

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MATO GROSSO DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E DESENVOLVIMENTO NA
REGIÃO CENTRO-OESTE
MELINA GOMES BORGES

**MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE DA
METILENOTETRAHIDROFOLATO REDUTASE (MTHFR) EM REPOSTA AO
TRATAMENTO CLÍNICO EM CRIANÇAS COM TEA**

Campo Grande
2025

MELINA GOMES BORGES

**MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE DA
METILENOTETRAHIDROFOLATO REDUTASE (MTHFR) EM REPOSTA AO
TRATAMENTO CLÍNICO EM CRIANÇAS COM TEA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Saúde e Desenvolvimento. Linha de Pesquisa: **Atenção à saúde integral da criança, do adolescente e da gestante.**

Orientador: Prof. Dr. Durval Batista Palhares
Coorientador: Prof. Dr. Rondon Tosta Ramalho

Campo Grande – MS
2025



Ata de Defesa de Dissertação
Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste
Mestrado

Aos vinte e dois dias do mês de agosto do ano de dois mil e vinte e cinco, às treze horas, na videoconferência, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos membros: Durval Batista Palhares (UFMS), Almir de Sousa Martins (UFMG) e SUZANA LOPES BOMFIM BALANIUC (EBSERH), sob a presidência do primeiro, para julgar o trabalho da aluna: MELINA GOMES BORGES, CPF ***.891.811-**, Área de concentração em Saúde e Sociedade, do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, Curso de Mestrado, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, apresentado sob o título "MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE DA METILENOTETRAHIDROFOLATO REDUTASE (MTHFR) EM REPOSTA AO TRATAMENTO CLÍNICO EM CRIANÇAS COM TEA" e orientação de Durval Batista Palhares. O presidente da Banca Examinadora declarou abertos os trabalhos e agradeceu a presença de todos os Membros. A seguir, concedeu a palavra à aluna que expôs sua Dissertação. Terminada a exposição, os senhores membros da Banca Examinadora iniciaram as arguições. Terminadas as arguições, o presidente da Banca Examinadora fez suas considerações. A seguir, a Banca Examinadora reuniu-se para avaliação, e após, emitiu parecer expresso conforme segue:

EXAMINADOR(A)	ASSINATURA	AValiação
Dr. Durval Batista Palhares (Interno) Presidente da Banca Examinadora	 Documento assinado digitalmente DURVAL BATISTA PALHARES Data: 26/08/2025 21:13:40-0300 Verifique em https://validar.jf.gov.br	☒ Aprovação ☐ Aprovação c/ revisão ☐ Reprovação
Dr. Almir de Sousa Martins (Externo)	 Documento assinado digitalmente ALMIR DE SOUSA MARTINS Data: 26/08/2025 18:12:31-0300 Verifique em https://validar.jf.gov.br	☒ Aprovação ☐ Aprovação c/ revisão ☐ Reprovação
Dr. Cesar Augusto Sobrinho (Interno) (Suplente)		☐ Aprovação ☐ Aprovação c/ revisão ☐ Reprovação
Dra. Suzana Lopes Bomfim Balaniuc (Externo)	 Documento assinado digitalmente SUZANA LOPES BOMFIM BALANIUC Data: 22/08/2025 21:39:10-0300 Verifique em https://validar.jf.gov.br	☒ Aprovação ☐ Aprovação c/ revisão ☐ Reprovação

RESULTADO FINAL: ☒ APROVAÇÃO ☐ APROVAÇÃO COM REVISÃO ☐ REPROVAÇÃO

OBSERVAÇÕES: A pós-graduanda apresentou sua
dissertação em tempo hábil e respondeu a arguição
de forma clara e adequada.

Documento assinado digitalmente
MELINA GOMES BORGES
Data: 22/08/2025 21:41:31-0300
Verifique em <https://validar.jf.gov.br>

Assinatura do(a) Alun(o)a

Nada mais havendo a ser tratado, o(a) Presidente declarou a sessão encerrada e agradeceu a todos pela presença.

Dedico esta dissertação aos meus bons amigos biólogos, que tinham sede pelo conhecimento, entusiasmo pela vida e muito alto astral. Louise Ribeiro e Guilherme Feitosa - *in memoriam*.

AGRADECIMENTOS

Sou grata ao professor Rondon, que me deu o voto de confiança e foi a ponte para meu ingresso no curso.

Ao professor Dr. Durval Palhares, que em meio aos contratempos, deu seu apoio e se tornou orientador deste projeto. Com seu jeito sereno, carregado de entusiasmo e muita vontade pela pesquisa, esteve sempre presente me direcionando da melhor maneira. Sempre me lembrarei das nossas conversas enriquecedoras e engraçadas!

Ao Dr. Almir, que sempre se mostrou disponível para compartilhar seu vasto conhecimento, contribuindo de forma decisiva para a execução eficaz e eficiente das práticas laboratoriais em biologia molecular. Mais do que isso, foi um professor atento e comprometido, que me guiou no caminho para me tornar uma pesquisadora capaz de reconhecer desafios, planejar estratégias de aprendizado e organizar com clareza as etapas e tarefas necessárias para atingir os objetivos no prazo.

Ao meu marido Rafael, que esteve ao meu lado em todos os momentos, soube me ouvir com atenção nas horas de angústia e foi um parceiro amoroso, dedicado e sempre disposto a ajudar — mesmo quando isso exigia aprender algo novo. Sua presença e parceria foram essenciais para que eu percorresse esse caminho com leveza.

Às queridas amigas Cynthia e Thaislane, as quais tive o prazer de conhecer em momentos distintos, porém, em um momento de fragilidade. Ambas foram essenciais para me encorajar a trilhar essa jornada que por vezes eu duvidei ser capaz.

Sou grata a todos os colegas, professores e técnicos de laboratório que auxiliaram nos momentos oportunos. Destacando os colegas do grupo de pesquisa, que estiveram juntos ajudando neste curto período que tive para executar um projeto do zero: Adriana, César, Camila, Júlia, Ester e Michele. Em especial Júlia e Ester, biólogas, assim como eu! Entraram no grupo nos “45 minutos do fim do jogo” e trouxeram ânimo, diversão e boas conversas!

Aos familiares que autorizaram a participação de suas crianças nesta pesquisa, meu sincero agradecimento. Sem essa colaboração, nada disso teria sido possível. Com confiança e movidos pela esperança de que os resultados possam contribuir para o bem-estar dos pacientes, foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Agradeço aos meus familiares, que mesmo de longe estiveram preocupados e acompanharam minha trajetória, cheia de histórias, medos, alegrias e vitórias.

A mim, que me permiti encarar o desafio, as batalhas que tive que vencer, comigo mesma, para não ceder ao pessimismo e conseguir acreditar mais.

Por fim, agradeço às instituições que tornaram esta pesquisa possível: à UFMS, pela estrutura, pelas oportunidades e pela base de conhecimento oferecida; à CAPES, pelo apoio financeiro por meio da bolsa que me foi concedida; e ao IAPES, pelo custeio essencial que viabilizou a continuidade da pesquisa, tanto com a mão de obra quanto na aquisição de materiais laboratoriais indispensáveis.

“A gente precisa visitar nossos medos para separar os perigos reais dos imaginários, para encará-los, se preciso, para descobrir quanto deles é invenção. Apenas onde há medo pode haver coragem para vencê-lo”.

(Tamara Klink, 2021).

RESUMO

Introdução: O Transtorno do Espectro Autista (TEA) é um distúrbio do neurodesenvolvimento caracterizado por déficits na comunicação, interação social e comportamentos repetitivos, com prevalência crescente nas últimas décadas. Fatores genéticos, epigenéticos e inflamatórios, como a desregulação do metabolismo do folato e aumento de citocinas pró-inflamatórias, estão implicados em sua fisiopatologia. **Objetivo:** Este estudo avaliou a expressão do gene MTHFR e do marcador inflamatório TNF- α em crianças com TEA submetidas a tratamento medicamentoso experimental. **Metodologia:** Foram conduzidos dois estudos clínicos randomizados duplo-cegos com coleta de sangue de crianças com Transtorno do Espectro Autista (GTEA1 e GTEA2) e um estudo transversal com células epiteliais da boca de crianças típicas (GTÍPICOS). Os pacientes foram distribuídos em três grupos GTEA 1 – n = 20; GTEA 2 – n = 30; GTÍPICOS – n = 4, sendo GTEA 1 e GTEA 2 pacientes com tratamento farmacológico. O RNA foi extraído pelo método Trizol, seguido de síntese de cDNA e PCR em tempo real. **Resultados e Discussão:** Os pacientes do GTEA1 tiveram redução significativa do TNF- α nos indivíduos tratados (teste t, p = 0,0395); no GTEA 2 com relação a expressão relativa do gene codificador da enzima *MTHFR* houve um aumento significativo na comparação feita entre tratados *versus* não tratados *versus* placebo (ANOVA, p = 0,009), entre tratados *versus* não tratados (test-t, p = 0,0289) e placebo *versus* tratados (test-t, p = 0,065); já entre placebo *versus* não tratados não houve diferença significativa na expressão relativa do gene (test-t, p = 0,7422) e a respeito do TNF- α a redução da expressão relativa deste gene ocorreu somente entre tratados *versus* placebo (test-t, p = 0,0241), sugerindo impacto positivo do tratamento sobre processos metabólicos e inflamatórios. A análise das curvas de amplificação evidenciou eficiência de 100% e alta linearidade gene MTHFR, alvo desta pesquisa. Os achados reforçam a viabilidade do uso de células bucais no GTÍPICOS como amostra não invasiva para análise molecular e sugerem que a modulação do metabolismo do folato pode estar associada à melhora clínica em pacientes com TEA. **Conclusão:** Conclui-se que os resultados fornecem subsídios relevantes para a compreensão da base molecular do TEA e para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas personalizadas.

Descritores: Transtorno do Espectro Autista; Folato; MTHFR; TNF- α .

ABSTRACT

Introduction: Autism Spectrum Disorder (ASD) is a neurodevelopmental condition characterized by deficits in communication, social interaction, and repetitive behaviors, with an increasing prevalence over recent decades. Genetic, epigenetic, and inflammatory factors, such as dysregulation of folate metabolism and elevated pro-inflammatory cytokines, are implicated in its pathophysiology. **Objective:** This study evaluated the expression of the *MTHFR* gene and the inflammatory marker TNF- α in children with ASD undergoing experimental pharmacological treatment. **Methodology:** Two randomized double-blind clinical trials were conducted with blood collection from children with Autism Spectrum Disorder (GTEA1 and GTEA2), along with a cross-sectional study using buccal epithelial cells from typically developing children (GTYPICAL). Patients were distributed into three groups: GTEA1 (n = 20), GTEA2 (n = 30), and GTYPICAL (n = 4). GTEA1 and GTEA2 comprised patients receiving pharmacological treatment. RNA was extracted using the Trizol method, followed by cDNA synthesis and real-time PCR. **Results and Discussion:** In GTEA1, a significant reduction in TNF- α levels was observed in treated individuals (t-test, p = 0.0395). In GTEA2, regarding the relative expression of the *MTHFR* gene, there was a significant increase when comparing treated versus untreated versus placebo (ANOVA, p = 0.009), treated versus untreated (t-test, p = 0.0289), and placebo versus treated (t-test, p = 0.065). No significant difference was found between placebo versus untreated (t-test, p = 0.7422). Concerning TNF- α , the reduction in relative expression was only observed between treated versus placebo (t-test, p = 0.0241), suggesting a positive impact of treatment on metabolic and inflammatory processes. Amplification curve analysis demonstrated 100% efficiency and high linearity for the *MTHFR* gene, the target of this research. The findings support the feasibility of using buccal cells in GTYPICAL as a non-invasive sample for molecular analysis and suggest that modulation of folate metabolism may be associated with clinical improvement in patients with ASD. **Conclusion:** The results provide relevant insights into the molecular basis of ASD and contribute to the development of personalized therapeutic strategies.

Descriptors: Autism Spectrum Disorder; Folate; MTHFR; TNF- α .

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

μL	Microlitros
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
cDNA	DNA complementar
DSM	<i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders</i>
HAAM	Composto farmacológico
Hcy	Homocisteína
IL	Interleucina
mM	Milimolar
MPF	Sistema Materno-Placentário-Fetal
mRNA	RNA mensageiro
MTHFR	Metilenotetrahidrofolato redutase
MTHFR 677 C>T	Região alvo de mutação, neste caso há troca da citosina pela timina.
ng	Nanogramas
nt	Nucleotídeos
O ₂	Oxigênio
pb	Pares de bases
pmol	Picomol
qPCR	<i>Polimerase Chain Reaction real time</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RNS	<i>Reactive Nitrogen Species</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RT	Transcrição reversa
S26	Proteína ribossomal, utilizado como normalizador da reação de PCR
SYBR-Green	Fluoróforo marcador para PCRtr
TALE	Termo de assentimento livre e esclarecido
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TDAH	Transtorno de Déficit de Atenção
TEA	Transtorno do Espectro Autista

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA CIENTÍFICA	12
1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	13
2.1 HISTÓRIA DO TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA (TEA)	13
2.2 FATORES INFLAMATÓRIOS	16
2.3 A GENÉTICA E A EPIGENÉTICA DO TEA	19
2.4 EXPRESSÃO DA ENZIMA MTHFR E MUTAÇÕES	20
3 OBJETIVOS.....	22
3.1 OBJETIVO GERAL	22
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
4 MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1 TIPO DE ESTUDO, LOCAL E ASPECTOS ÉTICOS.....	22
4.2 SELEÇÃO DA POPULAÇÃO.....	23
4.2.1 DIVISÃO DE GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	23
4.2.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO	24
4.3 PROCEDIMENTOS DE COLETA DE MATERIAL	25
4.4 PROCEDIMENTOS DE BIOLOGIA MOLECULAR	25
4.4.1 EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL DO SANGUE.....	25
4.4.2 EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL DE CEB.....	25
4.4.2 TRANSCRIÇÃO REVERSA (RT)	25
4.4.3 PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL (QPCR) PARA CEB	26
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
5.1 DETERMINAÇÃO DOS PRIMERS E AVALIAÇÃO A VIABILIDADE DO GENE EM CÉLULAS EPITELIAIS DA BOCA.....	26
5.2 COMPARAÇÃO DOS PERFIS DE EXPRESSÃO DO MTHFR NO SANGUE	30
5.3 COMPARAÇÃO DOS PERFIS DE EXPRESSÃO DA CITOCINA INFLAMATÓRIA TNF-A	33
CAPÍTULO 2 – APRESENTAÇÃO DO ARTIGO DE REVISÃO INTEGRATIVA	36
6 CONCLUSÃO.....	67
REFERÊNCIAS.....	68
ANEXOS	76
ANEXO A - BIORREPOSITÓRIO.....	76
ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)	81
ANEXO C – TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TALE).....	90
ANEXO D – COMPOSTO FARMACOLÓGICO	95
ANEXO E – PROCEDIMENTOS OPERACIONAIS DO LABORATÓRIO	96
ANEXO F - INFORMAÇÕES OBTIDAS NO GENBANK	98

CAPÍTULO 1 – Desenvolvimento da pesquisa científica

1 INTRODUÇÃO

O Transtorno do Espectro Autista (TEA) é uma condição no neurodesenvolvimento complexa, caracterizada por dificuldades na comunicação social, comportamentos repetitivos (*flapping*) e interesses restritos. A história do TEA começou com a descrição clínica de Leo Kanner em 1943, que identificou comportamentos característicos em um grupo de crianças. Paralelamente, Hans Asperger descreveu um conjunto semelhante de comportamentos, que mais tarde seria reconhecido como parte do espectro autista. A prevalência do TEA aumentou significativamente nas últimas décadas, com estimativas atuais do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) indicando que cerca de um em cada 31 crianças são afetadas. Esse aumento pode ser atribuído a melhores diagnósticos, maior conscientização e potenciais fatores ambientais.

O folato, uma vitamina B essencial, desempenha um papel crítico no desenvolvimento do sistema nervoso central, particularmente durante a gestação. É necessário para a síntese de DNA e para a metilação da homocisteína em metionina, processos fundamentais para a divisão celular e a regulação da expressão gênica. O gene MTHFR (Metilenotetrahidrofolato Redutase) é fator central nesse metabolismo, e as mutações nas suas variantes C677T e A1298C podem reduzir a atividade enzimática, levando à acumulação de homocisteína, uma condição conhecida como homocisteinemia e esta alteração tem sido associada a vários distúrbios neurológicos e cardiovasculares, e estudos indicam uma possível ligação com o TEA.

A genética e a epigenética são fundamentais para entender a etiologia do TEA, enquanto a genética se refere às variações na sequência de DNA que podem predispor indivíduos ao TEA, a epigenética envolve modificações na expressão gênica sem alterar a sequência de DNA, comumente influenciadas por fatores ambientais. Mudanças epigenéticas, como a metilação do DNA, podem ser críticas no desenvolvimento do TEA e são influenciadas pelo estado nutricional, incluindo os níveis de folato. Estudos recentes têm aprofundado a compreensão do papel das citocinas e da desregulação imune na patogênese do TEA. Estudos apontam que alterações nos perfis de citocinas contribuem para processos de neuroinflamação e desregulação sináptica, os quais estão diretamente relacionados aos sintomas comportamentais característicos do transtorno. Em crianças com TEA, níveis alterados de citocinas — em especial IL-6 e TNF- α — foram identificados como marcadores críticos de anormalidades do sistema imune, capazes de comprometer tanto a sinalização quanto o desenvolvimento neuronal. Além disso, o desequilíbrio entre citocinas pró e anti-inflamatórias,

evidenciado pela redução significativa de IL-10, reforça a hipótese de que a regulação imune deficiente desempenha um papel central na fisiopatologia do TEA.

Com a crescente prevalência do TEA, há uma demanda urgente por estratégias eficazes de prevenção e tratamento, sendo assim, compreender os fatores etiológicos subjacentes pode melhorar a qualidade de vida dos indivíduos afetados e suas famílias, minimizando a carga sobre os sistemas de saúde pública e educação. A identificação de mutações no gene MTHFR e biomarcadores inflamatórios como a TNF- α pode permitir diagnósticos mais precoces e tratamentos personalizados, a exemplo disto, a suplementação de folato, ajustada para necessidades individuais, pode oferecer uma intervenção nutricional preventiva eficaz, reduzindo os riscos associados ao TEA. Estudar as interações entre genética, epigenética, o metabolismo do folato, a homocisteinemia e aspectos inflamatórios decorrentes destas alterações sistêmicas pode contribuir significativamente para a compreensão dos mecanismos biológicos do TEA. Esta pesquisa pode revelar novos alvos terapêuticos e biomarcadores, avançando o conhecimento científico e abrindo novas possibilidades para intervenções precoces e personalizadas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 História do Transtorno do Espectro Autista (TEA)

O Transtorno do Espectro Autista (TEA) é um distúrbio do neurodesenvolvimento, diagnosticado a partir da avaliação de comportamentos e disfunções associados. Além disso, o autismo caracteriza-se por um modo particular de processamento de informações e estímulos sensoriais (Hens, 2019). Afeta cerca de 1 a 2% ou mais da população e, aproximadamente 31% dos pacientes com TEA também apresentam deficiência intelectual, e 20-37% sofrem de epilepsia (Lai; Lombardo; Baron-Cohens, 2014; Baio *et al.*; 2018; APA, 1994; Asato; Hardan, 2004). Segundo Yasuhara (2010), este grupo de pacientes podem apresentar quadros epiléticos com frequência maior em crianças autistas, bem como outras condições psiquiátricas, incluindo ansiedade, depressão, déficit de atenção e hiperatividade, distúrbios do sono e problemas gastrointestinais (Valicenti-Mcdermott *et al.*, 2006; Richdale; Schreck, 2009; White *et al.*, 2009).

Em 1925, Sukhareva publicou uma descrição clínica detalhada de seis meninos, com idades entre 2 e 14 anos, que permaneceram aproximadamente dois anos em sua “escola-hospital” e apresentavam sintomas compatíveis com o que hoje é reconhecido como Transtorno do Espectro Autista (TEA). Esse estudo foi inicialmente divulgado no periódico russo *Questions of Pedology and Child Psychoneurology* onde Sukhareva denominava o quadro como “psicopatias esquizóides” e,

posteriormente, foi rebatizado por ela como “psicopatia autista” (Manouilenko; Bejerot, 2015; Sukhareva, 1959; Sukhareva, 1925). De acordo com Posar e Visconti (2017), as observações precisas de Sukhareva destacaram a relevância das anormalidades sensoriais, aspecto que apenas recentemente voltou a receber a devida atenção nas descrições do TEA, como evidenciado na atualização do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-5).

Em meados de 1940, outras descrições do quadro clínico do autismo foram realizadas por Leo Kanner e Hans Asperger. Em 1943, Kanner publicou o artigo intitulado “Os distúrbios autísticos do contato afetivo”, no qual descreveu um conjunto de casos caracterizados por uma acentuada dificuldade, manifestada desde os primeiros anos de vida, em estabelecer interações sociais adequadas e em responder de forma típica a pessoas e situações do ambiente (Kanner, 1943, p. 243). Foram descritas crianças que demonstravam interesse excessivo por partes de objetos ou por objetos em movimento giratório, de forma que esse comportamento impactava negativamente seu funcionamento cognitivo. Kanner observou que essas características, além de se manifestarem desde a infância, distinguiam-se claramente daquelas previamente descritas na esquizofrenia ou na psicose infantil (Kanner, 1943; Rutter, 1978).

Em seu estudo de 1943, o autor identificou duas características principais entre as crianças: os termos *aloneliness* e *sameness*. O primeiro, traduzido como “solidão”, referia-se a um isolamento em relação ao mundo exterior; já o segundo, “mesmice”, dizia respeito a um desejo obsessivo e ansioso pela manutenção da uniformidade, refletindo a preferência por padrões fixos e repetitivos. Em relação às famílias das crianças analisadas, Kanner (1943) destacou a presença de traços comuns, como elevados níveis intelectual e sociocultural, além de certo distanciamento emocional nas relações conjugais e entre pais e filhos. Ele também ressaltou características de obsessividade no ambiente familiar, levantando a hipótese de uma possível relação causal entre esses aspectos e os comportamentos observados nas crianças.

Paralelamente, em 1944, o psiquiatra vienense Hans Asperger, sem ter conhecimento do trabalho de Kanner, publicou o artigo “Psicopatia Autística na Infância”, no qual descreveu um quadro psicopatológico marcado principalmente por dificuldades na relação da criança com o ambiente que a circunda.

Tanto Kanner (1943) quanto Asperger (1944) identificaram, nas crianças que estudaram, importantes dificuldades de ordem socioafetiva, bem como limitações no desenvolvimento das habilidades de adaptação social. Ambos ressaltaram a tendência ao isolamento social apresentada pelas crianças. Contudo, as crianças descritas por Asperger distinguiam-se por apresentarem comportamentos que as tornavam distraídas, excessivamente concentradas em si mesmas, alheias ao ambiente e inseridas em um universo particular.

Ao longo das décadas, a classificação desse transtorno evoluiu e, em 1978, Rutter propôs uma definição do autismo baseada em quatro critérios fundamentais: (1) atrasos e desvios nas interações sociais, não explicáveis apenas por retardo mental; (2) dificuldades de comunicação, também não decorrentes apenas de retardo mental associado; (3) comportamentos incomuns, como movimentos estereotipados e maneirismos; e (4) início dos sintomas antes dos 30 meses de idade (Rutter, 1978; Klin, 2006).

Os critérios que subsidiaram o diagnóstico do autismo passaram por diversas mudanças ao longo dos anos e foram descritos nos manuais de categorização nosológica. Atualmente, os mais conhecidos e utilizados são o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM) e a Classificação Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde (CID), particularmente a partir da década de 1980. Estes manuais apresentam diferenças nas nomenclaturas, características e códigos utilizados para fins de diagnóstico, mas convergem nos pressupostos conceituais que embasaram a classificação nosológica, hegemônicos no período em que foram publicados.

No DSM-5 (2014), o autismo foi incluído no grupo dos Transtornos do Neurodesenvolvimento, dos quais fazem parte a Deficiência Intelectual (DI), o Transtorno de Comunicação (TC), o Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade (TDAH), o Transtorno Específico da Aprendizagem (TA) e os Transtornos Motores (TM), e assim, ocorreu uma fusão dos intragrupos transtorno autista, transtorno de Asperger e transtorno global do desenvolvimento.

Nível 1 - leve (necessita de pouco suporte) e com suporte, pode ter dificuldade para se comunicar, mas não é um limitante para interações sociais. Apresenta problemas de organização e planejamento que impedem a independência.

Nível 2 - moderado (necessita de suporte), mas com menor intensidade, no que cabe aos transtornos de comunicação e deficiência de linguagem.

Nível 3 - grave (necessita de maior suporte/apoio), diz respeito àqueles que apresentam um déficit considerado grave nas habilidades de comunicação verbais e não verbais, ou seja, não conseguem se comunicar se não houver suporte. Apresentam dificuldade nas interações sociais e têm cognição reduzida. Também possuem um perfil inflexível de comportamento, manifestam dificuldade de lidar com mudanças. Tendem ao isolamento social, se não estimulados (APA, 2013).

A incidência do Transtorno do Espectro Autista (TEA) tem apresentado um aumento expressivo nas últimas décadas. De acordo com estudos de Araújo (2019), nos Estados Unidos, entre 2000 e 2002, a prevalência era de uma criança diagnosticada com TEA a cada 150 crianças de 8 anos. Já entre 2010 e 2012, essa taxa subiu para uma em cada 68 crianças, e em 2014, para uma em cada 58 crianças. Embora a ampliação e o aprimoramento dos critérios diagnósticos contribuam de forma significativa para esse crescimento, a incidência praticamente triplicou entre 2000 e 2014.

Atualmente, segundo dados do Centers for Disease Control and Prevention (CDC), a prevalência do TEA nos Estados Unidos é de aproximadamente uma em cada 36 crianças, correspondendo a cerca de 2,78% da população infantil. Estudos mais recentes indicam números ainda maiores, com prevalência estimada em uma em cada 31 crianças, ou 3,22%, evidenciando uma tendência contínua de aumento.

Embora a etiologia do TEA ainda seja objeto de intensos debates, diversos estudos indicam que a origem do transtorno resulta de uma complexa interação entre fatores genéticos e ambientais. Pesquisas como as de Bailey (1995) e Sandin (2014) demonstraram que a incidência do TEA entre gêmeos monozigóticos é significativamente maior do que entre gêmeos dizigóticos, evidenciando o papel relevante da carga genética. Há indícios de que a genética do TEA envolva centenas ou até milhares de genes, configurando múltiplos padrões de herança. Entretanto, esses fatores genéticos sofrem influência de aspectos ambientais, como idade avançada dos pais, uso de medicações durante o pré-natal, prematuridade, baixo peso ao nascer e negligência nos cuidados com a criança (Mandy, 2016).

O diagnóstico diferencial do TEA deve considerar manifestações semelhantes em outras condições, como deficiência intelectual, distúrbios de linguagem, outras desordens do neurodesenvolvimento, transtornos emocionais, doenças neurodegenerativas e epilepsias de início precoce. Diante do aumento da prevalência e da complexidade do diagnóstico, é fundamental o investimento em estratégias de detecção precoce e em políticas públicas que favoreçam o acompanhamento interdisciplinar, visando ao melhor prognóstico e à inclusão efetiva das pessoas com TEA na sociedade.

2.2 Fatores inflamatórios

O TEA se manifesta frequentemente com uma vasta gama de comorbidades, incluindo condições morfológicas (macrocefalia), fisiológicas (problemas gastrointestinais e/ou do sono) e psiquiátricas (ansiedade). As causas mais comuns propostas para o TEA são perturbações fisiológicas e metabólicas, envolvendo a imunidade, o stress oxidativo e a disfunção mitocondrial

O estresse oxidativo é uma condição caracterizada pelo desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS) e a capacidade do organismo de neutralizar seus efeitos deletérios por meio de sistemas antioxidantes. Esse quadro pode resultar de um aumento na geração de ROS/RNS, de uma síntese reduzida ou de uma disfunção nos mecanismos de defesa antioxidante, o que compromete a proteção contra o ataque oxidativo às biomoléculas. Além de provocarem danos, as espécies reativas desempenham papéis importantes em

processos de defesa, desintoxicação, reações biossintéticas e sinalização celular. No entanto, os danos oxidativos induzidos pelos radicais livres estão comprovadamente associados à ocorrência, progressão e gravidade de mais de cem doenças, incluindo Alzheimer, Huntington, Parkinson, autismo, esclerose lateral amiotrófica, diabetes mellitus, enfermidades cardiovasculares e inflamatórias, enfisema, catarata e diversos tipos de câncer (Lopez-Alarcona; Denicola, 2013; Sies, 1985).

No desenvolvimento fetal, os órgãos com rápido desenvolvimento são especialmente suscetíveis às influências do estresse oxidativo e, o cérebro, por passar por intenso crescimento e diferenciação durante o período fetal, destaca-se como um dos principais alvos desses fatores. Por essa razão, o ambiente intrauterino pode determinar a vulnerabilidade a transtornos do neurodesenvolvimento. Rommel e colaboradores (2020) relataram uma associação entre estresse oxidativo materno durante a gestação e o aumento de dificuldades sociais e comportamentais na prole e, dados epidemiológicos e clínicos apontam que diversas condições maternas durante a gravidez — incluindo exposição a toxinas ambientais, uso de determinados medicamentos, obesidade, infecções, alimentação inadequada e altos níveis de estresse psicossocial — estão relacionadas a um maior risco de alterações no neurodesenvolvimento da criança. O ponto em comum entre essas condições é a capacidade de gerar alterações nos processos endócrinos, imunológicos/inflamatórios, metabólicos e de estresse oxidativo no sistema materno-placentário-fetal (MPF), mediadores que podem alcançar o feto tanto pela transferência transplacentária direta quanto por efeitos indiretos sobre a fisiologia placentária.

O sistema nervoso apresenta elevada vulnerabilidade a lesões induzidas pelo estresse oxidativo, logo, a atividade neuronal especializada e a transmissão sináptica dependem de membranas com funcionamento adequado, sendo assim, os axônios apresentam predisposição a lesões, principalmente em regiões periféricas em razão de fatores como à alta demanda energética cerebral e o consumo de grandes quantidades de oxigênio, favorecendo a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ROS), além disto, a abundância de ácidos graxos poli-insaturados, presente nas membranas neuronais, tornam suscetíveis à peroxidação lipídica causada por radicais livres. Um dos principais neurotransmissores, o glutamato, possui natureza excitotóxica que contribui para o estresse oxidativo, sendo assim, a oxidação de neurotransmissores pode gerar espécies como O_2 e quinonas, que reduzem os níveis de glutathione, um dos principais antioxidantes celulares (Manivasagam, *et al*; 2020).

Outro neurotransmissor de importância é a serotonina que atua no cérebro regulando humor e cognição, e no intestino controlando secreção, motilidade e percepção da dor. Sua produção depende do triptofano obtido na dieta e, em pessoas com autismo, a síntese de serotonina no cérebro está reduzida devido à inflamação intestinal que leva à produção elevada de serotonina por células enterocromafins e mastócitos, provocando alterações da motilidade intestinal, vasodilatação e aumento

da permeabilidade vascular, assim, reforça a importância da saúde intestinal na regulação da serotonina e no manejo dos sintomas do autismo. Além disto, a microbiota intestinal pode influenciar disfunções cerebrais por meio da modulação da resposta imune do hospedeiro, uma vez que micro-organismos patogênicos estimulam a secreção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, IL-6 e IL-8, por células epiteliais, dendríticas e macrófagos, desencadeando processos inflamatórios associados a distúrbios neuropsiquiátricos.

Estudos apontam níveis elevados de estresse oxidativo em indivíduos com Transtorno do Espectro Autista (TEA) e até em seus pais, através de biomarcadores diretos de peroxidação lipídica, além disso, foram identificadas concentrações aumentadas de pró-oxidantes, incluindo toxinas orgânicas e metais pesados como mercúrio, chumbo e arsênio, que se acumulam nesses indivíduos. Também se observam níveis elevados de citocinas e xantina oxidase, capazes de gerar radicais livres. Infecções por certos vírus e bactérias podem induzir a produção excessiva de óxido nítrico no intestino, que, ao alcançar o cérebro, pode causar lesões. O aumento de nitritos em indivíduos com TEA está relacionado a danos crônicos no intestino e no sistema nervoso central. Estudos sugerem ainda que a barreira hematoencefálica em pessoas com autismo apresenta maior permeabilidade, tornando o cérebro mais vulnerável ao estresse oxidativo (Rose, *et al.*; 2012; James, *et al.*, 2010).

