

2023  
v.11  
nº4

# ACiS

---

Atas de Ciências da Saúde  
ISSN: 2448-3753

**FMU**  
CENTRO UNIVERSITÁRIO

Atas de Ciências da Saúde - ACIS / Faculdades  
Metropolitanas Unidas. -- São Paulo: A Faculdade,  
2013-

Semestral  
ISSN: 2448-3753

1. Ciências da Saúde. 2. Qualidade de Vida.  
I. Faculdades Metropolitanas Unidas. II. Título.



**CENTRO UNIVERSITÁRIO DAS FACULDADES METROPOLITANAS UNIDAS – FMU**

**PRESIDENTE / REITOR**

Prof. Arthur Sperandéo de Macedo

**VICE-PRESIDENTE ACADÊMICO**

Prof. Dr. Manuel Nabais da Furriela

**VICE-PRESIDENTE EXECUTIVA DE ESTRATÉGIA E TRANSFORMAÇÃO**

Profa. Ms. Aline Alves de Andrade

---

**ATAS DE CIÊNCIAS DA SAÚDE – ACiS**

**EDITOR CIENTÍFICO**

Profa. Dra. Terezinha A. de Carvalho Amaro

**EQUIPE EDITORIAL**

Psicóloga Patrícia Salvaia

Profa. Ms. Alessandra Gasparello Viviani

Prof. Dr. Daniel Manzoni de Almeida

Profa. Ms. Leila Frayman

Profa. Dra. Maria Lucia Marques

Profa. Ms. Mirtes C.T. P. Perrechi

Profa. Dra. Priscila C. Cristovam

Profa. Dra. Rogéria Maria Ventura

*ACiS 2023 vol.11 n.4*

Carta de Apresentação <i>Charlotte Cesty Borda de Saenz</i>	5
ACiS 2767 <b>Fatores inibitórios do Quorum sensing e sua relação com o biofilme</b> / Inhibitory factors of Quorum sensing and its relationship with biofilm <i>Vinicius Freitas Oliveira, Charlotte Cesty Borda de Saenz</i>	6
ACiS 2883 <b>Bioestimuladores de Colágeno no Tratamento da Flacidez Facial</b> / Collagen Biostimulators in the Treatment of Facial Sagging <i>Renato Antônio Feitosa, Thais Bruna Ferreira da Silva</i>	15
ACiS 2893 <b>Eficácia de fotoprotetores como prevenção do câncer de pele</b> / Effectiveness of photoprotectors as skin cancer prevention <i>Grazielle Prado Alexandre, Stefani Lameze, Priscila Ferreira Silva</i>	22
ACiS 2912 <b>A utilização do sequenciamento do exoma para diagnóstico do Transtorno do Espectro Autista (TEA) não síndrômico: uma revisão bibliográfica</b> / The use of exome sequencing for the diagnosis of non-syndromic Autism Spectrum Disorder (ASD): a literature review <i>Larissa Dourado de Almeida, Tamires Vieira Albuquerque Lira, Victor Hugo Gomes Almeida Vieira, Messias Oliveira Pacheco</i>	31
ACiS 2922 <b>O uso das células tronco para o tratamento do Alzheimer</b> / The use of stem cells for the treatment of Alzheimer's disease <i>Alany's Caraça Raymundo; Renata Ruoco Loureiro</i>	42
ACiS 2929 <b>Terapia com células T modificadas: avanço para o tratamento de neoplasias malignas</b> / Modified T-cell therapy: a breakthrough in the treatment of malignant neoplasms <i>Beatriz Silva Santos, Brenda Evangelista Ribeiro, Renata Ruoco</i>	56
ACiS 2930 <b>Síndrome de MELAS: fisiopatologia, métodos diagnósticos e tratamentos disponíveis</b> / MELAS syndrome: pathophysiology, diagnostic methods and available treatments <i>Beatriz Cruz Souza, Renata Ruoco Loureiro</i>	67
ACiS 2945 <b>Uso da biologia molecular nas ciência forense</b> / Use of molecular biology in forensic science <i>Maria Lucia Sala, Erik Cendel Saenz Tejada</i>	81
ACiS 2963 <b>Associação com transtornos do espectro autista (TEA) e sua modulação: Polimorfismo do gene MTHFR C677T (rs1801133)</b> / Association with Autism Spectrum Disorders (ASD) and its modulation: Polymorphism of the MTHFR C677T gene (rs1801133) <i>Mariane Rocha Stellato, Luciene Stellato Chiaramonte, Rogeria Maria Ventura</i>	92

