



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE CIENCIAS  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**Estudio sobre el efecto de contaminantes emergentes en  
la actividad enzimática de metionina sintasa en  
neuroblastoma SH-SY5Y asociado con el autismo**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**GABRIELA GARCÍA CERÓN**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ROEB GARCÍA ARRAZOLA  
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM**

**COMITÉ TUTOR: DRA. YAZMÍN RAMIRO CORTÉS  
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM  
DR. MARCOS FRANCISCO ROSETTI SCIUTTO  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM**

MÉXICO, CD. MX., CIUDAD UNIVERSITARIA

JUNIO, 2023



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.





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
FACULTAD DE CIENCIAS  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**Estudio sobre el efecto de contaminantes emergentes en  
la actividad enzimática de metionina sintasa en  
neuroblastoma SH-SY5Y asociado con el autismo**

# **TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**GABRIELA GARCÍA CERÓN**

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ROEB GARCÍA ARRAZOLA  
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. YAZMÍN RAMIRO CORTÉS  
INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR, UNAM  
DR. MARCOS FRANCISCO ROSETTI SCIUTTO  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

DIVISIÓN ACADÉMICA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

OFICIO FCIE/DAIP/176/2023

ASUNTO: Oficio de Jurado

**M. en C. Ivonne Ramírez Wence**  
**Directora General de Administración Escolar, UNAM**  
**Presente**

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **16 de enero de 2023** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biología Experimental** de la estudiante **GARCÍA CERÓN GABRIELA** con número de cuenta **311187274** con la tesis titulada "**Estudio sobre el efecto de contaminantes emergentes en la actividad enzimática de metionina sintasa en neuroblastoma SH-SY5Y asociado con el autismo**", realizada bajo la dirección del **DR. ROEB GARCÍA ARRAZOLA**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: **DR. MANUEL GUTIÉRREZ AGUILAR**  
Vocal: **DRA RUTH GUTIÉRREZ AGUILAR**  
Vocal: **DRA. DANIELA ARAIZA OLIVERA TORO**  
Vocal: **DRA. SOFÍA MORÁN RAMOS**  
Secretario: **DRA. YAZMÍN RAMIRO CORTÉS**

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 12 de abril de 2023

**COORDINADOR DEL PROGRAMA**



**DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA**



## **Agradecimientos institucionales**

Al posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM, por brindarme los medios para continuar con mi desarrollo y crecimiento en el área de la investigación científica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme la beca 788719 a través del Programa de Becas Nacionales para realizar mis estudios de maestría.

Un agradecimiento especial a mi tutor principal, el Dr. Roeb García Arrazola, por la aceptación en su equipo de investigación, por la paciencia, apoyo y confianza que me han ayudado a madurar tanto personalmente como en el ámbito de la ciencia y que junto con mi comité tutor, la Dra. Yazmín Ramiro Cortés y el Dr. Marcos Rosetti, se han encargado de guiarme y respaldarme en la elaboración de este proyecto, por las críticas siempre positivas que a lo largo de estos cuatro semestres me impulsaron a mejorar y comprender más allá de lo propuesto, que a su vez promovieron un ambiente positivo de seguridad y productividad.

## **Agradecimientos a título personal**

A mi alma mater, la UNAM, por seguir dándome el privilegio de formar parte de su comunidad permitiendo ampliar mis conocimientos y formación tanto personal como académica.

A mi tutor, el Dr. Roeb García Arrazola, gracias porque a lo largo de estos años ha guiado un aspecto muy valioso en mi vida, mi formación científica. También agradezco la paciencia, atención y disposición para debatir las nuevas propuestas de nuestros proyectos de investigación, pues eso nos fortalece como equipo de trabajo.

A la Unidad de investigación preclínica (UNIPREC), por darnos las facilidades y permitirnos realizar los experimentos de cultivo celular en su laboratorio. Al Dr. Mariano y el M. en C. Hugo, por permitirme compartir su espacio de trabajo, por apoyarme en el proceso de organización y desarrollo del diseño experimental, por su paciencia en el momento de explicarme y ayudarme a resolver mis dudas, fue importante para lograr desarrollar este proyecto y poder mejorar para cumplir mis objetivos.

Un agradecimiento especial al Dr. Manuel Gutierrez, por permitirme realizar los experimentos de la actividad enzimática en su laboratorio. Gracias por las atenciones y paciencia que me brindó para poder desarrollar este proyecto, fue muy valioso para mí, su paciencia y enseñanzas me ayudaron a mejorar tanto en este trabajo como en la vida.

Al Dr. Marcos Rosetti, gracias por su paciencia, apoyo para mejorar y realizar las gráficas, fue esencial para el análisis del proyecto.

Al Dr. Miquel Gimeno y su alumna la Dra. Carmen, por apoyarnos al proporcionarnos el poli-gálico (PGAL).

A los miembros del jurado de examen: Dra. Yazmín Ramiro, Dra. Sofía Morán, Dra. Daniela Araiza, Dra. Ruth Gutiérrez y el Dr. Manuel Gutiérrez, por las atenciones y tiempo dedicado a la revisión de este proyecto, así como sus valiosas aportaciones para mejorar y complementarlo.

## **Dedicatorias**

A mis padres, Lilia y Paulino, quienes siempre me han guiado, cuidado, orientado y apoyado incondicionalmente en la toma de mis decisiones, tanto personales como académicas. Que al momento de decidir estudiar un posgrado, se sintieron orgullosos y me motivaron a seguir adelante.

A mi hermano, Pablo, por el gran soporte que ha sido desde hace 28 años, que siempre con paciencia busca la forma de ayudarme y que además siempre tiene las palabras adecuadas para mostrar su apoyo. También por siempre compartir momentos de calidad donde no falta la risa y diversión.

A mi tía, Irma, quién desde mi existencia se ha preocupado por mi bienestar mostrándome su apoyo en todo momento.

A mi amiga, Ale Maruri, que en esta etapa se volvió muy cercana a mí y siempre me ha mostrado su cariño y apoyo para impulsarme a mejorar tanto personalmente como académicamente.

A mi amiga, Xime, que siempre está para mí, para mostrarme su apoyo, paciencia, cariño y con quien siempre disfruto compartir momentos.

A mis amigos, Aleida, Karen y Miguel, que siempre mostraron su sincero apoyo para este proceso importante del posgrado, me apoyaron estudiando y motivándome a lograrlo.

A mis amigos Viri, Maffer, Mariana, Cintya, Bris, Fer, Elena, Alfi, Pepelpunk, Yayo, Rojo y Proo porque siempre tiene un momento para brindarme su compañía, comprensión, apoyo y soporte, que me han ayudado a crecer en todos los sentidos.

A mis amigos y compañeros de lab., Iván, Naomi, Ángel y Alberto, por compartir este espacio de trabajo y el apoyo mutuo para lograr nuestra mejora y una sana convivencia.

*“A veces el mundo se ve claramente y otras simplemente no se ve”.*

Freeman, 1993.

Fuente: Percepción sensorial en autismo y síndrome de asperger,  
por Olga Bogdashina.

# Índice

Lista de figuras.....	ii
Lista de tablas.....	ii
Resumen.....	1
Abstract.....	2
1. Introducción.....	3
2. Marco teórico.....	5
2.1 Compuestos disruptores endocrinos (EDC)	
2.2. EDC presentes en alimentos	
2.3. Asociación de los EDC con el trastorno de espectro autista (TEA)	
2.4. Metionina sintasa.	
2.5. Metabolismo neuronal redox de metionina sintasa (MS)	
2.6. Metilación de ADN mediado por MS	
2.7. Estrés oxidativo y TEA	
2.8. Reguladores redox	
3. Hipótesis.....	21
3.1. Objetivo general	
3.1.1. Objetivos particulares	
4. Materiales y Métodos.....	22
4.1. Materiales	
4.2. Cultivo celular	
4.3. Propagación celular	
4.4. Exposición a diferentes sustratos (variedad de EDC)	
4.5. Exposición a diferentes moléculas reguladoras redox	
4.6 Citotoxicidad	
4.7. Lisis celular y cuantificación de proteína	
4.8. Medición enzimática de MS	
4.9. Análisis estadístico	
5. Diseño experimental.....	27
6. Resultados y Discusión.....	28
6.1. Cultivo celular	
6.2. Citotoxicidad	
6.3. Actividad enzimática de MS	
7. Conclusiones.....	42
8. Perspectivas.....	43
9. Referencias bibliográficas.....	44

## Lista de figuras

**Figura 1.** Clasificación y ejemplo de los compuestos disruptores endocrinos (EDC).

**Figura 2.** Estructura de la metionina sintasa (MS).

**Figura 3.** Vía de la metionina sintasa (MS).

**Figura 4.** Vías redox relacionadas con la metilación en neuronas.

**Figura 5.** Papel del estrés oxidativo en el neurodesarrollo.

**Figura 6.** Hipótesis de metilación redox del ADN para TEA.

**Figura 7.** Diseño experimental empleado para el desarrollo del proyecto.

**Figura 8.** Efecto del tratamiento 24h de EDC (DEHP y MBP) en cultivo *in vitro* de neuroblastomas SH-SY5Y.

**Figura 9.** Efecto del tratamiento 24h de moléculas reguladoras redox en cultivo *in vitro* de neuroblastomas SH-SY5Y.

**Figura 10.** Citotoxicidad (%) de EDCs y moléculas reguladoras redox a diferentes concentraciones en cultivo *in vitro* de neuroblastomas SH-SY5Y en tratamientos de 24h.

**Figura 11.** Actividad enzimática específica de Metionina Sintasa en cultivo *in vitro* de neuroblastomas SH-SY5Y con los diferentes tratamientos de 24h.

## Lista de tablas

**Tabla 1.** Estudios de EDC asociado con TEA o desorden neurocognitivo.

**Tabla 2.** Propagación de cultivo celular de neuroblastoma SH-SY5Y.

**Tabla 3.** Sustratos -EDC- utilizados y concentraciones.

**Tabla 4.** Moléculas reguladoras redox utilizadas y concentraciones.

**Tabla 5.** Actividad específica de metionina sintasa obtenida a partir de cultivo *in vitro* de neuroblastomas SH-SY5Y con los diferentes tratamientos y pre-tratamientos.

## Resumen

El Trastorno del Espectro Autista (TEA) es un trastorno neurocognitivo caracterizado por una interacción social atípica de etiología desconocida. Recientemente, se ha propuesto que el TEA está asociado a un desequilibrio redox en las neuronas causado por la exposición involuntaria del feto a compuestos alteradores endocrinos (EDC) durante el embarazo o las primeras etapas de la vida. Los EDC pueden encontrarse en los alimentos. Su origen es diverso (p.ej. envases, agua de riego, etc.) y aunque se encuentran en bajas concentraciones (ppm o ppb) son capaces de alterar las funciones endocrinas, conduciendo a la producción de estrés oxidativo y provocando cambios en la relación de metabolitos relacionados con la actividad de la metionina sintasa (MS).

En el presente trabajo, se evaluó in vitro la viabilidad de cultivos de células neuronales con los EDCs más comunes reportados en alimentos: los ftalatos a diferentes concentraciones. Los cultivos se expusieron a los EDCs en tratamientos de 24 h con el fin de identificar la actividad específica de la MS.

Como resultado, la actividad enzimática de los MS varió significativamente en el aumento o disminución de la actividad de los MS en comparación con los cultivos que no fueron expuestos a EDC o moléculas reguladoras redox. Nuestros resultados demuestran que algunos compuestos disruptores endocrinos presentes en los alimentos pueden alterar de forma significativa la actividad enzimática de la metionina sintasa en las neuronas, dando lugar a posibles cambios asociados al autismo.

**Abstract:**

Autism Spectrum Disorder (ASD) is a neurocognitive disorder characterized by atypical social interaction due to unknown etiology. Recently, ASD has been proposed to be associated to redox imbalance in neurons caused by involuntary fetal exposure to Endocrine Disrupting Compounds (EDCs) during pregnancy or early life-stages. EDCs can be found in food. Their origin is diverse (e.g. packaging, irrigation water, etc.) and although they are found in low concentrations (ppm or ppb) they are capable of altering endocrine functions, leading to the production of oxidative stress and causing changes in the ratio of metabolites related to methionine synthase (MS) activity.

In the present work, the viability of neuronal cell cultures was evaluated in vitro with the most common EDCs reported in food: phthalates at different concentrations. Cultures were exposed to EDCs in 24 h treatments in order to identify the specific MS activity.

As a result, enzymatic activity of MS was significant variation in the increase or decrease of MS activity in comparison to cultures that were not exposed to EDCs or redox regulatory molecules. Our results demonstrate that some endocrine disrupting compounds in food can alter significantly the enzymatic activity of methionine synthase in neurons, leading to possible changes associated with autism.

## 1. Introducción

El trastorno de espectro autista (TEA) es una afección del neurodesarrollo que presenta algunos síntomas principales, como alteraciones en la interacción y comunicación social, conductas, intereses o actividades restrictivas y repetitivas, déficits en el lenguaje verbal y no verbal, y alteraciones en la percepción sensorial (American Psychiatric Association, 2013). En la actualidad, se ha observado un incremento en su incidencia: 1 de cada 100 niños son diagnosticados con TEA (Zeidan *et al.*, 2022). Su etiología aún es desconocida; sin embargo, se atribuyen diversos factores, principalmente ambientales y genéticos (Hodges *et al.*, 2020). Respecto a los ambientales, los humanos estamos expuestos a estos factores a través de contaminantes en el aire, agua o alimentos.

Específicamente, los contaminantes emergentes son sustancias o mezclas exógenas cuya exposición hacia los humanos se da principalmente por la ingesta de los alimentos procesados (Muncker J., 2009). Su origen es diverso (ej. empaques, agua de riego, etc.), y aunque se encuentran en bajas concentraciones (partes por millón (ppm) o partes por billón (ppb)), estos son capaces de alterar las funciones endocrinas (García C., 2012) y consecuentemente causar efectos adversos para la salud en un organismo o su progenie (WHO-UNEP, 2013).

Se propone que los contaminantes emergentes y su efecto como disruptores endocrinos puede ser una pieza clave para identificar las causas del TEA (Braun Joe M. 2012). El cerebro es susceptible a las agresiones ambientales y, en etapas tempranas del desarrollo, la desintoxicación con sustancias químicas es menos eficiente que en etapas adultas. Lo anterior puede causar una desregulación en el metabolismo conduciendo a la producción de estrés oxidativo. El estrés oxidativo puede resultar en alteraciones estructurales y funcionales del sistema nervioso central, tales como: variación en mecanismos de inflamación, daño a las membranas celulares, fenómenos de autoinmunidad, daño en la síntesis de proteínas y metilación del ADN, muerte celular, afección en las sinapsis y déficit neurológico (Noris-García *et al.*, 2013; Quintana D., 2015).

La relación entre los agentes ambientales y el incremento del estrés oxidativo se refleja principalmente en la actividad de la enzima metionina sintasa (MS). Deth *et al.* en 2014 propusieron una hipótesis/mecanismo de metilación redox del ADN asociado al TEA, basado en estudios *in vitro* de neuroblastoma SH-SY5Y. Estos autores estudian la relación metabólica entre el estrés oxidativo y la metilación del ADN mediada por la actividad de MS en un proceso dependiente de cisteína y glutatión (conformado por glicina, cisteína y glutamato) dentro de su ruta metabólica.

En específico, la homeostasis redox es producto del intercambio de protones en el glutatión, resultando en un potente antioxidante (Chen *et al.*, 2021). Por ejemplo, se ha encontrado en niños con TEA una disminución significativa del 35% en los niveles de glutatión reducido (GSH) en plasma.

Con base en todo lo anterior, el objetivo del presente estudio es evaluar si la exposición *in vitro* de células de neuroblastoma SH-SY5Y a contaminantes emergentes presentes en alimentos, tiene un efecto en la actividad enzimática de MS, y de esta forma demostrar el efecto negativo de los contaminantes emergentes tienen sobre células de origen neuronal y su posible participación en el TEA.

## 2. Marco teórico

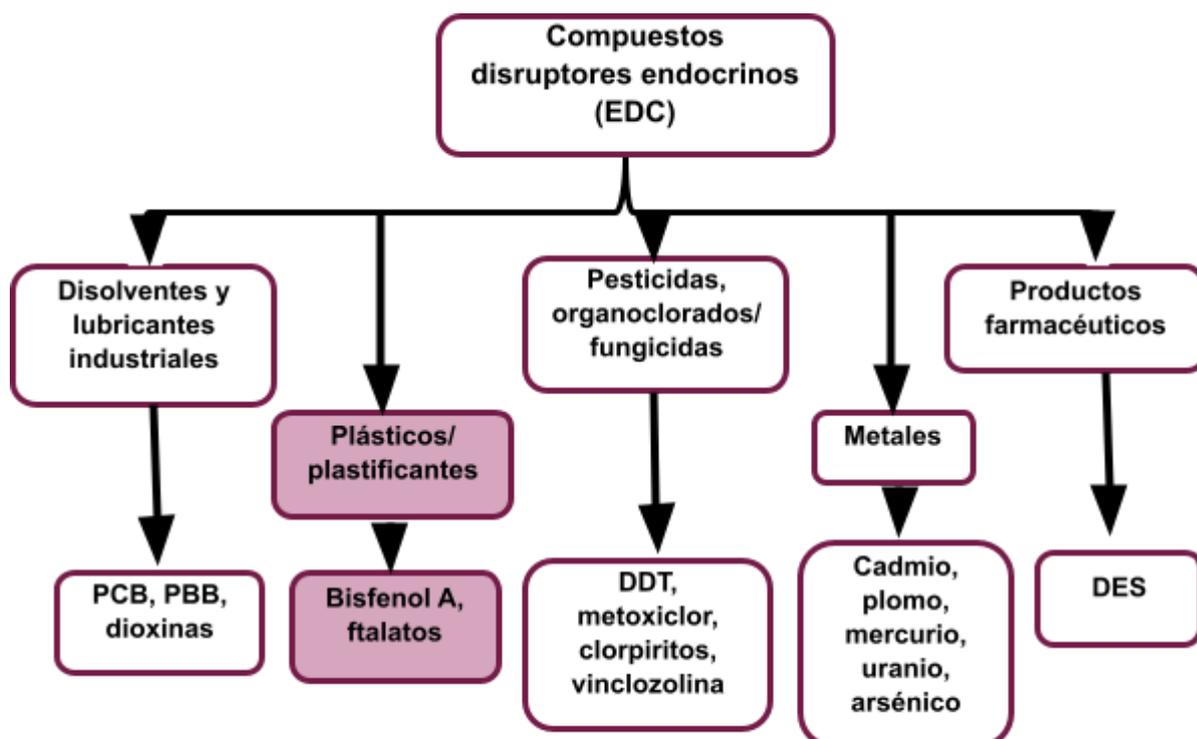
### 2.1 Compuestos disruptores endocrinos (EDC)

Los contaminantes emergentes son en su gran mayoría compuestos disruptores endocrinos (**endocrine disruptor compounds, EDC por sus siglas en inglés**), y conforman un conjunto heterogéneo de químicos ambientales, agrícolas, industriales, nutricionales y farmacéuticos que tienen efectos adversos en el funcionamiento endocrino (WHO-UNEP, 2013).