A presença de marcadores inflamatórios impacta diretamente o metabolismo, com destaque para o ciclo da metionina, cuja cascata bioquímica está intimamente relacionada à reciclagem da homocisteína (Hcy). Estudos experimentais demonstram que a Hcy pode induzir lesões celulares e moleculares por meio do estresse oxidativo, principalmente pela geração de espécies reativas de oxigênio (ROS). Outro mecanismo associado à toxicidade da Hcy envolve a interferência nos processos epigenéticos de regulação gênica, incluindo a metilação do DNA, as modificações de histonas e a ação de RNAs não codificantes. Mais do que um simples biomarcador, a Hcy é considerada um indicador relevante na prevenção de diversas doenças. Polimorfismos genéticos relacionados à sua via metabólica estão associados a um risco aumentado de trombose (Sirachainan *et al.*, 2006), enquanto níveis plasmáticos elevados de Hcy têm sido correlacionados a maior risco de distúrbios neurológicos, acidentes vasculares cerebrais e doenças cardiovasculares. Entretanto, a literatura permanece controversa quanto aos níveis de Hcy em crianças com Transtorno do Espectro Autista (TEA), ressaltando a necessidade de investigações adicionais nessa área. Lisboa *et al.* (2020) demonstraram que crianças com o transtorno apresentaram níveis significativamente mais altos de Hcy em comparação aos controles, sugerindo que esse desequilíbrio metabólico pode contribuir para alterações epigenéticas e sinápticas associadas à fisiopatologia do autismo. Dessa forma, a Hcy se configura não apenas como um biomarcador de risco, mas também como um ponto-chave de convergência entre genética (polimorfismos da MTHFR), metabolismo e vulnerabilidade neurológica.

Nesta cascata bioquímica o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) destaca-se como uma das principais citocinas pró-inflamatórias associadas ao autismo, sendo apontado em diferentes contextos nos estudos recentes como níveis elevados de TNF- α no líquido cefalorraquidiano de indivíduos com TEA, sugerindo sua participação na neuroinflamação, na ativação microglial e na disfunção da barreira hematoencefálica, processos que podem contribuir para alterações sinápticas e comportamentais características do transtorno (Than *et al.*, 2023). Complementarmente, Nadeem *et al.* (2022) evidenciaram que células B de crianças com TEA apresentam aumento significativo da expressão de TNF- α em relação a controles típicos, reforçando a hipótese de um desequilíbrio pró-inflamatório sistêmico que envolve diferentes populações celulares do sistema imune. Desde modo, há indicação de que a produção exacerbada de TNF- α não apenas intensifica a inflamação periférica e central, mas também representa um potencial alvo terapêutico, considerando que sua modulação pode impactar positivamente tanto a imunidade quanto a função neurológica em indivíduos com TEA.

2.3 A genética e a epigenética do TEA

Em muitas doenças genéticas complexas há um desafio recorrente na investigação delas, podendo denominar como “déficit de hereditariedade”, para elucidar essa lacuna, hipóteses são propostas para buscar a compreensão, incluindo a presença de variantes genéticas ainda não completamente caracterizadas, interações entre diferentes genótipos, a ocorrência de penetrância incompleta, modificações epigenéticas e a influência de interações entre fatores genéticos e ambientais (Eichler *et al.*, 2010; Génin, 2020; Winiowiecka-Kowalnik *et al.*, 2020).

Atualmente, estima-se que as técnicas clássicas de cariotipagem podem revelar aberrações cromossômicas em aproximadamente 2-5% dos indivíduos com TEA (Devlin; Scherer, 2012; Liu; Takumi, 2014). Grandes anormalidades cariotípicas são encontradas com mais frequência em casos de TEA com características dismórficas associadas, além disto, alterações cromossômicas estruturais foram relatadas em todos os cromossomos e incluem deleções, duplicações, inversões, translocações, bem como cromossomos marcadores. A maioria das aberrações estruturais é rara e o seu papel causal no TEA não é claro apesar de algumas serem frequentes (Castermans *et al.*, 2004). A anomalia cromossômica mais detectada em 1-3% das crianças com TEA é a duplicação 15q11q13 de origem materna, com tamanho variável (Hogart *et al.*; 2010). Muitos genes nesta região cromossômica têm funções essenciais no cérebro, tais como os receptores GABA, como: GABAR5 e GABAR3 (receptores GABA), UBE3A e HERC2 (componentes do complexo proteassoma) e SNRPN (ribonucleoproteína peptídeo N), bem como CYFIP1 (a proteína de interação FMRP) (Menold *et al.*, 2001; Nishimura *et al.*, 2007; Bucan *et al.*, 2009; Puffenberger *et al.*, 2012). Outras anomalias cromossômicas identificadas

em indivíduos com TEA incluem aneuploidias: 21 (síndrome de Down), X (síndrome de Turner, síndrome de Klinefelter, síndrome XXX) e Y (síndrome XYY) (Devlin; Scherer, 2012). Apesar da limitação de pequenas amostras disponíveis e da ausência de amostras parentais, estudos de mutações em mosaico em tecido cerebral *post-mortem* sugerem a presença de mutações em mosaico prejudiciais em alguns cérebros com autismo.

Os mecanismos de defesa do organismo dependem tanto de fatores hereditários conservados como das variações que passam pelo crivo da seleção natural e da deriva genética (Konopinski; Fijarczyk; Biedrzycka, 2023). Quando combinados a diferentes ambientes, os patógenos exercem uma forte pressão seletiva sobre seus hospedeiros. O combate entre o sistema imunológico dos hospedeiros e os agentes patogênicos, em um contexto coevolutivo, permite a fixação de alelos eficientes dentro da população, devido a seleção positiva (Kosiol *et al.*, 2008; Nielsen *et al.*, 2008). Os padrões genômicos conservados podem ser biomarcadores de processos fisiológicos necessários ao sistema de defesa de diversos organismos. Sendo assim, analisar genes relacionados ao sistema imunológico são opções promissoras para compreender a base genômica dos processos evolutivos de inúmeras patologias humanas. A medicina evolutiva traz consigo abordagens da genética populacional e investiga a saúde sobre mudanças micro evolutivas passadas, atuais e futuras acerca da estrutura, função e das patologias humanas (Rühli; Henneberg, 2013).

2.4 Expressão da Enzima MTHFR e mutações

A enzima metilenotetrahidrofolato (MTHFR) tem papel importante no metabolismo do folato, vitamina importante para o desenvolvimento embrionário. A deficiência desta enzima e os elevados níveis de homocisteína estão associados ao desenvolvimento de doenças neurológicas. Quando o corpo apresenta uma quantidade baixa de folato, pode ocorrer queda em um dos componentes importantes para essas reações e isso pode levar ao acúmulo do aminoácido homocisteína (Nazki; Sameer; Ganaie, 2014)

O gene da enzima metilenotetra-hidrofolato redutase (MTHFR) pode apresentar a mutação c677t, essa mutação é um polimorfismo que está associado ao aumento da homocisteína, assim, os autores afirmam que a ingestão do metil-folato precisa ser elevada para que haja o desenvolvimento adequado do sistema nervoso (Schmidt *et al.*, 2012).

Nos tecidos periféricos, a 5-metil-THF chega ao interior das células via um sistema de transporte específico, para isso perde o grupamento metil por cedê-lo à homocisteína para a síntese de metionina. O folato fica retido dentro da célula a partir de reações de adição de resíduos de glutamato à THF resultante, pela folipoliglutamato sintetase. O armazenamento do folato é feito sob a forma de

The diagram illustrates the metabolic pathway of homocysteine (Hcy) and its regulation by B9 (Folate) and MTHFR. The pathway shows the conversion of B9 to MTHF, which then converts Hcy to 5-MTHF. MTHF also converts Met to SAM, which then converts SAM to Hcy. The diagram highlights the MTHFR C677T mutation, which leads to a decrease in MTHF and an increase in Hcy. This increase in Hcy is associated with oxidative stress (ESTRESSE OXIDATIVO) and the production of TNF-α, which is linked to atherosclerosis. The diagram also shows the role of MTHFR in the conversion of Hcy to Met and the role of MTHFR in the conversion of Met to SAM.

Figura 1 - Metabolismo de MTHFR: ciclo do folato, ciclo da metionina, trans-ulfuração e hiper-homocisteinemia. **Fonte:** autoria própria.

Mohammad *et al.* (2016) examinaram a utilidade clínica dos polimorfismos genéticos envolvidos na via do folato na previsão do risco de distúrbios do espectro do autismo (TEA) e abordou as inconsistências na associação de MTHFR C677T e hiper-homocisteinemia com TEA. Neste estudo, foi desenvolvido um modelo de sistema de rede neural artificial (ANN) a partir dos dados de 138

crianças autistas e 138 não-autistas, usando os polimorfismos: GCPII C1561T, SHMT1 C1420T, MTHFR C677T, MTR A2756G e MTRR A66G, para explorar preditores de risco de autismo e determinantes genéticos da homocisteína. Meta-análises foram realizadas em 1361 crianças com TEA e 6591 crianças não-autistas para explorar a associação de MTHFR C677T e homocisteína com o risco de TEA. Os resultados desta pesquisa identificaram que polimorfismos genéticos da via do folato foram preditores moderados de risco de autismo.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

3.1.1 Estudar a expressão do gene metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) em crianças com Transtorno do Espectro Autista (TEA) após um tratamento medicamentoso.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para alcançar o objetivo geral, foram determinados os seguintes objetivos específicos:

3.2.1 Determinar primers para estudo de expressão gênica da *MTHFR* em pacientes com TEA.

3.2.2 Comparar os perfis de expressão leucocitários da enzima *MTHFR* em grupos de pacientes TEA no pré e pós-tratamento.

3.2.3 Avaliar a expressão leucocitária da citocina inflamatória *TNF- α* em grupos de pacientes TEA no pré e pós-tratamento.

3.2.4 Avaliar a viabilidade do gene em células escamosas da boca.

3.2.5 Elaborar artigo de revisão integrativa a respeito da influência do polimorfismo genético do gene *MTHFR*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Tipo de estudo, local e aspectos éticos.

O estudo foi conduzido na Faculdade de Medicina (FAMED) da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul e no Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian (HUMAP), contemplando diferentes delineamentos de pesquisa. Inicialmente foi realizado um estudo clínico duplo-cego randomizado com a coleta de amostras biológicas de sangue de pacientes com TEA. Posteriormente foi desenvolvido um segundo estudo clínico duplo-cego randomizado, também utilizando sangue

como material biológico, também de pacientes com TEA. Por fim foi conduzido um estudo transversal, com coleta de células escamosas da boca (CEB) de pacientes típicos, ou seja, sem diagnósticos de TEA. A análise molecular de todas as amostras foi realizada em 2025, no Laboratório de Patologia Molecular da FAMED (Tabela 1).

O armazenamento das amostras seguiu os critérios delineados no protocolo de biorrepositório da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, conforme especificado na Resolução nº 240, de 18 de setembro de 2017 (Anexo A).

Tabela 1 – Delineamento da pesquisa.

Tipo de material biológico	Intervenção Medicamentosa	Número amostral (n)	*CAAE
Sangue	Sim	n = 20	21878619.7.0000.0021
Sangue	Sim	n = 40	21878619.7.0000.0021
**CEB	Não	n = 4	83180424.8.0000.0021

* Certificado de Apresentação de Apreciação Ética.

** Células epiteliais da boca.

4.2 Seleção da População

Foram selecionados pacientes com Transtorno do Espectro Autista (TEA), já com diagnóstico, realizados por psicólogo, psiquiatra ou neuropediatra, sem comorbidades, exceto TDAH (Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade); e crianças com desenvolvimento típico, ou seja, sem diagnóstico de TEA ou outras condições neuropsiquiátricas.

A participação no estudo foi condicionada à assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) por um dos pais ou responsável legal (Anexo B). Além disso, crianças com idade acima de 7 anos expressaram sua concordância mediante a assinatura do Termo de Assentimento Livre e Esclarecido (TALE) (Anexos C). Apenas as crianças que possuíam capacidade cognitiva e compreensão suficiente para assimilar as informações relacionadas à pesquisa puderam assinar o TALE. Nos casos em que a criança não tivesse essa capacidade, a participação foi autorizada exclusivamente por meio do TCLE assinado pelo responsável legal.

4.2.1 Divisão de grupos experimentais

Os participantes foram agrupados de acordo com o tipo de intervenção medicamentosa utilizada, a qual difere entre os grupos. O composto medicamentoso do grupo dois com TEA está sob patente da

equipe de pesquisa conforme documento anexado (Anexo D). A distribuição dos grupos ocorreu da seguinte forma:

Grupo um com TEA (GTEA 1) – 20 crianças com diagnóstico de transtorno do espectro autista (TEA), com idades entre 2 anos e 3 meses e 5 anos e 5 meses, em uso de uma substância medicamentosa. O tempo de uso do medicamento foi de 120 dias e os pacientes foram divididos em grupos: tratados (n=10) e placebo (n=10).

Grupo dois com TEA (GTEA 2) – 30 crianças com TEA, com idades entre 2 anos e 14 anos incompletos, em uso de um composto farmacológico contendo três substâncias. O tempo de uso do medicamento foi de 90 dias e os pacientes foram divididos em grupos: não tratados (n=10), tratados (n=10) e placebo (n=10).

Grupo controle sem TEA (GTÍPICOS) – 4 crianças com desenvolvimento típico, com idades entre 2 anos e 14 anos incompletos, sem uso de medicação.

4.2.2 Critérios de inclusão e exclusão

Nos grupos com diagnóstico de transtorno do espectro autista (TEA), foram incluídas apenas crianças que não faziam uso de medicamentos controlados anteriormente. Crianças em acompanhamento terapêutico com psicólogos, fonoaudiólogos ou profissionais especializados em Análise do Comportamento Aplicado (ABA) foram elegíveis, desde que estivessem dentro da faixa etária previamente definida.

Não foram incluídas no grupo TEA crianças pertencentes a populações indígenas ou quilombolas, aquelas cujo diagnóstico de TEA não estivesse claramente estabelecido ou que apresentassem histórico de convulsões.

No grupo controle (GTÍPICOS), foram incluídas exclusivamente crianças com desenvolvimento típico, sem diagnóstico de TEA ou qualquer outra comorbidade potencialmente associada a distúrbios de comportamento, infecções ou condições clínicas que justificassem sua exclusão, desde que estivessem na faixa etária previamente determinada.

4.3 Procedimentos de coleta de material

O sangue foi coletado pela equipe do laboratório de análises clínicas do HUMAP utilizando tubo com heparina conservado em RNAlater®. A coleta de CEB foi realizada pela equipe de pesquisa raspando o interior de cada bochecha, utilizando um abaixador de língua pediátrico esterilizado e conservado em RNAlater®. Ambos os materiais foram acondicionados em freezer -20°C até o momento do processamento.

4.4 Procedimentos de biologia molecular

4.4.1 Extração do RNA total do sangue

Na realização de extração de RNA total, foram utilizados cerca de 500 µl de sangue total heparinizado, previamente estabilizado em RNAlater® e obtido individualmente de cada indivíduo. Após o descongelamento, alíquotas de 1,5 ml foram submetidas à centrifugação a 700 g, durante 15 minutos, em centrífuga refrigerada (3K30 Sigma®), a fim de concentrar o pellet celular. Posteriormente, a extração do RNA total foi realizada com o reagente Stat-60®, conforme instruções do fabricante. O RNA obtido foi ressuspensão em 100 µl de água livre de RNase tratada com DEPC, sendo quantificado por espectrofotometria a 260 nm no equipamento NanoDrop® 2000 (ThermoScientific) a partir de alíquotas de 2 µl.

Na sequência, alíquotas do RNA total foram tratadas com DNase I (TURBO DNA-free kit, Ambion Inc., Foster, CA, EUA) para remoção de resíduos de DNA genômico. Na sequência, procedeu-se à extração com duas vezes o volume de fenol tamponado em Tris-EDTA 1 M, pH 4,2, seguida de precipitação com 50% (v/v) de isopropanol (200 proof). O pellet de RNA tratado foi lavado com 700 µL de etanol ultrapuro e ressuspensão em 25 µl de água DEPC. Após esse processamento, as amostras foram novamente quantificadas por leitura espectrofotométrica em O.D. = 260 nm, sendo então utilizadas nas reações subsequentes de RT-PCR.

4.4.2 Extração do RNA total de CEB

O RNA total foi extraído utilizando o reagente Trizol, conforme o protocolo fornecido pelo fabricante. Para isso, as amostras de sangue em RNAlater® foram descongeladas e submetidas a centrifugação de 700g/15 min./4°C. Resumidamente, o RNA total resultante foi ressuspensão em 50 µl de água de RNase free do tipo DEPC, e alíquotas de 2 µl foram quantificadas por meio de leitura a 260 nm em um espectrofotômetro NanoDrop™ One (*Thermo Scientific™ Spectrophotometer*). Alíquotas de RNA total foram armazenadas a -20°C para subsequente uso na transcrição reversa (RT) e seguido de PCR quantitativo em tempo real (qPCR) (Anexo E).

4.4.2 Transcrição reversa (RT)

A RT para síntese de cDNA (DNA complementar) de fita simples foi realizada a partir de 500 ng de RNA total em volume final de reação de 26,7 µl por amostra. Resumidamente, 16 µl de amostras

de RNA foram pré-incubadas a 70°C por 10 minutos, com 10 pmol de cada primer reverso, específico para os genes alvos em estudo, juntamente com 10 pmol de primer oligo dT18 (*Invitrogen*), seguido de armazenamento em gelo num volume de 19 µl. Em seguida 5,2 µl de tampão RT 5x (KCl 50 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 8,4), foram acrescentados à solução de RNA total contendo os primers reversos e adicionados 2 µl de dNTP mix, (10 mM de cada). Para a reação de RT foram acrescentadas 0,5 µl de Transcriptase Reversa (100 U), em um volume final de 26,7 µl que foram incubados a 45°C por 1 hora. A reação foi terminada a 4°C e utilizada imediatamente para PCR quantitativo em tempo real (qPCR). Todos os reagentes foram provenientes da *Invitrogen*TM (*SuperScript*TM *First-Strand Synthesis System for RT-qPCR*) (Anexo E).

4.4.3 PCR quantitativo em tempo real (qPCR) para CEB

As amostras de cDNA resultantes da RT foram utilizadas na qPCR, realizada no equipamento *QuantStudio*TM 6 *Flex Real-Time PCR System*, utilizando-se o protocolo de reação descrito pelo SYBR Green PCR Master Mix Kit (*Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA*). As amostras foram utilizadas para a construção de curva-padrão em quadruplicatas, aplicadas em placas de 384 poços (*ABI PRISM*[®] 384-Well Optical Reaction Plate with Barcode, *Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA*), em volume final de 10 µl para cada reação. Aliquotas de 3,0 µl de cDNA, em diferentes diluições (1 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4}), foram pipetadas em cada canaleta da placa, adicionando-se, posteriormente, 7 µL de sybr Mix (5 µL do SYBR Green PCR Master Mix Kit; 2 µL de primers [senso e anti-senso; 0,5 pmol cada]). A placa foi selada com adesivo óptico (*ABI PRISM*[®] Optical Adhesive Covers, *Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA*). As reações de PCR em tempo real ocorreram no seguinte ciclo termal: [estágio 1] um ciclo de 50°C/2 min.; [estágio 2] um ciclo a 95°C/10 min.; [estágio 3] 40 ciclos de 95°C/15 s, seguidos de curva de dissociação a partir de 60°C para análise da especificidade dos fragmentos alvos amplificados (amplicons).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Determinação dos primers e avaliação a viabilidade do gene em células epiteliais da boca.

Utilizando o banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), foi selecionado o gene *MTHFR* e, dentro das informações relacionadas, optou-se por RNAs RefSeq, escolhendo a sequência de mRNA linear de 6.801 pb, com uma região *coding DNA sequence* (CDS) que se estende de 117 a 1841, a partir dessas informações, foi possível determinar a região alvo (EMBRAPA, 2015). Informações do gene alvo e as sequências obtidas pelo GenBank (Anexo E).

Inicialmente, por meio da ferramenta de *design PRIMER-BLAST* do National Center for Biotechnology Information (NCBI), a região do *coding DNA sequence* (CDS) foi inserida para encontrar um primer específico. O *amplicon* para a região codificadora foi determinado baseado na posição 677 do gene em que pode ocorrer a mutação *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) tendo um impacto funcional na região codificante denominado missense, ou seja, a troca da base nitrogenada citosina por timina, alterando a produção do aminoácido alanina por valina, sendo assim, foram desenhados os primers *forward* (FOR) e *reverse* (REV), específico e genômico, além disto, o primer S26 foi utilizado como normalizador durante a qPCR (tabela 1).

Tabela 2 – Iniciadores para MTHFR, TNF- α e S26.

Iniciadores	Sequência de primer 5'-3'	Tamanho	Amplicon (pb)
HSC677T	(F) CTG TCC CGC CTT CCT CCT	18 nt	68
	(R) TGG GAG AGA CAC GAA GGA	18 nt	
HSS26	(F) TGT GCT TCC CAA GCT GTA TGT GAA	24 nt	75
	(R) CGA TTC CTG ACT ACT TTG CTG TG	23 nt	
HSTNF α	(F) CCA GGG ACC TCT CTC TAA TCA	21nt	95
	(R) CTT TGC TAC AAC ATG GGC TAC	21nt	

Fonte: Dados da pesquisa

HSC677T: abreviação para o iniciador referente ao gene MTHFR.

Após a degradação do ácido ribonucleico (RNA), procedeu-se à quantificação das amostras de células epiteliais da boca (CEB) provenientes dos pacientes controle (GTÍPICOS). As densidades ópticas (OD) foram medidas em comprimento de onda de 260 nm, método utilizado para a determinação de ácidos nucleicos conforme descrito por Sambrook et al. (1989). Os resultados confirmaram a presença de RNA e permitiram o cálculo das concentrações finais, que variaram de 1,64 a 2,09 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, correspondendo a uma quantidade total entre 14,4 e 18,5 μg em um volume de 250 μl . Esses valores estão de acordo com o esperado para amostras contendo 500 μl de RNA latter e raspado celular. Além disso, os dados confirmam que essa metodologia de coleta não invasiva foi capaz de fornecer rendimentos superiores a 30 μg de RNA total, quantidade adequada e viável para a etapa subsequente de PCR. O RNA extraído via método Trizol apresentou qualidade e quantidade adequadas para análises de PCR quantitativo em tempo real, após transcrição reversa. O armazenamento imediato das amostras em estabilizador de RNA foi essencial para preservar sua integridade, tais amostras foram processadas cerca de um mês após a coleta. Os resultados indicam que o uso de CEB é promissor para

estudos genômicos ampliados, contribuindo para a elucidação dos mecanismos moleculares associados ao gene MTHFR e ao Transtorno do Espectro Autista (TEA).

Para verificar a observação de amostras de RNA extraídas de células epiteliais bucais (CEB), foi realizada a técnica de RT-qPCR utilizando primers específicos para a enzima humana MTHFR, direcionado ao amplicon-alvo de 68 bp. As figuras 2 e 3 apresentam as curvas de interferência e dissociação geradas, evidenciando a linearidade da amplificação e uma eficiência de 100% para todos os alvos, além da especificidade dos *primers* e *amplicons*. Esses resultados permitiram confirmar tanto a orientação dos *primers* quanto a expressão do gene MTHFR nas células epiteliais bucais. Além disso, os dados obtidos destacam a qualidade adequada dos procedimentos de pipetagem, diluição e sensibilidade analítica. Assim, os resultados demonstram não apenas a padronização da técnica, mas também a sua aplicabilidade para análises posteriores com as demais amostras, incluindo estudos genômicos potenciais.

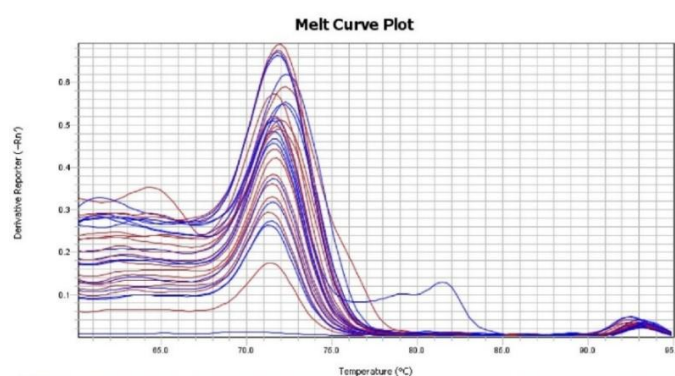


Figura 2 – Curva de desnaturação (Melt Curve) derivada da análise de qPCR, representando a primeira derivada da fluorescência em função da temperatura ($-d(Rn)/dT$). Observa-se um pico principal em aproximadamente 72–75 °C, indicando a amplificação específica do alvo. Picos secundários de menor intensidade sugerem a presença de produtos inespecíficos ou formação de dímeros de primers.

Os resultados encontrados revelaram um perfil típico de amplificação linear nas diluições de 1, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} ng, utilizando o corante SYBR Green em função do número de ciclos (C_t). As Figuras 2 e 3 apresentam uma curva de concentração gerada para a enzima MTHFR, incluindo os quatro pontos de diluição específica. A curva exibiu alta linearidade, evidenciada por um elevado coeficiente de determinação ($R^2 = 0,94$). A eficiência da ocorrência de RT-qPCR foi calculada como 100%, utilizando a pesquisa $E = 10^{-1/\text{declive}}$ $E = 10^{\{-1/\text{inclinação}\}}$ $E = 10^{-1/\text{declive}}$.

Esses valores de eficiência e linearidade destacam a robustez do método para quantificação absoluta das amostras, utilizando o controle interno na RT-qPCR, conforme sugerido por Pfaffl (2003). As figuras também demonstram que os valores de C_t coletados foram consistentes, refletindo uma relação logarítmica clara entre as diluições e os pontos da curva padrão, com boa separação entre eles.

Esses resultados são fundamentais para permitir a quantificação absoluta em amostras de RNA provenientes de células epiteliais da boca (CEB). Além disso, os dados confirmam que a expressão relativa de cada amostra é mensurável com alta confiabilidade.

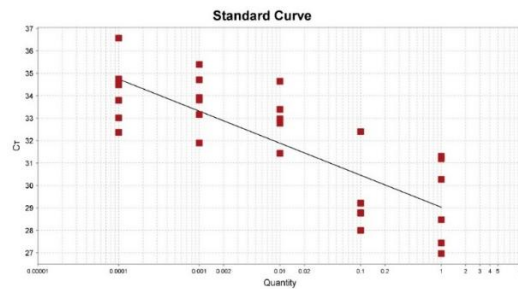


Figura 3 - Curva padrão (Standard Curve) obtida por qPCR, relacionando o ciclo limiar (Ct) com a quantidade inicial de molde (escala logarítmica). A regressão linear demonstra a relação inversa entre Ct e quantidade, utilizada para calcular a eficiência de amplificação e validar a precisão do ensaio.

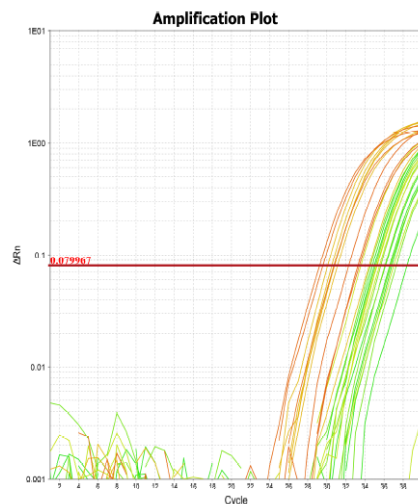


Figura 4 - Curva padrão (Amplification Plot) obtida por qPCR, representando a variação da fluorescência normalizada (ΔRn) em função do número de ciclos. A linha de limiar (threshold, em vermelho) define o ponto de detecção do sinal acima do ruído de fundo, permitindo a determinação dos valores de ciclo limiar (Ct) para cada amostra. As curvas coloridas representam as diferentes amostras ou replicatas analisadas.

O diagnóstico de Transtorno do Espectro Autista (TEA) ainda é considerado predominantemente clínico, sendo o padrão-ouro baseado na avaliação comportamental e no histórico do paciente. No entanto, as diretrizes atuais destacam a importância crescente da avaliação genética como complemento ao diagnóstico, uma vez que esta abordagem permite identificar a etiologia do distúrbio em aproximadamente 15% a 30% dos casos (Schaefer; Mendelsohn, 2013).

Neste estudo, a análise da viabilidade do uso de células epiteliais bucais (CEB) como amostra não invasiva para obtenção de RNA total, por meio de raspagens de mucosa oral foi validada para a expressão da enzima MTHFR como visto pelas quantidades de RNA analisadas por meio de espectrofotometria nas curvas de expressão relativa (figuras 2 e 3), como retratado em outros

trabalhos, demonstrou-se que a obtenção de RNA total a partir de CEB foi viável (Balaniuc *et al*, 2025; Messias *et al*, 2024), fornecendo quantidades adequadas para análises quantitativas por qPCR. Além disso, identificaram diferenças na expressão basal de genes específicos — como ACVR1, TNF- α , por ter como alvo do estudo a doença fibrodysplasia ossificante progressiva (FOP) (Messias, *et al.*; 2024). Em síntese, este estudo confirma que as CEB podem ser utilizadas como um material biológico acessível, seguro e eficiente para investigar a expressão de genes relacionados ao TEA destacando o MTHFR e TNF- α .

De acordo com o parecer da Sociedade Brasileira de Genética Médica e Genômica (2018), o diagnóstico genético no TEA desempenha um papel crucial, auxiliando na identificação de causas subjacentes. Essa investigação genética é essencial não apenas para orientar instruções específicas, mas também para o direcionamento do acompanhamento clínico e do aconselhamento genético. Além disso, permite a elaboração de estratégias personalizadas para o manejo do paciente e para o suporte aos familiares, promovendo uma abordagem mais integrada e eficiente no cuidado ao TEA.

5.2 Comparação dos perfis de expressão do MTHFR no sangue

Do total de 30 pacientes do GTEA 2, 26 pacientes foram avaliados neste experimento, sendo oito pertencentes ao grupo não tratado, oito ao grupo tratado e dez ao grupo placebo, foi inicialmente realizado um teste ANOVA para comparar os três grupos experimentais - tratados *versus* não tratados *versus* placebo, o qual revelou diferença estatisticamente significativa na expressão relativa ($p = 0,009$). Em seguida, por meio do teste t, verificou-se diferença significativa entre os não tratados *versus* tratados ($p = 0,0289$). Por fim, a comparação entre os grupos tratados *versus* placebo também apresentou diferença significativa na expressão relativa do gene ($p = 0,0065$), confirmada pelo teste t (figura 4). O número amostral ficou reduzido por causa de falhas de leitura do equipamento, que eventualmente podem acontecer.

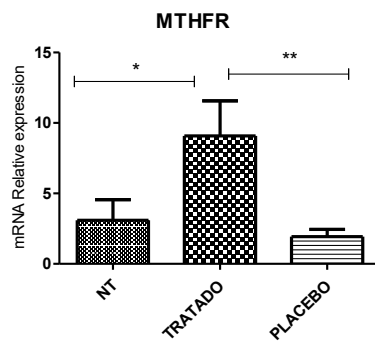


Figura 5 – Expressão relativa do mRNA, em cada grupo experimental e momento de análise. *Diferença significativa em relação ao grupo não tratado (n=10) e tratado(n=10) (t-student, $p<0,0289$). **Diferença significativa em relação ao grupo tratado e placebo (t-student, $p<0,0065$).

As análises realizadas por qPCR apresentaram curvas de amplificação consistentes para a expressão relativa tanto dos genes da citocina TNF- α quanto do gene da enzima MTHFR. Para garantir a comparabilidade e a padronização dos resultados, foi utilizado o gene S26 como normalizador, devido à sua expressão estável. Esse procedimento possibilitou corrigir variações inerentes à quantidade inicial de RNA, à eficiência da extração e à síntese de cDNA, assegurando maior confiabilidade e reprodutibilidade dos dados obtidos (Figura 5).