Caro Leitor,

É com grande prazer que anuncio a Edição Especial dos trabalhos de revisão bibliográfica dos estudantes do Curso de Biomedicina, referentes aos anos de 2022 e 2023, onde se observa o grande crescimento e desenvolvimento dos estudantes através da pesquisa científica. A investigação científica é essencial na vida acadêmica e profissional dos biomédicos, pois permite descobrir e traçar diferenciais e competências éticas, críticas e de domínio dos temas abordados. A dedicação nesta etapa final da graduação permitirá estimular os colegas, como também servirá de alicerce para dar continuidade e profundidade aos temas de relevância atual.

Minha menção especial aos estudantes, orientadores, revisores e ao Editor chefe que realizaram um grande e significativo trabalho, onde para muitos deles é sua primeira publicação de artigo científico.

Parabéns, queridos estudantes, lhes desejamos muitas conquistas futuras e muitas pesquisas bem fundamentadas com grandes argumentos científicos.

Para finalizar trago uma frase de Claude Lévi-Strauss, referindo-se que “O cientista não é a pessoa que dá as respostas certas, mas quem faz as perguntas certas”, ... questionem, perguntem e vão atrás das respostas em fontes confiáveis, que assim chegarão muito longe.

Uma boa leitura a todos,

Charlotte Cesty Borda de Saenz

*Profa. Dra. do Curso de Biomedicina do Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas – FMU, Brasil*

# Fatores inibitórios do *Quorum sensing* e sua relação com o biofilme

## Inhibitory factors of *Quorum sensing* and its relationship with biofilm

Vinicius Freitas Oliveira<sup>a</sup>, Charlotte Cesty Borda de Saenz<sup>b</sup>

a: Graduando do Curso de Biomedicina do Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas – FMU, Brasil

b: Bióloga, Profa. Dra. do Curso de Biomedicina do Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas – FMU, Brasil

### RESUMO

O *Quorum sensing* é o sistema de comunicação celular amplamente utilizado na natureza responsável pela expressão de fatores de virulência, resistência e formação do biofilme em ambientes que demandam maior prevalência bacteriana. Esta comunicação bacteriana, presente nos biofilmes, também é frequentemente encontrada em pacientes com doenças crônicas. A partir do levantamento bibliográfico, avaliar os fatores inibitórios do *Quorum sensing* e produção de biofilme foi o objetivo do presente estudo, no qual busca avaliar o potencial terapêutico da inibição dos respectivos mecanismos, assim como potencial atuação nos tratamentos já empregados apresentados na literatura. Foram identificadas as enzimas AHL-lactonases e AHL-acilases que atuam como inibidoras capazes de limitar a liberação de sinais, através da clivagem de moléculas liberadas ou através da competição por receptores de membrana. Por outro lado, também foram identificadas as enzimas antagonistas do *Quorum sensing*, sendo elas, furanonas halogenadas que atuam na deslocação das moléculas e impedindo o funcionamento dos sinais liberados. Pode-se concluir que o tratamento específico pode gerar impacto positivo ao paciente, auxiliando na efetividade do tratamento e facilitando a recuperação do paciente.

