

POLIMORFISMO A2756G DEL GEN *MTR* EN NIÑOS CON TRASTORNO DEL ESPECTRO AUTISTA

María Fátima Garcés (1), Jhoana Raffoul (2), Jorge Chakkal (3),
Ana Cecilia Márquez (4), Xiomara Moreno (5), Clara Martínez (6),
Celsy Hernández (7), Karolina López (8).

Recibido: 16-11-2019
Aceptado: 19-12-2019

Resumen

Introducción: Los factores genéticos y ambientales juegan un papel en la patogénesis en el Trastorno del Espectro Autista (TEA). Genes involucrados en la vía de folato/homocisteína pueden ser un factor de riesgo para desarrollar TEA y uno de ellos podría ser la metionina sintasa (*MTR*). **Objetivo:** Evaluar la posible relación entre el polimorfismo A2756G del gen de la *MTR* y el TEA. **Metodología:** 72 niños y adolescentes con diagnóstico de TEA y 67 niños y adolescentes (control) sin diagnóstico de TEA. El polimorfismo se estudió mediante el uso de la reacción en cadena de la polimerasa y polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP). La significación estadística se estimó mediante chi-cuadrado y tablas de contingencia de 2×2 , se calculó odds ratios (OR). **Resultados:** La frecuencia genotípica AA, AG y GG en niños TEA fue 61,1 %, 29,2 % y 9,7 %, respectivamente, mientras en controles fueron 86,6 %, 13,4 % y 0 %, respectivamente. La frecuencia alélica A y G en niños TEA fue de 0,76 y 0,24, respectivamente y en controles fueron 0,93 y 0,7, respectivamente ($p < 0,05$). El alelo G del gen *MTR* confirió un riesgo 4 veces mayor para desarrollar TEA en relación con el alelo A (95% CI = 1,79 – 9,04, $p < 0,05$). Los niños portadores del genotipo de riesgo GG presentaron 9 veces más riesgo de desarrollar TEA que los portadores del genotipo AA (IC 95% = 1,09 – 77,77, $p \neq 0,05$). **Conclusión:** El polimorfismo A2756G se asocia con un mayor riesgo de desarrollar TEA.

Palabras clave: Trastornos del espectro autista, TEA, *MTR*, polimorfismo.

MTR GENE A2756G POLYMORPHISM IN CHILDREN WITH AUTISTIC SPECTRUM DISORDER

Summary

Introduction: Genetic and environmental factors play a role in the pathogenesis of Autism spectrum disorder (ASD). Several studies have revealed that genes involved in the folate-homocysteine pathway can be considered risk factors in children with ASD and one of them could be methionine synthase (*MTR*). **Objective:** To evaluate the possible relationship between the A2756G polymorphism of the *MTR* gene and the ASD. **Methodology:** 72 children and adolescents with a diagnosis of ASD and 67 children and adolescents (control) without a diagnosis of ASD. The polymorphism was studied by using the polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphisms (PCR-RFLP). The statistical significance was estimated using the chi-square test using 2×2 contingency tables, odds ratios (OR) were calculated. **Results:** The genotypic frequency of AA, AG and GG in autistic children were 61,1 %, 29,2 % and 9,7 %, respectively, while in controls were 86,6 %, 13,4 % and 0 %, respectively. The allelic frequency of A and G in autistic children were 0,73 and 0,24 respectively and in controls were 0,93 and 0,7 respectively ($p < 0,05$). The *MTR* G allele conferred a 4 fold increased risk to ASD relative to the A allele (95% CI = 1,79 – 9,04, $p < 0,05$). Children with the GG genotype had 9 times more risk of developing ASD than those with the AA genotype (IC 95% = 1,09 – 77,77, $p \neq 0,05$). **Conclusion:** The A2756G polymorphism is associated with an increased risk of developing ASD.

Key words: Autism spectrum disorders, ASD, *MTR*, polymorphism

INTRODUCCIÓN

El autismo, es considerado un desorden neurológico de amplio espectro, que abarca casos de diferentes niveles y asociados con factores genéticos y del medio ambiente, cuyas manifestaciones son variables; por lo que se definen como “Trastornos del Espectro Autista” (TEA), los cuales son definidos como una desarmonía generalizada en el desarrollo de las funciones cognitivas superiores e independientes del potencial inicial; está caracterizado por alteraciones en la interacción social, comunicación y un espectro restringido de intereses de los pacientes, por lo que estos niños se describen