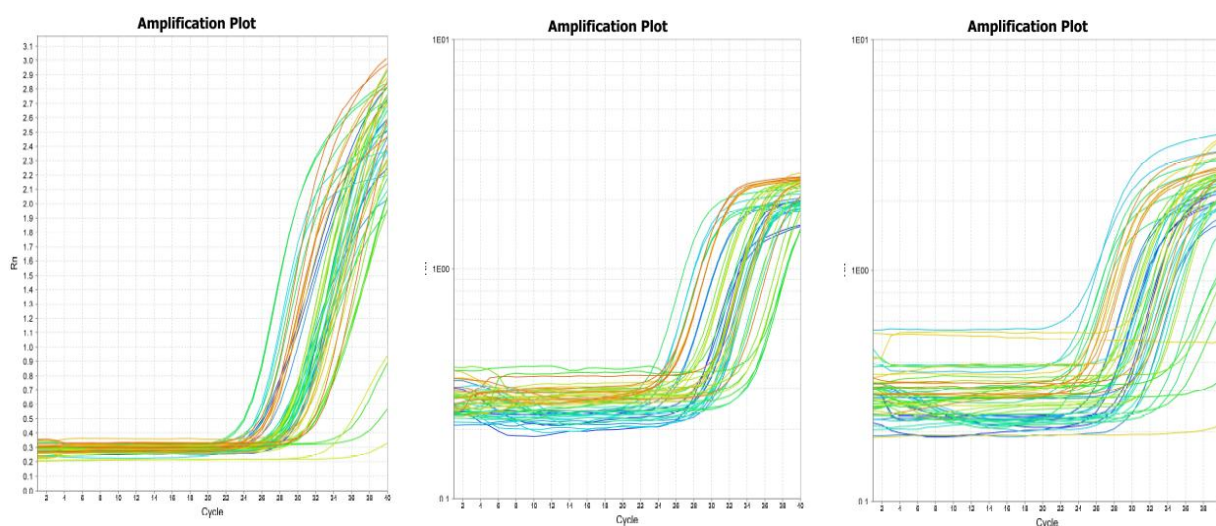


Figura 6 – Curvas de amplificação representativa da expressão do S26 (n=28), TNF- α (n=28) e metilenotetrahidrofolato (MTHFR) (n=28), respectivamente da esquerda para direita, através de PCR em tempo real.

Recentemente tem sido desenvolvidas pesquisas no laboratório em relação ao transtorno do espectro autista cujos resultados têm demonstrado melhoras nos aspectos clínicos após o uso de formulações para tratamento do TEA como foi o caso deste trabalho, através do composto farmacológico HAAM, proveniente de flavonoide, vitamina hidrossolúvel e forma ativa do folato. De acordo com Maldonado (2020) o uso de um único composto de flavonoide demonstrou melhorias mais significativas nos seguintes aspectos: aumento do contato visual, avanços na comunicação verbal (incluindo ampliação do vocabulário e maior intenção comunicativa), melhora na linguagem receptiva e na interação social, uso mais funcional de objetos e brinquedos, aprimoramento das percepções visual e auditiva, e melhor uso do corpo, com redução de estereotípias. Além disso, foram observadas melhorias no comportamento, como a diminuição de crises de birra, agressividade direcionada a si ou a outros (auto e heteroagressividade), aumento da imitação motora, redução da hipersensibilidade sensorial, melhora na qualidade do sono e redução dos níveis de ansiedade.

Esta melhora clínica pode ser associada através dos resultados obtidos nos experimentos realizados com GTEA2 entre pacientes tratados *versus* não tratados ($p = 0,0289$) bem como entre pacientes tratados *versus* placebo ($p = 0,0065$), uma vez que o gene metilenotetrahidrofolato redutase

(MTHFR), atua na codificação da enzima fundamental para o metabolismo do folato, e teve um aumento na expressão relativa gênica nestes pacientes que fizeram uso do composto farmacológico. Este aumento demonstra uma associação positiva visto que pacientes com TEA tendem a ter perfis inflamatórios elevados que tendem a desencadear desregulação nos sintomas comportamentais apresentados anteriormente.

Os resultados do grupo tratado *versus* placebo ($p = 0,0065$) demonstraram que não houve efeito placebo, desta forma é possível validar a resposta fisiológica ao tratamento, visto que, considerando que qualquer melhora na condição de saúde possui relevância clínica para os pacientes, é imprescindível reconhecer tanto o efeito placebo — no âmbito das investigações científicas — quanto a resposta placebo — no contexto da prática clínica. Esse achado é particularmente relevante, pois as crianças medicadas não tinham consciência a respeito do tratamento, o que exclui vieses relacionados à expectativa de melhora. Assim, é possível validar a resposta fisiológica ao tratamento, assegurando que os benefícios relatados refletem mecanismos biológicos e não apenas efeitos psicossomáticos. Embora seja imprescindível reconhecer o impacto do efeito placebo no âmbito das investigações científicas e da prática clínica — já que qualquer melhora na condição de saúde apresenta relevância para o paciente —, no contexto deste estudo a ausência de tal efeito confere maior robustez aos resultados, indicando que a intervenção testada apresenta potencial terapêutico real e deve ser considerada em futuras abordagens clínicas. Em ensaios clínicos controlados, Zhang e Doherty (2018) demonstraram a diferença entre o grupo que recebe a intervenção ativa e o grupo placebo corresponde ao efeito específico do tratamento, ou seja, ao seu benefício líquido. No entanto, ao se considerar unicamente essa diferença, desconsidera-se a intensidade da resposta placebo e seus efeitos, os quais também podem exercer influência significativa sobre os desfechos clínicos observados.

Sendo assim, o aumento da expressão relativa no MTHFR confirma um potencial benefício do composto HAAM, visto que estudos demonstraram os efeitos benéficos do uso de suplementos nutricionais no tratamento de crianças com TEA. Como a vitamina B12 é um cofator essencial para a regeneração da metionina a partir da homocisteína, ela tem sido utilizada para melhorar a capacidade de metilação e o estado redox de crianças com TEA (Li *et al*, 2018), além disto o composto flavonoide com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias e a sua forma metilada podem melhorar significativamente a absorção de compostos bioativos de baixa solubilidade, como a nobiletina, inclusive no cérebro. Essa capacidade de aumentar a biodisponibilidade de flavonoides potencialmente neuroprotetores pode ter implicações futuras no tratamento de condições neurológicas, incluindo TEA (Iwashita *et al*, 2019).

Sae-Lee *et al*. (2018) demonstraram que o metabolismo do folato, regulado pela enzima MTHFR, é determinante para a disponibilidade de grupos metil necessários às reações epigenéticas,

como a metilação do DNA. Deste modo, a suplementação combinada de ácido fólico e vitamina B12 foi capaz de aumentar a metilação global do DNA e reduzir a idade epigenética, efeito mais pronunciado em mulheres portadoras do genótipo MTHFR 677CC, sugerindo uma interação genótipo-nutriente relevante para a manutenção epigenética. Por outro lado, os flavanóis — subgrupo dos flavonoides — apresentaram efeito oposto, atuando como moduladores negativos da atividade das DNA metiltransferases e reduzindo a metilação em regiões específicas do genoma.

Shaik e Gan (2014) destacam que polimorfismos no gene MTHFR, especialmente a variante C677T, reduzem a atividade enzimática e resultam em hiper-homocisteinemia, condição associada ao aumento do estresse oxidativo. O acúmulo de homocisteína favorece a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), nesse contexto, o ácido ascórbico apresenta-se como um modulador importante, devido à sua potente ação antioxidante, neutralizando ROS e atenuando os efeitos nocivos da homocisteína elevada. Dessa forma, os autores sugerem que a suplementação com vitamina C pode exercer efeito protetor em indivíduos com variantes de MTHFR, atuando como estratégia coadjuvante para minimizar os impactos da desregulação metabólica da homocisteína sobre o sistema nervoso.

5.3 Comparação dos perfis de expressão da citocina inflamatória TNF- α

Tendo em vista que o gene MTHFR está diretamente associado com a síntese de folato no organismo e, sabendo que os efeitos oxidativos tendem a gerar processos inflamatórios, é de importância compreender os marcadores que expressam essa condição, como as citocinas. Neste estudo o marcador inflamatório TNF- α ocorreu em duas etapas: - a primeira consistiu em analisar o GTEA1 (n = 20) e posteriormente o GTEA 2 (n = 28).

A finalidade da análise realizada em GTEA 1 (tratado *versus* não tratado) foi para verificar primariamente a possível redução da citocina inflamatória sob efeito do flavonoide fitoterápico, desse modo, o TNF- α apresentou redução na expressão relativa após o tratamento com o flavonoide, este resultado é confirmado por meio da relação tratados *versus* não tratados (test-t, p = 0,0395) (Figura 5).

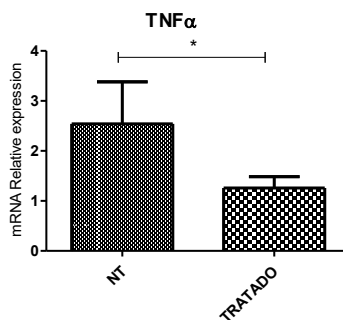


Figura 7 - Expressão relativa do mRNA, em cada grupo experimental e momento de análise (GTEA1).

*Diferença significativa em relação ao grupo não tratado e tratado (t-student, p=0,0395).

Maldonado (2020) sugere que ao se comparar à expressão do mRNA TNF- α entre grupo tratamento comparado ao grupo placebo, há menor expressão relativamente ao grupo tratamento, o que corrobora a informação acerca do potencial redução de inflamação no organismo. Sendo assim, esse único composto flavonoide tem uma atuação na expressão desta citocina, promovendo o mecanismo anti-inflamatório e por consequência contribuindo com a melhora do paciente.

Com o intuito de dar sequência na investigação o achado anterior do GTEA 1, foi repetido o experimento com um número amostral maior que compôs o GTEA 2 – não tratado *versus* tratado *versus* placebo, cujo tratamento foi realizado por meio de um composto farmacológico constituído da tríade de substâncias flavonoide, vitamina hidrossolúvel e a forma ativa do folato. Para avaliar os três grupos foi realizado o teste one-way ANOVA para ($p = 0,5579$) que não demonstrou um resultado significativo, já a comparação entre pacientes não tratados *versus* tratados foi feita por meio do test-t não pareado com correção de Welch ($p = 0,187$) apesar do valor de p não ser significativo é possível observar tendência significativa para o efeito da redução sobre a expressão da citocina; em contrapartida a análise entre os grupos tratados *versus* placebo com test-t com correção de Welch ($p = 0,0241$) foi determinado um valor significativo demonstrando que houve redução na expressão relativa do TNF- α ; por fim o grupo não tratado *versus* placebo evidenciou que não teve significância ($p = 0,3671$), logo, sugerindo que não houve o resposta placebo entre os pacientes (Figura 6).

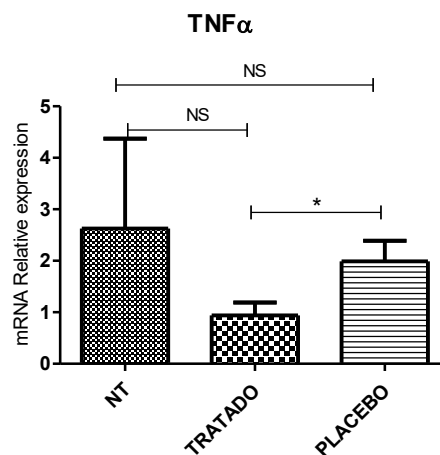


Figura 8 - Expressão relativa do mRNA, em cada grupo experimental e momento de análise. *Diferença significativa em relação ao grupo tratado e placebo (t-student com correção de Welch, $p < 0,0241$). NS = não significativo (não tratado *versus* tratado t-student com correção de Welch, $p = 0,187$; não tratado *versus* placebo, $p = 0,3671$).

Anastasescu *et al* (2023) afirmam que o TNF-alfa não atua de forma isolada, mas integra uma complexa rede de citocinas que interagem dinamicamente na modulação do ambiente

neuroinflamatório associado ao transtorno do espectro autista (TEA). Essa citocina pró-inflamatória atua de forma sinérgica com outras, como a interleucina-1 beta (IL-1 β) e a interleucina-6 (IL-6), contribuindo para a amplificação das respostas inflamatórias. Em conjunto, essas moléculas são capazes de influenciar a plasticidade sináptica, modulando a expressão de receptores de neurotransmissores e de proteínas sinápticas, o que pode resultar em alterações na força das conexões sinápticas e na conectividade neural — aspectos frequentemente comprometidos no TEA. Além disto, é muito importante a interação entre o TNF- α e citocinas anti-inflamatórias, como a interleucina-10 (IL-10), para o equilíbrio entre processos neuroinflamatórios e mecanismos de neuroproteção, que foi demonstrado nos estudos de Maldonado (2020) onde, após tratamento feito com flavonoide fitoterápico ocorreu uma expressão relativa elevada da IL-10 e redução de TNF- α .

As evidências deste estudo relacionadas ao fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) demonstram consistência com outros achados, visto que, ao se tratar de faixa etária há relatos de níveis elevados dessa citocina em crianças com transtorno do espectro autista (TEA) com menos de cinco anos, especialmente naquelas com sintomas mais intensos ou comorbidades, como distúrbios gastrointestinais (ASHWOOD, 2023; ROSE et al., 2020). Trabalhos como os de Vargas et al. (2005) e Li et al. (2009) identificaram correlações significativas entre os níveis aumentados de TNF- α e a gravidade clínica do TEA, sugerindo que essa elevação, particularmente em crianças mais jovens, pode refletir uma resposta inflamatória exacerbada durante fases críticas do neurodesenvolvimento, contribuindo para o surgimento e a progressão dos sintomas da condição. No entanto, resultados contrários também foram observados, por exemplo, Goines *et al.* (2013) não encontraram diferenças estatisticamente significativas na expressão relativa do TNF- α entre crianças com TEA e controles, o que indica que o papel dessa citocina pode variar de acordo com o perfil da amostra ou subtipos específicos do transtorno. As diferenças apresentadas podem ser atribuídas a diferentes métodos entre os estudos, incluindo variações no tamanho amostral, no momento da coleta de dados e nas características clínicas das populações analisadas.

Contudo, em relação à expressão relativa do TNF- α quando não se envolveu administração ou intervenção medicamentosa como parte do protocolo de análise, Guiducci et al. (2022) observaram que, embora o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) seja um marcador relevante de inflamação e tenha sido incluído nas análises, os resultados não evidenciaram uma associação significativa entre seus níveis. Além disso, o estudo reforça que as citocinas desempenham um papel essencial tanto na resposta inflamatória quanto nos processos de neurodesenvolvimento, especialmente no transtorno do espectro autista (TEA). Corroborando com os estudos anteriores, outras citocininas demonstraram alterações nos níveis em crianças com TEA, destacando-se a redução de citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e IL-8. Também se evidenciou uma possível deficiência na regulação anti-inflamatória,

particularmente por meio da diminuição dos níveis de IL-10, o que pode favorecer uma resposta inflamatória exacerbada e prolongada, com possíveis impactos no desenvolvimento cerebral. Nesse sentido, embora o TNF- α tenha sido incluído no perfil imunológico dos participantes, não se verificaram alterações significativas nos seus níveis entre as crianças autistas avaliadas, sugerindo que sua participação na patogênese do TEA pode ser mais complexa ou heterogênea, conforme apontado também por Noori et al. (2024).

No GTEA 2, em que a população abrange pacientes com faixa etária maior, os resultados a respeito às análises direcionadas à comparação dos níveis de marcadores imunológicos periféricos, com ênfase em citocinas inflamatórias, tendem a ter um perfil diferente em relação as pacientes mais novos do GTEA 1. O TNF- α exerce papel central na mediação da resposta inflamatória e na modulação do sistema imunológico e, no que se refere especificamente à relação entre o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e o TEA em adolescentes, os resultados indicaram que indivíduos com autismo apresentaram níveis significativamente elevados dessa citocina em comparação ao grupo controle, evidenciando um estado pró-inflamatório (Ferencova *et al.*, 2023). Sua elevação no contexto do TEA sugere que a ativação de vias inflamatórias possa estar relacionada às alterações neurológicas e comportamentais características da condição, fortalecendo a hipótese de que processos inflamatórios sistêmicos desempenham um papel contributivo na fisiopatologia do transtorno níveis aumentados de TNF- α , líquido cefalorraquidiano (LCR) de pacientes com TEA em comparação com pacientes controle, sugerindo uma correlação entre os níveis de citocinas no soro e no LCR que contribuem para a fisiopatologia do TEA (Ferencova *et al.*, 2023; Than *et al.*, 2023).

CAPÍTULO 2 – Apresentação do artigo de revisão integrativa

A apresentação do artigo científico submetido, desenvolvido no formato de revisão integrativa, tem como finalidade alcançar o objetivo específico descrito na metodologia da pesquisa, atendendo aos critérios estabelecidos pelo regulamento da pós-graduação. Este artigo foi elaborado a partir do tema central da dissertação, que aborda a expressão da enzima MTHFR e suas implicações tanto em pacientes com Transtorno do Espectro Autista (TEA) quanto em outros distúrbios associados.

A construção do texto buscou integrar evidências científicas recentes, permitindo uma análise crítica e abrangente sobre os possíveis impactos das alterações na atividade dessa enzima em diferentes contextos clínicos, reforçando a relevância do tema para a área da saúde e para o avanço do conhecimento científico.

A influência do polimorfismo genético do gene MTHFR nos níveis de folato: revisão integrativa

Melina Gomes Borges^{1*} (0009-0007-8788-7810), Durval Batista Palhares (0000-0002-4300-6125)^{1,2}

¹ Programa em Saúde e Desenvolvimento do Centro-Oeste, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Faculdade de Medicina – FAMED, Campo Grande, Brasil.

² Laboratório de Patologia Molecular, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Faculdade de Medicina – FAMED, Campo Grande, Brasil.

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Faculdade de Medicina – FAMED, Campo Grande, Brasil. Cidade Universitária, Av. Costa e Silva - Pioneiros, MS, 79070-900.

Resumo

As mutações genéticas, definidas como alterações permanentes na sequência do DNA, desempenham papel essencial na evolução biológica e na adaptação dos organismos, mas também estão associadas a diversas doenças genéticas, incluindo o Transtorno do Espectro Autista (TEA). Esta revisão integrativa examina os polimorfismos no gene metilenotetrahydrofolato redutase (MTHFR), com foco nas variantes 677 C>T (Ala222Val) e 1298 A>C (Glu429Ala) e sua influência nos níveis de folato e homocisteína. Essas variantes reduzem a atividade enzimática, resultando em hiper-homocistemia e comprometimento do metabolismo do folato, o que está associado a doenças cardiovasculares, distúrbios neurodegenerativos, diabetes, complicações reprodutivas e alterações no desenvolvimento neurológico. A revisão utilizou as bases de dados PubMed e Biblioteca Virtual em Saúde (BVS), abrangendo artigos publicados em inglês entre 2016 e 2024 sobre polimorfismos do gene MTHFR e suas implicações clínicas. Dos 81 estudos inicialmente identificados, 16 atenderam aos critérios de inclusão e foram analisados. Os achados destacam associações entre os polimorfismos do MTHFR e condições como susceptibilidade ao câncer, infertilidade, modificações epigenéticas, TEA, depressão e catarata relacionada à idade. Evidências emergentes sugerem que os efeitos desses polimorfismos vão além das alterações em um único gene, influenciando redes metabólicas e epigenéticas mais amplas. Esses resultados reforçam a importância clínica dos polimorfismos MTHFR como potenciais biomarcadores para estratificação de risco e intervenções personalizadas. Compreender os impactos fenotípicos e o potencial terapêutico relacionados à via folato-homocisteína é essencial para o avanço da medicina de precisão e a melhoria dos desfechos em saúde.

Palavra-chave: Folato, MTHFR, Polimorfismo genético, doenças.

*Autora correspondente: Melina G. Borges, e-mail: melina.gbbio@gmail.com

Introdução

Mutações genéticas são alterações permanentes na sequência de nucleotídeos do DNA, que podem ocorrer de forma espontânea ou induzida por agentes mutagênicos. Essas alterações genômicas desempenham um papel central na evolução biológica, proporcionando a variabilidade genética necessária para a adaptação e sobrevivência das espécies. No entanto, mutações também podem ser a base de uma ampla gama de doenças genéticas e cânceres, impactando profundamente a saúde humana e, comumente são detectadas variações nos genes chamados de polimorfismos. ⁽¹⁾ Polimorfismo genético refere-se à ocorrência de duas ou mais variantes (alelos) de um gene em uma população, onde a frequência do alelo mais raro é superior a 1%. Essas variações genéticas são responsáveis pela diversidade fenotípica observada entre os indivíduos de uma espécie. Polimorfismos podem se manifestar em diferentes formas, incluindo variações na sequência de nucleotídeos, inserções, deleções e duplicações de segmentos de DNA. ⁽²⁾

O gene humano MTHFR está localizado no cromossoma 1p36.3 com um comprimento total de 1.980 pb e em cada pessoa há duas cópias de determinados genes. Neste gene em questão há os possíveis genótipos das variantes: 677 são CC (homozigoto selvagem), CT (heterozigoto) e (homozigoto) TT. A variante mais comum no gene MTHFR é chamada MTHFR 677 C > T. ⁽³⁾ Outra mutação genética comum é a variante MTHFR 1298 A > C, que ocorre na posição 1298 no gene, ou seja, na posição 1298 no gene a base nitrogenada de DNA esperada "A", adenina, é substituída por "C", citosina. A 5,10-metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) é uma enzima central no ciclo do folato, desempenhando um papel crítico no metabolismo de um carbono ao catalisar a conversão irreversível de 5,10-metilenotetrahidrofolato em 5-metiltetrahidrofolato, uma forma predominante de folato circulante utilizado na remetilação da homocisteína. As associações destas variações, C677T (Ala222Val) e A1298C (Glu429Ala), estão associadas a uma redução na atividade enzimática e as modificações na distribuição intracelular de folato, com potenciais implicações clínicas significativas. ⁽⁴⁾

Indivíduos homozigotos para essas variantes exibem uma redução significativa na atividade da MTHFR, o que pode comprometer a eficiência do ciclo do folato e aumentar os níveis de homocisteína ⁽⁵⁾ e, têm sido associados a um risco aumentado de doenças cardiovasculares ⁽⁶⁾, neurodegenerativas ⁽⁷⁾, diabetes ⁽⁸⁾, tumor ⁽⁹⁾ e complicações na gravidez ⁽¹⁰⁾, tornando-se um foco crítico de pesquisa biomédica ⁽¹¹⁾. Desse modo, explorar a diversidade e os impactos das mutações genéticas, delineando os mecanismos subjacentes à sua ocorrência e as consequências fenotípicas resultantes sob a influência do polimorfismo genético na expressão do gene MTHFR nos níveis de folato e suas consequências, é o que se objetiva nesta revisão.

Métodos

A elaboração desta revisão integrativa se baseou nas seguintes etapas metodológicas: definição da pergunta e dos objetivos da revisão, estabelecimento dos critérios de inclusão e exclusão dos artigos, delimitação das informações a serem extraídas dos textos selecionados, e análise dos resultados seguida de discussão. A questão central que guiou esta revisão foi: qual é a influência dos polimorfismos do gene *MTHFR* nos níveis de homocisteína?

Estratégia de pesquisa

Para a seleção dos textos, foram utilizadas as seguintes bases de dados pubmed e BVS. O uso dessas bases de dados visou minimizar os possíveis vieses no processo de elaboração da revisão integrativa.

A presente busca foi realizada entre julho e setembro de 2024 por meio de acesso online, adotando critérios de exclusão que desconsideraram artigos de revisão e trabalhos publicados em outros idiomas, bem como outras mutações relacionadas ao gene. Foram incluídos, nesta revisão integrativa, artigos publicados em inglês entre 2016 e 2024, com resumos disponíveis nas bases de dados selecionados, que abordam os polimorfismos 677 C > T e 1298 A > C do gene metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR). Os descritores utilizados, conforme disponíveis no DeCS/MeSH, foram: “folate AND polymorphic mutation”, “genetic mutation methylenetetrahydrofolate reductase AND autism OR schizophrenia OR central nervous system”.

Resultados

Características do estudo

A análise dos artigos selecionados evidenciou diferentes abordagens em relação ao objetivo de investigar as associações dos polimorfismos do gene MTHFR. As principais conexões relacionadas incluem:

câncer, transtorno do espectro autista, fertilidade e gravidez, fatores nutricionais e epigenéticos, depressão, acidente vascular cerebral e catarata senil.

Foram encontrados como resultado 81 artigos científicos, entre os quais 16 estavam de acordo com o objetivo do tema, na BVS foram encontrados resultados duplicados, que não foram contabilizados. Para a coleta de dados dos artigos que foram incluídos na revisão integrativa, foi desenvolvido um quadro sinóptico (tabela 1) com a síntese dos artigos que atenderam aos critérios de inclusão.

Os polimorfismos estudados foram o MTHFR 677 C > T (variável mais comum), MTHFR 1298 A > C (outra variável comum), ambos relacionados a hiper-homocitemia.

Table 1: Estudos sobre as consequências fenotípicas resultantes da influência do polimorfismo genético na expressão do gene MTHFR sobre os níveis de homocisteína.

Cancer		
Study	Sample Size	Association with polymorfism
1 Chang et al., (2020)	32 pacientes e 21,8% eram portadores do genótipo d tipo selvagem (CC), 46,9% eram portadores do genótipo variante heterozigótico (CT) e 31,3% eram portadores do genótipo variante homozigótico (TT).	MTHFR 677 C>T – risco de toxicidade relacionada ao metotrexato em doses elevadas em doentes com linfoma difuso de grandes células B do sistema nervoso central primário

2	Diakite et al., (2023)	100 participantes, apenas 5% apresentaram o polimorfismo 677 CT.	MTHFR 677 C>T – Risco de câncer de mama
3	Elens et al., (2021)	31 pacientes totais sendo 16,12% CC, 38,72% AC e 45,16% AA.	MTHFR 1298 A>C – associação do polimorfismo e os níveis de biomarcadores neurotóxicos e o desempenho cognitivo.
4	Wu et al., (2021)	439 amostras, n = 389 com tumor e n = 50 controle.	MTHFR (677 C>T e 1298 A>C) – carcinoma hepatocelular

Autism spectrum disorder

	Study	Sample Size	Association with polymorphism
1	Ismail et al., (2023)	78 pacientes com autismo e 80 controles saudáveis, totalizando 158 participantes. 41 pacientes com TEA apresentaram serem portadores dos polimorfismos.	MTHFR 677 C>T – Pacientes com transtorno do espectro autista.
2	Noa; Golan, (2019)	105 indivíduos os efeitos dos genótipos maternos (WT e MTHFR+/-) e dos filhotes (WT e MTHFR+/-).	MTHFR 677 C>T – desenvolvimento de comportamentos associados ao transtorno do espectro autista (TEA) em um modelo de camundongo.
3	Orenbuch et al., (2019)	95 camundongos distribuídos em grupos que combinavam dieta (control diet - CD e prenatal plus - PP) e genótipo (wild-type - Wt e heterozygote - Het), sendo Wt-Wt-CD (12 camundongos), Wt-Het-CD (13 camundongos), Het-Het-CD (10 camundongos), Wt-Het-PP (11 camundongos), Het-Het-PP (46 camundongos), Wt-Het-PN (13 camundongos), Het-Het-PN (8 camundongos), e Wt-Het-PN (7 camundongos).	MTHFR 677 C>T – risco de transtornos do espectro autista (TEA).

Fertility/pregnancy

Study	Sample Size	Association with polymorfism
1 Ménézo et al., (2021)	2.970 pacientes foram testados para as duas mutações: 1.588 mulher e 1262 homem.	MTHFR (677 C > T e 1298 A > C) – infertilidade, bem como os níveis de homocisteína.
4 Wu et al., (2021)	439 amostras, n = 389 com tumor e n = 50 controle.	MTHFR (677 C>T e 1298 A>C) – carcinoma hepatocelular

Autism spectrum disorder

Study	Sample Size	Association with polymorfism
1 Ismail et al., (2023)	78 pacientes com autismo e 80 controles saudáveis, totalizando 158 participantes. 41 pacientes com TEA apresentaram serem portadores dos polimorfismos.	MTHFR 677 C>T – Pacientes com transtorno do espectro autista.
2 Noa; Golan, (2019)	105 indivíduos os efeitos dos genótipos maternos (WT e MTHFR+/-) e dos filhotes (WT e MTHFR+/-).	MTHFR 677 C>T – desenvolvimento de comportamentos associados ao transtorno do espectro autista (TEA) em um modelo de camundongo.
3 Orenbuch et al., (2019)	95 camundongos distribuídos em grupos que combinavam dieta (control diet - CD e prenatal plus - PP) e genótipo (wild-type - Wt e heterozygote - Het), sendo Wt-Wt-CD (12 camundongos), Wt-Het-CD (13 camundongos), Het-Het-CD (10 camundongos), Wt-Het-PP (11 camundongos), Het-Het-PP (46 camundongos), Wt-	MTHFR 677 C>T – risco de transtornos do espectro autista (TEA).

Het-PN (13 camundongos), Het-Het-PN (8 camundongos), e Wt-Het-PN (7 camundongos).

Fertility/pregnancy		
Study	Sample Size	Association with polymorfism
1 Ménézo et al., (2021)	2.970 pacientes foram testados para as duas mutações: 1.588 mulher e 1262 homem.	MTHFR (677 C > T e 1298 A > C) – infertilidade, bem como os níveis de homocisteína.
2 Ota et al., (2020)	837 mulheres com perdas recorrentes de gravidez (RPL).	MTHFR 677 C>T – níveis de vitamina D, níveis de homocisteína e citotoxicidade das células natural killer (NK).
3 Ye et al., (2022)	692 mulheres que estavam se submetendo a fertilização in vitro (IVF) ou injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) - transferência de embriões (ET) e que estavam recebendo suplementação adequada de ácido fólico.	MTHFR 677 C > T – gravidez em mulheres submetidas a IVF/ICSI-ET com suplementação adequada de ácido fólico.
Nutritional and epigenetic factors		
Study	Sample Size	Association with polymorfism
1 Amenyah et al., (2020)	80 participantes, divididos em dois grupos: 39 participantes com o genótipo MTHFR 677 TT e 41 participantes com o genótipo CC. Durante a fase de intervenção, todos os participantes foram submetidos a uma suplementação de riboflavina ou placebo por 16 semanas.	MTHFR 677 C > T – o impacto da riboflavina na metilação global do DNA em indivíduos com os genótipos 677 CC e 677 TT.
2 Bošković et al., (2024)	102 mulheres grávidas. As participantes foram selecionadas aleatoriamente entre aquelas que estavam realizando exames de rotina na clínica de maternidade durante o período de gestação entre 24 e 28 semanas.	MTHFR (677 C>T e 1298 A>C) – relacionados aos níveis de homocisteína, folato e vitamina B12 em mulheres grávidas.

