

## **Situación actual de los estudios de factores ambientales y autismo. Diseño del estudio realizado en España.**

P García Primo, MC Martín Arribas, M<sup>a</sup> J Ferrari, M Posada, E García de Andrés, J Hernández, A Martínez, M Herraez, L Herraez, M<sup>av</sup> Martín, Z Guisuraga, J Santos, C Domínguez, B Mongil, R Canal.

### **INTRODUCCIÓN**

Ya desde las primeras descripciones del trastorno autista, hechas en 1943 casi simultáneamente por L. Kanner, en EEUU y H. Asperger, en Austria, con desconocimiento recíproco de sus investigaciones, nace una polémica en la adjudicación causal de los síntomas de esta patología tan compleja.

En la actualidad la evidencia científica plantea una visión multifactorial compleja por interacción de diversos factores genéticos y ambientales, sin que todavía se conozca exactamente cuales son esos factores y cómo interactúan los posibles factores ambientales sobre la susceptibilidad genética.

Las causas de autismo conocidas son principalmente genéticas, el 10% de los niños diagnosticados de autismo tienen una etiología genética, neurológica, o debida una alteración metabólica. Menos de 1% es atribuible a teratógenos (Ac. valproico, talidomida). Queda un 90% de los niños cuya causa es idiopática, es decir, no sabemos la causa (1) Recientemente ha habido un creciente interés por la posible contribución que pueden tener agentes ambientales químicos, biológicos e infecciosos en la aparición de los TGD.

A pesar de que existen pocos datos disponibles que apoyen la contribución de factores ambientales sobre el desarrollo de los TEA y que muchos de los datos existentes están sujetos a estudios con serios errores metodológicos, no podemos dejar de tener en cuenta la susceptibilidad fetal a tóxicos de origen medioambiental y la posible influencia de estos factores en el aparente incremento de la prevalencia de los TGD. Desde el National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS) y la Environmental Protection Agency (EPA) (2) se esta promoviendo una línea de investigación rigurosa centrada en el estudio del papel que desempeña el medio ambiente y la interacción del gen ambiente en el desarrollo de estos trastornos

En España, recientemente se ha iniciado el primer estudio de búsqueda de factores de riesgo ambientales y autismo (Estudio de factores ambientales y autismo: estudio caso control, financiado por el Fondo de Investigación Sanitaria-FIS, TPY 1365/06). Este estudio está en su primer año de desarrollo por lo cual consideramos que podría ser de interés presentar brevemente el diseño del mismo y la situación más relevante relacionada con la investigación epidemiológica sobre este tema a la espera de resultados preliminares que deseamos podamos presentar en próximas reuniones y que puedan ser de utilidad para el conocimiento de la etiología y sobre todo para la prevención de estos trastornos. El estudio tiene carácter exploratorio sobre casos incidentes de autismo, procedentes de un programa de detección temprana poblacional, y pretende comparar la frecuencia de los factores de riesgo ambientales, potencialmente asociados a la aparición de los TGD, su posible relación con la presencia de alteraciones inmunes y/o marcadores proteómicos, con dos grupos de controles emparejados por edad mental, género y área geográfica.

## DESENCADENANTES AMBIENTALES

Entre los factores ambientales más estudiados y publicados en la literatura científica nos encontramos:

**Agentes químicos:** Aunque no existen pruebas concluyentes, se han asociado con efectos adversos del neurodesarrollo en niños y son considerados como potenciales disruptores endocrinos.

- Por un lado, los efectos biológicos de ciertos metales pesados como el mercurio, cobre, plomo, y cadmio que se pueden encontrar en el agua y en el aire o que provienen de centrales eléctricas o explotaciones mineras cercanas al lugar de residencia, están siendo foco de atención en muchos estudios multicéntricos como factores de riesgo de la alteración del desarrollo neuroconductual del niño y por extensión en el autismo (3)

- Y por otro, *las exposiciones a xenobióticos y neurotóxicos* ambientales persistentes como los policlorados bifenilos (PCBs), retardantes del fuego (Brominated flame retardant-BFRs). Las dioxinas son uno de los productos químicos más tóxicos que el hombre ha sido capaz de sintetizar. industria química combina gas cloro con derivados del petróleo para crear: pesticidas (DDT, lindano), plásticos (PVC, PVDC), disolventes (percloroetileno, tetracloruro de carbono) y refrigerantes (CFC, HCFC) (4).