El sistema endocrino es un complejo sistema químico interno que regula funciones vitales de nuestro organismo, tales como: reproducción, desarrollo embrionario, sistema inmunológico y hasta aspectos del comportamiento psicosocial. Las sustancias que regulan estas funciones se llaman hormonas. Los EDC tienen la capacidad de interferir con el sistema endocrino a través de diversos mecanismos, a saber: imitando la acción de las hormonas endógenas, antagonizando su mecanismo de acción, alterando su patrón de síntesis, transporte, liberación o metabolismo, principalmente (WHO-UNEP, 2013). Además, se ha reportado que los contaminantes emergentes son capaces de alterar los niveles de los receptores celulares provocando una desregulación en la homeostasis de los organismos vivos (Aular Y., 2013).

En consecuencia, la exposición a los EDC puede interferir en las diferentes etapas del desarrollo humano. En específico, teniendo un papel en la proliferación de problemas reproductivos masculinos y femeninos, cánceres relacionados con el sistema endocrino, infecciones, asma, obesidad, diabetes y trastornos del comportamiento y del aprendizaje como el TEA (Birnbaum L., 2013).

Existe una gran cantidad de EDC que han sido identificados, entre los que se incluyen compuestos químicos como bifenilos policlorados (PCB), dioxinas, pesticidas organoclorados (OCP) clorpirifós, metoxicloro, 2,2-bis-(p-clorofenil)-1,1,1-tricloroetano (DDT) y sus metabolitos, vinclozolina, sustancias perfluoroalquiladas (PFAS), bisfenol-A (BPA), ftalatos, dietilestilbestrol (DES), metales como cadmio, plomo, mercurio, uranio y arsénico (**Fig. 1**) (Pombo *et al.*, 2020). Estos compuestos han sido creados para aplicaciones industriales, agrícolas, comerciales, productos químicos nutricionales o farmacéuticas.



**Figura 1.** Clasificación y ejemplos de los compuestos disruptores endocrinos (EDC)  
(elaboración propia)

Cabe señalar que los EDC migran al aire, agua y alimentos en donde se da la exposición hacia los humanos y la vida silvestre. Lo anterior se debe a la naturaleza de los disruptores endocrinos los cuales se degradan muy lentamente en el ambiente y son bioacumulables dentro de la cadena alimentaria, debido a su relativa insolubilidad en agua y alta solubilidad en grasas (Falero et al., 2005).

## 2.2. EDC presentes en alimentos

Las sustancias químicas que se filtran desde los envases a los alimentos contribuyen a la exposición humana de los EDC. Incluso a bajas concentraciones (ppm o ppb), la exposición crónica a los EDC ha demostrado ser toxicológicamente relevante en la salud humana, particularmente en los primeros años de vida que son las etapas más sensibles de desarrollo (Muncker J., 2009).

Entre los EDC más comunes que están presentes en alimentos se incluyen el bisfenol A (BPA) y los ftalatos. El BPA se usa en polímeros de policarbonato (PC) y

resinas epoxi en botellas de plástico para líquidos y alimentos enlatados, respectivamente (Sakhi *et al.*, 2014; Blackburn *et al.*, 2020). La evidencia científica demuestra que la ingesta de EDC interfiere en diferentes vías metabólicas causando un incremento de interleucina IL-1 $\beta$  y factor de necrosis tumoral TNF- $\alpha$ , principalmente (Genco *et al.*, 2020). Este incremento en las citocinas pro-apoptóticas se ha asociado con diversos padecimientos, tales como: inducción de intolerancia a la glucosa, aumento de la adipogénesis, acumulación de lípidos en adipocitos y hepatocitos, disminución de la capacidad antioxidante y aumento del estrés oxidativo (Polyzos *et al.*, 2012).

Los ftalatos son lipofílicos y su exposición de manera natural está asociada con determinados grupos de alimentos, especialmente carnes, alimentos grasos y productos lácteos (Serrano *et al.*, 2014; Sakhi *et al.*, 2014). Los principales mecanismos reportados en los que los ftalatos actúan como disruptores endocrinos son la interferencia con el receptor de insulina, la inducción de intolerancia a la glucosa alterada, la reducción de la oxidación de la glucosa, el aumento de la peroxidación de lípidos y, el incremento del estrés oxidativo (Polyzos *et al.*, 2012).

### **2.3. Asociación de los EDC con el TEA**

El trastorno del espectro autista (TEA) es una alteración del neurodesarrollo, cuyas manifestaciones clínicas afectan múltiples áreas del desarrollo. Las manifestaciones principales del TEA son las alteraciones en la interacción y comunicación social, conductas, intereses o actividades restrictivas y repetitivas, déficits en el lenguaje verbal y no verbal, y alteraciones en la percepción sensorial (American Psychiatric Association, 2013). La etiología del TEA es desconocida y actualmente se reconoce su asociación con diversos factores genéticos, epigenéticos, inmunológicos y ambientales (Bölte *et al.*, 2019; Yoon *et al.*, 2020).

James W. en 2012 propone una lista de factores de riesgo potenciales para el TEA relacionado con la disrupción endocrina en hormonas sexuales. Braun Joe M. en 2012 retoma este estudio y propone que la exposición a los EDC puede tener una influencia significativa en desórdenes del neurodesarrollo, debido a una

alteración en el medio hormonal intrauterino o la modificación del metabolismo de acción en las hormonas maternas.

Es muy importante señalar que la premisa de Braun Joe M. en 2012 inicia una línea de investigación global enfocada en el binomio madre-hijo. Su propuesta se basa en la exposición de madres embarazadas a la naturaleza omnipresente de los EDC en el ambiente, lo que originó las siguientes conclusiones:

- La exposición materna a sustancias químicas ambientales durante el embarazo puede estar asociada con el trastorno por déficit de atención e hiperactividad (TDAH), trastorno del espectro autista (TEA) y trastornos generalizados del desarrollo (Landrigan *et al.*, 2012).
- El cerebro es muy susceptible a las agresiones ambientales y en etapas tempranas del desarrollo su capacidad de desintoxicación es menor que en la etapa adulta.
- Esto los lleva a proponer la siguiente pregunta: ¿Cuál es el efecto acumulativo o sinérgico que pueden producir los compuestos disruptores endocrinos en el ser humano?

Existen diversos estudios en modelos animales y humanos que han observado la asociación entre la exposición a EDC y los rasgos de comportamiento de TEA. Lo anterior puede explicarse a que diferentes compuestos mediados por la acción de tipo endócrino tienen un papel relevante en las funciones del sistema nervioso central (SNC), asociado con la actividad conductual y cognitiva (Schantz & Widholm, 2001).

En la **tabla 1**, se muestran los estudios reportados que han evaluado la exposición a EDC con TEA u otros desórdenes.

**Tabla 1.** Estudios de EDC asociado con TEA o desorden neurocognitivo.

Objetivo del estudio	EDC de estudio	Población	Conclusión
Examinar la asociación de la exposición prenatal a los ftalatos con el comportamiento y el funcionamiento ejecutivo entre los 4 y 9 años. <b>(Engel et al., 2010)</b>	Metabolitos de ftalatos	404 mujeres y sus hijos entre los 4 y 9 años	Los dominios conductuales asociados adversamente con la exposición prenatal a ftalatos se encuentran comúnmente afectados en niños diagnosticados con trastornos de conducta o por déficit de atención con hiperactividad
Estimar el impacto de las exposiciones al bisfenol A (BPA) gestacional e infantil sobre el comportamiento y la función ejecutiva a los 3 años <b>(Braun JM et al., 2011)</b>	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, especialmente en las niñas.
Exposición prenatal a dos disruptores endocrinos ubicuos y el comportamiento social en niños. <b>(Miodovnik A. et al., 2011)</b>	Ésteres de ftalato y BPA.	137 mujeres 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.
Examinar la asociación entre la exposición prenatal al BPA y el comportamiento infantil, con el planteamiento de la hipótesis de efectos específicos del sexo. <b>(Perera et al., 2012)</b>	BPA	370 mujeres embarazadas y sus hijos- 337- entre 3 y 5 años.	Asociación positiva con el comportamiento emocionalmente reactivo y agresivo en niños. Se observaron las asociaciones inversas para el comportamiento ansioso/deprimido y agresivo en el caso de niñas.
Identificar exposiciones gestacionales de EDC asociadas con comportamientos autistas, a través de la Escala de respuesta social (SRS), una medida de los comportamientos autistas. <b>(Braun et al., 2014)</b>	Ftalatos (MBP y MEHP), BPA, PCB, OCP, retardantes bromados y PFAS.	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 de la SRS más altos.

<p>Estimar la asociación entre la exposición prenatal a BPA y el comportamiento neurológico infantil. <b>(Braun JM. et al., 2017)</b></p>	BPA	812 madres y sus hijos a los 3 años.	La concentración de BPA urinario prenatal se asoció con algunos aspectos del comportamiento infantil internalizantes y externalizantes*, así como un déficit en la memoria de trabajo.
<p>Identificar si la exposición gestacional a sustancias químicas que alteran el sistema endócrino, tiene relación con el peso al nacer de un bebé. <b>(Woods et al., 2017)</b></p>	OCP, PCB, PFAS, ftalatos y BPA.	272 mujeres embarazadas	Exposición gestacional a ftalatos, PFAS, PCB, PBDE, OCP u OPP tuvo asociaciones nulas o pequeñas con el peso al nacer. Las exposiciones gestacionales a OPP, parabenos y PFAS estuvieron más fuertemente asociadas con el bajo peso al nacer.
<p>Exposición prenatal de perturbadores endocrinos y la influencia en el comportamiento cuando son niños (3-5 años). <b>(Philippat et al., 2017)</b></p>	11 metabolitos de ftalato y nueve fenoles (cuatro parabenos, benzofenona-3, BPA, dos diclorofenoles, triclosán)	604 mujeres embarazadas 546 niños de 3 a 5 años.	El BPA se asoció positivamente con la subescala de problemas de relación y MBP se asoció con conductas de comportamiento internalizante.
<p>Examinar sustancias químicas que afectan el sistema endocrino, afectando hormonas gonadales susceptibles a trastorno por déficit de atención con hiperactividad (TDAH). <b>(Tsai et al., 2020)</b></p>	Ftalatos, Parahidroxibenzoicos y BPA	130 con TDAH 68 niños sanos	Los hallazgos sugieren que puede existir la posibilidad de un impacto adverso de los EDC sobre las hormonas gonadales y el desarrollo neurológico
<p>Estudios longitudinales de cohorte de nacimientos y estudios experimentales de animales expuestos perinatalmente a orto-ftalatos que muestran riesgo en trastornos de comportamiento y cognición. <b>(Engel et al., 2021)</b></p>	Ftalatos	Modelos animales expuestos perinatalmente.	Exposición a los orto-ftalatos puede afectar el desarrollo del cerebro y aumentar los riesgos de trastornos del aprendizaje, la atención y el comportamiento en la infancia.
<p>Exposición prenatal a plaguicidas como agentes OCP y relación con alteraciones en comunicación social,</p>	OCP	16 preclínicos en roedores y 45 clínicos en niños y adolescentes.	La amplia variedad de estudios difiere en muchos aspectos como la ruta, la edad o la fuente de exposición. La exposición a OCP está relacionada con

cognitivas, conductuales y psicomotoras. (Biosca-Brull <i>et al.</i> , 2021)			efectos adversos sobre la cognición.
Exposición prenatal a una amplia gama de sustancias químicas ambientales y comportamiento infantil entre los 3 y los 7 años. (Jedynak <i>et al.</i> , 2021)	BPA, Ftalatos, MBP, PCB y Cu	708 parejas madre e hijo.	El bisfenol A y el MBP se asocian con un aumento de los problemas de conducta externalizante e internalizante en los niños.

\***Conductas internalizantes:** depresión, ansiedad, baja autoestima y aislamiento, irritabilidad.  
**Conductas externalizantes:** hiperactividad, agresividad e impulsividad.

\***BPA:** bisfenol-A, **Cu:** Cobre, **MBP:** mono-butyl-ftalato, **MEHP:** mono (2-etilhexil) ftalato, **OCP:** pesticidas organoclorados, **OPP:** dos pesticidas organoclorados, **PBDE:** éteres de difenilo polibromados, **PCB:** bifenilos policlorados, **PFAS:** sustancias perfluoroalquiladas, **SRS:** (por sus siglas en inglés) Social responsiveness scale.

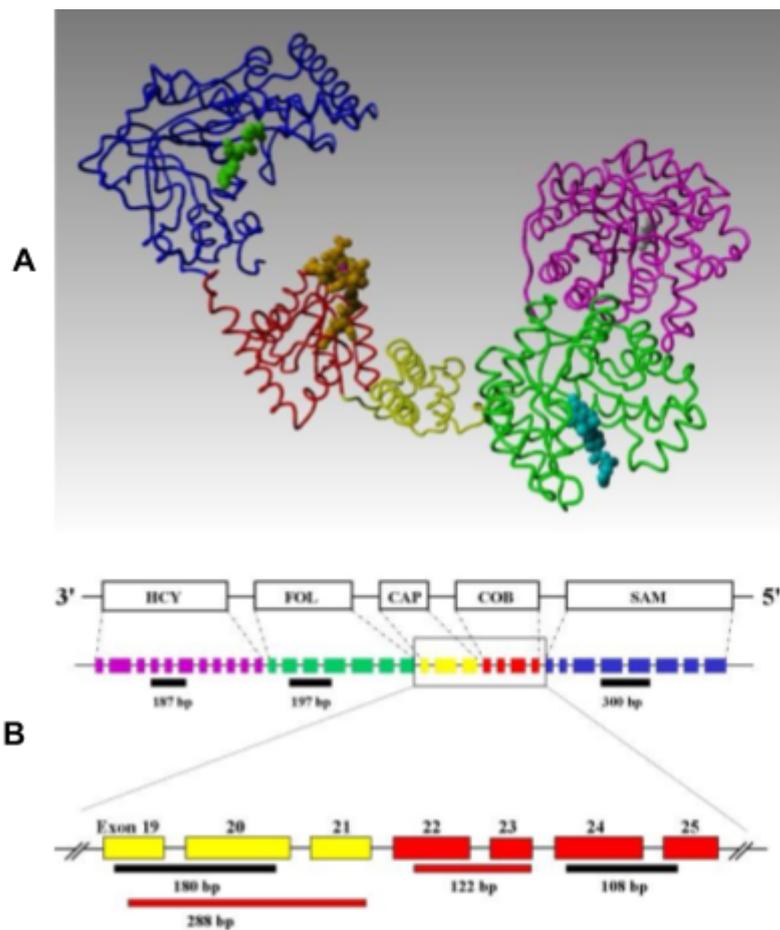
En la actualidad, existen importantes áreas de oportunidad para conocer los mecanismos de afectación al desarrollo neurológico por exposición a EDC (Moosa *et al.*, 2018). Sin embargo, se ha identificado que los efectos a través de la interrupción o desregulación en vías de señalización hormonal provocados por los EDC pueden influir en etapas del desarrollo humano, contribuyendo al riesgo de padecer TEA. Además, se ha encontrado una asociación en la exposición de diferentes EDC a rasgos dentro del espectro autista como conductas, comportamiento y aspectos cognitivos por desregulación en el metabolismo debido al aumento de estrés oxidativo (Chauhan & Chauhan, 2006; Rebuli & Patisaul, 2016).

## 2.4. Metionina sintasa (MS)

La MS es una enzima fundamental para el metabolismo de los grupos metilo y aminoácidos en todos los dominios de la vida. Está regulada por ácido fólico y cobalamina. La MS es una parte clave del ciclo de metilación que convierte la homocisteína (HCY) en metionina (MET) mediante la incorporación de un grupo metilo derivado del 5-metiltetrahidrofolato (5-MeTHF). La cobalamina está

directamente involucrada en el proceso y contribuye en la transferencia de este grupo metilo (Deth *et al.*, 2014).

La estructura de la MS está compuesta por cinco dominios con funciones específicas representados secuencialmente dentro de su gen (**Fig. 2**). Dentro del modelo es posible apreciar una molécula de homocisteína (HCy), metilfolato, cap, cobalamina y S-adenosil metionina (SAM) (Dixon *et al.*, 1996; Evans *et al.*, 2004).

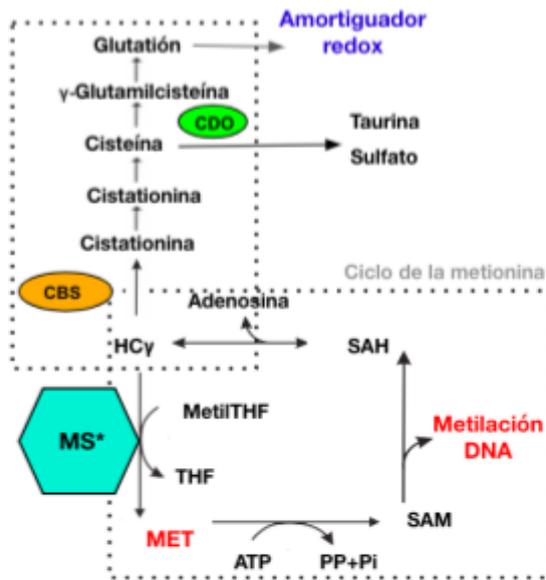


**Figura 2.** Estructura de metionina sintasa (MS) **A.** La MS comprende cinco dominios: unión a SAM (azul), unión a cobalamina (rojo), cap (amarillo) unión a metilfolato (verde), y unión a HCY (rosa) Estructuras de *E. coli* y *T. maritima*. **B.** Gen de la MS humana, contiene 33 exones que especifican sus cinco dominios de forma secuencial. Imagen tomada y modificada de (Muratore *et al.*, 2013).