1. Licenciada en Bioanálisis. Dra. en Ciencias mención Bioquímica. Profesor Titular Cátedra de Bioquímica “A” Escuela de Bioanálisis. Coordinador Laboratorio de Investigaciones Básicas y Aplicadas. Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, Caracas.
2. Licenciada en Bioanálisis. Laboratorio de Investigaciones Básicas y Aplicadas, Facultad de Medicina, Escuela de Bioanálisis, Universidad Central de Venezuela, Caracas.
3. Licenciado en Bioanálisis. Profesor Instructor Cátedra de Inmunología e Investigador del Laboratorio de Investigaciones Básicas y Aplicadas, Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, Caracas.
4. Médico Psiquiatra. Coordinador de la Unidad de Autismo Maternidad Concepción Palacios, Anexo “Negra Matea” Caracas-Venezuela.
5. Licenciada en Bioanálisis. MSc. Micología Clínica. Laboratorio Clínica La Floresta, Caracas, Venezuela.
6. Licenciada en Biología. Dra. en Ciencias Biológicas. Profesor Asistente Cátedra de Bioquímica, Escuela de Nutrición y Dietética, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, Caracas.
7. Licenciada en Bioanálisis. MSc. en Aseguramiento de la Calidad. Profesor Agregado Cátedra de Bioquímica “B” e Investigador del Laboratorio de Investigaciones Básicas y Aplicadas, Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, Caracas.
8. Médico Pediatra, Gastroenterólogo Unidad de Gastroenterología y Nutrición Pediátrica Hospital General “Dr. Miguel Pérez Carreño”, IVSS. Caracas-Venezuela.

Dra. María Fátima Garcés Da Silva.
Venezuela, Teléfonos: 0212-6053308 / 0414-1363868, Fax 0212-6053312
Correo electrónico: mariafatimagarcés@hotmail.com

como retraídos, con formas inusuales de juego, apegados a la rutina, con comportamientos repetitivos y extraños (1).

La OMS estima que aproximadamente 1 de cada 160 niños padece TEA, representando ésta, una cifra media de la prevalencia de estos casos, ya que varían de acuerdo a los diferentes estudios que se han realizado, indicando además de que estas cifras se encuentran en incremento y este incremento en la detección de los trastornos puede deberse a las mejoras en las herramientas diagnósticas, en la ampliación de los criterios de diagnóstico y a una mayor concientización y despistaje de los mismos al momento del nacimiento de los niños (2).

La etiología del trastorno autista es notablemente heterogénea, por lo cual existe una gran variedad de factores que lo pueden provocar y que intervienen en él; siendo este trastorno de origen multifactorial, cuya relevancia de causas va a depender de la persona, de sus factores genéticos y ambientales, los cuales desempeñan un papel sumamente importante, en donde los factores ambientales influyen, perturbando el sistema del individuo a nivel molecular (2).

La metionina sintetasa (MS) es una enzima que se encarga de regular el metabolismo de la Homocisteína, la cual es importante y necesaria tanto para el metabolismo del tetrahidrofolato como para la síntesis de ADN y ARN. La metionina sintetasa, codificada por el gen *MTR*, la cual trabaja junto con la *MTRR* para regenerar y utilizar vitamina B12 en la vía bioquímica de la metilación, ayudando a convertir la homocisteína en metionina. Se localiza en el cromosoma 1, en la región 1q42.3-43; la cual cataliza la transferencia del grupo metilo desde el 5-metiltetrahidrofolato, a la homocisteína para formar metionina y, regenerar el ácido tetrahidrofólico para el nuevo transporte de grupos formilo, metilo y metileno, necesarios para la síntesis de purinas y pirimidinas (3).

Durante esta reacción el grupo metilo del metiltetrahidrofolato es transferido a la cobalamina (I), que se encuentra fuertemente ligada a la enzima, para formar la metilcobalamina que finalmente es transferido a la homocisteína. La cobalamina(I) después de participar un cierto número de veces en esta reacción se oxida a cobalamina (II) o a cobalamina (III). Su regeneración a cobalamina (I) requiere de un sistema reductor y de SAM. También se oxida en presencia de óxido nítrico a cobalamina (II), con formación de nitrógeno y de un radical hidroxilo o su equivalente capaz de modificar sitios de proteína próximos a la cobalamina. Este último inhibe irreversiblemente la enzima metionina Sintasa e induce la pérdida de este grupo prostético (cobalamina I) (4).

Las alteraciones nutricionales y/o genéticas que comprometen la formación de la metilcobalamina o del ácido metiltetrahidrofolato inducen deficiencia funcional de la metionina sintasa y causan hiperhomocisteinemia intermedia (5).

