

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Instituto de Biociências

**MTRR A66G COMO UM FATOR DE RISCO PARA TRANSTORNOS DO
ESPECTRO AUTISTA EM UMA AMOSTRA DO SUL DO BRASIL**

Bibiane Armiliato de Godoy

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lavínia Schuler-Faccini

Trabalho apresentado como requisito para obtenção do grau de Bacharel no Curso de Ciências
Biológicas ênfase Molecular, Celular e Funcional.

Porto Alegre, novembro de 2010.

MTRR A66G como um fator de risco para Transtornos do Espectro Autista em uma amostra do Sul do Brasil

Autores: Bibiane Armiliato de Godoy¹, Dânae Longo¹, Pollyanna Almeida Costa dos Santos¹, Ana Paula Carneiro Brandalize¹ e Lavínia Schüler-Faccini¹

¹Departamento de Genética, Instituto Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

E-mails: bibianegodoy@yahoo.com.br; danae.longo@gmail.com; pollybaixinha@gmail.com; anapaulabrandalize@yahoo.com.br

Autor responsável:

Lavinia Schuler-Faccini
E-mail: lavinia.faccini@ufrgs.br
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Departamento de Genética
Caixa Postal 15031 – Agencia Campus UFRGS
CEP 91501-970
Porto Alegre – RS – Brasil
Fone: (51) 3308 9826 Fax: (51) 3308 9823

Manuscrito em preparo a ser submetido à revista *Molecular Autism*.

RESUMO

Os Transtornos do Espectro Autista (TEA) formam um grupo heterogêneo de transtornos do desenvolvimento caracterizado pelo prejuízo na interação social e comunicação, e por padrões restritos de comportamentos e interesses. Entre os fatores genéticos apontados como de risco, estão genes polimórficos envolvidos no metabolismo do ácido fólico. O folato é uma vitamina do complexo B que desempenha um papel importante no desenvolvimento neurológico, agindo como co-fator na manutenção e reparo do genoma, regulação da expressão gênica, metabolismo de aminoácidos, formação da mielina e síntese de neurotransmissores. O objetivo deste estudo é investigar os polimorfismos MTR A2756G, MTRR A66G, CBS 844ins68 e RFC-1 A80G, envolvidos no metabolismo do folato, e a suscetibilidade para os TEA em uma amostra do sul do Brasil. A análise caso-controle envolveu 152 pacientes com diagnóstico prévio de TEA idiopático, avaliadas clinicamente e diagnosticadas de acordo com os critérios do DSM-IV-TR (*American Psychiatric Association*, 2000) e/ou CARS (*Childhood Autism Rating Scale*), e um total de 148 controles. A genotipagem foi realizada através de PCR, seguida de clivagem com enzima de restrição específica e posterior visualização dos fragmentos em gel de poliacrilamida ou agarose. Frequências alélicas foram estimadas por contagem direta e as frequências genotípicas, com exceção daquelas estimadas para MTRR A66G, estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg. A frequência do alelo 66G do MTRR (53% em casos e 36% em controles), bem como o genótipo homozigoto GG (20% em casos e 6% em controles), foram significativamente maiores nos indivíduos com TEA ($P=0,0002$; $P=0,00005$). Quando comparados os genótipos GG vs. AA+AG, observa-se um risco 3,85 vezes maior para os indivíduos portadores do genótipo homozigoto GG (95% IC: 1,45-10,79; $P=0,0023$). Para os demais polimorfismos, não foram observadas diferenças significativas entre caso e controle. Nosso estudo indica que o alelo G do polimorfismo MTRR A66G representa um fator de risco para desenvolvimento de TEA. Esse resultado sugere que indivíduos portadores do alelo G, associado a menor atividade da enzima metionina sintase redutase (codificada pelo gene MTRR), poderiam apresentar um prejuízo nas reações de metilação necessárias para o neurodesenvolvimento embriológico normal, apresentando assim um maior risco para o desenvolvimento de TEA.