El mecanismo catalítico de la MS ocurre cuando la S-adenosil-metionina (SAM), el principal donante de grupos metilo del cuerpo, que se convierte en S-adenosil-homocisteína (SAH) durante las reacciones de metilación. Por lo tanto, la relación de concentración SAM/SAH en plasma indica el estado de metilación. Posteriormente, la SAH se hidroliza a HCy en una reacción reversible que libera adenosina. La homocisteína formada a partir de reacciones de metilación se metaboliza por una de dos vías (**Fig. 3**) (Main *et al.*, 2010).

La primera ruta metabólica en la que participa la MS es de y es la vía de *transulfuración*, que implica la conversión irreversible de HCy en cisteína a través de cistationina. La cisteína es el aminoácido limitante de la síntesis de glutatión y juega un papel clave en los procesos de desintoxicación. El GSH en plasma es un indicador de estrés oxidativo (Fang *et al.*, 2002; Schafer & Buettner, 2001).

La segunda vía metabólica implica la remetilación de homocisteína a metionina, que es llevada a cabo por la metionina sintasa (MS) en la mayoría de los tejidos. El grupo metilo para MS es donado por 5-MTHF que se convierte en tetrahidrofolato (THF). El THF se metila para convertirse en 5,10-metilen tetrahidrofolato (5,10-MTHF) mediante serina hidroxil-metiltransferasa o mediante una serie de tres reacciones catalizadas por metiltetrahidrofolato deshidrogenasa (MTHFD-1). La mayor parte del 5,10-MTHF se metaboliza a 5-MTHF por acción de la metiltetrahidrofolato reductasa (MTHFR), El 5-MTHF es la única forma de folato utilizada en el SNC y la forma principal de folato en la sangre. El 5,10-MTHF restante se convierte en dihidrofolato (DHF) por la timidina sintasa en la síntesis de timidilato, que es necesario para la replicación del ADN y puede volver a convertirse en THF por el dihidrofolato reductasa (DHFR) (Main *et al.*, 2010).



**Figura 3.** Vía de la metionina sintasa (MS). Imagen tomada y modificada de (Deth et al., 2008).

\***CBS:** cistationina-b-sintasa, **CDO:** cisteína dioxigenasa, **HCy:** homocisteína, **PP:** pirofosfato, **Pi:** fosfato inorgánico, **SAH:** S-adenosil-homocisteína, **SAM:** S-adenosil-metionina, **THF:** tetrahidrofolato.

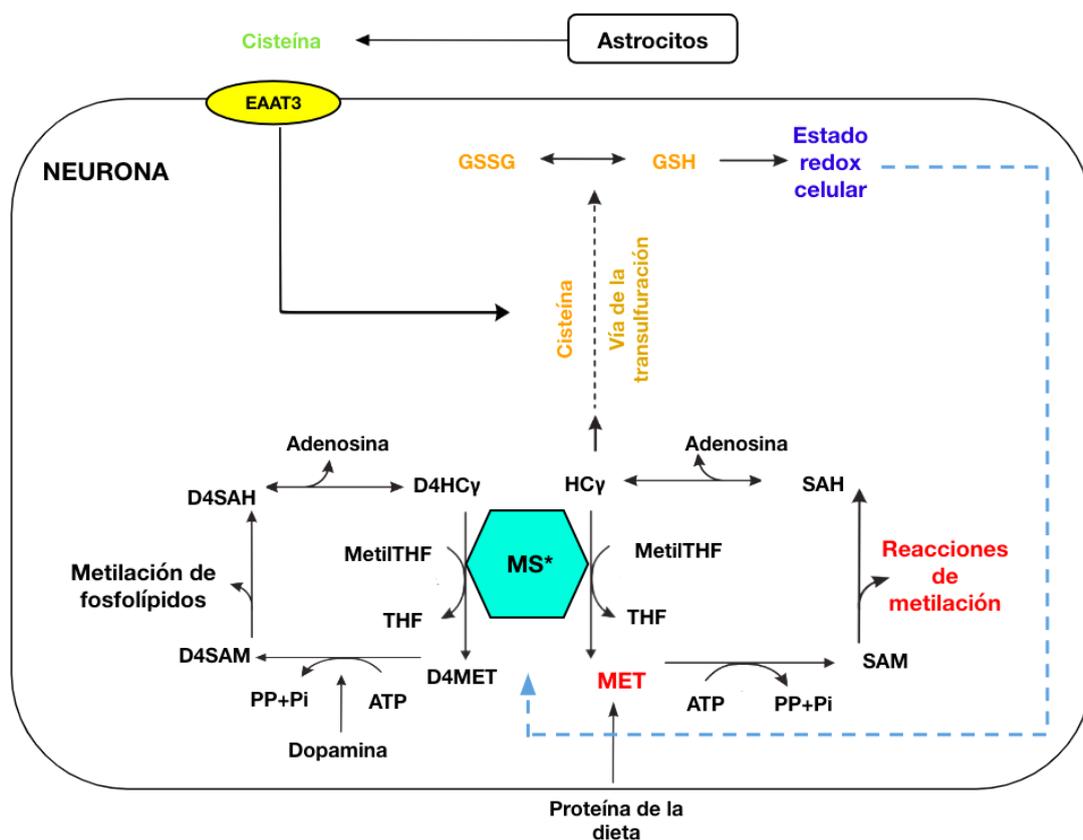
## 2.5. Metabolismo neuronal redox de MS

Durante el ciclo catalítico, los grupos metilo derivados de metilfolato se transfieren primero al cofactor de 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 et al., 1998). Esto crea un ciclo de retroalimentación negativa en el que la actividad de MS es sensible al estado redox y viceversa.

En la **Figura 4**, se muestra una célula neuronal identificando la MS en el citoplasma. En primer lugar, el aminoácido cisteína limita la velocidad para la síntesis de GSH, esto ocurre porque mediante la captación de cisteína derivada de

astrocitos o transulfuración de HCy se disminuye esa producción de GSH. A través de la transulfuración se puede producir metionina con la re-metilación de HCy a través de la hidrólisis reversible de SAH, que a su vez se forma por transferencia de un grupo metilo de SAM en más de 200 reacciones diferentes de metilación del ADN. El ciclo de metilación de la metionina depende de la metionina dietética y de la re-metilación de HCY regulado por la actividad de MS.

Por otra parte, la actividad de la MS también proporciona grupos metilo derivados del folato al receptor de dopamina D4, lo que respalda su capacidad única para llevar a cabo la metilación de fosfolípidos estimulada por la dopamina (Zhao et al., 2001; Evans et al., 2004). Por lo tanto, la actividad de la MS influye en una gama excepcionalmente amplia de procesos celulares, modulando así la actividad metabólica en respuesta al estado redox (Muratore *et al.*, 2013)(Fig. 4).



**Figura 4.** Vías redox relacionadas con la metilación en neuronas. Imagen tomada y modificada de (Muratore *et al.*, 2013)

\*ATP: adenosín Trifosfato, EAAT3: transportador de aminoácido excitador-3, D4HCy: dopamina D4 - homocisteína, D4MET: dopamina D4 - metionina, D4SAH: dopamina D4 - S-adenosil-homocisteína, D4SAM: dopamina D4 - S-adenosil-metionina, GSH: glutatión, GSSG: glutatión disulfuro, HCy: homocisteína, MET: metionina, MetilTHF: metil tetrahidrofolato, PP: pirofosfato, Pi: fosfato inorgánico, SAH: S-adenosil-homocisteína, SAM: S-adenosil-metionina, THF: tetrahidrofolato.

El estado redox y la actividad de metilación están estrechamente relacionados debido a que la formación de HCY a partir de SAH es reversible y la SAH inhibe la metilación (Deth *et al.*, 2014). Lo anterior conduce a una disminución en la actividad de la MS (ej: causada por estrés oxidativo) que deriva en un aumento en la síntesis de GSH e inhibe las reacciones de metilación del ADN. Con base en lo anterior, la relación entre los niveles de GSH y la actividad de la MS es crítica para mantener la homeostasis redox celular. Cualquier factor que disminuya los niveles de GSH causan una disminución en la metilación global del ADN y sus consecuencias epigenéticas posteriores (Deth *et al.* 2008).

## **2.6. Metilación de ADN mediado por MS**

En la actualidad, existen cientos de genes cuya función está finamente regulada por mecanismos de metilación. Entre las principales funciones de la metilación del ADN se encuentra reprimir la expresión de elementos genéticos que pueden ser dañinos. Por ejemplo, Moore y colaboradores en 2012, describieron el proceso de metilación y desmetilación del ADN en el sistema nervioso. La metilación del ADN está catalizada por metionina sintasa (MS) y una familia de ADN metiltransferasas (Dnmts) que transfieren un grupo metilo de la S-adenosil metionina (SAM) al quinto carbono de un residuo de citosina para formar 5mC. En el cerebro se encuentran los niveles más altos de metilación del ADN, que pueden variar dependiendo de la región; este proceso influye en la diferenciación y maduración del sistema nervioso central (SNC). En particular la metilación del ADN es esencial para la función cognitiva normal; sin embargo, la actividad neuronal puede intervenir en los patrones de metilación de ADN como respuesta a factores fisiológicos y ambientales (Feng *et al.*, 2010).

## 2.7. Estrés oxidativo y TEA

Diversos trabajos/investigaciones han propuesto que la incidencia de factores externos podría alterar el desarrollo del sistema nervioso central (SNC) induciendo anomalías fisiológicas y funcionales relacionadas con trastornos generalizados del desarrollo, TEA incluido (Karimi *et al.*, 2017). Lo anterior sugiere que en algunos individuos el TEA surge de anomalías sistémicas, tales como: la desregulación inmunológica, la desintoxicación alterada, las exposiciones tóxicas ambientales, la regulación redox por estrés oxidativo, la generación de energía por sistemas mitocondriales, entre otros (Ming *et al.* 2008).

El estrés oxidativo puede causar daños a los lípidos, proteínas y ADN en las células, causando una posterior alteración en el desarrollo de los seres humanos (Fig 5). El cerebro humano es especialmente vulnerable al estrés oxidativo porque representa sólo el 2% de la masa corporal, pero consume el 20% del oxígeno (Bjørklund *et al.*, 2020; Chen *et al.*, 2021). Por lo tanto, las neuronas consumen una parte desproporcionadamente grande de la energía del cuerpo. El SNC tiene una capacidad limitada para la desintoxicación de especies reactivas de oxígeno (ROS) debido a la falta de capacidad de producción de glutatión en las neuronas (Dávila & Torres-Alemán, 2008). Por lo tanto, las neuronas son las primeras células en ser afectadas por el aumento de ROS y la escasez de antioxidantes. En este sentido, las neuronas son las células más susceptibles a estrés oxidativo (Fig 5) (Shulman *et al.*, 2004; Wang & Michaelis, 2010).

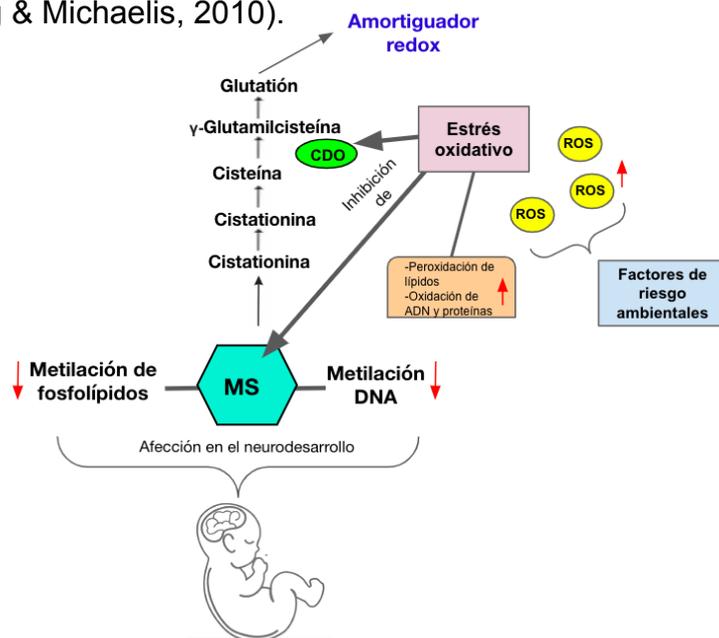


Figura 5. Papel del estrés oxidativo en el neurodesarrollo. Al existir un aumento en ROS, se genera

estrés oxidativo lo que provoca la producción de peroxidación de lípidos, oxidación de proteínas y ADN; en contraste, disminuye la actividad CDO y MS, reduciendo la metilación, incluida la metilación de fosfolípidos, influyendo en el neurodesarrollo. Imagen tomada y modificada de (Deth *et al.*, 2008).

\***CDO**: cisteína dioxigenasa, **MS**: metionina sintasa.

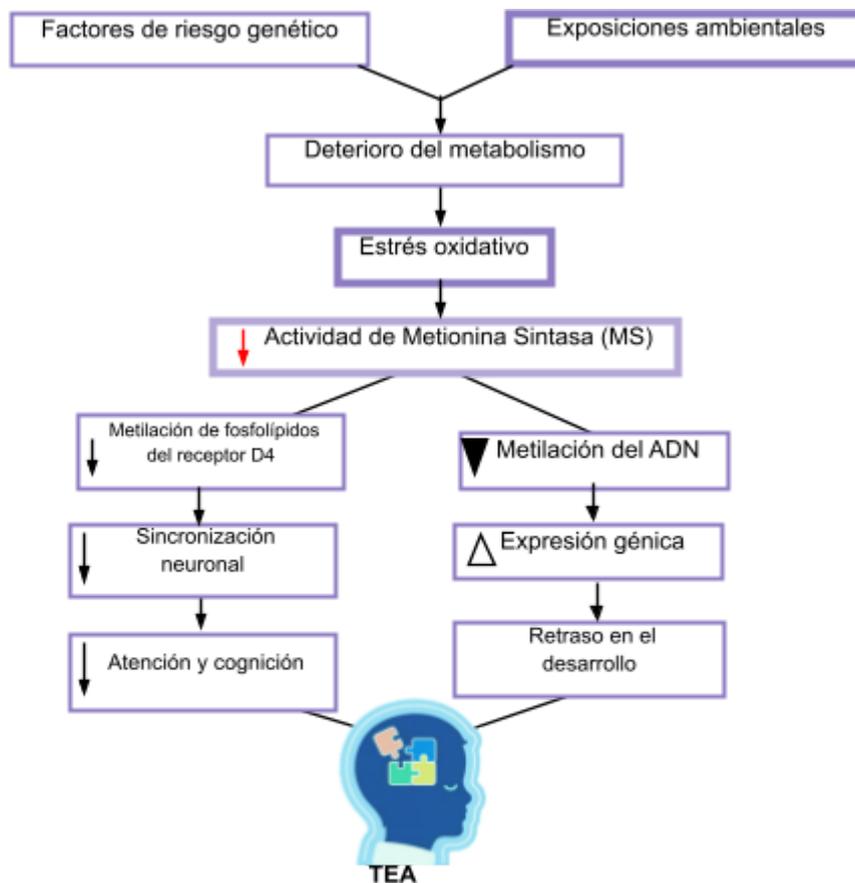
Con base en lo anterior, el estrés oxidativo puede provocar más vulnerabilidad en niños que en adultos, debido a sus niveles naturalmente bajos de glutatión reducido (GSH) (Bjørklund *et al.*, 2020). El estrés oxidativo en el TEA se ha estudiado a nivel de membrana celular y también cuantificando los productos de la peroxidación lipídica, agentes desintoxicantes (como el glutatión) y, antioxidantes involucrados en el sistema de defensa contra ROS (Manivasagam *et al.*, 2020). Además, (Chauhan & Chauhan, 2006). Se han reportado niveles alterados de glutatión en el metabolismo de homocisteína/metionina, los cuales están asociados con el aumento de la inflamación, la citotoxicidad, así como disfunción mitocondrial e inmunológica en individuos diagnosticados con TEA.

Existe una creciente evidencia de que el estrés oxidativo puede estar implicado en la fisiopatología celular del trastorno del TEA. Al respecto, se han reportado actividades enzimáticas reducidas de glutatión peroxidasa (GPx), catalasa (CAT) y niveles reducidos de glutatión y cisteína en pacientes con TEA con edades comprendidas entre los 3 y 15 años. (Söğüt *et al.*, 2003; Al-Gadani *et al.*, 2009). Las disminuciones significativas en los niveles de homocisteína, cisteína y GSH indican que la vía enzimática de transulfuración es probablemente menos eficiente en los individuos con diagnóstico de TEA. La reducción de los niveles de estos metabolitos es consistente con la disminución de los niveles de metionina sintasa (MS) (Main *et al.*, 2010).

Las personas con TEA han mostrado evidencia de estrés oxidativo y metilación alterada, lo que podría atribuirse a que la vía de folato-metionina actúa de forma disfuncional. Esta vía es crucial para la síntesis de ADN, la metilación del ADN y el equilibrio redox celular (Main *et al.*, 2010).

En este sentido, Deth *et al.* en 2014 propusieron una hipótesis/mecanismo de metilación redox de ADN para el TEA. En esta propuesta se revisa la relación metabólica entre el estrés oxidativo y la metilación del ADN, con especial énfasis en las respuestas adaptativas que limitan la actividad de la cobalamina y la metionina

sintasa (MS). La MS puede intervenir en la metilación de fosfolípidos y del ADN, provocando un impacto en los procesos que regulan el desarrollo en individuos genéticamente vulnerables (**Fig. 6**).



