



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

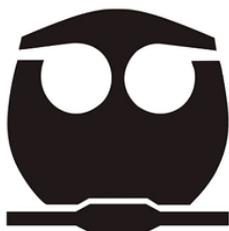
FACULTAD DE QUÍMICA

**EXPOSICIÓN EN MODELOS NEURONALES A
CONTAMINANTES EMERGENTES PRESENTES EN LOS
ALIMENTOS ASOCIADOS AL TRASTORNO DEL ESPECTRO
AUTISTA.**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

PRESENTA

ALBA FERNANDA SOLANO GONZÁLEZ



CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: MIQUEL GIMENO SECO
VOCAL: CARMINA MONTIEL PACHECO
SECRETARIO: ROEB GARCÍA ARRAZOLA
1er SUPLENTE: MANUEL GUTIÉRREZ AGUILAR
2º SUPLENTE: ANA LILIA ZÁRATE MARTÍNEZ

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 313 DEL DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA, CONJUNTO E, FACULTAD DE QUÍMICA, CIUDAD UNIVERSITARIA.

ASESOR DEL TEMA:

DR. ROEB GARCÍA ARRAZOLA

SUSTENTANTE:

ALBA FERNANDA SOLANO GONZÁLEZ

RESUMEN

La expresión del trastorno del espectro autista (TEA) presenta una etiología desconocida como resultado de factores genéticos y medioambientales. Al respecto de los últimos, los seres humanos estamos expuestos a diversos compuestos contaminantes a través del aire, agua y alimentos, principalmente.

En el caso de los alimentos, una de las mayores fuentes de exposición a los contaminantes proviene de los envases, donde se utilizan plastificantes como los ftalatos y el bisfenol A. Este tipo de compuestos se conocen como contaminantes emergentes y son considerados disruptores endocrinos por su capacidad de alterar el sistema endocrino en un organismo, asociado también con cambios epigenéticos. Al respecto, se ha propuesto un modelo que asocia el TEA con cambios en la metilación de ADN por efecto de un desbalance de óxido-reducción (REDOX); específicamente, en el citoplasma celular existe una enzima directamente relacionada con la metilación de ADN y que es sensible al estado REDOX celular, a saber, la Metionina sintasa.

En el presente estudio se expusieron células de neuroblastoma a tres diferentes tipos de ftalatos y bisfenol A para conocer su efecto sobre la actividad específica de metionina sintasa. Las concentraciones experimentales de exposición fueron seleccionadas con base a estudios previos y a niveles reportados en alimentos envasados, resultando en 800 μM y 50 $\mu\text{g/mL}$ para los ftalatos y el bisfenol A, respectivamente. La actividad enzimática de Metionina sintasa fue medida 24 h después de la exposición. Los resultados demostraron una disminución de la actividad enzimática de metionina sintasa hasta un 34% de la actividad específica después de una exposición a los contaminantes emergentes.

ÍNDICE

1. Introducción	5
2. Marco teórico	7
<i>Autismo y metilación REDOX</i>	7
<i>Metionina sintasa y su metabolismo neuronal</i>	11
<i>Compuestos disruptores endocrinos</i>	15
<i>Hipótesis</i>	19
<i>Objetivo general</i>	20
<i>Objetivos particulares</i>	20
3. Materiales y métodos	21
<i>Materiales</i>	21
<i>Cultivo celular</i>	21
<i>Propagación celular</i>	21
<i>Extracción de MS y cuantificación de proteína</i>	22
<i>Exposición a diferentes sustratos</i>	22
<i>Medición de actividad enzimática de MS</i>	22
<i>Aseguramiento de la calidad en los métodos experimentales</i>	23
4. Resultados y discusión	24
5. Conclusiones	33
6. Anexo	34
7. Referencias	35

1. INTRODUCCIÓN

Los contaminantes emergentes de los alimentos son sustancias que no han sido intencionalmente adicionadas a los alimentos y que a pesar de que se encuentran en bajas concentraciones, son capaces de perjudicar a la salud al alterar funciones endocrinas principalmente (García C. 2011). Un número importante de estos disruptores endócrinos son los metales pesados (mercurio, plomo y cadmio), nitrato, 2,3,7,8- tetraclorodibenzo-p-dioxina, plaguicidas, cloruro de vinilo, estireno y plastificantes di-(2-etilhexil) ftalato y di-n-butil ftalato, etilcarbamato, acrilamida, aminas heterocíclicas, hidrocarburos aromáticos policíclicos, entre otros (Anadón A, 2009).

La disfunción mitocondrial, los factores de riesgo medioambientales, los desbalances metabólicos y la susceptibilidad genética conllevan al estrés oxidativo, el que a su vez desencadena mecanismos inflamatorios, de daño a las membranas celulares, fenómenos de autoinmunidad, daños en la metilación, muerte celular y déficit neurológico. El cerebro es muy vulnerable al estrés oxidativo, particularmente en los niños durante etapas tempranas del desarrollo. Una vez que los eventos medioambientales y los desequilibrios metabólicos afectan el estrés oxidativo y la metilación, se afecta la expresión de los genes (Quintana D. 2015).

A través de varios estudios se han señalado agentes causales del trastorno del espectro autista (TEA), como los niveles de glutatión (reducido y oxidado), ocasionados por cambios redox en las células neuronales que afectan la metilación del ADN y consecuentemente alteran la expresión génica del individuo (Quintana D. 2015). Por ejemplo, la disminución de glutatión reducido (GSH) en plasma sirve como biomarcador del estrés oxidativo para la regulación metabólica en el cerebro y se ha encontrado en niños con autismo una disminución significativa del 35% de GSH en el nivel plasmático. Esta disminución, y su asociación con el TEA, está directamente relacionada con la reducción de

actividad de la enzima Metionina sintasa (MS) y por lo tanto con la inhibición de la metilación del ADN (Deth et al., 2014).

Con base en lo anterior, el objetivo de esta investigación se enfoca en medir la actividad enzimática de metionina sintasa en un cultivo *in vitro*, específicamente en células de neuroblastoma, y posteriormente observar si existe un efecto en la actividad de MS cuando se somete a las células a los contaminantes emergentes con mayor presencia en los alimentos. La relevancia cae en considerar como una posible causa, que el TEA sea potencialmente producto de un mecanismo epigenético por la exposición a contaminantes a través de alimentos.

2. MARCO TEÓRICO

❖ AUTISMO Y METILACIÓN REDOX

El trastorno del espectro autista (TEA) es un grupo heterogéneo de afecciones del neurodesarrollo que se definen mediante observaciones conductuales y se caracterizan por impedimentos en la comunicación y la interacción social, junto con comportamientos restrictivos y repetitivos (Rangel D, 2015). Además, se ha observado que personas con TEA pueden presentar epilepsia, depresión, ansiedad y trastorno de déficit de atención e hiperactividad. Uno de cada 160 niños tiene un TEA (OMS, 2018), esta estimación representa una cifra media, pues la prevalencia observada varía considerablemente entre los distintos estudios. En México 1 de cada 115-120 personas presenta algún tipo de trastorno del espectro autista (Carol Ajax, 2019).

Se cree que varias de las características cognitivas y conductuales del TEA, surgen de la disfunción del sistema nervioso central (SNC), debido a genes o alteraciones cromosómicas. Sin embargo, la evidencia en muchos campos de la medicina ha documentado múltiples anomalías fisiológicas no relacionadas con el SNC pero asociadas con el TEA (Rossignol DA.; Buie T, 2010; James SJ, 2006; Ashwood P, 2010). Lo anterior sugiere que en algunos individuos el TEA surge de anomalías sistémicas, tales como: desregulación inmune, desintoxicación alterada, exposición tóxica ambiental, regulación redox por estrés oxidativo, generación de energía por sistemas mitocondriales, entre otros (Ming X, 2008).

La metilación REDOX es un mecanismo propuesto para la regulación epigenética (modificaciones en la estructura de la cromatina) del ADN por la adición de grupos metilos como resultado del balance entre las especies reducidas y oxidadas involucradas en las rutas metabólicas de la célula (Deth, et al., 2014). Cabe señalar que la metilación del ADN o de las histonas son solo dos tipos de mecanismos en más de 200 reacciones asociadas con la metilación (Petrossian, et al., 2011). Por ejemplo, los oligómeros α -beta (péptido que es el principal componente de las placas seniles), inhiben la capacidad de los factores de

crecimiento para aumentar la absorción de cisteína, disminuyen la actividad de la MS e inhiben la metilación (incluida la metilación del ADN), propiciando un desequilibrio redox hacia un estrés oxidativo y neurodegeneración (Hodgson N., 2013).

Jill James (2004) publicó un artículo sobre biomarcadores metabólicos del estrés oxidativo y la disminución de la capacidad de metilación en niños con autismo, las concentraciones plasmáticas se midieron en 20 niños con autismo y 33 niños control. Una parte de sus resultados se presentan en la tabla 1.