El polimorfismo (rs1805087) A2756G del gen *MTR* influye en la actividad de su enzima codificadora, lo que conduce a niveles elevados de homocisteína circulante. Este polimorfismo es el más común, en donde ocurre una sustitución de A2756G, lo cual produce un cambio de Ácido Aspártico por

Glicina (D919G) (6). El ácido aspártico está localizado en la alfa hélice, entre la región de unión a Cobalamina y la región reguladora, región responsable de la unión de proteínas, por lo tanto, cualquier perturbación en la estructura terciaria de la proteína se ve reflejada en su función; debido a que produce variaciones proteicas termolábiles, disminuyendo la actividad de las enzimas (7).

Actualmente se conoce que defectos en la vía del folato-homocisteína así como perturbaciones en la metilación del ADN pueden desempeñar un papel importante en la fisiopatología de los TEA y que el polimorfismo A2756G del gen *MTR* puede ser considerado un factor de riesgo para este trastorno del neurodesarrollo (3,5). Es por ello, que el objetivo del presente estudio fue evaluar la posible relación entre el polimorfismo A2756G del gen de la enzima *MTR* y el Trastorno del Espectro Autista en niños que asisten al servicio de neuropediatría de la Unidad de Autismo “Negra Matea” de la Maternidad Concepción Palacios, Caracas, Distrito Capital, Venezuela.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tipo y nivel de la investigación

El presente trabajo es un estudio descriptivo-correlacional, transversal no experimental, realizado en un grupo de niños diagnosticados con Trastorno del Espectro Autista para identificar el genotipo de riesgo del gen de la *MTR*.

Aspectos éticos

El estudio fue realizado en el Laboratorio de Investigaciones Básicas y Aplicadas de la Escuela de Bioanálisis de la Universidad Central de Venezuela (U.C.V), en cooperación con la Unidad de Autismo del Edificio “Negra Matea” de la Maternidad Concepción Palacios.

El protocolo del estudio se realizó bajo las normas de ética establecidas por la Organización Mundial de la Salud (OMS), para trabajos de investigación en humanos y la declaración de Helsinki ratificada por la 29ava Asamblea Médica Mundial, realizada en Tokio en 1995 (8). Adicionalmente, esta investigación contó con el aval del Comité de Bioética de la Maternidad Concepción Palacios, y con el consentimiento informado de los padres y/o representantes de los niños del estudio.

Población de estudio

La población estuvo constituida por 72 niños y adolescentes con edades comprendidas entre los 3 a 17 años, atendidos entre mayo 2014 - 2018 en la Unidad de Autismo del Edificio “Negra Matea” de la Maternidad Concepción Palacios, y como grupo control de 67 niños aparentemente sanos sin Trastornos del Espectro Autista, en edades comprendidas entre los 3 y 13 años que asisten a la primaria del Colegio “La Patria de Bolívar”, ubicado en la Urbanización Santa Mónica, de Caracas.

Criterios de inclusión

Grupo pacientes: Niños y adolescentes atendidos en el

Servicio de Neuropediatría de la Unidad de Autismo de la Maternidad Concepción Palacios, diagnosticados según la evaluación clínica en niños con Trastorno del Espectro Autista y no estar recibiendo ningún tratamiento para el TEA (terapias conductuales y de comunicación, tratamientos nutricionales, farmacológicos, entre otros). Grupo control: niños evaluados clínicamente que no presentaron trastornos del neurodesarrollo, alguna enfermedad de base y/o disfuncionalidad del sistema inmunológico.

Clasificación de los niños según diagnóstico clínico

Cada niño fue evaluado en el Servicio de alto riesgo neurológico, Unidad de Autismo de la Maternidad Concepción Palacios. Se utilizaron los criterios del DSM V (9) y la escala de Observación para el Diagnóstico del Autismo (ADOS) (10) para realizar el diagnóstico de Trastorno del Espectro Autista.

En el manual DMS-V se describe: A. Deficiencias persistentes en la comunicación social y en la interacción social; B. Patrones restrictivos y repetitivos de comportamiento, intereses o actividades; C. Los síntomas deben de estar presentes en las primeras fases del período de desarrollo; D. Los síntomas causan un deterioro clínicamente significativo en lo social, laboral u otras áreas importantes del funcionamiento habitual; E. Estas alteraciones no se explican mejor por la discapacidad intelectual (trastorno del desarrollo intelectual) o por retraso global del desarrollo (9).