**Agentes biológicos:** Hay algunos factores ambientales que se han asociado con autismo con valores de Riesgo Relativo (RR) muy altos.

- *Infecciones* como la rubéola congénita, pueden afectar al desarrollo del SNC, y se han relacionado con la aparición de TGD, sobre todo si se producen durante el primer trimestre del embarazo aunque existe poca evidencia de que sean causa principal de los TGD (5)

- *Drogas* como la talidomida (fármaco para tratar las náuseas, la ansiedad, el insomnio y los vómitos matutinos de las embarazadas) fue otro importante descubrimiento de epidemiólogos y clínicos porque la exposición era benigna para la madre producía graves defectos congénitos raros y otros menos raros como la ceguera o sordera, que asociaban con autismo (6)

- *Vacunas*, no sólo por el contenido de las mismas (thimerosal- mercurio), sino también por el incremento de las mismas y los desafíos inmunológicos que tienen que hacer hoy en día los niños, comparados con generaciones previas. Recientemente, se han presentado los resultados de la tendencia en la prevalencia de autismo considerando la retirada de thimerosal de las vacunas infantiles desde 1999 en USA (7) indicando que la prevalencia no ha disminuido, pero no se apoya la hipótesis de que la exposición a timerosal sea una causa primaria de autismo y se plantean los problemas del registro de DDS y la política de ayudas, como posibles causas que han podido aumentar el registro. Por otro lado, plantean que la exposición materna debida a las vacunas anti Rh y la dieta no han finalizado y deberían ser tenidas en cuenta.

**Otros factores** son la edad materna o el sexo varón (8) que si bien no son factores necesariamente causales, podrían ser variables de aproximación para alguno de ellos y presentan también un RR elevado.

Por otra parte, una de las principales áreas de investigación esta centrada en el papel que tienen las alteraciones del sistema inmune en la aparición del autismo y la potencial contribución de agentes tóxicos específicos en la producción y o exacerbación de la sintomatología autista (9). Se han descrito en estos pacientes niveles elevados de proteínas totales en suero (albumina, IgM, IgG, IgG2, IgG4). Estos hallazgos apoyan la idea de que determinadas características hereditarias del sistema inmune podrían dar lugar a una mayor vulnerabilidad frente a tóxicos específicos (p ej: thimerosal) en las fases tempranas del desarrollo del SNC (10). Algunos estudios han detectado niveles de autoanticuerpos del SNC en suero de

personas con TGD, que aunque no se han podido relacionar con efectos fisiopatológicos específicos hasta la actualidad podrían ayudar a definir el lugar donde se ha producido el daño neurológico. Un estudio reciente ha suscitado gran interés sobre la aparición de determinados neuropéptidos o neurotrofinas como marcadores en autismo, ya que las personas con retraso mental severo y las diagnosticadas de TGD mostraron un perfil similar, que no apareció en las personas con parálisis cerebral o en el grupo control, lo que sugiere que estos biomarcadores pueden estar relacionados con trastornos del desarrollo del SNC aunque no son específicos de los TGD 811).

El análisis de expresión de proteínas entre muestras que difieren en alguna variable, permite la identificación de proteínas específicas de una enfermedad.

*La proteómica* es una técnica muy eficaz para buscar marcadores de enfermedad y está siendo aplicada a múltiples patologías, como cáncer, enfermedades mentales y enfermedades autoinmunes. En el Autismo, esta técnica está empezándose a utilizar de forma exploratoria para establecer marcadores de posibles subfenotipos autistas. En el análisis de 4 de 8 tejidos cerebrales de pacientes autistas fallecidos, se identificó como factor de riesgo a la glioxalasa I (Glo1) (12).

La proteómica ha demostrado que muchas lesiones orgánicas expresan proteínas o subunidades de éstas transportadas desde los tejidos a sangre periférica facilitando los estudios en sujetos vivos sin necesidad de alcanzar el órgano diana.