Tabla 1. Comparación de metabolitos entre niños autistas y niños control

	Control de niños	Niños autistas
Metionina (µmol / L)	31,5 ± 5,7	19,3 ± 9,7
SAM (nmol / L)	96,9 ± 12	75,8 ± 16,2
SAH (nmol / L)	19,4 ± 3,4	28,9 ± 7,2
SAM: SAH	5.2 ± 1.3	2.9 ± 0.8
Homocisteína (µmol / L)	6.4 ± 1.3	5.8 ± 1.0
Cisteína (µmol / L)	202 ± 17	163 ± 15
tGSH (µmol / L)	7.6 ± 1.4	4.1 ± 0.5
Glutación oxidado (nmol / L)	0.32 ± 0.1	0.55 ± 0.2
tGSH: GSSG	25,5 ± 8,9	8.6 ± 3.5

James J. (2004) Metabolic biomarkers of increased oxidative stress and impaired methylation capacity in children with autism.

En relación con los niños control, los niños con autismo tuvieron concentraciones plasmáticas basales más bajas de metionina, S- adenosilmetionina (SAM), homocisteína, cisteína y glutatión total (tGSH) y concentraciones más altas de S- adenosilhomocisteína (SAH) y glutatión oxidado (GSSG). Este perfil metabólico es consistente con un aumento del estrés oxidativo (proporción redox significativamente menor de glutatión reducido a glutatión oxidado) en niños con autismo.

El estrés oxidativo en el autismo se ha estudiado a nivel de membrana (neuronas, eritrocitos, entre otros.) y también midiendo productos de peroxidación lipídica, agentes desintoxicantes (como el glutatión) y antioxidantes involucrados en el sistema de defensa contra especies reactivas de oxígeno (ROS). Se han sugerido niveles alterados de glutatión, alteración en el metabolismo de homocisteína/metionina, aumento de la inflamación, excitotoxicidad, así como disfunción mitocondrial e inmune en el autismo (Chauhan A. 2006).

La epigenética es una parte de la genética que estudia los cambios “heredables” en la expresión de genes, que no se deben a modificaciones en la secuencia de bases de su ADN sino a modificaciones químicas, como la metilación del ADN y la acetilación de histonas (García R. 2012).

El ADN se encuentra empaquetado como cromatina. Las histonas son proteínas alrededor de las cuales el ADN puede enrollarse para la compactación y la regulación génica. Estas histonas tienen un dominio carboxiloterminar globular y una cola aminoterminar no estructurada (Kouzarides T. 2007). Se ha descrito una variedad importante de modificaciones en estas colas, que incluyen: metilación en los residuos de lisina y arginina, acetilación en residuos de lisina, fosforilación de serinas y treoninas, entre otras. La acetilación y metilación de residuos de lisina son marcas moduladoras clave para la activación o represión transcripcional (Kouzarides T. 2007; Santos R, 2005). En la figura 1 se ilustra cómo los mecanismos epigenéticos pueden afectar la salud.

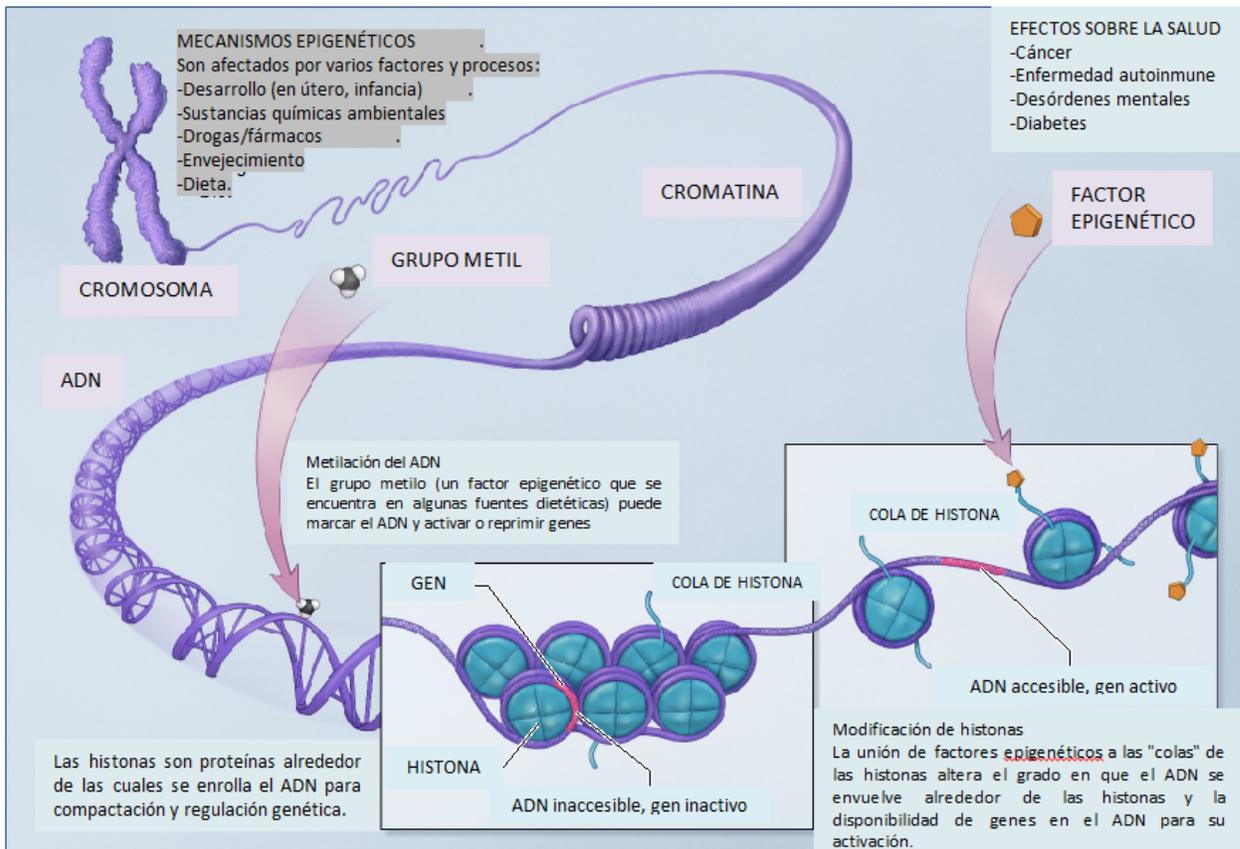


Figura 1. Adaptada de “A Scientific Illustration of How Epigenetic Mechanisms Can Affect Health” NIH-National Institutes of Health, Office of Strategic Coordination-The Common Fund.

Se ha observado que la metilación de los sitios CpG (regiones de ADN donde un nucleótido de citosina es seguido por un nucleótido de guanina en la secuencia lineal de bases a lo largo de su dirección 5' → 3') son potentes reguladores de la expresión génica y este proceso se ve afectado por varios factores externos, entre ellos la dieta. Los nutraceuticos incluyen moléculas que se prestan directamente donantes de metilo en el ciclo de activación de metilo o sirven como cofactores en estas vías, tales como la metionina, la piridoxina (vitamina B6), ácido fólico

(vitamina B9), betaína (trimetilglicina), colina, vitamina B12 y zinc (Albertini DF, 2013).

Todas estas reacciones de metilación están reguladas por la actividad de la enzima dependiente de folato y vitamina B12, a saber, metionina sintasa (MS).

❖ METIONINA SINTASA Y SU METABOLISMO NEURONAL

La metionina sintasa (MS) es una enzima fundamental en la ruta metabólica de la homocisteína, ya que convierte la homocisteína (HCy) en metionina (MET) por incorporación de un grupo metilo, derivado de 5-metiltetrahidrofolato (5-MeTHF). La vitamina B12 está directamente involucrada y ayuda a la transferencia de este grupo metilo.

La MS está compuesta por cinco dominios estructurales, representados secuencialmente dentro de su gen y ARNm, incluidos los dominios de unión a HCy, unión a metilfolato, cap, unión a cobalamina y unión a SAM (Dixon M, 1996; Evans J, 2004), la figura 2 presenta el modelo de la enzima, obtenido de un artículo científico. Durante el ciclo catalítico, los grupos metilo derivados de metilfolato se transfieren primero al cofactor de vitamina B12 (cobalamina) y luego a HCy. El estado Cbl (I) resultante de la cobalamina es un "supernucleófilo" altamente reactivo, que funciona como un sensor / indicador del entorno celular redox hasta que se metila nuevamente (Jensen K, 2005). Sin embargo, durante este intervalo vulnerable, el dominio cap asume una posición por encima de Cbl (I), protegiéndolo parcialmente de la oxidación (Bandarian V, 2002). La oxidación de la cobalamina detiene la actividad enzimática y desvía la HCy a la transulfuración, lo que a su vez aumenta la síntesis de GSH hasta que la metilación reductora de la cobalamina dependiente de SAM restablece la actividad de la MS (Jarrett J. 1998). Esto crea un ciclo de retroalimentación negativa en el que la actividad de MS es sensible al estado redox y el estado redox es sensible a la actividad de MS.

