parte dei coetanei (Compton et al., 2000).

3.1.2 METODO

Campione

Il campione è stato reclutato all'interno di una scuola elementare nella provincia di Milano. Sono stati informati genitori ed insegnanti dei bambini delle classi II, III, IV e V, il 73 % delle famiglie hanno aderito al progetto. Sui 243 partecipanti sono stati applicati i seguenti criteri di esclusione: 1) iscrizione alla scuola da meno di 6 mesi e quindi scarsa conoscenza da parte degli insegnanti degli alunni; 2) handicap fisici e/o mentali che abbiamo richiesto insegnanti di sostegno; 3) gravi difficoltà di apprendimento e/o attentive.

Il gruppo di studio è risultato così costituito da 228 bambini (105 maschi e 123 femmine) di età media pari ai 9,37 ($\pm 0,91$) anni.

Dei 228 bambini il 20% appartiene alla coorte longitudinale descritta al paragrafo 3.2.2.

Stimoli

Gli stimoli consistono in una serie di fotografie in bianco e nero ritraenti emozioni espresse dai volti, in particolare: gioia, paura, rabbia, disgusto e sorpresa. Le emozioni vengono rappresentate da un volto maschile (Camras & Allison, 1985) e da uno femminile (Battaglia et al., 2004) coetanei rispetto ai soggetti che costituiscono il campione. Tutti gli stimoli sono stati ideati secondo i canoni proposti da Ekman e Friesen (1976) e sono stati validati in studi precedenti (Battaglia et al., 2004, 2005).

Paradigma sperimentale

I volti sono stati presentati in sequenze cinematiche al fine di rendere gli stimoli maggiormente ecologici, approssimando le variazioni che avvengono in natura nelle interazioni umane. Per poter utilizzare statisticamente le informazioni contenute nelle presentazioni cinematiche sono stati creati 15 fotogrammi, attraverso il programma Morpheus 1.85, per passare da un'espressione neutra ad un'emozione prototipica (per es. 100% rabbia). I fotogrammi sono stati presentati con un intervallo di un secondo e con incremento delle informazioni prototipiche delle emozioni pari al 7% tra uno e l'altro.

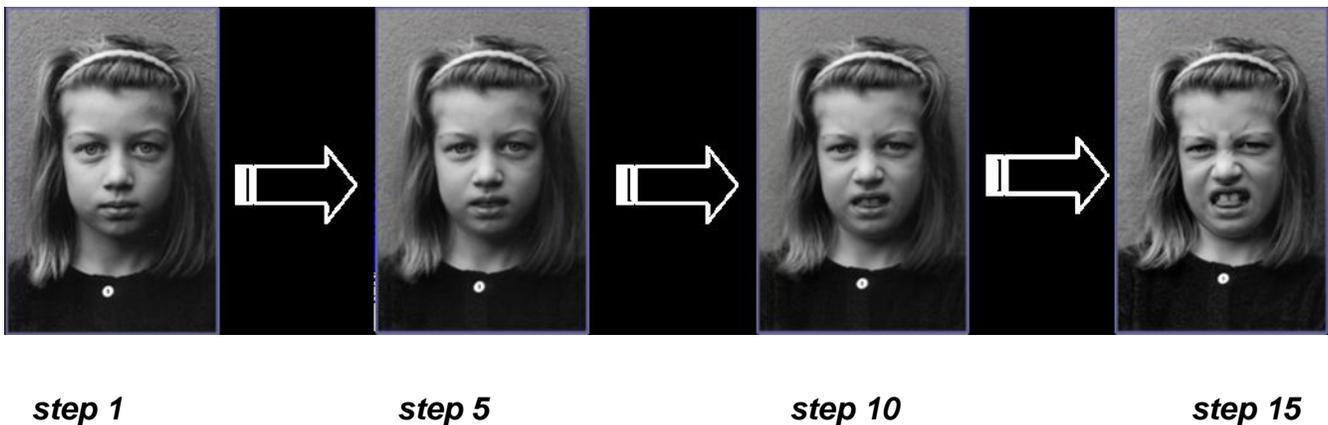


Figura 3.1. Esempio di alcuni fotogrammi nella sequenza da espressione neutra a emozione di rabbia

I bambini quindi vedevano sul monitor un volto che da espressione neutra gradualmente acquisiva le caratteristiche di una delle emozioni (gioia, paura, rabbia, disgusto e sorpresa). Prima di iniziare l'esperimento è stato verificato che ogni bambino conoscesse i termini utilizzati per "etichettare" le emozioni, chiedendo loro di fornirne almeno un sinonimo. Venivano quindi fornite le istruzioni per svolgere il compito, ossia al bambino veniva chiesto di far partire la sequenza e di interromperla, premendo la barra spaziatrice del pc, quando riteneva di avere identificato l'emozione rappresentata dal volto visionato sul monitor. Per scegliere l'emozione corretta veniva fornita una griglia con indicate le possibili risposte. Ad ogni bambino venivano presentate, con la medesima successione, 10 sequenze (le 5 emozioni rappresentate sia dal volto femminile che da quello maschile). L'ordine delle sequenze è stato definito in modo da non ripetere in successione la stessa emozione e

alternando volto maschile e femminile.

Qualora la risposta fosse sbagliata veniva chiesto al bambino di andare avanti con la stessa sequenza, in caso di risposta corretta invece si passava a quella successiva. Al quindicesimo fotogramma se non era ancora stata fornita la risposta il bambino veniva forzato a fare un tentativo.

Per ogni bambino i dati sono stati acquisiti automaticamente da un apposito programma predisposto a rilevare: a) il numero di errori (ossia numero di tentativi prima di fornire la risposta corretta) all'interno di ogni sequenza; b) numero di steps richiesti per dare la risposta corretta (ossia numero di fotogrammi visionati). Un valore *dummy* è stato attribuito nei casi in cui al quindicesimo steps non era stata fornita la risposta corretta.

Valutazione dell'ansia

Evidenze empiriche suggeriscono l'importanza del contesto scolastico in quanto ambiente d'elezione in cui possono manifestarsi le diverse forme d'ansia nei bambini (Battaglia et al., 2004; 2005). Pertanto è stato chiesto agli insegnanti, istruiti da psicologi, di compilare la versione italiana della SCARED (Screen for Child Anxiety Related Emotional Disorders, Ogliari et al., 2006) ideata per valutare il livello di ansia in soggetti in età evolutiva (Birmaher et al., 1997). Per la compilazione della scala agli insegnanti sono state fornite informazioni sulle manifestazioni dell'ansia nei bambini ed è stato quindi chiesto di rispondere alle domande facendo riferimento ai comportamenti abituali dei propri alunni.

La SCARED è composta da 41 items (su una scala Likert da 0 a 3) che riflettono i criteri del DSM-IV per l'infanzia e l'adolescenza. La scala mostra una buona consistenza interna ($\alpha = .74$ -.93; Birmaher et al., 1997), affidabilità test-retest (coefficiente di correlazione intraclassa .70-.90), una buona capacità di discriminare tra le forme differenti dell'ansia, e una buona concordanza con le diagnosi effettuate attraverso interviste diagnostiche (Birmaher et al., 1997).

Analisi dei dati

Sono stati in primo luogo calcolati i possibili effetti legati al genere dei bambini testati rispetto al numero di errori e al numero di steps effettuati in ogni sequenza, attraverso due ANCOVA per misure ripetute in cui la covariata era rappresentata dall'età.

L'effetto del tipo di categoria emozionale sull'accuratezza (numero di errori) nel processo di decodifica è stato testato con una ANOVA per misure ripetute. Per valutare se il numero di steps impiegati per riconoscere correttamente l'espressione potesse variare da un'emozione all'altra è stata invece effettuata una analisi di sopravvivenza; nei casi in cui la risposta corretta non fosse fornita entro il quindicesimo fotogramma la prestazione poteva infatti risentire di una parte di informazione censurata. Per questa ragione è stata analizzata la probabilità di fornire la risposta corretta attraverso l'Estimatore Kaplan Meier, e sono state comparate le differenze tra le funzioni di sopravvivenza per ogni emozione con il log-rank test. Secondo questo approccio il numero di steps rappresentava la variabile "tempo" e la mancanza di corretta identificazione entro il quindicesimo fotogramma come variabile "censurata".

In seguito è stato valutato se alle performances accurate e inaccurate potesse corrispondere una modalità più o meno rapida di elaborazione degli elementi emotivi del volto, ossia se una buona prestazione necessitasse di un maggior numero di steps e viceversa. Poiché la media generale degli errori all'interno delle 10 sequenze era piuttosto bassa (0.27 ± 0.60), le performances sono state considerate accurate nel caso di riconoscimento al primo tentativo, inaccurate in presenza di 1 o più errori nella sequenza.

Infine è stata misurata la possibile influenza delle diverse dimensioni dell'ansia, valutate con la SCARED, attraverso la regressione di Cox applicata all'analisi di sopravvivenza. La variabile "tempo" è stata anche in questo caso definita dal numero di fotogrammi, mentre le dimensioni dell'ansia (panico, ansia da separazione, ansia generalizzata e fobia sociale) sono state utilizzate come predittori in un disegno backward stepwise.

3.1.3 RISULTATI

Dall'ANCOVA per misure ripetute, effettuata per valutare l'effetto del genere dei partecipanti, è risultato che il numero di errori non differisce in modo significativo tra i maschi e le femmine del campione ($F(1, 225) = 0.41, MSE = 0.47$).

La figura 3.2 mostra i risultati relativi all'ANOVA per misure ripetute effettuata per valutare la frequenza del numero di errori all'interno di ogni sequenza. Dai risultati è emerso che il

numero di errori differiva significativamente tra le diverse categorie emozionali ($F(9, 2043)=34.60$, $MSE= 0.31$, $p = 0.001$), in particolare l'espressione di rabbia era caratterizzata da un numero di errori significativamente superiore a quello delle altre espressioni, seguita da disgusto, paura, sorpresa e gioia, come rilevato dai post hoc effettuati con il Tukey HSD test .

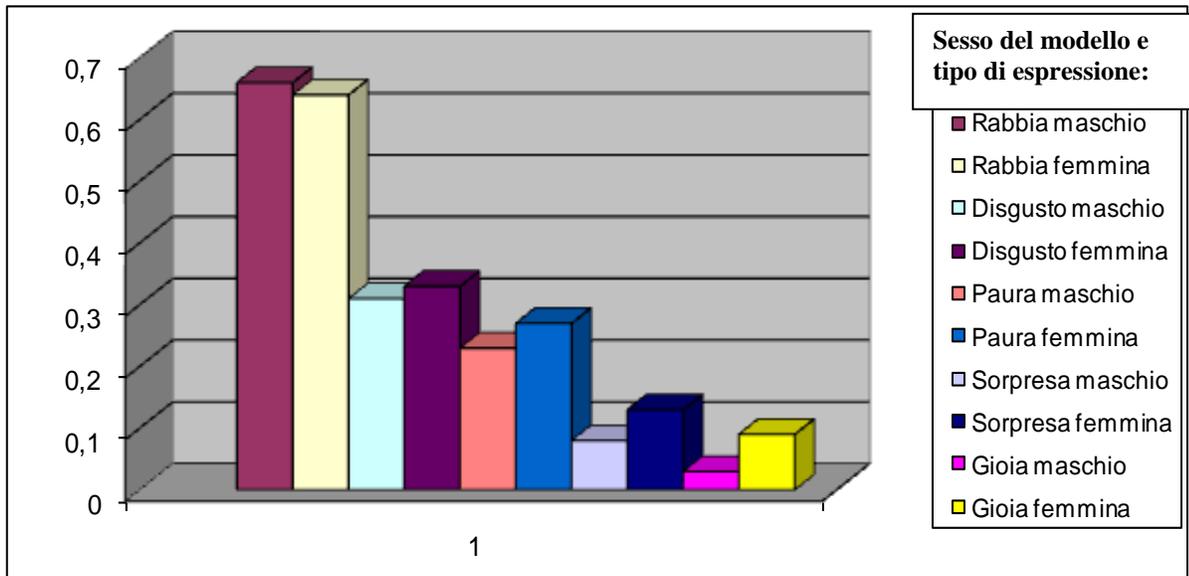


Figura 3.2. Numero di errori commessi per ognuna delle 10 sequenze presentate

La seconda ANCOVA per misure ripetute ha mostrato che anche per il numero di steps non sono emerse differenze significative legate al genere dei bambini testati ($F(1,151)= 0.85$, $MSE= 34.47$). Tale risultato conferma quindi che non ci sono effetti di interazione tra genere dei bambini e sesso del modello rappresentato negli stimoli.