**Figura 6.** Hipótesis de metilación redox del ADN para TEA. Se ilustran los factores de riesgo asociados con el TEA, así como los niveles de alteración producidos por estrés oxidativo en la actividad de metionina sintasa (MS). Imagen tomada y modificada de Deth *et al.*, 2008.

## 2.8. Reguladores redox

Un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y antioxidantes (en respuesta biológica al estrés oxidativo) conduce a una variación en la homeostasis celular (Mariani *et al.*, 2005). Consecuentemente, se genera un potencial daño oxidativo en biomoléculas esenciales de las células del sistema nervioso central y periférico (Zhang *et al.*, 2019).

El desequilibrio redox, puede ser regulado por antioxidantes endógenos y exógenos que neutralizan las ROS y las enzimas oxidativas relacionadas. Los

antioxidantes endógenos se producen en el organismo a través de proteínas, enzimas, coenzimas u hormonas. Por su parte, los antioxidantes exógenos se pueden encontrar en los alimentos, así como algunos productos farmacéuticos (Pisoschi *et al.*, 2020).

Un ejemplo claro de antioxidantes exógenos son el sulforafano (SFN) y el políácido gálico (PGAL). El SFN es un isotiocianato que se encuentra en verduras crucíferas, como el brócoli, col rizada y rábano. El SFN exhibe actividades antioxidantes, anti-apoptóticas, antitumorales y anti-inflamatorias que regulan al alza los genes que protegen a las células aeróbicas contra el estrés oxidativo, la inflamación y el daño del ADN (Singh *et al.*, 2014; De Oliveira *et al.*, 2017).

Por su parte, el PGAL, derivado del ácido gálico, es una sustancia presente en algunas frutas como manzanas, nueces, arándanos, hojas de té y corteza de roble. Esta molécula es soluble en agua, semiconductor y tiene propiedades antioxidantes, así como antimicrobianas (Romero-Montero *et al.*, 2020; Zamudio-Cuevas *et al.*, 2021).

Con base en lo anterior, podría existir la posibilidad de que la exposición a moléculas antioxidantes tenga una función como regulador redox. Es decir, tener una función protectora o reversible frente al daño celular asociado a procesos por estrés oxidativo, como sucede fisiológicamente en trastornos generalizados del desarrollo, TEA incluido.

### **3. Hipótesis**

La adición de contaminantes emergentes presentes en alimentos tiene un efecto sobre la actividad enzimática de metionina sintasa, aumentando o disminuyendo su actividad en células de neuroblastoma SH-SY5Y asociado con el modelo de metilación redox del ADN en el trastorno del espectro autista (TEA).

#### **3.1. Objetivo general**

Demostrar si la exposición a contaminantes emergentes en cultivos *in vitro* de neuroblastoma SH-SY5Y tiene un efecto en la actividad enzimática de la metionina sintasa.

##### **3.1.1. Objetivos particulares**

- Desarrollar cultivos celulares 2D de neuroblastomas SH-SY5Y.
- Exponer cultivos celulares *in vitro* de neuroblastomas SH-SY5Y a diferentes concentraciones de compuestos disruptores endocrinos (EDC) y moléculas reguladoras redox.
- Evaluar la citotoxicidad en cultivos celulares *in vitro* de neuroblastomas SH-SY5Y a diferentes concentraciones de compuestos disruptores endocrinos (EDC) y moléculas reguladoras redox.
- Evaluar el efecto de la actividad enzimática de MS en cultivos celulares *in vitro* de neuroblastomas SH-SY5Y a diferentes concentraciones de compuestos disruptores endocrinos (EDC) y moléculas reguladoras redox.

## **4. Materiales y Métodos**

### **4.1. Materiales**

La línea celular de neuroblastoma hueso, médula de *Homo sapiens* SH-SY5Y se adquirió de ATCC® (CRL-2266™). El medio de cultivo Gibco Dulbecco's Modified Eagle (DMEM) se adquirió de ATCC® (30-2003™) así como el medio F12K Medium (Kaighn's Modification of Ham's F-12 Medium) ATCC® (30-2004™). El kit de proliferación celular II (XTT) (11465015001™) se adquirió de Roche. El Fetal Bovine Serum (FBS) se adquirió de ATCC® (30-2020™). Ditioneitol (DTT), L-homocisteína, S-Adenosil Metionina (AdoMet), Hidroxicobalamina y Metil-tetrahidrofolato (CH 3 THF) se adquirieron de Sigma Aldrich®. Los demás reactivos fueron de grado analítico y se encuentran comercialmente.

### **4.2. Cultivo celular**

La técnica de cultivo celular se basó en lo recomendado por la casa comercial ATCC® de donde se adquirió la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y (CRL-2266™) y el método empleado en la Unidad de Investigación Preclínica (UNIPREC de la Facultad de Química) para estandarizar el cultivo celular. En frascos ROX de poliestireno tratados previamente con poli-L-lisina se realizó la siembra de neuroblastoma SH-SY5Y, para el cual se utilizó medio DMEM/F12 con suplemento de FBS al 10%. Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

### **4.3. Propagación celular**

El cultivo celular se mantuvo en crecimiento y observación los días posteriores hasta tener una confluencia del ~85 %, que funcionaba como indicador para iniciar la propagación celular. Primero, se extrajo el medio, luego se realizó un lavado con PBS 1x y se añadieron 500 µL de tripsina e incubando a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> durante cinco minutos. Posteriormente, se paró la reacción con medio DMEM/F12 , seguido de esto se dio un suave golpe en el frasco para que las células

quedarán suspendidas en la caja. Se decantaron en un tubo ensayo de 50 ml y se centrifugó a 1500 revoluciones por minuto (rpm), se decantó el sobrenadante y se añadió 5 ml de medio DMEM/F12, con cuidado se resuspendió el botón celular. Para el conteo celular se utilizó una cámara de Neubauer en donde se añadieron 20  $\mu$ L de suspensión de células y 80  $\mu$ L de azul de tripano. Teniendo previamente preparadas las cajas Petri (**tabla 2**) redondas con poli-L-lisina, se procedió a realizar la propagación celular y se añadió adicionalmente 5mL de medio DMEM/F12 , finalmente se incubó a 37°C en una atmósfera de 5 %de CO<sub>2</sub>.

Dependiendo del experimento se consideró la propagación celular, en la **tabla 2** se muestra el experimento, el tamaño de caja petri y la cantidad de células por pozo utilizadas.

**Tabla 2.** Propagación de cultivo celular de neuroblastoma SH-SY5Y

<b>Experimento</b>	<b>Placas</b>	<b>Cantidad de células por pozo</b>
<b>Citotoxicidad</b> (Viabilidad celular mediante el ensayo con el kit de proliferación celular II (XTT))	96 pozos	~16,000
<b>Actividad enzimática MS</b> (obtención de lisado)	6 pozos	~150,000

#### **4.4. Exposición a diferentes sustratos (variedad de EDC)**

Para este proyecto fue esencial realizar la exposición a diferentes sustratos de EDC. La exposición de dichos sustratos se llevó a cabo cinco días después de la propagación celular. Se aplicaron diferentes concentraciones por triplicado e incubadas a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> en un periodo de 24 h. En la **tabla 3** se muestra un resumen de los sustratos, concentraciones y tiempo de exposición.

**Tabla 3.** Sustratos -EDC- utilizados y concentraciones.

Sustratos -EDC-	Concentración	Tiempo de exposición	Referencia
Di(2-etilhexil) ftalato (DEHP)	10, 25, 50 $\mu$ M	24 h	Solano A., 2022 Guida <i>et al.</i> , 2014
Mono-butil-ftalato (MBP)	10, 25, 50 $\mu$ M	24 h	Solano A., 2022

Posterior al tiempo de exposición se observó al microscopio óptico y se obtuvo el extracto intracelular por medio de la lisis celular. Es importante mencionar que por cada tratamiento se consideró un control de medio de cultivo DMEM/F12.

DMEM/F12.

#### 4.5. Exposición a diferentes moléculas reguladoras redox

Para este proyecto fue esencial realizar la exposición a diferentes sustratos de moléculas reguladoras redox. La exposición de dichos sustratos se llevó a cabo cinco días después de la propagación celular. Se aplicaron diferentes concentraciones por triplicado e incubadas a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> en un periodo de 24 h. En la **tabla 4** se muestra un resumen de los sustratos, concentraciones y tiempo de exposición.

**Tabla 4.** Moléculas reguladoras redox utilizadas y concentraciones.

Moléculas reguladoras redox	Concentración	Tiempo de exposición	Referencia
Ácido gálico (AG)	0.75, 1, 51.5 $\mu$ g/mL	24 h	Chandrasekhar <i>et al.</i> , 2018
Poliácido gálico (PGAL)	1, 5, 10 $\mu$ g/mL	24 h	Zamudio-Cuevas <i>et al.</i> , 2021

Sulforafano (SFN)	1, 1.5, 2.5 $\mu$ M	24 h	Angeloni <i>et al.</i> , 2015 Brasil <i>et al.</i> , 2022
-------------------	---------------------	------	--

Posterior al tiempo de exposición se observó al microscopio óptico y se obtuvo el extracto intracelular por medio de la lisis celular. Es importante mencionar que por cada tratamiento se consideró un control de medio de cultivo DMEM/F12.

#### 4.6. Citotoxicidad

Para evaluar diferentes concentraciones de los EDC y las moléculas reguladoras redox se realizó un ensayo de citotoxicidad con el kit de proliferación celular II (XTT). Es un ensayo por detección colorimétrica, consta de dos reactivos: el reactivo XTT, que se utiliza para evaluar la viabilidad celular en función del potencial redox celular y el reactivo de acoplamiento de electrones, que mejora el rango dinámico del ensayo. Se llevó a cabo en una placa de 96 pozos en donde se sembraron ~16,000 células por pozo y se colocó el control, así como los diferentes tratamientos por triplicado, al finalizar el periodo de incubación (24 h) se retiró el medio de cultivo y se añadió directamente 1  $\mu$ L del reactivo de acoplamiento de electrones y 50  $\mu$ L del reactivo XTT por pozo. La placa se incubó a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> durante 4h. Finalmente se midieron las muestras en un espectrofotómetro Epoch® a 490 nm.

#### 4.7. Lisis celular y cuantificación de proteínas

Considerando la confluencia celular (~150,000 células por pozo) de neuroblastoma SH-SY5Y propagadas en cajas Petri redondas de 6 pozos, se prosiguió con la lisis celular. Para esto se retiró el medio de cultivo y se lavó una vez con 1 mL de PBS 1x. Se añadieron 200  $\mu$ L por caja petri de la solución de lisis (buffer RIPA). Se raspó la base de la caja petri con un raspador celular, el cual se dejó actuar por 10 minutos para volver a raspar. Se recuperó el máximo en tubos Eppendorf y después se centrifugó por 5 minutos y se recuperó el sobrenadante, el cual corresponde al

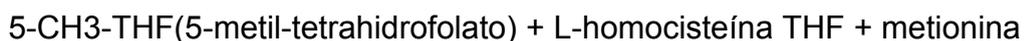
extracto intracelular donde se encuentra la enzima MS. Posteriormente, se midió el contenido de proteína de cada uno de los lisados, por el método de Bradford para la cuantificación de proteína, en placas de 96 pozos que se analizaron en un espectrofotómetro Epoch® a 595 nm usando albúmina sérica bovina como estándar para una curva de calibración del método.

#### 4.8. Medición enzimática de metionina sintasa

Para la determinación enzimática se realizó una adaptación del protocolo descrito por Drummond J. en 1995 para un volumen total del ensayo de 200  $\mu\text{L}$ , en placas de 96 pozos. Se añadió el volumen de cada lisado, para estandarizar a 0.050mg de proteína en el ensayo, se ajustó el contenido con agua Mili Q para un total de 98.4  $\mu\text{L}$ . Se agregaron 16  $\mu\text{L}$  de  $\text{KPO}_4$  (pH 7.2) 1.0 M, 8  $\mu\text{L}$  de DTT 500 mM, 0.8 $\mu\text{L}$  de adenosil metionina 3.8 mM, 0.8  $\mu\text{L}$  de L-homocisteína 100 mM y 16  $\mu\text{L}$  de hidroxibalamina 500  $\mu\text{M}$ . Se realizó una pre-incubación a 37°C en una atmósfera de 5% de  $\text{CO}_2$  por 5 minutos. Consecutivamente, se inició la reacción con 20  $\mu\text{L}$  de metil-THF 4.2 mM, se mezcló y la reacción ocurrió por 10 minutos incubando a 37°C en una atmósfera de 5% de  $\text{CO}_2$ . La reacción se detuvo con 40  $\mu\text{L}$  5 N HCl 60 % de ácido fórmico y una incubación a 80°C por 10 minutos. Finalmente, se enfrió a temperatura ambiente y se analizó la placa de 96 pozos en el equipo Epoch® a 350 nm.

Mediante los datos obtenidos en el análisis se realizó el cálculo de la actividad enzimática específica de MS 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.

La enzima MS cataliza la siguiente reacción:



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



De tal modo que, a través de estas reacciones se monitorea la actividad enzimática de MS.

## 4.9. Análisis estadístico

Los datos se analizaron usando el programa RStudio, mediante la prueba de ANOVA de dos vías seguida de la prueba post hoc de Tukey. Los valores se expresaron como el promedio  $\pm$  desviación estándar (SD). Se consideraron diferencias significativas con una  $p < 0.05$  de los experimentos por triplicado.

## 5. Diseño experimental

Para la realización del presente estudio se propuso un diseño experimental (**Fig. 7**) conformado por los siguientes elementos:

**-Población o universo:** Cultivo celular *in vitro* de neuroblastomas de la línea celular SH-SY5Y (con densidad específica).

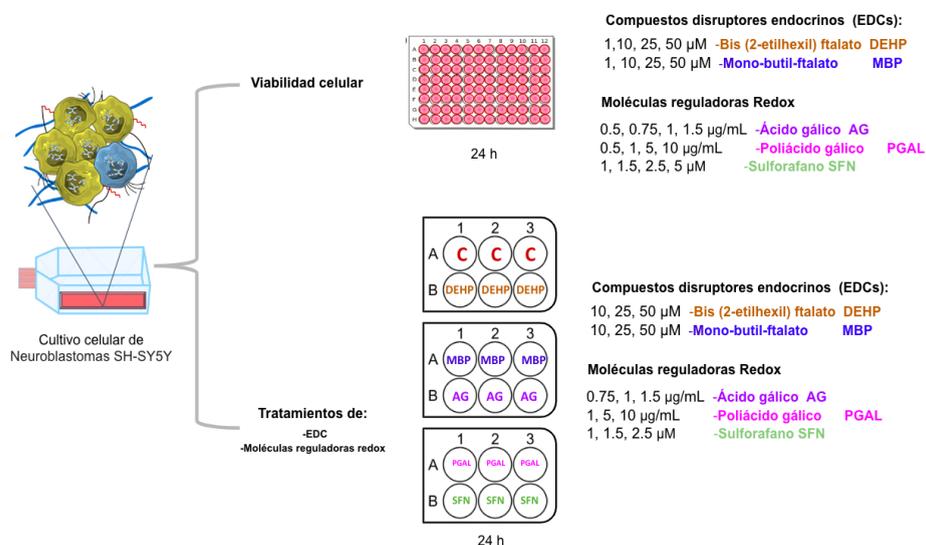
**-Unidad muestral o de muestreo:** Células de neuroblastoma SH-SY5Y.

**-Unidad de estudio (elementos):** Enzima MS de las células de neuroblastoma SH-SY5Y.

**-EDC:** Di(2-etilhexil) ftalato (DEHP) y mono-butyl-ftalato (MBP)

**-Reguladores redox:** Ácido gálico (AG), Poli-gálico (PGAL) y Sulforafano (SFN).

Los experimentos permitieron la identificación de la actividad enzimática de MS de las células de neuroblastoma SH-SY5Y con y sin la exposición a diferentes tratamientos.



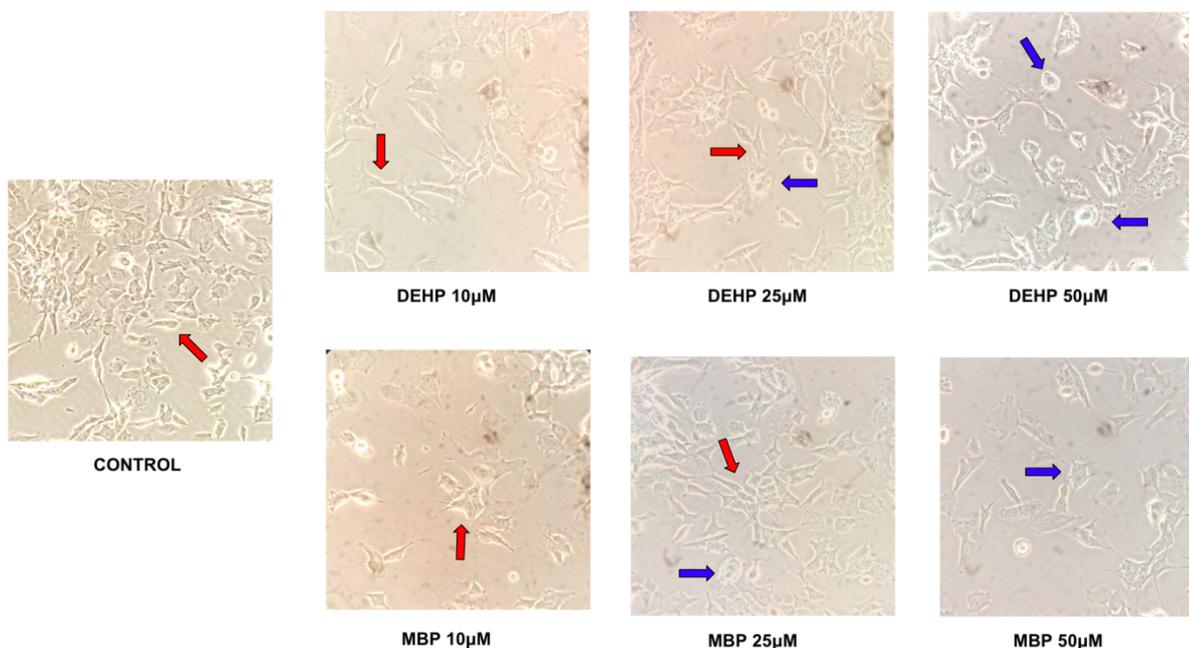
**Figura 7.** Diseño experimental empleado para el desarrollo del proyecto.