“FINDINGS”

Os Transtornos do Espectro Autista (TEA), que incluem o transtorno autista, transtorno de Asperger e transtorno global do desenvolvimento não especificado (TGD-NE), formam um grupo heterogêneo de transtornos do desenvolvimento caracterizado pelo prejuízo na interação social e comunicação, e por padrões restritos de comportamentos e interesses [1]. A prevalência na população é de 60 em 10.000 (0.6%), sendo mais freqüente em meninos, com proporção sexual de 4 meninos para cada menina afetada [2]. Sua etiologia ainda continua sob debate [3]. São apontados como possíveis fatores de risco genes envolvidos no desenvolvimento fetal, bem como fatores ambientais presentes no período do neurodesenvolvimento de indivíduos geneticamente suscetíveis [4, 5]. Entre os fatores genéticos cogitados, estão os genes polimórficos que participam da metabolização do ácido fólico.

O ácido fólico é uma vitamina do complexo B presente em frutas e vegetais, que desempenha um papel importante no desenvolvimento neurológico, agindo como co-fator na manutenção e reparo do genoma, regulação da expressão gênica, metabolismo de aminoácidos, formação da mielina e síntese de neurotransmissores [6]. Entre esses processos encontra-se o ciclo metabólico da metionina/homocisteína, também chamado Ciclo da Metionina (Figura 1), no qual o ácido fólico obtido da dieta é convertido para sua forma ativa (tetraidrofolato). O produto desta reação são grupos metil utilizados para a síntese de metionina [7]. Em indivíduos autistas, constatou-se que os níveis séricos dos metabólitos envolvidos no ciclo da metionina encontram-se alterados, indicando um possível déficit na capacidade de metilação do DNA [8, 9]. Diversos trabalhos anteriores implicam variações na rota metabólica do folato na etiologia dos TEA [10, 11, 12].

Várias enzimas que atuam no ciclo metabólico da metionina/homocisteína são codificadas por genes polimórficos, sendo o gene MTHFR o mais investigado em estudos de associação com TEA [13]. No entanto, outros genes que codificam enzimas importantes dessa rota são pouco estudados (Figura 1). Os genes *MTR*, *MTRR* e *RFC-1* possuem polimorfismos de nucleotídeo simples que provocam trocas de aminoácidos nas proteínas: *MTR* A2756G (GenBank:rs1805087), *MTRR* A66G (GenBank:rs1801394), *RFC-1* A80G (GenBank:rs1051266), respectivamente [14]. O gene *CBS*, por sua vez, possui um polimorfismo de inserção/deleção de 68 pares de bases que cria um sítio de *splicing* alternativo [15, 16]. Tais variações genéticas estão associadas a aumento do risco de defeitos de tubo neural e outras malformações congênitas [17, 18, 19, 20, 21, 22]. Devido ao

importante papel do ciclo metabólico da metionina para o neurodesenvolvimento fetal [23, 24, 25], variações nos genes que compõem essa rota configuram-se como fatores de risco genéticos para a TEA [26, 12].

O objetivo deste trabalho é investigar a associação entre TEA e os polimorfismos MTR A2756G, MTRR A66G, CBS 844ins68 e RFC-1 A80G em uma amostra do sul do Brasil, através de um estudo caso-controle. Para isso, os pacientes (grupo caso) foram contatados no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) ou outras instituições médicas ou educacionais do estado do Rio Grande do Sul.

Foram incluídas crianças acima de três anos de idade com diagnóstico de TEA. Os diagnósticos foram confirmados por profissionais treinados e estavam de acordo com os critérios estabelecidos pelo DSM-IV-TR [1], e/ou o *Childhood Autism Rating Scale* (CARS) [27] em sua versão brasileira [28]. Os critérios de exclusão utilizados foram idade menor do que três anos, diagnóstico de neurofibromatose, esclerose tuberosa, Síndrome do X Frágil, Síndrome de Rett, anomalias cromossômicas, paralisia cerebral, rubéola fetal, toxoplasmose ou outras condições possivelmente associadas a danos neurológicos. O objetivo destes critérios foi obter uma amostra de casos TEA idiopáticos.

O grupo caso foi composto por 152 pacientes com TEA idiopático no grupo caso, sendo 118 (77.6%) meninos, com média de idade de 10,4 (\pm 5,14). Cinquenta e oito pacientes (38,1%) apresentavam transtorno autista, 15 (9,8%) transtorno de Asperger e 79 (52%) TGD-NE. O grupo controle compreendeu um total de 148 crianças saudáveis, (57% meninos) selecionados de maneira aleatória durante a realização de exames laboratoriais de rotina no HCPA. Os grupos caso e controle foram predominantemente eurodescendentes (92% e 93%, respectivamente). Esse estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do HCPA (nº 05-451) e todos os participantes ou representantes legais assinaram um termo de consentimento.