Nell'analisi rispetto al numero di steps sono stati inclusi solo i casi in cui la corretta identificazione delle emozioni è avvenuta entro il quindicesimo fotogramma, mentre a quelli che hanno fallito è stato attribuito un punteggio dummy.

La figura 3.3 riporta i risultati ottenuti dall' analisi di sopravvivenza. Attraverso l'applicazione dell'analisi di sopravvivenza, è stato possibile evidenziare come anche il numero di fotogrammi impiegati per raggiungere la risposta corretta vari significativamente tra le diverse

emozioni. Dal confronto tra le funzioni di Kaplan Meier per ogni sequenza è emerso infatti che il numero di fotogrammi utilizzati dai bambini differiva a seconda dell'emozione (log-rank $p=0.0001$). Le curve per ognuna delle 5 emozioni presentate sono mostrate in figura 3.3. Dalle curve è risultato che il numero di fotogrammi necessari per riconoscere correttamente le emozioni cresce a partire dalla sorpresa, gioia, paura, disgusto fino alla rabbia, dimostrando che le ultime due rappresentano le più lente da identificare per i bambini.

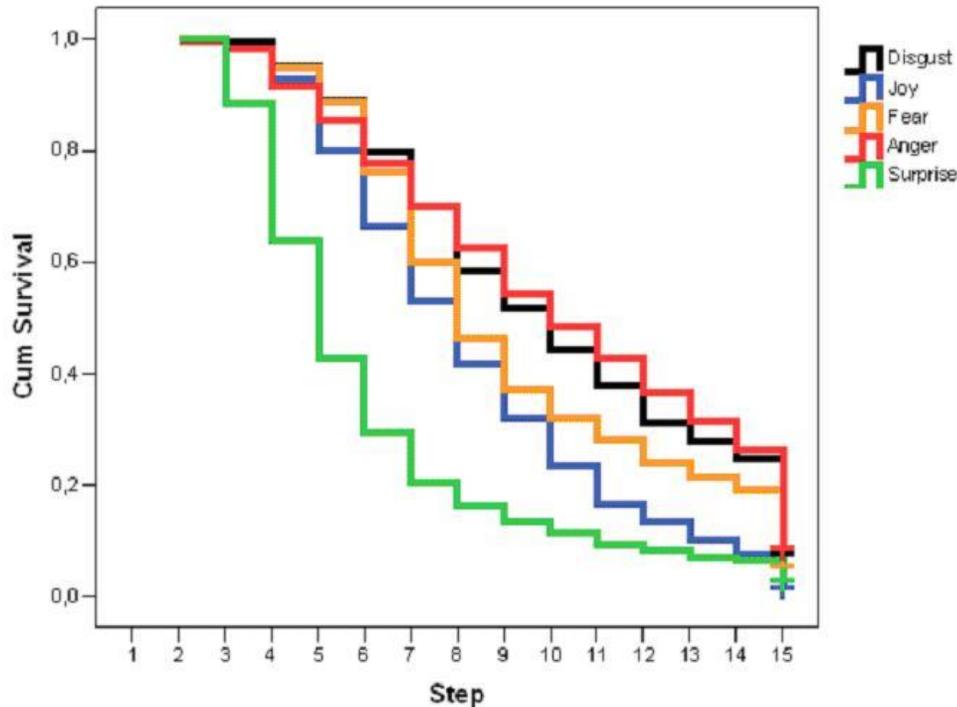


Figura 3.3 Funzione di sopravvivenza sul numero di steps impiegati per identificare le 5 emozioni espresse dai volti in evoluzione.

Dai log rank test ($p=0.00001$) è risultato inoltre che le prestazioni “accurate” richiedevano anche un minor numero di steps rispetto alle prestazioni “inaccurate” per tutte e 10 le sequenze (figura 3.4).

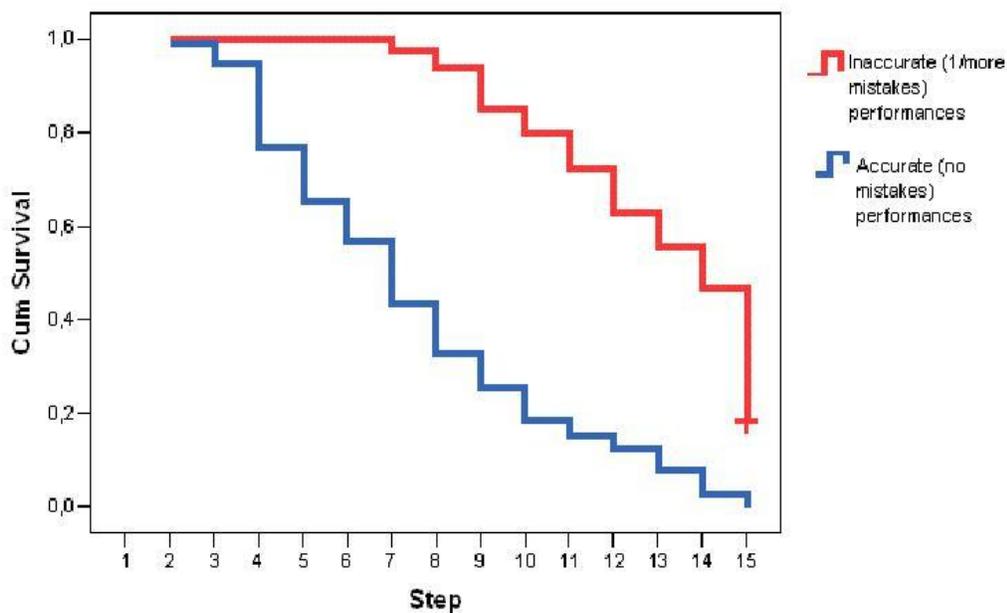


Figura 3.4 Numero di steps utilizzati nelle prestazioni “accurate” vs “inaccurate”.

Dall'analisi stepwise, effettuata per valutare l'influenza delle quattro dimensioni dell'ansia sul numero di steps utilizzati per identificare ognuna delle 5 emozioni, è risultato che solo la Fobia Sociale predice un numero maggiore di fotogrammi impiegati per classificare correttamente la rabbia ($\beta= .050$, $SE= 023$, $Wald= 4.64$, $df=1$, $p=0.03$). E' stata inoltre rilevata una tendenza di significatività anche per il disgusto ($p= 0.10$), mentre per tutte le altre emozioni non è emerso alcun effetto significativo.

3.1.4 DISCUSSIONE

I risultati del primo esperimento mostrano in primo luogo che le emozioni, espresse da volti in evoluzione, più semplici da riconoscere sono la gioia e la sorpresa, mentre le più difficili la rabbia e il disgusto. Questi dati replicano quanto riportato in letteratura dagli studi sull'elaborazione delle espressioni facciali in età evolutiva (Battaglia et., 2004; Herba et al., 2006).

Inoltre emerge che le prestazioni definite come “accurate” e “inaccurate” seguono la medesima modalità di relazione tra accuratezza e rapidità: le prestazioni accurate infatti richiedono un minor numero di fotogrammi, rispetto a quelle inaccurate, per identificare correttamente l'emozione presentata. Ciò equivale a dire che le prestazioni accurate non sono buone perché lente e viceversa. Questo dato potrebbe suggerire l'assenza di uno stile specifico di processazione nelle prestazioni inaccurate che potrebbe portare ad errori sistematici, per esempio la tendenza a rispondere in maniera affrettata.

Infine risulta importante sottolineare che le emozioni presentate durante lo svolgimento del compito, rappresentano stimoli che veicolano specifici messaggi di natura sociale. Un'espressione di sorpresa per esempio evoca in chi la guarda la tendenza a cercare maggiori dettagli nell'ambiente circostante, in quanto parzialmente ambigua (Whalen, 1998); la gioia veicola un messaggio di approvazione sociale (Adolphs, 2002); la paura viene generalmente interpretata come minaccia di un possibile pericolo (Adolphs, 2002); mentre la rabbia è tipicamente riferita ad un clima di ostilità e il disgusto di rigetto nelle relazioni interpersonali (Whalen, 1998). In letteratura è stato ampiamente discusso che la corretta identificazione di tali messaggi assume un ruolo cruciale nel funzionamento sociale degli individui. Tra le diverse forme d'ansia quella in cui il funzionamento sociale risulta particolarmente compromesso è sicuramente rappresentata dalla Fobia Sociale. Dai risultati dello studio, coerentemente con quanto atteso, la Fobia Sociale è l'unica forma d'ansia che predice un'errata e lenta identificazione dell'emozione di rabbia. Tale espressione veicola infatti un segnale di rifiuto sociale, messaggio rispetto al quale i fobici sociali risultano particolarmente sensibili (Battaglia et al, 2004; Simonian et al., 2001; Stirling et al., 2006).

Il disegno sperimentale di questo studio non consente di trarre inferenze rispetto alla direzione della causalità tra abilità compromesse nella decodifica delle emozioni del volto e manifestazioni d'ansia (per es. è la compromissione nella decodifica a influire sull'Ansia Sociale o viceversa?). Tuttavia, studi precedenti, hanno riscontrato che i polimorfismi genetici

noti per essere associati all'ansia, influenzano anche pattern di attivazione corticale a fronte delle emozioni di rabbia espresse dai volti (Battaglia et al., 2005). L'elaborazione delle espressioni facciali sembra quindi condividere alcuni polimorfismi genetici e substrati neurali con le forme cliniche dell'ansia.

Nell'interpretazione dei risultati è necessario tenere in considerazione alcuni limiti dello studio. In primo luogo ad ogni bambino sono state presentate solo due sequenze per ogni emozione e questo potrebbe in qualche modo limitare la "sensibilità" del paradigma utilizzato. D'altro canto la scelta dello studio è stata quella di presentare il maggior numero di emozioni con differenti significati dal punto di vista sociale. Questo, in aggiunta alla numerosità del campione, che risulta inoltre costituito da bambini della popolazione generale e non clinica, potrebbe bilanciare il limite del paradigma. Inoltre, per facilitare la procedura delle analisi statistiche, è stato necessario suddividere la sequenza in diversi fotogrammi presentati con un breve intervallo uno dall'altro, penalizzando in parte l'obiettivo di mimare ciò che accade nella realtà. In secondo luogo, le valutazioni dell'ansia sono state effettuate solo da parte degli insegnanti e non da altre fonti di informazione. Da studi precedenti è risultato comunque che i punteggi ottenuti dagli insegnanti rispetto alla presenza di Ansia Sociale risultano affidabili e concordanti alle valutazioni effettuate da clinici (Battaglia et al., 2005). In conclusione, nonostante i limiti esposti, i risultati di questo studio suggeriscono la possibilità di includere nell'assessment di bambini con Ansia Sociale, o a rischio di sviluppare tale condizione, anche il processo di decodifica delle emozioni espresse dai volti.

3.2 ESPERIMENTO 2

A LONGITUDINAL STUDY OF CEREBRAL RESPONSES TO FACIAL EXPRESSIONS IN ADOLESCENTS WITH SOCIAL PHOBIA

Cerebral responses to affective stimuli vary quantitatively across subjects and can be predicted in part by individual differences, such as social anxiety, and by some polymorphic genes. One polymorphic gene (5-HTTLPR) influences the amygdala responses to facial expressions as well as individual differences for social anxiety.

Our longitudinal study looks at these relationships in a cohort of general population children followed up from age 7 to 17 years. Subjects have been evaluated over the past 10 years at regular intervals: they were characterized at age 7-8 for their degree of Behavioral Inhibition/Social anxiety (BI/SA) and for the ability to categorize other children's expressions of emotions, and then followed up at the age of 9-10 for BI/SA and electrophysiological (ERP waveforms) responses to facial expressions, in relation to genes known to influence human emotionality, including 5-HTTLPR.

The aim of the present study is to assess the influences of different predictors (BI/AS, ERP and 5-HTTLPR) measured during infancy on Social Phobia evaluated in twenty-one adolescents. Moreover every subjects have been asked to perform a task of implicit elaboration of facial expression, presented in a randomized block design. The task has been realised to evaluate the influence of individual differences on the cerebral activity, in particular amygdala activation, measured with MRI method, in response to face emotional expressions (happy, neutral, anger).