## 6. Resultados y Discusión

### 6.1. Cultivo celular

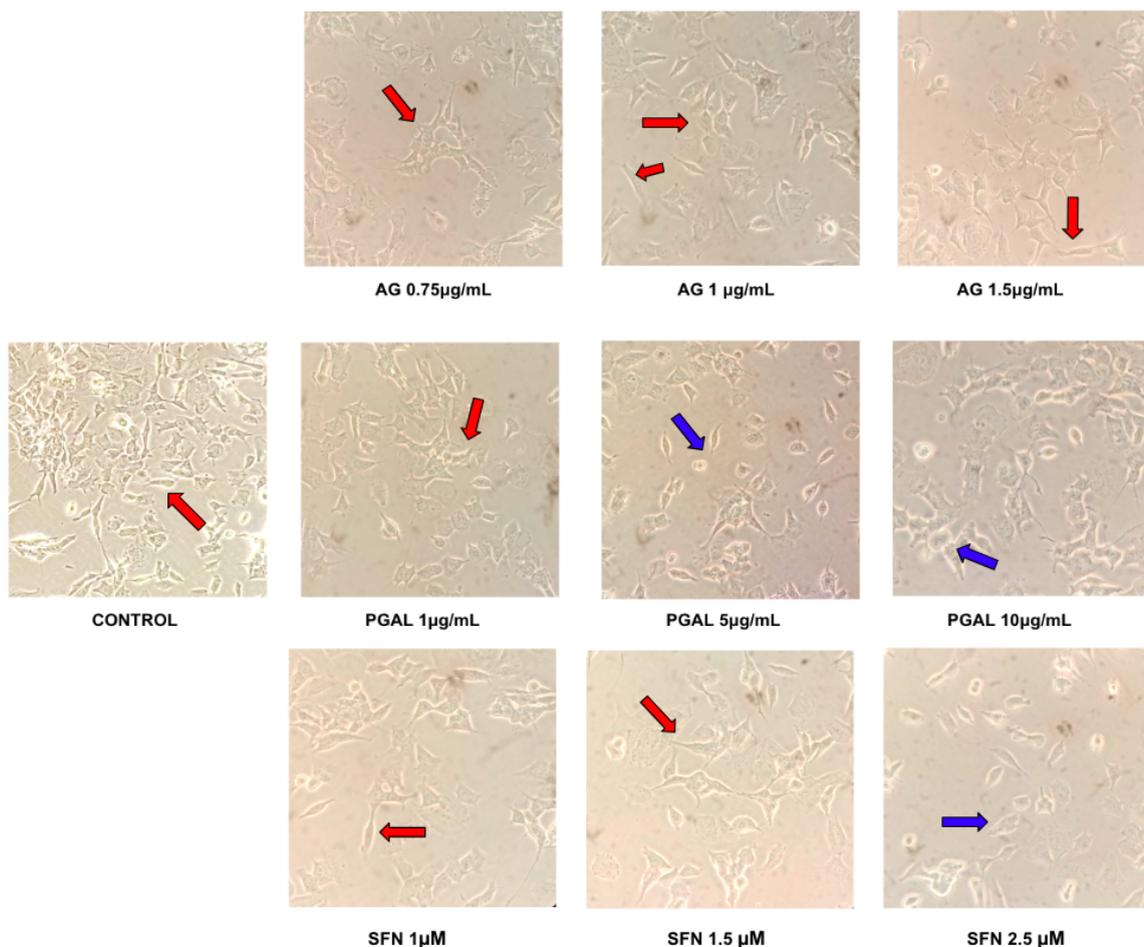
Los ensayos para la identificación del adecuado manejo del cultivo celular *in vitro* de neuroblastomas SH-SY5Y se realizaron en la UNIPREC. Se registraron observaciones importantes con respecto a la densidad y confluencia celular. Esto permitió posteriormente calcular el total de células necesarias para la propagación celular, en placas de seis pozos, en donde se sembraron ~150,000 células por pozo para la aplicación de los diferentes tratamientos por triplicado.

Para la aplicación de tratamientos se colocó: control; EDC: DEHP y MBP; moléculas reguladoras redox: AG, PGAL y SFN en ensayos de 24 h. Se tomaron capturas fotográficas con el microscopio óptico para registrar el efecto de los tratamientos de acuerdo con el tiempo establecido de 24 h **figura 8** y **figura 9**. Después de las observaciones, se realizó el lisado celular para la obtención del extracto intracelular y almacenar a  $-80^{\circ}\text{C}$ .



**Figura 8.** Efecto del tratamiento 24h de EDC (DEHP y MBP) en cultivo *in vitro* de neuroblastomas SH-SY5Y. De izquierda a derecha, se encuentran: Control, seguidos de tratamiento DEHP y MBP 10, 25 y 50 $\mu\text{M}$ .

\*Las flechas indican el fenotipo celular: rojo células neuroblásticas (N) y azul células adherentes al sustrato (S).



**Figura 9.** Efecto del tratamiento 24h de moléculas reguladoras redox en cultivo *in vitro* de neuroblastomas SH-SY5Y. De izquierda a derecha, se encuentran: Control, seguidos de tratamiento AG 0.75, 1, 1.5µg/ml, PGAL 1, 5 y 10µg/ml y SFN 1, 1.5 y 2.5µM.

\*Las flechas indican el fenotipo celular: rojo células neuroblásticas (N) y azul células adherentes al sustrato (S).

Considerando los datos proporcionados por la casa comercial ATCC® las células de neuroblastoma SH-SY5Y (CRL-2266™) crecen formando grupos de células con múltiples prolongaciones celulares finas y cortas llamadas neuritas o proceso neuronal. Las células de neuroblastoma SH-SY5Y se caracterizan por presentar dos fenotipos celulares: células neuroblásticas (N) y células adherentes al sustrato (S) (Walton *et al.*, 2004; Bell *et al.*, 2013). Las célula de tipo N presentan generalmente citoplasma escaso, procesos neuríticos, neurofilamentos, pseudoganglios y expresión de enzimas neurotransmisoras; mientras que las tipo S tienen como característica un citoplasma extenso y expresión de vimentina y CD44 ((Walton *et*

*al.*, 2004). Como puede observarse en las **figuras 8 y 9**, mediante la observación con el microscopio óptico se identificaron variaciones mínimas en densidad y fenotipo celular dependiendo del tratamiento empleado durante 24 horas.

En el caso del control, la densidad se mantuvo constante durante todo el tratamiento y se distinguió un fenotipo un tanto alargado, similar a los fibroblastos. Los contornos de las células son definidos y poco angulares de donde surgen las neuritas, siendo esto una característica típica del fenotipo N para neuroblastoma SH-SY5Y. Esto concuerda con lo reportado por Feles *et al.*, en 2022, quienes realizaron una detallada caracterización del cultivo celular *in vitro* de neuroblastomas SH-SY5Y (ATCC (CRL-2266)) en condiciones estándar.

Por otra parte, los cultivos tratados con EDC y moléculas reguladoras redox presentaron variaciones en su densidad y fenotipo dependiendo de la concentración empleada. El DEHP y MBP, en 10 y 25  $\mu\text{M}$  observaron un patrón similar entre ambos tratamientos. En específico, su densidad celular disminuyó mínimamente con un fenotipo predominante N. Sin embargo, los contornos se distinguieron un poco más angulares y en algunos casos visiblemente redondeados con una apariencia similar a una célula epitelial. Lo anterior es distintivo de un fenotipo S en neuroblastomas SH-SY5Y (Feles *et al.*, 2022).

Además, el fenotipo celular predominante resultó S bajo tratamientos de DEHP y MBP (50  $\mu\text{M}$ ). Particularmente, se observaron las células con neuritas reducidas en longitud y con bordes redondeados en su mayoría. En particular, el tratamiento con MBP mostró una disminución importante en la densidad celular.

El tratamiento con AG en las tres concentraciones empleadas (0.75, 1 y 1.5  $\mu\text{g/mL}$ ) disminuyó la densidad celular en todos los casos. Respecto al fenotipo celular predominante se identificó principalmente N, con los contornos definidos poco angulares y presencia de neuritas. En la concentración de 1 y 1.5  $\mu\text{g/mL}$  se distinguió algunas células ahusadas bipolares.

El tratamiento con PGAL presentó una disminución mínima en su densidad celular. Sin embargo, se visualizaron células no tan alargadas con los contornos bien

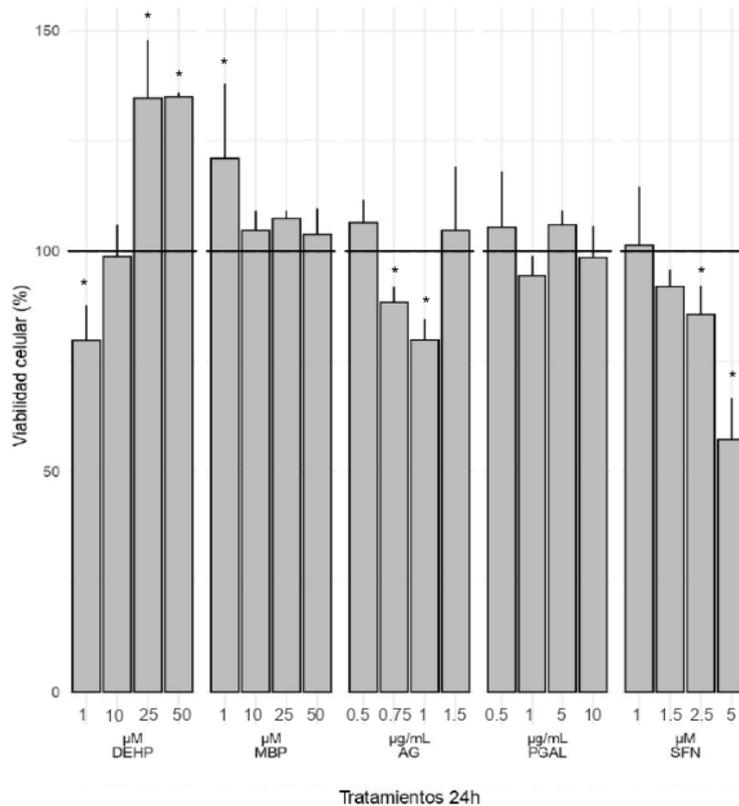
definidos y poco angulares, con las neuritas cortas y en su mayoría redondeadas. En el tratamiento a 5 µg/mL, se observó principalmente un fenotipo S en donde también se distinguen algunas células ahusadas bipolares cortas.

Finalmente, el tratamiento con SFN (1 y 1.5 µM) disminuyó mínimamente su densidad celular y mantuvo principalmente un fenotipo N. En contraste, para el tratamiento con 2.5 µM se identificó una significativa disminución en su densidad celular, así como células más redondeadas y con pocas o nulas neuritas.

## 6.2. Citotoxicidad

Se realizó un análisis de citotoxicidad para evaluar diferentes concentraciones de los EDC y las moléculas reguladoras redox (ver **figura 10**). El ensayo con el kit de proliferación celular II (XTT) se llevó a cabo en una placa de 96 pozos en donde se sembraron ~16,000 células por pozo y se colocó el control, así como los diferentes tratamientos por triplicado. Las moléculas cuyo vehículo fue el DMSO, a saber, DEHP, MBP y SFN, se resolvió usar disolución al 1% para evitar la toxicidad por DMSO. Esto es congruente con las recomendaciones reportadas por Traversari *et al.*, 2022.

Considerando este análisis, se determinaron tres concentraciones por compuesto respecto del control (100%) que no influyeran en la viabilidad celular para realizar el análisis de la actividad de MS.



**Figura 10.** Citotoxicidad (%) de EDCs y moléculas reguladoras redox a diferentes concentraciones en cultivo *in vitro* de neuroblastomas SH-SY5Y en tratamientos de 24 h. Gráficas de porcentaje respecto del control. La línea de color negro es el promedio del control. Los datos se presentan como el promedio  $\pm$ SD del triplicado de los experimentos.  $p < 0.05$  vs el Control.

Las sustancias químicas pueden tener un efecto neurotóxico y los estudios al respecto se han basado principalmente en modelos *in vivo* de roedores e *in vitro* de cultivos celulares primarios y líneas celulares (López-Suárez *et al.*, 2022). Sin embargo, los modelos basados en células humanas (*in vitro*) tienen una preferencia cada vez mayor para el estudio de neurotóxicos, debido a la problemática que significa el abordar las diferencias entre humanos y otras especies, así como la perspectiva bioética que limita el uso de modelos animales (Meijboom *et al.*, 2020).

El DEHP y MBP son EDC pertenecientes al grupo de los ftalatos que han observado tener un efecto sobre la viabilidad celular con base al tipo de molécula, concentración y el tiempo de exposición (Wu *et al.*, 2014). Existe evidencia de la neurotoxicidad de los ftalatos en el desarrollo (Testa *et al.*, 2012; Sedha *et al.*, 2021) con cierto grado de especificidad hacia células neuronales. Por ejemplo, el DEHP no presentó un efecto tóxico en oligodendrocitos (Guida *et al.*, 2014).

El análisis realizado en un periodo de 24 horas demostró que la exposición a DEHP induce una reducción en la viabilidad celular dependiente de la dosis. Se observó una afectación significativa en la viabilidad celular para 1  $\mu\text{M}$  (79.78%,  $\pm 7.98$ ) respecto al control. En contraste, la viabilidad se mantuvo constante e incluso se identificó un aumento de la viabilidad respecto al control para las concentraciones de 10, 25 y 50  $\mu\text{M}$  (98.76%,  $\pm 7.24$ ; 134.65%,  $\pm 13.21$ ; 134.95%,  $\pm 0.92$ ) (**Fig. 10**).

La citotoxicidad del DEHP ha sido evaluada tanto en líneas celulares de neuroblastoma humanas (SH-SY5Y) como de ratón (Neuro-2a). En el análisis realizado por Guida *et al.*, 2014 para neuroblastomas SH-SY5Y se identificó un efecto opuesto al obtenido en nuestro análisis. Los autores observaron una viabilidad al alza a menor concentración (0.1 $\mu\text{M}$ ) y un importante decremento de la viabilidad en concentraciones de 10, 50 y 100  $\mu\text{M}$ . Por su parte, en la línea celular Neuro-2a también se ha encontrado que la viabilidad se mantiene e incluso aumenta mínimamente a concentraciones bajas (1  $\mu\text{M}$ ). Sin embargo, se ha observado una evidente disminución de la viabilidad a partir de 10  $\mu\text{M}$  de DEHP, con un decremento muy significativo a partir de 100  $\mu\text{M}$  DEHP (Lin *et al.*, 2011; Aung *et al.*, 2014).

La exposición a MBP reveló en nuestro análisis que la concentración de 1  $\mu\text{M}$  (121.02%,  $\pm 17.04$ ) aumentó significativamente la viabilidad respecto del control. Además, la viabilidad se mantuvo constante respecto del control a partir de concentraciones de 10, 25 y 50  $\mu\text{M}$  (104.67%,  $\pm 4.44$ ; 107.35% y  $\pm 1.79$ ; 103.75%,  $\pm 5.89$ ) (**Fig. 10**).

El MBP presenta pocos estudios de citotoxicidad; sin embargo, se ha descrito su efecto adverso a altas concentraciones en algunas líneas celulares como: Sertoli cells (Hu *et al.*, 2014) y MLTC-1 (Chen *et al.*, 2013). En el caso de la línea celular MLTC-1, se observó un efecto similar al nuestro, en donde se mantenía constante la viabilidad en concentraciones de hasta 100  $\mu\text{M}$  y una disminución significativa de la viabilidad en concentraciones de 1000 y 2000  $\mu\text{M}$  para un periodo de 24 horas.

Las moléculas reguladoras redox están involucradas en el sistema de defensa contra ROS. El AG y SFN son moléculas ampliamente estudiadas como neuroprotectores, ya que se pueden utilizar eficazmente en el tratamiento de los trastornos inducidos por radicales libres del sistema nervioso (Angeloni *et al.*, 2015; Khorsandi *et al.*, 2020). Sin embargo, es muy importante poner especial atención a la dosis dependiendo del modelo y línea celular. Por ejemplo, se ha observado un efecto citotóxico a concentraciones mayores a 50 µg/ml de AG (Chandrasekhar *et al.*, 2018; Zhao *et al.*, 2019) y 10 µM de SFN (Klomprens & Ding, 2019).

Con base en lo anterior, en este trabajo se emplearon concentraciones de 0.5, 0.75, 1 y 1.5 µg/ml para AG. Los resultados mostraron un decremento mínimo pero significativo de la viabilidad a las concentraciones de 0.75 a 1 µg/mL (88.34%, ±3.62 y 79.87%, ±4.72)(**Fig. 10**). En contraste, la viabilidad aumentó después de 24 horas de tratamiento a la concentración de 1.5 µg/mL (104.67%, ±14.47)(**Fig. 10**). En comparación con otros estudios, el AG suprime la viabilidad celular dependiendo de la dosis, es decir, evita la proliferación celular por la producción de apoptosis a concentraciones más altas en diversas líneas celulares, a saber, U937 (Kim *et al.*, 2011), A549 (Ko *et al.*, 2022), HeLa (Aborehab & Osama, 2019). Un dato interesante a resaltar es lo observado en células de glioma U87 y U251n que presentaron una citotoxicidad selectiva dependiendo del tipo celular y la concentración de AG (Lu *et al.*, 2010).

Las concentraciones empleadas para el SFN fueron 1, 1.5, 2.5 y 5 µM y se observó una viabilidad celular constante sin promoción de un efecto citotóxico para las tres primeras concentraciones (101.30%, ±13.30; 91.98%, ±3.74 y 85.60%, ±6.58, respectivamente)(**Fig. 10**). Sin embargo, a 5 µM (57%, ±9.42)(**Fig. 10**) de SFN se registró una disminución significativa de la viabilidad celular. Lo anterior puede deberse al propio efecto tóxico del SFN que ha sido reportado en otros estudios con células de neuroblastoma SH-SY5Y (Angeloni *et al.*, 2015; Brasil *et al.*, 2022) y Neuro-2a (Zhao *et al.*, 2018).