**Descritores:** percepção de *Quorum*, bioluminescência, biofilme

### ABSTRACT

*Quorum sensing* is the cellular communication system widely used in nature responsible for the expression of virulence factors, resistance and biofilm formation in environments that demand greater bacterial prevalence. This bacterial communication, present in biofilms, is also frequently found in patients with chronic diseases. Based on the bibliographical survey, evaluating the inhibitory factors of *Quorum sensing* and biofilm production was the objective of the present study, which seeks to evaluate the therapeutic potential of inhibiting the respective mechanisms, as well as the potential effect on treatments already used presented in the literature. The enzymes AHL-lactonases and AHL-acylases were identified that act as inhibitors capable of limiting the release of signals, through the cleavage of released molecules or through competition for membrane receptors. On the other hand, enzymes that are antagonistic to *Quorum sensing* were also identified, namely halogenated furanones that act to displace molecules and prevent the released signals from functioning. It was concluded that specific treatment can generate a positive impact on the patient, helping to make the treatment more effective and facilitating the patient's recovery.

**Descriptors:** *Quorum sensing*, bioluminescence, biofilm

### INTRODUÇÃO

No meio ambiente, os microrganismos estão constantemente em situações cuja necessidade

de administrar seu crescimento e consumo de nutrientes, assim como o reconhecimento uns dos outros, é fundamental para sua prevalência, sendo comunicação a peça chave para o direcionamento e sobrevivência da colônia frente aos mais diversos ambientes em que estão inseridas.<sup>(2)(4)</sup> Através da comunicação, especificamente, as bactérias, podem receber instruções externas ou de sua própria colônia, havendo mudanças diretas na expressão de genes específicos, bem como para o controle de crescimento e o metabolismo.<sup>1,2</sup>

O *Quorum sensing* (QS) é o mecanismo de comunicação de extrema importância para a vida bacteriana, sendo encontrado não só em populações com ascendente crescimento, mas também em colônias onde a expressão de genes específicos é necessária<sup>3,4</sup>, permitindo a transmissão de informações, que por sua vez possibilitam uma resposta aos estímulos externos.<sup>1</sup> O mecanismo de QS é baseado em autoindutores que penetram a membrana celular e desencadeiam uma série de respostas, por exemplo: a bioluminescência em *V. Fischer*<sup>7</sup> ou a produção de biofilme em situações de estresse<sup>3</sup>, bem como a transcrição de fatores de virulência.<sup>3,4</sup> Os autoindutores são moléculas as utilizadas que atuam na sinalização e possuem diferenças quando encontrados em diferentes tipos de bactérias, ou seja, em Gram-positivas são baseados em peptídeos, enquanto em Gram-negativas, majoritariamente, são regidas por acil-homoserina lactona (AHLs).<sup>1</sup>

Respectivamente, o mecanismo QS é população-dependente, necessitando de determinadas quantidades de microrganismos para que as moléculas atinjam a densidade necessária para alterações significativas na colônia.<sup>1,2</sup> Em grandes populações, em situação de competição ou estresse<sup>1,2</sup>, a transcrição de genes em toda a colônia é necessária e deve ser realizada de forma conjunta, de modo que não haja apenas bactérias isoladas expressando genes específicos, mas toda a colônia, possibilitando uma resposta acentuada ao estímulo.<sup>4</sup> Um exemplo de atuação do mecanismo de QOS são as colônias de *Vibrio fischeri*, cujo processo de bioluminescência é realizado através de AHL's transcritas pelo gene *LuxL*, onde, as moléculas sintetizadas são liberadas e detectadas por outras bactérias da colônia.<sup>2,7</sup> A detecção dos sinais externos é realizada através de receptores da superfície bacteriana que permitem a entrada das moléculas compartilhadas e, após entrarem, as moléculas, agregam-se à proteína transcrita pelo gene *LuxR*, sendo o produto da sua interação a estabilidade proteica para ativar o *operon* que libera novos autoindutores a partir de *LuxL* e *Luciferases* a partir do gene *luxCDABE*.<sup>2,7</sup> A partir da análise bibliográfica, foi notado que a utilização de QS nos tratamentos demonstra possibilidade no enfrentamento preciso contra os microrganismos e, tanto em pacientes com doenças crônicas quanto em infecções agudas, a inibição de *Quorum sensing* e biofilme através de novos métodos podem ser de grande auxílio nos tratamentos convencionais, bem como precursores dos novos.