Amostras de sangue obtidas dos pacientes e controles foram utilizadas para extração de DNA por método de precipitação salina [29]. A análise dos polimorfismos MTR A2756G, MTRR A66G, CBS 844ins68 e RFC A80G foi realizada pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando *primers* e procedimentos específicos, previamente descritos [30, 31, 17, 32]. Para os polimorfismos MTRR A66G e MTR A2756G não foi possível obter os genótipos de 48 indivíduos do grupo controle.

O teste qui-quadrado foi utilizado para comparar as frequências alélicas e genotípicas entre os grupos caso e controle e testar desvios do equilíbrio Hardy-Weinberg (H-W). Para o polimorfismo MTRR A66G, o *odds ratio* (OR) e intervalo de confiança de 95% (IC) foram

calculados para medir o possível efeito do alelo G e do genótipo GG, uma vez que esse alelo está relacionado a uma atividade enzimática reduzida [33, 34] além de ser o alelo de risco associado previamente com defeitos de tubo neural [17, 18, 20]. As análises foram realizadas com o auxílio do programa EpiInfo software, versão 3.5.1 (2008).

As frequências alélicas e genóticas correspondentes aos polimorfismos estudados no grupo caso e controle são mostradas na Tabela 1. Com exceção das frequências estimadas para o polimorfismo MTRR A66G ($P < 0,001$ em casos e $P < 0,01$ em controles), a distribuição das frequências genóticas para todos os outros polimorfismos analisados estava em equilíbrio de H-W. A genotipagem para o polimorfismo MTRR A66G foi repetida para 50% da amostra total e nenhum erro foi encontrado. Outros estudos também apresentaram desequilíbrio de H-W para o polimorfismo MTRR A66G [35, 36]. Aléssio e cols [36] realizou a técnica SSPC (*Single Strand Conformation Polymorphism*) para confirmação da genotipagem obtida através de clivagem enzimática em uma amostra de 220 crianças brasileiras, não havendo discordância entre os resultados. Zijno e cols [37] e Mohammad e cols [10], por sua vez, encontraram frequências genóticas em equilíbrio de H-W para esse polimorfismo. Todos esses estudos utilizaram a mesma metodologia empregada no presente trabalho, sugerindo que o desequilíbrio H-W atribuído a esse polimorfismo provavelmente não decorre de erros de genotipagem.

Nossos resultados mostram que tanto a frequência do alelo G como do genótipo GG foram significativamente maiores nos pacientes com TEA ($P = 0,0002$ e $P = 0,0005$, respectivamente) (Tabela 1). O alelo G foi associado com risco 1,98 vezes maior para TEA (95% IC: 1,35-2,91) (Tabela 1). O genótipo GG, cuja frequência foi de 20% nos casos e 6% nos controles, foi associado a um risco de 3,85 vezes para TEA (95% IC: 1,45-10,79; $P = 0,0023$) (dados não mostrados). Não foram observadas diferenças significativas entre caso e controle para os demais polimorfismos analisados.

Esse resultado está de acordo com trabalhos anteriores que sugerem alterações no metabolismo do ácido fólico como mecanismo na etiologia dos TEA (Tabela 2). O polimorfismo MTRR A66G foi investigado previamente em estudos de associação com TEA [38, 39, 10, 12]. James e cols [38] e Mohammad e cols [10] encontraram resultados contraditórios, indicando diferentes alelos com efeito protetor para autismo (Tabela 2), enquanto Adams [39] e James [12] não encontraram associação entre o polimorfismo MTRR A66G e TEA.

