

---

---

## **Infecciones por HSV-2 y su relación con anticuerpos antiencéfalo de rata en suero de pacientes con autismo.**

Marylú Mora<sup>1</sup>, Luis Quintero<sup>2</sup>, Ricardo Cardenas<sup>2</sup>, Heberto Suárez-Roca<sup>2</sup>, María Zavala<sup>3</sup> y Nola Montiel<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias,

<sup>2</sup>Sección de Neurofarmacología y Neurociencias, Instituto de Investigaciones Clínicas, Facultad de Medicina, <sup>3</sup>Hospital Psiquiátrico de Maracaibo, Post-grado de Psiquiatría, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia. Maracaibo Venezuela.

**Palabras clave:** Autoinmunidad, autismo, virus neurotrópicos.

**Resumen.** Algunos casos de autismo podrían estar vinculados a infecciones virales capaces de inducir mecanismos autoinmunes dirigidos contra el encéfalo. Las infecciones de virus neurotrópicos en animales se acompañan de síntomas similares a los observados en los trastornos del neurodesarrollo. Así, en este estudio evaluamos la co-existencia de anticuerpos contra tejido nervioso y contra virus con capacidad neurotrópica [HSV-1/2, Epstein-Barr (EBV), citomegalovirus, sarampión y rubéola] en el suero de cuarenta niños autistas y cuarenta niños sanos. La presencia de anticuerpos contra tejido nervioso se detectó en cortes de tejido encefálico de rata mediante inmunofluorescencia indirecta. Los niveles de anticuerpos IgG e IgM anti-virales se midieron por ELISA indirecta. La proporción de autistas con anticuerpos IgG anti-encéfalo (77% anti-amígdala, 70% anti-núcleo caudado, 47,5% anti-cerebelo y anti-tallo cerebral, 45% anti-hipocampo, 40% anti-cuerpo calloso y 17,5% anti-corteza) fue significativamente mayor que aquella de los controles (10% anti-amígdala y 5% anti-cerebelo) y se relacionó directamente con la severidad del autismo. La proporción de niños con niveles positivos (mayores a 1,1 mg/dL) para anticuerpos IgM anti-HSV (indicativo de infección aguda) fue significativamente mayor en autistas (65%) que en sanos (17,5%). El 96% de los autistas con anticuerpos anti-HSV también presentó anticuerpos anti-encéfalo, porcentaje que fue significativamente mayor que el de los autistas negativos al anticuerpo anti-HSV (43%). En contraste, no hubo diferencias significativas para los anticuerpos IgG e IgM para EBV, citomegalovirus, sarampión y rubéola. Esto sugiere que una autoinmunidad contra estructuras encefálicas desencadenada por infecciones por HSV podría estar involucrada en el autismo.

## **Association between HSV-2 infection and serum anti-rat brain antibodies in patients with autism.**

*Invest Clin 2009; 50(3): 315 - 326*

**Key words:** Autoimmunity, autism, neurotrophic virus.

**Abstract.** Some cases of autism could be linked to viral infections able to induce autoimmune mechanisms directed against the encephalon. Neurotrophic virus infections in animals are associated with clinical signs that are similar to those observed in neurodevelopment disorders. Thus, in this study, we determined the co-existence of antibodies against nerve tissue and viruses with neurotrophic competence (HSV-1/2, Epstein-Barr-EBV, cytomegalovirus, measles and rubella) in serum of forty autistic children and forty healthy children. The presence of antibodies against nerve tissue was detected in slices of rat encephalic tissue by indirect immunofluorescence. The levels of anti-viral IgG and IgM antibodies were measured by indirect ELISA. The proportion of autistics with anti-encephalon IgG antibodies (77% anti-amygdala, 70% anti-caudate nucleus, 47.5% anti-cerebellum y anti-brain stem, 45% anti-hippocampus, 40% anti-corpus callosum and 17,5% anti-cortex) was significantly greater than that of controls (10% anti-amygdala y 5% anti-cerebellum) and was directly related to the severity of the autism. The proportion of children with positive levels (greater than 1.1.mg/dL) for anti-HSV IgM antibodies (indicative of acute infection) was significantly greater in autistics (65%) than in healthy children (17.5%). Ninety six percent of the autistics with anti-HSV antibodies also had anti-encephalon antibodies, percentage that was significantly greater than that of autistics negative to the anti-HSV-antibody (43%). In contrast, there were no significant differences for IgG and IgM antibodies for EBV, cytomegalovirus, measles and rubella. This suggests that autoimmunity against encephalic structures elicited by HSV infections could be involved in autism.

*Recibido: 25-02-2008. Aceptado: 15-01-2009.*

### **INTRODUCCIÓN**

Los trastornos del espectro autista se clasifican según el Manual de Diagnóstico y Estadística de los Trastornos Mentales de la Asociación Psiquiátrica Americana (Texto Revisado), (DSM-IV-TR) (1), como parte de los Trastornos Generalizados del Desarrollo, caracterizados por una perturbación severa en la interacción social, habilidades comunicativas, o por la presencia de conductas, intereses y actividades estereotipadas,

usualmente haciéndose obvios durante los primeros años de vida, pudiendo estar relacionados con retardo mental.