## OBJETIVOS

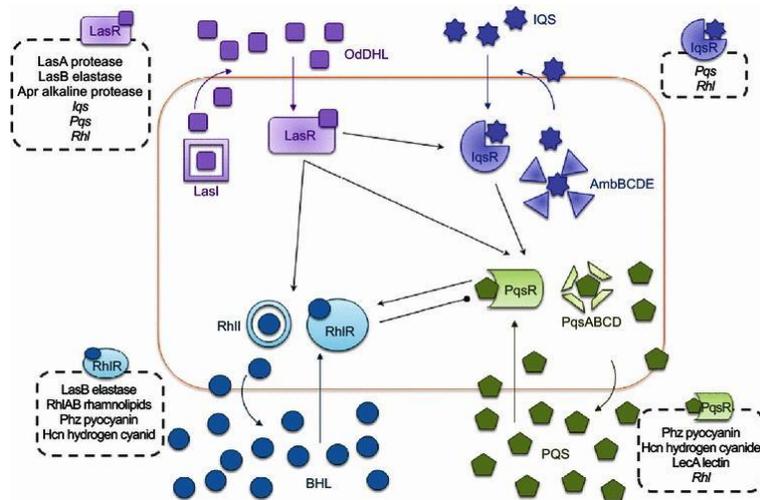
Avaliar os fatores inibitórios do *Quorum sensing* e sua relação com o biofilme.

## METODOLOGIA

A metodologia utilizada para a realização do presente estudo foi baseada na revisão literária de artigos científicos disponíveis em algumas das principais plataformas de divulgação, sendo elas: PUBMED, SciELO, e demais revistas e livros relacionados à microbiologia e biologia molecular. As palavras-chave utilizadas para a busca foram: *Quorum sensing*, comunicação bacteriana, inibição da comunicação, autoindutores, bioluminescência e biofilme.

## DESENVOLVIMENTO

Além dos processos de bioluminescência, QS também atua na expressão de fatores de virulência em colônias de *Pseudomonas aeruginosa* (**Figura 1**), bactérias estas que possuem uma diversidade de moléculas que, em conjunto e hierarquia<sup>4</sup>, atuam na expressão de fatores de virulência e de sobrevivência quando encontradas em hospedeiro infectado ou no meio-ambiente onde estão inseridas.<sup>3,4</sup> Apesar de semelhantes os mecanismos, em *P. aeruginosa* há uma diversidade maior de genes a serem transcritos quando necessário, sendo um exemplo os genes *LasA* e *LasB*, respectivamente, precursores de *Proteases* e *Elastases* que facilitam a infecção e sobrevivência da bactéria a partir da absorção do ferro.<sup>4</sup> Para a expressão de determinados fatores de virulência, *P. aeruginosa*, como descrito anteriormente, possui um sistema de sinalização dividido e hierárquico que trabalha em conjunto, sendo *Las* o sistema mais operante, possuindo a capacidade de interferir nas demais cascatas de sinalização.<sup>4</sup> Em *Las*, os autoindutores são transcritos pelo gene *LasL* e trabalham juntamente com a proteína do gene *LasR*, deste modo, possibilitando a expressão de *LasA*, *LasB* e outros genes dos sistemas *Rhl* e *Pqs* responsáveis pela sobrevivência e virulência de *Pseudomonas aeruginosa*.<sup>4</sup>

