



## Caracterización de biomarcadores predictivos de comorbilidades en el autismo

**ENTIDAD EJECUTORA PRINCIPAL:** Centro Internacional de Restauración Neurológica

**AUTORES:** María de los Ángeles Robinson Agramonte, Héctor Vera Cuesta; Lilia María Morales Chacón, Margarita MinouBaez Martín, Sheila Berrillo Batista, María Elena González Fraguera

**Filiación:** Centro Internacional de Restauración Neurológica (CIREN). La Habana, Cuba

**Colaboradores:** Carlos Maragoto Rizo<sup>1</sup>, Lázaro Gómez<sup>1</sup>, Elena Noris García<sup>2</sup>, Mabel Willby<sup>3</sup>, Leyanis Hernández<sup>3</sup>

**Filiaciones:** <sup>1</sup>Centro Internacional de Restauración Neurológica, La Habana, Cuba. <sup>2</sup>Instituto de Nefrología, La Habana, Cuba. <sup>3</sup>Hospital Pediátrico del Cerro, La Habana, Cuba

### RESUMEN

#### Palabras clave

biomarcadores; predicción; comorbilidades; autismo

Se conoce de la importancia del sueño y los mecanismos inflamatorios en la plasticidad cerebral y la construcción de las conexiones funcionales normales, así como del impacto de las comorbilidades en la progresión de los trastornos del espectro autista. La epilepsia y los trastornos del sueño son comorbilidades frecuentes en el autismo; sin embargo, no existen biomarcadores de utilidad para la evaluación temprana del riesgo de presentar estas comorbilidades, lo que dificulta una intervención temprana más eficaz en el autismo. El estudio realizado identificó patrones de neuroinflamación con dominancia diferencial para citoquinas asociados a la epileptogenicidad, los patrones de conectividad funcional detectadas por EEG durante el sueño NREM y de conectividad local y global de la red durante el sueño no REM para autismo primario y secundario. De igual manera se describe la eficiencia de la red de conectividad funcional en estos pacientes. Se aportan herramientas que permiten estratificar los fenotipos clínicos en el autismo y la estimación prodrómica de la progresión de la enfermedad, basado en el análisis de la epileptogenicidad, los trastornos del sueño y parámetros moleculares basados en la evaluación del perfil de citoquinas en el autismo. Estos resultados fueron publicados en revistas internacionales de alto impacto: 3 artículos originales y 4 capítulos de un libro publicado por la Editorial Springer, para un total de 7 citas en los últimos 4 años. Se defendieron dos tesis de especialistas en Inmunología y Neurofisiología Clínica (2016), se obtuvieron dos Resultados Científicos Relevantes (CIREN 2015 y 2016), dos Premios del concurso Premio Anual de Salud (2017 y 2018), un Premio Anual de la Sociedad Cubana de Inmunología (2017) y un Premio Internacional de Neurología "Rafael Estrada 2017", así como dos Certificaciones de Aportes Científicos de los Resultados (2016 y 2018).

Los trastornos del espectro del autismo (TEA) son trastornos del neurodesarrollo caracterizados por alteraciones en la interacción social y la comunicación verbal y no verbal, asociados a patrones estrechos de intereses. Los síntomas aparecen tempranamente, y siguen gradualmente un curso sin remisión, para establecerse de manera general después de los 3 años de edad y continuar hasta la adultez, cuando se manifiesta de forma más atenuada.

Una limitante en la eficacia de la intervención en el autismo es la carencia de biomarcadores que permitan estratificar los fenotipos clínicos principales que subyacen a la plasticidad neural maladaptativa en esta entidad o predecir tempranamente la progresión de la enfermedad. De ahí, la necesidad de caracterizar parámetros neurobiológicos objetivos que permitan la estimación temprana de comorbilidades frecuentes como la epileptogenicidad, los trastornos del sueño y sus principales determinantes en el autismo.

## Caracterización de patrones inflamatorios y neurofisiológicos predictores de epileptogenicidad en el autismo

Datos recientes manifiestan el impacto de los eventos moleculares en la plasticidad neural aberrante que tiene lugar en el autismo [1-3]. Cambios en los niveles de citoquinas IL-1, IL-10, IL-6, IL-17 e IL-12 con un impacto diferencial sobre la severidad de la enfermedad y el deterioro en la conducta han sido referidos por varios autores [2-4], mientras que otros estudios evidencian un predominio de epilepsia subclínica identificada por anomalías en el electroencefalograma (EEG) de estos niños [5-7], sin que se conozca el papel de la inflamación en su ocurrencia.