A multiple regression showed that the *s* allele of the 5-HTTLPR gene and the amplitude of ERP waveform evoked by anger expressions are the only to predict Social Phobia diagnosis in adolescence. Moreover brain imaging analyses showed that the presence of Social Phobia predict hyperactivation of the amygdala in front of facial expressions. A specific trend has been observed in response to angry emotion.

Battaglia M., Zanoni A., et al., in preparation.

3.2.1 PREMESSA

Dal precedente studio e dai dati presenti in letteratura risulta evidente una compromissione della capacità di identificare correttamente le emozioni espresse dai volti in diverse condizioni cliniche, in particolare nell' Ansia Sociale (Gur et al., 1992; Birmaumer et al., 1998; Blair et al., 2001; Stein et al., 2002). Una simile concordanza si evince anche dai risultati di diverse ricerche che, attraverso metodi di rilevazione dell'attività cerebrale, hanno riscontrato un'aumentata attivazione dell'amigdala a fronte di espressioni facciali, in particolar modo quelle a contenuto negativo, in soggetti caratterizzati da Ansia Sociale (Stein et al., 2002; Blair et al., 2008; Evans et al., 2008).

Parallelamente è stato riscontrato che il polimorfismo genetico 5-HTTLPR del gene del trasportatore della serotonina influenza l'attività cerebrale coinvolta nella processazione delle espressioni facciali. In modo particolare la presenza dell'allele s del polimorfismo è stata associata ad un incremento di attivazione dell'amigdala a fronte alle espressioni di rabbia (Hariri et al., 2002, 2005; Munafò et al., 2008; Furmark et al., 2009). La presenza dell'allele s del gene è risultata, inoltre, essere associata a caratteristiche di timidezza, predisposizione all'ansia, ai comportamenti di evitamento e ad uno stile negativo nelle relazioni interpersonali (Munafò et al., 2003).

Anche in questi ambiti la maggior parte delle rilevazioni sono state ottenute su soggetti adulti e su campioni clinici. Poiché la predisposizione temperamentale nota come Ansia Sociale si distribuisce in modo continuo (Compton et al., 2000), potrebbe risultare invece di notevole importanza studiare soggetti che siano rappresentativi della popolazione generale. Questa considerazione appare ancor più rilevante alla luce di un interesse nel rintracciare possibili indicatori biologici e precoci di patologia durante l'età evolutiva (Essex et al., 2010).

Inoltre, nonostante le numerose evidenze circa una sostanziale sovrapposizione tra polimorfismi genetici e aree cerebrali associati sia all'elaborazione dei volti che all'Ansia Sociale, in letteratura si riscontra una notevole difficoltà nel rilevare valutazioni che tengano in considerazione dei tre livelli di analisi (genotipo, endofenotipo e fenotipo). Ad oggi infatti la ricerca che ha indagato il legame tra l'attivazione cerebrale in risposta ad espressioni facciali, il grado di Ansia Sociale e la presenza di polimorfismi genetici candidati a rappresentare parte del substrato biologico del fenotipo è molto scarsa ed i risultati non sembrano soddisfacenti.

Il presente studio è stato quindi realizzato al fine di valutare la possibile associazione tra le manifestazioni di Ansia Sociale in soggetti in età evolutiva estratti dalla popolazione generale

con specifici polimorfismi genetici e pattern di attivazione cerebrale a fronte di segnali sociali veicolati dalle espressioni dei volti. L'indagine dei possibili genotipi ed endofenotipi legati all'Ansia Sociale viene in particolare indagata attraverso una valutazione longitudinale, per poterne verificare l'influenza nel tempo. Una valutazione di questo genere può consentire infatti di rintracciare eventuali indicatori di rischio nel passaggio dall'infanzia all'adolescenza..

3.2.2 COORTE LONGITUDINALE E STUDI PRELIMINARI

Il secondo esperimento rappresenta pertanto l'ultimo di una serie di studi effettuati su una coorte di soggetti estratti dalla popolazione generale e monitorati nel passaggio dall'infanzia all'adolescenza. La coorte longitudinale, costituita da 149 bambini, è stata testata in diverse fasi con l'obiettivo comune di valutare la modalità di elaborazione delle espressioni facciali nelle manifestazioni di Ansia sociale.

Associazione tra Ansia Sociale e identificazione delle emozioni espresse dai volti

Il primo di questi studi preliminari ha coinvolto 149 bambini (71 maschi e 78 femmine), reclutati in una scuola elementare (età media 7.5 ± 0.5) che hanno partecipato ad uno studio volto a valutare la possibile relazione tra i livelli individuali di Ansia Sociale e l'abilità di classificare le emozioni espresse da volti di coetanei.

I bambini sono stati sottoposti ad un compito di identificazione delle emozioni definite universali: gioia, sorpresa, paura, tristezza, rabbia, disgusto e un'espressione neutra. Per ognuna di tali espressioni è stato chiesto ai bambini di scegliere l'etichetta corrispondente all'emozione rappresentata da due modelli, uno maschile e l'altro femminile. Gli stimoli utilizzati in questo caso erano statici.

Il livello individuale di Ansia Sociale è stato misurato attraverso la somministrazione agli insegnanti di diverse scale. Durante il compito di riconoscimento delle espressioni facciali, è stato inoltre rilevato il numero di commenti spontanei, un indice spesso associato alla timidezza e all'Ansia Sociale (Kagan et al., 1998; Biederman et al., 2001).

Dai risultati dello studio è stata rilevata una percentuale pari al 72% di identificazioni corrette sull'intero campione, senza differenze legate al genere sia dei volti presentati sia dei partecipanti. Inoltre è emerso che alti livelli di Ansia Sociale, rilevati sia attraverso i questionari che l'osservazione comportamentale, risultano associati ad un maggior numero di errori nella decodifica, in particolare per quanto riguarda l'espressione di rabbia e quella

neutra. I soggetti con alti livelli Ansia Sociale hanno, nella maggior parte dei casi, classificato l'espressione di rabbia come disgusto e l'espressione neutra come tristezza.

In sintesi, questi dati suggeriscono che l'abilità di decodificare le emozioni espresse dai volti, in soggetti in età evolutiva estratti dalla popolazione generale, risulta parzialmente predetta dai livelli individuali di Ansia Sociale. In particolare il maggior numero di errori commessi a fronte della rabbia, interpretata come disgusto, potrebbe riflettere la tendenza da parte dei soggetti con Ansia Sociale a decodificare i segnali ostili in termini di rifiuto nei contesti di interazione sociale (Compton et al., 2000). La lettura dell'espressione neutrale in termini di tristezza, potrebbe invece riflettere la difficoltà dei soggetti con Ansia Sociale a identificare un segnale ambiguo (Whalen, 1998), attribuendo ad esso una connotazione tendenzialmente negativa (Morris et al., 1996).

(Children's Discrimination of Expressions of Emotions: Relationship With Indices of Social Anxiety and Shyness. Battaglia M., Ogliari A., Zanoni A., et al. J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry, 2004; 43:358–365).

Associazione tra Ansia Sociale, basi genetiche e componenti ERP evocate dalle emozioni espresse dai volti.

A due anni di distanza 49 (26 maschi e 23 femmine) dei bambini appartenenti alla coorte longitudinale hanno preso parte ad un secondo studio volto a valutare la possibile associazione tra l'Ansia Sociale, alcuni polimorfismi genetici e pattern specifici di attivazione elettrocorticale a fronte delle emozioni espresse dai volti. I partecipanti sono stati selezionati attraverso una procedura di randomizzazione dalla coorte precedente.

I 49 bambini sono stati sottoposti ad una registrazione con Potenziali Evocati Visivi (vERP) durante la presentazione di volti di coetanei ritraenti alcune emozioni espresse dai volti. Poiché il paradigma utilizzato richiedeva un elevato numero di ripetizioni per l'acquisizione del segnale, sono state presentate solo alcune delle emozioni fondamentali: gioia, rabbia e un'espressione neutra. Sono state scelte queste tre espressioni in quanto veicolano messaggi di natura sociale differenti: ad esempio la gioia veicola un segnale di accettazione e di approvazione (Fontana & Arcudi, 1987); la rabbia veicola un messaggio di disapprovazione o di pericolo (Whalen, 1998); l'espressione neutra trasmette ambiguità suscettibile a diverse interpretazioni (Battaglia et al., 2004).

Ognuno dei bambini è stato caratterizzato genotipicamente attraverso il polimorfismo genetico 5-HTTLPR del gene del trasportatore della serotonina. Inoltre per ogni partecipante

è stato rilevato il livello individuale di Ansia Sociale attraverso un indice costituito appositamente per il presente studio e attraverso l'osservazione comportamentale.

Dalle valutazioni sui grandaverage dei potenziali evocati dalle espressioni del volto, è stato scelto di utilizzare per le analisi la componente N400 in quanto particolarmente marcata e spesso associata all'elaborazione delle espressioni del volto, specie in soggetti in età evolutiva (vedi paragrafo 2.5; Eimer, 2000; Posamentier & Adbi, 2003).

Dalle analisi dei dati la componente N400 evocata dall'espressione di rabbia è risultata l'unica (rispetto alle espressioni di gioia e neutra) ad essere predetta sia dal livello individuale di Ansia Sociale sia dal polimorfismo genetico. In particolare dai risultati è emersa un'associazione tra alti livelli di Ansia Sociale e la presenza dell'allele s del 5-HTTLPR con una ridotta ampiezza della componente N400 evocata dell'emozione di rabbia espressa da volti di coetanei (figura 3.5).

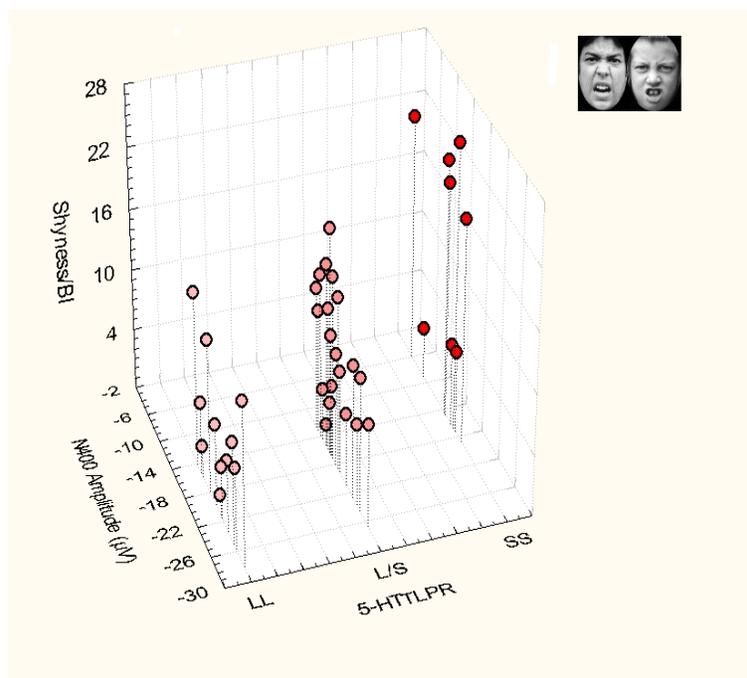


Figura 3.5. Interazione tra genotipo (asse x), Ansia Sociale (asse y) e ampiezza della componente N400 evocata dall'espressione di rabbia (asse z).

In conclusione questi dati suggeriscono l'esistenza di pattern di attivazione elettrocorticale specifici associati all'elaborazione di messaggi sociali di ostilità in bambini che manifestano alti livelli di Ansia Sociale e portatori di una o due coppie dell'allele s del gene del

trasportatore della serotonina. A partire da tali considerazioni emerge la possibilità di rilevare a livello elettrocorticale il pattern disfunzionale di decodifica di stimoli a contenuto emotivo che caratterizza i bambini con alti indici di Ansia Sociale.

(Influence of the Serotonin Transporter Promoter Gene and Shyness on Children's Cerebral Responses to Facial Expressions. Battaglia M., Ogliari A., Zanoni A., et al. Arch Gen Psychiatry. 2005;62:85-94).

3.2.3 METODO

Campione

Il campione del presente esperimento è costituito da 21 soggetti (9 femmine e 12 maschi) di 14 anni (± 1.1), residenti nelle province di Milano. I ragazzi inclusi nel presente campione appartengono alla coorte longitudinale precedentemente descritta. Sono stati contattati tutti e 49 bambini che hanno preso parte al precedente studio preliminare, nonostante la disponibilità e il consenso da parte delle famiglie più del 30% dei ragazzi sono stati esclusi dal campione per i criteri di esclusione dovuti alla procedura di registrazione fMRI (presenza di protesi metalliche e gravi problemi di vista).