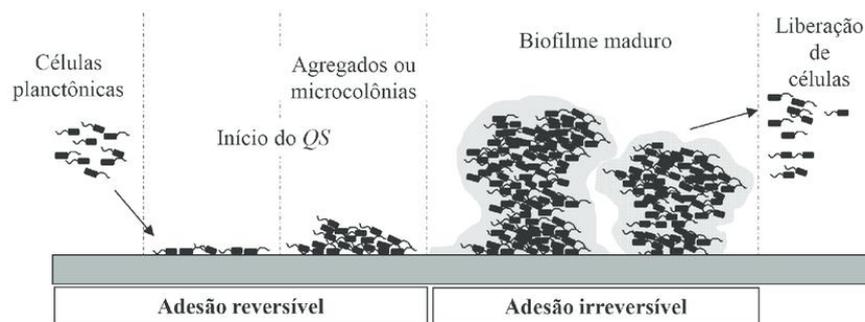


**Figura 1** – Rede hierárquica de *Quorum sensing* presente em *Pseudomonas aeruginosa*, sendo representados os genes e moléculas expressas na sinalização dos respectivos sistemas. Fonte: Lee and Zhang, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4286720/>

Por ser um mecanismo amplamente distribuído entre microrganismos e apresentar papel fundamental na sobrevivência de bactérias, *Quorum sensing* abre oportunidade para novos tratamentos frente à constante necessidade dos mesmos, cuja atenuação da virulência das bactérias urge conforme adquirem resistência aos tratamentos convencionais.<sup>9</sup> Estudos sugerem que tratamentos híbridos utilizando a inibição de QS e fármacos podem ser uma saída em potencial no desenvolvimento de novas terapias, tornando possível o controle da virulência e acentuando o resultado em cada paciente, visto que a inibição de QS impede a comunicação e, conseqüentemente, a transcrição de genes com potencial de prejudicar o tratamento.<sup>9</sup> O biofilme, processo intimamente ligado a QS e que confere virulência às bactérias capazes de formá-lo em infecções<sup>3</sup>, é um dos mecanismos que porventura pode ser combatido através de terapias conjuntas<sup>9</sup> e, em pacientes com doenças crônicas cuja infecção possui alto índice de letalidade, o impedimento na comunicação dos microrganismos e o bloqueio da expressão de fatores de virulência podem tornar a recuperação facilitada e melhorar a qualidade de vida do indivíduo.<sup>9</sup>

Sendo produto da expressão de genes específicos, o biofilme possui grande participação na sobrevivência bacteriana, não somente conferindo virulência a bactérias como *P. aeruginosa* em infecções<sup>4,10</sup>, como permitindo a sobrevivência dos microrganismos em situações de estresse, carência nutricional e demais outros fatores externos do ambiente no qual estão inseridos<sup>10</sup>. Quando em seu habitat natural ou meio artificial, as bactérias capazes de formar biofilme se aderem às superfícies para adquirirem nutrientes e proteção, iniciando o processo que será capaz de proporcioná-las a estabilidade necessária para sua sobrevivência através de uma série de mecanismos.<sup>10,11</sup>

A formação do biofilme (**Figura 2**) acontece em etapas, começando com a adesão de um pequeno grupo de microrganismos numa determinada superfície, em seguida, é iniciada a comunicação entre as bactérias colonizadoras e realizada síntese de polissacarídeos fundamentais à formação da matriz.<sup>10</sup> A formação da matriz primária é seguida do desenvolvimento da colônia, onde há crescimento bacteriano e aumento da matriz e, ao final do processo, acontece a dispersão ativa dos microrganismos, podendo também ser relacionada a fatores ambientais.<sup>(10)</sup> Quando formado, o biofilme é capaz de gerar proteção contra danos às bactérias em seu interior e difundir nutrientes<sup>(11)</sup> fundamentais ao crescimento das mesmas, tornando a prevalência elevada em ambientes com carência ou disponibilidade nutricional mínima.<sup>10,11</sup>



**Figura 2** – Etapas do desenvolvimento do biofilme, demonstrando a adesão e formação da estrutura, bem como a utilização da rede *Quorum sensing*. Fonte: Adaptado de Macedo and Abraham, 2019