Depression		
Study	Sample Size	Association with polymorfism
1 Dartois et al., (2019)	10 pacientes adolescentes que apresentaram depressão resistente ao tratamento. 80% dos pacientes apresentaram uma mutação entre as variantes do gene MTHFR avaliadas, com 50% apresentando a variante 1298 AC e 30% a variante 677 CT.	MTHFR 677 C>T – depressão resistente
2 Jha et al., (2016)	1 paciente com o polimorfismo 677 C>T.	MTHFR 677 C > T – síntese de nucleotídeos e a metilação do DNA, levando a uma baixa biodisponibilidade de folato e, conseqüentemente, a um metabolismo prejudicado dos neurotransmissores catecolaminérgicos.
Cerebral vascular accident		
Study	Sample Size	Association with polymorfism
1 Li et al., (2023)	258 pacientes com hiper-homocisteinemia (HHcy), classificados em dois grupos: o grupo "Eficaz" = redução satisfatória nos níveis de homocisteína, e o grupo "Inválido" = sem resposta adequada ao tratamento. 83,3% dos pacientes apresentavam o genótipo TT, enquanto no Grupo Eficaz, apenas 46,9% tinham esse genótipo, com maior prevalência dos genótipos CC e CT.	MTHFR 677 C>T - eficácia do tratamento com ácido fólico, vitamina B6 e B12 na redução dos níveis de homocisteína em pacientes com acidente vascular cerebral (AVC) e hiper-homocisteinemia (HHcy).
Senile Cataract		
Study	Sample Size	Association with polymorfism

1	Luo et al., (2023)	1.309 indivíduos, sendo 663 pacientes com catarata senil no grupo de observação, que apresentou 153 = CC, 347 = CT, 163 = CT e 646 indivíduos saudáveis no grupo de controle, sendo 104 = CC, 303 = CT e 239 = TT.	MTHFR 677 C>T – catarata senil e níveis de homocisteína (HCY), ácido fólico (FOL) e vitamina B12 (VitB12),
---	-----------------------	--	--

A redução da expressão do MTHFR auxilia a defesa celular contra a segregação cromossômica e a incorporação inadequada de uracila no DNA induzidas pela depleção de folato

O estudo incluiu 389 pacientes com tumor e 50 pacientes do grupo controle, e foi estruturado em grupos experimentais baseados em diferentes condições nas células HepG2. O grupo de Controle (WT) consistiu em células com expressão normal do MTHFR, enquanto o grupo de Inibição do MTHFR (shMTHFR) foi criado utilizando um vetor lentiviral para silenciar a expressão do gene MTHFR, com o clone sh77, que resultou em uma redução de 63% na expressão do mRNA do MTHFR. Além disso, os grupos foram subdivididos conforme as condições de folato: condições adequadas de folato e depleção de folato, permitindo a análise dos efeitos da inibição do MTHFR em diferentes níveis de folato no ambiente celular. Os resultados do estudo indicam uma forte associação entre a expressão do gene MTHFR, a atividade enzimática e o ciclo celular nas células HepG2, com destaque para os seguintes achados: Associação entre MTHFR e Ciclo Celular - Foi observada uma correlação inversa significativa entre a expressão do gene MTHFR e a acumulação de células na fase G2/M do ciclo celular, com coeficiente de correlação (r) de $-0,81$ e $p < 0,0001$. A expressão da proteína MTHFR também apresentou correlação inversa com a acumulação de células no G2/M ($r = -0,8$; $p = 0,01$), assim como a atividade enzimática ($r = -0,842$; $p = 0,005$). Análise Estatística - A análise de variância (ANOVA) de uma via revelou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p < 0,05$). A análise de correlação mostrou que a expressão do mRNA do MTHFR teve correlação positiva com a fase G1 ($r = 0,86$; $p < 0,0001$) e negativa com G2/M ($r = -0,810$; $p < 0,0001$). Depleção de Folato - A depleção de folato aumentou modestamente a proporção de células no G2/M nas células WT e Neg, mas não nas células shMTHFR, sugerindo que a inibição do MTHFR pode modular a resposta das células ao estresse causado pela depleção de folato. Esses resultados são cruciais para entender como a expressão do MTHFR influencia o ciclo celular e a resposta das células HepG2 a condições de folato ⁽¹²⁾.

Ausência de associação entre o polimorfismo C677T da metilenotetrahidrofolato redutase e o risco de câncer de mama no Mali

O estudo recrutou 127 pacientes com câncer de mama, sendo a maioria (121 casos) diagnosticada com carcinoma ductal invasivo (IDC) e para o grupo controle foram recrutadas

160 mulheres que não apresentaram histórico de câncer ou doença crônica. A média de idade das pacientes foi de 43,30 anos, enquanto os controles saudáveis tinham uma média de 41,2 anos. A análise da distribuição genotípica do polimorfismo C677T no gene MTHFR revelou que, no grupo de pacientes com câncer de mama, 88,2% apresentaram o genótipo CC (wild type), 11,0% o genótipo CT (heterozigoto) e 0,8% o genótipo TT (homozigoto mutante). No grupo controle, as frequências foram semelhantes, com 90,6% para CC, 8,8% para CT e 0,6% para TT. Essas proporções indicam uma distribuição genotípica predominantemente do tipo selvagem em ambos os grupos. Apenas 5 pacientes (5%) apresentaram a variante T do polimorfismo 677 C>T do MTHFR, tanto entre as mulheres com câncer de mama quanto entre os controles saudáveis. Essa frequência foi considerada muito baixa. Não foi observada correlação significativa entre o polimorfismo 677 C>T do MTHFR e as características clínico patológicas dos pacientes com câncer de mama ($p > 0,05$) ⁽¹³⁾.

Influência do polimorfismo MTHFR C677T na toxicidade relacionada ao uso de altas doses de metotrexato em pacientes com linfoma difuso de grandes células B do sistema nervoso central primário

Os participantes do estudo foram categorizados com base no genótipo do polimorfismo C677T no gene da metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR). Essa divisão resultou em três grupos genotípicos: Genótipo Selvagem (CC), representando indivíduos com o padrão genético considerado normal; Genótipo Heterozigoto (CT), caracterizado por uma cópia do alelo selvagem (C) e uma do alelo variante (T); e Genótipo Homozigoto Variante (TT), composto por indivíduos com duas cópias do alelo variante (T). Os resultados demonstraram que o polimorfismo MTHFR C677T está associado a um aumento significativo nas toxicidades relacionadas ao uso de altas doses de metotrexato. Pacientes com o genótipo homozigoto variante (TT) apresentaram maior risco de nefrotoxicidade em relação aos genótipos selvagem (CC) (OR 13.08; $P = 0.002$) e heterozigoto (CT) (OR 8.43; $P < 0.001$). O risco de hepatotoxicidade também foi mais elevado no genótipo TT comparado ao CC (OR 9.33; $P < 0.001$). Para toxicidade hematológica, o genótipo TT apresentou risco aumentado frente ao CC (OR 3.09; $P = 0.024$), mas sem diferenças significativas em relação ao CT. Além disso, a anemia foi mais prevalente no grupo TT, enquanto mucosite oral e diarreia não mostraram variação significativa entre os genótipos. Esses achados evidenciam o impacto clínico do genótipo TT, especialmente no aumento de nefrotoxicidade, hepatotoxicidade e anemia. A administração de leucovorina, iniciada 24 horas após a infusão de MTX, mostrou-se eficaz na redução da

toxicidade. No total, os pacientes realizaram 148 ciclos de tratamento (média de 5 ciclos por paciente), com atraso na depuração do MTX em 35,8% dos ciclos, fator potencialmente implicado na toxicidade observada ⁽¹⁴⁾.

Polimorfismos A1298C da metilenotetrahidrofolato redutase influenciam as sequelas na vida adulta de sobreviventes de leucemia infantil tratados com quimioterapia

O estudo, 31 sobreviventes de leucemia infantil foram recrutados, e entre eles, as variantes do polimorfismo MTHFR A1298C foram distribuídas da seguinte forma: genótipo AA: 10 pacientes; genótipo AC: 15 pacientes; e genótipo CC: 6 pacientes. Os resultados apresentados no artigo incluem várias descobertas significativas relacionadas ao polimorfismo MTHFR 1298 A>C e seus efeitos em sobreviventes de leucemia infantil. Os níveis de biomarcadores do líquido cefalorraquidiano (CSF) Tau e pTau foram significativamente influenciados pelo genótipo MTHFR. Os portadores do genótipo MTHFR 1298 CC apresentaram os níveis mais altos de CSF Tau, enquanto os heterozigotos MTHFR 1298 A>C mostraram uma resposta intermediária. Os portadores do genótipo MTHFR 1298 AA apresentaram os níveis mais baixos. A administração de ácido folínico reduziu os níveis elevados de CSF Tau em indivíduos com o genótipo MTHFR 1298 CC, indicando que a suplementação pode atenuar a toxicidade associada ao tratamento com metotrexato. O genótipo MTHFR teve uma correlação significativa com o Quociente de Inteligência de Desempenho (PIQ) na idade adulta, sugerindo que as variantes genéticas podem influenciar o desempenho cognitivo a longo prazo. O estudo também encontrou associações entre o genótipo MTHFR e medidas de conectividade cerebral, como a conectividade entre a rede de modo padrão (DMN) e o giro temporal inferior (ITG), além de medidas de anisotropia fracionada (FA) e índice de dispersão de orientação (ODI) ⁽¹⁵⁾.

Transtorno do Espectro Autista

Estudo da variante C677T do gene metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) em crianças egípcias com Transtorno do Espectro Autista (TEA)

O estudo comparou dois grupos: Pacientes com TEA, composto por 78 indivíduos diagnosticados com transtorno do espectro autista (média de idade de 4,6 anos; proporção de 5:1 entre homens e mulheres), selecionados do Departamento de Genética Clínica, e Controles Saudáveis, formado por 80 indivíduos saudáveis, pareados por idade e gênero com os pacientes

com TEA. A análise focou na frequência dos genótipos do polimorfismo MTHFR C677T para investigar sua associação com o risco de autismo. A análise revelou que 23,1% dos casos tinham consanguinidade e 34,6% apresentavam histórico familiar de doenças psiquiátricas. Os genótipos CT e TT do polimorfismo C677T do gene MTHFR foram encontrados em uma frequência significativamente maior entre os pacientes com autismo em comparação com os controles saudáveis. Especificamente, 52,6% dos pacientes com autismo apresentaram os genótipos CT + TT, em comparação com 25% dos controles. Os genótipos CT + TT foram mais distribuídos entre pacientes com consanguinidade e histórico familiar de doenças psicológicas. Além disso, uma maior distribuição do genótipo heterozigoto CT e do genótipo combinado CT + TT foi observada em pacientes com distúrbios gastrointestinais e de sono. A análise de regressão linear não encontrou associação significativa entre os genótipos do MTHFR e a severidade do comportamento autista, conforme avaliado pela Childhood Autism Rating Scale (CARS) ⁽⁷⁾.

A intervenção nutricional pré-natal reduz os índices de comportamentos semelhantes ao autismo em camundongos com deficiência de MTHFR

O estudo examinou 95 camundongos distribuídos em grupos que combinavam dieta (control diet - CD e prenatal plus - PP) e genótipo (wild-type - Wt e heterozygote - Het), sendo Wt-Wt-CD (12 camundongos), Wt-Het-CD (13 camundongos), Het-Het-CD (10 camundongos), Wt-Het-PP (11 camundongos), Het-Het-PP (46 camundongos), Wt-Het-PN (13 camundongos), Het-Het-PN (8 camundongos), e Wt-Het-PN (7 camundongos). Essa organização permitiu avaliar como a interação entre genótipo e dieta influencia nos comportamentos semelhantes ao autismo. Resultados estatísticos apontaram uma associação significativa entre a deficiência do gene Mthfr, a dieta e comportamentos sintomáticos. No Teste Qui-Quadrado, foi observada uma variação significativa na frequência de camundongos sintomáticos entre os grupos ($p < 0,001$). O Odds Ratio (OR) mostrou que a dieta enriquecida (PP) em descendentes de mães Mthfr+/- reduziu o comportamento semelhante ao autismo em comparação à dieta controle (CD) (OR = 0,18; IC 95%: 0,035–0,970), evidenciando um efeito protetor. Por fim, a ANOVA revelou diferenças nos níveis de metionina no córtex cerebral entre os grupos (ANOVA $F_{4,44} = 3,3$; $p < 0,02$). Esses resultados destacam o papel crítico da deficiência de Mthfr e da intervenção nutricional na modulação de comportamentos semelhantes ao autismo, sugerindo que a dieta enriquecida pode oferecer benefícios protetores significativos ⁽¹⁶⁾.

Os genótipos maternos e da prole da metilenotetrahidrofolato redutase interagem em um modelo murino para induzir comportamentos semelhantes ao Transtorno do Espectro Autista (TEA)

O estudo investigou em um grupo de 105 indivíduos os efeitos dos genótipos maternos (WT e MTHFR+/-) e dos filhotes (WT e MTHFR+/-) em aspectos comportamentais e do desenvolvimento físico, analisando interações genéticas e sexuais em modelos de camundongos. Os grupos foram organizados em combinações genotípicas (WT:WT, HT:WT, HT:HT) para explorar como essas variações influenciam comportamentos semelhantes ao autismo. Em relação ao comportamento social, a duração das interações sociais foi influenciada significativamente por fatores como o sexo, genótipo materno e genótipo do filhote: Sexo - $F(1,27) = 5.23$, $P = 0.03$; Genótipo materno - $F(1,27) = 11.01$, $P = 0.003$; Genótipo do filhote - $F(1,27) = 10.84$, $P = 0.003$. Interações significativas foram observadas entre sexo e genótipo materno ($F(1,27) = 7.72$, $P = 0.01$) e Sexo e genótipo do filhote ($F(1,27) = 5.07$, $P = 0.033$). Os machos MTHFR+/- apresentaram maior interação social, enquanto as fêmeas mostraram comportamentos consistentes independentemente do genótipo. Sobre os indicadores de ansiedade, como a exploração do centro da arena aberta, revelaram que a frequência de entrada no centro foi $F(1,73) = 8.21$, $P = 0.006$ e a distância percorrida no centro foi $F(1,73) = 5.74$, $P = 0.019$. Fêmeas MTHFR+/- apresentaram menor exploração no centro ($F(1,35) = 5.54$, $P = 0.025$), sugerindo maior ansiedade. No aspecto do desenvolvimento físico, os filhotes de mães MTHFR+/- mostraram atrasos significativos no desenvolvimento físico (ex.: abertura de pálpebras, canal auditivo, crescimento de pelos e dentes), reforçando a associação entre genótipo materno e progressão morfogenética. Especificamente sobre comportamentos relacionados ao autismo, como déficits em memória, ansiedade e comportamentos repetitivos foram mais pronunciados em camundongos MTHFR+/-, especialmente influenciados pelo genótipo materno. E nos testes sociais, como residente-intruso, mostraram diferenças significativas no comportamento agressivo e interações sociais, apresentando agressão social $F(1,32) = 5.36$, $P = 0.027$. Os resultados destacam o impacto combinado do genótipo materno e do filhote, bem como do sexo, em parâmetros comportamentais e físicos relacionados ao autismo. Intervenções que considerem essas interações genéticas podem ser promissoras para compreender e mitigar características associadas a transtornos do espectro autista ⁽¹⁷⁾.

Fertilidade/gravidez

Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) do gene MTHFR (metilenotetrahidrofolato redutase: EC 1.5.1.20) e homocisteína em pacientes encaminhados para investigação de fertilidade

O estudo, que incluiu 2.614 pacientes, investigou os polimorfismos do gene MTHFR (677 C>T e 1298 A>C) e sua relação com níveis de homocisteína, além de potenciais riscos à saúde, como infertilidade. Os participantes foram classificados com base no gênero, status genético e níveis de homocisteína, revelando interações significativas entre esses fatores. Em relação a prevalência de polimorfismo do MTHFR, apenas 15% da população apresentou o genótipo selvagem (tipo selvagem) para ambos os SNPs, mais de 40% dos pacientes eram homozigotos para um SNP ou heterozigotos compostos. Entre os genótipos, 1.277 pacientes (49%) apresentavam a variante 677 C>T, incluindo: 11,4% homozigotos para 677 TT, 19,4% heterozigotos compostos para 677CT/1298AC; 24% heterozigotos para 677 CT/1298 AA; 19,3% heterozigotos para 677 CC/1298 AC. A respeito dos níveis de homocisteína 46,6% dos pacientes tinham níveis elevados (>10 µmoles/L), com maior prevalência entre homens (72,8%) do que mulheres (23,5%); 9,9% apresentaram níveis críticos (>15 µmoles/L), associados principalmente ao SNP 677 CT; 42,6% dos homozigotos 677 TT/1298 AA e 26,4% dos heterozigotos compostos 677 CT/1298 AC apresentaram homocisteinemia elevada. A homocisteinemia elevada e os polimorfismos MTHFR foram fortemente associados a problemas de infertilidade, sugerindo implicações para a saúde reprodutiva e geral. Os SNPs mostraram maior impacto nos níveis de homocisteína em homens, indicando uma possível diferença na expressão ou influência genética entre os sexos ⁽¹⁸⁾.

Efeitos do polimorfismo MTHFR C677T sobre a vitamina D, a homocisteína e a citotoxicidade das células natural killer em mulheres com perdas gestacionais recorrentes

O estudo avaliou 837 mulheres com perdas recorrentes de gravidez (RPL), classificadas em grupos genotípicos do polimorfismo MTHFR 677 C>T (CC, CT e TT). A pesquisa buscou relacionar características clínicas, bioquímicas e imunológicas com os genótipos, destacando os níveis de homocisteína, vitamina D e a citotoxicidade das células natural killer (NK). A frequência do genótipo TT foi de 10,7%, similar à média da população norte-americana (11,9%). O genótipo TT foi associado a um aumento significativo na probabilidade de hiper-

homocisteinemia, conforme análise de regressão logística multivariada. Os níveis de homocisteína (tHCY) e vitamina D (25(OH)VD) foram correlacionados (coeficiente de Pearson), mas os valores específicos não foram detalhados. As comparações entre os grupos genotípicos foram realizadas via ANOVA, seguida de correção de Bonferroni. Apesar de indicar diferenças significativas, os dados numéricos não foram fornecidos. Os resultados sugerem que o polimorfismo MTHFR 677 C>T, especialmente o genótipo TT, está relacionado à hiperhomocisteinemia e pode impactar negativamente a função imunológica em mulheres com RPL. Isso ressalta a importância de investigar mecanismos bioquímicos e imunológicos na relação entre genótipo e perdas gestacionais ⁽¹⁰⁾.

Associação do polimorfismo MTHFR 677C>T com os desfechos gestacionais em receptoras de FIV/ICSI-ET com suplementação adequada de ácido fólico sintético

O estudo investigou a associação entre o polimorfismo MTHFR 677 C>T e os desfechos de gravidez em 692 mulheres (22–49 anos, IMC: 16,02–32,66 kg/m²). As frequências genotípicas foram: CC (45,66%), CT (32,66%) e TT (21,68%). Análises utilizando modelos aditivo, dominante e recessivo não demonstraram associação significativa entre o polimorfismo e a taxa ou os desfechos de gravidez, incluindo gravidez clínica (n=349), química (n=36) e partos prematuros (n=273), mesmo após ajustes para idade e IMC. Por outro lado, fatores demográficos tiveram papel relevante: a idade mostrou forte influência negativa na taxa de gravidez (OR = 0,91, IC 95% = 0,88–0,94, P < 0,001) e nos desfechos (OR = 0,92, IC 95% = 0,86–0,98, P = 0,01), enquanto o IMC também apresentou impacto significativo nos desfechos (OR = 0,95, IC 95% = 0,90–0,997, P = 0,04). Embora amplamente estudado em outros contextos, o polimorfismo MTHFR 677 C>T não demonstrou relevância clínica em desfechos de gravidez neste grupo, sugerindo que fatores como idade e IMC desempenham papel mais determinante ⁽¹⁹⁾.

Fatores nutricionais e epigenéticos

A suplementação com riboflavina altera a metilação global e gênica específica do DNA em adultos com o genótipo MTHFR 677 TT

A suplementação de riboflavina demonstrou reduzir significativamente a metilação global do DNA em indivíduos com o genótipo MTHFR 677 TT por meio da avaliação do impacto dessa

suplementação em 60 adultos com o referido genótipo, comparando-os a um grupo placebo. Os resultados indicaram associações relevantes entre o polimorfismo MTHFR 677 C>T, a metilação do DNA e os níveis de homocisteína. Indivíduos com o genótipo TT apresentaram metilação global do DNA (medida por LINE-1) 1,6% maior em comparação com o genótipo CC ($p = 0,011$). Foi detectada hipermetilação significativa na região sul do gene MTHFR no grupo TT, com um aumento de 4,85% ($p < 0,001$). Em contrapartida, as regiões norte e a ilha CpG não mostraram diferenças significativas. Participantes com o genótipo TT apresentaram níveis de homocisteína significativamente mais elevados (13,8 $\mu\text{mol/L}$) em relação ao grupo CC (10,6 $\mu\text{mol/L}$, $p = 0,002$). A homocisteína é reconhecida como um marcador crítico para a saúde cardiovascular. O genótipo MTHFR 677 C>T está associado a alterações na metilação global e regional do DNA, além de níveis aumentados de homocisteína. Essas características podem impactar a saúde metabólica e o risco cardiovascular, destacando o potencial da suplementação de riboflavina como uma abordagem terapêutica personalizada para indivíduos com o genótipo TT ⁽²⁰⁾.

Associação do polimorfismo MTHFR, ácido fólico e vitamina B12 com os níveis séricos de homocisteína em gestantes

O estudo incluiu 102 gestantes, com idades variando entre 19 e 43 anos. Desses participantes, 33 (32,4%) apresentaram níveis de homocisteína abaixo do valor de referência. A distribuição dos genótipos foi a seguinte: 43,1% wild type (CC), 47,1% heterozigotos (CT) e 9,8% homozigotos (TT) para o polimorfismo 677 C>T; e 10,8% wild type (AA), 40,2% heterozigotos (AC) e 49,0% homozigotos (CC) para o polimorfismo 1298 A>C. Surpreendentemente, não foi observada uma associação significativa entre os polimorfismos do gene MTHFR e os níveis de homocisteína sérica, o que pode ser atribuído ao efeito modulador da suplementação de ácido fólico e vitamina B12 nas gestantes, que pode atenuar os impactos das mutações genéticas. Embora não tenha sido encontrada diferença significativa nos níveis de homocisteína entre os diferentes genótipos ($P > 0,05$), observou-se uma correlação negativa significativa entre os níveis de homocisteína e as concentrações de vitamina B12 ($P = 0.003$) e ácido fólico ($P < 0.001$) no genótipo wild type de A1298C. Para os heterozigotos do polimorfismo 1298 A>C, essa correlação foi ainda mais forte, sugerindo que a suplementação de ácido fólico e vitamina B12 pode ser uma estratégia eficaz para controlar os níveis de homocisteína durante a gestação, beneficiando a saúde materna e fetal ⁽²¹⁾.

Depressão

Suplementação com L-metilfolato associada a antidepressivos em adolescentes com depressão resistente ao tratamento: uma série de casos

O estudo envolveu 10 adolescentes com uma média de idade de 14,4 anos, sendo 80% do sexo feminino e 90% brancos. A maioria dos pacientes tinha em média três diagnósticos psiquiátricos comorbidos, sendo os mais comuns: transtorno de ansiedade generalizada (100%), transtorno depressivo maior (80%) e transtorno de ansiedade social (20%). Todos os pacientes falharam em três tratamentos com medicamentos psicotrópicos antes de iniciar o LM. Destes, 80% dos pacientes apresentaram uma mutação entre as variantes do gene MTHFR avaliadas, com 50% apresentando a variante 1298 AC e 30% a variante 677 CT, indicando atividade reduzida da MTHFR. Após a adição do LM ao tratamento, 80% dos pacientes mostraram melhora nos sintomas de depressão, ansiedade e irritabilidade. A redução média na pontuação do PHQ-9 foi de 8,5 pontos após três meses de tratamento, com 67,9% dos pacientes respondendo ao tratamento (definido como uma redução de 50% ou mais na pontuação inicial do PHQ-9) e 45,7% alcançando remissão (pontuação do PHQ-9 abaixo de 5) após 90 dias. A qualidade de vida dos pacientes também melhorou significativamente, com a proporção de pacientes que relataram que os sintomas depressivos tornavam a vida "muito ou extremamente difícil" para funcionar, diminuindo de 50% para 13%. Mais de 90% dos pacientes relataram que tomaram quase todas as doses de LM, indicando alta adesão e satisfação com o tratamento. O LM foi bem tolerado, e os pacientes iniciaram o tratamento em doses de 3,75 a 7,5 mg. Esses resultados sugerem que o LM pode ser uma estratégia segura e eficaz para o manejo da depressão resistente ao tratamento em adolescentes, especialmente aqueles com mutações no gene MTHFR ⁽²²⁾.

Eficácia da terapia adjuvante com L-metilfolato em uma doença psiquiátrica complexa com polimorfismo genético MTHFR C677T

O paciente com o polimorfismo MTHFR apresentou uma resposta positiva ao L-Metilfolato em combinação com medicamentos psicotrópicos, sugerindo um potencial benefício dessa abordagem em casos de depressão resistente ao tratamento. O artigo menciona que o polimorfismo MTHFR C677T está associado a várias condições psiquiátricas, como depressão, esquizofrenia e transtorno bipolar, e discute a possibilidade de que esse polimorfismo possa afetar o metabolismo dos neurotransmissores. O estudo conclui que mais pesquisas são

necessárias para avaliar a eficácia a longo prazo do L-Metilfolato em pacientes com esse polimorfismo e para entender melhor a relação entre o polimorfismo MTHFR e as intervenções terapêuticas em condições psiquiátricas complexas ⁽²³⁾.

Acidente Vascular Cerebral

Associação entre os polimorfismos do gene MTHFR C677T e a eficácia da terapia com vitaminas na redução dos níveis de homocisteína em pacientes com hiper-homocisteinemia

O estudo incluiu 320 pacientes com acidente vascular cerebral (AVC) e hiper-homocisteinemia (HHcy), dos quais 258 (80,6%) atenderam aos critérios de inclusão e exclusão para análise final. Os pacientes foram divididos em dois grupos com base na resposta ao tratamento com suplementos vitamínicos: Grupo Eficaz (162 pacientes, resposta satisfatória com redução dos níveis de homocisteína) e Grupo Inválido (96 pacientes, sem resposta adequada após um mês de tratamento com ácido fólico, vitamina B6 e methylcobalamin). A análise genética revelou que a distribuição dos genótipos MTHFR 677 C>T foi significativamente diferente entre os grupos. No Grupo Inválido, 83,3% dos pacientes apresentavam o genótipo TT, enquanto no Grupo Eficaz, apenas 46,9% tinham esse genótipo, com maior prevalência dos genótipos CC e CT. A análise de regressão multivariada indicou que o alelo T do MTHFR C677T estava independentemente associado a uma resposta insuficiente ao tratamento (OR = 1,327, $p = 0,0015$). O genótipo TT foi particularmente associado a uma resposta inadequada, com OR de 1,645 ($p = 0,017$). Os resultados estatísticos foram significativos ($p < 0,05$), sugerindo que o polimorfismo MTHFR C677T, especialmente o genótipo TT, está relacionado a uma resposta subótima ao tratamento com vitaminas em pacientes com AVC e HHcy, destacando a importância da genotipagem para personalização terapêutica ⁽²⁴⁾.

Catarata Senil

Associação do polimorfismo MTHFR C677T, homocisteína e vitaminas do complexo B

O estudo incluiu 1.309 participantes, divididos em dois grupos: 663 pacientes com cataratas senis (Grupo de Observação) e 646 indivíduos saudáveis (Grupo Controle). A distribuição por sexo foi semelhante em ambos os grupos, com 47,1% de homens e 52,9% de mulheres no grupo de observação, e 47,7% de homens e 52,3% de mulheres no grupo controle. A faixa etária variou

de 50 a 93 anos, com médias de 68,7 anos no grupo de observação e 68,2 anos no grupo controle. A análise genotípica revelou diferenças significativas nas frequências dos genótipos MTHFR 677 C>T entre os grupos ($p < 0,001$ para TT e $p = 0,049$ para CT). O nível de homocisteína foi significativamente mais alto no grupo de observação ($p < 0,001$), enquanto os níveis de folato, vitamina B12 e vitamina B6 foram mais baixos ($p < 0,001$). A análise multivariada indicou que a mutação no gene MTHFR e os níveis elevados de homocisteína estavam associados à ocorrência de cataratas senis, sugerindo que esses fatores podem ser preditores independentes do risco da doença. O teste de Qui-Quadrado mostrou diferenças significativas na distribuição genotípica entre os grupos ($p < 0,001$). Esses achados sugerem que os polimorfismos do gene MTHFR e os níveis de homocisteína desempenham um papel importante na patogênese das cataratas senis ⁽²⁵⁾.

Discussão

Os resultados do presente estudo fornecem evidências robustas sobre a influência do polimorfismo MTHFR 677 C>T na regulação epigenética, nos níveis de homocisteína e em potenciais riscos metabólicos. Além disso, os dados destacam o papel terapêutico da suplementação de riboflavina e outras vitaminas, como ácido fólico e B12, no manejo dessas alterações, com implicações importantes para estratégias personalizadas de saúde.

A hipermetilação global do DNA em indivíduos com o genótipo TT, incluindo um aumento significativo na região sul do gene MTHFR, reforça a associação entre o polimorfismo e mudanças epigenéticas. Esses resultados são consistentes com a literatura, diminuindo que o genótipo TT afeta o metabolismo do folato e a disponibilidade de cofatores para a metilação do DNA. Por outro lado, a ausência de diferenças significativas na região norte e na ilha CpG sugere que o impacto epigenético é regionalmente específico, possivelmente relacionado à proximidade funcional dessas áreas no contexto do metabolismo do folato ⁽²⁰⁾.

Os níveis elevados de homocisteína em indivíduos com o genótipo TT (13,8 $\mu\text{mol/L}$) reforçam sua relevância como marcador metabólico e cardiovascular. Embora não tenham sido observadas associações diretas entre os polimorfismos do MTHFR e os níveis de homocisteína em gestantes suplementadas, um brilho negativo significativo entre homocisteína, vitamina B12 e ácido fólico confirma a eficácia dessas suplementações em mitigar o impacto genético. Em especial, a suplementação parece ser crucial para grupos vulneráveis, como gestantes, onde níveis equilibrados de homocisteína são fundamentais para a saúde materna e fetal ⁽²¹⁾.

Os resultados sobre a suplementação de riboflavina são particularmente promissores. A redução significativa da metilação global do DNA em indivíduos com o genótipo TT sugere que a riboflavina atua como chave moduladora do metabolismo do folato e da homocisteína. Este achado corrobora a possibilidade de intervenções direcionadas para indivíduos geneticamente predispostos a disregulações metabólicas e epigenéticas, oferecendo uma abordagem terapêutica personalizada ⁽²⁰⁾. De forma semelhante, em gestantes, o ácido fólico e a vitamina B12 mostraram-se eficazes em controlar os níveis de homocisteína, especialmente em heterozigotos do polimorfismo 1298 A>C, onde a transparência foi mais acentuada ⁽²¹⁾. Esses dados reforçam a importância da suplementação periconcepcional na prevenção de complicações gestacionais associadas à hiper-homocisteinemia, como pré-eclâmpsia e restrição do crescimento fetal. Diante disto, a necessidade de abordagens personalizadas no manejo de condições associadas aos polimorfismos MTHFR, com estratégias específicas de suplementação vitamínica baseadas no perfil genotípico. A riboflavina surge como uma alternativa inovadora para indivíduos homozigotos TT, enquanto o ácido fólico e a vitamina B12 continuam sendo intervenções extremamente recomendadas, especialmente em gestantes. A epigenética e nutrição tem um papel muito relevante quando se trata da compreensão da relação entre os polimorfismos do gene MTHFR e seus impactos sobre os níveis de homocisteína e saúde reprodutiva. Interações genéticas, bioquímicas e demográficas, permitiram explorar implicações tanto no contexto da saúde geral quanto na fertilidade. A elevada prevalência de níveis de homocisteína (>10 µmoles/L) observada em quase metade dos pacientes reflete uma influência significativa dos polimorfismos MTHFR (677 C>T e 1298 A>C) sobre o metabolismo da homocisteína. Em particular, o genótipo homozigoto TT foi associado a um maior risco de hiper-homocisteinemia, conforme corroborado por estudos prévios, reforçando a importância da mutação 677 C>T como marcador genético de risco. A diferença de gênero identificada, com maior prevalência de níveis elevados em homens (72,8% *versus* 23,5% em mulheres), sugere um potencial viés biológico ou hormonal na expressão do gene ou no metabolismo da homocisteína. Essa diferença é de grande relevância, pois destaca a necessidade de abordagens personalizadas no manejo clínico de condições relacionadas ⁽¹⁸⁾. A hiper-homocisteinemia foi fortemente associada à infertilidade e às perdas gestacionais recorrentes (RPL). O genótipo TT, presente em 10,7% das mulheres com RPL, relatou uma relação direta com a disfunção imunológica, incluindo níveis reduzidos de vitamina D e aumento da citotoxicidade das células NK. Esses achados destacam o papel crítico da interação entre fatores bioquímicos e imunológicos na manutenção da gestação, o que pode abrir novas frentes para intervenções terapêuticas, como a suplementação de folato e vitamina B12 ⁽¹⁰⁾. No

entanto, no grupo de mulheres comprovados para desfechos de gravidez (n=692), os polimorfismos do MTHFR não demonstraram impacto significativo nos estágios clínicos, como gravidez clínica ou partos prematuros. Esses resultados contrastam com outros estudos e sugerem que fatores demográficos, como idade e índice de massa corporal (IMC), desempenham papel mais determinante na fertilidade e nos resultados gestacionais. A idade apresentou forte efeito negativo sobre as taxas de gravidez, e o IMC também influenciou os níveis de evolução, reforçando a necessidade de considerar variáveis contextuais em estudos genéticos ⁽¹⁹⁾.