El PGAL de origen natural, producido enzimáticamente a partir de AG, es un polianión multi radical termoestable y no tóxico. Se ha probado su efecto

antioxidante y antiinflamatorio en diferentes líneas celulares: THP-1, HCT 116 y HT-29, las cuales mostraron una disminución importante en la proliferación y adherencia celular con tratamientos de 100 y 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Zamudio-Cuevas *et al.*, 2021). Además, se ha observado una afectación en la proliferación celular de fibroblastos dérmicos primarios a partir de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Sánchez-Sánchez *et al.*, 2017).

Tomando en cuenta las características de la línea celular de neuroblastomas SH-SY5Y y de acuerdo con lo reportado sobre los estudios previos del PGAL, nosotros trabajamos con un intervalo de bajas concentraciones (0.5, 1, 5 y 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) para identificar el efecto citotóxico en esta línea celular. Los resultados indicaron que después de 24 horas de tratamiento existió un leve aumento en la viabilidad celular para 0.5 y 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (105.40%,  $\pm 12.63$ ; 105.97%,  $\pm 3.24$ )(**Fig. 10**) y una constante respecto del control para 1 y 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (94.44%,  $\pm 4.47$ ; 98.49%,  $\pm 7.21$ )(**Fig. 10**), sin afectar la viabilidad y adherencia celular.

Se considera un hecho relevante que se conserve la adherencia celular en los cultivos cuando son expuestos a PGAL. Lo anterior debido a que los neuroblastomas son una mezcla de células flotantes y adherentes en su mayoría. Consecuentemente, la adherencia es una ventaja para identificar adecuadamente tanto la citotoxicidad como el análisis de la actividad enzimática de MS en este estudio.

### **6.3. Actividad enzimática de metionina sintasa**

Con base en los ensayos de citotoxicidad se consideraron las concentraciones a utilizar para identificar la actividad enzimática de MS. Las concentraciones para di(2-etilhexil) ftalato (DEHP) y mono-butil-ftalato (MBP) 10, 25, 50  $\mu\text{M}$ ; ácido gálico (AG) 0.75, 1, 51.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; poliácido gálico (PGAL) 1, 5, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y sulforafano (SFN) 1, 1.5, 2.5  $\mu\text{M}$ .

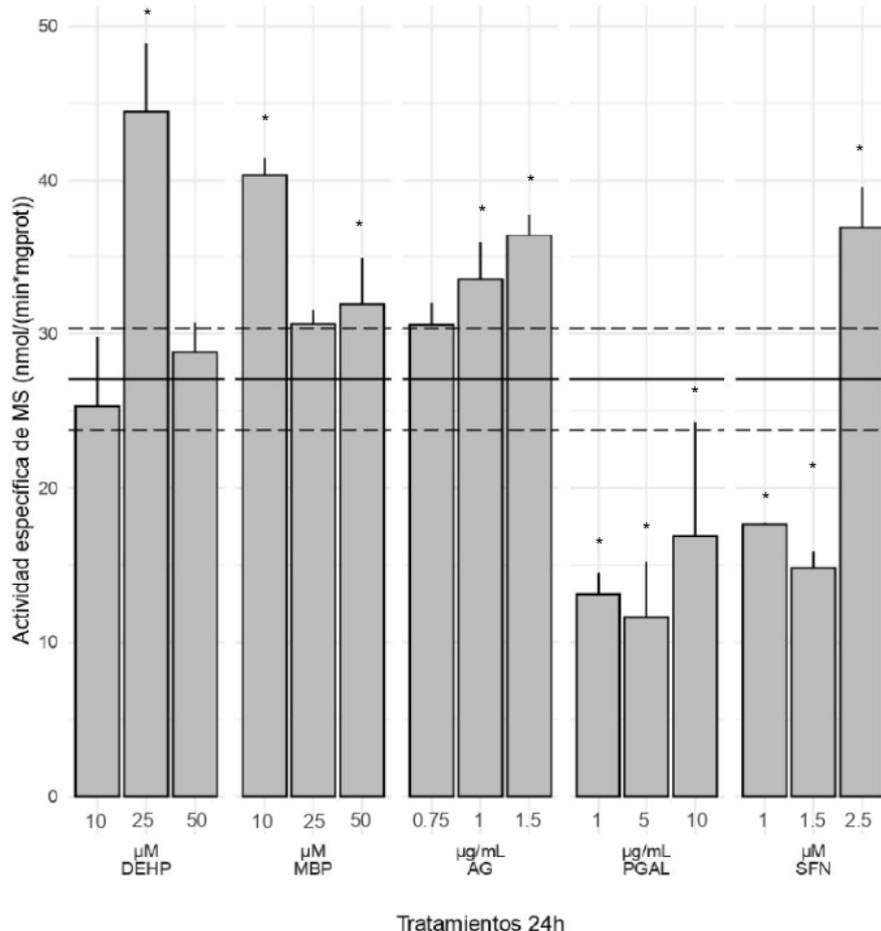
Se realizó el ensayo para actividad enzimática específica de MS con los lisados obtenidos. Para este caso, se consideró la estandarización de la concentración de proteína a 0.025 mg propuesta por Solano A., 2022, quien desarrolló la investigación

previa como parte del equipo de trabajo en nuestro laboratorio para la línea celular de neuroblastoma Neuro-2a.

Considerando la concentración de proteína a 0.025 mg para el ensayo, los resultados obtenidos pueden encontrarse en la **tabla 5** y representados en la **figura 11**. Al respecto, se realizó la reacción enzimática a través de los valores medidos por la absorbancia a 350 nm en el equipo EPOCH.

**Tabla 5.** Actividad específica de metionina sintasa obtenida a partir de cultivo *in vitro* de neuroblastomas SH-SY5Y con los diferentes tratamientos y pre-tratamientos.

Tratamiento	Actividad enzimática (nmol/min)	Actividad enzimática específica MS (nmol/(min*mg prot ))
Control	0.676	27.047 ± 3.295
DEHP 10µM	0.614	25.28 ± 4.492
DEHP 25µM	0.889	44.45 ± 4.444
DEHP 50µM	0.72	28.8 ± 1.927
MBP 10µM	1.008	40.346 ± 1.092
MBP 25µM	0.765	30.613 ± 0.922
MBP 50µM	0.797	31.893 ± 3.024
AG 0.75µg/mL	0.764	30.56 ± 1.427
AG 1µg/mL	0.838	33.52 ± 2.382
AG 1.5µg/m	0.910	36.405 ± 1.383
PGAL 1µg/mL	0.327	13.106 ± 1.380
PGAL 5µg/mL	0.290	11.626 ± 3.595
PGAL 10µg/mL	0.422	16.88 ± 7.367
SFN 1µM	0.441	17.64 ± 0.113
SFN 1.5µM	0.370	14.813 ± 1.043
SFN 2.5µM	0.923	36.946 ± 2.594



**Figura 11.** Actividad enzimática específica de Metionina Sintasa en cultivo *in vitro* de neuroblastomas SH-SY5Y con los diferentes tratamientos de 24 h. ANOVA de dos vías y prueba post hoc de comparación. La línea de color negro es el promedio del control y las segmentadas la SD encima y debajo de la media. Los datos se presentan como el promedio  $\pm$ SD del triplicado de los experimentos.  $p < 0.05$  vs el Control.

La línea celular SH-SY5Y es un modelo *in vitro* muy utilizado en investigación debido a sus características en función y diferenciación neuronal (Lopez-Suarez *et al.*, 2022). En particular, se ha enfocado para el estudio de trastornos del neurodesarrollo o afecciones neurodegenerativas debido a los sistemas adrenérgicos y dopaminérgicos involucrados en su naturaleza (Feles *et al.*, 2022).

Existe una creciente evidencia de la relación entre el estrés oxidativo y el TEA. En específico, un desequilibrio entre moléculas prooxidantes y antioxidantes se ha asociado con un daño a las moléculas y procesos celulares esenciales en las primeras etapas del desarrollo del SNC, lo que resulta clave en la presencia de diversos trastornos neurales, como lo es el TEA (Burke *et al.*, 2020). Deth *et al.* en 2014 proponen una hipótesis/mecanismo de metilación redox de ADN para el TEA,

la cual plantea una relación metabólica entre el estrés oxidativo y la metilación, específicamente la respuesta dependiente de MS.

La actividad de MS es esencial para la metilación dependiente de homocisteína y de folato de fosfolípidos estimulada por el receptor de dopamina D4, un proceso único de señalización que promueve la sincronización de las redes neuronales (Hodgson *et al.*, 2019). Al ocurrir una desregulación en el metabolismo de la actividad de MS por inhibición, se producen alteraciones en la metilación del ADN, así como alteraciones conductuales y cognitivas principalmente.

Un punto esencial que se considera en la hipótesis/mecanismo de la metilación redox del ADN es la generación de estrés oxidativo iniciado por factores ambientales en individuos genéticamente vulnerables. Es aquí, en donde el objetivo principal de nuestro trabajo se enfoca, ya que se está proponiendo a los EDC como factores ambientales que pueden tener un efecto en la actividad de MS.

La selección de los dos EDC utilizados en el presente estudio, a saber, DEHP y MBP se basaron en lo reportado por Solano A., 2022. En específico, este trabajo previo evaluó la actividad enzimática de MS en la línea celular Neuro-2a bajo la exposición de los principales EDC presentes en los alimentos: DEHP, MBP, OP y BPA. Los resultados reportan un mayor efecto para DEHP y MBP.

Como puede observarse en la **figura 11**, nuestro análisis evidencia que la actividad específica de MS del control es igual a  $27.047 \pm 3.295$  nmol/(min\*mg prot), es decir, la actividad de MS natural después de 24 horas. Al comparar los resultados obtenidos con los EDC y moléculas reguladoras redox encontramos valiosos datos.

Primero, para el DEHP (10  $\mu$ M) se obtuvo una actividad específica de MS de  $25.28 \pm 4.492$  nmol/(min\*mg prot), es decir, una leve reducción en comparación con el control. Para DEHP (25  $\mu$ M) se obtuvo un aumento significativo de  $44.45 \pm 4.444$  nmol/(min\*mg prot) en la actividad de MS y para DEHP (50  $\mu$ M) se observó un aumento mínimo de la actividad de MS con  $28.8 \pm 1.927$  nmol/(min\*mg prot) (**Fig. 11**).

Por su parte, el MBP mostró un aumento en la actividad específica de MS siendo significativo para 10 y 50  $\mu\text{M}$  con  $40.346 \pm 1.092$  y  $31.893 \pm 3.024$   $\text{nmol}/(\text{min} \cdot \text{mg prot})$  respectivamente, y mínimo para 25  $\mu\text{M}$  con  $30.613 \pm 0.922$  (**Fig. 11**). Estos resultados contrastan con lo obtenido por Solano A., 2022 que para el DEHP y MBP a 80  $\mu\text{M}$  se obtuvo una reducción significativa de la actividad específica de MS con 1.2002 y 0.7944  $\text{nmol}/(\text{min} \cdot \text{mg prot})$ .

El contraste obtenido con los datos de Solano A., 2022 y este estudio podría deberse a diversos factores. Aunque se trató de ajustar metodológicamente, para ambos estudios se utilizaron células de neuroblastoma, sin embargo, la línea celular de neuroblastoma 2a (Neuro 2A) utilizada por Solano A., 2022 es de ratón y la utilizado en este estudio es neuroblastoma SH-SY5Y de humano; otro aspecto a considerar es la propagación celular, Solano A., 2022 realizó los experimentos en cajas petri individuales y las mantuvo con medio de cultivo RPMI, mientras que en este estudio se realizaron los experimentos en placas de 6 pozos y se mantuvo con medios DMEM/F12.

Varios autores han reportado que el DEHP, utilizado como plastificante en la industria alimentaria, induce estrés oxidativo generando neurotoxicidad en células neurales de ratón: NE-4C y HT22 (Wu *et al.*, 2018 y Tu *et al.*, 2020). Sin embargo, mencionan que el mecanismo no es claro, pero identificaron que a partir de la concentración de 5 y 10  $\mu\text{M}$  existe variación significativa de algunas moléculas importantes en el estado redox celular. Por ejemplo, se identificó un aumento en el nivel de malondialdehído (MDA), una disminución en la proporción de GSH, así como en la actividad de superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GSH-PX).

Ahora bien, existe evidencia de la asociación del estrés oxidativo y el TEA. Se ha encontrado una reducción significativa de GSH, glutatión total (tGSH), GSH/GSSG, metionina, cisteína, vitamina B9, vitamina D, vitamina B12, vitamina E, en niños diagnosticados con TEA (Chen *et al.*, 2021). La relación GSH/GSSG es un indicador del entorno redox intracelular y el menor nivel de glutatión mitocondrial se asocia con sensibilidad neuronal al estrés oxidativo. Por lo que en el TEA se ha hecho hincapié hacia la investigación de procesos bioquímicos vitales como lo son la

metilación y transulfuración relacionados con el estado redox celular (Waligóra *et al.*, 2019).

Se ha propuesto que los EDC pudieran causar una desregulación endocrina en el estado redox celular y conducir a una variación en la actividad enzimática de MS que es altamente sensible al estrés oxidativo (Deth *et al.* 2008; Virant-Klun *et al.*, 2022). Al reducirse la actividad específica de MS se genera una variación en la metilación del ADN, luego entonces con base a nuestros resultados, ¿qué provocaría un aumento en la actividad específica de MS?

Es muy importante señalar que la actividad de MS también es necesaria para la metilación dependiente de folato a partir de los fosfolípidos en la membrana llevada a cabo por el receptor de dopamina D4 (Hodgson *et al.*, 2019). Al respecto, se ha propuesto que pudiese desempeñar un papel importante en la atención y en el aprendizaje debido a la plasticidad/arquitectura neuronal generada por los neurotransmisores (Hansen *et al.*, 2022).

Waly *et al.*, 2004 demostraron la capacidad del factor de crecimiento similar a la insulina-1 (IGF-1) y dopamina para aumentar la actividad de MS en células de neuroblastoma SH-SY5Y a través de un mecanismo regulado por las vías PI3-cinasa y MAP-cinasa. De este modo, identificaron que la actividad de MS es un determinante principal en los niveles de homocisteína y SAH; y la eficiencia de las reacciones de metilación se rige por la relación en concentración de SAM y SAH.

Para resumir, la actividad de MS es clave en el engranaje de los patrones de metilación del ADN y producción de neurotransmisores. El incremento en la actividad de MS aumenta la metilación del ADN (Waly *et al.*, 2004) mientras que su inhibición está asociada a la hipometilación global del ADN aumentando la expresión de genes sensibles que resultan clave en mecanismos epigenéticos y epigenómicos (Guéant *et al.*, 2013).

Nuestros resultados indican que los EDC produjeron en conjunto un aumento en la actividad específica de MS y que en algunos casos es significativo como el: DEHP

(25  $\mu$ M) y MBP (10 y 50  $\mu$ M). Mientras que las moléculas reguladoras redox mostraron un patrón bastante notable en donde existe una variación en la actividad de MS; se identificó un aumento significativo en AG (1 y 1.5  $\mu$ g/mL) y SF (2.5  $\mu$ M) y un decremento significativo de PGAL (1, 5 y 10  $\mu$ g/mL) y SF (1 y 1.5  $\mu$ M).

El tratamiento con AG aumentó la actividad específica de MS dependiendo de la concentración empleada:  $30.56 \pm 1.427$  nmol/(min\*mg prot) a 0.75  $\mu$ g/mL, mientras que el aumento fue significativo con  $33.52 \pm 2.382$  y  $36.405 \pm 1.383$  nmol/(min\*mg prot) para 1  $\mu$ g/mL y 1.5  $\mu$ g/mL, respectivamente (**Fig. 11**). En cambio en el tratamiento con PGAL, se mostró una disminución significativamente importante en la actividad específica de MS para las tres concentraciones: valores notablemente reducidos de  $13.106 \pm 1.380$  y  $11.626 \pm 3.595$  nmol/(min\*mg prot) a 1  $\mu$ g/mL y 5  $\mu$ g/mL, respectivamente; y un ligero aumento con  $16.88 \pm 7.367$  nmol/(min\*mg prot) para la concentración de 10  $\mu$ g/mL (**Fig. 11**).

Del mismo modo, el SFN presentó una actividad específica de MS con una reducción significativa para las concentraciones de 1 y 1.5  $\mu$ M con valores de  $17.64 \pm 0.113$  y  $14.813 \pm 1.043$  nmol/(min\*mg prot). Por el contrario, se identificó un aumento significativo de  $36.946 \pm 2.594$  nmol/(min\*mg prot) para la concentración de 2.5  $\mu$ M (**Fig. 11**).

El AG y el SFN son compuestos antioxidantes que tienen acción neuroprotectora en diferentes modelos de neurodegeneración, neurotoxicidad y estrés oxidativo (Dagalia *et al.*, 2014; McGuinness & Kim, 2020). Por ejemplo, el AG se ha reportado que funge un papel protector mejorando el estado antioxidante celular inhibiendo la producción de citocinas proinflamatorias en cultivos primarios de neuronas de la corteza de rata a 25 y 50  $\mu$ g/mL (Maya *et al.*, 2018).

Por su parte, el efecto del SFN como antioxidante se ha evaluado en células SH-SY5Y al exponer con SFN (5  $\mu$ M) por 24 h antes de la administración de metilglioxal a 500  $\mu$ M por 24 h más. El estudio demostró que el SFN previno el deterioro redox mitocondrial al estimular la actividad de la enzima  $\gamma$ -glutamil cisteína ligasa, lo que llevó a una mayor síntesis GSH (Brasil *et al.*, 2021).

Por lo tanto, es muy interesante reflexionar que mediante la ingestión de alimentos se puede tener una involuntaria, constante y acumulativa exposición a moléculas con el potencial de alterar la homeostasis redox celular. Esta alteración ha sido asociada por múltiples autores con el mecanismo de metabolismo redox del ADN o el metabolismo de neurotransmisores que se asocia con trastornos neurológicos como lo es el TEA.