Dentre os ambientes em que o biofilme pode ser encontrado, os que possuem nutrientes limitados podem ser propensos ao crescimento destes respectivos microrganismos, bem como no meio hospitalar em cateteres contaminados e pacientes com doenças crônicas como a fibrose cística.<sup>10,11</sup> O biofilme nos casos de contaminação ou colonização em hospedeiros infectados pode dificultar o tratamento e até mesmo ser letal, visto que sua disseminação em pacientes com fibrose cística impede a penetração acentuada dos antibióticos empregados nas terapias convencionais.<sup>11</sup> Além de dificultar a penetração de antibióticos, alguns genes reguladores de bombas de efluxo podem ser positivamente afetados na presença de biofilme, bem como o ganho da resistência aos antibióticos através da disseminação de plasmídeos através da matriz.<sup>11</sup> Visto que o biofilme, intimamente ligado ao *Quorum sensing* e a virulência de bactérias<sup>4</sup> possui tamanha relevância no resultado dos tratamentos atuais, a inibição de ambos se torna indispensável no desenvolvimento de novos tratamentos, havendo necessidade da criação de novas terapias envolvendo mecanismos de inibição da detecção dos autoindutores e agentes anti-biofilme, podendo haver também a sua aplicação em conjunto com os antibióticos já conhecidos pela indústria e usados nos tratamentos atuais.

## RESULTADOS

### Fatores de Inibição de *Quorum sensing*

Quando necessária, a comunicação bacteriana permite que haja expressão de genes que possibilitam a sobrevivência da colônia, e por meio de autoindutores que atravessam a membrana das bactérias é realizada a síntese de biofilme e demais fatores de virulência que direcionam esses microrganismos.<sup>10</sup> A captação desses sinais é realizada por receptores específicos de cada bactéria e podem ser usados também como alvo na inibição de QS, bem como o bloqueio dos sinais através de enzimas, moléculas produzidas por outras bactérias ou demais técnicas que realizem a inibição do mecanismo e seus derivados, sendo denominados de acordo com sua funcionalidade: inibidores de *Quorum sensing* (QSI - Quorum Sensing Inibitor) e extinção de *Quorum* (QQ - Quorum Quencher).<sup>13</sup>

Para a inibição da comunicação, o uso de enzimas pode ser escolhido para determinados tipos de moléculas expressas por bactérias, gerando a sua degradação ou inativação.<sup>12,13</sup> Os sinais liberados pelas bactérias podem ser degradados através do uso de enzimas que clivam em locais específicos dos autoindutores, de modo que as moléculas sejam inativadas e se tornem incapazes de agir na colônia. Por serem capazes de clivar a porção de ligação amida das moléculas, AHL-lactonases e AHL-acilases degradam moléculas e impedem a comunicação, havendo limitação também em fatores de virulência.<sup>12</sup> Outro exemplo de degradação de sinais pode ser observado também na natureza, onde bactérias como *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* possuem a capacidade de produzirem moléculas homólogas, cuja finalidade é atuar como mecanismo de defesa contra invasores.<sup>13</sup>

O bloqueio dos sinais também pode ser realizado a partir de soluções não-enzimáticas, as quais possuem finalidade de bloquear a captação dos sinais através dos receptores.<sup>13</sup> A inibição acontece a partir de moléculas análogas naturais ou sintetizadas que possuem capacidade de bloquear os sinais recebidos, por exemplo, a produção de furanonas halogenadas por *Delisea pulchra* que atuam como antagonistas de QS, inibindo AHLs através de deslocação.<sup>12,13</sup> Demais modificações e análogos de furanonas podem ser utilizados como inibidores, demonstrando efetividade na redução da patogenicidade em ratos infectados com *P. aeruginosa*, inibição da formação de biofilme em *S. epidermidis* e atividade significativa em colônias de *E. coli*.<sup>12,13</sup>

Além de serem produzidas de forma sintética ou naturalmente por bactérias como mecanismo de defesa, as moléculas que possuem a capacidade inibitória podem ser encontradas também em plantas rotineiramente observadas.<sup>12,13</sup> Um exemplo de potencial inibitório é o extrato de alho, tendo a capacidade de controlar a expressão de genes responsáveis por *Quorum*