A partir de las observaciones realizadas y de las notas tomadas durante la aplicación del ADOS-2, se asignan las puntuaciones o códigos. Estos se registran inmediatamente después de la sesión, de acuerdo con la aplicación en vivo. Posteriormente, en el momento de la corrección, los códigos se convierten en puntuaciones de algoritmo y se utilizan para completar el algoritmo diagnóstico que consiste en una selección de ítems que se suma y se compara con puntos de corte predeterminados. El resultado de este algoritmo puede utilizarse junto con otra información para formular un diagnóstico clínico (10).

Recolección y procesamiento de muestras sanguíneas

A cada niño se le extrajo con jeringa estéril 8 ml de sangre total que se colocó en un tubo con anticoagulante EDTA y un tubo sin anticoagulante. La muestra sin anticoagulante fue centrifugada en un lapso no mayor de 30 minutos a 3000 xg en una centrifuga refrigerada a 4 °C por 15 min y el suero congelado a -20 °C hasta su procesamiento. Las muestras con anticoagulante fueron conservadas en refrigerador a 4 °C hasta realizar la extracción del ADN.

Genotipificación

La extracción de ADN se realizó por el método de "Bunce" (11) modificado y almacenadas a -20 °C hasta la amplificación del ADN, la cual fue realizada por medio de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), en un termociclador (Lab Cycler de Senso Quest, Alemania). La amplificación del polimorfismo A2756G del gen MTR se realizó por la técnica descrita por Van der Put et al (12) que em-

plea los siguientes primers: Forward 5'-GGTGTGTTCCAGCTGTAGATG-3' y Reverse 5'-GACACTGAAGACCTCTGATTTGAAC-3' que abarcan una región de 265 pb. El volumen final de la PCR es de 25 µl, que contiene 0,4 µg de ADN genómico, 1,5 mmol/L de MgCl₂, 0,2 mmol/L de dNTPs, 0,4 µmol de cada primer, 5 µl Buffer 5x green (PROMEGA) y 1,25 U de Taq Polimerasa (PROMEGA). Las condiciones de la PCR constan de los siguientes pasos: desnaturalización a 94 °C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización de 94 °C por 45 segundos, alineamiento a 56 °C por 45 segundos, extensión a 72 °C por 45 segundos y una extensión final a 72 °C por 5 minutos. La calidad del producto de amplificación fue verificada mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2 %, en la cual se agregaron 4 µl del producto de PCR con 2 µl de buffer de carga, en búfer TAE 1x y coloreado con bromuro de etidio, además de un ADN ladder de 100 pb como marcador molecular y un control negativo. El polimorfismo A2756G del gen MTR fue detectado a través de una RFLP (Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos de Restricción), utilizando la enzima de restricción Hae III. Las muestras digeridas fueron separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida y visualizadas por tinción con nitrato de plata y visualizadas en un sistema de fotodocumentación digital, equipo Uvitec (Gel Documentation Uvitec Limited, USA). Para la interpretación de los geles, se tiene que se asigne el genotipo homocigoto AA al producto de PCR que no es digerido y se observa como una banda de 265 bp, mientras que el genotipo homocigoto GG es digerido y se observan dos fragmentos de 180 y 85 bp y el genotipo heterocigoto AG se observan 3 fragmentos de 265, 180 y 85 pb.

Análisis estadístico

Se calculó la frecuencia alélica (FA) y frecuencia genotípica (FG) del gen en estudio, la cual fue obtenida por conteo directo a partir de los fenotipos asignados a cada individuo. Se usó el paquete estadístico SPSS versión y tablas de contingencia simple, evaluando la asociación entre las variables en estudio y los alelos de MTR por Chi² y odds ratio (OR). Para determinar las relaciones entre los alelos de la MTR estudiada y el trastorno se realizaron pruebas de ANOVA.

RESULTADOS

Características de la población estudiada

Para el estudio se contó con una población de 72 niños con TEA (48%) y con una población control (no presenta TEA) de 67 niños (52%). Se clasificó el grupo de niños en estudio según la edad y sexo. Según su edad fueron clasificados en preescolares (2-6 años), escolares (7-12 años) y adolescentes (mayores de 12 años) y según el sexo en Masculino y Femenino. Los datos estadísticos indican que un aproximado de 82,20% del grupo de pacientes que presentan TEA, pertenecen al sexo masculino, mientras que solo un 17,80% pertenecen al sexo femenino (tabla 1). Además,

TABLA 1. Clasificación de los grupos de estudio según edad y sexo

Grupo	Sexo	Grupo Etario			Total (%)
		Preescolar (%)	Escolar (%)	Adolescente (%)	
Paciente	Masculino	37 (61,66)	20 (33,33)	3 (4,84)	60 (82,20)
	Femenino	6 (46,15)	6 (53,85)	0	12 (17,80)
	Total	43 (58,90)	26 (36,99)	3 (4,11)	72 (100)
Control	Masculino	12 (17,91)	18 (26,87)	0	30 (44,78)
	Femenino	11 (16,42)	26 (38,81)	0	37 (55,22)
	Total	23 (34,330)	44 (65,670)	0	67 (100)