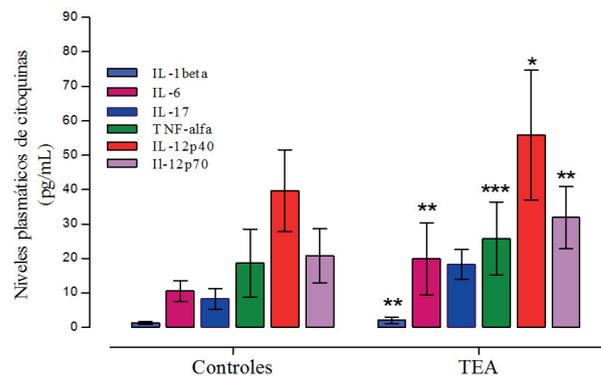
Diferentes grupos han marcado el papel de las citoquinas proinflamatorias, como IL-1, IL-6 y TNF, en la generación de conductas anormales asociadas a trastornos del neurodesarrollo [4,8]. El presente trabajo explora los cambios en la respuesta inflamatoria en pacientes autistas, con apoyo en el análisis del perfil de citoquinas y su relevancia para predecir el riesgo de ocurrencia de comorbilidades de conjunto con estudios neurofisiológicos basados en el registro del EEG, con el valor agregado de la evaluación de estos marcadores inflamatorios desde la periferia.

La investigación incluyó 17 pacientes con el diagnóstico de autismo primario y a 15 controles del mismo rango de edad y distribución de sexo. El diagnóstico siguió los criterios del DSM-IV-TR 2000 (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders) [9-11]. Se requirió el consentimiento informado de pacientes o cuidadores para la inclusión en la investigación, como parte de un proyecto aprobado por el Comité de Ética del CIREN, dirigido a caracterizar biomarcadores moleculares

y neurofisiológicos de valor potencial para predecir comorbilidades referidas a la epileptogenicidad y los trastornos del sueño en el autismo.

## Evaluación del perfil de citoquinas

Se evaluaron citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias en el plasma de pacientes y controles utilizando un kit de ELISA múltiple, tipo sándwich (Quantibody® Human Inflammation Arrays; QAH-INF-3, RayBiotech, Inc., Norcross, GA, USA), que permitió la cuantificación simultánea de mediadores solubles. Diferencias significativas se observaron para las citoquinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17, IL-12p40 y IL-12p70 en los pacientes con autismo en comparación con los controles ( $p < 0,05$ ) [16] (figura 1) [12].



**Fig. 1.** Niveles plasmáticos de citoquinas en pacientes con TEA y controles. Los datos se expresan como el valor de la mediana  $\pm$ EEM. Niveles significativos: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , y \*\*\* $p < 0,001$ , prueba t Student.

## Perfil inflamatorio y epileptogenicidad desde el electroencefalograma en el autismo

Los registros del EEG se realizaron con el equipo MEDICID V AmplifierSystem (Neuronic, Cuba), según el sistema internacional 10/20. La impedancia se mantuvo por debajo de 5 k $\Omega$ . La clasificación de las fases del sueño se realizó de forma manual. Los registros incluyeron EEG completo, electromiografía mentoniana, movimientos oculares y electrocardiograma. El registro EEG fue anormal en 14 de los 17 pacientes con autismo primario evaluados, para un 82 % del total [13]. Por otro lado, el 37,5 % refirió antecedentes de crisis de epilepsia. A partir de ahí, los pacientes fueron clasificados de acuerdo con la identificación de antecedentes de epilepsias, como con antecedentes de epilepsia y sin ellos. El registro EEG mostró que 6 de los primeros (35 %) mostró actividad epileptiforme interictal (AEI) focalizadas hacia la región frontotemporal, mientras que en 4 de los segundos (23 %), la AEI estuvo focalizada hacia la región frontoparietaltemporal [13].

La evaluación del perfil de citoquinas mostró un patrón proinflamatorio con predominio de IL-1 $\beta$  e IL-17 que difirió en estos subgrupos para niveles significativamente elevados de IL-12 p40 en los pacientes con historia de epilepsia ( $z = 2,23$ ,  $p = 0,025$ ), y de IL-6 en aquellos sin historia de epilepsia ( $z = 2,30$ ,  $p = 0,021$ ) [12]. Estos resultados, de conjunto con los hallazgos neurofisiológicos revelan la potencialidad de biomarcadores inflamatorios para predecir riesgo de comorbilidad vinculada a la epileptogenicidad en el autismo, una novedad de este trabajo [12,13].