## ESTUDIOS DE INVESTIGACIÓN DE LA ETIOLOGÍA DEL AUTISMO

Hay pocos estudios sobre la causalidad del autismo y el conocimiento generado no ha permitido obtener una evidencia más sólida sobre las posibles causas de estos trastornos (13). Estos estudios se pueden diferenciar en 4 tipos según el diseño utilizado:

**Estudios clínicos:** Utilizan poblaciones seleccionadas o grupos de pacientes de la clínica. Son estudios descriptivos generalmente con un pequeño número de sujetos. A veces las hipótesis se generan a posteriori. Estos estudios nos han enseñado la ocurrencia entre hermanos, la concordancia entre gemelos, el ratio por sexo, la comorbilidad y los síndromes genéticos que también van a veces asociado al autismo, síntomas gastrointestinales. También nos han enseñado la heterogeneidad de la presentación de la enfermedad, el fenómeno de regresión que parece ocurrir en muchos casos, así como, datos antropométricos, tales como el perímetro cefálico.

**Estudios basados en bases de datos administrativas:** Estos estudios valoran la exposición de dos formas: a nivel grupal (por área geográfica), o a nivel individual. A través de ellos se han podido obtener resultados sobre factores perinatales y tendencias temporales. Ejemplos de este tipo de estudios son los realizados en Dinamarca (sobre la retirada de timerosal de las vacunas y las tasas de autismo antes y después) (14) y el estudio sobre el registro de nacimientos realizado en Suecia donde se obtuvieron resultados sobre el efecto de la edad de los padres, las complicaciones obstétricas como factor de riesgo, así como una tendencia temporal (15)

Una variante dentro de estos estudios son *los estudios genéticos de bases de datos administrativas*, también basados en muestras de voluntarios. El más grande hasta ahora es el *Autism Genetic Resource Exchange (AGRE) Database*. En 2007 contaba con unas 1000 familias. Son familias con al menos dos afectados. De estos estudios hemos aprendido la existencia de una alta concordancia entre gemelos monocigóticos, pero no total. Sabemos que esta enfermedad no sigue un patrón de herencia

mendeliano, y que hay un número importante de cromosomas implicados, indicando múltiples genes.

**Diseños de caso-control.** Son estudios basados en población donde se confirma el diagnóstico en todos los sujetos. En general, la exposición se valora retrospectivamente y también se recogen muestras biológicas. No hay muchos estudios de este tipo. Pero algunos ejemplos son: estudio CHARGE (Childhood Autism Risk from Genetics and the Environment) (1) desarrollado en California donde se están encontrando muy diferentes perfiles inmunológicos en los niños con autismo comparados con los grupos control y han observado un set de genes que parecen estar expresados de forma diferente en los niños con autismo, especialmente en células del sistema inmune llamadas “natural killer cells”; otro es el CADDRE study (16), cuyos principales objetivos son estudiar las características únicas del fenotipo autista para identificar subgrupos para la investigación etiológica, la infección y la respuesta inmune y la influencia de los reproductivos y la función hormonal en la aparición de autismo.

Sin embargo, todos estos estudios tienen ciertas limitaciones. Por ejemplo, los estudios caso-control como CHARGE tienen la dificultad para incluir el tiempo de exposición. Pero a partir de los resultados se pueden plantear estudios prospectivos o diseños caso cohorte y se pueden compartir muestras en información con otras cohortes

**Otro tipo de diseños son los estudios de cohortes prospectivos:** Son estudios que se inician con una mujer embarazada y se sigue a la madre y al niño. Dada la recurrencia entre hermanos, los embarazos de estas mujeres que ya han tenido un hijo con Autismo, son considerados de alto riesgo. Algunos de los estudios de cohortes son el MARBLES (Markers of Autism Risk in Babies—Learning Early Signs), o Early Autism Risk Longitudinal Investigations Network (EARLI network).

#### **FACTORES AMBIENTALES Y AUTISMO EN ESPAÑA: ESTUDIO CASO-CONTROL**

Se trata de un estudio con diseño caso-control que persigue estimar la asociación de diferentes factores medioambientales con la aparición de TGD.