Actualmente, numerosas teorías han sido propuestas para intentar explicar el autismo (2). Por ejemplo, se han propuesto teorías psicológicas con base en ciertos fenómenos descritos en años recientes, como la “teoría de la mente aberrante”, la coherencia mental débil y la disfunción cognitiva (3). Sin embargo, el autismo es considerado hoy en día como una entidad multifac-

torial, con numerosos subtipos clínicos cuya etiología podría explicarse en base a procesos autoinmunitarios (4). La teoría autoinmune incluye mecanismos tales como, mimetismo molecular inducido por infecciones virales, permeabilidad intestinal alterada asociada a un déficit en el metabolismo del gluten y la caseína en la dieta, y alteraciones en factores genéticos que controlan el neurodesarrollo (5, 6), los cuales podrían estar involucrados en la etiología de los trastornos del espectro autista.

Numerosos estudios apoyan ésta teoría. Singh y col. (5) reportaron la presencia de anticuerpos contra la proteína básica de la mielina (PBM) en 58% de niños autistas y concluyeron que podría existir una relación directa entre anticuerpos anti-PBM y el desarrollo de conducta autista. Montiel (6) evaluó la presencia de anticuerpos contra núcleo, mitocondria, ADN y músculo liso, utilizando la inmunofluorescencia indirecta (IFI) en el suero de 35 niños autistas, 27 niños con retardo mental y 27 niños sanos, y encontró presencia de dichos anticuerpos en 37,5% de los niños con autismo, lo cual estaba directamente relacionado con la severidad clínica de la enfermedad, especialmente la presencia concomitante de retardo mental. Singh y Rivas (7), encontraron anticuerpos contra el núcleo caudado, corteza cerebral, cerebelo, en el 49%, 18% y 9% de los niños autistas, respectivamente. Estos autores proponen que una reactividad autoinmunitaria en regiones específicas del cerebro puede causar el deterioro neurológico y psicológico en los niños autistas. Silva y col. (8) evidenciaron autorreactividad contra el tejido cerebral en pacientes con autismo; dicha respuesta podría representar un efecto protector del sistema inmunitario ante una lesión cerebral ocurrida durante el neurodesarrollo. Vargas y col. (9) demostraron un proceso inflamatorio activo, con marcada activación de microglia, astrogliosis y citocinas proinflamatorias, en la

corteza cerebral, la sustancia blanca y notablemente en el cerebelo de pacientes con autismo. Cabanlit (10) encontró reactividad contra tres proteínas cerebrales en 37% de niños con autismo, en particular en el hipotálamo, al comparar con 13% del grupo control; la inmunoglobulina involucrada en dicha reactividad fue la IgG. Zimmerman y col. (11) identificaron anticuerpos específicos en el suero de madres de niños con autismo que reconocen antígenos cerebrales expresados prenatalmente, sugiriendo que estos autoanticuerpos pudieran atravesar la placenta y alterar el desarrollo fetal del cerebro.

Singh (12) determinó en niños con autismo la co-existencia de anticuerpos séricos contra los virus del sarampión, parotiditis y el herpes simple tipo 6 (HSV-6), anticuerpos contra las proteínas encefálicas PBM y filamento neuro-axil (NAFP). Estos hallazgos refuerzan la hipótesis según la cual una respuesta autoinmunitaria contra el tejido cerebral, inducida por una infección viral, es un factor causal potencial en el autismo. Montiel (13) encontró títulos elevados de IgG, IgM y C3 en niños con autismo, sugiriendo que la activación de una respuesta inmunitaria por estimulación antigénica autóloga o exógena constante podría influir sobre los niveles de anticuerpos y sobre la severidad clínica de la enfermedad. Kawashti y col. (14) encontraron niveles elevados de anticuerpos contra la proteína del gluten y la caseína en 50% y 83% niños con autismo, respectivamente, mientras que observaron una baja respuesta de anticuerpos contra otros virus tales como sarampión, parotiditis y rubéola.

Estudios en animales de experimentación han permitido observar que infecciones cerebrales por virus neurotrópicos se acompañan de síntomas neurológicos y cognitivos equivalentes a los observados en los trastornos del neurodesarrollo en humanos. Por ejemplo, Beers y col. (15), usando téc-

nicas de hibridación *in situ*, detectaron ácido nucléico de HSV-1 en los núcleos de neuronas dentro del hipocampo y la corteza entorhinal de ratas con déficit en las pruebas de memoria y aprendizaje, aun en ausencia de cambios histopatológicos o inmunocitoquímicos que revelen antecedentes de infección encefálica viral. La infección en periodo neonatal de ratas con el virus de la enfermedad de Borna (BDV) conduce a la muerte neuronal en el hipocampo, el cerebelo y la neocorteza y un síndrome conductual parecido al autismo (16). Estas anomalías parecen correlacionarse con alteraciones principales en la expresión de citocinas en varias regiones cerebrales, indicando que, juegan un papel como mediadores de lesión en el sistema nervioso central en este modelo (17, 18). Ratones infectados con el virus influenza a mediados de la gestación presentan anomalías neuropatológicas conductuales en los descendientes, que son compatibles con las observadas en el autismo (19).