A enzima metionina sintase redutase (MTRR) catalisa a conversão da forma inativa da metionina sintase (MTR) para sua forma ativa (Figura 1). Segundo Olteanu e cols [33] a

proteína MTRR codificada pela variante alélica G exibe atividade 4 vezes menor que a proteína selvagem *in vivo*. Logo, pela redução do nível de MTR ativa, a proteína variante pode estar relacionada com a disponibilidade de SAM, o doador universal de grupos metil para reações de metilação do DNA, proteínas e neurotransmissores [40], levando à hipometilação do DNA. Botto e cols [41] encontraram níveis elevados de homocisteína em indivíduos portadores do alelo G do polimorfismo MTRR A66G, indicando um efeito de déficit de metilação dose dependente relacionado a esse alelo. Nossos resultados sugerem que indivíduos portadores do alelo G poderiam apresentar um prejuízo nas reações de metilação necessárias para o neurodesenvolvimento embriológico normal, aumentando o risco pré-natal para o desenvolvimento de TEA.

Considerados como um grupo de transtornos de etiologia multifatorial, os TEA teoricamente seriam condicionados por uma interação complexa entre diversos fatores genéticos e ambientais de risco [42]. Todos esses fatores de risco, entretanto, apresentam efeitos baixos quando avaliados individualmente [43]. Dessa forma, a principal limitação desse estudo se refere ao baixo tamanho amostral, o que não permitiu, por exemplo, análises de interação entre os fatores genéticos e outras variáveis ambientais disponíveis (dados não mostrados). Por outro lado, foi possível detectar um efeito importante do polimorfismo MTRR A66G nessa população do sul do Brasil, o que aponta a importância da replicação desse resultado em estudos de maior tamanho amostral. Por fim, estudos correlacionando o polimorfismo MTRR A66G com marcadores bioquímicos (como SAM e SAH) poderiam auxiliar a esclarecer possíveis prejuízos nas reações de metilação em indivíduos TEA portadores do alelo G.

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram que não houve conflito de interesses na realização desse estudo.

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

BAG realizou as genotipagens e preparação do manuscrito. PACS e APCB contribuíram para a coleta das amostras e genotipagens. DL participou da avaliação dos pacientes e revisão do manuscrito. LSF idealizou o estudo e organizou a versão final do artigo.

AGRADECIMENTOS

Somos gratos às APAES e escolas especiais do estado do Rio Grande do Sul pela colaboração com a realização deste estudo. Também ao apoio e consultoria dos profissionais do PROTID (Programa para Transtornos Invasivos do Desenvolvimento do Hospital de Clínicas de Porto Alegre) que foram fundamentais para o contato com as famílias e avaliação clínica criteriosa dos pacientes. Esse trabalho foi financiado por FIPE-HCPA, CNPq, CAPES, FAPERGS, DECIT/SCTIE/MS e CNPq-Institutos do Milênio.

Referências Bibliográficas

1. American Psychiatric Association: *Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-IV-TR*. 4th ed. Washington, DC; 2000.
2. Fombonne E: **Epidemiology of autistic disorder and other pervasive developmental disorders**. *J Clin Psychiatry* 2005, **66**(Suppl 10):3-8.
3. Longo D, Schüler-Faccini L, Brandalize AP, dos Santos Riesgo R, Bau CH: **Influence of the 5-HTTLPR polymorphism and environmental risk factors in a Brazilian sample of patients with autism spectrum disorders**. *Brain Res* 2009, **1267**:9-17.
4. Persico AM, Bourgeron T: **Searching for ways out of the autism maze: genetic, epigenetic and environmental clues**. *Trends Neurosci* 2006, **29**: 349-58.
5. Gupta AR, State MW: **Recent advances in the genetics of autism**. *Biol Psychiatry* 2007, **61**: 429-37.
6. Gordon N: **Cerebral folate deficiency**. *Dev Med Child Neurol* 2009, **51**(3):180-2.
7. Goyette P, Sumner JS, Milos R, Duncan AMV, Rosenblat DS, Matthews RG, Rozen R: **Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation identification**. *Nat Genet* 1994, **7**:195-200.
8. James SJ, Cutler P, Melnyk S, Jernigan S, Janak L, Gaylor DW, Neubrandner JA: **Metabolic biomarkers of increased oxidative stress and impaired methylation capacity in children with autism**. *Am J Clin Nutr* 2004, **80**:1611–1617.
9. Deth R, Muratore C, Benzecry J, Power-Charnitskyva, Waly M: **How environmental and genetic factors combine to cause autism: A redox/methylation hypothesis**. *Neurotoxicology* 2008, **29**(1):190-201.