Embora a associação entre os polimorfismos MTHFR e níveis de homocisteína seja clara, sua relevância clínica nos estágios de gravidez permanece inconclusiva. Isso ressalta a importância de estudos que integrem dados genéticos, bioquímicos e ambientais para elucidar os mecanismos subjacentes às condições de saúde. Estratégias clínicas voltadas à modulação dos níveis de homocisteína, por meio de suplementação vitamínica ou intervenções dietéticas, podem beneficiar subgrupos específicos, como indivíduos com genótipos de alto risco (ex.: TT e heterozigotos compostos).

Ao observar as associações do polimorfismo genético e o desenvolvimento neural durante a gestação, ficam evidentes aspectos fundamentais da relação entre os genótipos do polimorfismo MTHFR 677 C>T e o transtorno do espectro autista (TEA), com implicações importantes tanto para a compreensão dos mecanismos biológicos subjacentes quanto para abordagens terapêuticas. A análise revelou que os genótipos CT e TT estão significativamente mais presentes em pacientes com TEA em comparação com controles saudáveis, sugerindo uma associação potencial entre a variação genética no gene MTHFR e o risco de desenvolver TEA. Além disso, a correlação entre consanguinidade e histórico familiar de doenças psiquiátricas com a maior prevalência dos genótipos CT + TT reforça o papel de fatores genéticos no desenvolvimento do TEA ⁽⁷⁾. Os resultados também destacaram que distúrbios gastrointestinais e de sono são frequentemente observados em pacientes com os genótipos CT + TT, sugerindo uma relação entre alterações metabólicas mediadas pela função do MTHFR e os fenótipos clínicos do TEA. Essa associação, no entanto, não foi acompanhada por uma influência significativa dos genótipos do MTHFR na severidade do comportamento autista avaliada pela escala CARS, indicando que fatores adicionais além da variação genética podem desempenhar um papel mais determinante na gravidade dos sintomas.

Os estudos em modelos animais forneceram dados complementares que ampliam a compreensão do impacto do gene MTHFR no desenvolvimento de fenótipos semelhantes ao autismo. Os experimentos com camundongos revelaram que a interação entre genótipo e dieta

exerce um papel crítico na modulação de comportamentos relacionados ao TEA. A dieta enriquecida, ao reduzir significativamente os comportamentos sintomáticos em camundongos MTHFR+/-, sugere que intervenções nutricionais podem oferecer benefícios protetores contra o impacto da deficiência do gene MTHFR. As análises comportamentais em camundongos destacaram que o genótipo materno e do filhote, bem como o sexo, influenciam de forma significativa os fenótipos sociais e de ansiedade. Machos MTHFR+/- demonstraram maior interação social, enquanto fêmeas com o mesmo genótipo apresentaram maior ansiedade, reforçando a importância das interações genéticas e sexuais. Além disso, atrasos no desenvolvimento físico observados em filhotes de mães MTHFR+/- indicam que a variação genética pode impactar aspectos morfogenéticos, potencialmente contribuindo para as manifestações comportamentais relacionadas ao TEA ^(17; 16).

Os achados reforçam a relevância de fatores genéticos, metabólicos e ambientais, como a dieta, na patogênese do TEA. Especificamente, a interação entre genótipos do MTHFR, condições ambientais e histórico genético familiar emerge como uma área promissora para investigações futuras. A identificação de mecanismos que modulam esses fatores pode abrir caminhos para intervenções mais eficazes e individualizadas, considerando as especificidades genéticas e ambientais de cada paciente. A prevalência de TEA observada entre os filhos cujas mães tomaram vitaminas pré-natais no primeiro mês de gravidez (14,1%) foi significativamente menor do que entre aqueles cujas mães não tomaram (32,7%). Essa diferença substancial indica que a suplementação com vitaminas pré-natais pode desempenhar um papel protetor, o que é consistente com a literatura existente que sugere que o ácido fólico é crucial para o desenvolvimento neurológico fetal. O ácido fólico é conhecido por sua função na síntese de DNA e na divisão celular, processos que são fundamentais durante as fases iniciais do desenvolvimento fetal ⁽²⁶⁾.

Sabendo que há possibilidade de desencadear aspectos neurais negativos, como ansiedade, a depressão também pode ter associação com o polimorfismo, uma vez que estudos reforçam o impacto clínico dos polimorfismos do gene MTHFR em diferentes contextos, como transtornos psiquiátricos resistentes ao tratamento em adolescentes e resposta terapêutica em pacientes com acidente vascular cerebral (AVC) e hiper-homocisteinemia (HHcy). Além disso, destaca-se a relevância da genotipagem na personalização das abordagens terapêuticas. O estudo com adolescentes mostrou uma alta prevalência de variantes genéticas do MTHFR entre os participantes, com 80% apresentando lesões associadas à redução da atividade enzimática. Essas descobertas corroboram a associação entre variantes do MTHFR e maior risco de transtornos psiquiátricos, como depressão e ansiedade ⁽²²⁾. A eficácia do tratamento com L-

metilfolato (LM) em melhorar os sintomas de depressão resistente ao tratamento é particularmente relevante. A redução média de 8,5 pontos no PHQ-9 e a alta taxa de resposta ao tratamento (67,9%) demonstram o potencial do LM como uma intervenção eficaz. A capacidade do LM de contornar a etapa limitante imposta pela atividade reduzida da enzima MTHFR explica os resultados positivos observados, especialmente em pacientes com mutações genéticas. A alta adesão ao tratamento (90%) e a baixa incidência de efeitos adversos também reforçam suas previsões clínicas ⁽²³⁾. Esses resultados sugerem que a genotipagem do MTHFR pode ser uma ferramenta útil para identificar adolescentes que se beneficiam do LM, particularmente aqueles com variantes como 1298 AC e 677 CT, facilitando um manejo mais eficaz dos transtornos psiquiátricos resistentes.

No contexto de pacientes com AVC e HHcy, o genótipo TT do polimorfismo MTHFR 677 C>T foi identificado como um fator determinante para uma resposta subótima ao tratamento com ácido fólico, vitamina B6 e metilcobalamina. Uma análise de regressão multivariada revelou uma associação independente entre o alelo T e uma resposta insuficiente, com o genótipo TT apresentando maior resistência terapêutica (OR = 1,645, p = 0,017). Esses resultados são consistentes com estudos que sugerem que a capacidade limitada do genótipo TT de metabolizar folato contribui para a persistência da hiper-homocisteinemia, um fator de risco identificado para AVC ⁽²⁴⁾.

A presença de múltiplas deficiências nutricionais, especificamente em ácidos graxos ômega-3, homocisteína e vitamina D, está fortemente associada a um aumento do risco de demência. O hazard ratio de 1,50 para cada ponto adicional no índice de status nutricional sugere que mesmo pequenas deficiências podem ter um impacto cumulativo significativo na saúde cognitiva. Este achado é consistente com a literatura existente, que já havia sugerido que a nutrição desempenha um papel crucial na saúde cerebral e no envelhecimento ⁽²⁷⁾. Pacientes com concentrações de vitamina B-12 superiores a 303 pmol/L apresentaram melhor desempenho em tarefas de aprendizado e reconhecimento em comparação com aqueles com concentrações de vitamina B-12 normais-baixas ⁽²⁸⁾.

Logo, enfatizam a importância da genotipagem do MTHFR como uma ferramenta de estratificação para intervenções terapêuticas mais precisas. Em adolescentes, a identificação precoce de mutações pode direcionar o uso de LM como um complemento eficaz para transtornos psiquiátricos resistentes. Em pacientes com AVC e HHcy, a genotipagem pode orientar ajustes na suplementação vitamínica ou a introdução de estratégias alternativas, como o uso de formas bioativas de vitaminas. Outro fator associado ao envelhecimento, deficiências nutricionais e o polimorfismo é a catarata senil, sendo destacados a relevância de fatores

genéticos e bioquímicos na patogênese das cataratas senis. A associação significativa entre os polimorfismos do gene *MTHFR* (especialmente o genótipo 677 TT) e a ocorrência de catarata indica que alterações genéticas podem aumentar o risco da doença. A maior frequência do genótipo TT no grupo de observação, comparado ao controle, sugere uma vulnerabilidade genética relacionada à redução da atividade da enzima MTHFR, resultando no acúmulo de homocisteína. Os níveis elevados de homocisteína observados corroboram evidências de seu papel como fator de risco em condições associadas ao envelhecimento e estresse oxidativo. Essa molécula pode causar danos às proteínas e células do cristalino, contribuindo para a opacificação característica das cataratas sensíveis. Além disso, foi identificada uma relação entre altos níveis de homocisteína e baixas concentrações de folato, vitamina B12 e vitamina B6, nutrientes essenciais no metabolismo da homocisteína, cujas deficiências podem aumentar o risco de cataratas ⁽²⁵⁾.

Uma análise multivariada mostrou que a mutação no gene *MTHFR* e os níveis elevados de homocisteína são preditores independentes para o desenvolvimento da doença. Esses achados sugerem que o rastreamento genético e o monitoramento de biomarcadores podem ser úteis na identificação de indivíduos em risco. Intervenções, como suplementação de folato, vitamina B12 e vitamina B6, podem oferecer estratégias promissoras para prevenir ou retardar a progressão da catarata.

Os diferentes aspectos do gene MTHFR e suas implicações em condições clínicas e celulares, conectam pontos comuns e fazem contrapontos relevantes. O polimorfismo MTHFR, particularmente as variantes C677T e A1298C, desempenha um papel importante nas doenças relacionadas ao metabolismo do folato, incluindo câncer, leucemia e toxicidade associada ao tratamento com metotrexato. O estudo das células HepG2 demonstrou uma forte associação entre a expressão do gene MTHFR e a dinâmica do ciclo celular, evidenciando que a inibição do MTHFR impacta significativamente a acumulação de células nas fases G2/M. A análise dos resultados indica uma correlação inversa entre a expressão do MTHFR e a fase G2/M, sugerindo que níveis elevados de MTHFR podem atuar na regulação do ciclo celular, possivelmente modulando a resposta das células a condições de estresse, como a depleção de folato. Este achado corrobora a importância do gene MTHFR na regulação do ciclo celular e levanta a possibilidade de que alterações na expressão deste gene possam contribuir para o desenvolvimento de tumores, como observado no grupo de pacientes com câncer de mama ⁽¹²⁾. Entretanto, a análise do polimorfismo C677T no câncer de mama revelou uma distribuição genotípica predominantemente selvagem (CC), tanto no grupo de pacientes quanto no grupo controle, com uma frequência muito baixa da variante T (homozigoto TT). Esses resultados,

em contraste com a forte correlação entre o polimorfismo e a toxicidade do metotrexato, sugerem que a variante T pode não ser um fator determinante no desenvolvimento do câncer de mama, mas sim em efeitos adversos do tratamento quimioterápico. A ausência de correlação significativa entre o polimorfismo MTHFR C677T e características clínico-patológicas dos pacientes com câncer de mama reforça a ideia de que a expressão do MTHFR pode ter um impacto maior na resposta a tratamentos, como a quimioterapia, do que no desenvolvimento primário da doença ⁽¹³⁾.

No contexto do tratamento de leucemia infantil, o polimorfismo MTHFR 1298 A>C também mostrou associações significativas, especialmente no que se refere aos biomarcadores do líquido cefalorraquidiano, como Tau e pTau, cujos níveis variaram conforme o genótipo. Pacientes com o genótipo CC apresentaram níveis mais elevados de Tau, enquanto os heterozigotos apresentaram valores intermediários. Isso sugere que variantes do MTHFR podem estar relacionadas à toxicidade do metotrexato e ao impacto cognitivo a longo prazo, dado que os níveis elevados de Tau estão associados a danos neuronais. A administração de ácido folínico foi eficaz em reduzir esses níveis elevados de Tau, o que indica que a suplementação pode atenuar a toxicidade associada ao tratamento quimioterápico. Esses achados reforçam a importância do MTHFR como um alvo terapêutico, especialmente em crianças submetidas a tratamentos agressivos, com implicações tanto para a saúde imediata quanto para o desenvolvimento cognitivo posterior ⁽¹⁵⁾.

Por outro lado, o estudo sobre a toxicidade do metotrexato em pacientes com diferentes genótipos do MTHFR destacou o risco aumentado de nefrotoxicidade, hepatotoxicidade e anemia entre os indivíduos com o genótipo homozigoto TT. Isso demonstra um vínculo claro entre variantes do MTHFR e a resposta adversa a tratamentos farmacológicos, como o metotrexato, e sugere que a genotipagem pode ser uma ferramenta importante para personalizar os tratamentos e minimizar os efeitos colaterais. O impacto da leucovorina na redução da toxicidade, especialmente no grupo TT, também levanta a possibilidade de intervenções clínicas que possam melhorar a tolerância ao tratamento em pacientes com este genótipo ⁽¹⁴⁾.

Em suma, os resultados desses estudos destacam a complexa interação entre o gene MTHFR, as variantes genéticas específicas e a resposta dos pacientes a tratamentos terapêuticos, especialmente no contexto do câncer e da leucemia. Embora o polimorfismo MTHFR não tenha mostrado uma associação direta com o desenvolvimento de câncer de mama, suas variantes têm um impacto claro na toxicidade associada ao tratamento, sugerindo que o MTHFR pode ser mais relevante no contexto da resposta a terapias do que na etiologia de certos tipos de câncer. Além disso, as variações genéticas do MTHFR, como as variantes 677C>T e 1298 A>C,

desempenham um papel significativo na toxicidade e nos efeitos a longo prazo dos tratamentos, como evidenciado pelos estudos em leucemia infantil e no câncer de mama, tornando-se um alvo potencial para estratégias de tratamento personalizadas.

Agradecimentos

Agradecemos à CAPES e à IAPES pelo apoio financeiro e incentivo à pesquisa, bem como à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) pelo suporte institucional.

Apoio Financeiro

Este artigo está relacionado a uma pesquisa em andamento, e o IAPES (Instituto de Apoio à Pesquisa), por meio do Dr. Durval Palhares, promove estudos sobre temas relacionados ao TEA (Transtorno do Espectro Autista) e à FOP (Fibrodysplasia Ossificante Progressiva). O instituto desempenha um papel fundamental para que a pesquisa prossiga até sua conclusão. A CAPES apoia a pesquisa por meio da concessão de bolsas a estudantes de pós-graduação.

Autoria

MGB e DBP realizaram a pesquisa, analisaram os dados e redigiram o artigo; MGB traduziu o texto. Todos os autores leram e aprovaram a versão final do manuscrito.

Declaração de Conflito de Interesses

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

1. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Biologia Molecular da Célula. 2015.
2. Griffiths AJF, Wessler SR, Carroll SB, Doebley J. Introdução à Genética. 11ª ed. Guanabara Koogan; 2016.
3. Wilcken B, Bamforth F, Li Z, Zhu H, Ritvanen A, Renlund M, Stoll C, Alembik Y, Dott B, Czeizel AE, et al. Geographical and ethnic variation of the 677C>T allele of 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): findings from over 7000 newborns from 16 areas world wide. *J Med Genet.* 2004 May; 41(5):400. doi: 10.1136/jmg.40.8.619
4. De Mattia E, Toffoli G. C677T and A1298C MTHFR polymorphisms, a challenge for antifolate and fluoropyrimidine-based therapy personalisation. *Eur J Cancer.* 2009 May;45(8):1333-51. doi: 10.1016/j.ejca.2008.12.004. Epub 2009 Jan 12. PMID: 19144510.

5. Crider KS, Zhu JH, Hao L, Yang QH, Yang TP, Gindler J, Maneval DR, Quinlivan EP, Li Z, Bailey LB, Berry RJ. MTHFR 677C→T genotype is associated with folate and homocysteine concentrations in a large, population-based, double-blind trial of folic acid supplementation. *Am J Clin Nutr*. 2011 Jun;93(6):1365-72. doi: 10.3945/ajcn.110.004671. Epub 2011 Apr 20. PMID: 21508090.
6. Li MN, Wang HJ, Zhang NR, Xuan L, Shi XJ, Zhou T, Chen B, Zhang J, Li H. MTHFR C677T gene polymorphism and the severity of coronary lesions in acute coronary syndrome. *Medicine (Baltimore)*. 2017 Dec;96(49):e9044. doi: 10.1097/MD.00000000000009044. PMID: 29245302; PMCID: PMC5728917.
7. Ismail S, Senna AA, Behiry EG, Ashaat EA, Zaki MS, Ashaat NA, Salah DM. Study of C677T variant of methylene tetrahydrofolate reductase gene in autistic spectrum disorder Egyptian children. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2019 Jul;180(5):305-309. doi: 10.1002/ajmg.b.32729. Epub 2019 Apr 29. PMID: 31033224.
8. Meng Y, Liu X, Ma K, Zhang L, Lu M, Zhao M, Guan MX, Qin G. Association of MTHFR C677T polymorphism and type 2 diabetes mellitus (T2DM) susceptibility. *Mol Genet Genomic Med*. 2019 Dec;7(12):e1020. doi: 10.1002/mgg3.1020. Epub 2019 Oct 30. PMID: 31663297; PMCID: PMC6900375.
9. Baghdad I, Erreguibi D, Boufettal R, Eljai SR, Chihab F, Nadifi S. Association du polymorphisme de la méthylène tétrahydrofolate réductase C677T avec le risque de cancer colorectal sporadique [Association of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism and the risk of sporadic colorectal cancer]. *Pan Afr Med J*. 2021 Mar 18;38:287. French. doi: 10.11604/pamj.2021.38.287.12522. PMID: 34122714; PMCID: PMC8179987.
10. Ota K, Takahashi T, Han A, Damvaeba S, Mizunuma H, Kwak-Kim J. Effects of MTHFR C677T polymorphism on vitamin D, homocysteine and natural killer cell cytotoxicity in women with recurrent pregnancy losses. *Hum Reprod*. 2020 Jun 1;35(6):1276-1287. doi: 10.1093/humrep/deaa095. PMID: 32478379.
11. Spyridopoulou KP, Dimou NL, Hamodrakas SJ, Bagos PG. Methylene tetrahydrofolate reductase gene polymorphisms and their association with methotrexate toxicity: a meta-analysis. *Pharmacogenet Genomics*. 2012 Feb;22(2):117-33. doi: 10.1097/FPC.0b013e32834ded2a. PMID: 22143415.
12. Wu MT, Ye WT, Wang YC, Chen PM, Liu JY, Tai CK, Tang FY, Li JR, Liu CC, Chiang EI. MTHFR Knockdown Assists Cell Defense against Folate Depletion Induced Chromosome Segregation and Uracil Misincorporation in DNA. *Int J Mol Sci*. 2021 Aug 30;22(17):9392. doi: 10.3390/ijms22179392. PMID: 34502300; PMCID: PMC8431311.

13. Diakite B, Kassogue Y, Maiga M, Dolo G, Kassogue O, Holl JL, Joyce B, Wang J, Cisse K, Diarra F, Keita ML, Traore CB, Kamate B, Sissoko SB, Coulibaly B, Sissoko AS, Traore D, Sidibe FM, Bah S, Teguate I, Ly M, Nadifi S, Dehbi H, Kim K, Murphy R, Hou L. Lack of Association of C677T Methylenetetrahydrofolate Reductase Polymorphism with Breast Cancer Risk in Mali. *Genet Res (Camb)*. 2023 Jan 17;2023:4683831. doi: 10.1155/2023/4683831. PMID: 36721432; PMCID: PMC9873441.
14. Chang X, Guo Y, Su L, Zhang Y, Hui W, Zhao H, Hu R, Sun W. Influence of MTHFR C677T Polymorphism on High-Dose Methotrexate-Related Toxicity in Patients With Primary Central Nervous System Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2021 Feb;21(2):91-96. doi: 10.1016/j.clml.2020.08.020. Epub 2020 Sep 18. PMID: 33069634.
15. Elens I, Deprez S, Billiet T, Sleurs C, Labarque V, Uyttebroeck A, Van Gool S, Lemiere J, D'Hooze R. Methylenetetrahydrofolate reductase A1298C polymorphisms influence the adult sequelae of chemotherapy in childhood-leukemia survivors. *PLoS One*. 2021 Apr 30;16(4):e0250228. doi: 10.1371/journal.pone.0250228. PMID: 33930029; PMCID: PMC8087097.
16. Orenbuch A, Fortis K, Taesuan S, Yaffe R, Caudill MA, Golan HM. Prenatal Nutritional Intervention Reduces Autistic-Like Behavior Rates Among Mthfr-Deficient Mice. *Front Neurosci*. 2019 May 2;13:383. doi: 10.3389/fnins.2019.00383. PMID: 31133774; PMCID: PMC6511811.
17. Sadigurschi N, Golan HM. Maternal and offspring methylenetetrahydrofolate-reductase genotypes interact in a mouse model to induce autism spectrum disorder-like behavior. *Genes Brain Behav*. 2019 Jan;18(1):e12547. doi: 10.1111/gbb.12547. PMID: 30552741.
18. Ménéz Y, Patrizio P, Alvarez S, Amar E, Brack M, Bami C, Chouteau J, Clement A, Clement P, Cohen M, Cornet D, Dale B, D'Amato G, Jacquesson-Fournols L, Mares P, Neveux P, Sage JC, Servy E, Huong TM, Viot G. MTHFR (methylenetetrahydrofolate reductase: EC 1.5.1.20) SNPs (single-nucleotide polymorphisms) and homocysteine in patients referred for investigation of fertility. *J Assist Reprod Genet*. 2021 Sep;38(9):2383-2389. doi: 10.1007/s10815-021-02200-6. Epub 2021 Apr 29. PMID: 33914208; PMCID: PMC8490548.
19. Ye F, Zhang S, Qi Q, Zhou J, Du Y, Wang L. Association of MTHFR 677C>T polymorphism with pregnancy outcomes in IVF/ICSI-ET recipients with adequate synthetic folic acid supplementation. *Biosci Trends*. 2022 Sep 17;16(4):282-290. doi: 10.5582/bst.2021.01306. Epub 2022 Jun 10. PMID: 35691911.
20. Amenyah SD, McMahon A, Ward M, Deane J, McNulty H, Hughes CF, Strain JJ, Horigan G, Purvis J, Walsh CP, Lees-Murdock DJ. Riboflavin supplementation alters global and gene-

- specific DNA methylation in adults with the MTHFR 677 TT genotype. *Biochimie*. 2020 Jun;173:17-26. doi: 10.1016/j.biochi.2020.04.007. Epub 2020 Apr 22. PMID: 32334045.
21. Bošković A, Ćuk A, Mandrapa V, Dugandžić Šimić A, Cvetković I, Orlović Vlaho M, Krešić T, Tomić T, Tomić V. Association of MTHFR polymorphism, folic acid and vitamin B12 with serum homocysteine levels in pregnant women. *Biomol Biomed*. 2024 Jan 3;24(1):138-143. doi: 10.17305/bb.2023.9260. PMID: 37622180; PMCID: PMC10787622.
 22. Dartois LL, Stutzman DL, Morrow M. L-methylfolate Augmentation to Antidepressants for Adolescents with Treatment-Resistant Depression: A Case Series. *J Child Adolesc Psychopharmacol*. 2019 Jun;29(5):386-391. doi: 10.1089/cap.2019.0006. Epub 2019 May 6. PMID: 31058543.
 23. Jha S, Kumar P, Kumar R, Das A. Effectiveness of add-on l-methylfolate therapy in a complex psychiatric illness with MTHFR C677 T genetic polymorphism. *Asian J Psychiatr*. 2016 Aug;22:74-5. doi: 10.1016/j.ajp.2016.05.007. Epub 2016 May 20. PMID: 27520898.
 24. Li ZC, Huang M, Yao QY, Lin CH, Hong BC, Wang JH, Zhang Z. Association between MTHFR C677T gene polymorphisms and the efficacy of vitamin therapy in lowering homocysteine levels among stroke patients with hyperhomocysteinemia. *J Integr Neurosci*. 2024 Jan 10;23(1):3. doi: 10.31083/j.jin2301003. PMID: 38287840.
 25. Luo J, Chen X, Yang Y, Liu Y, Feng Y, Chen G. Association of MTHFR C667T polymorphism, homocysteine, and B vitamins with senile cataract. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 2023;69(2):136-144. doi: 10.3177/jnsv.69.136. PMID: 37121723.
 26. Schmidt RJ, Iosif AM, Guerrero Angel E, Ozonoff S. Association of maternal prenatal vitamin use with risk for autism spectrum disorder recurrence in young siblings. *JAMA Psychiatry*. 2019 Apr 1;76(4):391-398. doi: 10.1001/jamapsychiatry.2018.3901. PMID: 30810722; PMCID: PMC6450282.
 27. van Soest APM, de Groot LCPGM, Witkamp RF, van Lent DM, Seshadri S, van de Rest O. Concurrent nutrient deficiencies are associated with dementia incidence. *Alzheimers Dement*. 2024 Jul;20(7):4594-4601. doi: 10.1002/alz.13884. Epub 2024 Jun 12. PMID: 38865433; PMCID: PMC11247665.
 28. Köbe T, Witte AV, Schnelle A, Grittner U, Tesky VA, Pantel J, Schuchardt JP, Hahn A, Bohlken J, Rujescu D, Flöel A. Vitamin B-12 concentration, memory performance, and hippocampal structure in patients with mild cognitive impairment. *Am J Clin Nutr*. 2016 Apr;103(4):1045-54. doi: 10.3945/ajcn.115.116970. Epub 2016 Feb 24. PMID: 26912492.

6 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou, pela primeira vez, o efeito do tratamento em crianças com Transtorno do Espectro Autista (TEA) sobre a modulação positiva da expressão do gene MTHFR. Os resultados também evidenciaram a sub-regulação do gene inflamatório TNF- α em resposta à intervenção medicamentosa. Ambos os tratamentos avaliados foram capazes de modular a expressão do gene MTHFR e reduzir a expressão da citocina pró-inflamatória TNF- α , indicando impacto positivo nos processos metabólicos e inflamatórios associados ao TEA. Essa modulação molecular refletiu-se em melhora clínica relatada pelos familiares, incluindo avanços na comunicação, na interação social e redução de comportamentos estereotipados, conforme registrado pelo grupo de pesquisa e pela médica responsável.

Além disso, a validação do rt-PCR em amostras de tecido leucocitário e em células epiteliais da mucosa bucal (CEB) confirmou a viabilidade do uso de células bucais como alternativa não invasiva e eficiente para análises de expressão gênica, com rendimento adequado de RNA e resultados consistentes em qPCR. O uso do gene S26 como normalizador contribuiu para a robustez das análises, assegurando maior precisão nos dados obtidos.

Esses achados reforçam a importância do metabolismo do folato na fisiopatologia do TEA e abrem perspectivas para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas personalizadas, integrando modulação epigenética e controle de processos inflamatórios como parte do manejo clínico.

Por fim, este trabalho sugere a realização de estudos futuros que avaliem as concentrações sanguíneas de homocisteína em indivíduos com TEA, bem como pesquisas com amostras maiores, a fim de consolidar evidências, avaliar a modulação do gene em amostras CEB em pacientes com TEA, explorar polimorfismos do MTHFR e orientar novas intervenções inovadoras voltadas para a melhoria da qualidade de vida de pacientes e suas famílias.

REFERÊNCIAS

AKIRA, S.; TAKEDA, K. **Toll-like receptor signalling**. *Nature Reviews Immunology*, v. 7, p. 499–511, 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15229469/>. Acesso em: 20 jun. 2024.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and statistical manual of mental disorders**. 4th ed. Washington, DC: American Psychiatric Association, 1994. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC181059/>. Acesso em: 20 jun. 2024.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and statistical manual of mental disorders**. 5th ed. Arlington: American Psychiatric Publishing, 2013.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Manual de diagnóstico e estatístico de transtornos mentais: DSM-5**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. 848 p.

ARAÚJO, L. A. et al.. **Sociedade Brasileira de Pediatria: manual de orientação**, Departamento Científico de Pediatria do Desenvolvimento e Comportamento. 5. ed. Rio de Janeiro: SBP, 2019.

ASATO, M. R.; HARDAN, A. Y. **Neuro-psychiatric problems in tuberous sclerosis complex**. *Journal of Child Neurology*, v. 19, p. 241–244, 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15163088/>. Acesso em: 20 jun. 2024.

ASHWOOD, P. **Preliminary findings of elevated inflammatory plasma cytokines in children with autism who have co-morbid gastrointestinal symptoms**. *Biomedicines*, [S.l.], v. 11, p. 436, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/biomedicines11020436>. Acesso em: 13 jul. 2025.

ASPERGER, H. **Die autistischen Psychopathen“ im Kindesalter**. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten*, v. 117, p. 76–136, 1944.

BAILEY, A. et al.. **Autism as a strongly genetic disorder: evidence from a British twin study**. *Psychological Medicine*, v. 25, n. 1, p. 63–77, 1995.

BAIO, J. et al.. **Prevalence of autism spectrum disorder among children aged 8 years—autism and developmental disabilities monitoring network**, 11 sites, United States, 2014. *MMWR Surveillance Summaries*, v. 67, p. 1–23, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29701730/>. Acesso em: 20 jun. 2024.

BALANIUC, S. L. B. et al.. **Gene modulation in buccal epithelial cells of patients with fibrodysplasia ossificans progressiva treated with ascorbic acid and propranolol**. *Journal of Pre-Clinical and Clinical Research*, v. 19, n. 1, p. 1–8, 2025. DOI: <https://doi.org/10.26444/jpccr/200407>.

BETTELHEIM, B. **The empty fortress: infantile autism and the birth of the self**. New York, NY: The Free Press, 1967.

- BUCAN, M. et al..**Genome-wide analyses of exonic copy number variants in a family-based study point to novel autism susceptibility genes**. PLoS Genetics, v. 5, e1000536, 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19557195/>. Acesso em: 22 jun. 2024.
- CANDLAND, D. K. *Feral children and clever animals: reflections on human nature*. New York: Oxford University Press, 1995.
- CANITANO, R. **Epilepsy in autism spectrum disorders**. European Child & Adolescent Psychiatry, v. 16, n. 1, p. 61–66, 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16932856/>. Acesso em: 20 jun. 2024.
- CASTERMANS, D.; WILQUET, V.; STEYAERT, J.; VAN DE VEN, W.; FRYNS, J-P.; DEVRINDT, K. **Chromosomal anomalies in individuals with autism**: a strategy towards the identification of genes involved in autism. Autism, [S.l.], v. 8, n. 2, p. 141–161, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1177/1362361304042719>.
- DEVLIN, B.; SCHERER, S. W. **Genetic architecture in autism spectrum disorder**. Current Opinion in Genetics & Development, v. 22, p. 229–237, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22463983/>. Acesso em: 22 jun. 2024.
- DINARELLO, C. A. **Historical insights into cytokines**. European Journal of Immunology, v. 37, supl. 1, p. S34–S45, 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17972343/>. Acesso em: 20 jun. 2024.
- DONVAN, J.; ZUCKER, C. **Em uma chave diferente**: a história do autismo. New York: Broadway Books, 2016.
- DUNKER, C. I. L. **Questões entre a psicanálise e o DSM**. Jornal de Psicanálise, v. 47, n. 87, p. 79–107, 2014. Disponível em: <http://pepsic.bvsalud.org/pdf/jp/v47n87/v47n87a06.pdf>. Acesso em: 22 jun. 2024.
- EICHLER, E. E. et al..**Missing heritability and strategies for finding the underlying causes of complex disease**. Nature Reviews Genetics, v. 11, p. 446–450, 2010.
- FAREED, M. M. et al..**In silico analysis of the impact of non-synonymous single nucleotide polymorphisms (nsSNPs) in the human IL-6 gene related to autoimmune diseases**. International Journal of Sciences, v. 3, n. 1, p. 1–5, 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35452998/>. Acesso em: 20 jun. 2024.
- FOLSTEIN, S.; RUTTER, M. **Genetic influences and infantile autism**. Nature, v. 265, n. 5596, p. 726–728, 1977. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/558516/>. Acesso em: 22 jun. 2024.
- FOMBONNE, E. **The epidemiology of autism**: a review. Psychological Medicine, v. 29, n. 4, p. 769–786, 1999. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10473304/>. Acesso em: 22 jun. 2024.
- FREITAS, K. A. et al..**Enhanced T cell effector activity by targeting the Mediator kinase module**. Science, v. 375, n. 6620, eabn5647, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.abn5647>. Acesso em: 20 jan. 2025.