Pacientes con autismo primario con historia de epileptogenicidad mostraron un patrón de AEI focalizada a la región frontotemporal en ambos hemisferios con un patrón molecular proinflamatorio en periferia relevante para IL-1 $\beta$  e IL-17 e IL-12 p40, diferente de aquellos sin historia de epilepsia, donde la AEI mostró una focalización centroparietotemporal asociada a un patrón proinflamatorio en periferia relevante para IL-1 $\beta$  e IL-17 e IL-6. La coincidencia de los patrones moleculares y neurofisiológicos asociados a esta comorbilidad refuerzan el aporte de estos patrones neurobiológicos en la identificación de riesgo de progresión por la influencia de comorbilidades clínicas en el autismo.

La IL-1 liberada por los macrófagos y células dendríticas tiene acciones estimuladoras e inhibitorias sobre diversos tipos celulares y promueve la apoptosis. La IL-1 $\beta$ , por su parte, activa proteínas de señalización y factores de transcripción como el NF $\kappa$ B, que controla la expresión de genes catabólicos e inflamatorios y regula la expresión de genes proapoptóticos y el balance entre las señales pro- y antiapoptóticas. De la misma manera, la IL-17 es una citoquina proinflamatoria capaz de inducir la producción microglial de IL-1 $\beta$ , contribuyendo a la enfermedad neuroinmunitaria. Se conoce que macrófagos que infiltran el cerebro producen IL-12, y promueven la producción de IL-17 por linfocitos T $\gamma$  $\delta$ , los cuales actúan directamente sobre macrófagos y células del cerebro para promover la expresión de mediadores inflamatorios como IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  y MPP3y9, entre otros que inducen la muerte celular por apoptosis con impacto negativo a este nivel [14].

Desde este análisis es posible considerar que el incremento de IL-12p40 en pacientes autistas con antecedentes de epilepsia pudiera ser expresión de un proceso inflamatorio crónico relevante para promover la epileptogenicidad en el autismo. La IL-6, por su parte, es una citoquina pleiotrópica que sinergiza con el TNF $\alpha$  y la IL-1. Su efecto en células neurales es sugerido por su influencia en la angiogénesis y los mecanismos de reparación tisular [15,16], que pudieran explicar lo observado en los pacientes autistas sin antecedentes de epilepsia.

## **Caracterización de la conectividad funcional y patrones de electroencefalograma como biomarcador predictivo de epileptogenicidad y de trastornos del sueño en el autismo**