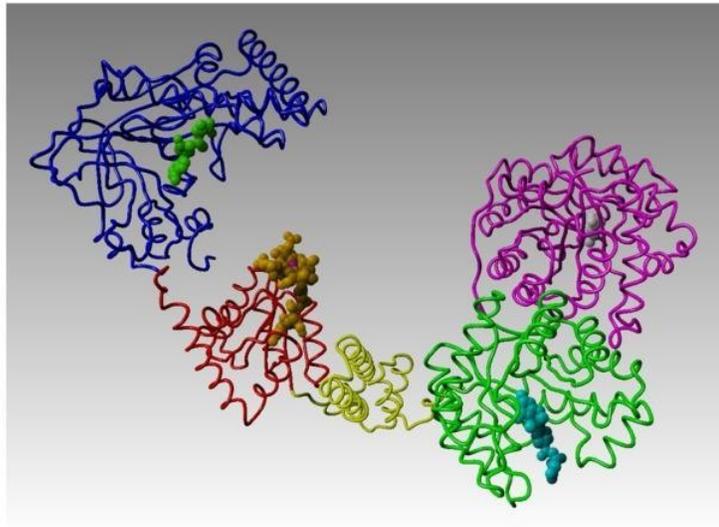
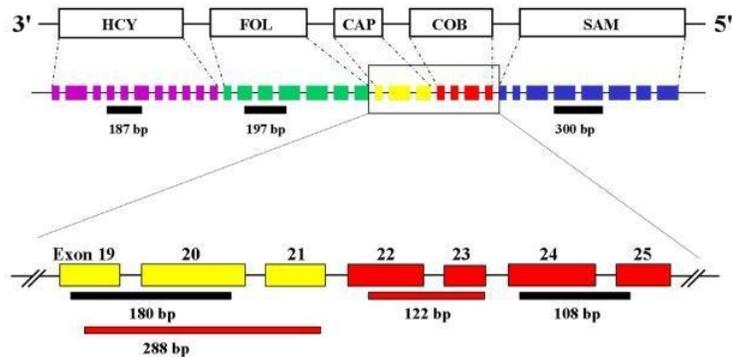
A**B**

Figura 2. Estructura de dominio y composición de exón de la MS dependiente de cobalamina. **(A)** MS se compone de cinco dominios: unión a HCy (rosa), unión a metilfolato (verde), tapa (amarillo), unión a cobalamina (rojo) y unión a SAM (azul). Estructuras de *E. coli* (Dixon M. 1996; Bandarian V. 2003) y *T.maritima* (Evans J. 2004) (los códigos PDB 1Q8J, 1K98 y 1MSK, respectivamente, se utilizaron para construir un modelo compuesto). No existe un segmento enlazador estructuralmente no caracterizado entre los dominios folato y cap. **(B)** El gen MS humano contiene 33 exones que especifican sus cinco dominios de manera secuencial. La ubicación de las secuencias de PCR utilizadas en este estudio se indica mediante segmentos de línea roja y negra debajo de los dominios correspondientes.

Un solo receptor de dopamina (específicamente el D4), transfiere de 20 a 50 grupos metilo por segundo, una tasa de rotación impresionantemente rápida. Cada receptor es proporcionado por la metionina sintasa, por lo tanto, cualquier efecto adverso sobre la actividad de la metionina sintasa (MS) se refleja como una pérdida del papel que desempeñará la metilación, mediada por D4 (Deth RC, 2004). Una investigación a fondo de la MS (Matthews R, 2002), arrojó que el estrés oxidativo desactiva la MS, al promover la oxidación de su vitamina B₁₂ (cobalamina) cofactor. Por lo tanto, la MS sirve como sensor del estado oxidativo de las células (estado redox), lo que implica que las respuestas del receptor D4, como la capacidad de atención, podrían verse afectadas en condiciones de estrés oxidativo. Debido a que la actividad de la MS también controla la proporción de la S-adenosilmetionina (SAM), donante de metilo al inhibidor de la metilación S-adenosilhomocisteína (SAH), el estrés oxidativo también regula cientos de reacciones de metilación que afectan a casi todos los aspectos de la función celular.

A continuación, se presenta la figura 3 que ilustra las vías redox y la metilación en neuronas, así como la posición de la Metionina sintasa en las rutas metabólicas.

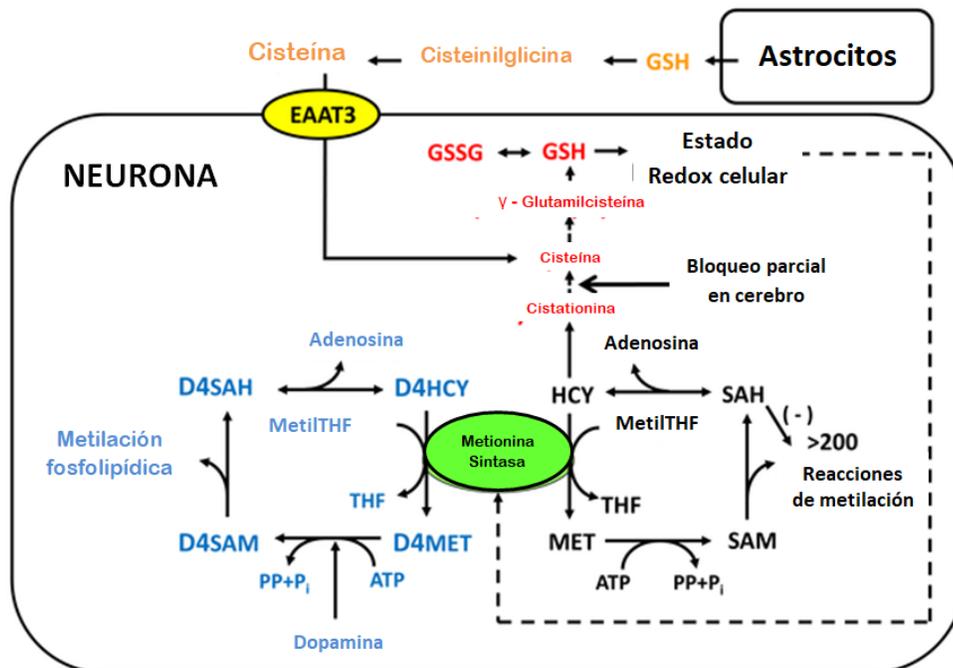


Figura 3. Vías redox y metilación en neuronas (Adaptada de Deth et al., 2014)

El aminoácido cisteína es limitante de velocidad para la síntesis de glutatión reducido (GSH) y se proporciona mediante la captación de cisteína derivada de astrocitos o por transulfuración de homocisteína (HCy). El ciclo de metilación de metionina (MET) depende de metionina dietética como de la metilación de HCy por metionina sintasa (MS). El estado redox y la metilación están vinculadas, dado que la formación de HCy a partir de S-adenosilhomocisteína (SAH) es reversible e inhibe la metilación SAH, disminuyendo la actividad de la metionina sintasa y aumentando la síntesis de GSH e inhibiendo la reacción de metilación. Como se observa en la figura 3, la metionina sintasa se encuentra en citoplasma de la célula neuronal, por lo que el estrés oxidativo generado por la disminución de glutatión reducido (GSH) provoca un cambio redox y una influencia en su actividad, interviene en el metabolismo de homocisteína y está relacionada directamente con las reacciones de metilación, ya que provee el sustrato para S-adenosilmetionina (SAM) que es un donador de grupos metilo.

La actividad de la MS también determina el nivel de tetrahidrofolato disponible para la síntesis de purina y timidina. Además, la actividad de la MS proporciona grupos metilo derivados del folato al receptor de dopamina D4, lo que respalda su capacidad única de llevar a cabo la metilación de fosfolípidos estimulada por dopamina (Sharma A, 1999).

La relación entre los niveles de GSH y la actividad de la MS es crítica para mantener la homeostasis redox celular y cualquier factor que disminuya los niveles de GSH causan una disminución en la metilación global del ADN, con consecuencias epigenéticas posteriores (Deth et al. 2008).

❖ COMPUESTOS DISRUPTORES ENDOCRINOS

Los factores ambientales pueden desempeñar un papel importante en la etiología y la patogénesis de TEA (Child D. 2013; Hum J. 2013; Ronald A. 2010). También se sabe que las interacciones genético-ambientales durante el desarrollo fetal que conducen a cambios epigenéticos tempranos en la vida, afectan la expresión génica posterior en el cerebro (Roth T. 2012) y están detrás del riesgo potencial de TEA después de la exposición prenatal a factores ambientales (Lai M. 2014; Braun 2014; Kajta M. 2013). Las modificaciones epigenéticas (la alteración de la transcripción de ADN sin alteraciones en la secuencia de ADN) afectan la regulación génica. Estas alteraciones en la expresión génica, son el resultado de influencias reguladoras de la transcripción de factores ambientales, tales como efectos inmunológicos, deficiencias nutricionales, compuestos disruptores endocrinos (EDC) y productos farmacéuticos (Siniscalco D. 2013).

Se ha acuñado el término de compuestos disruptores endocrinos (EDC) para definir el conjunto heterogéneo de químicos ambientales, agrícolas, industriales, nutricionales y farmacéuticos que interaccionan con el sistema endocrino. Estos contaminantes se asocian en la alteración de la actividad hormonal endógena, irrumpiendo en las etapas del desarrollo humano, contribuyendo al riesgo de desarrollo de TEA. Algunos de estos compuestos tienen la capacidad de interferir con el sistema endocrino imitando la acción de las hormonas endógenas; antagonizando su mecanismo de acción; alterando su patrón de síntesis, transporte, liberación o metabolismo; o, al modular los niveles de los receptores correspondientes (OMS, 2012).

Los EDC incluyen una gran variedad de productos químicos, como los bifenilos policlorados (PCB), los pesticidas organoclorados (OCP), los éteres de difenilo polibromados (PBDE), las dioxinas (Bonfeld-J, 2010), sustancias de perfluoroalquilo (PFAS) (Kjeldsen L. 2013; Long M. 2013) y compuestos como el bisfenol A (Ghisari M. 2009; Kruger T. 2008), sintetizados para aplicaciones comerciales, agrícolas, industriales o farmacéuticas. Los EDC migran al aire, a los

alimentos y al agua que están en constante contacto con los seres humanos y la vida silvestre.