GÉNIN, E. **Missing heritability of complex diseases: case solved?** Human Genetics, v. 139, p. 103–113, 2020.

GOGOU, M.; KOLIOS, G. **Nutritional supplements during gestation and autism spectrum disorder: what do we really know and how far have we gone?** Journal of the American College of Nutrition, v. 39, n. 3, p. 261–271, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31318329/>. Acesso em: 20 jun. 2024.

GOINES, P. E.; ASHWOOD, P. **Cytokine dysregulation in autism spectrum disorders (ASD): possible role of the environment.** Neurotoxicology and Teratology, [S.l.], v. 36, p. 67–81, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2013.01.007>. Acesso em: 13 jul. 2025.

GUO, B.-Q.; LI, H.-B.; DING, S.-B. **Níveis de homocisteína no sangue em crianças com transtorno do espectro autista: revisão sistemática e meta-análise atualizada.** Psychiatry Research, v. 291, p. 113283, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32763544/>. Acesso em: 20 jun. 2024.

HENS, K. **The many meanings of autism: conceptual and ethical reflections.** Developmental Medicine & Child Neurology, v. 61, n. 9, p. 1025–1029, 2019.

HOGART, A.; SCHANEN, N. C. **The comorbidity of autism with the genomic disorders of chromosome 15q11.2-q13.** Neurobiology of Disease, v. 38, p. 181–191, 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18840528/>. Acesso em: 22 jun. 2024.

INGERSOLL, B.; WAINER, A. **The broader autism phenotype.** In: VOLKMAR, F. R.; ROGERS, S. J.; PELPHREY, K. A. (eds.). Handbook of autism and pervasive developmental disorders. 4th ed. Hoboken, NJ: Wiley, 2014. p. 28–56. Disponível em: <https://psycnet.apa.org/record/2014-33097-002>. Acesso em: 22 jun. 2024.

JAMES, S. J. et al. **A functional polymorphism in the reduced folate carrier gene and DNA hypomethylation in mothers of children with autism.** American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics, v. 153, n. 6, p. 1209–1220, 2010.

KANNER, L. **Autistic disturbances of affective contact.** Nervous Child, v. 2, p. 217–250, 1943.

KANG, S.-S.; WONG, P.-W. K.; MALINOW, M. R. **Hyperhomocysteinemia as a risk factor for occlusive vascular disease.** Annual Review of Nutrition, v. 12, p. 279–298, 1992. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1503807/>. Acesso em: 20 jun. 2024.

KLIN, A. **Autismo e síndrome de Asperger: uma visão geral.** Revista Brasileira de Psiquiatria, v. 28, n. 1, p. 3–?, 2006. [Dados de páginas incompletos.]

KOSIOL, C. et al. **Patterns of positive selection in six mammalian genomes.** PLoS Genetics, v. 4, n. 8, e1000144, 2008. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosgenetics/article?id=10.1371/journal.pgen.1000144>. Acesso em: 20 jun. 2024.

LAI, M.-C.; LOMBARDO, M. V.; BARON-COHEN, S. **Autism**. *Lancet*, v. 383, p. 896–910, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24074734/>. Acesso em: 20 jun. 2024.

LI, G.; LEE, O.; RABITZ, H. **High efficiency classification of children with autism spectrum disorder**. *PLoS One*, v. 13, n. 2, e0192867, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29447214/>. Acesso em: 22 jun. 2024.

LI, X. et al.. **Elevated immune response in the brain of autistic patients**. *Journal of Neuroimmunology*, [S.l.], v. 207, p. 111–116, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2008.12.002>. Acesso em: 13 jul. 2025.

LIU, X.; TAKUMI, T. **Genomic and genetic aspects of autism spectrum disorder**. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 452, p. 244–253, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25173933/>. Acesso em: 22 jun. 2024.

LI, Y.; LI, Y.-M.; XIANG, D. **Supplement intervention associated with nutritional deficiencies in autism spectrum disorders: a systematic review**. *European Journal of Nutrition*, v. 57, p. 2571–2582, 2018.

MANDY, W.; LAI, M.-C. **Annual Research Review: the role of the environment in the developmental psychopathology of autism spectrum condition**. *Journal of Child Psychology and Psychiatry*, v. 57, n. 3, p. 271–292, 2016.

MANIVASAGAM, T. et al.. **Role of oxidative stress and antioxidants in autism**. In: **Personalized food intervention and therapy for autism spectrum disorder management**. *Advances in Neurobiology*, v. 24, 2020. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-030-30402-7_7.

MANOUILENKO, I.; BEJEROT, S. **Sukhareva—before Asperger and Kanner**. *Nordic Journal of Psychiatry*, 2015. DOI: 10.3109/08039488.2015.1005022.

MESSIAS, A. L. B. et al.. **Buccal epithelial cells as non-invasive biological material for fibrodysplasia ossificans progressiva gene expression studies**. *Journal of Pre-Clinical and Clinical Research*, v. 18, n. 2, p. 89–94, 2024. DOI: 10.26444/jpcr/188214.

McCRAE, L. E.; TING, W.-T.; HOWLADER, M. M. R. **Advancing electrochemical biosensors for interleukin-6 detection**. *Biosensors and Bioelectronics: X*, v. 13, 2023. DOI: 10.1016/j.biosx.2022.100288. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biosx.2022.100288>. Acesso em: 20 jan. 2025.

MENOLD, M. M. et al.. **Análise de associação de genes da subunidade do receptor GABAA do cromossomo 15 em transtorno autista**. *Journal of Neurogenetics*, v. 15, p. 245–259, 2001.

MOHAMMAD, N. S. et al.. **Clinical utility of folate-pathway genetic polymorphisms in the diagnosis of autism spectrum disorders**. *Psychiatric Genetics*, v. 26, n. 6, p. 281–286, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27755291/>. Acesso em: 22 jun. 2024.

NADEEM, A. et al.. **Imbalance in pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines milieu in B cells of children with autism**. *Molecular Immunology*, v. 141, p. 297–304, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2021.12.009>

- NAZKI, F. H.; SAMEER, A. S.; GANAIE, B. A. **Folate: metabolism, genes, polymorphisms and associated diseases**. *Gene*, v. 533, n. 1, p. 11–20, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24091066/>. Acesso em: 20 jun. 2024.
- NIELSEN, R. et al.. **A scan for positively selected genes in the genomes of humans and chimpanzees**. *PLoS Biology*, v. 3, n. 6, e170, 2005. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2675972/>. Acesso em: 22 jun. 2024.
- NISHIMURA, Y. et al.. **Genome-wide expression profiling of lymphoblastoid cell lines distinguishes different forms of autism and reveals shared pathways**. *Human Molecular Genetics*, v. 14, p. 1682–1698, 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17519220/>. Acesso em: 22 jun. 2024.
- PISULA, E.; ZIEGART-SADOWSKA, K. **The broader autism phenotype**. In: VOLKMAR, F. R.; ROGERS, S. J.; PELPHREY, K. A. (eds.). *Handbook of autism and pervasive developmental disorders*. 4th ed. Hoboken, NJ: Wiley, 2014. p. 28–56. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4490493/>. Acesso em: 20 jun. 2024.
- POSAR, A.; VISCONTI, P. **Tribute to Grunya Efimovna Sukhareva, the woman who first described infantile autism**. *Journal of Pediatric Neurosciences*, v. 12, p. 300, 2017. DOI: 10.4103/jpn.JPN_46_17.
- PUFFENBERGER, E. G. et al.. **A homozygous missense mutation in HERC2 associated with global developmental delay and autism spectrum disorder**. *Human Mutation*, v. 33, p. 1639–1646, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23065719/>. Acesso em: 22 jun. 2024.
- RICHDALE, A. L.; SCHRECK, K. A. **Sleep problems in autism spectrum disorders: prevalence, nature, & possible biopsychosocial aetiologies**. *Sleep Medicine Reviews*, v. 13, p. 403–411, 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19398354/>. Acesso em: 20 jun. 2024.
- RIVERS-AUTY, J. et al.. **Redefining the ancestral origins of the interleukin-1 superfamily**. *Nature Communications*, v. 9, n. 1, p. 1156, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29559685/>. Acesso em: 20 jun. 2024.
- ROMMEL, A. S. et al.. **Associations between urinary biomarkers of oxidative stress in the third trimester of pregnancy and behavioral outcomes in the child at 4 years of age**. *Brain, Behavior, and Immunity*, v. 90, p. 272–278, 2020.
- ROSE, S. et al.. **Evidence of oxidative damage and inflammation associated with low glutathione redox status in the autism brain**. *Translational Psychiatry*, v. 2, e134, 2012.
- ROSE, D. R. et al.. **T cell populations in children with autism spectrum disorder and comorbid gastrointestinal symptoms**. *Brain, Behavior, and Immunity – Health*, [S.l.], v. 2, p. 100042, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbih.2020.100042>. Acesso em: 13 jul. 2025.
- ROSEN, N. E.; LORD, C.; VOLKMAR, F. R. **The diagnosis of autism: from Kanner to DSM-III to DSM-5 and beyond**. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, v. 51, p.

4253–4270, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33624215/>. Acesso em: 22 jun. 2024.

RÜHLI, F. J.; HENNEBERG, M. **New perspectives on evolutionary medicine: the relevance of microevolution for human health and disease**. BMC Medicine, v. 11, p. 115, 2012. Disponível em: <https://bmcmmedicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/1741-7015-11-115>. Acesso em: 20 jun. 2024.

RUTTER, M. **Diagnosis and definition of childhood autism**. Journal of Autism and Childhood Schizophrenia, v. 8, p. 139–161, 1978.

RUTTER, M.; GARMEZY, N. **Developmental psychopathology: socialization, personality and child development**. In: HETHERINGTON, E. M. (ed.). Mussen's handbook of child psychology. v. 4. New York: Wiley, 1983. p. 755–911.

RUSSO, F. B. et al.. **Modeling neuron–astrocyte interactions in autism using human induced pluripotent stem cells**. Biological Psychiatry, v. 83, n. 7, p. 569–578, 2018.

SAE-LEE, C. et al.. **Dietary intervention modifies DNA methylation age assessed by the epigenetic clock**. American Journal of Clinical Nutrition, v. 107, n. 4, p. 566–573, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqx060>

SAMBROOK, J.; MANIATIS, T. **Clonagem molecular: um manual de laboratório**. 2. ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANDIN, S. et al.. The familial risk of autism. JAMA, v. 311, n. 17, p. 1770–1777, 2014.

SCHAEFER, G. B.; MENDELSON, N. J. **Clinical genetics evaluation in identifying the etiology of autism spectrum disorders: 2013 guideline revisions**. Genetics in Medicine, [S.l.], v. 15, n. 5, p. 399–407, 2013.

SCHMIDT, R. J. et al.. **Maternal periconceptional folic acid intake and risk of autism spectrum disorders and developmental delay in the CHARGE case-control study**. American Journal of Clinical Nutrition, [S.l.], v. 96, n. 1, p. 80–89, 2012. DOI: <https://doi.org/10.3945/ajcn.110.004416>.

Schmidt et al

SIES, H. **Oxidative stress: introductory remarks**. London: Academic Press, 1985.

SHAIK, M. M.; GAN, S. H. **Vitamin supplementation as possible prophylactic treatment against migraine with aura and menstrual migraine**. BioMed Research International, v. 2014, p. 1–18, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1155/2014/512931>

SILBERMAN, S. **NeuroTribes: o legado do autismo e o futuro da neurodiversidade**. Anthropological Quarterly, v. 88, n. 4, p. 1111–1121, 2015.

SIRACHAINAN, N. et al.. **Polimorfismo genético na via metabólica da homocisteína e trombose**. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, v. 28, n. 3, p. 191–196, 2006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17171147/>. Acesso em: 20 jun. 2024.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE GENÉTICA MÉDICA E GENÔMICA. **Genética cumpre papel importante no diagnóstico do autismo**. Porto Alegre, 2018. Disponível em: <https://www.sbgm.org.br/detalhe.aspx?id=1477&area=4>. Acesso em: 28 abr. 2020.

SUKHAREVA, G. E. **Die schizoiden Psychopathien im Kindesalter**. *Monatsschrift für Psychiatrie und Neurologie*, v. 57, p. 235–261, 1925.

SUKHAREVA, G. E. **Autistische (pathocharakterologische) Psychopathien im Kindesalter**. *Monatsschrift für Psychiatrie und Neurologie*, v. 137, p. 235–261, 1959.

THAN, A. et al. **Inflammatory mediators drive neuroinflammation in autism spectrum disorder and cerebral palsy**. *Frontiers in Immunology*, v. 14, p. 1-18, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1215693>

TREFFERT, D. A. **Epidemiology of infantile autism**. *Archives of General Psychiatry*, v. 22, n. 5, p. 431–438, 1970.

VALICENTI-McDERMOTT, M.; RAPIN, I.; SHINNAR, S. **Frequency of gastrointestinal symptoms in children with autism spectrum disorders and association with family history of autoimmune disease**. *Journal of Developmental and Behavioral Pediatrics*, v. 27, p. S128–S136, 2006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16685179/>. Acesso em: 20 jun. 2024.

VARGAS, D. L. et al. **Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism**. *Annals of Neurology*, [S.l.], v. 57, n. 1, p. 67–81, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1002/ana.20315>. Acesso em: 13 jul. 2025.

VÁZQUEZ, L.-I.; CANALS, J.; ARIJA, V. **Prenatal folic acid was associated with a 58% reduction in autism, but had no effect on mental and motor development: a review and meta-analysis**. *Acta Paediatrica*, 2019. DOI: apa.14657. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30466185/>. Acesso em: 20 jun. 2024.

WIŚNIEWIECKA-KOWALNIK, B.; NOWAKOWSKA, B. A. **Genetics and epigenetics of autism spectrum disorder—current evidence in the field**. *Journal of Applied Genetics*, v. 60, p. 37–47, 2019.

WHITE, S. W.; OSWALD, D.; SCAHILL, L. **Anxiety in children and adolescents with autism spectrum disorders**. *Clinical Psychology Review*, v. 29, p. 216–229, 2009. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2692135/>. Acesso em: 20 jun. 2024.

YASUHARA, A. **Correlation between EEG abnormalities and symptoms of autism spectrum disorders (ASD)**. *Brain and Development*, v. 32, p. 791–798, 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20826075/>. Acesso em: 20 jun. 2024.

YU, X.-F.; LI, M.; ZHENG, Y. **Associação entre suplementação materna de folato durante a gestação e risco de TEA na prole: meta-análise**. *Journal of Contemporary Pediatrics*, v. 19, n. 3, p. 286–291, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28302198/>. Acesso em: 20 jun. 2024.

ZHANG, W.; DOHERTY, M. **Efficacy paradox and proportional contextual effect (PCE)**. *Clinical Immunology*, v. 186, p. 82–86, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.clim.2017.07.018>. Acesso em: 12 jul. 2025.

ANEXOS

Anexo A - Biorrepositório

Regulamento ou Regimento de Biorrepositório segundo a Resolução CNS Nº 441, de 12 de maio de 2011

Identificação do projeto de pesquisa: MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE DA METILENOTETRAHIDROFOLATO REDUTASE (MTHFR) EM REPOSTA AO TRATAMENTO CLÍNICO EM CRIANÇAS COM TEA, nome do Pesquisador Responsável e Corresponsável (se houver): Melina Gomes Borges (Responsável) e Dr. Durval Batista Palhares (Corresponsável), localização física (laboratório/setor/departamento/instituição): Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Faculdade de Medicina, Departamento de Pediatria, Laboratório de Patologia Molecular da FAMED. CAAE: 83180424.8.0000.0021; CAAE: 21878619.7.0000.0021. Contato dos pesquisadores: melina.gomes@ufms.br, dbpalhares@hotmail.com

1. **Amostras biológicas:** amostra 1: Raspado de mucosa oral; amostra 2: sangue venoso periférico.

Procedimentos Operacionais: 1 - Coleta da amostra 1 (Raspado de mucosa oral):

Qualificado para esse fim é uma amostra de células escamosas da boca que será obtida através da raspagem não traumática da mucosa da face interna da bochecha (lados direito e esquerdo), utilizando-se técnica padronizada. Esse procedimento será realizado pelo próprio pesquisador e sua equipe no Laboratório de Patologia Molecular da FAMED/UFMS.

2 - Processamento da amostra 1 (Raspado de mucosa oral): Imediatamente após ser obtido, o material do raspado de mucosa oral será acondicionado em *Eppendorf* estéril de 2 ml, devidamente identificado, o qual terá a adição prévia de 0,5 ml de RNA Later, e em seguida será congelado a -20°C. As amostras de mucosa oral serão utilizadas para a extração e quantificação do tRNA (Ácido Ribonucleico total) pela técnica de RT-qPCR (Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa com Transcritase Reversa). A extração e quantificação do rtRNA serão realizadas no Laboratório de Patologia Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. As amostras de mucosa oral de ~200 mg, obtidas de raspado da bochecha, serão colocadas em *RNA later™ Stabilization Solution*, armazenadas em freezer a -20°C por curto período (1 a 3 dias) e então submetidas à extração de RNA total pelo método do TRIZOL, baseado no protocolo do fabricante, com algumas modificações. Resumidamente, o tecido em RNA later será centrifugado previamente a 700g/4°C/10 minutos

(microcentrífuga refrigerada *Eppendorf* 5427 R de bancada); o estabilizador *RNAlater*TM será removido e substituído por 1 ml de Trizol, e o tecido será triturado com esferas magnéticas *MagMAX*, segundo protocolo do fabricante. O RNA total será ressuspensão em 25 µl de água DEPC, quantificado a 260 nm em espectrofotômetro Thermo *Scientific*TM *NanoDrop*TM. As alíquotas serão armazenadas a -20°C para posterior processamento em RT-PCR. Exames de Biologia Molecular (Marcadores de Inflamação e anti-inflamação) serão realizados no Laboratório de Patologia Molecular da faculdade de medicina da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS). **3 - Armazenamento da amostra 1 (Raspado de mucosa oral):** As amostras que não forem completamente processadas e utilizadas na obtenção de dados da pesquisa permanecerão armazenadas no Freezer a - 20°C no Laboratório de Patologia Molecular da FAMED/UFMS, para possíveis estudos posteriores.

1 – Coleta da amostra 2 (sangue venoso periférico): Exames de Sangue (Marcador Inflamatório) será realizado no Laboratório de Análises Clínicas do HUMAP: homocisteína. O sangue venoso será coletado de uma das veias do antebraço (direito ou esquerdo) através de punção simples (técnica padronizada) realizada por um dos técnicos do Laboratório de Análises Clínicas do HUMAP (fluxo já acordado com aquele setor). No mesmo momento da coleta de sangue para os exames listados acima, será coletado 0,5 mL de sangue, que imediatamente heparinizado, será acondicionado num microtubo (*Eppendorf*) com capacidade de 2,0 mL, ao qual será adicionado 0,5 mL de um estabilizador do RNA (RNA Later). O sangue adicionado neste microtubo com RNA Later, deverá ser bem homogeneizado, e será utilizado para determinar a expressão de alguns genes inflamatórios e anti-inflamatórios pela técnica de RT-qPCR, a saber: A - Biomarcadores inflamatórios: Interleucina 6. **2 - Processamento da amostra 2 (sangue venoso periférico):** O processamento ocorrerá no Laboratório de Análises Clínicas do HUMAP, sendo que para cada exame será aplicada a técnica padrão utilizada naquele laboratório. **3 - Armazenamento da amostra 2 (sangue venoso periférico):** As amostras que não forem completamente processadas e utilizadas na obtenção de dados da pesquisa permanecerão armazenadas no Freezer a - 20°C no Laboratório de Patologia Molecular da FAMED/UFMS, para possíveis estudos posteriores.

Gerenciamento: O gerenciamento do material biológico humano armazenado em Biorrepositório será de responsabilidade do pesquisador e atenderá as seguintes diretrizes: 1 – Segurança: Será garantida devido o laboratório de Patologia Molecular possuir senha em sua porta de entrada, e somente o pesquisador responsável e sua equipe possuem a senha. 2 -

Condições de armazenamento: Serão atendidas utilizando-se de técnicas que atendem às melhores práticas padronizadas utilizadas em laboratórios de pesquisa clínica. 3 - Fornecimento de energia contínuo: Será atendido devido a existência de NoBreaks acoplados ao freezer – 20°C. 4 - Sistema de gerenciamento de informações do laboratório: Será atendido utilizando-se de planilhas eletrônicas e físicas onde serão registrados todos os passos e dados da pesquisa. 5 - Verificação do Termo de Consentimento: Será atendido pois os TCLE e TALE serão guardados no cofre pessoal do pesquisador cuja senha somente ele tem acesso. 6 - Controle do tempo de armazenamento: Será atendido obedecendo os protocolos de utilização de materiais biológicos sob preservação térmica. 7 - Procedimentos de destruição: Será atendido pois o pesquisador e sua equipe pretendem destruir o material biológico em preservação após 5 anos, se não for reutilizado. 8 - Custódia das amostras: Será atendida com procedimentos de segurança e controle de

1. acesso já descritos acima. Caso haja necessidade de entrar em contato para tratar sobre os materiais acondicionados deverá comunicar via e-mail melina.gomes@ufms.br ou pelo telefone (61)99955-5335.
2. Direitos dos participantes de pesquisa (O pesquisador reconhece e concorda com as diretrizes contidas nos itens 4.1 até 4.5):
 - 1.1. O material biológico humano armazenado no Biorrepositório é do participante da pesquisa, permanecendo sua guarda sob a responsabilidade institucional;
 - 1.2. O participante da pesquisa, ou seu representante legal, a qualquer tempo e sem quaisquer ônus ou prejuízos, pode retirar o consentimento de guarda e utilização do material biológico armazenado no Biorrepositório, valendo a desistência a partir da data de formalização desta;
 - 1.3. A retirada do consentimento deverá ser formalizada por manifestação, por escrito e assinada, pelo participante da pesquisa ou seu representante legal, cabendo-lhe a devolução das amostras existentes se este for seu desejo;
 - 1.4. O participante da pesquisa deverá ser informado sobre a perda ou destruição de suas amostras biológicas, bem como sobre o encerramento do Biorrepositório, quando for o caso; e
 - 1.5. Impossibilidade de patenteamento ou a utilização comercial de material biológico humano armazenado no Biorrepositório.

2. Prazo de armazenamento das amostras (O pesquisador reconhece e concorda com as diretrizes contidas a seguir):

O prazo de armazenamento de material biológico humano em Biorrepositório deve estar de acordo com o cronograma da pesquisa correspondente e pode ser autorizado por até 10 (dez) anos. Renovações da autorização de armazenamento são permitidas mediante solicitação do pesquisador responsável, ao Comitê de Ética em Pesquisa da UFMS, acompanhada de justificativa e relatório das atividades de pesquisa desenvolvidas com o material durante o período.

3. **Destinação das amostras ao final do período de realização da pesquisa (O pesquisador reconhece e concorda com as diretrizes contidas a seguir):** o material biológico humano armazenado no Biorrepositório será transferido formalmente para outro Biorrepositório ou Biobanco, mediante aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMS ou será descartado, conforme normas vigentes de órgãos técnicos competentes, e de acordo com o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), respeitando-se a confidencialidade e a autonomia do participante da pesquisa.

4. **Pesquisa envolvendo mais de uma instituição (O pesquisador reconhece e concorda com as diretrizes contidas a seguir):** deve haver acordo firmado entre as instituições participantes, contemplando formas de operacionalização, compartilhamento e utilização do material biológico humano armazenado no Biorrepositório, inclusive a possibilidade de dissolução futura da parceria e a consequente partilha e destinação dos dados e materiais armazenados, conforme previsto no TCLE. É necessário explicitar o tipo e a quantidade dos materiais compartilhados, informando sua destinação após a utilização.

Biorrepositório a ser utilizado por instituição estrangeira (O pesquisador reconhece e concorda com as diretrizes contidas a seguir):

- 4.1. Deverão ser obedecidas as normas nacionais e internacionais para remessa de material e será apresentado o regulamento da instituição destinatária (no exterior) para análise do Sistema CEP/CONEP quanto ao atendimento dos requisitos da Resolução CNS N° 441/2011;
- 4.2. O pesquisador e a instituição brasileiros terão direito ao acesso e a utilização, em pesquisas futuras, do material biológico humano armazenado no exterior, não necessariamente das amostras depositadas pelo pesquisador, garantida, no mínimo, a proporcionalidade da participação;

- 4.3. Garantia do direito de acesso e utilização das amostras, informações associadas e resultados incorporados ao banco, obtidos em pesquisas aprovadas pelo Sistema CEP/CONEP;
- 4.4. Os direitos relativos ao material biológico humano armazenado no exterior não são considerados exclusivos de Estado ou instituição;
- 4.5. A utilização de amostras de brasileiros armazenadas no exterior somente poderá se realizar-se observado o artigo 5º da Resolução CNS Nº 441/2011 e com a participação de pesquisador e/ou instituição brasileira; e
- 4.6. A instituição destinatária no exterior se compromete a respeitar a legislação brasileira, em especial a vedação do patenteamento e da utilização comercial de material biológico humano.

Anexo B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)**Termo de Consentimento Livre e Esclarecido****Nome do voluntário:** _____

Idade: _____ anos.

Nome do responsável: _____

R.G. _____ CPF: _____

Grau de parentesco: _____

Seu(sua) filho(a) está sendo convidado(a) para, sob sua responsabilidade, participar do projeto de pesquisa: "Resposta das habilidades sociais, comportamentais e comunicativas em pacientes com diagnóstico de Transtorno do Espectro Autista (TEA) com a utilização de um bioflavanoide" (Hesperetin 7-O-rutinoside; nome fantasia: HSP), coordenado por Durval Batista Palhares, médico pediatra e pesquisador da UFMS (Universidade Federal de Mato Grosso do Sul), que pode ser contatado pelo celular nº (67) 9998-21927, e-mail: dbpalhares@hotmail.com, ou no endereço profissional: Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian, Av. Senador Filinto Muller, 355, Vila Ipiranga, Campo Grande/MS. Este projeto foi previamente avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFMS que, em caso de recurso, dúvidas ou reclamações, pode ser contatado pelo telefone (67) 3345-7187, pelo e-mail: cepconep.propp@ufms.br, ou diretamente no campus da UFMS, localizado na Av. Costa e Silva, s/n – Prédio das Pró-Reitorias, 1º andar – sala do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos-CEP, Campo Grande/MS.

Outros profissionais, como psicólogas, neuropediatra, farmacêutica e geneticista, também participarão do estudo como pesquisadores. A pesquisa conta com dois grupos. Durante 120 dias, um grupo receberá a medicação chamada de HSP, e o outro grupo receberá uma cápsula placebo, ou seja, sem efeito nenhum. O grupo do qual sua criança vai participar será decidido por sorteio, assim, podemos garantir que a divisão dos grupos não será influenciada por características físicas, culturais ou sociais, da criança ou de seus familiares. Tanto você como o pesquisador só saberão se estão no grupo da medicação ou do placebo no final do estudo. Mas, garantimos que ao final do estudo, o grupo tratado com o placebo receberá a mesma quantidade da medicação, pelo mesmo período (120 dias).

Para termos certeza de que durante a pesquisa a medicação não provocará efeitos indesejados, será preciso que a sua criança participe com a doação de pequenas

Rubrica do responsável: _____

Rubrica do pesquisador: _____

amostras de sangue para a realização de alguns exames laboratoriais em duas ocasiões: antes da pesquisa, e após 4 meses. A HSP é um composto natural, com importante efeito anti-inflamatório. Por isso, a partir das amostras de sangue coletadas, também serão realizados estudos moleculares, quando serão investigados os mRNA (RNA mensageiros) de genes normalmente envolvidos nos processos inflamatórios desenvolvidos no organismo: Interleucina-6, procalcitonina, Interleucina-10 e TNF-alfa. O que desejamos saber é se no TEA existe alguma alteração na expressão desses genes (maior ou menor expressão) antes e depois do tratamento, que possa explicar o resultado esperado com o uso da HSP.

As coletas e análises do sangue serão realizadas no laboratório geral do Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian, mediante apresentação da carteira do SUS e registro de prontuário na instituição, bem como a solicitação dos exames, sem custo para os participantes. No período da pesquisa, a criança será avaliada clinicamente pelo pesquisador nas dependências ambulatoriais do mesmo hospital e, ainda, participará de dois encontros com psicólogas habilitadas para a investigação de sintomas do TEA, na Clínica Espaço Intervenção Comportamental, localizada na rua General Odorico Quadros, número 312, Centro, Campo Grande, MS. A medicação ou o placebo serão disponibilizados gratuitamente durante o tempo do estudo, ou seja, por 120 dias. Assim também, as avaliações clínicas e psicológicas serão realizadas sem custos neste período. Havendo necessidade de despesas financeiras por parte do participante referentes a alguma das situações acima elas serão ressarcidas pelo pesquisador, mediante comprovação da despesa. Da mesma forma, eventuais danos comprovadamente decorrentes da pesquisa serão devidamente indenizados.

Nossa hipótese é de que a HSP pode melhorar a comunicação e os relacionamentos sociais de crianças com TEA. Esta medicação habitualmente não apresenta efeitos colaterais, mas ao surgimento de qualquer desconforto, tais como dor de cabeça, diarreia, dor abdominal ou qualquer outro sintoma indesejado durante a pesquisa, a ingestão das cápsulas deverá ser interrompida e o pesquisador responsável deverá ser contatado para prestar os devidos cuidados.

Durante o período desta pesquisa, para atingirmos resultados fieis e verdadeiros, solicitamos que a criança não inicie qualquer outro tipo de intervenção terapêutica diferente da HSP (medicamentos, dietas restritivas, tratamento psicológico e outras terapias) sem o conhecimento do pesquisador responsável. Pedimos também que vocês não participem de outra pesquisa ao mesmo tempo. O não cumprimento desta condição

Rubrica do responsável: _____

Rubrica do pesquisador: _____

levará ao automático desligamento da pesquisa, sem penalização alguma para o tratamento que lhe foi proposto. De qualquer maneira vocês podem desistir de participar da nossa pesquisa a qualquer momento e solicitar o seu desligamento, sem qualquer ônus para ambas as partes.

Encerrado o tempo da pesquisa, depois de toda a coleta e análise dos dados, vocês terão acesso aos resultados gerais da pesquisa, bem como aos resultados específicos de seu filho, se assim desejarem. Não serão registrados imagem e/ou voz. Pretendemos publicar os resultados em revista científica, mas garantimos total sigilo das informações pessoais, de modo que nenhuma criança possa ser identificada. Ressaltamos que todos os dados coletados para esta pesquisa (informações pessoais, resultados de exames e avaliações clínicas e psicológicas) serão tratados com respeito e usados apenas para interpretar o resultado do tratamento. Serão de acesso exclusivo para os profissionais diretamente envolvidos na pesquisa e não serão disponibilizados para terceiros, mesmo depois de encerrada a pesquisa.

Este termo será preenchido e assinado em duas vias, ficando uma com o pesquisador principal e outra com você, como responsável legal.

Eu, _____, RG nº _____, declaro ter sido informado(a) e esclarecido(a), e concordo voluntariamente com a participação do(a) menor _____ no projeto de pesquisa acima descrito.

Campo Grande _____ de _____ de _____.

Assinatura do responsável legal

Assinatura do pesquisador responsável

Assinatura da testemunha

Rubrica do responsável: _____

Rubrica do pesquisador: _____



Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)
(Destinado aos responsáveis legais dos pacientes)

Nome do voluntário: _____
 Data de nascimento: ____/____/____ Idade: ____ anos, ____ meses.
 Nome do responsável legal: _____

 R.G (Resp.): _____ CPF (Resp.): _____
 Grau de parentesco com o voluntário: _____
 Endereço do responsável legal: _____

 Telefone 1: () _____; Telefone 2: () _____
 E-Mail: _____

PESQUISADORA RESPONSÁVEL: MELINA GOMES BORGES.

A pesquisa tem como objetivo determinar a prevalência da mutação da enzima MTHFR 677 C>T, interleucina-6 elevada, e homocisteinemia em crianças com Transtorno do Espectro Autista.