Los objetivos principales de este estudio que está siendo desarrollado son: 1) Estimar la asociación de la presencia de ciertos factores de exposición medioambiental, preconceptionales, del embarazo, perinatales y postnatales con la aparición de trastornos generalizados del desarrollo. 2) Describir los niveles de estos factores de exposición en los tres grupos de estudio. 3) Medir la influencia sobre la modificación del efecto anteriormente mencionado, que producen otros factores, tales como los socioeconómicos y los tradicionalmente relacionados con alteraciones del desarrollo psicomotor (edad de la madre, diabetes, insuficiencia placentaria, etc.). 4) Analizar la posible presencia de subfenotipos en el conjunto de los casos diagnosticados de TGD. 5) Explorar la presencia de patrones de expresión proteica y de factores inmunes diferenciales y valorar la posibilidad de realizar una estimación del riesgo de presentar estas diferencias entre casos y controles.

Los sujetos de estudio son niños con edades comprendidas entre 18 y 32 meses, por un lado “niños/as casos” diagnosticados de autismo en los programas de cribado de Salamanca-Zamora y Área 1 de Salud de Madrid y “niños/as controles sanos y patológicos” emparejados por sexo, edad y zona geográfica con los “casos”. La fuente para los “controles sanos” son niños con desarrollo típico y niños con otros trastornos (retraso madurativo, trastorno específico del lenguaje, etc.) también participantes en el programa de cribado. Dado el bajo número de casos detectados en estos programas de cribado se ha ampliado el intervalo de edad de los niños para la muestra hasta 48 meses y el área geográfica, incluyendo niños de la “Fundación Gaspar Hauser” de Mallorca donde se está desplazando el equipo investigador a fin de realizar la recogida

de datos para el estudio y posiblemente también se amplie la muestra con casos de la Asociación de Autismo Burgos, y con controles de los Centros de valoración de minusvalía y discapacidad de las respectivas ciudades mencionadas.

De todos los sujetos casos y controles se recogen las siguientes variables:

- 1) Resultados de la Merrill Palmer-R., Vineland y ADOS-G (no es necesaria la administración del ADOS-G en los controles sanos, una vez determinada la normalidad con las otras dos pruebas)
- 2) Un cuestionario sobre historia clínica y reproductiva que recoge enfermedades y tratamientos de la madre previo, durante y tras el embarazo: desarrollo psicomotriz y ponderal, vacunaciones y exploración neurológica del niño.
- 3) Respuestas de los padres a un cuestionario que recoge información de la exposición ambiental a la que ha estado expuesto el niño.
- 4) Un cuestionario que recoge información de la exposición ambiental y laboral a la que han estado expuestos los padres.
- 5) Mediciones analíticas: Inmunología (determinación de autoanticuerpos) y perfil proteómico en sangre y determinación de metil-mercurio en pelo.

Aspectos éticos del estudio: El estudio se plantea dentro del marco al respeto de los derechos individuales, según los postulados aceptados internacionalmente por las Naciones Unidas y la Comisión Europea (Acta de Helsinki de 1964 y Convenio de Oviedo de 1997, respecto a la protección de los Derechos Humanos y la dignidad del ser humano con respecto a las disciplinas de la biología y la medicina) y la Ley 15/de 1999 regulación del tratamiento automatizado de los datos de carácter personal y la Ley 41/2002 de autonomía del paciente. Previo al inicio del estudio se solicita el consentimiento informado (CI) de los padres tanto para la participación de sus hijos como en lo referente a su participación.

Esperamos que los resultados nos permitan identificar factores de riesgo ambientales que expresen diferencias en los grupos y se puedan asociar a determinados subfenotipos. Las tablas resultantes tras la recogida de variables serán analizadas para evaluar la diferencia estadística entre cada uno de los grupos. Por el momento en total se han recogido variables de 26 niños entre casos y controles. Estimamos una muestra de 60 casos y 60 controles sanos y patológicos respectivamente emparejados con estos casos cuando finalice el estudio.

## **LIMITACIONES Y CONCLUSIONES**

Este estudio tiene ciertas limitaciones e implica numerosas colaboraciones y coordinaciones entre los participantes, los servicios y el grupo de estudio así como un gran esfuerzo multidisciplinar. Además es posible una baja tasa de participación de los controles, dado que los cuestionarios son largos y la toma de muestras (cabello y sangre), pueden mermar la participación en un estudio del que ellos van a obtener pocos beneficios. Entre las variables de clasificación, parece obvio que en un caso control en el que se interroga por temas pasados a las madres, la influencia de un sesgo del recuerdo puede ser un problema. La mayoría de estas variables serán confirmadas por la historia clínica escrita del niño.