A continuación se adjunta información sobre algunos estudios que han evaluado la influencia de los EDC en el autismo o en desórdenes neurocognitivos.

Tabla 2. Estudios con EDC asociado a autismo o desorden neurocognitivo.

Objeto de estudio	EDC de estudio	Población	Conclusión
Estimar el impacto de las exposiciones al bisfenol A (BPA) gestacional e infantil sobre el comportamiento y la función ejecutiva a los 3 años de edad (Braun JM. 2011)	BPA	244 madres y sus hijos hasta los 3 años.	La exposición gestacional a BPA afectó los dominios de regulación conductual y emocional a los 3 años de edad, especialmente entre las niñas.
Exposición prenatal a dos disruptores endocrinos ubicuos y el comportamiento social en niños. (Miodovnik A. 2011)	Ésteres de ftalato y bisfenol A (BPA).	137 madres y sus hijos entre los 7 y 9 años.	Se asociaron las concentraciones de metabolitos de ftalatos con mayores déficits sociales y con una cognición social más pobre.
Identificar exposiciones gestacionales de EDC asociadas con comportamientos autistas, a través de la Escala de respuesta social (SRS), una medida de los comportamientos autistas. (Braun JM. 2014)	Ftalatos (incluidos Mono-butil-ftalato (MBP) y mono (2-etilhexil) ftalato (MEHP)), Bisfenol A, bifenilos policlorados, pesticidas organoclorados, retardantes bromados y sustancias perfluoralquil.	175 mujeres embarazadas y sus hijos a la edad de 4 y 5 años.	Al menos un producto químico de cada clase de EDC que fue examinada se asoció con puntajes SRS más altos, que son consistentes con comportamientos más autistas.
Estimar la asociación entre la exposición prenatal a BPA y el comportamiento neurológico infantil. (Braun JM. 2017)	BPA	812 madres y sus hijos a los 3 años de edad.	La concentración de BPA urinario prenatal se asoció con algunos aspectos del comportamiento infantil internalizantes y somatizantes, así como una peor memoria de trabajo.

Algunos de los principales compuestos disruptores endocrinos identificados por su frecuencia en el medio ambiente y los alimentos incluyen: ftalatos, nonilfenoles, bisfenol A (BPA), éteres de difenilo polibromados y estrógenos naturales y sintéticos, como la genisteína y la daidzeína (Crini G. 2007).

Los ftalatos de dialquilo son compuestos sintéticos ubicuos empleados principalmente en la fabricación de películas plásticas y contenedores, incluso de alimentos. Se ha reportado que los ftalatos producen diversos efectos adversos a la salud como disrupción endocrina, relación con la obesidad, diabetes, daños reproductivos y autismo. La FDA en el 2012, estableció un límite máximo permisible del 3% para el Dietil hexil ftalato (DEHP), que es el comercialmente más utilizado para matrices poliméricas de empaques para alimentos (García M. 2018).

La presencia de los ftalatos en los alimentos se ha sugerido que tiene origen en el transcurso del procesamiento o empaqueo, por lo cual diversos alimentos envasados y no envasados han sido analizados en varios países, encontrando que son una considerable fuente de exposición de varios tipos de ftalatos (Cacho y col., 2012; Bradley y col., 2013; Schechter y col., 2013; Holderbeke y col., 2014). Los estudios sugieren que en el caso de los alimentos envasados, puede existir una migración, del empaque hacia el alimento, lo cual ha sido ampliamente reportado incluso para el caso de bolsas de polietileno (Sun y col., 2012), mientras que los no envasados se contaminan con ftalatos provenientes del medio ambiente (Cacho y col., 2012).

El bisfenol A (BPA) es un compuesto orgánico con dos grupos funcionales fenol, ampliamente utilizado en una variedad de productos de consumo, incluidos envases de plástico y metal para alimentos y bebidas, selladores y empastes dentales, equipos médicos, entre otros. La fuente predominante de exposición al BPA es la dieta, pero también puede presentarse por inhalación a través de aire contaminado o absorción dérmica (Sarrouilhe, 2017). Existe la preocupación de

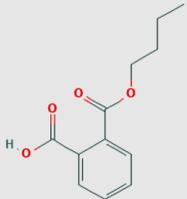
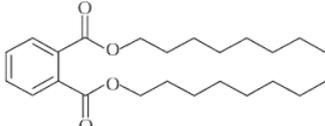
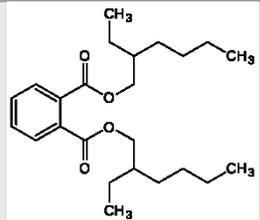
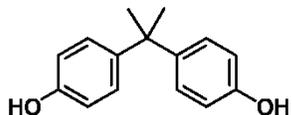
que la exposición a BPA pueda influir en el desarrollo del cerebro humano y puede contribuir a la creciente prevalencia de problemas de neurodesarrollo y de comportamiento. En un estudio de 46 niños con TEA y 52 controles, se encontró por primera vez una asociación directa entre niños con TEA y exposición a BPA, y demostró que el BPA no se metaboliza bien en niños con TEA (Stain P. 2015).

A partir de este antecedente y conociendo que la actividad de la enzima metionina sintasa está relacionada con una reducción de la metilación del ADN y con la expresión del TEA, se trata de descubrir si los EDC mencionados tienen una influencia en el estado *redox* plasmático celular y por lo tanto, están relacionados con un efecto en la actividad enzimática de metionina sintasa.

Los compuestos disruptores endocrinos fueron seleccionados por su presencia en envases de plástico utilizados en la industria alimentaria, además de estudios que sugieren una influencia negativa en el comportamiento infantil por su exposición prenatal. Se trabajará con 3 compuestos de la familia de ftalatos, para observar si existe alguna diferencia debido a su cadena alifática, y con Bisfenol A.

En la tabla 3 se presentan los compuestos de interés, su aplicación y su estructura química, considerados EDC para su exposición a las células de neuroblastoma.

Tabla 3. Compuestos disruptores endocrinos.

COMPUESTO	APLICACIÓN	ESTRUCTURA QUÍMICA
Mono-butiril-ftalato (MBP)	Plastificador (añadido al plástico para aumentar su flexibilidad).	
Di-n-octilftalato (octilftalato)	Plastificador (añadido al plástico para aumentar su flexibilidad).	
Bis (2-etilhexil) ftalato (DEHP)	Plastificador (añadido al plástico para aumentar su flexibilidad).	
Bisfenol A (2,3-dihidroxipropil) glicidil éter (BPA)	Fabricación de plásticos.	

HIPÓTESIS

La exposición *in vitro* de células neuronales a contaminantes emergentes presentes en los alimentos tiene un efecto negativo en la actividad enzimática de Metionina-Sintasa, involucrada en el mecanismo de metilación REDOX al ADN, propuesto como posibilidad para la expresión del Trastorno del Espectro Autista (TEA).

OBJETIVO GENERAL

Medir la actividad enzimática de metionina sintasa en un cultivo de neuroblastomas y observar el efecto de exposición a cuatro disruptores endócrinos (mono-butil-ftalato, di-n-octilftalato, DEHP y Bisfenol A).

OBJETIVOS PARTICULARES

- Desarrollar la técnica de cultivo *in vitro* para neuroblastoma 2A.
- Extraer el material intracelular de los cultivos de neuroblastoma 2A por medio de lisis celular con buffer TNE y cuantificar el contenido de proteína obtenido en cada extracto por el método de Bradford.
- Medir la actividad enzimática de MS cobalamina dependiente a través de una metodología espectrofotométrica, con una estandarización de la cantidad de proteína para cada ensayo.
- Exponer las células Neuro 2A a compuestos disruptores endócrinos, específicamente a los aditivos mono-butil-ftalato, di-n-octilftalato, DEHP y Bisfenol A, empleados para la fabricación de plásticos utilizados como envases de alimentos.
- Evaluar la actividad enzimática de MS en cultivos de Neuro 2A bajo condiciones normales y por exposición a EDC.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Ditiotreitol (DTT), L-homocisteína, S-Adenosil Metionina (AdoMet), Hidroxicobalamina y Metil-tetrahidrofolato (CH₃THF) de Sigma Aldrich®. El agua utilizada fue MiliQ y los demás reactivos de grado analítico.

➤ *Cultivo celular*

El modelo utilizado corresponde a la línea celular Neuroblastoma 2a (Neuro 2A), son células que pertenecen al neuroblastoma cerebral de un ratón albino, que proviene de un tumor espontáneo de la especie *Mus musculus*, que se caracteriza por tener un crecimiento adherentes y por poseer una morfología neuronal ameboidal. Las células se incubaron a 37°C, en medio RPMI (usado para el cultivo de células humanas o de tejidos aislados), bajo atmósfera de CO₂ en cajas petri.

➤ *Propagación celular*

Se monitoreó visualmente la población de células, cuando aumentaba la cantidad de ellas, se realizaba un lavado de la caja petri con PBS y 500 µL de tripsina, para despegar las células de la caja y que pudieran quedar suspendidas nuevamente en el medio, posteriormente se añadía 5mL de medio RPMI y nuevamente se incubaron a 37°C, bajo atmósfera de CO₂.