Preescolar: 2 – 6 años

Escolar: 7 – 12 años

Adolescente: > 12 años



Figura 1. Visualización de los productos amplificados correspondientes a la variante A2756G del gen MTR, mediante electroforesis en gel de agarosa al (2%) en buffer TAE, coloreado con bromuro de etidio. El pozo número 1 corresponde al marcador molecular (MP) de 100 pb (LUCIGEN). Los carriles 2, 3, 4, 5 corresponden a los productos amplificados (265 pb).

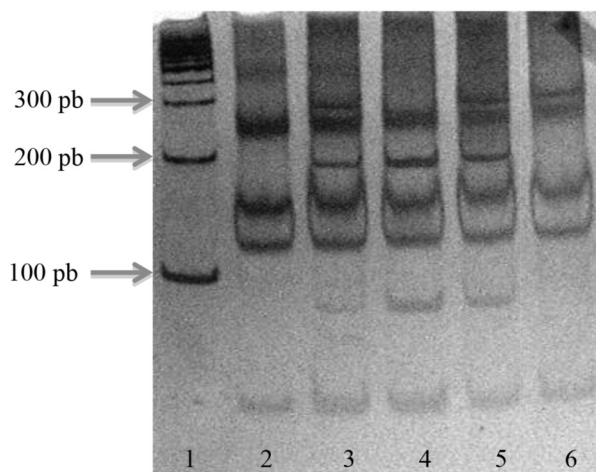


Figura 2. RFLP gel de poliacrilamida del gen MTR. Carril 1) marcado de peso molecular de 100pb de la casa comercial (LUCIGEN). Carril 2) Control Negativo. Carril 3 y 5) Pacientes portadores del Genotipo AG. Carril 4) Pacientes portadores del genotipo GG. Carril 6) Paciente portador del Genotipo AA.

se puede observar que un 58,90% de la población pertenecen al grupo de preescolares.

Según el diagnóstico clínico los niños con TEA fueron clasificados en leve (42,86%), moderado (51,43%) y severo (5,71%).

Tipificación de la variante A2756G del gen MTR

En la figura 1 se visualiza el producto de amplificación correspondiente a la variante A2756G del gen de la enzima

MTR, obtenido por el método de PCR, con una longitud de 265 pb, analizado en un gel de agarosa al 2% y teñido con bromuro de etidio; la migración electroforética se realizó a 100 mV por 40 minutos. Visualizado y fotografiado con cámara digital, en un equipo de Fotodocumentación Uvitec (Gel Documentation Uvitec Limited) marca BIORAD.

En la figura 2 se observan los fragmentos del producto de la digestión del gen de la MTR por la metodología de RFLP, con la enzima de restricción *HaeIII*. Se procedió a realizar la migración electroforética en un gel de poliacrilamida al 10% a 200V por 60 min, coloreado con nitrato de plata y visualizado y fotografiado con el equipo Uvitec (Gel Documentation Uvitec Limited) BIORAD.

Estimación del equilibrio de Hardy Weinberg (H-W) para el polimorfismo A2756G del gen de la MTR.

Se compararon las Frecuencias Genotípicas con la estimación del Equilibrio de Hardy Weinberg para el polimorfismo específico A2756G del gen *MTR*, ya que se desconoce la fase genética por ausencia de los datos familiares relacionados con cada muestra. Se confirmó que el grupo en estudio estaba en equilibrio H-W para la distribución genotípica del sitio polimórfico estudiado en el gen *MTR* con $X^2 = 2,037382$ y un $p = 0,153474$.

Distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo A2756G del gen de la MTR.

En la tabla 2 se refleja la frecuencia genotípica del polimorfismo A2756G de la enzima *MTR* en los niños con TEA y los controles. Se observó la presencia de los tres genotipos posibles, A/A, A/G y G/G. La mayor frecuencia se observó para el genotipo A/A (61,1%), seguido por el genotipo A/G (29,2%) y el genotipo GG (9,7%) con la menor frecuencia. En el grupo de los niños controles, se tiene como genotipo predominante el A/A (86,6%) y con menor porcentaje el A/G (13,4%), siendo que el genotipo G/G no se presentó en los pacientes controles.