A seguito dell'approvazione del protocollo sperimentale da parte del Comitato Etico dell'Ospedale San Raffaele, ai genitori di ogni bambino è stato chiesto di firmare un consenso informato prima della procedura.

Stimoli

Nell'ottica di valutare soggetti in età adolescenziale con un paradigma volto all'indagine dell'elaborazione delle espressioni del volto, si è ritenuto anche in questo necessario creare un set di stimoli ad hoc che presenti modelli di età paragonabile ai partecipanti allo studio (vedi paragrafo 3.1.1).

Poiché in letteratura è presente un numero limitato di studi su soggetti in età di sviluppo che rispettino canoni naturalistici nella fase di formulazione dei paradigmi, il set di immagini-stimolo è stato creato ex novo chiedendo a soggetti appartenenti alla popolazione generale (10 maschi e 10 femmine) di riprodurre tre espressioni facciali: gioia, espressione neutra, e rabbia (vedi paragrafo 3.2.2). Il set di foto conclusivo è costituito quindi da: 30 immagini di volti femminili e 30 immagini di volti maschili per un totale di 60 figure in bianco e nero figura (3.6).

Gli stimoli ideati per questo studio sono stati validati in un campione indipendente di ragazzi di pari età. Sono stati testati 32 soggetti (16 maschi e 16 femmine) reclutati in una scuola media superiore nella provincia di Varese. Ad ogni soggetto è stato richiesto di scegliere per ogni immagine un'etichetta che esprimesse l'emozione rappresentata da ciascun volto del set in visione. Dalle frequenze di risposte corrette fornite dai ragazzi si evidenzia che il set ideato ha mostrato un alto indice medio di identificazioni corrette pari al 94,3%, ben oltre gli indici riscontrati in letteratura (Herba & Phillips, 2004).

Sono state inoltre rilevate le frequenze delle risposte corrette ad ogni categoria emozionale, al fine di assicurare la prototipicità di ogni immagine selezionata, e anche in questo caso le percentuali di risposte corrette rispondono ai canoni previsti.



Figura 3.6 Alcune immagini tratte dal set completo di stimoli (gioia, neutra e rabbia)

Paradigma sperimentale

Dati presenti in letteratura mostrano che, durante la processazione di segnali emotivi rappresentati dalle emozioni facciali, la componente cognitiva del compito coinvolge un pattern di attivazione che include la modulazione dell'attività nelle regioni limbica e paralimbica, note per essere implicate nella risposta cerebrale emozionale (Fischer et. al, 2005, Monk et al., 2008).

Le aree cerebrali che interessano ai fini del presente studio sono quelle coinvolte nel circuito di elaborazione della componente emotiva dello stimolo, e corrispondono a strutture sottocorticali quali l'amigdala, l'ippocampo ed i giri paraippocampali. Tali aree sono in grado di rispondere a qualsiasi emozione facciale a prescindere dal fatto che il soggetto diriga o meno la propria attenzione o consapevolezza sugli aspetti emozionali dello stimolo (Habel et al., 2007). La soluzione adoperata nel presente studio è quindi stata l'utilizzo di un compito di discriminazione di genere.

L'ideazione del paradigma e la presentazione degli stimoli sono state realizzate attraverso il software Presentation (Neurobehavioural Systems, Inc.).

Il paradigma consisteva in una rapida e successiva presentazione degli stimoli in 2 sequenze della durata di 400 s ciascuna.

Ogni sequenza è stata composta da 4 quadruplette ognuna composta da 4 blocchi (16 blocchi per ogni sequenza).

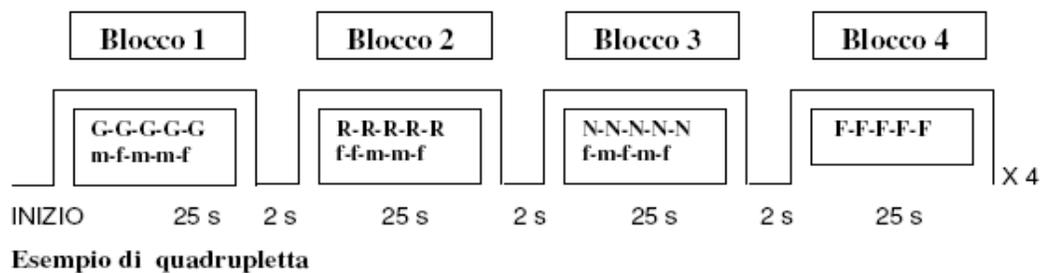
Ogni quadrupletta è stata costituita da 4 blocchi, uno per ogni condizione sperimentale (gioia, espressione neutra, rabbia e fissazione).

All'interno di ogni quadrupletta le tre espressioni sono state alternate in modo random, mentre la fissazione è stata presentata sempre al termine (ad es.: G-N-R-F, R-G-N-F, N-G-R-F, G-R-NF).

Ogni blocco è stato costituito da 5 ripetizioni della medesima espressione rappresentata da soggetti diversi (ad es.: G-G-G-G-G, oppure N-N-N-N-N, RR-R-R-R, F-F-F-F-F).

I soggetti sono stati presentati in ordine semi-casuale all'interno di blocchi con l'accortezza di non presentare due volte lo stesso soggetto con la stessa espressione nella medesima quadrupletta e alternando il genere dei soggetti in modo tale che non ci siano più di 2 individui dello stesso sesso in successione (ad es.: Gm-Gf-Gf-Gm-Gf).

All'interno dei blocchi alla presentazione di ogni stimolo della durata di 3000 ms è stata alternata una breve pausa di 2000 ms.



L'inserimento di punti di fissazione è stato funzionale all'analisi dello studio di attivazione secondo il paradigma di sottrazione

Dopo un primo momento di accoglienza dei ragazzi e di spiegazioni circa la natura del compito, i soggetti sono stati collocati all'interno della risonanza in posizione supina. Accertata la corretta posizione del ragazzo sono stati forniti dei tappi di schiuma compressa da inserire nelle orecchie per proteggersi dal rumore prodotto dalla macchina.

Sono poi stati consegnati due pulsanti, che il soggetto usava per eseguire il compito, uno per ogni mano. Il compito richiesto ai soggetti consisteva nel premere il pulsante destro qualora identificassero sullo schermo un volto di genere maschile, quello sinistro per le femmine e qualsiasi pulsante volessero ogni qual volta compariva una croce sullo schermo.

Il software SPM5 (Statistical Parametric Mapping, Wellcome Department of Imaging Neuroscience, London, UK) ha permesso la sincronizzazione della presentazione di ogni specifico stimolo con la rilevazione dell'attivazione relativa ad esso e l'elaborazione e le analisi dei dati grezzi acquisiti durante la sessione.

Parametri di acquisizione fMRI

I dati funzionali ed anatomici sono stati acquisiti presso il Centro di Eccellenza Risonanza Magnetica ad Alto Campo (CERMAC) dell'Istituto Scientifico San Raffaele di Milano.

È stato utilizzato uno scanner *Philips Intera* a 3 Tesla, dotato di una bobina di tipo *Sense* a 8 canali per la ricezione e la trasmissione del segnale.

Per ogni sequenza sono state acquisite 225 immagini dell'attività cerebrale, ciascuna costituita da 30 sezioni che coprivano tutto il cervello e orientate parallelamente al piano bi-

commissurale, con i seguenti parametri:

TR = 2000 msec,

TE = 30 msec, dimensione dei voxel = 1.85 x 1.85 mm,

Spessore della sezione = 4 mm.

Al termine dell'acquisizione funzionale, per ogni volontario è stata acquisita un'immagine anatomica tridimensionale ad alta risoluzione dell'intero cervello (dimensione dei voxel = 1 x 1 x 1 mm, matrice = 256 x 256 x 124).

Valutazione dell'Ansia Sociale

Poiché durante il periodo dell'adolescenza le manifestazioni temperamentali più estreme dell'Ansia Sociale tendono a presentarsi in quadri clinici definiti (Mick & Telch, 1998; Hayward et al., 1998), ai fini del presente studio è stata somministrata ai genitori dei ragazzi la Schedule for Affective Disorder and Schizophrenia (K-SADS; Kaufman, 1997; versione italiana a cura di Ambrosini, 2000). Si tratta di un'intervista diagnostica semistrutturata che riflette i criteri previsti dal DSM-IV (Diagnostic and statistical manual of mental disorders) per i principali disturbi presenti in età evolutiva. È composta da una sezione di screening, che indaga 82 sintomi riconducibili a 20 diverse patologie, alla quale segue una sezione di approfondimento per le aree problematiche emerse. Ogni sintomo può essere valutato come "assente", "sotto soglia" oppure "sopra soglia" a seconda della frequenza e del grado di intensità con cui si presenta.

Dal punto di vista psicometrico, questo strumento ha mostrato di avere una elevata affidabilità sia tra esaminatori che *test-retest*, mentre gli studi finora effettuati sulla sua validità non consentono di arrivare a conclusioni definitive, a causa delle ridotte dimensioni dei campioni utilizzati (Ambrosini, 2000).

Analisi dei dati

a) Analisi descrittive

Sono state in primo luogo calcolate le frequenze alleliche del polimorfismo oggetto di studio e attraverso il test del chi-quadro di Pearson è stato valutato l'Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE). Dal calcolo delle frequenze emerge che il 31% dei ragazzi sono omozigoti L (LL), il 53% eterozigoti (Ls) e il 16% omozigoti s (ss). Tale distribuzione rispetta l'HWE come rilevato anche dal test del chi-quadro ($\chi^2 = 4.80$, $df=2$, $p= 0.10$).

Attraverso le risposte fornite dai genitori all'intervista K-SADS i soggetti sono stati suddivisi in tre gruppi:

- 1) soggetti con diagnosi di Fobia Sociale secondo i criteri del DSM-IV
- 2) soggetti sottosoglia, ossia con la presenza di alcuni tratti di Fobia Sociale che non raggiungono la soglia per una diagnosi
- 3) soggetti sani.

Da tale suddivisione risultano 5 soggetti con diagnosi (24%), 6 soggetti sottosoglia (29%), 10 soggetti sani (47%).

b) Analisi longitudinali

Poiché il campione oggetto di questo studio ha partecipato a fasi precedenti del progetto effettuate in età infantile, sono state effettuate analisi per valutare l'influenza di alcune variabili rilevate durante gli anni precedenti sulle manifestazioni di Fobia Sociale in età adolescenziale.

In primo luogo è stata calcolata la possibile associazione tra genotipo e fenotipo, attraverso un chi-quadro di Pearson tra le tre forme alleliche del 5-HTTLPR e i tre gruppi identificati sulla base della presenza di Fobia Sociale.

Inoltre attraverso una regressione multipla è stata analizzata la possibile predizione di variabili acquisite negli anni precedenti (livello di Ansia Sociale e componenti N400 dei vERP) sulla diagnosi di Fobia Sociale.

c) Analisi di Brain Imaging

Le analisi di pre-processing e l'analisi statistica dei dati ottenuti dalle registrazioni in fMRI sono state effettuate con il software Statistical Parametric Mapping (SPM5; Wellcome Department of Cognitive Neurology, London, UK) e Matlab 6.5 (Mathworks Inc., Natick, MA, USA).

c.1) Pre-processing

L'obiettivo di queste analisi è stato quello di ridurre quanto più possibile la quota di varianza non indotta dal compito sperimentale, ma ad esempio dal movimento all'interno della serie di acquisizioni per lo stesso soggetto, oppure da differenze presenti tra acquisizioni di soggetti

diversi. Tale processo è stato quindi compiuto al fine di poter massimizzare la sensibilità delle successive analisi e di aumentare la validità statistica (Smith, 2004) attraverso le seguenti applicazioni:

Controllo TSdiffana

Tale funzione ha permesso di verificare se le acquisizioni sono state soggette ad eccessiva fonte di rumore. In particolare è stato possibile osservare se il movimento del soggetto, in termini di rotazione e traslazione intorno ai tre assi che definiscono lo spazio tridimensionale, è avvenuto con intensità tale da falsare la rilevazione del segnale di attivazione. In questi casi è stata applicata la funzione Artifact Repair di SPM che consente di correggere i dati dagli artefatti sperimentali.

Riallineamento

I movimenti intra-compito effettuati dal soggetto possono rendere le immagini acquisite differenti tra loro. Per poter eseguire analisi che evidenzino l'attivazione di ogni voxel, è stato quindi necessario che le immagini acquisite in ogni span temporale fossero allineate.