➤ *Extracción de MS y cuantificación de proteína*

Una vez que se consideraba adecuada la población de Neuro 2A, es decir, la mayor parte del espacio de la caja estaba ocupado por las células, se procedía a realizar una lisis física. La lisis celular fue realizada con buffer TNE en proporción 1:10 (v/v). Las células se mantuvieron adheridas a la caja, se eliminó el medio, se añadió 400 µL del buffer, se raspó la base de la caja con un raspador celular, se dejó actuar 10 min, nuevamente se raspó, se recolectó todo el buffer en un tubo Eppendorf, se centrifugó (5min) y se recuperó el sobrenadante, lo que corresponde al extracto intracelular donde se encuentra la

enzima de interés. Posteriormente se midió el contenido de proteína de cada uno de los lisados, por el método de Bradford, en placas de 96 pocillos.

➤ *Exposición a diferentes sustratos*

La exposición a cada sustrato se realizó en dos cajas celulares de Neuro 2A durante 24 h. Se trabajaron las siguientes concentraciones: Mono-butil-ftalato (MBP), Di-n-octilftalato (octilftalato) y Bis (2-etilhexil) ftalato (DEHP) a 800 μM (Lin, et al., (2011)); Bisfenol A (2,3-dihidroxipropil) glicidil éter (BPA) a 50 $\mu\text{g/mL}$ (Hernández, et. al., (2019)). Posterior al tiempo de exposición se obtuvo el extracto intracelular con el procedimiento antes señalado. Se seleccionó la concentración de trabajo con base a artículos, debido a que Lin y colaboradores hallaron la toxicidad de DEHP en el sistema nervioso central e implicó que DEHP puede afectar el desarrollo del cerebro fetal, como se trata de un ftalato, para los demás tipos de ftalatos se consideró la misma concentración. Para BPA se seleccionó esa concentración de acuerdo a la exposición involuntaria a través de alimentos de acuerdo con Hernández y colaboradores.

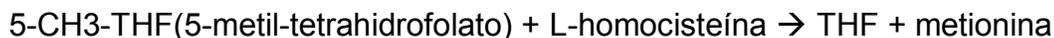
➤ *Medición de actividad enzimática de MS*

Se realizó una adaptación del protocolo descrito por Drummond J. (1995) para un volumen total del ensayo de 200 μL , en placas de 96 pocillos. Se añadía el volumen necesario de cada lisado, para estandarizar a 0.050mg de proteína en el ensayo, se ajustaba el contenido con agua MQ para un total de 98.4 μL , se agregó 16 μL de buffer de fosfatos (pH 7.2) 1.0 M, 8 μL de DTT 500mM, 0.8 μL de Adenosil Metionina 3.8 mM, 0.8 μL de L-homocisteína 100 mM y 16 μL de hidroxicobalamina 500 μM , se realizó una preincubación a 37°C por 5 minuto. Posteriormente se iniciaba la reacción con 20 μL de metil-THF 4.2 mM, se mezcló y la reacción ocurría por 10 minuto a 37°C. La reacción se detenía con 40 μL 5N HCl/60% ácido fórmico y una incubación a 80°C por 10 minuto. Finalmente se enfriaba a temperatura ambiente y se leía la placa en el equipo Epoch® a 350 nm. Se calculó la actividad específica a través del coeficiente de

extinción del CH⁺-THF en ácido = $26.5 \times 10^{-6} \text{ nM}^{-1}$, el volumen de la reacción y el tiempo.

$$A_{350} \text{ corregida} \times \left(\frac{0.2 \text{ mL}}{2.65 \times 10^{-5} \text{ nM}^{-1} \times 10 \text{ min} \times 10^3 \frac{\text{mL}}{\text{L}}} \right)$$

La enzima, metionina sintasa, cataliza la siguiente reacción:



El producto tetrahidrofolato (THF) es detectado espectrofotométricamente por su conversión a 5, 10-metenil-THF:



Y a través de estas reacciones se monitorea la actividad enzimática.

➤ ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD EN LOS MÉTODOS EXPERIMENTALES

La absorbancia medida con el equipo Epoch® corresponde al producto de la conversión del THF a CH⁺-THF, que tiene absorbancia a 350 nm y un coeficiente de extinción de $26.5 \times 10^{-6} \text{ nM}^{-1}$, debido a que las enzimas son específicas, es decir, actúan sobre un solo sustrato, tenemos la certeza de que el producto medido por el espectrofotómetro, se deriva de la reacción que la enzima cataliza. Los resultados presentados corresponden a la actividad enzimática de MS, presentados como la media \pm la desviación estándar.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La línea celular Neuro 2A se cultivó bajo las condiciones descritas en materiales y métodos, para obtener el material intracelular, donde se encuentra la enzima de estudio MS. Para las cajas Petri control, así como para las células expuestas a los EDC, se obtuvieron las concentraciones de proteína de los extractos que se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Concentración de proteína en extracto celular.

MUESTRA	[proteína] (mg/mL)
A	3,089
B	3,190
C	3,030
1 DEHP	0,425
2 DEHP	0,436
1 MBP	0,601
2 MBP	0,476
1 OF	0,526
2 OF	0,443
1 BPA	1,317
2BPA	1,481

A, B, C → Extracto de células control. **OF** → Octilftalato.

Como se puede observar en la tabla 4, la concentración de proteína es desigual para cada uno de los tratamientos empleados debido a la diferencia de la propagación de las células en cada caja. Consecuentemente, se procedió a realizar el ensayo con la estandarización del contenido de proteína a 0.050 mg de proteína, en la siguiente tabla se presentan los valores de absorbancia medidos a 350 nm en el equipo EPOCH.

Tabla 5. Absorbancia medida para los diferentes ensayos a 350 nm.

MUESTRA	ABSORBANCIA A 350 nm	
A	0.444	0.520
B	0.478	0.491
C	0.502	0.478
1 DEHP	0.405	
2 DEHP	0.392	
1 MBP	0.382	
2 MBP	0.382	
1 OF	0.424	
2 OF	0.404	
1 BPA	0.427	0.433
2BPA	0.436	0.430
Blanco	0.331	

A, B, C → Extracto de células control. **OF** → Octilftalato

En la tabla 5 se observa que el menor valor de absorbancia corresponde al Blanco, lo que nos indica que la Metionina sintasa en los extractos celulares se encuentra en su forma activa y cataliza la formación de THF, que es detectado por su conversión a 5, 10-metenil-THF. También es perceptible que los ensayos control (A, B y C) presentan las mayores medidas de absorbancia, lo que podría indicar que la enzima metionina sintasa presente en estos extractos, tiene un metabolismo normal, que será tomado como referencia.

El control de la actividad de la metionina sintasa se basa en el suministro de cobalamina exógena, normalmente hidroxicobalamina (que juega un papel doble) y un reductor como ditiotreitól, utilizados en este ensayo. Específicamente, la MS puede aislarse en 4 formas estables (véase figura 4).

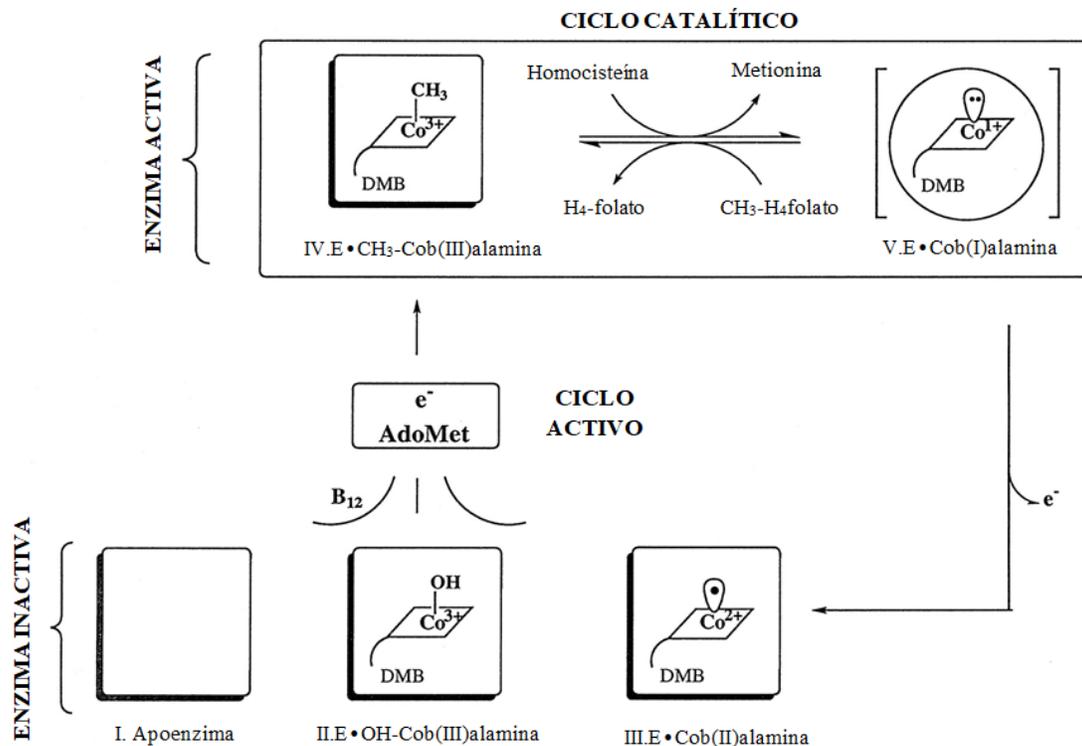


Figura 4. Representación de los distintos estados de oxidación de la metionina sintasa y los requisitos de cada forma para su participación en el ciclo catalítico. DMB se refiere a la base intramolecular dimetilbencimidazol. Adaptada de Chen Z, 1995.