En la tabla 3 se observa empleando el modelo Codominante, que los niños portadores del genotipo AG y el GG presentan cierta susceptibilidad para el desarrollo de TEA, ya que presentan un OR de 3,46 (IC: 1,40 – 8,54) y 9,23 (IC 1,09 – 77,77) respectivamente, obteniéndose una diferen-

TABLA 2. Frecuencias Genotípicas y Alélicas de Pacientes con TEA y Controles

	TEA	Controles	OR (95%)	p
Genotipo				
AA	44 (61,1%)	58 (86,6%)	1.00	< 0,05
AG	21 (29,2%)	9 (13,4%)	3,46 (1,40 – 8,54)	< 0,05
GG	7 (9,7%)	0	9,23 (1,09 – 77,77)	< 0,05
Alelo				
A	109 (76%)	125 (93%)	1.00	< 0,05
G	35 (24%)	9 (7%)	3,98 (1,79 – 9,04)	< 0,05

OR, Odds Ratio; IC, Intervalo de Confianza

TABLA 3 Frecuencias genotípicas según el modelo dominante de los pacientes con TEA

	Casos	Controles	OR (95%)	p
Genotipo				
AA	44 (61,1%)	58 (86,6%)	1,00	> 0,05
AG + GG	28 (38,9%)	9 (13,4%)	4,10 (1,76 – 9,57)	< 0,05

cia significativa entre los genotipos de la enzima *MTR* entre pacientes con TEA y controles, en donde según la estadística los polimorfismos representan un factor de riesgo, tanto el AG como el GG, según la distribución de los genotipos en estudio ($p=0,0016$; $<0,05$).

Se observa por otro lado la distribución alélica y cuyos resultados coinciden y reafirman la teoría ya descrita, en donde se tiene que el alelo G, representa un mayor factor de riesgo para padecer TEA en los pacientes, con un OR de 3,98 y una significancia $<0,0001$.

De acuerdo al modelo Dominante de la distribución Genotípica de los pacientes con TEA y los controles expuestos en la Tabla 3, se obtiene que los portadores de al menos un alelo G (AG + GG) presentan un OR de 4,10, con una diferencia estadísticamente significativa ($p=0,00004$) con respecto al grupo control, lo que quiere decir, que los pacientes portadores de estos genotipos presentan susceptibilidad de desarrollar TEA.

DISCUSIÓN

La etiología del autismo es compleja y muy heterogénea, en donde existe un amplio espectro de hipótesis sobre sus causas, siendo que la mayoría concluye que es un trastorno que se caracteriza por patrones atípicos de conectividad a nivel de neurodesarrollo. Se buscan principalmente factores genético-ambientales que podrían favorecer la vulnerabilidad y como los genes implicados en el trastorno pueden ser susceptibles, haciéndose gran énfasis en la posibilidad de que muchos efectos genéticos resulten de cambios epigenéticos, por ejemplo, daños a nivel de ADN fetal, proceso que puede verse inducido por elementos externos o ambientales como alguna respuesta inmune materna a procesos infecciosos *in*

útero, pudiendo causar daños significativamente grandes en el desarrollo neural temprano (13, 14).

Los resultados obtenidos arrojan que entre los pacientes diagnosticados con TEA pertenecían al sexo masculino un 82,20%, con lo que se puede establecer que en relación a cada paciente femenina, se tiene un aproximado de 6 pacientes masculinos, es decir, una razón de 6:1. Lo que se correlaciona con teorías de diferentes autores, las cuales indican un aumento en la prevalencia de trastornos neurológicos en pacientes masculinos, con lo que se refiere que la población femenina posee un modelo de protección genética.

Diferentes estudios realizados y publicados por la revista “American Journal of Human Genetics” concluyen luego del análisis de diferentes muestras de ADN y la secuenciación de un conjunto de aproximadamente 16 mil personas con trastornos del neurodesarrollo, que los

pacientes femeninos que padecen de TEA, requieren mutaciones genéticas mucho más grandes y fuertes que los hombres para reflejar la sintomatología común. Lo que hace conocer que el umbral de protección femenino contra mutaciones es mucho mayor (15).

Esta investigación se enfocó en el estudio del gen *MTR*, involucrado en la vía metabólica del folato, el cual, en conjunto con otro grupo de genes, influyen de manera importante en desarrollo de TEA en poblaciones susceptibles. Diferentes estudios, indican la asociación, principalmente del polimorfismo de la *MTR* y su influencia en el ciclo de la Homocisteína y el folato, lo que hace una relación directa con la susceptibilidad de ciertas poblaciones a presentar TEA o a padecer trastornos del neurodesarrollo y a pesar de que la acción directa de este polimorfismo aún no se encuentra muy clara, estos estudios sugieren que a través de su acción sobre la vía de los folatos, influyen en la metilación de ADN y alteran la expresión genética, reflejándose daños a diferentes niveles (16,17).