Finalmente, me parece una gran área de oportunidad la identificación de biomoléculas relacionadas con el TEA. Es un trastorno generalizado del desarrollo con múltiples factores asociados que intervienen en la calidad de vida de las personas y sus familias; por lo tanto, el hecho de identificarlo cuantitativamente mediante algún biomarcador específico sería de gran ayuda para su tratamiento o profilaxis oportuna.

## **7. Conclusiones**

- El DEHP en células de neuroblastoma SH-SY5Y tiene un efecto citotóxico a la concentración de 10  $\mu$ M.
- El AG 0.75 y 1  $\mu$ g/mL, y el SF 2.5 y 5  $\mu$ M en células de neuroblastoma SH-SY5Y tiene un efecto citotóxico.
- La actividad de MS en células de neuroblastoma SH-SY5Y tiene un aumento significativo con los EDC: DEHP 25  $\mu$ M y MBP 10 y 50  $\mu$ M.
- Las moléculas reguladoras redox en células de neuroblastoma SH-SY5Y influyeron en la variación de la actividad de MS dependiendo de la concentración. Obteniendo un aumento significativo en AG 1 y 1.5  $\mu$ g/mL y el SF 2.5  $\mu$ M y un decremento significativo de PGAL 1, 5 y 10  $\mu$ g/mL y el SF 1 y 1.5  $\mu$ M.

## 8. Perspectivas

- Identificar por medio de pretratamientos y postratamientos si las moléculas reguladoras redox pueden tener un efecto neuroprotector o neurorestaurador en la actividad de MS.
- Profundizar en la relación de la actividad de MS con la presencia de TEA.
- Evaluar la cinética celular de neuroblastomas SH-SY5Y con las diversas concentraciones de EDC.
- Analizar la producción de metabolitos celulares con los diferentes tratamientos de EDC y moléculas reguladoras redox.
- Evaluar cómo los reguladores redox tiene un efecto benéfico en MS a través de diferentes biomarcadores.
- Identificar qué vías de señalización además de MS pueden influir en el estado REDOX celular con la presencia de EDC.

## 9. Referencias bibliográficas

- Aborehab N. M., & Osama N. (2019). Effect of Gallic acid in potentiating chemotherapeutic effect of Paclitaxel in HeLa cervical cancer cells. *Cancer Cell International*, 19(1). doi:10.1186/s12935-019-0868-0.
- Al-Gadani Y., El-Ansary A, Attas O, Al-Ayadhi L (2009) Metabolic biomarkers related to oxidative stress and antioxidant status in Saudi autistic children. *Clin Biochem* 42:1032–40. 1032-40. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2009.03.011.
- American Psychiatric Association (2013). What is autism spectrum disorder? Retrieved on August 4th, 2021 from <https://www.psychiatry.org/patients-families/autism/what-is-autism-spectrum-disorder>.
- Angeloni C., Malaguti, M., Rizzo, B., Barbalace, M. C., Fabbri, D., & Hrelia, S. (2015). Neuroprotective Effect of Sulforaphane against Methylglyoxal Cytotoxicity. *Chemical Research in Toxicology*, 28(6), 1234–1245. doi:10.1021/acs.chemrestox.5b0.
- Aular Y. (2013) Disruptores endocrinos: un nuevo informe con recomendaciones para reducir sus efectos adversos a la salud. *Salud vol.17 no.1 Valencia ene. 2013*. ISSN 1316-7138.
- Aung, K. H., Win-Shwe, T.-T., Kanaya, M., Takano, H., Tsukahara, S. (2014). Involvement of hemeoxygenase-1 in di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP)-induced apoptosis of Neuro-2a cells. *The Journal of Toxicological Sciences*, 39(2), 217–229. doi:10.2131/jts.39.217
- Bandarian V., Patridge K.A., Lennon B.W., Huddler D.P., Matthews R.G., Ludwig M.L. (2002) Domain alternation switches B(12)-dependent methionine synthase to the activation conformation. *Nat Struct Biol* 9: 53–56. <https://doi.org/10.1038/nsb738>.
- Bell, N., Hann, V., Redfern, C. P. F., & Cheek, T. R. (2013). *Store-operated Ca<sup>2+</sup> entry in proliferating and retinoic acid-differentiated N- and S-type neuroblastoma cells. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1833(3), 643–651. doi:10.1016/j.bbamcr.2012.11.025.
- Biosca-Brull J., Pérez-Fernández C., Mora S., Carrillo B., Pinos H., Conejo N.M., Collado P., Arias J.L. Martón-Sánchez F., Sánchez-Snted F., Colomina M.T. (2021) Relationship between Autism Spectrum Disorder and Pesticides: A Systematic Review of Human and Preclinical Models. *Int J Environ Res Public Health*. 2021 May; 18(10): 5190. doi:10.3390/ijerph18105190.
- Birnbaum L.S. (2013) State of the science of endocrine disruptors. *Environ Health Perspect*. 2013 Apr;121(4):A107. doi: 10.1289/ehp.1306695.
- Blackburn B., Cox K, Zhang Y., Anderson D., Wilkins D., Porucznik C. (2020). Efecto del enjuague de alimentos enlatados sobre la exposición al bisfenol-A: el experimento del hummus. *Resultados experimentales*, 1 , E45. doi: 10.1017 / exp.2020.52.
- Bölte S., Girdler S. & Marschik P.B. (2019) The contribution of environmental exposure to the etiology of autism spectrum disorder. *Cell. Mol. Life Sci*. 76, 1275–1297. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2988-4>

- Bjørklund G., Meguid N.A., El-Bana M.A, Tinkov A.A. Saad K., Dadar M., Hemimi M., Skalny A.V., Hosnedlová B., Kizek R., Osredkar J., Urbina M.A., Fabjan T., El-Houfey A.A., Kałużna-Czaplińska J., Gałtarek P., Chirumbolo S. (2020) Oxidative Stress in Autism Spectrum Disorder. *Molecular Neurobiology* 57:2314–2332. doi:10.1007/s12035-019-01742-2.
- Brasil F. B., Gobbo R. C. B., de Almeida F. J. S., Luckachaki M. D., dos Santos Petry F., de Oliveira M. R. (2021). The Isothiocyanate Sulforaphane Depends on the Nrf2/γ-GCL/GSH Axis to Prevent Mitochondrial Dysfunction in Cells Exposed to Methylglyoxal. *Neurochemical Research*, 46(4), 740–754. doi:10.1007/s11064-020-03204-x
- Brasil F.B., de Almeida F.J.S., Luckachaki M.D., Dall'Oglio E.L., de Oliveira M.R. (2022) The isothiocyanate sulforaphane prevents mitochondrial impairment and neuroinflammation in the human dopaminergic SH-SY5Y and in the mouse microglial BV2 cells: role for heme oxygenase-1. *Metab Brain Dis.* 2022 Apr 25. Epub ahead of print. PMID: 35469083. doi: 10.1007/s11011-022-00990-x.
- Braun J. M., Kalkbrenner A. E., Calafat A. M., Yolton K., Ye X., Dietrich K. N., Lanphear, B. P. (2011). Impact of Early-Life Bisphenol A Exposure on Behavior and Executive Function in Children. *PEDIATRICS*, 128(5), 873–882. doi:10.1542/peds.2011-1335
- Braun J.M. (2012) Endocrine disrupting compounds, gonadal hormones, and autism. *Developmental Medicine & Child Neurology*, 54(11), 1068–1068 doi: 10.1111/j.1469-8749.2012.04372.x.
- Braun J.M., Kalkbrenner A., Just A., Yolton K., Calafat A., Sjödin A., Hause R., Webster G., Chen A., Lanphear B. (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.* 2014 Mayo; 122(5):513-520. doi: 10.1289/ehp.1307261.
- Braun J. M., Muckle G., Arbuckle T., Bouchard M. F., Fraser W. D., Ouellet E., Webster G.M., Lanphear, B. P. (2017). Associations of Prenatal Urinary Bisphenol A Concentrations with Child Behaviors and Cognitive Abilities. *Environmental Health Perspectives*, 125(6), 067008. doi:10.1289/ehp984.
- Burke S. L., Cobb J., Agarwal R., Maddux M., Cooke M. S. (2020). How Robust is the Evidence for a Role of Oxidative Stress in Autism Spectrum Disorders and Intellectual Disabilities? *Journal of Autism and Developmental Disorders*. doi:10.1007/s10803-020-04611-3.
- Chandrasekhar Y., Phani Kumar G., Ramya E. M., & Anilakumar K. R. (2018). Gallic Acid Protects 6-OHDA Induced Neurotoxicity by Attenuating Oxidative Stress in Human Dopaminergic Cell Line. *Neurochemical Research*, 43(6), 1150–1160. doi:10.1007/s11064-018-2530-y.
- Chauhan A. Chauhan V. (2006) Oxidative stress in autism. *Pathophysiology*. Volume 13, Issue 3 171-181. doi: 10.1016/j.pathophys.2006.05.007.
- Chen L., Shi X.-J., Liu H., Mao X., Gui L.-N., Wang H., Cheng Y. (2021) Oxidative stress marker aberrations in children with autism spectrum disorder: a systematic review and meta-analysis of 87 studies (N = 9109). *Translational Psychiatry*, 11(1). doi:10.1038/s41398-020-01135-3.

- Chen X., Zhou Q., Leng L., Chen X., Sun Z., & Tang, N. (2013). Effects of di(n-butyl) and monobutyl phthalate on steroidogenesis pathways in the murine Leydig tumor cell line MLTC-1. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 36(2), 332–338. doi:10.1016/j.etap.2013.04.013.
- Daglia M., Di Lorenzo A., Nabavi S.F., Talas Z.S., Nabavi S.M. (2014) Polyphenols: well beyond the antioxidant capacity: gallic acid and related compounds as neuroprotective agents: you are what you eat! *Curr Pharm Biotechnol*. 2014;15(4):362-72. doi: 10.2174/138920101504140825120737.
- Dávila D. & Torres-Aleman I. (2008) Neuronal death by oxidative stress involves activation of FOXO3 through a two-arm pathway that activates stress kinases and attenuates insulin-like growth factor I signaling. *Mol Biol Cell* 19:2014–2025. doi: 10.1091/mbc.e07-08-0811.
- De Oliveira M. R., de Bittencourt Brasil F., Fürstenau C. R. (2017). Sulforaphane Promotes Mitochondrial Protection in SH-SY5Y Cells Exposed to Hydrogen Peroxide by an Nrf2-Dependent Mechanism. *Molecular Neurobiology*, 55(6), 4777–4787. doi:10.1007/s12035-017-0684-2
- Deth R., Muratore C., Benzecry J., Power-Charnitsky V-A., Waly M. (2008) How environmental and genetic factors combine to cause autism:A redox/methylation hypothesis, *NeuroToxicology* 29, 190–201. doi: 10.1016/j.neuro.2007.09.010.
- Deth R., Trivedi, M.S., Hodgson, N.W., Muratore, C.R., Waly, M.I. (2014). Redox/Methylation Theory and Autism. *Comprehensive Guide to Autism*. Springer Science, 1389-1410. doi.org/10.1007/978-1-4614-4788-7\_78.
- Dixon M.M., Huang S., Matthews R.G., Ludwig M (1996) The structure of the C-terminal domain of methionine synthase: presenting S-adenosylmethionine for reductive methylation of B12. *Structure* 4: 1263–1275. doi.org/10.1016/S0969-2126(96)00135-9.
- Drummond J. (1995). Characterization of nonradioactive assays for cobalamin-dependent and cobalamin-independent methionine synthase enzymes, *Analytical Biochemistry*, volumen 228, 323-329.
- Engel S.M., Miodovnik A., Canfield R.L., ZHU c., Silva MJ., Calafat A., Wolff MA. (2010) Prenatal Phthalate Exposure Is Associated with Childhood Behavior and Executive Functioning. *Environ Health Perspect*. 2010 Apr; 118(4): 565–571. doi: 10.1289/ehp.0901470.
- Engel S.M., Patisaul A.B., Brody C., Hauser R., Zota A.R., Bennet D.H., Swanson M., Whyatt. (2021) Neurotoxicity of Ortho-Phthalates: Recommendations for Critical Policy Reforms to Protect Brain Development in Children. *Am J Public Health*. 2021 April; 111(4): 687–695. doi: 10.2105/AJPH.2020.306014.
- Evans J.C., Huddler D.P., Hilgers M.T., Romanchuk G., Matthews R.G. (2004) Structures of the N-terminal modules imply large domain motions during catalysis by methionine synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 3729–36. doi: 10.1073/pnas.0308082100.
- Falero A., Pérez C., Luna B, Fonseca M. (2005) Impacto de los disruptores endócrinos en la salud y el medio ambiente. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, Vol. 36, No. Especial, 2005. ISSN: 0253-5688.

- Fang Y.Z., Yang S., Wu G. (2002) Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*. 2002 Oct;18(10):872-9. doi: 10.1016/s0899-9007(02)00916-4.
- Feles S., Overath C., Reichardt S., Diegeler S., Schmitz C., Kronenberg J., Baumstark-Khan C., Hemmersbach R., Hellweg C.E., Liemersdorf C. (2022) Streamlining Culture Conditions for the Neuroblastoma Cell Line SH-SY5Y: A Prerequisite for Functional Studies. *Methods Protoc*. 2022 Jul 12;5(4):58. PMID: 35893584; PMCID: PMC9326679. doi: 10.3390/mps5040058.
- Feng J., Zhou Y., Campbell S. L., Le T., Li E., Sweatt J. D., Silva A. j., Fan G. (2010). Dnmt1 and Dnmt3a maintain DNA methylation and regulate synaptic function in adult forebrain neurons. *Nature Neuroscience*, 13(4), 423–430. doi:10.1038/nn.2514
- García-Gómez C. (2012) Contaminantes emergentes: efectos y tratamientos de remoción, *Revista QuímicaViva*, Número 2, año 10.
- Genco M., Anderson-Shaw L., Sargis R. M. (2020) Unwitting Accomplices: Endocrine Disruptors Confounding Clinical Care. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. doi:10.1210/clinem/dgaa358.
- Guéant J.L., Caillerez-Fofou M., Battaglia-Hsu S., Alberto J.M., Freund, J.N., Dulluc I., Adjalla C., Maury F., Merle C., Nicolas J.P., Namour F., Daval, J.L. (2013). Molecular and cellular effects of vitamin B12 in brain, myocardium and liver through its role as co-factor of methionine synthase. *Biochimie*, 95(5), 1033–1040. doi:10.1016/j.biochi.2013.01.
- Guida N., Laudati G., Galgani M., Santopaolo M., Montuori, P., Triassi M., Di Renzo G., Canzoniero L., Formisano, L. (2014). Histone deacetylase 4 promotes ubiquitin-dependent proteasomal degradation of Sp3 in SH-SY5Y cells treated with di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP), determining neuronal death. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 280(1), 190–198. doi:10.1016/j.taap.2014.07.014
- Hansen J.Y., Shafiei G., Markello R.D., Smar K., Cox S.M.L., Nørgaard M., Beliveau V., Wu Y., Gallezot J.D., Aumont E., Servaes S., Scala S.G., DuBois J.M., Wainstein G., Bezgin G., Funck T., Schmitz T.W., Spreng R.N., Galovic M., Koeppe M.J., Duncan J.S., Coles J.P., Fryer T.D., Aigbirhio F.I., *et. al.* (2022) Mapping neurotransmitter systems to the structural and functional organization of the human neocortex. *Nat Neurosci* 25, 1569–1581. doi: 10.1038/s41593-022-01186-3.
- Hodges H., Fealko C., Soares N.; (2020). Autism spectrum disorder: definition, epidemiology, cuses, and clinical evaluation, *Transl Pediatr*. 2020 Feb; 9(Suppl 1): S55–S65. doi: 10.21037/tp.2019.09.09.
- Hodgson N. W., Waly M. I., Trivedi M. S., Power-Charnitsky V.-A., Deth R. C. (2019). Methylation-related metabolic effects of D4 dopamine receptor expression and activation. *Translational Psychiatry*, 9(1). doi:10.1038/s41398-019-0630-3.
- Hu Y., Wang R., Xiang Z., Qian W., Han X., & Li D. (2014). Antagonistic Effects of a Mixture of Low-Dose Nonylphenol and Di-N-Butyl Phthalate (Monobutyl Phthalate) on the Sertoli Cells and Serum Reproductive Hormones in Prepubertal Male Rats In Vitro and In Vivo. *PLoS ONE*, 9(3), e93425. doi:10.1371/journal.pone.00934.
- James W. H. (2012) A potential explanation of some established major risk factors for autism. *Developmental Medicine & Child Neurology*, 54(4), 301–305. doi:10.1111/j.1469-8749.2012.04225.x

- Jarrett JT, Huang S, Matthews RG (1998) Methionine synthase exists in two distinct conformations that differ in reactivity toward methyltetrahydrofolate, adenosylmethionine, and flavodoxin. *Biochemistry* 37: 5372–82. doi: 10.1021/bi9730893.
- Jedynak P., Maitre L., Guxens M., Gützkow K.B., Julvez J., López-Vicente M., Sunyer J., Casas M., Chatz L.I., Gražulevičienė R., Kampouri M., McEachan R., Mon-Williams M., Tamayo I., Thomsen C., Urquiza J., Vafeiadi M., Wright J., Basagaña X., Vrijheid M., Philippat C. (2021) Prenatal exposure to a wide range of environmental chemicals and child behaviour between 3 and 7 years of age – An exposome-based approach in 5 European cohorts, *Science of The Total Environment*, Volume 763, 144115, ISSN 0048-9697. doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144115.
- Jensen K.P. (2005) Electronic structure of Cob(I)alamin: the story of an unusual nucleophile. *J Phys Chem B* 109: 10505–10512. doi:10.1021/jp050802m.
- Karimi P., Kamali E., Mousavi S.M., Karahmadi M. (2017) Environmental factors influencing the risk of autism. *J. Res. Med. Sci.* 2017;22:27. doi: 10.4103/1735-1995.200272.
- Khorsandi K., Kianmehr Z., Hosseinmardi Z., & Hosseinzadeh R. (2020). Anti-cancer effect of gallic acid in presence of low level laser irradiation: ROS production and induction of apoptosis and ferroptosis. *Cancer Cell International*, 20(1). doi:10.1186/s12935-020-1100-y.
- Kim N.-S., Jeong S.-I., Hwang B.-S., Lee Y.-E., Kang S.-H., Lee H.-C., Oh C.-H. (2011). Gallic Acid Inhibits Cell Viability and Induces Apoptosis in Human Monocytic Cell Line U937. *Journal of Medicinal Food*, 14(3), 240–246. doi:10.1089/jmf.2010.1160
- Klomprens E.A. & Ding Y. (2019) The neuroprotective mechanisms and effects of sulforaphane. *Brain Circ.* 2019 Apr-Jun;5(2):74-83. Epub 2019 Jun 27. PMID: 31334360; PMCID: PMC6611193. doi: 10.4103/bc.bc\_7\_19.
- Ko E.B., Jang Y.G., Kim C.W., Go R.E., Lee H.K., Choi K.C. (2022) Gallic Acid Hindered Lung Cancer Progression by Inducing Cell Cycle Arrest and Apoptosis in A549 Lung Cancer Cells via PI3K/Akt Pathway. *Biomol Ther (Seoul)*. 30(2):151-161. PMID: 34261818; PMCID: PMC8902450. doi: 10.4062/biomolther.2021.074.
- Landrigan P., Lambertini L., Birnbaum L. (2012) estrategia de investigación para descubrir las causas ambientales del autismo y las discapacidades del neurodesarrollo. *Perspectiva de salud ambiental* 2012. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.1104285>.
- Lin C.H., Chen T.J., Chen S.S., Hsiao P.C., Yang R.C., (2011). Activation of Trim17 by PPAR $\gamma$  is involved in di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP)-induced apoptosis on Neuro-2a cells. *Toxicol. Lett.* 206, 245–251. doi: <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2011.08.002>.
- Lopez-Suarez L., Al Awabdh S., Coumoul X., Chauvet C. (2022) The SH-SY5Y human neuroblastoma cell line, a relevant in vitro cell model for investigating neurotoxicology in human: Focus on organic pollutants. *NeuroToxicology*, Volume 92, 2022, 131-155, ISSN 0161-813X. doi: <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2022.07.008>.
- Lu, Y., Jiang, F., Jiang, H., Wu, K., Zheng, X., Cai, Y., ... To, S.-S. T. (2010). Gallic acid suppresses cell viability, proliferation, invasion and angiogenesis in human glioma cells. *European Journal of Pharmacology*, 641(2-3), 102–107. doi:10.1016/j.ejphar.2010.05.0.