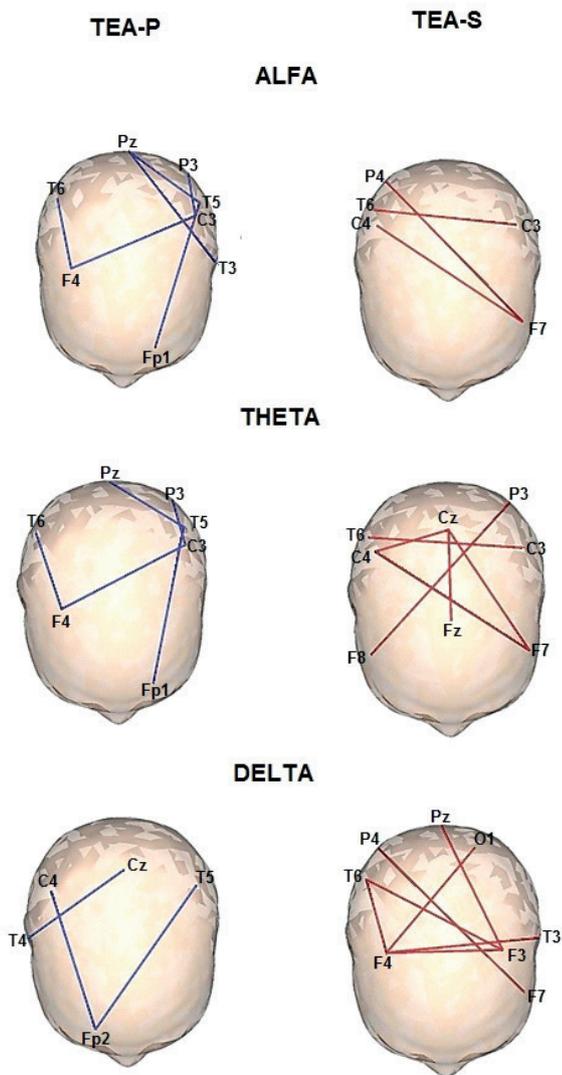
### **Análisis topológico de la red**

Al estudio electroencefalográfico realizado siguió el análisis de la conectividad funcional basado en el cálculo de la matriz de sincronización espacial en las cuatro bandas de frecuencia alfa, beta, theta y delta, siguiendo lo publicado internacionalmente para este análisis y utilizando un programa desarrollado en el Centro de Neurociencias de Cuba [17]. Los pacientes con TEA secundario (TES-S) mostraron una disminución de la sincronización para la frecuencia alfa y un incremento para la frecuencia theta y delta, predominando la región frontocentral en comparación con los TEA primarios (TEA-P), en los que el hallazgo fue más manifiesto hacia la región centrotemporal (figura 2) (prueba de permutaciones  $p < 0,05$ ). Los análisis molecular, electrofisiológico y de conectividad funcional realizado en los TEA-P sin historia de epilepsia parecen sugerir un patrón inmunológico proinflamatorio con predominio proinflamatorio [12 y 13], en presencia de una AEI focalizada hacia la región frontal, y un patrón de conectividad funcional de incremento de las frecuencias theta y delta, predominante hacia la región centrotemporal en los TEA-P [13], una definición neurobiológica surgida de esta investigación.

### **Caracterización de los patrones de actividad epileptiforme interictal por las propiedades topológicas de la red en pacientes autistas**

El análisis teórico de grafos se realizó a partir de la matriz de sincronización de todas las posibles combinaciones entre los electrodos, por una programación implementada en Matlab R2008b. Los parámetros que se evaluaron fueron el coeficiente de clusterización, la longitud del camino medio, la eficiencia local, la eficiencia global y la conectividad global [13,17]. Las propiedades topológicas de la red para todas las bandas de frecuencia en función de la presencia o ausencia de AEI para ambos grupos de autismo mostró una mayor eficiencia local alfa en los pacientes con AEI en comparación con aquellos en los que no fue detectable este hallazgo ( $p = 0,03$ , prueba t Student para muestras independientes) [13].

El análisis de correlación entre la frecuencia de descarga de la AEI (FD-AEI) y las propiedades topológicas de la red de clusterización, la conectividad global y la eficiencia local alfa, así como la conectividad global beta en los pacientes con TEA-S mostró una significación estadística positiva y negativa para la eficiencia global y longitud del camino alfa y beta (prueba de correlación de Spearman  $p = 0,05$ ) [13,18,19].



**Fig. 2.** Conexiones significativas en TEA-P y secundario TEA-S en las frecuencias alfa, theta y delta (prueba de permutaciones,  $p < 0,05$ ). Aumento de las conexiones entre los pares de electrodos para los grupos de TEA-S y TEA-P con disminución de la sincronización para la frecuencia alfa en TEA-S e incremento para las frecuencias theta y delta con predominancia en región frontocentral comparado con los TEA-P, donde predominó la región centrotemporal.

## Consideraciones finales

Se caracterizaron biomarcadores para la identificación prodrómica de la epileptogenicidad y los trastornos del sueño en el autismo, dados por patrones moleculares y electroencefalográficos con acercamiento topológico a las redes de conectividad funcional y focalización de la AEI y sus determinantes asociados. Se describen por primera vez herramientas que brindan información neurobiológica para la identificación temprana de riesgo de progresión en el autismo [12, 13, 18, 19] y se definen además patrones relacionados con la integri-

dad y la segregación de las redes funcionales derivadas del EEG durante el sueño no REM para los subtipos de autismo primario y secundario. Se exponen además los patrones de AEI relacionados con la conectividad local y global para las bandas de frecuencia alfa y beta en estos pacientes, desde la exploración de las propiedades intrínsecas de la red.

Estos resultados fueron publicados en revistas internacionales de alto impacto: 3 artículos originales y 4 capítulos de un libro publicado por la Editorial Springer, para un total de 7 citas en los últimos 4 años. Se defendieron dos tesis de especialistas en Inmunología y Neurofisiología Clínica (2016), se obtuvieron dos Resultados Científicos Relevantes (CIREN 2015 y 2016), dos Premios del concurso Premio Anual de Salud (2017 y 2018), un Premio Anual de la Sociedad Cubana de Inmunología (2017) y un Premio Internacional de Neurología "Rafael Estrada 2017", así como dos Certificaciones de Aportes Científicos de los Resultados (2016 y 2018). Todos en conjunto revelan el impacto científico y social de esta propuesta.