Los resultados del análisis del gen que codifican para la *MTR* entre los niños con TEA y los niños controles muestra una diferencia significativa en la distribución del polimorfismo, estableciendo una relación directa de su presencia con el desarrollo del TEA. Los niños portadores del genotipo de riesgo GG presentaron 9 veces más riesgo de desarrollar TEA que los portadores del genotipo AA (IC 95% = 1,09 – 77,77, $p \leq 0,05$), lo que sugiere que este polimorfismo está asociado a una baja actividad de la enzima MS y por lo tanto en el Trastorno del Espectro Autista.

Haghiri et al, observaron que el alelo G de la *MTR* confiere un aumento en el riesgo de desarrollar autismo con respecto al alelo A. Por lo que, los resultados expuestos por el autor, coinciden con los resultados obtenidos en nuestro estudio, en

donde describimos que el alelo G es aquel que le confiere mayor significancia de riesgo al polimorfismo, y al presentarse el genotipo AG o el GG se relacionan con un mayor riesgo de padecer TEA. Además de esto, se indica que defectos genéticos raros de la *MTR*, en los cuales se detecta baja actividad de la misma, dan como resultado hipometilaciones de ADN. Este aumento de la homocisteína, es debido a la baja actividad de la *MTR*, causado por una oxidación excesiva de la cobalamina, lo que se relaciona directamente con el estrés oxidativo, asociándose con enfermedades degenerativas y el envejecimiento. Este aumento del estrés oxidativo, ha sido diagnosticado en pacientes autistas, relacionándose de manera positiva estos datos con los obtenidos en nuestro estudio, en donde sí se asocia el polimorfismo de la *MTR* con el desarrollo de TEA en los niños (16).

Por otra parte, Zhang Zengyu y col. expone que el polimorfismo A2756G del gen de la *MTR* ejerce influencia en la actividad de su enzima metionina sintetasa, tendiendo a elevar los niveles de homocisteína a nivel plasmático, sin embargo, este autor indica que el polimorfismo no representa un factor de riesgo de susceptibilidad para los niños que presentan TEA ni se asocia con los grados de severidad que se presentan en cada uno de los casos de este estudio en la población del sur de China (17); caso contrario a nuestros resultados, los cuales exponen que si existe una diferencia significativa que indican que existe riesgo de padecer TEA cuando se presenta el polimorfismo.

Mohammad y col. evaluaron la utilidad clínica de los polimorfismos genéticos de la vía del folato en el diagnóstico del Trastorno del Espectro Autista, encontrando que el polimorfismo de los genes *MTHFR* y *MTRR* son un factor de riesgo para la presentación del autismo, sin embargo, descartan la asociación del polimorfismo A2756G del gen de la *MTR* con la presencia de autismo (18).

Garcés y col. reportaron que es importante estudiar las enzimas involucradas en la ruta del folato, debido a que polimorfismos en uno o varios de los genes que codifican estas enzimas pueden tener un efecto sumatorio para desarrollar TEA. Estos investigadores observaron que el polimorfismo C677T del gen de la *MTHFR* estaba asociado con la severidad del TEA (19).

CONCLUSIÓN

El genotipo GG del polimorfismo A2756G del gen de la *MTR* se asocia con un mayor riesgo de desarrollar Trastorno del Espectro Autista.

AGRADECIMIENTOS

El proyecto fue financiado por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CDCH) Proyecto de Grupo N° 09-00-8202-2013, por el Ministerio del Poder Popular para Ciencia, Tecnología e Innovación diciembre 2014, la

Coordinación de Investigación de la Facultad de Medicina y AIVEPET. Agradecimiento especial a: AIVEPET, a los padres o representantes de los niños incluidos en el estudio, a la Unidad de Autismo de la Maternidad Concepción Palacios “Negra Matea” y al Colegio La Patria de Bolívar.