Como puede observarse en la figura 4, una de las formas de MS es una variación de holoenzima, en la que la cobalamina unida está en una "forma activa" (IV , CH₃-cobalamina) y dos se encuentran de una "forma inactiva" (II y III). Las dos últimas especies pueden re-admitirse en el ciclo catalítico en una reacción que es independiente de la cobalamina añadida pero que depende de un sistema reductor y AdoMet. El reclutamiento de la forma de apoenzima (I) para el ciclo catalítico depende de la cobalamina (Chen Z, 1995). Aunque no se comprende la ruta específica de transferencia de electrones, la omisión de OH-cobalamina en el ensayo provoca un cortocircuito en el suministro de equivalentes de electrones a la enzima (Chen Z, 1995).

Las medidas de absorbancia sirvieron de base para la estimación de la actividad enzimática, restando el valor de absorbancia del Blanco para cada muestra y considerando el promedio para las repeticiones. Los resultados se resumen en la tabla 6.

Tabla 6. Actividad específica de Metionina sintasa en extractos intracelulares provenientes de células Neuro 2A.

MUESTRA	Actividad (nmol/min)	Actividad específica (nmol/(min*mg_{prot}))
A	0.1140	2.2792
B	0.1155	2.3094
C	0.1200	2.4000
1 DEHP	0.0558	1.3297
2 DEHP	0.0460	1.0706
1 MBP	0.0385	0.7698
2 MBP	0.0385	0.8189
1 OF	0.0702	1.4038
2 OF	0.0551	1.2521
1 BPA	0.0747	1.4943
2BPA	0.0770	1.5396

A, B, C → Extracto de células control. **OF** → Octilftalato.

Finalmente, en la tabla 7 se resume el valor promedio de la actividad específica en cada uno de los EDC y en el control, junto con el porcentaje de actividad que representa, además de considerar su desviación estándar. Los resultados indican una disminución en la actividad de MS ante la exposición celular de los EDC.

Tabla 7. Valor promedio de la actividad específica de Metionina sintasa, su desviación estándar y el % de actividad que representa.

MUESTRA	Actividad específica (nmol/(min*mg_{prot}))	Desviación estándar	%Actividad
Control	2,3295	0,0629	100%
DEHP	1,2002	0,1832	52%
MBP	0,7944	0,0347	34%
Octilftalato	1,3280	0,1073	57%
BPA	1,5170	0,0320	65%

Deth et al., 2008 presentan una hipótesis en la cual asocian la metilación REDOX con el trastorno del espectro autista. En específico, la inhibición de la metionina sintasa reduce ampliamente la actividad de metilación, siendo ejemplos importantes la metilación del ADN y la metilación de fosfolípidos estimulada por dopamina. La metilación reducida del ADN interfiere con los eventos epigenéticos que son fundamentales para el desarrollo normal. La alteración de la metilación de fosfolípidos estimulada por dopamina limita la sincronización de las redes neuronales dependiente de la frecuencia, reflejada como déficits en la atención y la cognición. Si bien todos los tipos de células están sujetos a efectos similares, que pueden manifestarse como síntomas asociados con el autismo, las células neuronales exhiben una mayor sensibilidad al estrés oxidativo debido al impacto epigenético.

Como puede observarse en la tabla 7, la primera actividad medida corresponde a las condiciones de crecimiento normales, es decir, sin la presencia de un factor ambiental (EDC en específico). Por lo tanto, podemos decir que la actividad específica normal de la enzima Metionina Sintasa, bajo estas condiciones, es de 2.3295 ± 0.0629 nmol/(min*mg_{prot}). Este valor muestra que hay diferencia en las actividades, del cultivo celular control en comparación de

los sometidos a los compuestos disruptores endocrinos presentes en alimentos procesados.

La medición de la actividad de la MS, asociada con los niveles de homocisteína y metil-THF podrían estar directamente relacionados a desequilibrios REDOX en el plasma neuronal (Drummond et al., 1995).

Los ftalatos presentan una estructura base de ácido benceno-1,2-dicarboxílico (ácido ftálico) y se diferencian por la formación de ésteres dialquílicos o arílicos. Las actividades específicas observadas en los cultivos celulares expuestos a DEHP, MBP y Octilftalato fueron 1.2002 ± 0.1832 nmol/(min*mg_{prot}), 0.7944 ± 0.0347 nmol/(min*mg_{prot}) y 1.3280 ± 0.1073 nmol/(min*mg_{prot}) respectivamente. El mono-butil-ftalato mostró la actividad específica más baja de MS, con una reducción al 34% del valor normal, recordando las estructuras presentadas en la tabla 3, esto puede deberse a su grupo carboxílico comúnmente asociado a una mayor reactividad (Lin et al., 2011), lo que causa un mayor desequilibrio para el potencial REDOX de la neurona.

Del mismo modo, en el caso de los otros dos ftalatos también hay una disminución respecto a la actividad de referencia: al 52% para DEHP y al 57% para Octilftalato (Tabla 7). La diferencia es menos marcada entre ellos, conviene recordar que ambos son diésteres. El DEHP es una molécula más ramificada, mientras que el octilftalato es lineal, esta diversidad puede estar proporcionando una forma de estabilidad a la propia molécula, reflejado de igual manera en su alteración REDOX, por esta razón el octilftalato presentó una mayor actividad, debido a que su influencia en el potencial REDOX fue menor, es decir, posiblemente el DEHP está favoreciendo el contenido intracelular de ROS, interviniendo en su formación o afectando las defensas antioxidantes. Existen escasos estudios de la toxicidad de los principales ftalatos a los que los humanos están expuestos, no se conoce con exactitud los mecanismos de acción, que probablemente son múltiples y variables.

Nuestros resultados son congruentes con otros hallazgos descritos en la literatura científica. Erkekoglu et al. (2012) evaluaron el efecto del DEHP en células de MA-10 Leydig (línea celular modelo derivada del tumor de células de Leydig de ratón), y reportaron una disminución significativa de aproximadamente 40% de GSH con respecto al control, cuando se sometió a una exposición de 3 mM de DEHP.

Además fue medida la producción de ROS (especies reactivas de oxígeno), alcanzando en el punto de tiempo de 30 min aproximadamente 2.4 veces el nivel del tiempo cero, y después de 60 min de incubación, el aumento fue de aproximadamente 3.5 veces, bajo la misma concentración de DEHP. Lo que se concluye, es que al menos uno de los mecanismos subyacentes a la toxicidad reproductiva del DEHP, podría ser la inducción de ROS intracelulares y/o provocar alteraciones en antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos intracelulares, produciendo así estrés oxidativo (Erkekoglu, 2012).

Como se mencionó anteriormente, existe una creciente evidencia de estrés oxidativo e inflamación en el autismo. Los niveles de cistationina, cisteína y GSH se reducen cada uno junto con la relación GSH / GSSG, lo que refleja un aumento del estrés oxidativo. El GSH intracelular es un regulador REDOX clave, que es crucial para múltiples funciones biológicas.

Por último, la exposición de 24h al BPA redujo la actividad específica de MS a 1.5170 ± 0.0320 nmol/(min*mg_{prot}) en consecuencia al 65% de la normal. Su estructura integra anillos fenólicos (anillo bencénico con un grupo OH) unidos por la parte central a una molécula de propano de forma simétrica. El BPA aumenta la producción de radicales libres y disminuye la efectividad de los mecanismos de defensa frente a estrés oxidativo (García J. 2015). Por lo anterior se ve alterado el balance REDOX y por lo tanto puede estar limitando la actividad de Metionina sintasa, además se ha informado que el bisfenol A no se metaboliza fácilmente en niños con autismo, lo que puede conducir a un tiempo de exposición celular prolongado. (Stein et al., 2015).

Otros estudios de exposición a BPA en células, han reportado resultados que se involucran con estrés oxidativo y con el consecuente daño del material genético. A concentraciones de 150 μM , aumentan los niveles de ROS (Gassman y col., 2012).

Por ejemplo, en un estudio *in vitro* realizado en espermatozoides bovinos, los resultados indicaron que en todos los grupos experimentales la cantidad de superóxido aumentó en comparación con el grupo de control (Lucacova et al., 2015). Otro trabajo, realizado en embriones del pez spp *Danio Rerio*, indican que BPA induce la formación de ROS y en consecuencia también induce daño en el ADN por disminución en la metilación del ADN, aunque se desconoce el mecanismo que genera esta respuesta (Wang et al., 2013; Olsvik P. 2019).

En la figura 7 se muestran los mismos valores reportados en la Tabla 7 de la actividad específica de MS. Se observa la diferencia significativa que existe entre las diferentes condiciones, lo que es reforzado considerando el ANOVA realizado (Anexo 1), donde se valida la pertinencia de las conclusiones.