Como toda esta evidencia apoya que el autismo podría estar relacionado con mecanismos autoinmunitarios desencadenados por virus neurotrópicos y, puesto que existe una alta prevalencia de anticuerpos contra los virus neurotrópicos (33% para HSV 1/2 y 15% para EBV) en nuestra población general (20), el propósito de este estudio fue determinar la presencia de anticuerpos séricos contra diferentes estructuras del cerebro de rata en niños con autismo, y su relación con la co-existencia de anticuerpos contra los virus neurotrópicos HSV-1/2, EBV y citomegalovirus, así como, contra otros virus no relacionados como el del sarampión y rubéola.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Población de estudio

En el estudio participaron cuarenta niños autistas de centros de atención especializada, Centro de Atención Integral Para

Autistas del Zulia (CAIPA-Zulia), Fundación Peter Alexander para Atención de Niños y Adolescentes con Autismo del Zulia (FUPANAZ) y de la Asociación Zuliana para Atención de Niños Excepcionales (AZUPANE) en Maracaibo, Venezuela y cuarenta niños sanos del Servicio de Pediatría del Instituto de Previsión y Asistencia Social del Ministerio del Poder Popular para la Educación (IPASME). Se hizo el diagnóstico de autismo de acuerdo a los criterios del Manual de Diagnóstico y Estadística de los Trastornos Mentales de la Asociación Psiquiátrica Americana (Texto Revisado), (DSM-IV-TR) (1), para los Trastornos del Espectro Autista (1). Veintiséis de los 40 niños con autismo eran varones, y 14 hembras; 23 de los niños control eran varones, y 17 hembras. La edad promedio de los niños con autismo fue de  $11,9 \pm 5,56$  años, mientras que la edad promedio para los niños sanos fue de  $10,7 \pm 3,87$  años. De los 40 niños con autismo, 6 habían sido previamente diagnosticados con autismo leve; 18 con autismo moderado y 16 con autismo severo. Los criterios de inclusión en el estudio fueron: ayuno mínimo de 8 horas antes de la toma de la muestra, no presentar síntomas aparentes de infección aguda viral al momento de tomar la muestra y haber sido inmunizados con la vacuna triple viral. Se excluyeron del estudio aquellos niños con trastorno neurológico aparente o con alguna patología adicional que a juicio de los investigadores pudiera confundir la interpretación de los datos. Se obtuvo consentimiento escrito de los padres de los niños luego de una explicación detallada del protocolo de estudio y de su propósito. Se extrajeron 5 mL de sangre periférica mediante punción venosa a nivel del antebrazo. El suero obtenido luego de la remoción del coágulo se distribuyó en alícuotas viales de 1,5 mL y se congeló a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento. El aspecto bioético de este estudio fue aprobado por el Comité Técnico

Institucional de la Facultad de Ciencias, Universidad del Zulia.

### Preparación de tejido de rata

Ratas macho Sprague-Dawley fueron previamente anestesiadas por vía intraperitoneal con ketamina (75 mg/kg) y xylazina (10 mg/kg), y luego perfundidas con tampón fosfato salino, pH 7,4, y finalmente se extrajeron cerebro, cerebelo y tallo cerebral, utilizando un atlas de anatomía del encéfalo de rata como guía (21). Las estructuras nerviosas fueron entonces congeladas en nitrógeno líquido, fijadas en Tissuetek® (EMS, USA) y cortadas a un grosor de 4 µm en secciones coronales para cerebro y longitudinales para cerebelo y tallo cerebral, utilizando un criostato motorizado (Shandon, USA). Posteriormente, cada sección fue colocada individualmente en una lámina portaobjetos y secada durante 30 minutos, fijada con acetona durante 10 minutos a temperatura ambiente, y almacenada a -20°C. Como controles positivos y para probar la condición del anticuerpo secundario se añadieron anticuerpos secundarios marcados con isotiocianato de fluoresceína (FITC) a cortes de tejido renal de rata y a láminas de *Crithidia luciliae* (Kallestad, USA), que habían sido previamente enfrentados al suero de un paciente con diagnóstico establecido de lupus eritematoso sistémico, positivo para anticuerpos antinucleares y anti-ADN. Cuatro anticuerpos secundarios conjugados con FITC (fragmentos de F(ab')<sub>2</sub>) fueron usados para identificar el isotipo de inmunoglobulina contra cerebro predominante: anti-IgA+IgM+IgG (H+L), anti-IgA, anti-IgM, y anti-IgG (ImmunoPure®, USA).

### Detección de anticuerpos contra tejido cerebral de rata en suero

Se utilizó inmunofluorescencia indirecta (IFI) para determinar la presencia de anticuerpos contra tejido de rata (22). Láminas con cortes de tejido congelado se se-

caron y fijaron nuevamente en acetona durante 12 minutos a temperatura ambiente. Luego fueron secadas y lavadas con solución tampón fosfato-salino 3 veces durante 3 minutos cada vez. Muestras de 50 µL de suero tomadas de pacientes ó controles (dilución 1:20) se añadieron a cada lámina de tejido cerebral. Las láminas se incubaron a temperatura ambiente durante 35 minutos y fueron lavadas con solución tampón fosfato-salino. Un volumen de 50 µL de anticuerpos anti-IgG conjugados con FITC (dilución 1:25) se añadió a las láminas, se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente y se lavaron con solución tampón fosfato-salino nuevamente 3 veces durante 3 minutos cada vez. Los bordes de las láminas se secaron con papel absorbente y se le añadió glicerina al 25% en solución tampón fosfato-salino para el montaje. Las láminas fueron luego observadas al microscopio de fluorescencia (Axioskop 2 Plus, Zeiss®, Alemania).