REFERENCIAS

1. Baxter A, Brugha T, Erskine H, Scheurer R, Vos T, Scott J. The epidemiology and global burden of autism spectrum disorders. *Psychol Med* 2015;45:601–613. Disponible en: <https://doi.org/10.1017/S003329171400172X> [citado 18 feb 2019]
2. Organización Mundial de la Salud. Trastornos del Espectro Autista. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/autism-spectrum-disorders/es/> [citado 7 nov 2019].
3. Oviedo N, Manuel L, Chesnaye E, Guerra C. Aspectos genéticos y neuroendocrinos en el trastorno del espectro Autista. *Bol Med Hosp Infant Mex* 2015;72(1):5-14 Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmhmx.2015.01.01> [citado 18 feb 2019]
4. Fenech M. Folate (vitamin B9) and Vitamin B12 and their Function in the Maintenance of Nuclear and Mitochondrial Genome Integrity. *Mutat Res* 2012;733(1-2):21-33. Disponible: <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2011.11.003> [citado 25 feb 2019]
5. Ami N, Bernstein M, Boucher F, Rieder M, Parker L. Folate and neural tube defects: The role of supplements and food fortification. *Paediatr Child Health*. 2016;21(3):145-154.
6. Yadav U, Kumar P, Yadav SK, Mishra OP, Rai V. Polymorphisms in folate metabolism genes as maternal risk factor for neural tube defects: an updated meta-analysis. *Metab Brain Dis* 2015;30(1):7-24. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s11011-014-9575-7> . [citado 22 feb 2019]
7. Sopo O, Zarante I. Desarrollo Embrionario y Frecuencia de los Defectos del Tubo Neural en el Embarazo. *Laboratorio Actual* 2014;45:20-31.
8. The World Medical Association Ethics Unit. Declaration of Helsinki. Disponible en: <http://www.wma.net/e/ethicsunit>. [citado 10 feb 2019].
9. American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-V). 5th Edition. Washington, DC: American Psychiatric Association 2013.
10. Lord C, Rutter M, Di Lavore P, Risi S, Gotham K, Bishop S. ADOS-2. Escala de Observación para el Diagnóstico del Autismo - 2. Manual (Parte I): Módulos 1-4. TEA Ediciones. Madrid 2015, pp. 11-216.
11. Welsh KI, Bunce M. Molecular typing for the MHC with PCR-SSP. *Rev Immunogenet* 1999;1(2):157-176.
12. Van der Put NM, Van der Molen EF, Kluijtmans LA, Heil SG, Trijbels JM, Eskes TK et al. Sequence analysis of the coding region of human methionine synthase: relevance to hyperhomocysteinaemia in neural-tube defects and vascular disease. *QJM* 1997;90(8):511-517. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/qjmed/90.8.511> [citado 27 feb 2019]
13. Fernandez M, Fernandez A, Fernandez A. Trastorno del Espectro Autista. Puesta al día (I): introducción, epidemiología y etiología. *Acta Pediatr Esp* 2013;71:217-223
14. Zalaquett D, Schönstedt M, Angeli M, Herrera C, Moyano A. Fundamentos de la intervención temprana en niños con trastornos del espectro autista. *Rev Chil Pediatr* 2015;86(2):126-131. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.rchipe.2015.04.025>

- [citado 19 feb 2019]
15. Jacquemont S, Coe B, Hersch M, Duyzend M, Krumm N, Bergmann S, et al. A Higher Mutational Burden in Females Supports a "Female Protective Model" in Neurodevelopmental Disorder. *Am J Hum Genet* 2014;94(3):415-425. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2014.02.001> [citado 21 feb 2019]
 16. Haghiri R, Mashayekhi F, Bidabadi E and Salehi Z. Analysis of Methionine Synthase (rs1805087) Gene Polymorphism in Autism Patients in Northern Iran. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 2016;76(4):318-323. Disponible en: <https://doi.org/10.21307/ane-2017-030> [citado 14 feb 2019]
 17. Zhang Z, Yu L, Sufang Yu, Lui J. Association Study of Polymorphisms in Genes Relevant to Vitamin B12 and Folate Metabolism with Childhood Autism Spectrum Disorder in a Han Chinese Population. *Med Sci Monit* 2018;24:370-376. Disponible en: <https://doi.org/10.12659/MSM.905567> [citado 18 feb 2019]
 18. Shaik N, Sai P, Bharathi V, Krishna C, Hussain T, Alrokayan S, et al. Clinical Utility of Folate Pathway Genetic Polymorphisms in the Diagnosis of Autism Spectrum Disorders. *Psychiatr Genet* 2016;26(6):281-286. Disponible en: <https://doi.org/10.1097/YPG.0000000000000152> [citado 6 feb 2019]
 19. Garcés MF, Arrollo A, Chakkal J, Márquez AC, Martínez C, Núñez ML et al. Polimorfismo C677T del gen de la MTHR en niños con Trastorno del Espectro Autista. *Arch Venez Puer Ped* 2018;81(2):37-43. Disponible en: <http://www.svpediatrica.org/repositorio/publicaciones/2018/AVPP%2081-2.pdf> [citado 25 febrero 2019].