Por otra parte, ya que desconocemos a priori la distribución de los subfenotipos de TGD en la muestra a analizar podría darse el caso de no contar con suficiente número de cada uno de ellos como para realizar el análisis estratificado, si bien algunas variables como el cociente intelectual o la presencia o ausencia de epilepsia podrán ser utilizadas como clasificadores de subfenotipos dada su prevalencia en los TGD.



En cualquier caso, se trata del único estudio de casos incidentes de base poblacional desarrollado en nuestro país y si bien, es posible que en este primer estudio exploratorio, no se obtengan una información muy sólida sobre las causas del autismo, si parece posible identificar algunos factores de riesgo, descartar factores de confusión y perfilar la existencia de algunas variables marcadores de posibles mecanismos. Se trata de un estudio pionero, que sin duda se podrá ampliar durante el seguimiento de los casos a lo largo del tiempo, así como con la expansión del programa a otras áreas geográficas.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Hertz-Picciotto et al. The CHARGE study: an epidemiologic investigation of genetic and environmental factors contributing to autism". *Environ Health Perspect.* 2006 Jul;114(7):1119-25.)
2. Environmental Protection Agency (EPA). [http://es.epa.gov/search97cgi/s97\\_cgi](http://es.epa.gov/search97cgi/s97_cgi).
3. (Rodier PM, Hyman SL. Early environmental factors in autism. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 1998;4:121–8).
4. Windham G, Zhang L, Gunier R, et al: Autism Spectrum Disorders in Relation to Distribution of Hazardous Air Pollutants in the San Francisco Bay Area. *Environmental Health Perspectives.* 2006 114(9): 1438-1444.
5. Craig J. Newschaffer, Daniele Fallin, and Nora L. Lee. Heritable and Nonheritable Risk Factors for Autism Spectrum Disorders. *Epidemiol Rev* 2002;24:137–153).
6. Strömland K, Nordin V, Miller M, et al. Autism in thalidomide embryopathy: a population study. *Dev Med Child Neurol.* 1994 Apr;36(4):351-6.
7. Schechter R, Grether JK. Continuing increases in autism reported to California's developmental services system: mercury in retrograde. *Arch Gen Psychiatry.* 2008 Jan;65(1):19-24.
8. Croen LA, Najjar DV, Fireman B, et al. Maternal and paternal age and risk of autism spectrum disorders. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 2007 Apr;161(4):334-40).
9. Ashwood P, Van de Water J. Is autism an autoimmune disease? *Autoimmun Rev.* 2004; 3 (7-8): 557-62.
10. Hornig M, Chian D, Lipkin WI. Neurotoxic effects of postnatal thimerosal are mouse strain dependent. *Mol Psychiatry* 2004;9:833-45.
11. (Nelson KB, Grether JK, Croen LA, et al. Neuropeptides and neurotrophins in neonatal blood of children with autism or mental retardation. *Ann Neurol* 2001;49:597–606).
12. Colomé N., Prieto M., Carrascal M., Posada M., Emilio Gelpí, Joaquin Abian. Determination of protein markers in human serum: Analysis of protein expression in toxic oil syndrome Studies. *Proteomics* 2004, 4, 303–315
13. Newschaffer CJ, Croen LA, Daniels et al. The epidemiology of autism spectrum disorders. *Annu Rev Public Health.* 2007;28:235-58. Review).
14. Kreesten Meldgaard Madsen, Anders Hviid, Mogens Vestergaard et al. A Population-Based Study of Measles, Mumps, and Rubella Vaccination and Autism. *N Engl J Med*, Vol. 347, N o. 19. November 7, 2002; 1477-82)
15. Gillberg C, Cederlund M, Lamberg K, Zeijlon L. Brief report: "the autism epidemic". The registered prevalence of autism in a Swedish urban area. *J Autism Dev Disord.* 2006 Apr;36(3):429-35.
16. <http://www.cdc.gov/ncbddd/autism/states/mdde.htm>