## Referencias bibliográficas

1. Garay, P.A.; McAllister, A.K. Novel roles for immune molecules in neural development: Implications for neurodevelopmental disorders. *Front. Synaptic. Neurosci.* 2010, 2, 136.
2. González-Fraguela, ME, Diaz Hung, Mei-Li, Vera H, Maragoto C, Noris E, Blanco L, Galvizu R and Robinson MA. Oxidative Stress Markers in Children with Autism Spectrum Disorders. *British Journal of Medicine & Medical Res*, 2013, 3: 307-317.
3. Careaga, M.; Ashwood, P. Autism spectrum disorders: From immunity to behavior. *Methods Mol. Biol.* 2012, 934, 219-240.
4. Amaicha Mara Depino, A; Robinson Agramonte, MA. Understanding on Neuroimmunology in Autism Spectrum Disorder. In: Robinson Agramonte MA, ed. *Translational Approaches to Autism Spectrum Disorder*. Heidelberg: Springer; 2015. p. 155-180.
5. Tuchman, R.; Hirtz, D.; Mamounas, L.A. NINDS epilepsy and autism spectrum disorders workshop report. *Neurology* 2013, 81, 1630-1636.
6. Tuchman, R. Autism and social cognition in epilepsy: Implications for comprehensive epilepsy care. *Curr. Opin. Neurol.* 2013, 26, 214-218.
7. Tuchman, R.; Alessandri, M.; Cuccaro, M. Autism spectrum disorders and epilepsy: Moving towards a comprehensive approach to treatment. *Brain Dev.* 2010, 32, 719-730.
8. Robinson Agramonte, MA; González Fraguera, ME; Bergado Rosado, ME. Autism, Development and Neural Plasticity. In: Robinson Agramonte MA, ed. *Translational Approaches to Autism Spectrum Disorder*. Heidelberg: Springer; 2015. p. 119-135.
9. McKnight, W.; Shafer, E.; Wray, C. New autism spectrum criteria proposed: Some who qualify for diagnosis might not after 2013. *Pediatr. Ann.* 2012, 41, 89.
10. Battle, D.E. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM). *Codas* 2013, 25, 191-192.
11. Beighley, J.S.; Matson, J.L.; Rieske, R.D.; Jang, J.; Cervantes, P.E.; Goldin, R.L. Comparing challenging behavior in children diagno-

- sed with autism spectrum disorders according to the DSM-IV-TR and the proposed DSM-5. *Dev. Neurorehabil.* 2013, 16, 375–381.
12. Robinson Agramonte MA, et al. A Peripheral Inflammatory Markers Contributing to Comorbidities in Autism. *Behav. Sci.* 2016, 6, 29-42.
  13. Berrillo-Batista Sheila, Morales-Chacón Lilia M., Báez-Martín Margarita M., Gómez-Fernández Lázaro, Vera-Cuesta Héctor, Maragoto-Rizo Carlos, Sánchez-Coronaux Abel, Pérez Laura. Conectividad funcional derivada del electroencefalograma durante el sueño no REM en los trastornos del espectro autista. *Rev Neurol* 2018; 67: 41-49.
  14. Lyakh Lyudmila, Trinchieri Giorgio, Provezza Lisa, Carra, Giuseppe and Gerosa Franca. Regulation of interleukin-12/interleukin-23 production and the Thelper 17 response in humans. *Immunol Rev.* 2008 December ; 226: 112-131.
  15. Matsuda, T and T Kishimoto. *Encyclopedia of Immunology (Second Edition)* 1998.
  16. Biomarkers in Burn patients care. Amines ELayadi, Gleslec, Finnerly: In *Total Burn Care (Fifty Edition)* 2018.
  17. Herrera-Díaz A, Mendoza-Quifones R, Melie-García L, Martínez-Montes E, Sanabria-Díaz G, Romero-Quintana Y, et al. Functional connectivity and quantitative EEG in women with alcohol use disorders: a resting-state study. *Brain Topogr* 2016; 29: 368-81.
  18. Morales Chacón LM and Baez Martin Margarita M. Autism Spectrum Disorders: A Clinical neurophysiology Approach I. In: Robinson Agramonte MA, ed. *Translational Approaches to Autism Spectrum Disorder*. Heidelberg: Springer; 2015. p. 65-84.
  19. Baez Martin Margarita M and Morales Chacón LM. Autism Spectrum Disorders: A Clinical neurophysiology Approach II. In: Robinson Agramonte MA, ed. *Translational Approaches to Autism Spectrum Disorder*. Heidelberg: Springer; 2015. p. 85-94.

#### AUTOR PARA LA CORRESPONDENCIA

**Dr. C. María Robinson Agramonte.** Edificio 104, e/n 31 y 35. Apto E-6. Reparto La Coronela. La Lisa. La Habana. CP 10600. Correo electrónico: [maria.robinson@infomed.sld.cu](mailto:maria.robinson@infomed.sld.cu) y [neuroinmunologia@infomed.sld.cu](mailto:neuroinmunologia@infomed.sld.cu)