A pessoa pela qual o(a) senhor(a) é responsável está sendo convidada a participar da pesquisa intitulada "DETERMINAÇÃO MOLECULAR DA PREVALÊNCIA DA ENZIMA MUTADA MTHFR677T, EXPRESSÃO DA INTERLEUCINA 6 E PERFIL DA HOMOCISTEINEMIA EM UMA POPULAÇÃO DE CRIANÇAS COM TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA E CRIANÇAS TÍPICAS".

O convite para a participação desse estudo se deve ao fato da sua criança ou pré-adolescente (assinale ao campo que condiz com a sua realidade):

☐ ter sido diagnosticada com Transtorno do Espectro Autista (TEA) e ter idade entre 2 e 14 anos incompletos

☐ ser uma criança típica, ou seja, não possuir diagnóstico de Transtorno do Espectro Autista (TEA) e ter idade entre 2 e 14 anos incompletos.

Rubrica do(a) responsável pelo participante: _____

Rubrica da pesquisadora: _____

A participação da criança/pré-adolescente é **VOLUNTÁRIA**. Antes de decidir, é importante que a compreensão dos objetivos, dos procedimentos e seus direitos, como responsável e do próprio participante. Serão garantidas a confidencialidade e a privacidade das informações prestadas pelo(a) participante e pelo senhor(a). Qualquer dado que possa identificar o participante ou seu responsável será omitido na divulgação dos resultados da pesquisa, e o material será armazenado em local seguro.

Confidencialidade

Os procedimentos adotados nesta pesquisa obedecem aos critérios da ética em pesquisa com seres humanos e prevê a possibilidade de indenização conforme a Resolução n. 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde. Nenhum dos procedimentos realizados oferecem riscos à sua dignidade. Todas as informações coletadas neste estudo são estritamente confidenciais, somente a pesquisadora e a equipe de pesquisa Durval Batista Palhares e Almir Souza Martins, terão conhecimento dos dados.

1. Esclarecimento dos termos técnicos do objetivo do estudo:

- **Interleucina-6 (IL-6):** Substância do sistema imunológico que combate infecções e inflamações. Se você estiver alto por muito tempo, pode causar inflamação crônica e aumentar o risco de doenças cardíacas, diabetes e problemas cerebrais.
- **Homocisteína:** Substância produzida quando o corpo digere proteínas. Em excesso, pode prejudicar os vasos sanguíneos e aumentar o risco de doenças cardíacas. Em pessoas com autismo, níveis elevados podem estar ligados a mudanças no desenvolvimento neurológico.
- **Homocisteinemia:** Quando a homocisteína está acima do normal, o que pode ocorrer por dificuldades no uso de vitaminas como B9 e B12. Isso pode causar problemas no coração, inflamações e até afetar o cérebro.
- **Mutação da enzima MTHFR 677 C>T:** Alteração genética que pode dificultar o uso do ácido fólico (vitamina B9) e a quebra da homocisteína, causando acúmulo no sangue.
- **Enzima:** Proteína que acelera processos químicos no corpo, tornando funções mais rápidas e eficientes.
- **Análise genômica de DNA:** Estudo do material genético completo de uma pessoa para identificar genes, mutações e predisposição a doenças.
- **Análise de fragmento de RNA com gene específico:** Exame que verifica se um gene está "ligado" ou "desligado".

2. Procedimentos

Locais de referência:

- UFMS/FAMED: Universidade Federal do Mato Grosso do Sul / Faculdade de Medicina
- HUMAP: Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian
- LAC: Laboratório de Análises Clínicas

As entrevistas ocorrerão no ambulatório de pediatria do HUMAP e as coletas de células escamosas da boca (CEB) e sangue serão realizadas no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian LAC/HUMAP/EBSERH, ambos os procedimentos poderão acontecer nos turnos matutino ou vespertino, com agendamento prévio, via contato telefônico. Será solicitado que sempre o responsável legal do(a) paciente permaneça a todo momento junto da criança/adolescente, durante as realizações dos procedimentos. As coletas de sangue e células da bochecha serão feitas apenas uma vez.

ETAPAS:

- **Entrevista → Tempo de duração: 30 a 40 minutos.**
O(a) responsável pela criança/adolescente deverá assinar este TCLE – Termo de Consentimento Livre Esclarecido, preencher uma ficha de anamnese contendo dados gestacionais, dados clínicos do(a) paciente e, caso o(a) paciente seja portador do TEA, deverá preencher a ficha *Mayo Clinic* adaptada. O(a) paciente com idade entre 7 anos e 14 anos incompletos deverá assinar o TALE – Termo de Assentimento Livre Esclarecido, desde que tenha clareza e capacidade de entendimento.
- **Coleta de células escamosas da boca (CEB): para análise do gene *MTHFR* 677 C>T.**
→ Tempo de duração: 5 a 10 minutos.
- Paciente típico e TEA.
A coleta de raspado de células escamosas da boca (CEB) será realizada pela equipe de pesquisa e pesquisadora. Esses materiais biológicos servirão para estudos de **biologia molecular (Análise genômica de DNA) do gene *MTHFR* (Análise de fragmento de RNA com gene específico)**. O estudo destes biomarcadores é importante para aquisição de novos conhecimentos, publicações em revistas de cunho científico, orientações específicas aos responsáveis legais dos pacientes, etc.
- **Coleta de sangue: para análise dos níveis de homocisteína e dosagem de interleucina-6.**
→ Tempo de duração: aproximadamente 20 a 30 minutos.
- Somente em paciente TEA.

Rubrica do(a) responsável pelo participante: _____

Rubrica da pesquisadora: _____

A coleta de sangue será realizada pelos técnicos em coleta do Laboratório de Análises Clínicas do HUMAP (pessoal treinado e qualificado para esse tipo de coleta), e supervisionada pela pesquisadora. Não há necessidade de jejum para realização deste exame.

3. Riscos

Durante a coleta de sangue, podem ocorrer pequenos hematomas, dor ou sangramento no local da punção. Para reduzir esses riscos, o profissional seguirá técnicas de segurança, como inserir corretamente a agulha na veia, manter o material estável e pressionar o local após a coleta. Já a coleta de saliva, será realizada com o uso de um abaivador de língua de madeira esterilizado (processo que elimina **todos os microrganismos**, como bactérias, vírus e fungos), fazendo uma raspagem no interior das bochechas dos dois lados (direito e esquerdo) e, como pode ter risco de contaminação, será feito o uso de materiais estéreis e técnicas adequadas. Caso ocorra algum problema, a equipe de pesquisa, **prestará atendimento imediato gratuito** no pronto atendimento do HUMAP.

4. Uso das Amostras Biológicas

Apenas as análises descritas neste termo serão realizadas, ou seja, **análises de biologia molecular (análise de fragmento de RNA específico e análise genômica) por meio do material colhido de células escamosas bucais e exames laboratoriais do sangue**. As amostras biológicas só poderão ser utilizadas em pesquisas futuras, desde que previamente sejam aprovadas novamente pelo Sistema CEP/Conep, portanto, mesmo que o material permaneça guardado no biorrepositório, **não poderão ser utilizados** e, para cada nova pesquisa, será necessário um novo projeto aprovado e um novo consentimento assinado pelo participante ou, quando justificado, a obtenção de dispensa do Termo pelo Comitê.

5. Armazenamento de dados

O material biológico do(a) paciente poderá ser armazenado no biorrepositório por até 10 anos. Estes ficarão armazenados no Brasil, cidade de Campo Grande – MS, na Universidade Federal do Mato Grosso do Sul. Os dados genéticos gerados a partir dessa análise serão armazenados no próprio laboratório que as análises serão feitas (Laboratório de Patologia Molecular), localizado na faculdade de medicina da UFMS. Para isso, solicitamos sua autorização expressa sobre o armazenamento desses dados. Por favor, marque uma das opções abaixo.

- [] Autorizo o armazenamento dos meus dados genéticos no laboratório de patologia molecular.
 [] **NÃO** autorizo o armazenamento dos meus dados genéticos no laboratório de patologia molecular.

Rubrica do(a) responsável pelo participante: _____

Rubrica da pesquisadora: _____

6. Acesso aos Resultados

A pesquisadora responsável garantirá o acesso a **TODOS** os resultados dos exames ao seu médico ou a você, sempre que solicitado e/ou indicado, ou seja, os exames incluídos a serem disponibilizados são: [1] exame de sangue constando os níveis de homocisteína; [2] exames de sangue contendo a dosagem de interleucina-6 (IL-6); [3] os exames de biologia molecular – [3.1] o resultado do perfil molecular do fragmento de RNA; [3.2] o resultado da análise genômica, caso seja realizada.

7. Direito de Retirada

A sua participação é voluntária e o(a) senhor(a) e sua criança/adolescente podem desistir a qualquer momento, sem prejuízo aos participantes. Caso deseje retirar seu consentimento para a guarda das amostras biológicas e dos dados genéticos, essa solicitação deverá ser feita **POR ESCRITO E ASSINADA**, com validade a partir da data da comunicação da decisão. Após a retirada do consentimento, todas as suas amostras biológicas serão **DEVOLVIDAS OU DESTRUÍDAS**.

8. Assistência e Custos

Caso haja qualquer dano decorrente da pesquisa, o(a) paciente terá direito à assistência integral e gratuita pelo tempo que for necessário.

O(a) senhor(a) e sua criança/adolescente não terão nenhum custo com os procedimentos e exames durante a realização do estudo, todas as despesas tidas com a pesquisa serão de responsabilidade do pesquisador responsável/patrocinador.

9. Acesso a Dados de Prontuário

Caso seja necessário, solicitamos sua autorização para acessar e utilizar os dados do prontuário médico do(a) paciente. Isso nos permitirá preencher os questionários com maior precisão e confiabilidade, assegurando a qualidade das informações coletadas para a pesquisa.

[☐] Autorizo o acesso e utilização de dados do prontuário médico do(a) paciente.

[☐] NÃO autorizo o acesso e utilização de dados do prontuário médico do(a) paciente.

O Comitê Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) é um órgão que garante a segurança e os direitos das pessoas que participam de pesquisas científicas no Brasil. Ele analisa e aprova estudos que envolvem seres humanos, verificando se as pesquisas estão de acordo com as regras éticas e se não colocam os participantes em risco. Além disso, o CONEP garante que os participantes recebam todas as informações necessárias antes de aceitarem participar e que possam sair do estudo a qualquer momento, sem prejuízo.

Rubrica do(a) responsável pelo participante: _____

Rubrica da pesquisadora: _____

Ou seja, sua função principal é proteger os voluntários das pesquisas e garantir que os estudos sejam feitos de forma ética e responsável.

Em caso de dúvida sobre seus direitos e/ou questões éticas de sua participação na pesquisa, você poderá contatar, de maneira independente:

1. CONEP, endereço: SRTVN - Via W 5 Norte - Edifício PO700 - Quadra 701, Lote D - 5º andar - Asa Norte, CEP 70719-040, Brasília (DF); Telefone: (61) 3315-5877. Horário de atendimento: 09h às 18h.

2. Comitê de Ética com Seres Humanos da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, no endereço Av. Costa e Silva, s/nº | Bairro Universitário, Campus da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, prédio das Pró-Reitorias Hércules Maymone, 1º andar, CEP: 79070900. Campo Grande-MS. e-mail: cepconep.propp@ufms.br; telefone: 3345-7187; atendimento ao público: 07:30-11:30 no período matutino e das 13:30 às 17:30 no período vespertino.

3. CEP – Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (HUMAP). Contato: (067) 3345-3078. Vila Piratininga.CEP:79080-190. Campo Grande – MS.

4. Pesquisadora: e-mail: melinagb24@hotmail.com. Contato telefônico: (61) 99955-5335. Endereço: Travessa Newton Cavalcanti, casa 251, Amambai. Campo Grande – MS. CEP: 79005-720.

Declaro que fui informado(a) sobre os objetivos, procedimentos, riscos e benefícios deste estudo. Concordo voluntariamente em participar e autorizo a coleta e utilização das amostras biológicas conforme descrito neste documento.

Campo Grande - MS, _____ de _____ de _____

Assinatura do pesquisador

Assinatura do responsável legal

Anexo C – Termo de Assentimento Livre e Esclarecido (TALE)



Termo de Assentimento Livre Esclarecido (TALE)

(Texto adaptado para a faixa etária de 7 a 9 anos)

Nome do voluntário: _____

Data de nascimento: ____/____/____ Idade: _____ anos, _____ meses.

Nome do responsável legal: _____

R.G (Resp.): _____ CPF (Resp.): _____

Grau de parentesco com o voluntário: _____

Endereço do responsável legal: _____

Telefone 1: () _____; Telefone 2: () _____

E-Mail: _____

PESQUISADORA RESPONSÁVEL: MELINA GOMES BORGES.

Ola!

Meu nome é Melina e eu estudo na Universidade Federal do Mato Grosso do Sul. Eu pesquiso sobre a saúde das crianças e quero te convidar para participar do meu estudo. Você e outras crianças serão muito importantes! Vamos aprender mais sobre crianças autistas. Você sabe o que é autismo?



Ilustração: João Pedro Rodrigues da Costa – Estudante atendido pelo CREAM/TEA (2019)

O autismo é um jeito diferente de ver e sentir o mundo. Algumas crianças com autismo podem ser mais sensíveis a sons, luzes ou toques. Elas também podem ter interesses especiais ou aprender de um jeito único. Cada criança é especial e tem seu próprio jeito de ser!

Como funciona a pesquisa?

Se você quiser participar, converse com seus pais. Se aceitar, marque um X:

- [] Tenho autismo e tenho entre 7 e 14 anos incompletos.
- [] Não tenho autismo e tenho entre 7 e 14 anos incompletos.

Rubrica do(a) participante: _____

Rubrica da pesquisadora: _____

A participação é **VOLUNTÁRIA**. Isso significa que você pode participar ou não. Se decidir participar, vou cuidar do seu nome e de tudo o que você contar com segurança. Se tiver dúvida pode perguntar!

Vamos entender mais sobre o trabalho?

O nome dessa pesquisa é **"DETERMINAÇÃO MOLECULAR DA PREVALÊNCIA DA ENZIMA MUTADA MTHFR C677T, EXPRESSÃO DA INTERLEUCINA 6 E PERFIL DA HOMOCISTEINEMIA EM UMA POPULAÇÃO DE CRIANÇAS COM TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA E CRIANÇAS TÍPICAS"**

Queremos aprender mais sobre o autismo. Para isso, vamos estudar algumas coisas do seu corpo. Vou te explicar o que significa alguns nomes difíceis:

- **Interleucina-6** = Uma substância que ajuda o corpo a se proteger.
- **Homocisteína** = Vem de proteínas, como carne vermelha. Em grande quantidade, pode não ser bom para o coração e o cérebro.
- **Mutação da enzima MTHFR 677 C>T** = o nosso corpo tem uns códigos que fazem tudo funcionar direito, mas se algum código tiver com defeito, algumas tarefas não vão funcionar bem.
- **Enzima** = é uma ferramenta para deixar uma atividade mais rápida.
- **DNA** = o nosso código é bem grande, para saber se esse código pode estar com problema, essa análise precisa ser feita.

Agora vou te contar onde e como tudo isso vai acontecer:

- Tudo será feito no Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian (HUMAP).

Quando vai acontecer?

- As coletas podem ser feitas de manhã ou à tarde, no horário que for melhor para você e sua família.
- Por telefone, combinei com seu pai ou sua mãe um horário que funcione bem para todos.

Quem precisa estar com você?

- Seu pai ou sua mãe (ou outro responsável) precisa estar com você o tempo todo durante a entrevista e as coletas.

Quantas vezes isso vai acontecer?

- As coletas de sangue e células da bochecha serão feitas apenas uma vez. Não precisa se preocupar!

O que vai acontecer?

- Primeiro, vamos ter uma conversa simples para conhecer você melhor.



Ilustração: Dreamstime.com

Rubrica do(a) participante: _____

Rubrica da pesquisadora: _____

- Depois vai ser a coletar células da bochecha: Usaremos um palito parecido com um de picolé para pegar algumas células da sua bochecha. É rápido e não dói!

- E por último vamos coletar sangue, mas só se for uma criança com autismo.

- Para a coleta de sangue não precisa ter medo. Vai ser rápido e bem tranquilo, seu pai ou sua mãe estarão com você o tempo todo.

Isso será feito no Laboratório de Análises Clínicas do HUMAP.



Ilustração: iStock.com



Ilustração: Shutterstock.com

VAMOS VER MAIS DETALHES DESSE QUEBRA-CABEÇA?



Ilustração: iStock.com

PASSO 1:

Entrevista

Duração: 30 a 40 minutos

Quem participa? Pais ou mãe, e a criança.

A pessoa que cuida de você (sua mãe e seu pai) vai preencher um formulário e vamos medir sua altura, peso, batimento do coração.

PASSO 2:

Coleta de células escamosas da boca (CEB)

Duração: 5 a 10 minutos

Quem participa? Crianças/pré-adolescentes típicas e com TEA

Com o palito limpo, vamos passar dentro da boca nas duas bochechas para poder ver os códigos do corpo.

PASSO 3:

Coleta de sangue

Duração: 20 a 30 minutos

Quem participa? Só crianças/pré-adolescentes com TEA

Vai ser bem pouca a quantidade de sangue e vai ajudar bastante no nosso estudo.

Rubrica do(a) participante: _____

Rubrica da pesquisadora: _____

Riscos

Tudo vai ser com bastante cuidado! Quando tirar o sangue pode ficar roxinho ou inchado. Os(as) enfermeiras vão ajudar com o que precisar.

E para pegar as células da bochecha não vai doer! Vamos usar materiais limpos e técnicas seguras, com uso de máscaras e luvas.

Se acontecer algum problema, a equipe de pesquisa estará pronta para ajudar e, se precisar, você vai ser atendido no pronto atendimento do hospital (HUMAP).



Ilustração: Vecteezy.com

E depois? O que vai acontecer?

- Os resultados serão entregues para você e seus pais, é seu direito!
- Seu material vai ser guardado em um local seguro, chamado de biorrepositório, por pelo menos 10 anos e, só pode usar se seus pais deixarem. Seu pai ou mãe vai marcar um 'X' no item 3 do Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE) para permitir ou não esse acesso.
- Você pode mudar de ideia, se quiser sair da pesquisa, é só avisar seus pais!



Ilustração: mendia.com

Assistência e Custos

Se acontecer algum problema por causa da pesquisa, você vai ter ajuda, de graça, pelo tempo que precisar. Você e sua família não precisam pagar nada pelos exames e procedimentos do estudo.

Acesso ao prontuário médico

Como você é menor de idade, seu pai ou mãe é quem decide se a pesquisadora pode olhar seu prontuário médico. Se precisar, seu pai ou mãe irá marcar um 'X' no item 9 do Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE) para permitir ou não esse acesso.

Rubrica do(a) participante: _____

Rubrica da pesquisadora: _____

Quem cuida da segurança das pesquisas?

O CONEP (Comitê Nacional de Ética em Pesquisa) é um grupo de pessoas que cuida para que todas as pesquisas feitas com pessoas no Brasil sejam seguras e justas, dentro das regras. E, se você mudar de ideia, pode sair da pesquisa quando quiser, sem nenhum problema.

Junto com seus pais, se você tiver dúvidas sobre seus direitos na pesquisa ou quiser mais informações, pode falar com o(a):

1. CONEP, endereço: SRTVN - Via W 3 Norte - Edifício PO700 - Quadra 701, Lote D - 5º andar - Asa Norte, CEP 70719-040, Brasília (DF); Telefone: (61) 3315-5877. Horário de atendimento: 09h às 18h.
2. Comitê de Ética com Seres Humanos da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, no endereço Av. Costa e Silva, s/nº | Bairro Universitário, Campus da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, prédio das Pró-Reitorias Hércules Maymone, 1º andar, CEP: 79070-900. Campo Grande-MS. e-mail: cepconep.propp@ufms.br; telefone: 3345-7187; atendimento ao público: 07:30-11:30 no período matutino e das 13:30 às 17:30 no período vespertino.
3. CEP – Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (HUMAP). Contato: (067) 3345-3078. Vila Piratininga.CEP:79080-190. Campo Grande – MS.
4. Pesquisadora: e-mail: melinagb24@hotmail.com. Contato telefônico: (61) 99955-5335. Endereço: Travessa Newton Cavalcanti, casa 251, Amambai. Campo Grande – MS. CEP: 79005-720.

Eu entendi para que serve esta pesquisa, como ela será feita, quais são os cuidados e os benefícios. Eu quero participar e deixar que usem as minhas amostras, como foi explicado neste documento.

Campo Grande - MS, _____ de _____ de _____.

Assinatura do pesquisador

Assinatura do(a) participante

Anexo D – Composto farmacológico**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de
Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT****Número do Processo:** BR 10 2021 019751 0**Dados do Depositante (71)**

Depositante 1 de 3**Nome ou Razão Social:** MARIA JOSE MARTINS MALDONADO**Tipo de Pessoa:** Pessoa Física**CPF/CNPJ:** 35656239187**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Física:** Dirigente, presidente e diretor de empresa industrial, comercial ou prestadora de serviços**Endereço:** RUA RUI BARBOSA 4112 CENTRO**Cidade:** Campo Grande**Estado:** MS**CEP:** 79002-364**País:** Brasil**Telefone:****Fax:**

ANEXO E – Procedimentos operacionais do laboratório

Organizando amostras de sangue de 2020 a 2022

1a COLETA	ng/ml	2a COLETA	ng/ml												
AUT01	57,4	AUT01	NC												
AUT02	57,7	AUT02	NC												
AUT03	26,8	AUT03	NC												
AUT04	24,4	AUT04	31,2												
AUT05	36,6	AUT05	24,2												
AUT06	33,4	AUT06	24,2												
AUT07	52,2	AUT07	47,5												
AUT08	52,1	AUT08	23,5												
AUT09	39,5	AUT09	21,1												
AUT10	38,7	AUT10	37,2												
AUT11	41,7	AUT11	20												
AUT12	49,2	AUT12	NC												
AUT13	45	AUT13	NC												
AUT14	46,8	AUT14	NC												
AUT15	57,6	AUT15	NC												
AUT16	31,9	AUT16	25,7												
AUT17	43	AUT17	NC												
AUT18	29,9	AUT18	24												
AUT19	37,2	AUT19	58,7												
AUT20	27,9	AUT20	25												
AUT21	43,6	AUT21	NC												
AUT22	78,7	AUT22	16,6												
AUT23	51,2	AUT23	NC												
AUT24	55,6	AUT24	17,6												
AUT25	51,9	AUT25	37,2												
AUT26	51,6	AUT26	29,2												
AUT27	29,3	AUT27	12,0												
AUT28	49,8	AUT28	18,9												
AUT29	34,3	AUT29	NC												
AUT30	49,5	AUT30	34,5												
AUT31	54,2	AUT31	16,3												
AUT32	29,7	AUT32	NC												
AUT33	52	AUT33	NC												
AUT34	33,5	AUT34	21,5												
AUT35	51,7	AUT35	17,9												
AUT36	49,8	AUT36	20,6												
AUT37	47,8	AUT37	22,9												
AUT38	46,1	AUT38	75,2												
AUT39	ECISA EXTRAIR	AUT39	NC												
AUT40	ECISA EXTRAIR	AUT40	37,2												

MÉDIA 44,46

NC = NÃO COLETADO

NT = não tratado

PLAC = PLACEBO

A = 1a coleta

B = 2a coleta

amarelo = placebo

azul = tratamento

Anexo F - Informações obtidas no GenBank

PREDICTED: Homo sapiens methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR), transcript variant X9, mRNA

NCBI Reference Sequence: XM_054336707.1

FASTA Graphics

Go to:

LOCUS XM_054336707 6801 bp mRNA linear PRI 05-OCT-2023

DEFINITION PREDICTED: Homo sapiens methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR), transcript variant X9, mRNA.

ACCESSION XM_054336707

VERSION XM_054336707.1

DBLINK BioProject: PRJNA807723

KEYWORDS RefSeq.

SOURCE Homo sapiens (human)

ORGANISM Homo sapiens

Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini; Catarrhini; Hominidae; Homo.

COMMENT MODEL REFSEQ: This record is predicted by automated computational analysis. This record is derived from a genomic sequence (NC_060925) annotated using gene prediction method: Gnomon, supported by mRNA and EST evidence.

Also see:

Documentation of NCBI's Annotation Process

##Genome-Annotation-Data-START##

Annotation Provider :: NCBI RefSeq

Annotation Status :: Updated annotation

Annotation Name :: GCF_009914755.1-RS_2023_10

Annotation Pipeline :: NCBI eukaryotic genome annotation pipeline

Annotation Software Version :: 10.2

Annotation Method :: Best-placed RefSeq; Gnomon; RefSeqFE; cmsearch; tRNAscan-SE

Features Annotated :: Gene; mRNA; CDS; ncRNA

Annotation Date :: 10/02/2023

##Genome-Annotation-Data-END##

FEATURES	Location/Qualifiers
source	1..6801 /organism="Homo sapiens" /mol_type="mRNA" /isolate="CHM13" /db_xref="taxon:9606" /chromosome="1" /sex="female" /cell_line="CHM13htert" /tissue_type="hydatidiform mole" /note="haploid cell line"
gene	1..6801 /gene="MTHFR" /note="methylenetetrahydrofolate reductase; Derived by automated computational analysis using gene prediction method: Gnomon. Supporting evidence includes similarity to: 2 mRNAs, 16 ESTs, 382 long SRA reads, 1 Protein, and 94% coverage of the annotated genomic feature by RNAseq alignments, including 65 samples with support for all annotated introns" /db_xref="GeneID:4524" /db_xref="HGNC:HGNC:7436" /db_xref="MIM:607093"
CDS	117..1841 /gene="MTHFR" /codon_start=1 /product="methylenetetrahydrofolate reductase (NADPH) isoform X7" /protein_id="XP_054192682.1" /db_xref="GeneID:4524" /db_xref="HGNC:HGNC:7436" /db_xref="MIM:607093" /translation="MAAGGPLYIDVTWHPAGDPGSDKETSSMMIASTAVNYCGLETILHMTCCRQRLEEITGHLHKAKQLGLKNIMALRGDPIGDQWEEEEEGLFNAYVDLVKHIREFGDYFDICVAGYPKGHPEAGSFEADLKHLKEKVSAGADFIITQLFFEADTFFRFVKA"

CTDMGITCPIVPGIFPIQGYHSLRQLVKLSKLEVPQEIKDVIEPIKDNDAAIRNYGIE
 LAVSLCQELLASGLVPGLHFYTLNREMATTEVLKRLGMWTEPPRRPLPWALSAHPKRR
 EEDVRPIFWASRPKSYIYRTQEWDEFNNGRWGNSSSPAFGELKDYYLFYLSKSPKEE
 LLKMWGEELTSEASVFEVFLYLSGEPNRRNGHKVTCLPWNDPLAAETSLLEKEELLRV
 NRQGILTINSQPNINGKPSSDPIVWGPGSGGYVFQKAYLEFFTSRETAEALLQVLKKY
 ELRVNYHLNVKGENITNAPELQPNNAVWGIFPGREIIQPTVVDPVSFMFWKDEAFAL
 WIERWGKLYEEESPRTIIQYIHDNYFLVNLVDNDFPLDNCLWQVVEDTLELLNRPTQ
 NARETEAP"

ORIGIN

1 aggcggcgat tggaatctgg tgacaagtgg ttctccctgg aattcttccc tcctcgaact
 61 gctgaggag ctgtcaatct catctcaaga aacaaacccc ctacaggttt gaccggatgg
 121 cagcaggtgg cccctctac atagacgtga cctggcacc agcaggtgac cctggctcag
 181 acaaggagac ctctccatg atgatcgcca gcaccgccgt gaactactgt ggcctggaga
 241 ccatcctgca catgacctgc tgccgtcagc gcctggagga gatcacgggc catctgcaca
 301 aagctaagca gctgggcctg aagaacatca tggcgctgcg gggagacca ataggtgacc
 361 agtgggaaga ggaggaggga ggcttcaact acgcagtga cctggtgaag cacatccgaa
 421 gtgagtttg tgactacttt gacatctgtg tggcaggtta cccaaaggc caccggaag
 481 caggagcct tgaggctgac ctgaagcact tgaaggagaa ggtgtctgcg ggagccgatt
 541 tcatcatcac gcagcttttc ttgaggctg acacattctt ccgctttgtg aaggcatgca
 601 ccgacatggg catcacttgc cccatcgctc ccgggatctt tcccatccag ggctaccact
 661 cccttcggca gcttgtgaag ctgtccaagc tggagggtgc acaggagatc aaggacgtga
 721 ttgagccaat caaagacaac gatgctgcca tccgcaacta tggcatcgag ctggccgtga
 781 gcctgtgcca ggagcttctg gccagtggct tgggtgccag cctccacttc tacaccctca
 841 accgcgagat ggctaccaca gaggtgctga agcgccctgg gatgtggact gaggaccca
 901 ggcgtcccct accctgggct ctacgcgcc accccaagcg ccgagaggaa gatgtacgtc
 961 ccatcttctg ggctccaga ccaaagagtt acatctaccg taccagagag tgggacgagt
 1021 tccctaacgg ccgctggggc aattcctctt cccctgcctt tggggagctg aaggactact
 1081 acctcttcta cctgaagagc aagtcccca aggaggagct gctgaagatg tggggggagg
 1141 agctgaccag tgaagcaagt gtctttgaag tctttgttct ttacctctcg ggagaaccaa
 1201 accggaatgg tcacaaagt acttgccctgc cctggaacga tgagcccctg gcggctgaga
 1261 ccagcctgct gaaggaggag ctgctgcggg tgaaccgcca gggcatcctc accatcaact
 1321 cacagcccaa catcaacggg aagccgtcct ccgaccccat cgtgggctgg ggccccagcg
 1381 ggggctatgt cttccagaag gcctacttag agttttttcac ttcccgcgag acagcggaag
 1441 cacttctgca agtgctgaag aagtacgagc tccgggttaa ttaccactt gtcaatgtga
 1501 agggtgaaaa catcaccaat gccctgaac tgcagccgaa tgctgtcact tggggcatct
 1561 tccctgggag agagatcatc cagcccaccg tagtgatcc cgtcagcttc atgttctgga
 1621 aggacgaggc ctttgccctg tggattgagc ggtggggaaa gctgtatgag gaggagctcc

1681 cgtcccgac catcatccag tacatccacg acaactactt cctgggtcaac ctgggtggaca
 1741 atgacttccc actggacaac tgctctggc aggtgggtga agacacattg gagcttctca
 1801 acaggccac ccagaatgag agagaaacgg aggtccatg accctgctc ctgacgccct
 1861 gcgttgagc cactcctgtc ccgccttctt cctccacagt gctgcttctc ttgggaactc
 1921 cactctcctt cgtgtctctc ccacccggc ctccactccc ccacctgaca atggcagcta
 1981 gactggagtg aggttccag gctcttctg gacctgagtc ggccccacat gggaacctag
 2041 tactctctgc tctagccagg agtctgtgct cttttgggtg ggagcacttg cgtcctgcag
 2101 aggaccacag tgggtggcac ctcttgagaa ggagaggaga gtggttgttg ccaactaagc
 2161 cctgaacca aggcagcctc cagagccagc ctgggactcc cagtgaactt acacttggag
 2221 ccgtgagc acaggcaaaa cagcaaggc catcaggcac tgggtggcatc gtagaagaga
 2281 tgtggcaaa tgctgtacct ttccacctc tagaggtggg cagctgggcc ccacctactt
 2341 gtgactgaag gggcacacca ctgccctgcc tgccactta gccgtccatg gcaccagccc
 2401 cctggatggg cattgggctg acacctacca tgctgctttt tggcacagtt gtctattctg
 2461 agccttgaga gaaaaagtgc cccttaaggg ttgaaggcag tctgaaccct tgtgcttggg
 2521 ggggtcgtg gccttccctt tttgcctggc tgtggaggcc tgatgctgcc ccgttccctg
 2581 tcagaggcta agatgagatt tgccagcaca ggggccccag atctgcctgg gcctgtgcag
 2641 cagcccagct tctgggtgta ttttccaggt aggccttgt cctgccagct gccttctca
 2701 tccctcgtc ctgtccaga ggttatctgc ctggcctggc tccccacgag tcacctgaa
 2761 gcccagggc ctgggggcag tgactggcag gtgcagatgg gctgtttcgt gtagtgaag
 2821 agcagcctga tggccaaggg ggtggacgca attgtgggat gtctcttta ctcccttctt
 2881 ggctcactg gctggggcag aggggcagcc gctaggagag actgaaagca gcagctagga
 2941 ctgaggagtg ggttttattg tcttccagag ctcttcaagc tgtccctct gtcatcactc
 3001 cctggatgtg tggggcatg ttcttccctt gggaaggcta agttcagttc tgtttttat
 3061 tctatgagaa caagtcacag ctgcagctgg gcccctgct ctgccccaa ccccaaccc
 3121 cgggtgctc cggcgcttc ctgtccactc tcggggccct tggggcctg cttgctccag
 3181 ggtcttggc tactggcagc tctctcctt gggctcctg ctgccaggcg ttggtgccac
 3241 ttcttaaagg cctggaacca gggaggagag gaaatgctat tgttgtggc tttctccggg
 3301 gtctgtgctg tgctgtctag agcaaccctt gtaccagct ccttttgtcc ccaggggccc
 3361 tccctctgcc ccaagcagcc agccagtctt gcctaggcca aatgcacaag ctgagaatag
 3421 atctgatggt gagctggaa gctgtactca gagcagagca aatgaggag ggggcgctca
 3481 ggaccaggc cctcatggg ctagtgtgag tggcagccat gcctcatgcc acacctctt
 3541 cgcaaactga tggaccggg gggcctggcc tgagctggg ccacaaatca aagcaagggc
 3601 tccagcatcc agcctgtgtg ttctgtaatg gaactgacct cctccctga aaacgaaggg
 3661 gcccggggc tggcaagcag ggaaagctcc acgggtgcgc gctgtggcac agacttctg
 3721 aaggctggct gagtggaatg cagggaagag ggcagtacct gggaaaggac ccacctctt
 3781 tctgtgctg gtaactgctg agccactgc agtcgcagga tccgtgcca ccacgtctg
 3841 caggcccatc tcaggtgcca ctccctgagc tttggggaca gttggcagag aaggcctctt