Unwarp

Tale funzione è stata utilizzata per correggere il segnale in caso di modificazioni al campo magnetico (che possono essere causate, ad esempio, da movimento del soggetto).

Normalizzazione spaziale

E' stato applicato un processo di Normalizzazione per ricondurre tutte le immagini ad un cervello "universale" (Template) conforme ad uno spazio anatomico standard. Ciò ha permesso di rendere tutti gli encefali di tutti i soggetti confrontabili e quindi di effettuare analisi "di gruppo" sull'intero campione di partecipanti.

Il Template di riferimento utilizzato per le presenti analisi è definito Pediatrico ed è stato costruito a partire da una popolazione di soggetti in età evolutiva.

La Normalizzazione nello specifico è stata effettuata attraverso il metodo della Segmentazione.

Smoothing spaziale

Attraverso la funzione di smoothing è stato applicato un filtro spaziale gaussiano alle immagini per diverse ragioni: innanzitutto per correggere eventuali differenze anatomiche cerebrali tra i soggetti residue rispetto alla normalizzazione e in secondo luogo per garantire che i volumi fossero conformi ad un campo di distribuzione gaussiana prima di applicare alle immagini le analisi statistiche parametriche previste da SPM.

In seguito alle analisi di pre-processing due soggetti sono stati esclusi dalle analisi successive in quanto il movimento durante la registrazione aveva alterato in modo significativo la qualità delle immagini.

c.2) Analisi statistiche

Al fine di evidenziare le attivazioni cerebrali significative evocate dai volti (percentuale di cambiamento del segnale BOLD, voxel per voxel, nella presentazione delle facce rispetto alla fissazione) è stata condotta un'ANOVA fattoriale, in cui la variabile dipendente era rappresentata dall'attivazione cerebrale voxel per voxel, mentre il fattore dalla condizione sperimentale (Gioia, Neutra, Rabbia e Fissazione).

All'ANOVA è stata applicata la correzione per confronti multipli FWE (Family Wise Error), mentre la soglia di significatività è stata posta pari a $p \leq 0.05$.

Per testare l'influenza della Fobia Sociale e del polimorfismo genetico sulle aree di attivazione cerebrali di interesse è stata usata l'analisi delle Region of Interest (RoI). Tale metodo permette di estrarre il segnale di attivazione proveniente da specifiche regioni cerebrali rappresentate da piccoli volumi, riferibili ad una determinata condizione sperimentale (Poldrack, 2007).

La scelta dell'analisi delle RoI è consigliata per testare ipotesi riferite ad una specifica regione cerebrale: nelle presenti analisi si tratta della struttura amigdaloidica.

La selezione delle RoI (corrispondenti a coordinate stereotassiche riferite ai voxels che identificano l'amigdala) è stata effettuata utilizzando come riferimento una metanalisi di studi che hanno investigato la neuroanatomia funzionale dell'elaborazione delle emozioni (Murphy et al., 2003). Lo studio di metanalisi include 106 lavori che hanno utilizzato metodi (PET ed fMRI) e disegno sperimentale (confronto tra pattern di attivazioni cerebrali riferite a differenti

emozioni e processazione di stimoli non emozionali) paragonabili a quelli del presente studio. Sulle coordinate dell'amigdala sono quindi state condotte due ANOVA. La prima per testare la differenza di attivazione riferibile alla presenza di diagnosi di Fobia Sociale (su tre livelli), mentre la seconda in funzione alla presenza delle tre forme alleliche del 5-HTTLPR (ss, Ls, LL).

Infine, sempre attraverso l'utilizzo delle stesse ROI, sono stati effettuate dei confronti post-hoc tra i gruppi fattoriali.

3.2.4 RISULTATI

Dalle analisi longitudinali emerge un'associazione significativa tra l'allele a rischio (s) del 5-HTTLPR e la diagnosi di Fobia Sociale, come rilevato dal chi-quadro di Pearson ($\chi^2 = 10.78$, $df = 4$, $p = 0.029$).

Dalla regressione multipla (tabella 1) con predittori le variabili rilevate durante l'infanzia (8-9 anni) relative all'Ansia Sociale e alle componenti N400 dei vERP (evocate delle espressioni di gioia, rabbia e neutra) emerge che l'unica a predire la diagnosi di Fobia Sociale in adolescenza (14-15 anni) è la N400 evocata dall'espressione di rabbia ($\beta = 0.56$, $p = 0.018$). In particolare una ridotta ampiezza della componente predice la diagnosi di Fobia Sociale coerentemente con i dati riscontrati nelle precedenti fasi (Battaglia et al., 2005).

DIAGNOSI DI FOBIA SOCIALE			
	β	P	R²
N400 Gioia	- 0.17	0.52	0.04
N400 Neutra	0.38	0.14	0.08
N400 Rabbia	0.56	0.018	0.27
Indice di Ansia Sociale	0.34	0.16	0.06

Tabella 1. Risultati della regressione multipla a predire la diagnosi di Fobia Sociale.

I risultati dell'ANOVA fattoriale volta ad evidenziare le attivazioni cerebrali significative evocate dai volti sono mostrati nella figura 3.7.

Le gradazioni di colore rappresentano l'intensità della differenza di attivazione.

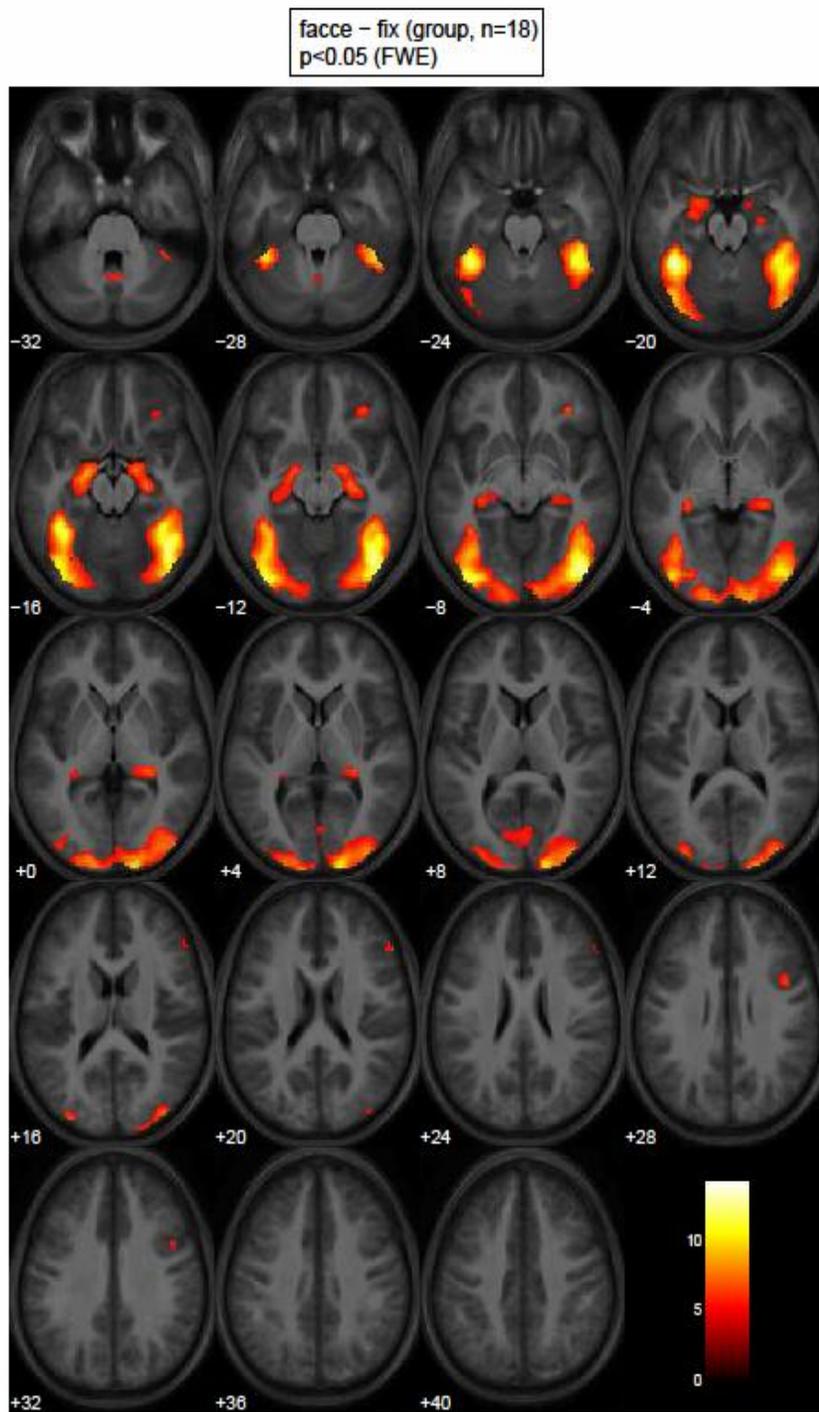


Figura 3.7. Effetto principale della condizione sperimentale. Contrasto Facce vs Fissazione

Dalla figura risulta possibile osservare le aree cerebrali con un'attivazione BOLD significativamente maggiore di fronte alla presentazione delle espressioni facciali rispetto alla condizione basale di fissazione. I risultati non discriminano per le singole emozioni presentate e sono riferiti all'intero campione. I dati mostrano un pattern di attivazione che comprende: aree della corteccia striata occipitale visiva bilaterale, giro fusiforme bilaterale, strutture appartenenti al sistema limbico (amigdala, ippocampo e giri paraippocampali bilaterali) ed aree della corteccia prefrontale sensori-motoria destra ($p \leq 0.05$, correzione *FWE*).

Dopo aver verificato le aree di attivazione evocate dai volti, sulle coordinate dell'amigdala estratte attraverso il metodo delle RoI, sono state condotte due ANOVA.

La prima per testare la differenza di attivazione riferibile alla presenza di diagnosi di Fobia Sociale (su tre livelli). Da tale ANOVA emerge un effetto principale legato al fattore gruppo, come rilevato da: $F = 3.14$, $p = 0.046$ (correzione *FWE*). In particolare dai contrasti tra i tre gruppi si osserva una maggiore attivazione dell'amigdala nei soggetti con diagnosi di Fobia Sociale rispetto ai soggetti sani ($t = 1.67$, $p = 0,043$ correzione *FWE*). I soggetti sottosoglia non mostrano differenze di attivazione significative né rispetto ai soggetti con diagnosi ($p = \text{NS}$ correzione *FWE*) né rispetto ai sani ($p = \text{NS}$ correzione *FWE*). Dagli effetti di interesse mostrati in figura 3.8 si osserva infatti una sorta di gradiente di attivazione nei 3 gruppi, che decresce a partire dai soggetti con diagnosi fino ai soggetti sani.

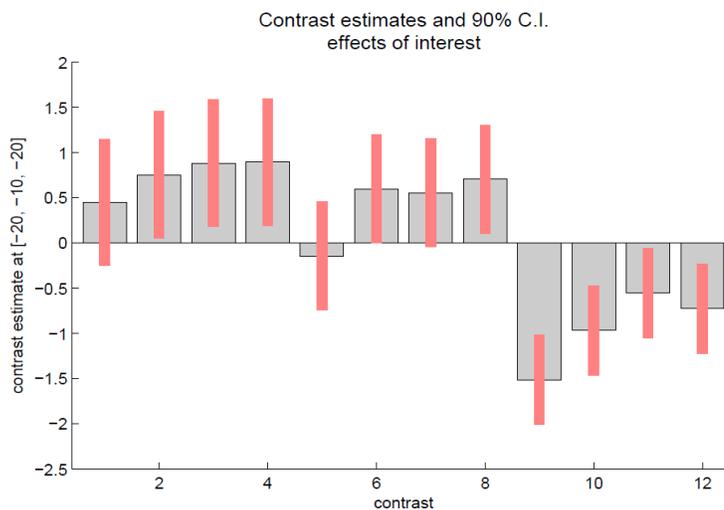


Figura 3.8 Effetto principale della diagnosi di Fobia Sociale su tre livelli. Per ogni gruppo a partire da soggetti con diagnosi, sottosoglia e infine sani vengono presentate le condizioni sperimentali nel seguente ordine: fissazione, neutra, gioia e rabbia.