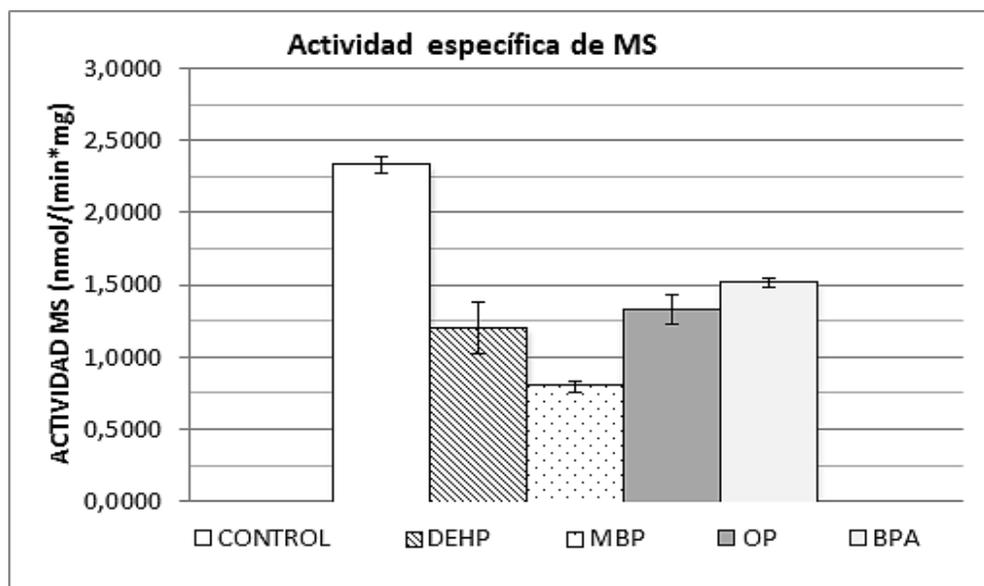


Figura 7. Efecto de Compuestos Disruptores Endocrinos en la actividad específica de Metonina Sintasa, en cultivo *in vitro* de células neuronales.

En resumen, los cultivos de células neuronales *in vitro* fueron expuestos 24 h a dos EDC de los más comunes reportados en los alimentos: ftalatos y bisfenol A (BPA). Como resultado, la actividad enzimática de la MS se redujo hasta 34% en comparación con los cultivos que no sufrieron exposición a EDC.

Los resultados obtenidos indican el efecto potencial que tienen los contaminantes ingeridos vía alimentación sobre la actividad enzimática de MS y que pueden desencadenar en una disminución de la metilación del ADN asociado en padecimientos neurocognitivos y cronológicos, como lo es el TEA.

La exposición a este tipo de contaminantes emergentes es involuntaria y diaria, lo cual es alarmante especialmente para poblaciones de alto riesgo tales como: el binomio madre-hijo en el embarazo, bebés y niños.

5. CONCLUSIONES

Se desarrolló con éxito el ensayo, a partir del cultivo *in vitro* de la línea celular Neuro 2A para determinar la actividad enzimática de metionina sintasa (MS), calculando una actividad específica de 2.3295 ± 0.0629 nmol/(min*mg_{prot}).

Cabe concluir que la influencia de EDC sobre las células provocó una disminución de la actividad enzimática específica para la MS, obteniendo 1.5170 ± 0.0320 nmol/(min*mg_{prot}) para BPA, 1.3280 ± 0.1073 nmol/(min*mg_{prot}) para octilftalato, 1.2002 ± 0.1832 nmol/(min*mg_{prot}) para DEHP y 0.7944 ± 0.0347 nmol/(min*mg_{prot}) para MBP, esto acuñado a una afectación metabólica por estrés oxidativo, es decir, un desequilibrio en el estado REDOX celular, de acuerdo a la literatura consultada.

Los resultados demuestran que los EDC presentes en los alimentos pueden reducir significativamente la actividad enzimática de la metionina sintasa en las neuronas en un modelo de cultivo *in vitro*, de manera que podría ser un indicio de posibles cambios epigenéticos asociados con el TEA.

Como trabajo futuro se plantea una investigación en el área de antioxidantes para conocer si pueden tener un efecto positivo o regulador en la actividad enzimática de la MS en modelos *in vitro* y modelos *in vivo*.

Estos estudios podrían dar lugar a nuevas propuestas para el tratamiento del TEA, especialmente durante la lactancia y la etapa gestacional.

6. ANEXO

A continuación se presenta el análisis de varianza (ANOVA) de la actividad enzimática de metionina sintasa para cada una de las condiciones de este trabajo.

Ho: CONTROL=DEHP=MBP=OF=BPA

$F_{cal} < F_{tab}$

Hi: Al menos una actividad específica de las muestras es diferente al 95% de confianza

$F_{cal} > F_{tab}$

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	3,29731003	4	0,82432751	89,5867829	1,7643E-05	4,53367695
Dentro de los grupos	0,05520865	6	0,00920144			
Total	3,35251868	10				

Ho se rechaza, el tipo de muestra afecta la actividad específica.

7. REFERENCIAS

- Ajax C. 2019. Día Mundial de Concienciación sobre el Autismo. [En línea], (actualizado al 21 de enero de 2019) Disponible en <https://www.gob.mx/conadis/es/articulos/dia-mundial-de-concienciacion-sobre-el-autismo-2019?idiom=es>
- Albertini DF. (2013) Folate forever--all methyl group donations welcome!. *J Assist Reprod Genet.*; 30(5):607-8.
- Anadón A. (2009) "Contaminantes emergentes de los alimentos. Evaluación del riesgo toxicológico", *Revista de Toxicología*, vol. 26, núm. 1, España, pp. 21-22.
- Ashwood P. (2010) Elevated plasma cytokines in autism spectrum disorders provide evidence of immune dysfunction and are associated with impaired behavioral outcome. *Brain Behav Immun*; 25: 40–45.
- Bandarian V, et. al.(2002) Domain alternation switches B(12)-dependent methionine synthase to the activation conformation. *Nat Struct Biol*;9:53–6.
- Bonefeld-Jorgensen EC (2005) Effect of pesticides on estrogen receptor transactivation in vitro: a comparison of stable transfected MVLN and transient transfected MCF-7 cells. *Mol Cell Endocrinol*; 244: 20–30.
- Bonefeld-Jorgensen EC. (2010) Biomonitoring in Greenland: human biomarkers of exposure and effects - a short review. *Rural Remote Health*; 10: 1362.
- Bradley E. (2013) Exposure to phthalic acid, phthalate diesters and phthalate monoesters from foodstuffs: UK total diet study results. *Food additives and contaminants: Parte A Vol. 30, No. 4*, 735–742.
- Braun JM. (2011) Impact of Early-Life Bisphenol A Exposure on Behavior and Executive Function in Children. *Pediatrics Noviembre*; 128 (5) 873-882.
- Braun JM. (2014) Gestational exposure to endocrine-disrupting chemicals and reciprocal social, repetitive, and stereotypic behaviors in 4- and 5-year-old children: the HOME study. *Environ Health Perspect*; 122(5):513-20.

- Braun JM. (2017). Associations of Prenatal Urinary Bisphenol A Concentrations with Child Behaviors and Cognitive Abilities. *Environ Health Perspect*;125(6):067008.
- Buie T et al. (2010) Evaluation, diagnosis, and treatment of gastrointestinal disorders in individuals with ASDs: a consensus report. *Pediatrics*; 12.
- Cacho J. (2012). Determination of alkylphenols and phthalate esters in vegetables and migration studies from their packages by means of stir bar sorptive extraction coupled to gas chromatography– mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1241, 21– 27.
- Chauhan V.(2006) Oxidative stress in autism. *Pathophysiology*;13:171–81.
- Chen Z. (1995) Demonstration That Mammalian Methionine Synthases Are Predominantly Cobalamin-loaded, *The Journal of Biological Chemistry*, 270.
- Child Dev. (2013) From genes to environment: using integrative genomics to build a "systems-level" understanding of autism spectrum disorders. *Hu VW*; 84(1):89-103.
- Crini, G. & Badot, P. M. (2007). *Traitement et épuración des eaux industriell es*, (Ed.), PUFC, Besancon, Francia, p. 356.
- Curran LK, et al. (2007) Behaviors associated with fever in children with autism spectrum disorders. *Pediatrics* 120(6):e1386–e1392.
- Deth R. (2008) How environmental and genetic factors combine to cause autism:A redox/methylation hypothesis, *NeuroToxicology* 29, 190–201.
- Deth R. (2014) *Redox/Methylation Theory and Autism*, Springer Science+Business Media New York, DOI 10.1007/978-1-4614-4788-7_78, páginas 1389-1406.
- Dixon M. (1996) The structure of the C-terminal domain of methionine synthase: presenting S-adenosylmethionine for reductive methylation of B12, *Structure*, Volume 4, Issue 11, páginas 1263-1275.
- Drummond J. (1995) Characterization of nonradioactive assays for cobalamin-dependent and cobalamin-independent methionine synthase enzymes, *Analytical Biochemistry*, volumen 228, páginas 323-329.