10. Mohammad NS, Jain JM, Chintakindi KP, Singh RP, Naik U, Akella RR: **Aberrations in folate metabolic pathway and altered susceptibility to autism.** *Psychiatr Genet* 2009, **19**(4):171-6.
11. Pasça SP, Dronca E, Kaucsár T, Craciun EC, Endreffy E, Ferencz BK, Iftene F, Benga I, Cornean R, Banerjee R, Dronca M: **One Carbon Metabolism Disturbances and the C667T MTHFR Gene Polymorphism in Children with Autism Spectrum Disorders.** *J Cell Mol Med* 2009, **13**(10):4229-38.
12. James SJ, Melnyk S, Jernigan S, Pavliv O, Trusty T, Lehman S, Seidel L, Gaylor DW, Cleves MA: **A functional polymorphism in the reduced folate carrier gene and DNA hypomethylation in mothers of children with autism.** *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2010, **153B**(6):1209-20.
13. Main PA, Angley MT, Thomas P, O'Doherty CE, Fenech M: **Folate and methionine metabolism in autism: a systematic review.** *Am J Clin Nutr* 2010, **91**(6):1598-620.
14. **GenBank em National Center for Biotechnology Information**
[<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>]
15. Sebastio G, Sperandio MP, Panico M, de Franchis R, Kraus JP, Andria G: **The molecular basis of homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency in Italian families, and report of four novel mutations.** *Am J Hum Genet* 1995, **56**: 1324-1333.
16. Tsai M Y, Bignell M, Schwichtenberg K, Hanson NQ: **High prevalence of a mutation in the cystathionine beta-synthase gene.** *Am J Hum Genet* 1996, **59**: 1262-1267.
17. Wilson A, Platt R, Wu Q, Leclerc D, Christensen B, Yang H, Gravel R A, Rozen R: **A common variant in methionine synthase reductase combined with low cobalamin (vitamin B12) increases risk for spina bifida.** *Mol Genet Metab* 1999, **67**:317-23.
18. Doolin MT, Barboux S, McDonnell M, Hoess K, Whitehead AS, Mitchell LE: **Maternal genetic effects, exerted by genes involved in homocysteine remethylation, influence the risk of spina bifida.** *Am J Hum Genet* 2002, **71**(5):1222-6.
19. De Marco P, Calevo MG, Moroni A, Merello E, Raso A, Finnell RH, Zhu H, Andreussi L, Cama A, Capra V: **Reduced folate carrier polymorphism (80A-->G) and neural tube defects.** *Eur J Hum Genet* 2003, **11**(3):245-52.
20. Pietrzyk JJ, Bik-Multanowski M, Sanak M, Twardowska M: **Polymorphisms of the 5,10-methylenetetrahydrofolate and the methionine synthase reductase genes as independent risk factors for spina bifida.** *J Appl Genet* 2003, **44**(1):111-3.