La seconda ANOVA è stata effettuata per testare la differenza di attivazione in funzione alla presenza delle tre forme alleliche del 5-HTTLPR (ss, Ls, LL). I risultati, seppure non raggiungano una piena significatività ($F = 3.14$, $p \leq 0.05$ non corretto), indicano una chiara influenza del genotipo sull'attivazione dell'amigdala, nella direzione di un'attivazione maggiore nei soggetti omozigoti s come evidenziato dai contrasti tra i tre gruppi (in particolare ss vs LL: $t = 1.67$, $p = 0.09$). Tale effetto viene anche osservato dal grafico sugli effetti di interesse mostrato in figura 3.9 in cui si osserva una sorta di gradiente di attivazione nei 3 gruppi, che decresce a partire dai soggetti omozigoti s (ss) fino agli omozigoti L (LL).

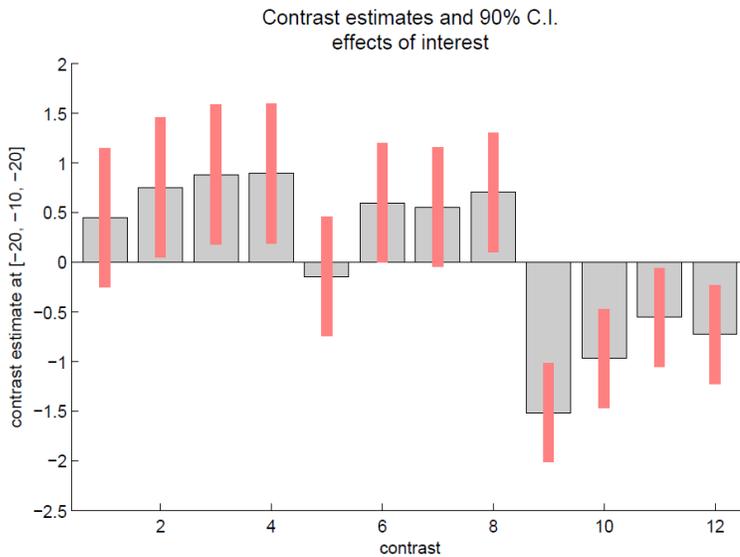


Figura 3.9 Effetto principale del polimorfismo genetico 5-HTTLPR del gene del trasportatore della serotonina su tre livelli. Per ogni gruppo a partire dai soggetti ss, LS e infine LL vengono presentate le condizioni sperimentali nel seguente ordine: fissazione, neutra, gioia e rabbia.

Infine, data l'influenza della diagnosi di Fobia Sociale sull'attivazione dell'amigdala, sono stati condotti, a livello puramente esplorativo, i confronti relativi alla condizione di rabbia tra i tre gruppi. E' stato scelto di indagare i post-hoc solo rispetto alla rabbia in quanto dalle precedenti fasi dello studio longitudinale effettuate sul medesimo campione (Battaglia et al., 2004; 2005) è risultata essere l'espressione la cui decodifica sembra essere particolarmente compromessa nei bambini con Ansia Sociale.

Da tali confronti è risultato che l'effetto di maggior rilevanza emerge dal contrasto di attivazione dell'amigdala evocata dall'espressione di rabbia nei soggetti con diagnosi rispetto a quelli sani ($t= 1.67$, $p = 0.065$).

3.2.5 DISCUSSIONE

I risultati confermano in primo luogo la validità del paradigma ideato per il presente studio, che comporta la presentazione di stimoli originali costituiti da volti di soggetti coetanei rispetto al campione in esame. In particolare sono state presentate tre emozioni fondamentali (neutra, gioia, rabbia) che veicolano differenti messaggi di natura sociale (Battaglia et al., 2004; 2005), alternate a punti di fissazione secondo un disegno a blocchi randomizzati.

I risultati dal punto di vista dei correlati neurali funzionali indicano che il set di stimoli creato, la loro modalità di presentazione ed il tipo di compito richiesto risultano idonei per soggetti in età evolutiva e costituiscono un paradigma adeguato di elaborazione implicita di stimoli emozionali con valenza sociale. I dati mostrano infatti che la visione di emozioni espresse dai volti di coetanei provoca una risposta neurale maggiore, rispetto alla condizione di fissazione, di aree note per essere coinvolte nell'elaborazione non consapevole delle emozioni, nello specifico dell'amigdala.

Dai risultati dello studio emerge in particolare che l'amigdala risulta iperattivata in adolescenti caratterizzati dalla diagnosi di Fobia Sociale. Tale struttura cerebrale è infatti nota per essere implicata nella patofisiologia dei Disturbi d'Ansia (Adolphs 2002, Nomura et al., 2004). Un'esagerata attivazione dell'amigdala, specie a fronte di emozioni espresse dai volti, è stata in particolare associata alla condizione d'ansia nota come disturbo d'Ansia Sociale (Birbaumer et al., 1998; Stein et al., 2002; Furmark et al., 2004). La maggior parte dei dati in letteratura sono però riconducibili a popolazioni di adulti, lo studio presentato costituisce infatti un tentativo di esplorare i correlati biologici dell'Ansia Sociale in età evolutiva. Un aspetto

innovativo dello studio è stato inoltre quello di utilizzare una coorte longitudinale. Il campione del presente esperimento è composto infatti da soggetti appartenenti ad una coorte longitudinale che da circa dieci anni hanno partecipato a progetti volti ad indagare le fonti di variabilità interindividuale rispetto al fenotipo Ansia Sociale e alle alterazioni nell'elaborazione delle emozioni espresse dai volti (Battaglia et al. 2004; 2005). Questo rende ragione del fatto che il presente studio si caratterizza per la dichiarazione di forti ipotesi a-priori, dalle quali derivano la scelta del paradigma e dei metodi di analisi dei dati.

In particolare dai risultati di queste analisi emerge una forte capacità di predizione da parte di pattern di attivazione elettrocorticale, rilevati in infanzia, sulla diagnosi di Fobia Sociale in adolescenza. Tale pattern è costituito da una ridotta ampiezza della componente N400 dei vERP evocata dall'espressione di rabbia, ed è risultato associato anche al gene del trasportatore della serotonina (Battaglia et al., 2005). Il medesimo polimorfismo è risultato inoltre nella fase attuale in associazione con la diagnosi di Fobia Sociale. Attraverso queste associazioni riscontrate nel passaggio dall'infanzia all'adolescenza, il pattern di attivazione elettrocorticale rilevato nelle precedenti fasi dello studio, può essere considerato un buon endofenotipo della Fobia Sociale (Gottesman & Gould, 2003).

Per quanto riguarda l'attivazione di specifiche aree cerebrali, dai risultati emerge un'aumentata attivazione dell'amigdala, come rilevato da altri studi presenti in letteratura (Stein et al., 2002; Murphy et al., 2003). Tale attivazione, oltre ad essere predetta dalla diagnosi di Fobia Sociale, risulta in parte associata anche al polimorfismo genetico. Dai risultati emerge infatti una tendenza in direzione coerente rispetto alle ipotesi a priori, ossia di una maggior attivazione nei soggetti omozigoti s del 5-HTTLPR. Il risultato non raggiunge la piena significatività probabilmente a causa di un forte limite dello studio, ossia la bassa numerosità del campione e la distribuzione disomogenea dei tre gruppi definiti sulla base delle varianti genotipiche.

La bassa numerosità campionaria ha impedito di effettuare le analisi volte a rilevare un possibile effetto di interazione tra gruppi fattoriali, e in particolare tra la diagnosi di Fobia Sociale e le diverse condizioni sperimentali. Poiché dagli studi precedenti sullo stesso campione (Battaglia et al., 2004; 2005) è emersa una compromissione specifica dei soggetti con Ansia Sociale nella decodifica delle espressioni di ostilità, si è scelto di effettuare i contrasti solo per l'emozione di rabbia. Da tali contrasti emerge un'aumentata attivazione dell'amigdala a fronte della rabbia nei soggetti con diagnosi di Fobia Sociale rispetto ai

soggetti sani, tale risultato si presenta al limite della significatività ma risulta fortemente coerente con quanto rilevato sulla coorte longitudinale.

In conclusione i risultati del presente studio, dati i limiti dovuti alla numerosità campionaria, possono essere considerati una prima esplorazione dei pattern di attivazione elettrocorticale e di specifiche aree cerebrali, in soggetti in età evolutiva caratterizzati per il polimorfismo genetico 5-HTTLPR e per l'Ansia Sociale.

Occorre infine specificare che la bassa numerosità campionaria è stata causata da un bias casuale, legato all'impossibilità nella maggior parte dei casi di eseguire la registrazione con la tecnica fMRI (per es. protesi metalliche), e che i partecipanti non differivano in maniera significativa da coloro che non hanno preso parte allo studio né per frequenza allelica del 5HTTLPR né per il numero di tratti di Ansia Sociale.

3.3 CONCLUSIONI DEGLI ESPERIMENTI

Il presente lavoro di tesi è stato articolato su due progetti volti ad approfondire la modalità di elaborazione delle emozioni espresse dai volti, in bambini e adolescenti caratterizzati dalla presenza di Ansia Sociale. L'origine di questi progetti deriva dalla considerazione che la maggior parte degli studi in letteratura si è focalizzata sulle caratteristiche che accomunano gli individui tra loro, trascurando quella parte della variabilità nella decodifica delle espressioni facciali che è dovuta alle differenze individuali (Elfenbein & Ambady, 2002; Battaglia et al., 2004; 2005). Poiché è ormai noto che la capacità di identificare le emozioni espresse dai volti compare precocemente nella vita degli individui ed assume un ruolo cruciale per un adeguato funzionamento sociale (Herba & Phillips, 2004; Battaglia et al., 2004; Batty & Taylor, 2006), un'esplorazione accurata di tale funzione può consentire di identificare indicatori precoci durante l'infanzia di condizioni cliniche che tendono a manifestarsi nel corso della vita.

In quest'ottica gli studi, oltre ad analizzare possibili associazioni nel tempo attraverso una coorte longitudinale, sono stati realizzati con diverse procedure sperimentali per esplorare da più punti di vista l'elaborazione di espressioni facciali che veicolano messaggi di natura sociale.

In particolare il primo esperimento, si è incentrato sulla realizzazione di immagini in evoluzione, diversamente dalla maggior parte degli studi in letteratura che utilizzano stimoli statici. In natura infatti i volti degli interlocutori con cui interagiamo si modificano

continuamente, fornendo quantità di informazione emotiva in ogni momento differente. Per tali ragioni, sono stati creati stimoli ad hoc che attraverso evoluzioni cinematiche mimino il più possibile le modificazioni degli elementi emotivi dei volti.

Attraverso questi stimoli l'obiettivo principale è stato quello di individuare possibili stili di elaborazione che possano meglio definire il processo di identificazione delle espressioni facciali. In particolare gli stili di elaborazione sono stati definiti sulla base di possibili compromessi tra accuratezza e rapidità. Inoltre la maggior parte degli studi in questo ambito ha preso in considerazione come principale condizione clinica l'ansia, trattando tutti i Disturbi d'Ansia come unica categoria, trascurando di conseguenza l'eterogenità che li caratterizza. Il presente esperimento si è posto pertanto come ultimo obiettivo quello di indagare le possibili differenze tra le diverse dimensioni dell'ansia, con particolare attenzione all'Ansia Sociale che è risultata essere quella che più interferisce sul processo di decodifica delle emozioni espresse dai volti (Simonian et al., 2001; Battaglia et al., 2004; Stirling et al., 2006).

Il secondo esperimento invece, attraverso diverse fasi di uno studio longitudinale, ha avuto come obiettivo principale quello di identificare possibili genotipi ed endofenotipi associati all'Ansia Sociale, che ne consentano una maggior caratterizzazione e che possano rappresentare indicatori di rischio precoce per la condizione clinica. Gli endofenotipi utilizzati sono stati registrati, attraverso le tecniche di ERPs e fMRI. L'attività cerebrale, sia in termini di modificazioni elettroencefalografiche che di attivazione di specifiche aree cerebrali, possiede infatti numerose caratteristiche che identificano un valido endofenotipo e pertanto può costituire un importante ambito di indagine per approfondire la natura delle differenze individuali nell'elaborazione implicita di stimoli emotivi (Gottesman & Gould, 2003). Il genotipo preso in considerazione è stato invece uno specifico polimorfismo del gene che codifica per il trasportatore della serotonina (5-HTTLPR) che è stato ampiamente associato alle manifestazioni di Ansia Sociale, sia in termini temperamentali (Battaglia et al., 2005) che in termini clinici (Furmark et al., 2004). Lo stesso polimorfismo inoltre è risultato predire specifici pattern di attivazione cerebrale a fronte di emozioni espresse dai volti (Hariri et al., 2005; Munafò et al., 2009; Furmark et al., 2009).