### Adsorción del suero

Para eliminar la presencia de anticuerpos no específicos contra tejido nervioso que podrían mostrar reacción cruzada, las muestras de suero fueron preadsorbidas con tejido de riñón de rata (23). El tejido fresco extraído del riñón de rata fue colocado en una cápsula de Petri, decapsulado, inyectado con solución tampón fosfato-salino frío y disgregado mecánicamente mediante agitación de la masa principal de células, con ayuda de pinza de disección. Posteriormente, las células disgregadas y restos de tejido fueron pasados a través de un filtro de separación celular (Falcone, USA), y lavada en tampón fosfato-salino. Las células así obtenidas fueron lavadas 3 veces en tampón fosfato-salino por centrifugación a 1200 rpm (Sorvall RT7 Microcentrifuge, USA) durante 5 minutos cada vez. Luego de ello, las células fueron resuspendidas en un volumen adecuado para obtener 1×10<sup>6</sup> células /mL. Un volumen de 100 µL de esta

suspensión celular y 100  $\mu$ L de suero de los pacientes se incubaron durante una hora a 37°C bajo agitación suave. La solución se centrifugó luego a 1200 rpm (Sorvall RT7 Microcentrifuge, USA) durante 10 minutos para eliminar las células que fijaron anticuerpos. El sobrenadante que contiene los anticuerpos que no se fijaron a las células renales se expuso nuevamente a los cortes de tejido encefálico (24).

#### **Detección de anticuerpos contra virus neurotróficos**

Se determinó la concentración de anticuerpos IgM e IgG contra sarampión (Cat No.338), rubéola (Cat No. No. 655 and 656), citomegalovirus (Cat. No. 504 and 694), herpes simple (Cat. No. 335) y Epstein-Barr (cat. No. 337), (ELISA Bioline Diagnostic, USA). Las unidades de medida correspondían a mg/dL, y se consideraban negativos para estos virus, valores por debajo de 0,9, valores límite entre 0,9-1,1 y valores positivos para infección por encima de 1,1.

#### **Análisis estadístico**

El análisis estadístico de los datos obtenidos se llevó a cabo utilizando el programa SPSS versión 10.0 para Windows. El test exacto de Fisher se utilizó para determinar diferencias estadísticas en las tablas de contingencia con variables dicotómicas (presencia o ausencia de anticuerpos contra tejido cerebral o contra virus neurotróficos). Se estableció la significancia estadística en  $p < 0,05$  (25).

## **RESULTADOS**

#### **Detección de anticuerpos contra tejido encefálico en el suero de niños con autismo a través de inmunofluorescencia indirecta**

En la Fig. 1 se observan varias estructuras encefálicas que muestran reactividad al ser expuestas a suero de niños con autis-

mo, luego de la adsorción del suero con tejido renal. En la Tabla I se observa que la amígdala es la zona del encéfalo contra la cual estaban dirigidos con mayor frecuencia (77% del total) los anticuerpos de los niños con autismo, siendo este porcentaje significativamente más alto que aquel observado en niños controles (10% del total) ( $p < 0,05$ ). La reactividad contra el núcleo caudado fue también muy alta, observándose en el 70% de la población con autismo, mientras que no se observó en el grupo control. En el cerebelo y tallo cerebral, se observó reactividad en 47,5% de los niños con autismo, un porcentaje que fue significativamente más alto que aquella detectada para los controles (5% para cerebelo y 0% para tallo cerebral) ( $p < 0,05$ ). A nivel del hipocampo, cuerpo calloso y corteza cerebral fue observada en el 45%, 40% y 17,5% de los casos en estudio, respectivamente, pero no se detectó ninguna reactividad contra estas regiones en los niños controles.

En la Tabla II se observa que de los 40 pacientes con autismo, 31 (77,5%) presentaron anticuerpos de tipo IgG dirigidos contra al menos alguna región del encéfalo de rata, a diferencia de los controles donde sólo 6 (15%) presentaron reactividad. La prueba exacta de Fisher reveló que la presencia de estos anticuerpos IgG contra cualquier región del encéfalo de rata se relacionaba directa y significativamente con la severidad del cuadro clínico de los pacientes con autismo ( $p < 0,001$ ); sólo el 50% de los 6 niños con autismo leve presentaron anticuerpos contra tejido encefálico de rata mientras que 77,5% de los 18 niños con autismo moderado y 88% de los 16 niños con autismo severo presentaron anticuerpos contra tejido encefálico de rata (Fig. 2).