21. O'Leary VB, Pangilinan F, Cox C, Parle-MacDermott A, Conley M, Molloy A, Kirke P, Mills J, Brody L, Scott JM: **Reduced folate carrier polymorphisms and neural tube defect risk.** *Mol Genet Metab* 2005, **85**:220-227.
22. Mostowska, A, Hozyasz, KK, Jagodzinski, PP: **Maternal MTR genotype contributes to the risk of non-syndromic cleft lip and palate in the Polish population.** *Clin. Genet* 2006, **69**: 512-517.
23. Scholl TO, Johnson WG: **Folic acid: influence on the outcome of pregnancy.** *Am J Clin Nutr* 2000, **71**(Suppl 5):1295S-303S.
24. Lopreato FR, Stabler SP, Carvalho FR, Hirata RD, Hirata MH, Robi DL, Sampaio-Neto LF, Allen RH, Guerra-Shinohara EM: **Relationships between gene polymorphisms of folate-related proteins and vitamins and metabolites in pregnant women and neonates.** *Clin Chim Acta* 2008, **398**(1-2):134-9.
25. Zeisel SH: **Importance of methyl donors during reproduction.** *Am J Clin Nutr* 2009, **89**(2):673S-7S.
26. Rogers EJ: **Has enhanced folate status during pregnancy altered natural selection and possibly Autism prevalence? A closer look at a possible link.** *Med Hypotheses* 2008, **71**:406-410.
27. Schopler E, Reihler RJ, Rothen Renner BR: *The childhood autism rating scale (CARS) for diagnostic screening and classification of autism.* New York: Irvington Publishers Inc; 1986.
28. Pereira AM, Vagner MB, Riesgo RS: **Childhood autism: translation and validation of the childhood autism rating scale for use in Brazil.** *J Pediatr* 2008, **84**:487-494.
29. Lahiri DK, Nurnberger JI: **A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies.** *Nucleic Acids Res* 1991, **19**: 5444.
30. Kluijtmans LA, Boers GH, Trijbels FJ, van Lith-Zanders HM, van den Heuvel LP, Blom HJ: **A common 844INS68 insertion variant in the cystathionine beta-synthase gene.** *Biochem Mol Med* 1997, **62**(1):23-5.
31. Van der Put NM, Van der Molen EF, Kluijtmans LA, Heil SG, Trijbels JM, Eskes TK, Van Oppenraaij-Emmerzaal D, Banerjee R, Blom HJ: **Sequence analysis of the coding region of human methionine synthase: relevance to hyperhomocysteinaemia in neural-tube defects and vascular disease.** *QJM* 1997, **90**:511-517.
32. Winkelmayr WC, Eberle C, Sunder-Plassmann G, Fodinger M: **Effects of the glutamate carboxypeptidase II (GCP2 1561C > T) and reduced folate carrier (RFC1 80G > A)**

- allelic variants on folate and total homocysteine levels in kidney transplant patients.** *Kidney Int* 2003, **63**:2280–2285.
33. Olteanu H, Munson T, Banerjee R: **Differences in the efficiency of reductive activation of methionine synthase and exogenous electron acceptors between the common polymorphic variants of human methionine synthase reductase.** *Biochemistry* 2002, **41**(45):13378-85.
34. Olteanu H, Wolthers KR, Munro AW, Scrutton NS, Banerjee R: **Kinetic and thermodynamic characterization of the common polymorphic variants of human methionine synthase reductase.** *Biochemistry* 2004, **43**(7):1988-97.
35. Relton CL, Wilding CS, Pearce MS, Laffling AJ, Jonas PA, Lynch SA, Tawn EJ, Burn J: **Gene-gene interaction in folate-related genes and risk of neural tube defects in a UK population.** *J Med Genet* 2004, **41**(4):256-60.
36. Aléssio ACM, Annichino-Bizzacchi JMA, Bydlowski SP, Eberlin MN, Vellasco AP, Höehr NF: **Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase reductase genes and homocysteine levels in Brazilian children.** *Am J Med Genet Part A* 2004, **128A**:256–260.
37. Zijno A, Andreoli C, Leopardi P, Marcon F, Rossi S, Caiola S, Verdina A, Galati R, Cafolla A, Crebelli R: **Folate status, metabolic genotype, and biomarkers of genotoxicity in healthy subjects.** *Carcinogenesis* 2003, **24**(6):1097-103.
38. James SJ, Melnyk S, Jernigan S, Cleves MA, Halsted CH, Wong DH, Cutler P, Bock K, Boris M, Bradstreet JJ, Baker SM, Gaylor DW: **Metabolic endophenotype and related genotypes are associated with oxidative stress in children with autism.** *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2006, **141B**(8):947-56.
39. Adams M, Lucock M, Stuart J, Fardell S, Baker K, Ng X: **Preliminary evidence for involvement of the folate gene polymorphism 19bp deletion-DHFR in occurrence of autism.** *Neurosci Lett* 2007, **422**(1):24-9.
40. Beaudin AE, Stover PJ: **Folate-mediated one-carbon metabolism and neural tube defects: balancing genome synthesis and gene expression.** *Birth Defects Res C Embryo Today* 2007, **81**(3):183-203.
41. Botto N, Andreassi MG, Manfredi S, Masetti S, Cocci F, Colombo MG, Storti S, Rizza A, Biagini A: **Genetic polymorphisms in folate and homocysteine metabolism as risk factors for DNA damage.** *Eur J Hum Genet* 2003, **11**(9):671-8.
42. Altevogt BM, Hanson SL, Leshner AI: **Autism and the environment: challenges and opportunities for research.** *Pediatrics* 2008, **121**(6):1225-9.