Dai risultati ottenuti in questi esperimenti è stato pertanto possibile effettuare importanti considerazioni sul processo di elaborazione delle emozioni espresse dai volti, in soggetti in età evolutiva estratti dalla popolazione generale.

In primo luogo i dati hanno replicato quanto riportato in letteratura, ossia che le emozioni più semplici da riconoscere sono la gioia e la sorpresa mentre le più difficili sono la rabbia e il disgusto. Inoltre è emerso che durante l'infanzia le prestazioni definite come "accurate" e "inaccurate" seguono la medesima modalità di relazione tra accuratezza e rapidità: le prestazioni "accurate" per identificare correttamente l'emozione presentata richiedono un minor numero di fotogrammi rispetto a quelle inaccurate. Ciò equivale a dire che le prestazioni "accurate" non sono buone perchè lente e viceversa. Questo risultato potrebbe suggerire l'assenza di errori sistematici, per esempio la tendenza a rispondere in maniera affrettata, nei soggetti che mostrano prestazioni "inaccurate".

Dal secondo studio effettuato attraverso la risonanza magnetica funzionale emerge inoltre che, dal punto di vista dei correlati neurali la visione di emozioni espresse dai volti di coetanei provoca una risposta neurale maggiore, rispetto alla condizione di fissazione, di aree note per essere coinvolte nell'elaborazione non consapevole delle emozioni: aree della corteccia striata occipitale visiva bilaterale, giro fusiforme bilaterale, strutture appartenenti al sistema limbico (amigdala, ippocampo e giri paraippocampali bilaterali).

Oltre a queste considerazioni di ordine generale, dagli studi è stato riscontrato che l'unica tra le diverse forme di ansia a influire sulle prestazioni di decodifica delle emozioni è l'Ansia Sociale. I bambini con alti livelli di Ansia Sociale, oltre a commettere un maggior numero di errori (Battaglia et al., 2004), richiedono un maggior numero di informazioni per identificare correttamente l'emozione di rabbia. Tale espressione veicola infatti un segnale di rifiuto sociale, messaggio rispetto al quale i soggetti con Ansia Sociale risultano molto sensibili (Battaglia et al., 2004; Simonian et al., 2001; Stirling et al., 2006).

Alla luce di tali considerazioni la condizione di Ansia Sociale è stata esplorata in termini longitudinali analizzandone anche possibili markers biologici e polimorfismi genetici associati. Dai risultati di queste analisi è stata in particolare rilevata una forte predizione da parte di pattern di attivazione elettrocorticale evocati dall'espressione di rabbia e rilevati in infanzia sulla diagnosi di Fobia Sociale in adolescenza. Tale pattern è risultato inoltre predetto dalla presenza dell'allele s del gene promotore del trasportatore della serotonina (Battaglia et al., 2005). Il medesimo polimorfismo è risultato inoltre associato alla diagnosi di Fobia Sociale. Attraverso queste associazioni riscontrate nel passaggio dall'infanzia all'adolescenza, il pattern di attivazione elettrocorticale rilevato nelle precedenti fasi dello studio, può essere

considerato un buon endofenotipo della Fobia Sociale (Gottesman & Gould, 2003).

Per quanto riguarda l'attivazione di specifiche aree cerebrali, dai risultati è emersa un'augmentata attivazione cerebrale, specie dell'amigdala, nei soggetti con diagnosi di Fobia Sociale. Tale attivazione, oltre ad essere predetta dalla diagnosi di Fobia Sociale, risulta in parte associata anche al polimorfismo genetico. Dai risultati emerge infatti una tendenza nella direzione coerente rispetto alle ipotesi, ossia di una maggior attivazione in soggetti portatori dell'allele s. Quest'ultimo risultato non raggiunge la piena significatività probabilmente a causa di un limite dello studio, ossia della bassa numerosità campionaria.

BIBLIOGRAFIA

Adolphs R., Tranel D., Damasio A.R., Damasio A.: Impaired recognition of emotion in facial expression following bilateral damage to the human amygdala. *Nature*.1994; 372: 669-672.

Adolphs R.: Recognizing emotion from facial expressions: psychological and neurological mechanisms. *Behav Cogn Neurosci Rev*. 2002; 1: 21-62.

Albano AM., Marten PA., Holt CS, et al.: Cognitivebehavioral group treatment for social phobia in adolescents. A preliminary study. *J Nerv Ment Dis*.1995; 183: 649-656.

Ambrosini PJ: Historical development and present status of the Schedule for Affective Disorders and Schizophrenia for School-age Children (K-SADS). *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2000; 39 :49-58.

American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders. 4th ed.- Text Revision 2000; Washington, DC: Author.

Azmitia EC, Gannon PJ: The primate serotonergic system: a review of human and animal studies and a report on *Macaca fascicularis*. *Adv Neurol*. 1986; 43: 407-468.

Baird AA, Gruber SA, Fein DA, et al.: Functional magnetic resonance imaging of facial affect recognition in children and adolescents. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 1999; 38:195-199.

Barrera ME, Maurer D: The perception of facial expressions by the three-month-old. *Child Dev*. 1981; 52:203-206.

Barrett LF, Bliss-Moreau E, Duncan SL, et al.: The amygdala and the experience of affect. *Soc Cogn Affect Neurosci*. 2007; 2: 73-83.

Battaglia M, Ogliari A, Zanoni A, et al.: Children's discrimination of expressions of emotions: relationship with indices of social anxiety and shyness. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2004; 43: 358-365.

Battaglia M, Ogliari A, Zanoni A, et al.: Influence of the Serotonin Transporter Promoter Gene and Shyness on Children's Cerebral Responses to Facial Expressions. *Arch Gen Psychiatry*. 2005; 62: 85-94.

Batty M, Taylor MJ: The development of emotional face processing during childhood. *Dev Sci*, 2006; 9: 207-220.

Bear MF, Connors BW, Paradiso MA: *Neuroscienze. Esplorando il cervello*. Masson 2002.

Beck AT, Rush AJ: A cognitive model of anxiety formation and anxiety resolution. *Issues Ment Health Nurs*, 1985; 7: 349-365.

Biedel DC, Turner SM: *Timidezza e fobia sociale*. Casa Editrice MacGrow- Hill 1° edizione italiana; 2000.

Biederman J, Rosenbaum JF, Hirshfeld DR, et al.: Psychiatric correlates of behavioral inhibition in young children of parents with and without psychiatric disorders. *Arch Gen Psychiatry*. 1990; 47: 21-26

Biederman J, Hirshfeld -Becker D, Rosenbaum J, et al.: Further Evidence Of Association Between Behavioral Inhibition And Social Anxiety In Children. *Am J Psychiatry*. 2001; 158: 1673-1679.

Birbaumer N, Grodd W, Diedrich O, et al.: fMRI reveals amygdala activation to human faces in social phobics. *Neuroreport*. 1998; 9:1223–1226

Birmaher B, Khetarpal S, Brent D, et al.: The Screen for Child Anxiety Related Emotional Disorders (SCARED): Scale construction and psychometric characteristics. . *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 1997; 36: 545-553.

Blair RJ, Morris JS, Frith CD, et al.: Dissociable neural responses to facial expressions of sadness and anger. *Brain*. 1999; 122: 883–893.

Blair RJ, Colledge E, Murray L, et al.: A selective impairment in the processing of social anxiety disorder and fearful expressions in children with psychopathic tendencies. *J Abnorm Child Psychol*. 2001; 29:491–498

Blair RJ, Drevets WC, Pine DS: Response to emotional expressions in generalized social phobia and generalized anxiety disorder: evidence for separate disorders. *Am J Psychiatry*. 2008; 165:1193-1202.

Blier P, de Montigny C: Serotonin and drug-induced therapeutic responses in major depression, obsessivecompulsive and panic disorders. *Neuropsychopharmacology*. 1999; 21: 91S–98S.

Bogels SM, Zigterman D: Dysfunctional cognition in children with social phobia, separation anxiety disorder and generalized anxiety disorder. *J Abnorm Child Psychol*, 2000; 28: 205-211.

Calder AJ, Young AW, Rowland D, et al.: Facial emotion recognition after bilateral amygdala damage: differentially severe impairment of fear. *Cogn Neuropsychol*, 1996; 13: 669-745.

Camras LA, Allison K: Children's understanding of emotional facial expressions and verbal labels. *J Nonverbal Behav*, 1985; 9: 84-94.

Clarck DM, McManus F: Information processing in social phobia. *Biol Psychiatry*. 2002; 51: 92-100.

Compton SN, Nelson AH, March JS: Social phobia and separation anxiety symptoms in community and clinical samples of children and adolescents. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2000; 39:1040-1046.

Dailey MN, Cottrell GW, Padgett C, et al.: EMPATH: A neural network that categorizes facial expressions. *J Cogn Neurosci.*2002; 14: 1158-1173.

Easter J, McClure EB, Monk CS, et al.: Emotion recognition deficits in pediatric anxiety disorders: implications for amygdala research. *J Child Adolesc Psychopharmacol.* 2005; 15 : 563-570.

Eimer M. Effects of face inversion on the structural encoding and recognition of faces: evidence from event-related brain potentials. *Brain Res Cogn Brain Res.* 2000;10:145-158.

Ekman P, Friesen WV. *Pictures of Facial Affect.* Palo Alto, Calif: Consulting Psychologists Press;1976.

Elfenbein H.A, Ambady N.: Is there an in-group advantage in emotion recognition? *Psychol Bull.* 2002; 128: 243-249.

Emery NJ, Capitanio JP, Mason WA, et al.: The effects of bilateral lesions of the amygdala on dyadic social interactions in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Behav Neurosci.* 2001; 115: 15-44.

Evans KC, Wright CI, Wedig MM, et al.: A functional MRI study of amygdala responses to angry schematic faces in social anxiety disorder. *Depress Anxiety.* 2008; 25:496-505.

Feinberg T, Rifkin A, Schaffer C, Walker E : Facial discrimination and emotional recognition in schizophrenia and affective disorders. *Arch Gen Psychiatry* . 1986; 43:276–279

Fernandez-Egea E, Parellada E, Lomeña F, et al.: A continuous emotional task activates the left amygdala in healthy volunteers: (18) FDG PET study. *Psychiatry Res.* 2009; 171: 199-206.

Field TM, Woodson R, Greenberg R, et al.: Discrimination and imitation of facial expression by neonates. *Science.* 1982; 218:179-181.

Fischer H, Sandblom J, Gavazzeni J, et al.: Age differential patterns of brain activation during perception of angry faces. *Neurosci Lett*, 2005; 30: 99-104.

Flint J, Munafò MR: The endophenotype concept in psychiatric genetics. *Psychol Med*, 2007; 37: 163-80.

Fontana F, Arcudi L: Aspetti evolutivi nella discriminazione di volti esprimenti emozioni. *Età Evolutiva*, 1987; 5-15.

Fox NA, Henderson HA, Rubin KH, et al.: Continuity and discontinuity of behavioral inhibition and exuberance: psychophysiological and behavioral influences across the first four years of life. *Child Dev*, 2001; 72: 1-21.

Fries AB, Pollak SD: Emotion understanding in postinstitutionalized Eastern European children. *Dev Psychopathol*. 2004; 16: 355-369.

Furmark T, Tillfors M, Garpenstrand H, et al.: Serotonin transporter polymorphism related to amygdala excitability and symptom severity in patients with social phobia. *Neurosci Lett*, 2004; 362: 189-92.

Furmark T, Henningsson S, Appel L, et al.: Genotype over-diagnosis in amygdala responsiveness: affective processing in social anxiety disorder. *J Psychiatry Neurosci*. 2009; 34: 30-40.

Goldsmith HH, Lemery KS: Linking temperamental fearfulness and anxiety symptoms: a behavior-genetic perspective. *Biol Psychiatry*, 2000; 48: 1199-1209.

Gottesman II, Gould TD: The endophenotype concept in psychiatry: etymology and strategic intentions. *Am J Psychiatry*, 2003; 160: 636–645.

Gould TD, Gottesman II: Psychiatric endophenotypes and the development of valid animal models. *Genes Brain Behav*, 2006; 5: 113–119.

Gur RC, Erwin RJ, Gur RE, et al.: Facial emotion discrimination: behavioral findings in depression. *Psychiatry Res*. 2002; 42:241–251

Guyer AE, Monk CS, McClure-Tone EB, et al.: A developmental examination of amygdala response to facial expressions. *J Cogn Neurosci*. 2008; 20:1565-1582.