3901 gtgctcacgc tccccgcag tcccagccc ttctgccttt ctccccgac actgctgcac
 3961 cagagtgaaa gggctatggc aagggggtgt catctgagga gtattaagaa tgcagattcc
 4021 tgggcctgtc cccaaggtt ttggagtcag taggtccaag ggccatactt ttgagagggg
 4081 tttgggttaa gtatgaggtg aaatgggaga tggtcagtgt ggagaggggt gcacccactc
 4141 accaggggtc gcaccagctg ctctgcccct tgggcatcca ccagtgctg ccatgccact
 4201 gccaggcacc tggcctgctg ggaacccgc agcccgtaa gcagtgcctc gaggcaccgg
 4261 cgctgcaggt acttcctcct gatggccaag agcatcgtga cccttcaggg ccagaaggag
 4321 ggcagagcca tgggcctggg cctgcttttc caggatcctg caggaacgag cactggccag
 4381 agagggccca gctgtagcca tggctcaggc aagcccctca gcccttgccc ccatcccttg
 4441 gaccaccaa actgcacaca cagctcctct taccgtagcc tccgtttatg ggccttgctt
 4501 tgggctttgc aggctctggg ctccaggctg gagtgcgctc ttgggtccctg gtccctcgtc
 4561 cacaggggca ggcctgggac ccagctactc tgtccaggcc actgtggcca gagctggaag
 4621 gcagggcaga gggaatgttc cctgcaccct ggaaagggga gttgagtcac aagaggttaa
 4681 ggtgggtcca ggaaggcagc tgctcttagt gccgcctag gagttgagta cagtgaggag
 4741 ggtggaggaa ggtgctgagc ttagccttgt gccctgcccc catctcccca ggcctccagc
 4801 ctctcccggc tgcctgccgc ccaaagagaa atcacagggg cggggcagga atgcaaagtg
 4861 ttttctcaga acagctgaaa cattccgaag agggaaatga tggggagaat ggtcaataca
 4921 cataagaccg tgtcccaagg agctgatttc caggcccctg aggactggag accgcttcac
 4981 ccctgcactt cagacaccgt ttgtccccg gggcaaggtc tccttactct gagcccaggc
 5041 cgttccccctt ggcttcctcc gtccaccag gctgcactgc agtgatggcg cgggaggcac
 5101 cagctctgtg gcctgtgtcc agcagctgcg ggtctgaagg aatagccaga gaggagcacc
 5161 tgaaccccat gggcttggac ttcttggggc cccgctggga tttcttcgct gctctagctg
 5221 gcaggacaca tcccgccctc ttccaccat tccccatgt ggctgaagac attccaacaa
 5281 tggggtgggc ccataatagt tagccctcag tcagttcccg gagcacagcc ctgggagggg
 5341 gctattttct tcccactga aaacatttca aagctgagtt acttgtctga ggcctcatcc
 5401 ctcggaagcc gtctgactcc agagtctgag ccccggtcta gtaccctata gagagggggc
 5461 tctccaaagg ggctgctggg gcatgtgtgc ctgtggcaga aaagaggaga ccctggaatt
 5521 cagcacctg ggtgccattc ccagcgttta gtttctagag gcctcagttt ctccatcagc
 5581 ttatgggatc cttgtcttta ctgacaagaa tggaatagaa atgtaaaagt actctgaaaa
 5641 gcaattgccc tgtaacttat ctagaaagaa aagaccctga gactccagaa tctgctgttg
 5701 ccatagcccc atatgtgtga attctgcaac tagccaaggc tagttccttt caattccatt
 5761 taaaaaacia aaaccagcag gtgtgggtgc tcatggcgta atgggcctgc ccaatgcttt
 5821 gggaggccaa ggcaggtaga tcgcttgagc ccaggagttt gagacaagcc ctggcaacat
 5881 agtgagatcc catttctaca aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa ttagccgggt gtgggtggcac
 5941 acgcctgtag tctcagctac tcagggtggc gaggtgggag gatcgtttga gccctggagg
 6001 ttgaggctgc agtgagctgt gatcgacca ctgcactctg gcctgggcga cagagtgaga
 6061 cactgtctga gaacaaaaaa cgactgaaaa aaaaaatcac cttagctttt tctcttagaa

6121 tcttctctaa aatgtattct ttgtggcatt ctgaaatagg attcatgatg atgcctgttg
 6181 atcttaggga cactacctca cctgccagta tctttggggc tgtgtccttc aaggacatgt
 6241 cccagactg ctgtgcagtg tcattttttg tgtttggttt ggtggtggtt tcttccccct
 6301 tgctaggcta tcaacctctt atcaccactt gttggtgtca gaactaactg cttctggtct
 6361 ggagagggac tgaccgatgc ctttgggtag agagaattat gaaagaaatt ttggtatttt
 6421 tctactttat attttctgag gtttctgtaa taagcatatt tcacttttcc aataagaaaa
 6481 aaaaaaact tggcctggcg cgggtggctca cacctgtaat cccagcactt tgggaagtgc
 6541 aggtgggagg atcacttgag ttccaggagt cgagaccagc ttgggcaata tgggtgaaacc
 6601 ccgtctctac taaaaataca aaaattagcc aggcgtggtg gcgtgcactt gtagtcccag
 6661 ctactcagga agctgaggcg ggagaatcac ttgaaccgag gaggcagagg ttgcagtgag
 6721 ctgagatcac tctctgtctt cagcctgggc aattgagcca gactctgtct caaaaaataa
 6781 caaaaaaact tgacaaaaa a

//

agggggcgattggaatctggtgacaagtgttctccttggaaattcttccctcctcgaactgctgagggagctgtcaatctcat
 ctcaagaaacaaacccccctacaggtttgaccggatggcagcaggtggccccctctacatagacgtgacctggcaccagcagg
 tgaccttggtcagacaaggagacctcctccatgatgatcgccagcaccgctgaaactactgtggcctggagaccatcctgc
 acatgacctgctgccgtcagcgctggaggagatcacgggccatctgcacaaagctaagcagctgggcctgaagaacatcatg
 gcgtgcggggagaccacaataggtgaccagtgggaagaggaggaggaggcttcaactacgcagtggacctggtgaagcacat
 ccgaagtgaagtttgggtgactactttgacatctgtgtggcaggttaccacaaaggccacccccgaagcagggagctttgaggctg
 acctgaagcacttgaaggagaaggtgtctgcgggagccgatttcatcatcacgcagcttttcttggaggctgacacattcttc
 cgctttgtgaaggcatgcaccgacatgggcatcacttgccccatcgtccccgggattcttcccatccagggctaccactccct
 tggcagcttgtgaagctgtccaagctggaggtgccacaggagatcaaggacgtgattgagccaatcaaagacaacgatgctg
 ccacccgcaactatggcatcgagctggccgtgagcctgtgtccaggagcttctggccagtggttgggtgccaggcctccacttc
 tacacctcaacccgagatggctaccacagaggtgctgaagcgctggggtgtggactgaggaccccagggcgtccctacc
 ctgggctctcagcgccccacccaaagcgccgagaggaagatgtacgtcccatctcttgggctccagaccaaagagttacatct
 accgtaccagaggtgggacaggttccctaacggcgctggggcaattcctcttccctgcctttggggagctgaaggactac
 tacctcttctacctgaagagcaagtccccaaaggaggagctgctgaagatgtggggggaggagctgaccagtgaagcaagtgt
 ctttgaagctcttgttcttacctctcgaggagaacaaacgggaatggtcacaagtgaactgacctgacctggaacgatgagc
 cctggcggtgagaccagcctgctgaaggaggagctgctgcgggtgaaccgcccagggcatcctaccatcaactcacagccc
 aacatcaacgggaagccgtcctccgaccccatcgtgggctggggccccagcggggctatgtcttcagaaggcctacttaga
 gtttttcaacttcccgcgagacagcggaagcacttctgcaagtgtgaagaagtacgagctccgggttaattaccaccttgtca
 atgtgaagggtgaaaacatcaccaatgccctgaactgcagccgaatgctgtcacttggggcatcttccctgggcgagagatc
 atccagcccaccgtagtgatcccgctcagcttcatgttctggaaggacgagcccttgcctgtggattgagcgggtgggga
 gctgtatgaggaggagtcctccgtccgcaccatcatccagtacatccacgacaactacttctgggtcaacctgggtggacaatg
 acttcccactggacaactgctctggcaggtgggtggaagacacattggagcttctcaacaggtcccaccagaatgacgagaa
 acggaggctccaatgaacctgctcctgacgccctgctgctggagccactcctgtcccgcttccctccactgctgcttct
 cttgggaactccactctccttctgtctctcccaacccggcctccactccccacctgacaatggcagctagactggagtga
 gcttccaggtcttcttctggacctgagtcggccccacatgggaacctagctctctgtcttagccaggagctgtgtctcttt
 ggtggggagcacttgcgtcctgcagaggaccacagtggtggcactcctgagaaggcgaggagagtggttgttgccactaa
 gccctcgaaacaaaggcagcctccagagccagcctgggactccagtgaaacttacacttggagcccgctgcagtacaggcaaac
 acgcaagggcacatcaggcactggtggcatcgtagaagagatgtggcaagtgtgtacccttccacctcctagaggtgggcagc
 tgggccccacactacttgtgactgaaggggcacaccactgcctgctgcccacttagccgtccatggcaccagccccctggat
 gggcattgggctgacacctaccatgctgctttttggcacagttgtctattctgagccttgagagaaaaagtgcccttaaggg
 ttgaaggcagctgtgaaccttgtgcttgggtgggctcgtggccttcccccttggcctggctgaggagcctgatgctgccccg
 tccccgtcagaggctaagatgagatttgccagcacaggggccccagatctgcctgggctgtgcagcagcccagcttctgtg
 tgtatttttcaagtaggccccctgtcctgccaagctgcttccctcatccccctgctcctgtccagaggttatctgctggcctgg
 ctccccacagctcagctcaagccccaggcctggggggcagtgactggcaggtgcagatgggctgtttctgtagtgggaagag
 cagcctgatggccaagggtggagcgaatgtgggatgtcctcttactcccttccctggcctcactggcctggggcagagggg
 cagccgtaggagagactgaaagcagcagctaggactgaggagtggtttttattgtccttcagagctcttcaagctgtccct
 ctgtcatcactccctggatgtgtggggcatggttcccttccctgggaaggctaagttcagttctgttttttattctatgagaac
 aagtcacagctgcagctgggccccatgctctgccccaaagccccaaaccccgcggtgctccggcggttccctgtccactctcgg
 ggcccttggggcctggctgtctccagggtcttgggctactggcagctcctctccttgggctcctggctgcccagcggttgggtgc

cacttcttaaaggcctggaaccagggaggagaggaaatgctattgttgtgggctttctccggggtctgtgctgtgctgctag
 agcaaccctgtaccagctccttttgtccccagggccctcctctgccccagcagccagctcttgcttaggccaat
 gcacaagctcagaatagatctgatggtgagctgggaagctgtactcagagcagagcaaatgaggagggggcgtcaggacc
 aggccctccatgggctagtgtagtgagtgccagccatgcctcatgccacaccttctcgcaaactgatggaccgggtgggctggc
 ctgagctggggccacaaatcaaagcaagggtccagcatccagcctgtgtgttctgtaatggaactgacccccctccctgaaa
 acgaagggggcccggggtggaagcagggaaagctccacggtgcgcggtgtgtggcacagacttctggaaggctggctgagtg
 gaatgcaggggaagagggcagtaacctgggaaaggaccaccatcttctgctgtgtaactgctgagccactcgcagtcgcag
 gatccgctgccaccagctgtgccaggcccatctcaggtgccactccctgagctttggggacagttggcagagaaggcctcttg
 tgctcacgctcccccgagtcccccagccctctgctcttctccccgacactgctgcaccagagtgaagggttatggcaagg
 ggggtgtcatctgaggagtttaagaatgcagattcctgggctctgcccccaagggttttgagtcagtaggtccaaggccata
 cttttgagaggggtttgggttaagtatgaggtgaaatgggagatggtcagtgaggaggggtgcacccactcaccagggtcc
 gcaccagctgctctgcccctgggcatccaccagtgctgccatgccactgccaggcacctggcctgctgggaaccccgagc
 ccgtgaagcagtgctcgaggcacggcgctgcaggtacttctcctgatggccaagagcatcgtgacccctcaggggccagaa
 ggagggcagagccatgggctgggctgcttttccaggatcctgcaggaacagcactggccagagagggggcagctgtagcc
 atggctcaggaagccctcagcccttgccccatcccttgaccaccaaactgcacacacagctcctcttaccgtagcctc
 cgtttatgggcttggcttgggcttggcaggtctgggctcagggctggagtgcgctcttggctccctggctccctcgtccacag
 gggcaggtctgggaccagctactctgtccaggccactgtggccagagctggaaggcagggcagaggggaatgttccctgcacc
 ctggaaggggaggttagtcacaagaggttaagggtgggtccaggaaggcagctgctcttagtgcccgcctaggagttgagtac
 agtgaggaggtggaggaaggtgctgagcttagccttggtgcccctgccccatctccccaggcctccagcctctcccggtgccc
 tgccgcccgaagagaaatcacaggggcggggcaggaatgcaaagtgttttctcagaacagctgaaacattccgaagagggaa
 ggatggggagaatgggtcaatacacataagacccgtgtcccaaggagctgatttccaggccctgaggactgagaccgttcac
 ccctgcacttcagacaccgtttgtcccccggggcaagggtctccttactctgagcccaggcgttccccctgggttccctcgtc
 caccaggtgcactgcagtgatggcgcgaggagcaccagctctgtggcctgtgtccagcagctgcggggtctgaaggaatagc
 cagagaggagcacctgaaccccatgggcttggacttctggggcccccgctgggatttcttctgctgctctagctggcaggacac
 atcccggtcttctccaccattcccccatgtggctgaagacattccaacaatgggggtgggcccataatagtttagccctcagtc
 agttcccgagcacagccctgggagggggctatttctctcccaactgaaaacatttcaaagctgagttacttgtctgaggcct
 catccctcggaagcgtctgactccagagctgagcccccggttagtaccctatagagagggggtcttccaaagggggtgctg
 gggcatgtgtgctgtgagcaaaaagaggagaccctggaattcagcacccctgggtgccattccagcggttagttcttagagg
 cctcagtttctccatcagcttatgggatccttgtctttactgacaagaatggaatagaaatgtaaaagtactctgaaaagcaa
 ttgcccgttaacttatctagaaagaaaagaccctgagactccagaatctgctgttgccatagccccatagtgtgaaattctgc
 aactagccaaggctagttcctttcaattccatttaaaaaacaaaaccagcaggtgtggtgggtcatggcgtaatgggctgccc
 ccaatgctttgggagggccaaggcaggtagatcgcttgagcccaggagtttgagacaagccctggcaacatagtgagatcccat
 ttctacaaaaaaaaaaaaaaaaaattagccgggtgtggtggcacacgcctgtagtctcagctactcaggtggctgaggtg
 ggaggatcggttgagccctggaggttgaggtgcagtgagctgtgatcgccactgcactctggcctgggcagagagtgag
 aactgtctgagaacaaaaaacgactgaaaaaaaaaatacacttagcttttctcttagaatcttctctaaaaatgtattcttt
 gtggcattctgaaataggattcatgatgatgctgttgatcttagggacactacctcacctgccagtatctttggggctgtgt
 ccttcaaggacatgtcccagactgctgtgcagtgctattttttgtgttttgggttgggtgggtcttctcccccttgctaggc
 tatcaacctcttatcaccactgtgtgggtgcagaactaactgcttctgggtcggagagggactgaccgatgcctttgggtaga
 gagaattatgaaagaaattttggtattttctactttatattttctgaggttctgttaataagcatatttctcttccaata
 agaaaaaaaaaaaaacttgccctggcgcggtggtcacacctgtaatccagcactttgggaagtcgaggtgggaggatcactt
 gagttcaggagttcgagaccagcttgggcaatatggtgaaaccccgctctactaaaaatacaaaaaattagccaggcggtggtg
 gcggtgcactttagtccagctactcaggaagctgaggcgggagaatcacttgaaccgggagggcagaggttcagtgagctg
 agatcactcctctgcttcagcctgggcaattgagccagactctgtctcaaaaataacaaaaaaacttgacaaaaaa

AMPLICON DE 68 PB ALVO PARA PCR EM TEMPO REAL DA METHYLENETETRAHYDROFOLATE REDUCTASE

ctgtcccgcttctcctccccacagtgtgctgtctctcttgggaactccactctccttcgtgtctctccca

HSC677TFOR = 5'- CTG TCC CGC CTT CCT CCT -3'

HSC677TREV = 5'- TGG GAG AGA CAC GAA GGA -3'

atgg

121 cagcaggtgg cccctctac atagacgtga cctggcacc agcaggtgac cctggctcag
 181 acaaggagac ctctccatg atgatcgcca gcaccgccgt gaactactgt ggctggaga
 241 ccattcctga catgacctgc tgccgtcagc gcctggagga gatcacgggc catctgcaca
 301 aagctaagca gctgggcctg aagaacatca tggcgctgcg gggagacca ataggtgacc
 361 agtgggaaga ggaggagga ggcttcaact acgcagtga cctggtgaag cacatccgaa

421 gtgagtttgg tgactacttt gacatctgtg tggcagggtta ccccaaaggc caccgccgaag
 481 cagggagctt tgaggctgac ctgaagcact tgaaggagaa ggtgtctgcg ggagccgatt
 541 tcatcatcac gcagcttttc tttgaggctg acacattctt ccgctttgtg aaggcatgca
 601 ccgacatggg catcacttgc cccatcgctc ccgggatctt tcccatccag ggctaccact
 661 cccttcggca gcttgtgaag ctgtccaagc tggagggtgc acaggagatc aaggacgtga
 721 ttgagccaat caaagacaac gatgctgcca tccgcaacta tggcatcgag ctggccgtga
 781 gcctgtgcca gga^{gct}tctg gccagtggct tgggtgccagg cctccacttc tacaccctca
 841 accgcgagat ggctaccaca gaggtgctga agcgctggg gatgtggact gaggacccca
 901 ggcgctccct accctgggct ctcagcgccc accccaagcg ccgagaggaa gatgtacgtc
 961 ccatcttctg ggcctccaga ccaaagagtt acatctaccg taccaggag tgggacgagt
 1021 tccctaacgg ccgctggggc aattcctctt cccctgcctt tggggagctg aaggactact
 1081 acctcttcta cctgaagagc aagtcccca aggaggagct gctgaagatg tggggggagg
 1141 agctgaccag tgaagcaagt gtctttgaag tctttgttct ttacctctcg ggagaaccaa
 1201 accggaatgg tcacaaagtg acttgctgc cctggaacga tgagcccctg gcggctgaga
 1261 ccagcctgct gaaggaggag ctgctgctgg tgaaccgcca gggcatctc accatcaact
 1321 cacagcccaa catcaacggg aagcgtcct ccgaccccat cgtgggctgg gggccagcg
 1381 ggggctatgt cttccagaag gcctacttag agtttttcac tcccgcgag acagcggaag
 1441 cacttctgca agtgcgaag aagtacgagc tccgggttaa ttaccactt gtcaatgtga
 1501 agggtgaaaa catcaccaat gccctgaac tgcagccgaa tgctgtcact tggggcatct
 1561 tccctggggc agagatcatc cagcccaccg tagtggtatcc cgtcagcttc atgttctgga
 1621 aggacgaggc ctttgccctg tggattgagc ggtggggaaa gctgtatgag gaggagtccc
 1681 cgtcccgac catcatccag tacatccagc acaactactt cctggtcaac ctggtggaca
 1741 atgacttccc actggacaac tgcctctggc aggtggtgga agacacattg gagcttctca
 1801 acaggccac ccagaatgcg agagaaacgg aggtcca^{tg} a

^MAAGGPLYIDVTWHPAGDPSDKETSSMMIASTAVNYCGLETILHMTCCRQRLLEEITGHLHKAKQLGLKNIMALRGDPIGDQW
 EEEEGGFNYAVDLVKHIRSEFGDYFDICVAGYPKGHPAGSFEADLHLKEKVSAGADFIITQLFFEADTFFRFVKACTDMGI
 TCPIVPGIFPIQGYHSLRQLVKLSKLEVPQEIKDVIEPIKDNDAAIRNYGIELAVSLCQELLASGLVPLGHFYTLNREMATTE
 VLKRLGMWTEDPRLPWALSAHPKRREEDVRPIFWASRPKSYIYRTQEWDEFNGRWGNSSPAFGLKDYLYLKSXSPK
 EELLKMWGEELTSEASVFEVFLVLSGEPNRRNGHKVTCPLWNDEPLAAETSLKEELLRVNRQGILTINSQPNINGKPSDPI
 VGWGPSSGGYVFQKAYLEFFTSRETAEALLQVLKKYELRVNYHLNVKGENITNAPELQPNVAVTWGIFPGREIIQPTVVDPVSF
 MFWKDEAFALWIERWGKLYEESPSRTIIQYIHDNYFLVNLVDNDFPLDNCLWQVVEDTLELLNRPTQNARETEAP

Query	1	MAAGGPLYIDVTWHPAGDPSDKETSSMMIASTAVNYCGLETILHMTCCRQRLLEEITGHL	60
		MAAGGPLYIDVTWHPAGDPSDKETSSMMIASTAVNYCGLETILHMTCCRQRLLEEITGHL	
Sbjct	83	MAAGGPLYIDVTWHPAGDPSDKETSSMMIASTAVNYCGLETILHMTCCRQRLLEEITGHL	142
Query	61	HKAKQLGLKNIMALRGDPIGDQWEEEGGFNYAVDLVKHIRSEFGDYFDICVAGYPKGHP	120
		HKAKQLGLKNIMALRGDPIGDQWEEEGGFNYAVDLVKHIRSEFGDYFDICVAGYPKGHP	
Sbjct	143	HKAKQLGLKNIMALRGDPIGDQWEEEGGFNYAVDLVKHIRSEFGDYFDICVAGYPKGHP	202
Query	121	EAGSFEADLHLKEKVSAGADFIITQLFFEADTFFRFVKACTDMGITCPIVPGIFPIQGY	180
		EAGSFEADLHLKEKVSAGADFIITQLFFEADTFFRFVKACTDMGITCPIVPGIFPIQGY	
Sbjct	203	EAGSFEADLHLKEKVSAGADFIITQLFFEADTFFRFVKACTDMGITCPIVPGIFPIQGY	262

Query	181	HSLRQLVKLSKLEVPQEIKDVIEPIKDNDAAIRNYGIELAVSLCQELLASGLVPGLHFYT	240
Sbjct	263	HSLRQLVKLSKLEVPQEIKDVIEPIKDNDAAIRNYGIELAVSLCQELLASGLVPGLHFYT	322
Query	241	LNREMATTEVLKRLGMWTEDPRRPLPWALSAHPKRREEDVRPIFWASRPKSYIYRTQEWD	300
Sbjct	323	LNREMATTEVLKRLGMWTEDPRRPLPWALSAHPKRREEDVRPIFWASRPKSYIYRTQEWD	382
Query	301	EFPNGRWGNSSSPAFGELKDYYLFYLKSKSPKEELLKMWGEELTSEASVFEVFLYLSGE	360
Sbjct	383	EFPNGRWGNSSSPAFGELKDYYLFYLKSKSPKEELLKMWGEELTSEASVFEVFLYLSGE	442
Query	361	PNRNGHKVTCLPWNDEPLAAETSLLEKELLRVNRQGILTINSQPNINGKPSSDPIVGWGP	420
Sbjct	443	PNRNGHKVTCLPWNDEPLAAETSLLEKELLRVNRQGILTINSQPNINGKPSSDPIVGWGP	502
Query	421	SGGYVFQKAYLEFFTSRETAEALLQVLKKYELRVNYHLNVKGENITNAPELQPNAVTWG	480
Sbjct	503	SGGYVFQKAYLEFFTSRETAEALLQVLKKYELRVNYHLNVKGENITNAPELQPNAVTWG	562
Query	481	IFPGREIIQPTVVDPVSFMFWKDEAFALWIERWKGKLYEEESPSRTIIQYIHDNYFLVNLV	540
Sbjct	563	IFPGREIIQPTVVDPVSFMFWKDEAFALWIEWWKGKLYEEESPSRTIIQYIHDNYFLVNLV	622
Query	541	DNDFPLDNCLWQVVEDTLELLNRPTQNARETEAP	574
Sbjct	623	DNDFPLDNCLWQVVEDTLELLNRPTQNARETEAP	656

FRAGMENTO ALVO DE 226 PB PARA SEQUENCIAMENTO GENÔMICO

Tcggcagcttgtgaagctgtccaagctggaggtgccacaggagatcaaggacgtgattgagccaatcaaagacaacgatgctg
ccatccgcaactatggcatcgagctggccgtgagcctgtgccaggagcttctggccagtggcttgggtgccaggcctccacttc
tacaccctcaaccgcgagatggctaccacagaggtgctgaagcgccctggggatgtggact

HSMTHFRGFOR = 5'- TCG GCA GCT TGT GAA GCT GTC - 3'

HSMTHFRGREV = 5'- AGT CCA CAT CCC CAG GCG CTT - 3'

Human DNA sequence from clone RP11-56N19 on chromosome 1, complete sequence

Sequence ID: AL953897.6Length: 102509Number of Matches: 1
Range 1: 81133 to 81358GenBankGraphicsNext MatchPrevious Match
Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
408 bits(452)	3e-109	226/226(100%)	0/226(0%)		Plus/Minus

Query	1	TCGGCAGCTTGTGAAGCTGTCCAAGCTGGAGGTGCCACAGGAGATCAAGGACGTGATTGA	60
Sbjct	81358	TCGGCAGCTTGTGAAGCTGTCCAAGCTGGAGGTGCCACAGGAGATCAAGGACGTGATTGA	81299
Query	61	GCCAATCAAAGACAACGATGCTGCCATCCGCAACTATGGCATCGAGCTGGCCGTGAGCCT	120
Sbjct	81298	GCCAATCAAAGACAACGATGCTGCCATCCGCAACTATGGCATCGAGCTGGCCGTGAGCCT	81239
Query	121	GTGCCAGGA GCTTCTGGCCAGTGGCTTGGTGCCAGGCCTCCACTTCTACACCTCAACCG	180

Sbjct 81238 GTGCCAGGAGCTTCTGGCCAGTGGCTTGGTGCCAGGCCTCCACTTCTACACCTCAACCG 81179

Query 181 CGAGATGGCTACCACAGAGGTGCTGAAGCGCCTGGGGATGTGGACT 226
|||||

Sbjct 81178 CGAGATGGCTACCACAGAGGTGCTGAAGCGCCTGGGGATGTGGACT 81133

methylenetetrahydrofolate reductase (NADPH) isoform X7 [Homo sapiens]
NCBI Reference Sequence: XP_054192682.1

Identical Proteins FASTA Graphics
Go to:
LOCUS XP_054192682 574 aa linear PRI 26-AUG-2024
DEFINITION methylenetetrahydrofolate reductase (NADPH) isoform X7 [Homo sapiens].
ACCESSION XP_054192682
VERSION XP_054192682.1
DBLINK BioProject: PRJNA807723
DBSOURCE REFSEQ: accession XM_054336707.1
KEYWORDS RefSeq.
SOURCE Homo sapiens (human)
ORGANISM Homo sapiens
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini; Catarrhini; Hominidae; Homo.
COMMENT MODEL REFSEQ: This record is predicted by automated computational analysis. This record is derived from a genomic sequence (NC_060925) annotated using gene prediction method: Gnomon, supported by mRNA and EST evidence.
Also see:
Documentation of NCBI's Annotation Process

##Genome-Annotation-Data-START##
Annotation Provider :: NCBI RefSeq
Annotation Status :: Updated annotation
Annotation Name :: GCF_009914755.1-RS_2024_08
Annotation Pipeline :: NCBI eukaryotic genome annotation pipeline
Annotation Software Version :: 10.3
Annotation Method :: Best-placed RefSeq; Gnomon; RefSeqFE; cmsearch; tRNAscan-SE
Features Annotated :: Gene; mRNA; CDS; ncRNA
Annotation Date :: 08/23/2024
##Genome-Annotation-Data-END##
COMPLETENESS: full length.
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..574
/organism="Homo sapiens"
/isolate="CHM13"
/db_xref="taxon:9606"
/chromosome="1"
/sex="female"
/cell_line="CHM13htert"
/tissue_type="hydatidiform mole"
/note="haploid cell line"
Protein 1..574
/product="methylenetetrahydrofolate reductase (NADPH) isoform X7"
/calculated_mol_wt=65209
Region 1..544
/region_name="MTHFR"
/note="Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). 5,10-Methylenetetrahydrofolate is reduced to 5-methyltetrahydrofolate by methylenetetrahydrofolate reductase, a cytoplasmic, NAD(P)-dependent enzyme. 5-methyltetrahydrofolate is utilized by methionine synthase...; c100246"
/db_xref="CDD:444783"
Site order(13,45,74..76,92..93,113,115,119,121,128,131,134..135,144,146,239)
/site_type="other"
/note="FAD binding site [chemical binding]"
/db_xref="CDD:238299"
CDS 1..574

```

/gene="MTHFR"
/coded_by="XM_054336707.1:117..1841"
/db_xref="GeneID:4524"
/db_xref="HGNC:HGNC:7436"
/db_xref="MIM:607093"

```

ORIGIN

```

1  maaggplyid vtwhpagdpg scketssmmi astavnycgl etilhmtccr qrleeitghl
61  hkakqlglkn imalrgdpig dqweeeeggf nyavdlvkhi rsefgdyfdi cvagypkghp
121 eagsfeadlk hlkekvsaga dfiitqlffe adtffrfvka ctdmgitcpi vpgifpiqgy
181 hslrqlvklk klevpqeikd viepikdnda airnygiela vslcqellas glvpglhfyt
241 lnremattev lkrlgmwted prrplpwals ahpkreedv rpifwasrpk syiyrtqewd
301 efpngrwgns sspafgelkd yylyfylksks pkeellkmwg eeltseasvf evfvlylsge
361 pnrnghkvtc lpwndeplaa etsllkeell rvnrggilti nsqpningkp ssdpivgwg
421 sggvfvqkay lefftsreta eallqvlkky elrvnyhlvn vkgenitnap elqpnavtwg
481 ifpgreiiqp tvvdpvsfmf wkdeafalwi erwgklyeee spsrtiiqyi hdnyflvnlv
541 dndfpldncl wqvvedtlel lnrtqnare tea

```