#### **Presencia de anticuerpos contra virus neurotróficos en niños con autismo**

La prueba exacta de Fisher reveló que niveles de anticuerpos IgM anti HSV-2 ma-

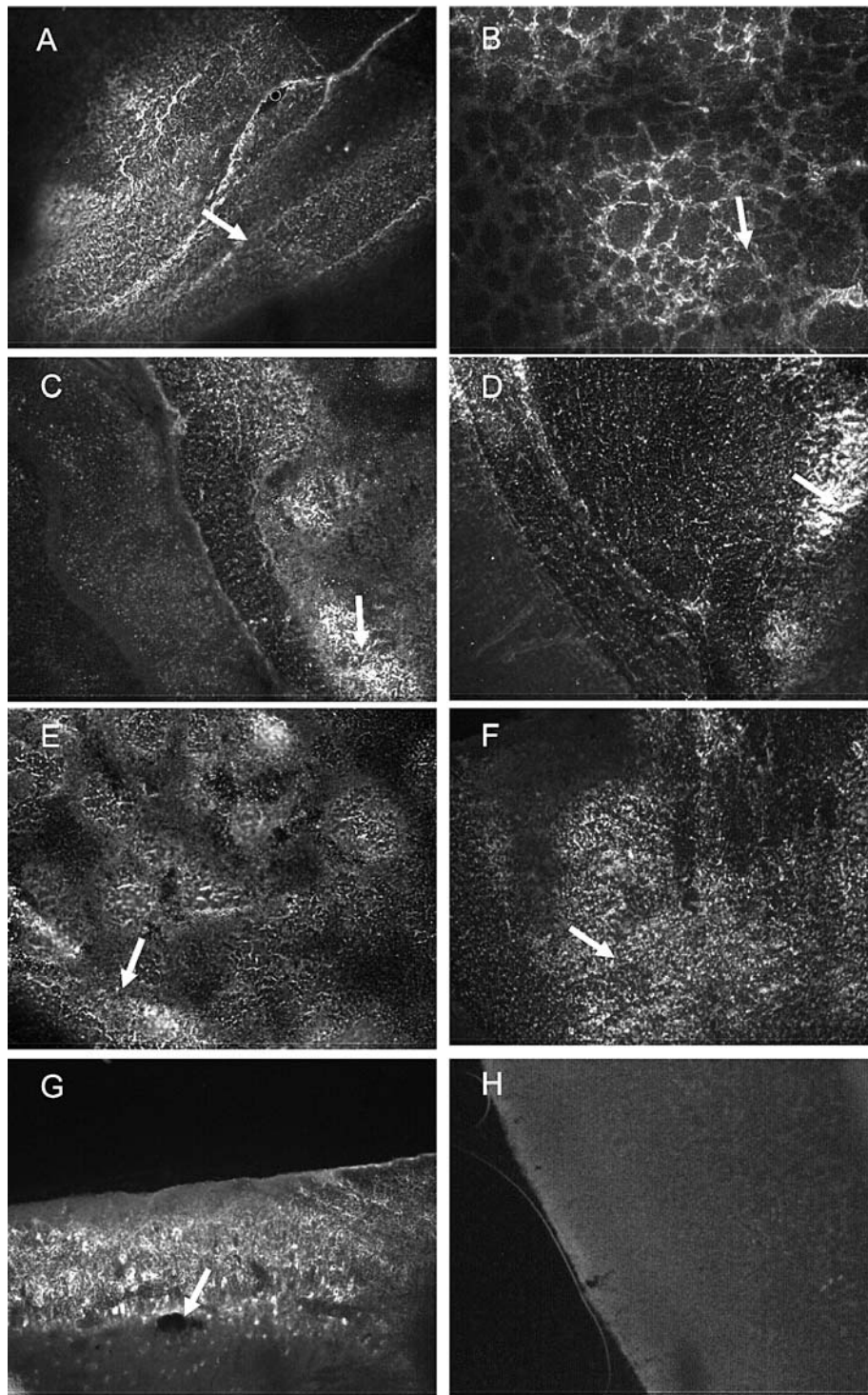


Fig. 1. Microfotografía que demuestra la distribución de los anticuerpos contra las diferentes zonas del encéfalo utilizando la técnica de IFI. La flecha señala la estructura: A: Amígdala reactiva. B: Hipocampo reactiva. C: Cuerpo calloso reactiva. D: Corteza cerebral reactiva. E: Núcleo caudado reactiva. F: Cerebelo reactiva. G: Tallo cerebral reactiva. H: corteza cerebral no reactiva. Magnificación: 10X.

**TABLA I**  
PRESENCIA DE ANTICUERPOS CONTRA  
DIFERENTES ÁREAS DEL ENCÉFALO DE RATA  
EN NIÑOS CON AUTISMO

Región cerebral	Niños con autismo n=40	Controles n=40
Amígdala	31	4
Núcleo caudado	28	0
Cerebelo	19	2
Tallo cerebral	19	0
Hipocampo	18	0
Cuerpo caloso	16	0
Corteza cerebral	7	0

**TABLA II**  
PRESENCIA DE ANTICUERPOS CONTRA  
TEJIDO ENCEFÁLICO DE RATA EN NIÑOS  
CON AUTISMO

Presencia de anticuerpos contra tejido encefálico	Autistas (n=40)	Controles (n=40)
Positivo	31 (77,5%)*	6 (15%)
Negativo	9 (22,5%)	34 (85%)

\* Prueba exacta de Fisher:  $p < 0,0001$ .