*sensing* em *P. aeruginosa* e podem auxiliar no tratamento com antibióticos através de sua interação com o biofilme, tornando-o mais susceptível ao tratamento.<sup>13</sup>

### **Fatores de Inibição do biofilme**

O crescimento do biofilme possui uma série de implicações na natureza, sendo de suma importância para as bactérias em ambientes hostis<sup>10</sup> e, quando submetidas a tratamentos com antibióticos, o biofilme pode gerar maior resistência e prevalência às bactérias.<sup>14</sup> Quando formado, possibilita que as bactérias permaneçam por um período maior de tempo no ambiente que estão inseridas, tornando vantajoso o uso de agentes antibiofilme para lidar com esse tipo de virulência e inibir a prevalência bacteriana. Os agentes antibiofilme, de forma similar aos inibidores de *Quorum sensing*, podem ser encontrados naturalmente ou produzidos de forma sintética,<sup>14,17</sup> atuando de forma direta ou indiretamente na produção do biofilme<sup>15</sup>.

Um dos mecanismos encontrados é a clivagem por enzimas, sendo um alvo o peptidoglicano presente na parede celular das bactérias que gera efeitos inibitórios ao biofilme quando clivado.<sup>17</sup> O galato de epigalotequina, composto encontrado naturalmente no chá-verde, possui a capacidade de ligar-se ao peptidoglicano e causar morte as bactérias através de danos a membrana, impedindo a ancoragem e, conseqüentemente, a formação do biofilme.<sup>17</sup> Danos à parede celular podem ser observados também a partir das reações entre hidrolases de bacteriófagos, cujas endolisinas expressas possuem a capacidade de causar danos à parede celular e lise hipotônica, porém, por serem específicos a cada bactéria, dependem da identificação do microrganismo para que o tratamento seja eficaz.<sup>17</sup> Por serem capazes de gerar efeitos adversos, os fagos ainda não são empregados nos tratamentos hospitalares, porém, possuem capacidade promissora para terapias contra biofilme.<sup>14</sup>

Não só na formação do biofilme estão concentrados os fatores inibitórios, mas também quando já formada pelas bactérias, a matriz pode ser degradada<sup>14</sup> e possui grande relevância nos tratamentos, visto que atua de forma conjunta com diversos outros fatores relacionados à resistência bacteriana ao tratamento empregado, atuando em conjunto com as bombas de efluxo bacterianas, por exemplo.<sup>16</sup> A degradação da matriz pode ser obtida através de enzimas que degradam o DNA extracelular<sup>14,17</sup>, sendo a atuação das DNases um fator que possibilita a penetração de antibióticos e, em bactérias patogênicas como *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *V. cholerae*,  $\alpha$ -amilase possui a capacidade de inibir a formação do biofilme e degradar matrizes já formadas.<sup>14</sup> A atividade antibiofilme, apesar de possuir caráter específico para determinados tipos de bactérias<sup>17</sup>, pode ser observada em diversas moléculas in vitro, possibilitando a avaliação das mesmas como potenciais alternativas em tratamentos contra bactérias e o combate à formação do biofilme, apresentando até 86% de inibição<sup>17</sup> e, deste modo,

possivelmente poderão ser utilizadas em novas terapias ou fármacos.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Terapias envolvendo *Quorum sensing* e seus inibidores possuem potencial significativo na área clínica, sugerindo não só uma opção alternativa de tratamento, mas possibilitando o enfrentamento de microrganismos de forma efetiva e, conseqüentemente, a recuperação do paciente com doenças crônicas. A utilização de mecanismos já presentes nas bactérias possibilitam uma precisão nos tratamentos e, em alguns casos, podem evitar o uso de altas concentrações de antibióticos. Além da inibição de QS, o biofilme também é um obstáculo em determinados tratamentos, havendo necessidade de novas terapias inibitórias que permitam a ação dos outros fármacos, evitando a contribuição na resistência dos microrganismos a partir da utilização de grandes quantidades de antibióticos.