Habel U, Windischberger C, Derntl B, et al.: Amygdala activation and facial expressions: explicit emotion discrimination versus implicit emotion processing. *Neuropsychologia*. 2007; 45:2369-2377.

Hariri AR, Mattay VS, Tessitore A., et al.: Serotonin transporter genetic variation and the response of the human amygdala. *Science*, 2002; 297: 400-403.

Hariri AR, Weinberger DR: Functional neuroimaging of genetic variation in serotonergic neurotransmission. *Genes, Brain and Behavior* .2003; 2: 341–349.

Hariri AR, Drabant EM, Munoz KE, et al.: A susceptibility gene for affective disorders and the response of the human amygdala. *Arch Gen Psychiatry*, 2005; 62: 146-152.

Hayward C, Killen JD, Kraemer H, et al.: Linking self-reported childhood behavioural inhibition to adolescent social phobia. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 1998; 37: 1308-1316.

Haxby JV, Hoffman EA, Gobbini MI: Human neural systems for face recognition and social communication. *Biol Psychiatry*.2002; 51: 59-67.

Herba C, Phillips M: Annotation: Development of facial expression recognition from childhood to adolescence: behavioural and neurological perspectives. *J Child Psychol Psychiatry*. 2004; 45:1185–1198.

Herba C, Landau S, Russell T, et al.: The development of emotion-processing in children: Effects of age, emotion, and intensity. . *J Child Psychol Psychiatry*. 2006; 47: 1098-1106.

Hirshfeld DR, Rosenbaum JF, Biederman J, et al.: Stable behavioural inhibition and its association with anxiety disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 1992; 31: 103-111.

Horley K, Williams LM, Gonsalvez C, et al.: Social phobics do not see eye to eye: a visual scanpath study of emotional expression processing. *J Anxiety Disord*. 2003;17:33-44.

Kagan J, Reznick JS, Clarke C, et al: Behavioral inhibition to the unfamiliar. *Child Dev*. 1984; 55: 2212-2225.

Kagan J, Reznick JS, Clarke C, et al.: Biological bases of childhood shyness. *Science*. 1988; 240: 167-171.

Kanwisher N, McDermott J, Chun MM: The fusiform face area: a module in human extrastriate cortex specialized for face perception. *J Neurosci*. 1997;17:4302-4311.

Kaufman J, Birmaher B, Brent D, et al.: Schedule for Affective Disorders and Schizophrenia for School-Age Children- Present and Lifetime Version (K-SADS-PL): initial reliability and validity data. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatr.*,1997; 36: 980-988.

Kendler KS, Karkowski LM, Prescott C: Fears and phobias: reliability and heritability. *Psychol Med*. 1999; 29: 539-553.

Leber S, Heidenreich T, Stangier U, et al. : Processing of facial affect under social threat in socially anxious adults: mood matters. *Depress Anxiety*. 2009; 26:196-206.

Lesch KP, Bengel D, Heils A, et al.: Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. *Science*. 1996; 274: 1527-1531.

Lévesque J, Eugène F, Joannette Y, et al.: Neural circuitry underlying voluntary suppression of sadness. *Biol Psychiatry*. 2003; 53:502-510.

Lewis MD, Granic I, Lamm C, et al.: Changes in the neural bases of emotion regulation associated with clinical improvement in children with behavior problems. *Dev Psychopathol*. 2008 ;20:913-39.

Lucki I: The spectrum of behaviors influenced by serotonin. *Biol Psychiatry*. 1998; 44: 151–162.

Matheny AP: Children's behavioral inhibition over age and across situations: genetic similarity for a trait during change. *J Pers*, 1989; 57: 215-235.

Melfsen SS, Florin I.: Do socially anxious children show deficits in classifying facial expressions of emotions?. *J Nonverbal Behav*. 2002; 26: 109-126.

Mick MA, Telch MJ: Social Anxiety And History Of Behavioral Inhibition In Young Adults. *J Anxiety Disord*. 1998; 12 : 1-20.

Moffitt TE, Caspi A, Rutter M. Strategy for investigating interactions between measured genes and measured environments. *Arch Gen Psychiatry*. 2005; 62: 473–481.

Monk CS, McClure EB, Nelson EE: Adolescent immaturity in attention-related brain engagement to emotional facial expressions. *Neuroimage*. 2003;20:420-428.

Monk CS: The development of emotion-related neural circuitry in health and psychopathology. *Dev Psychopathol*. 2008; 20:1231-1250.

Morris JS, Frith CD, Perrett DI, et al.: A differential neural response in the human amygdala to fearful and happy facial expressions. *Nature*. 1996;383:812-815.

Morris JP, Pelphrey KA, McCarthy G: Face processing without awareness in the right fusiform gyrus. *Neuropsychologia*. 2007;45:3087-3091.

Moser JS, Krompinger JW, Dietz J, et al.: Electrophysiological correlates of decreasing and increasing emotional responses to unpleasant pictures. *Psychophysiology*. 2009; 46:17-27.

Munafò MR, Clark TG, Moore LR, et al.: Genetic polymorphisms and personality in healthy adults: a systematic review and metaanalysis. *Mol Psychiatry*, 2003; 8: 471-84.

Munafò MR, Brown SM, Hariri AR: Serotonin Transporter (5-HTTLPR) Genotype and Amygdala Activation: A Meta-Analysis. *Biol Psychiatry*. 2008;63:852–857.

Murphy DL, Andrews AM, Wichems CH, et al.: Brain serotonin neurotransmission: an overview and update with an emphasis on serotonin subsystem heterogeneity, multiple receptors, interactions with other neurotransmitter systems, and consequent implications for understanding the actions of serotonergic drugs. *J Clin Psychiatry*. 1998; 59: 4–12.

Murphy FC, Nimmo-Smith I, Lawrence AD: Functional neuroanatomy of emotions: a meta-analysis. *Cogn Affect Behav Neurosci*. 2003;3 :207-33.

Nelson CA: The recognition of facial expressions in the first two years of life: mechanisms of development. *Child Dev*. 1987; 58:889-909.

Nelson EC, Grant JD., Bucholz KK, et al.: Social phobia in a population-based female adolescent twin sample: co-morbidity and associated suicide-related symptoms. *Psychol Med*, 2000; 30: 797-804.

Nelson LJ, Rubin KH, Fox NA: Social withdrawal, observed peer acceptance and the development of self-perception in children ages 4 to 7 years. *Early Child Res*. 2005; 20: 185-200.

Nomura M, Ohira H, Haneda K, et al.: Functional association of the amygdala and ventral prefrontal cortex during cognitive evaluation of facial expressions primed by masked angry faces: an event-related fMRI study. *Neuroimage*. 2004;21:352-363.

Ogliari A, Citterio A, Zanoni A, et al. Genetic and environmental influences on anxiety dimensions in Italian twins evaluated with the SCARED questionnaire. *J Anxiety Disord*. 2006; 20: 760-777.

Phan KL, Fitzgerald DA, Nathan PJ, et al.: Association between amygdala hyperactivity to harsh faces and severity of social anxiety in generalized social phobia. *Biol Psychiatry*, 2006; 59: 424-429.

Pine DS: Editorial: Answering questions in developmental science: separating the wheat from the chaff. *J Child Psychol Psychiatry*. 2007; 48 :1157-1159.

Poldrack RA: Region of interest analysis for fMRI. *SCAN* .2007; 2: 67–70

Posamentier MT, Abdi H. Processing faces and facial expressions. *Neuropsychol Rev*. 2003;13:113-143.

Plomin R.: Multivariate analysis and development behavioral genetics: developmental change as well as continuity. *Behav Genet*. 1986; 16:25-43.

Prior M., Smart D., Sanson A., et al.: Does shy-inhibited temperament in childhood lead to anxiety problems in adolescence? *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 2000; 39: 461-468.

Pujol J, Harrison BJ, Ortiz H., et al.: Genotype over-diagnosis in amygdala responsiveness: affective processing in social anxiety disorder. *J Psychiatry Neurosci*. 2009; 34:30-40.

Reznick JS, Kagan J, Snidman N, et al.: Inhibited And Uninhibited Children: A Follow-Up Study. *Child Development*. 1986; 57: 179-185.

Ridderinkhof KR, van den Wildenberg WP, Segalowitz SJ, et al.: Neurocognitive mechanisms of cognitive control: the role of prefrontal cortex in action selection, response inhibition, performance monitoring, and reward-based learning. *Brain Cogn.* 2004; 56:129-40.

Robinson JL, Kagan J, Reznick JS, et al.: The heritability of inhibited and uninhibited behaviour: a twin study. *Dev Psychol*, 1992; 28: 1030-1037.

Rosenbaum JF, Biederman J, Hirshfeld DR, et al.: Further evidence of an association between behavioral inhibition and anxiety disorders: results from a family study of children from a non-clinical sample. *J Psychiatr Res*, 1991; 25: 49-65.

Rosenbaum JF, Biederman J, Bolduc EA, et al.: Comorbidity of parental anxiety disorders as risk for childhood-onset anxiety in inhibited children. *Am J Psychiatry*, 1992; 149: 475-481.

Rutter M., Moffitt TE, Caspi A: Gene-environment interplay and psychopathology: multiple varieties but real effects. *J Child Psychol Psychiatry*. 2006;47:226- 61.

Schwartz CE, Wright CI, Shin LM, et al.: Inhibited and uninhibited infants “grown up”: adult amygdalar response to novelty. *Science*, 2003; 300: 1952-1953.

Simonian SJ, Beidel DC, Turner SM, et al.: Recognition of facial affect by children and adolescents diagnosed with social phobia. *Child Psychiatry Hum Dev*. 2001; 32:137–145

Smith SM: Overview of fMRI analysis. *Br J Radiol*, 2004;77: 167-175.

Southam-Gerow MA, Kendall PC.: A preliminary study of the emotion understanding of youths referred for treatment of anxiety disorders. *Journal of Clinical Child Psychology*. 2000; 29: 319-327.

SPM Wellcome Department of Cognitive Neurology, London, UK e Matlab 6.5 Mathworks Inc., Natick, MA, USA.

Stein MB, Goldin PR, Sareen J, et al.: Increased amygdale activation to angry and contemptuous faces in generalized social phobia. *Arch Gen Psychiatry*. 2002; 59: 1027-1034.

Stirling LJ, Eley TC., Clark DM: Preliminary evidence for an association between social anxiety symptoms and avoidance of negative faces in school-age children. *J Clinic Child Adolesc Psychology*,. 2006; 35: 431-439.

Thomas KM, Drevets WC, Dahl RE, et al. : Amygdala response to fearful faces in anxious and depressed children. *Arch Gen Psychiatry*, 2001; 58: 1057-1063.

Thomas LA, De Bellis MD, Graham R, et al.: Development of emotional facial recognition in late childhood and adolescence. *Dev Sci*. 2007; 10: 547-58.

Tillfors M, Furmark T, Marteinsdottir I: Cerebral blood flow in subjects with social phobia during stressful speaking asks: a PET study. *Am J Psychiatry*. 2001;158:1220-1226.

Timms RJ : Cortical inhibition and facilitation of the defence reaction [proceedings]. *J Physiol*. 1977;266:98-99.

Turner SM, Beidel DC, Wolff PL: Is Behavioral Inhibition Related To The Anxiety Disorders? *Clinical Psychologist Review*. 1996; 16: 157-172.

Van Ameringen M, Mancini C, Farvolden P, et al.: The neurobiology of social phobia: from pharmacotherapy to brain imaging. *Curr Psychiatry Rep*. 2000; 2:358-366.

Vicari S. Reilly JS, Pasqualetti P, et al.: Recognition of facial expressions of emotions in school-age children: the intersection of perceptual and semantic categories. *Acta Paediatr*, 2000; 89: 836-845.

Viskontas IV, Knowlton BJ, Steinmetz PN, et al.: Differences in mnemonic processing by neurons in the human hippocampus and parahippocampal regions. *J Cogn Neurosci*, 2006; 18: 1654-1662.

Whalen DE: Vigilance and ambiguity: initial neuroimaging studies of the human amygdala. *Curr Direct Psychol Sci*, 1998; 7: 177-188.

Winton EC, Clark DM, Edelmann RJ.: Social anxiety, fear of negative evaluation and the detection of negative emotion in others. *Behav Res Ther*. 1995; 33:193-196.