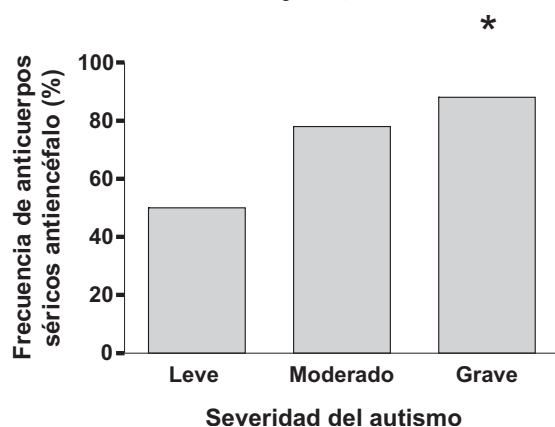


Fig. 2. Asociación entre el grado de severidad del autismo y la frecuencia de anticuerpos séricos anti-encéfalo de rata. Número de pacientes según severidad del autismo: leve = 6, moderada = 18 y grave = 16. \* Diferencia significativa respecto a autismo leve (Prueba exacta de Fisher:  $p < 0,05$ ).

yores de 1,1 mg/dL (indicativo de infección aguda) fueron significativamente más frecuentes en niños con autismo (65%) que en niños sanos (17,5%) ( $p < 0,0001$ ; Tabla III). La proporción de casos positivos para anticuerpos IgG contra EBV y citomegalovirus no fue estadísticamente diferente entre autistas (75% y 50%, respectivamente) y controles (67,5% y 55%, respectivamente). No hubo niveles positivos para infección viral en relación a los anticuerpos IgM o IgG contra sarampión y rubéola ni anticuerpos IgM para EBV y citomegalovirus.

#### Co-existencia de anticuerpos contra virus neurotrópicos y tejido encefálico en niños autistas

El 96% de los niños con autismo que presentaron niveles positivos para anticuerpos IgM contra el HSV-2 también presentaron anticuerpos contra tejido encefálico, lo cual fue significativamente mayor ( $p=0,0003$ ) que en los autistas con niveles negativos de este anticuerpo anti-viral (43%) (Tabla IV). Por el contrario, no hubo diferencias entre la presencia de anticuerpos anti-encéfalo en los niños con autismo positivos para anticuerpos IgG anti-EBV (77%) y aquellos negativos para este anticuerpo antiviral (80%).

#### DISCUSIÓN

A pesar de que el autismo no es considerado como parte de los trastornos autoinmunitarios, nuestros resultados evidencian una alta reactividad del suero de los niños autistas contra diferentes estructuras cerebrales, en contraste con la inmunorreactividad casi inexistente del suero de los niños sanos (Tabla I); del mismo modo, encontramos una relación significativa entre la severidad del autismo y la presencia de anticuerpos contra tejido encefálico de rata (Fig. 2). Nuestros hallazgos están en con-



**TABLA III**  
 FRECUENCIA DE ANTICUERPOS IgM  
 ANTI- HSV-2 EN NIÑOS CON AUTISMO

Grupo	IgM anti HSV-2	
	Positivo	Negativo
Autistas	26*	14
Controles	7*	33

**TABLA IV**  
 CO-EXISTENCIA DE ANTICUERPOS CONTRA  
 TEJIDO ENCEFÁLICO Y ANTICUERPOS IgM  
 CONTRA HSV-2 EN NIÑOS AUTISTAS

IgM Anti-HSV-2	Anticuerpos anti-encéfalo	
	Positivo	Negativo
Positivo	25*	1
Negativo	6	8

Diferencia significativa respecto a los autistas que no presentan ambos anticuerpos. Prueba exacta de Fisher:  $p=0,0003$ .

cordancia con estudios previos que aportan evidencia de un componente autoinmunitario en el autismo (5-14). El suero de niños con autismo mostró reactividad contra amígdala, núcleo caudado, hipocampo, cerebelo, tallo cerebral, cuerpo caloso y corteza cerebral. Estos resultados están en concordancia con estudios previos que han reportado inmunorreactividad aumentada contra el núcleo caudado, como el de Singh y Rivas (7) y Silva y col. (8), quienes estudiaron suero de niños con autismo y demostraron reactividad contra extractos de algunas estructuras encefálicas, a través de la técnica de inmunoblot. La reactividad contra cuerpo caloso pudiera estar relacionada con los hallazgos de otros investigadores como Egaas y col. (26), quienes, utilizando técnicas de neuroimágenes, observaron pérdida en el volumen celular de la mitad posterior de dicha estructura, que interconecta los hemisferios cerebrales entre sí. Lesiones en esta área causan alteraciones menta-

les, falta de coherencia en las ideas, conducta aberrante, trastornos de la memoria, el movimiento y apraxia, las cuales son observadas en el autismo. Por otra parte, otros estudios han encontrado reactividad contra antígenos cerebrales en el suero de madres de niños con autismo, sugiriendo que dichos anticuerpos pueden atravesar la placenta y alterar el desarrollo fetal del cerebro (11).