- Erkekoglu P. (2010) Evaluation of cytotoxicity and oxidative DNA damaging effects of di(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP) and mono(2-ethylhexyl)-phthalate (MEHP) on MA-10 Leydig cells and protection by selenium, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 52-62.
- Evans JC. (2004) Structures of the N-terminal modules imply large domain motions during catalysis by methionine synthase. *Proc Natl Acad Sci USA*; 101:3729–36.
- Frackowiak J. (2013) The link between intraneuronal N-truncated amyloid- β peptide and oxidatively modified lipids in idiopathic autism and dup(15q11.2-q13)/autism. *Acta Neuropathol Commun* 1(1):61.
- García-Gómez C. (2011) Contaminantes emergentes: efectos y tratamientos de remoción, *Revista Química Viva*, Número 2, año 10.
- García J. (2015) Toxicidad de Bisfenol A: Revisión, *Rev. Toxicol*, 32, páginas 144-160.
- García M. (2018) Ftalatos en alimentos de la canasta básica mexicana, *Revista Latinoamericana el Ambiente y las Ciencias* 9(21):1180 -1191 2018.
- García R. (2012) Epigenética: definición, bases moleculares e implicaciones en la salud y en la evolución humana. *Rev. Cienc. Salud*; 10 (1):59-71.
- Gassman NR. (2012) Bisphenol A promotes cell survival following oxidative DNA damage in mouse fibroblasts.
- Ghisari M. (2009) Effects of plasticizers and their mixtures on estrogen receptor and thyroid hormone functions. *Toxicol Lett.*; 189:67–77.
- Hernández K. (2019) Exposure to bisphenol A: current levels from food intake are toxic to human cells, *Molecular Biology Reports*, volumen 46, páginas 2555-2559.
- Hodgson N. (2013) Soluble oligomers of amyloid- β cause changes in redox state, DNA methylation, and gene transcription by inhibiting EAAT3 mediated cysteine uptake, *J Alzheimers Dis*; 36(1):197-209. doi: 10.3233/JAD-130101.
- Holderbeke., y col. (2014). Determination of contamination pathways of phthalates in food products sold on the Belgian market. *Environmental research*, 134, 345-352.

- Hollander E. (2013) Translational Experimental Therapeutics of Inflammation and Fever in Autism Spectrum Disorder: Hot Tubs, Locus Coeruleus Modulation and Helminth Therapy. American College of Neuropsychopharmacology 52nd Annual Meeting (American College of Neuropsychopharmacology) Dic. 12, 2013, Hollywood, FL.
- Hum J. (2013) Epigenomic strategies at the interface of genetic and environmental risk factors for autism. *LaSalle JM*. Julio; 58(7):396-401.
- James J. (2004) Metabolic biomarkers of increased oxidative stress and impaired methylation capacity in children with autism, *The American Journal of Clinical Nutrition*, Volumen 80, páginas 1611–1617.
- James SJ. (2006) Metabolic endophenotype and related genotypes are associated with oxidative stress in children with autism. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*; 141: 947–956.
- Jarrett J. (1997) Purification and assay of cobalamin-dependent methionine synthase from *Escherichia coli*, *Methods Enzymol*, 281, páginas 196-213.
- Jensen K. (2005) Electronic Structure of Cob(I)alamin: The Story of an Unusual Nucleophile, *J. Phys. Chem. B*, 109, 20, 10505–10512.
- Kajta M. (2013) Impact of endocrine-disrupting chemicals on neural development and the onset of neurological disorders. *Pharmacol Rep.*; 65(6):1632-9.
- Kjeldsen LS. (2013) Perfluorinated compounds affect the function of sex hormone receptors. *Environ Sci Pollut Res Int.*; 20: 8031–44.
- Kouzarides T. (2007) Chromatin modifications and their function. *Cell.*; 128 (4):693-705.
- Kräutler B. (2011) Biochemistry of B12-Cofactors in Human Metabolism, *Water Soluble Vitamins*, páginas 323-346.
- Kruger T. (2008) Plastic components affect the activation of the aryl hydrocarbon and the androgen receptor. *Toxicology*; 246:112–23.
- Lai MC. (2014) Autism. *Lancet*. 2014 Mar 8; 383(9920):896-910.

- Lin C. 2011. Activation of Trim17 by PPAR γ is involved in Di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP)-induced apoptosis on Neuro-2a cells, *Toxicology Letters*, volumen 206, páginas 245-251.
- Long M (2003). Effects of currently used pesticides in the AhR-CALUX assay: comparison between the human TV101L and the rat H4IIE cell line. *Toxicology*; 194: 77–93.
- Lucacova J. (2015) Dose- and time-dependent effects of bisphenol A on bovine spermatozoa in vitro, *Journal of Environmental Science and Health Part A Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering* 50(7):669-76.
- Matthwes R. (2002) Domain alternation switches B12-dependent methionine synthase to the activation conformation, *Nat Struct Mol Biol* 9, 53–56.
- Millá M. (2009) Atención temprana y programas de intervención específica en el trastorno del espectro autista, *REV NEUROL*, 48 (Supl 2), S47-S52.
- Ming X, Brimacombe M, Chaaban J, Zimmerman-Bier B, Wagner GC. (2008) Autism spectrum disorders: concurrent clinical disorders. *J Child Neurol*; 23: 6–13.
- Miodovnik A. (2011) Endocrine disruptors and childhood social impairment. *NeuroToxicology* Volumen 32, Número 2,, páginas 261-267.
- Moosa A. (2018) Are endocrine disrupting compounds environmental risk factors for autism spectrum disorder?, *Hormones and Behavior*, 101, páginas 13-21.
- Napoli E. (2014) Deficits in bioenergetics and impaired immune response in granulocytes from children with autism. *Pediatrics* 133: e1405–e1410.
- Olsvik P. (2019) Associations Between Behavioral Effects of Bisphenol A and DNA Methylation in Zebrafish Embryos, *Frontiers in genetics*, 10, 184.
- OMS. (2019) Trastornos del espectro autista. [En línea], (actualizado al 21 de enero de 2020) Disponible en <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/autism-spectrum-disorders>
- Paul B. (2018) Cysteine metabolism in neuronal redox homeostasis, *Trends Pharmacol Sci*, 39 (5), páginas 513-524.

- Petrossian T. (2011) Uncovering the human methyltransferasome, *Mol Cell Proteomics*, MCP. 2011;10(1):M110.000976.
- Quintana D. (2015) Biomarcadores genéticos y metabólicos en los trastornos del espectro autista, *Rev Cubana Genet Comunit.* 2015;9(3):14-22.
- Rangel-Rivera DA (2015). Consumo de ácido fólico en el embarazo y reducción del riesgo de trastornos del espectro autista. *MÉD UIS.* 2015; 28(3):327-36.
- Rivas A. (2004) Exposición humana a disruptores endocrinos, *Ecosistemas*, 13, páginas 7-12.
- Ronald A. (2010) Prenatal Maternal Stress Associated with ADHD and Autistic Traits in early Childhood. *Front Psychol.* 2010; (1):223.
- Rossignol DA, Frye RE . Mitochondrial dysfunction in autism spectrum disorders: a systematic review and meta-analysis. *Mol Psychiatry*
- Roth TL. (2012) Epigenetics of neurobiology and behavior during development and adulthood. *Dev Psychobiol.* 2012 Sep; 54(6):590-7.
- Santos-Rosa H, Caldas C. (2005) Chromatin modifier enzymes, the histone code and cancer. *Eur. J Cancer*; 41 (16):2381-402.
- Sarrouilhe D. (2017) Autism spectrum disorders and bisphenol A: Is serotonin the lacking link in the chain?, *Encephale*, Aug;43(4):402-404.
- Schecter A., Lobber M. (2013) Phthalate concentration and dietary exposure from food purchased in New York State. *Environmental Health Perspectives* Vol. 121, num. 4
- Sharma A, (1999) *Psiquiatría*. Mayo de 1999; 4 (3): 235-46.
- Siniscalco D. (2013) Epigenetic findings in autism: new perspectives for therapy. *Int J Environ Res Public Health.* 2013 Sep 11; 10(9):4261-73.
- Stein P. (2015) Bisphenol A Exposure in Children With Autism Spectrum Disorders. *Volumen 8, Issue3*, páginas 272-283.

- Stetler RA, et al. (2010) Heat shock proteins: Cellular and molecular mechanisms in the central nervous system. *Prog Neurobiol* 92(2):184–211.
- Sun H. (2012). Development of Multiresidue Analysis for Twenty Phthalate Esters in Edible Vegetable Oils by Microwave-Assisted Extraction–Gel Permeation Chromatography–Solid Phase Extraction–Gas Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*60, 5532–5539.
- Vargas DL. (2005) Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism. *Ann Neurol* 57(1):67–81.
- Waly M. Deth R. (2004) Activation of methionine synthase by insulin-like growth factor-1 and dopamine: a target for neurodevelopmental toxins and thimerosal, *Mol Psychiatry*. 2004 Apr;9(4):358-70.
- Wang X. (2013) Bisphenol A affects axonal growth, musculature and motor behavior in developing zebrafish. *Aquatic toxicology*.142:104-113.
- Wiggins JL, et al. (2011) Using a self-organizing map algorithm to detect age-related changes in functional connectivity during rest in autism spectrum disorders. *Brain Res* 1380:187–197.
- World Health Organization. United Nations Environment Programme. State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals. United Nations Environment Programme and the World Health Organization; Geneva, Switzerland: 2012.
- Zhang Y. (1992) A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: Isolation and elucidation of structure. *Proc Natl Acad Sci USA* 89(6):2399–2403.
- Zhang Y. (1994) Anticarcinogenic activities of sulforaphane and structurally related synthetic norbornyl isothiocyanates. *Proc Natl Acad Sci USA* 91(8):3147–3150.