- McGuinness G., Kim Y. (2020) Sulforaphane treatment for autism spectrum disorder: A systematic review. *EXCLI J.* 2020 Jun 26;19:892-903.PMID: 33013262; PMCID: PMC7527484. doi: 10.17179/excli2020-2487.
- Main P.A., Angley M.T., Thomas P., O'Doherty C.E., Fenech M. (2010) Folate and methionine metabolism in autism: a systematic review. *Am J Clin Nutr* 91:1598–620. doi: 10.3945/ajcn.2009.29002.
- Manivasagam T., Arunadevi S., Essa M.M., Babu C.S., Borah A., Thenmozhi A.J., Qoronfleh A.W. (2020) Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Autism. *Personalized Food Intervention and Therapy for Autism Spectrum Disorder Management, 2020, Volume 24.* ISBN : 978-3-030-30401-0. doi: 10.1007/978-3-030-30402-7\_7.
- Mariani E., Polidori M. C., Cherubini A., Mecocci P. (2005). Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: An overview. *Journal of Chromatography B*, 827(1), 65–75. doi:10.1016/j.jchromb.2005.04.
- Maya S., Prakash T., Das K. (2018). Assessment of neuroprotective effects of Gallic acid against glutamate-induced neurotoxicity in primary rat cortex neuronal culture. *Neurochemistry International.* doi:10.1016/j.neuint.2018.10.0.
- Meijboom F. L. B., Kostrzewa E., & Leenaars C. H. C. (2020). Joining forces: the need to combine science and ethics to address problems of validity and translation in neuropsychiatry research using animal models. *Philosophy, Ethics, and Humanities in Medicine*, 15(1). doi:10.1186/s13010-019-0085-4.
- Ming X, Brimacombe M, Chaaban J, Zimmerman-Bier B, Wagner G.C. (2006) Autism spectrum disorders: concurrent clinical disorders. *J Child Neurol* 2008; 23: 6–13. doi: 10.1177/0883073807307102.
- Miodovnik A., Engel S. M., Zhu C., Ye X., Soorya L. V., Silva M. J., Calafat A.M., Wolff M. S. (2011). Endocrine disruptors and childhood social impairment. *NeuroToxicology*, 32(2), 261–267. doi:10.1016/j.neuro.2010.12.00.
- Moore L. D., Le T., & Fan G. (2012). DNA Methylation and Its Basic Function. *Neuropsychopharmacology*, 38(1), 23–38. doi:10.1038/npp.2012.112.
- Moosa A., Shu H., Sarachan T., Hu V.W. (2018) Are endocrine disrupting compounds environmental risk factors for autism spectrum disorder? *Horm Behav.* 2018 May;101:13-21. doi.org/10.1016/j.yhbeh.2017.10.003.
- Muncker J. (2009) Exposure to endocrine disrupting compounds via the food chain: Is packaging a relevant source?. *Science of The Total Environment* Volume 407, Issue 16, 1 August 2009, 4549-4559. doi: 10.1016/j.scitotenv.2009.05.006.
- Muratore C.R., Hodgson N.W., Trivedi M.S., Abdolmaleky H.M., Perisco A.M., Lintas C., De La Monte S., Deth R.C. (2013) Age-Dependent Decrease and Alternative Splicing of Methionine Synthase mRNA in Human Cerebral Cortex and an Accelerated Decrease in Autism. *PLoS ONE*, 8(2). 2013;8(2):e56927. doi: 10.1371/journal.pone.0056927.
- Noris-García E., Rodríguez-Rey A., Whilby M., Ramos L., Robinson-Agramonte M., Pérez A.; (2013). Lead levels and DNA damage in children with autistic spectrum disorders. *Rev Cubana Hig Epidemiol* vol.51 no.1 Ciudad de la Habana.

- Perera F., Vishnevetsky J., Herbstman J. B., Calafat A. M., Xiong W., Rauh V., Wang S. (2012) Prenatal bisphenol a exposure and child behavior in an inner-city cohort. *Environmental health perspectives*, 120(8), 1190–1194. <https://doi.org/10.1289/ehp.1104492>.
- Pisoschi A. M., Pop A., Iordache F., Stanca L., Predoi G., Serban A. I. (2020) Oxidative stress mitigation by antioxidants - an overview on their chemistry and influences on health status. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 112891. doi:10.1016/j.ejmech.2020.112891.
- Philippat C., Nakiwala D., Calafat A. M., Botton J., De Agostini M., Heude B., Slama R. (2017) Prenatal Exposure to Nonpersistent Endocrine Disruptors and Behavior in Boys at 3 and 5 Years. *Environmental Health Perspectives*, 125(9), 097014. doi:10.1289/ehp1314.
- Polyzos S., Kountouras J., Deretzi G., Zavos C., Mantzoros C. (2012) The Emerging Role of Endocrine Disruptors in Pathogenesis of Insulin Resistance: A Concept Implicating Nonalcoholic Fatty Liver Disease”, *Current Molecular Medicine*; 12(1) . <https://doi.org/10.2174/156652412798376161>.
- Pombo M., Castro L., Barreiro J., Cabanas P. (2020) A review on endocrine disruptor and their possible impact on human health. *Rev Esp Endocrinol Pediatr* 2020; Vol. 11. 2. 10.3266/RevEspEndocrinolPediatr.pre2020.Nov.619.
- Quintana D. (2015) Biomarcadores genéticos y metabólicos en los trastornos del espectro autista, *Rev Cubana Genet Comunit.* 2015;9(3):14-22.
- Rebuli M. E. & Patisaul H. B. (2016) Assessment of sex specific endocrine disrupting effects in the prenatal and pre-pubertal rodent brain. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 160, 148–159. doi:10.1016/j.jsbmb.2015.08.021.
- Romero-Montero A., del Valle L. J., Puiggali, J., Montiel C., García-Arrazola R., & Gimeno M. (2020). Poly(gallic acid)-coated polycaprolactone inhibits oxidative stress in epithelial cells. *Materials Science and Engineering: C*, 111154. doi:10.1016/j.msec.2020.111154.
- Sakhi A, Lillegaard I.T., Voorspoels S., Carlsen M.H., Løken E.B., Brantsæter A.L., Haugen M., Meltzer H.M., Thomsen C. (2014) Concentrations of phthalates and bisphenol A in Norwegian foods and beverages and estimated dietary exposure in adults. *Environment International*, Volume 73, 2014, 259-269, <https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.08.005>.
- Sánchez-Sánchez R., Romero-Montero A., Montiel C., Melgarejo-Ramírez Y., Sánchez-Ortega C., Lugo-Martínez H., Cabello-Arista B., García-Arrazola R., Gimeno, M. (2017). Cytoprotective effect of the enzyme-mediated polygallic acid on fibroblast cells under exposure of UV-irradiation. *Materials Science and Engineering: C*, 76, 417–424. doi:10.1016/j.msec.2017.03.068
- Schafer F.Q. & Buettner G.R. (2001) Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med.* 2001 Jun 1;30(11):1191-212. doi: 10.1016/s0891-5849(01)00480-4.
- Schantz S. L., & Widholm J. J. (2001). Cognitive effects of endocrine-disrupting chemicals in animals. *Environmental Health Perspectives*, 109(12), 1197–1206. doi:10.1289/ehp.011091197.
- Sedha S., Lee H., Singh S., Kumar S., Jain S., Ahmad A., Bin Y. A., Sonwal S., Shukla S., Simal-Gandara J., Xiao J., Huh Y. S., Bajpai V. K. (2021). Reproductive toxic potential of

- phthalate compounds – State of art review. *Pharmacological Research*, 167, 105536. doi:10.1016/j.phrs.2021.105536.
- Serrano S.E., Braun J., Trasande L., Dills R., Sathyanarayana S. (2014) Phthalates and diet: a review of the food monitoring and epidemiology data. *Environ Health*.13(1):43. doi: 10.1186/1476-069X-13-43.
- Shulman R.G., Rothman D.L., Behar K.L., Hyder F. (2004) Energetic basis of brain activity: implications for neuroimaging. *Trends Neurosci* 27:489–495. doi: 10.1016/j.tins.2004.06.005.
- Singh K., Connors S. L., Macklin E. A., Smith K. D., Fahey J. W., Talalay P., Zimmerman A. W. (2014). Sulforaphane treatment of autism spectrum disorder (ASD). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(43), 15550–15555. doi:10.1073/pnas.1416940111.
- Solano A. (2022) Efecto de los contaminantes emergentes en los alimentos para modelos neuronales asociado al Trastorno del Espectro Autista. [Tesis de licenciatura para obtener el grado de Química de Alimentos. Facultad de Química. UNAM]. Repositorio institucional de la UNAM: <http://132.248.9.195/ptd2022/abril/0824434/Index.html>.
- Söğüt S, Zoroğlu SS, Özyurt H, Yılmaz HR, Özüğurlu F, Sivaslı E, Yetkin Ö, Yanık M et al. (2003) Changes in nitric oxide levels and antioxidant enzyme activities may have a role in the pathophysiological mechanisms involved in autism. *Clin Chim Acta* 331:111–117. doi: 10.1016/s0009-8981(03)00119-0.
- Testa C., Nuti F., Hayek J., De Felice C., Chelli M., Rovero P., Latini G. Papini A. M. (2012). Di-(2-Ethylhexyl) Phthalate and Autism Spectrum Disorders. *ASN Neuro*, 4(4), AN20120015. doi:10.1042/an20120015.
- Traversari G., Delogu F., Aparicio S., Cincotti A (2022) hMSCs in contact with DMSO for cryopreservation: Experiments and modeling of osmotic injury and cytotoxic effect. *Biotechnol Bioeng*. 2022;119:2890–2907. doi: 10.1002/bit.28174.
- Tsai C-S., Chou W-J., Lee S-Y., Lee M-J., Chou M-C., Wang L-J. (2020) Phthalates, Para-Hydroxybenzoic Acids, Bisphenol-A, and Gonadal Hormones' Effects on Susceptibility to Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *Toxics*. 2020 Sep; 8(3): 57. doi:10.3390/toxics8030057.
- Tu W., Li W., Zhu X., Xu L. (2020). Di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) induces apoptosis of mouse HT22 hippocampal neuronal cells via oxidative stress. *Toxicology and Industrial Health*, 074823372094720. doi:10.1177/0748233720947205.
- Virant-Klun I., Imamovic-Kumalic S., Pinter B. (2022). "From Oxidative Stress to Male Infertility: Review of the Associations of Endocrine-Disrupting Chemicals (Bisphenols, Phthalates, and Parabens) with Human Semen Quality" *Antioxidants* 11, no. 8: 1617. <https://doi.org/10.3390/antiox11081617>.
- Waligóra A., Waligóra S., Kozarska M., Damasiewicz-Bodzek A., Gorczyca P., Tyrpien-Golder K. (2019). Autism spectrum disorder (ASD)-biomarkers of oxidative stress and methylation and transsulfuration cycle. *Psychiatr Pol*, 53(4), 771-788. doi: 10.12740/PP/89948.

- Walton J. D., Kattan D. R., Thomas S. K., Spengler B. A., Guo H.-F., Biedler J. L., Ross R. A. (2004). *Characteristics of Stem Cells from Human Neuroblastoma Cell Lines and in Tumors. Neoplasia*, 6(6), 838–845. doi:10.1593/neo.04310.
- Waly M., Olteanu H., Banerjee R., Choi S.-W., Mason J. B., Parker B. S., Sukumar S., Shim S., Sharma A., Benzecry J.M., Power-Charnitsky V.A., Deth, R. C. (2004). Activation of methionine synthase by insulin-like growth factor-1 and dopamine: a target for neurodevelopmental toxins and thimerosal. *Molecular Psychiatry*, 9(4), 358–370. doi:10.1038/sj.mp.4001476.
- Wang X. & Michaelis E.K. (2010) Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. *Front Aging Neurosci* 2:12. doi:10.3389/fnagi.2010.00012.
- WHO-UNEP (2013). State of the Science: Endocrine Disrupting Chemicals 2012. ( An assessment of the state of the science of endocrine disruptors prepared by a group of experts for the United Nations Environment Programme (UNEP) and World Health Organization (WHO). ISBN: 978 92 4 150503 1. Retrieved on august 25th, 2021 from [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/78102/WHO\\_HSE\\_PHE\\_IHE\\_2013.1\\_eng.pdf;sequence=1](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/78102/WHO_HSE_PHE_IHE_2013.1_eng.pdf;sequence=1).
- Woods M. M., Lanphear B. P., Braun J. M., McCandless L. C. (2017) Gestational exposure to endocrine disrupting chemicals in relation to infant birth weight: a Bayesian analysis of the HOME Study. *Environmental Health*, 16(1). doi:10.1186/s12940-017-0332-3.
- Wu Y., Li K., Zuo H., Yuan Y., Sun Y., Yang X. (2014). Primary neuronal-astrocytic co-culture platform for neurotoxicity assessment of di-(2-ethylhexyl) phthalate. *Journal of Environmental Sciences*, 26(5), 1145–1153. doi:10.1016/s1001-0742(13)60504-5.
- Wu M., Xu L., Teng C., Xiao X., Hu W., Chen J., Tu W. (2018). Involvement of oxidative stress in di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP)-induced apoptosis of mouse NE-4C neural stem cells. *NeuroToxicology*. doi:10.1016/j.neuro.2018.10.01.
- Yoon S. H., Choi J., Lee W. J., Do J. T. (2020) Genetic and Epigenetic Etiology Underlying Autism Spectrum Disorder. *Journal of Clinical Medicine*, 9(4), 966. doi:10.3390/jcm9040966.
- Zamudio-Cuevas Y., Andonegui-Elguera M. A., Aparicio-Juárez A., Aguillón-Solís E., Martínez-Flores K., Ruvalcaba-Paredes E., Velasquillo-Martínez C., Ibarra C., Martínez López V., Gutiérrez M., García-Arrazola R., Hernández-Valencia C., Romero-Montero A., Hernández-Valdepeña M., Gimeno M., Sánchez-Sánchez, R. (2021) The enzymatic poly(gallic acid) reduces pro-inflammatory cytokines in vitro, a potential application in inflammatory diseases. *Inflammation*. doi:10.1007/s10753-020-01319-5.
- Zeidan J., Fombonne E., Scorah J., Ibrahim A., Durkin M.S., Saxena S., Yusuf A., Shih A., Elsabbagh M. (2022) Global prevalence of autism: A systematic review update. *Autism Res*. 15(5):778-790. doi: 10.1002/aur.2696.
- Zhang L., Wang X., Cueto R., Effi C., Zhang Y., Tan H., Qin X., Ji Y., Yang X., Wang, H. (2019). Biochemical basis and metabolic interplay of redox regulation. *Redox Biology*, 26, 101284. doi:10.1016/j.redox.2019.10128.
- Zhao F., Zhang J., Chang N. (2018). Epigenetic modification of Nrf2 by sulforaphane increases the antioxidative and anti-inflammatory capacity in a cellular model of Alzheimer's disease. *European Journal of Pharmacology*, 824, 1–10. doi: 10.1016/j.ejphar.2018.01.046.

Zhao R, Chen Y., Tan W., Waly M., Sharma A. (2001) Relationship between dopamine-stimulated phospholipid methylation and the single-carbon folate pathway. *J Neurochem* 78: 788–796. doi:10.1046/j.1471-4159.2001.00471.x.

Zhao Y., Li D., Zhu Z., & Sun Y. (2019). Improved neuroprotective effects of gallic acid-loaded chitosan nanoparticles against ischemic stroke. *Rejuvenation Research*. doi:10.1089/rej.2019.2230.