Por otro lado, la inmunoreactividad contra la amígdala y el hipocampo pudiera estar relacionada con hallazgos de estudios de resonancia magnética que demuestran que los niños con autismo presentan cambios neuropatológicos significativos en el hipocampo y la amígdala, consistentes en un menor tamaño neuronal, aumento del empaquetamiento y de la densidad celular de dichas zonas. Estas áreas están conectadas unas a otras por circuitos de interconexión y representan una porción del sistema límbico, el cual participa en el control y la expresión del estado anímico, las emociones, el procesamiento y almacenamiento de la memoria reciente, el control del apetito y de las respuestas emocionales a la comida; todas estas funciones se encuentran alteradas en los niños con autismo (27, 28). Sin embargo, nuestros resultados contrastan con los resultados de Singh y Rivas (9), donde no se observó inmunorreactividad contra hipocampo y los de Cabanlit y col. (10), quienes encontraron reactividad contra tres proteínas del hipotálamo en 37% de los niños autistas estudiados. Esta discrepancia pudiera estar relacionada con diferencias metodológicas dado que dichos estudios analizaron los sueros con electroinmunotransferencia, mientras que nosotros utilizamos inmunofluorescencia indirecta, técnicas con diferencias en sensibilidad de la detección (29).

En cuanto a los virus neurotrópicos encontramos una alta frecuencia de niveles elevados de anticuerpos IgM contra el

HSV-2, lo cual es similar a los resultados obtenidos por Singh y Rivas (7), quienes demostraron presencia de anticuerpos contra el HSV-6. En contraste con nuestros resultados, algunos estudios han encontrado niveles significativamente mayores de anticuerpos contra el virus del sarampión, parotiditis y rubéola en los niños con autismo con respecto a los controles, a pesar de usar técnicas ELISA similares a las usadas en el presente estudio (12, 30). Esta discrepancia pudiera estar relacionada con diferencias en la tasa de prevalencia o de riesgo de estas enfermedades virales entre las poblaciones infantiles estudiadas.

Se observó una relación estadísticamente significativa entre la frecuencia de niños con niveles de anticuerpos IgM contra HSV-2 mayores a 1,1 mg/dL (indicativo de infección aguda) y la presencia de anticuerpos contra tejido cerebral (Tabla IV). Estos resultados están en concordancia con los obtenidos por Singh y Rivas (7), quienes encontraron presencia de anticuerpos anti-PBM, anti-proteína del filamento neuro-axil y niveles de anticuerpos elevados para el HSV-6. Esta coexistencia de anticuerpos contra virus neurotrópicos y contra tejido encefálico podría ser el resultado de una respuesta autoinmunitaria debida a una reactividad cruzada iniciada por una reacción inflamatoria en respuesta a una infección viral encefálica que llega a exponer proteínas capaces de inducir la síntesis de anticuerpos contra estructuras cerebrales. Estos mecanismos eventualmente causarían las alteraciones morfológicas y funcionales observadas en el autismo. De hecho, existen estudios donde se ha evidenciado que la presencia de HSV-1, virus de la enfermedad Borna y virus influenza en neuronas de cerebro fetal de rata está asociado con un déficit en la memoria y el aprendizaje, así como alteraciones conductuales similares a las observadas en el autismo (16-19).

Estos resultados pueden contribuir a aclarar el papel de las infecciones virales en la etiología del autismo ya que si las mismas ocurren *in útero*, en neonatos, o durante la infancia temprana, los virus pueden alcanzar el encéfalo a través de las membranas nasofaríngeas, induciendo de este modo una respuesta auto-alérgica, alterando el neurodesarrollo (31). La comprensión de dichos mecanismos permitirá, en el futuro próximo, contribuir a un diagnóstico más temprano de la enfermedad y, eventualmente, a un tratamiento más precoz y eficaz, ofreciéndole a los pacientes y a su familia una mejor calidad de vida.

#### REFERENCIAS

1. **Valdez-Miya M.** Manual de diagnóstico y estadística de los trastornos mentales. Texto revisado de la Asociación Psiquiátrica Americana. Editores Lopez-Ibor Editorial Masson. 2002; p 79-96.
2. **DiCicco-Bloom E, Lord C, Zwaigenbaum L, Courchesne E, Dager SR, Schmitz C, Schultz RT, Crawley J, Young LJ.** The Developmental Neurobiology of Autism Spectrum Disorder. *J Neurosci* 2006; 26(26): 6897-6906.
3. **Joseph RM.** Neuropsychological Frameworks for Understanding Autism. *Int Rev Psychiatry* 1999; 11(4):309-324.
4. **Ashwood P, Wills S, Van de Water J.** The immune response in autism: a new frontier for autism research. *J Leukoc Biol* 2006; 80:1-15.
5. **Singh VK.** Antibodies to myelin basic protein in children with autistic behavior. *Brain Behav Immunity* 1993; 7(1): 97-103.
6. **Montiel N.** Detección de autoanticuerpos en autismo infantil. Parte I: Anticuerpos Antinucleares. Monografía. [Trabajo de Ascenso]. Maracaibo: Universidad del Zulia; 1997.
7. **Singh V, Rivas W.** Prevalence of serum antibodies to caudate nucleus in autistic children. *Neurosci Lett* 2003; 355:53-56.
8. **Silva SC, Correia C, Fesel C, Barreto M, Coutinho AM, Marques C, Miguel TS,**