43. Buxbaum JD: **Multiple rare variants in the etiology of autism spectrum disorders.** *Dialogues Clin Neurosci* 2009, **11**(1):35-43.
44. Boris M, Goldblatt A, Galanko J, James SJ: **Association of MTHFR Gene Variants with Autism.** *J Am Phys Surg* 2004, **9**: 106-8.
45. Santos PAC, Longo D, Brandalize AP, Schüler-Faccini L: **MTHFR C677T is not a risk factor for autism spectrum disorders in South Brazil.** *Psychiatr Genet* 2010, **20**(4):187-9.

LEGENDA DA FIGURA

FIGURA 1: Representação esquemática do ciclo metabólico da metionina/homocisteína. Metileno-tetra-hidrofolato redutase (MTHFR) catalisa a conversão de 5,10-metilenotetra-hidrofolato (5,10-CH₂-THF) para a forma circulante do folato, o 5-metiltetra-hidrofolato (5-CH₃-THF). O grupo metil do 5-CH₃-THF é transferido para a homocisteína para gerar metionina, via reação dependente de vitamina B₁₂ da enzima metionina sintase (MS). MS torna-se inativa com a oxidação da vitamina B₁₂, sendo necessária atuação da enzima metionina sintase redutase (MTRR), que mantém o co-fator B₁₂ em estado reduzido, recuperando a atividade da MS. Em seguida, metionina é convertida a s-adenosilmetionina (SAM), o principal doador de grupos metil para metiltransferases celulares. Após a transferência do grupo metil, SAM é convertido a s-adenosilhomocisteína (SAH), o qual é metabolizado a homocisteína. A homocisteína pode ser retirada permanentemente deste ciclo através da conversão irreversível a cistationina, catalisada pela enzima cistationina-β-sintase em reação dependente de vitamina B₆. A forma circulante do folato é transportada do plasma para o interior da célula através da proteína de membrana chamada transportador de folato reduzido (RFC) (Adaptado de James e cols [38]).

FIGURA 1

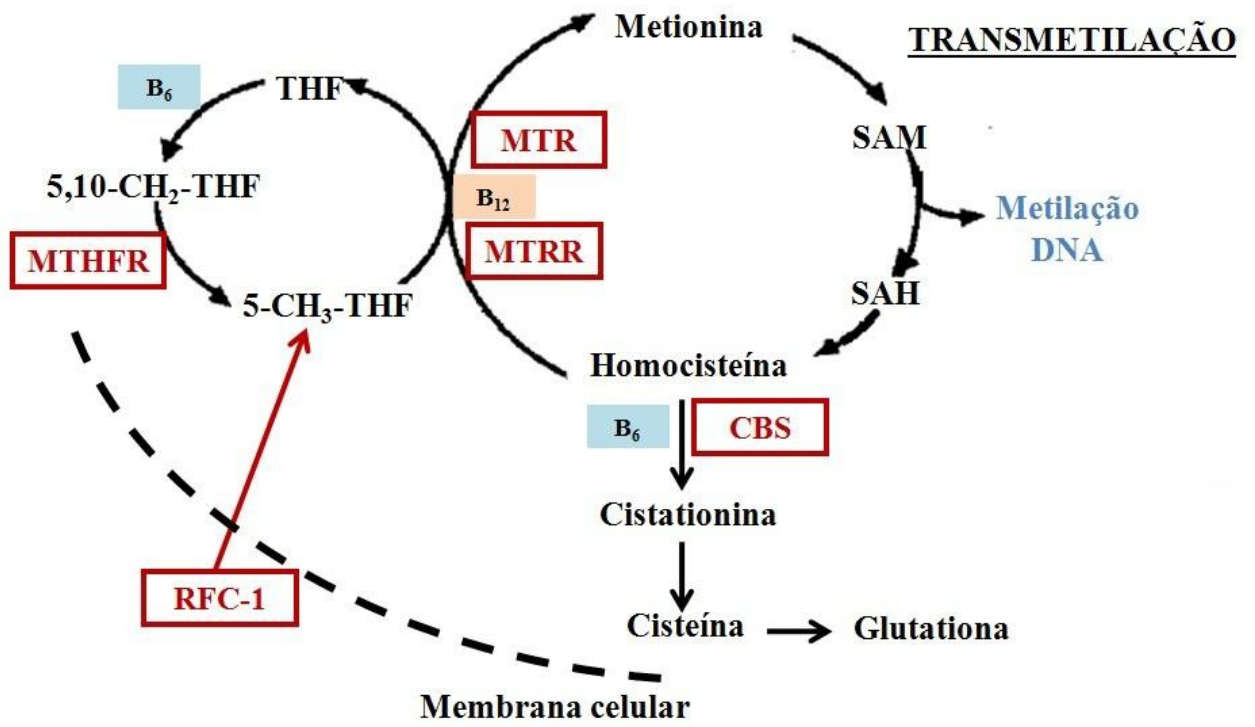


Tabela 1 – Distribuição das frequências alélicas e genotípicas referentes aos polimorfismos nos genes *MTR*, *MTRR*, *CBS* e *RFC-1* e valor P correspondente à análise caso-controle.

	Frequências genotípicas (%)			Valor P ¹	Frequências alélicas		Valor P ¹
	AA	AG	GG		A	G	
MTR A2756G							
Caso (N=152)	92 (60)	56 (37)	4 (3)	0,39	0,79	0,21	0,48
Controle (N=100)	67 (67)	29 (29)	4 (4)		0,81	0,19	
MTRR A66G							
Caso (N=152)	20 (13)	102 (67)	30 (20)	0,00005	0,47	0,53	0,0002 ²
Controle (N=100)	33 (33)	61 (61)	6 (6)		0,64	0,36	
CBS 844ins68							
Caso (N=152)	Ins -/-	Ins -/+	Ins +/+	0,25	Ins -	Ins +	0,82
Controle (N=148)	129 (85)	23 (15)	0 (0)		0,92	0,08	
RFC-1 A80G							
Caso (N=152)	29 (19)	84 (55)	39 (26)	0,55	0,47	0,53	0,55
Controle (N=148)	29 (20)	73 (49)	46 (31)		0,44	0,56	

1- Valores P referentes a teste qui-quadrado

2 – Odds ratio 1,98 (95% IC: 1,35-2,91)

Tabela 2: Trabalhos publicados que investigaram genes envolvidos no metabolismo do ácido fólico em indivíduos com autismo ou TEA.

Estudo	Local	Tipo	n	Polimorfismos	Genótipo associado	P ou OR (IC)	Alelo associado	P ou OR (IC)
Boris e cols [44]	EUA	Caso-controle	168 TEA 5389 controles (populacional)	MTHFR C677T	TT CT	<0,0001 < 0,0001	T	<0.0001
James e cols [38]	EUA	Caso-controle	358 autistas 205 controles	MTHFR C677T RFC1 A80G MTRR A66G	CC + CT GA + GG GA GG GG (protetor)	1,38 (0,96-1,98) 2,3 (1,4-3,4) 2,26 (1,37-3,7) 1,96 (1,15-3,3) 0,61 (0,36-1,03)	- G G (protetor)	NS 1,36 (1,04-1,7) 0,78 (0,6-1,02)
Adams e cols [39]	Austrália	Caso-controle	17 autistas 16 controles	MTHFR C677T RFC1 A80G MTRR A66G MTR A2756G	- - - -	NS NS NS NS	- - - -	NS NS NS NS
Mohammad e cols [10]	Índia	Caso-controle	138 autistas 138 controles	MTHFR C677T MTRR A66G MTR A2756G	TT AA (protetor)	<0.0001 <0.01 NS	T A (protetor) -	<0.0005 <0.02 NS
Pasça e cols [11]	Romênia	Caso-controle	39 TEA 80 controles	MTHFR C677T	-	NS	-	NS
James e cols [12]	EUA	Caso-controle	528 mães de autistas 566 mães controle 529 autistas 566 controles	RFC1 A80G MTHFR C677T MTHFR A1298C MTRR A66G RFC1 A80G MTHFR C677T MTHFR A1298C MTRR A66G	GG - - - AG - - - -	0.036 NS NS NS 0.047 NS NS NS	G - - - - - - -	0.056 NS NS NS NS NS NS NS
Santos e cols [45]	Brasil	Caso-controle	151 TEA 100 controles	MTHFR C677T	-	NS	-	NS