- Ataide A, Bento C, Borges L, Oliveira G, Vicente AM. Autoantibody repertoires to brain tissue in autism nuclear families. *J Neuroimmunol* 2004; 152(1-2):176-82.
9. Vargas D, Nascimbene C, Krishnan C, Zimmerman A, Pardo C. Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism. *Ann Neurol* 2005; 57: 67-81.
  10. Cabanlit M, Wills S, Goines P, Ashwood P, Van de Water J. Brain-specific autoantibodies in the plasma of subjects with autistic spectrum disorder. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1107:92-103.
  11. Zimmerman A, Connors S, Matteson K, Lee L, Singer H, Castaneda J and Pearce D. Maternal antibrain antibodies in autism *Brain, Behav Immun* 2007; 21(3):351-357.
  12. Singh VK. Serological association of measles virus and human herpesvirus-6 with brain autoantibodies in autism. *Clin Immunol Immunopathol* 1998; 89(1):105-108.
  13. Montiel N. Alteración de los comportamientos humorales y linfocitarios de la respuesta inmunitaria en niños adolescentes con autismo. Monografía. [Trabajo de Ascenso]. Maracaibo: Universidad del Zulia; 2004.
  14. Kawashti MI, Amin OR, Rowehey NG. Possible immunological disorders in autism: concomitant autoimmunity and immune tolerance. *Egypt J Immunol* 2006; 13(1): 99-104.
  15. Beers D, Henkel J, Kesner R, Stroop W. Spatial recognition memory deficits without notable CNS pathology in rats following herpes simplex encephalitis. *J Neurol Sci* 1995; 131(2):119-127.
  16. Hornig M, Solbrig M, Horscroft N, Weissenbock H, Lipkin WI. Borna disease virus infection of adult and neonatal rats: models for neuropsychiatric disease *Curr Top Microbiol Immunol* 2001; 253:157-177.
  17. Plata-Salaman CR, Ilyin SE, Gayle D, Romanovitch A, Carbone KM. Persistent Borna disease virus infection of neonatal rats causes brain regional changes of mRNAs for cytokines, cytokine receptor components and neuropeptides *Brain Res Bull* 1999; 49; 441-451.
  18. Sauder C, de la Torre JC. Cytokine expression in the rat central nervous system following perinatal Borna disease virus infection. *J Neuroimmunol* 1999; 96:29-45.
  19. Shi L, Fatemi SH, Sidwell RW, Patterson PH. Maternal influenza infection causes marked behavioral and pharmacological changes in the offspring *J Neurosci* 2003; 23:297-302.
  20. Valero N, Henriquez R, Hernandez C, Pomeda O, Urdaneta F, Atencio R, Larreal Y, Espina L, Rodríguez Z. Agentes virales en pacientes con procesos infecciosos del Sistema Nervioso Central. *Invest Clin* 2001; 42(4):241-254.
  21. Pellegrino L, Pellegrino A, Cushman A. A Stereotaxic Atlas of the Rat Brain. 2ª. Edición. New York: Plenum Press; 1981, p 40-90.
  22. Cavallero JJ, Palmer DF, Bigazzi PE. Immunofluorescence detection of autoimmune diseases. *Immunology Seven N°7*. Centers for Disease Control. Atlanta C.A; 1976, p 12-18.
  23. Abumohor P. Interpretación del Laboratorio en Reumatología. *Reumatología* 2005; 21(4):201-205.
  24. Pons H. Manual de métodos inmunológicos, Maestría en Biología, Mención Inmunología, Facultad Experimental de Ciencias. Universidad del Zulia.
  25. Visauta B. Análisis estadístico con SPSS para Windows. Estadística Básica. Mc Graw Hill; 1998, p 88- 95.
  26. Egaas B, Courchesne E, Saitoh O. Reduced size of the corpus callosum in autism. *Arch Neurol* 1995; 52: 794-801.
  27. Aylward EH, Minshew NJ, Goldstein G, Honeycutt NA, Augustine AM, Yates KO. MRI volumes of amygdala and hippocampus in non-mentally retarded autistic adolescents and adults. *Neurology* 1999; 53:2145-2150.
  28. Bauman M, Kemper A. Microscopic neuroanatomic abnormalities in autism. *Pediatrics* 1991; 87: 791-795.
  29. Ramos-Vara JA, Kiupel M, Baszler T, Bliven L, Brodersen B, Chelack B, Czub S, Piero FD, Dial S, Ehrhart EJ, Graham T, Manning L, Paulsen D, Valli VE, West K. Suggested guidelines for immunohisto-

- 
- chemical techniques in veterinary diagnostic laboratories. *J Vet Diagn Invest* 2008; 20(4):393-413.
30. **Singh VK, Jensen R.** Elevated levels of measles antibodies in children with autism. *Pediatr Neurol* 2003; 28:128-133.
31. **Patterson PH.** Maternal infection: window on neuroimmune interactions in fetal brain development and mental illness. *Curr Opin Neurobiol* 2002; 12:115-118.