## REFERÊNCIAS

- 1- Mukherjee S, Bassler BL. Bacterial Quorum sensing in complex and dynamically changing environments. *Nature Reviews Microbiology*. 2019 Apr 3;17(6):371–82.
- 2- Abisado RG, Benomar S, Klaus JR, Dandekar AA, Chandler JR. Bacterial Quorum Sensing and Microbial Community Interactions. Garsin DA, editor. *mBio*. 2018 Jul 5;9(3).
- 3- Thi MTT, Wibowo D, Rehm BHA. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *International Journal of Molecular Sciences* [Internet]. 2020 Nov 17;21(22):8671. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7698413/>
- 4- Lee J, Zhang L. The hierarchy Quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein & Cell*. 2014 Sep 25;6(1):26–41.
- 5- Steindler L, Venturi V. Detecção de moléculas de sinal de N -acil homoserina lactona com detecção de Quorum por biossensores bacterianos, *FEMS Microbiology Letters* , Volume 266, Issue 1, January 2007, Pages 1–9, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00501.x>
- 6- Williams P, Cámara M, Hardman A, Swift S, Milton D, Hope VJ, et al. Quorum sensing and the population-dependent control of virulence. Smith H, Dorman CJ, Dougan G, Holden DW, Dougan G, Williams P, editors. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences*. 2000 May 28;355(1397):667–80.
- 7- Brodl E, Winkler A, Macheroux P. Molecular Mechanisms of Bacterial Bioluminescence. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 2018;16:551–64.
- 8- Cámara M, Williams P, Hardman A. Controlling infection by tuning in and turning down the volume of bacterial small-talk. *The Lancet Infectious Diseases*. 2002 Nov;2(11):667–76.
- 9- Nadar S, Khan T, Patching SG, Omri A. Development of Antibiofilm Therapeutics Strategies to Overcome Antimicrobial Drug Resistance. *Microorganisms*. 2022 Jan 27;10(2):303.

- 10- Madigan MT, Martinko JM, Bender KS, Buck DH, Stahl DA. Ecosistemas microbianos. In: Microbiologia de Brock 14 ed. Porto Alegre: Artmed; 2016. p. 600–5.
- 11- Rabin N, Zheng Y, Opoku-Temeng C, Du Y, Bonsu E, Sintim HO. Biofilm Formation Mechanisms and Targets for Developing Antibiofilm Agents. *Future Medicinal Chemistry*. 2015 Mar;7(4):493–512.
- 12- Haque S, Ahmad F, Dar SA, Jawed A, Mandal RK, Wahid M, et al. Developments in strategies for Quorum Sensing virulence factor inhibition to combat bacterial drug resistance. *Microbial Pathogenesis* [Internet]. 2018 Aug 1 [cited 2020 May 29]; 121:293–302.
- 13- Bhardwaj AK, Vinothkumar K, Rajpara N. Bacterial Quorum sensing inhibitors: attractive alternatives for control of infectious pathogens showing multiple drug resistance. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery* [Internet]. 2013 Apr 1;8(1):68–83.
- 14- Sun F, Qu F, Ling Y, Mao P, Xia P, Chen H, et al. Biofilm-associated infections: antibiotic resistance and novel therapeutic strategies. *Future Microbiology*. 2013 Jul;8(7):877–86.
- 15- Venkatesan N, Perumal G, Doble M. Bacterial resistance in biofilm-associated bacteria. *Future Microbiology* [Internet]. 2015;10(11):1743–50. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26517598/>
- 16- Soto SM. Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. *Virulence* [Internet]. 2013 Apr;4(3):223–9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3711980/>
- 17- Roy R, Tiwari M, Donelli G, Tiwari V. Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. *Virulence* [Internet]. 2017 Mar 31;9(1):522–54. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5955472/>

## CONTATO

Vinícius Freitas de Oliveira: [vifreitas159@hotmail.com](mailto:vifreitas159@hotmail.com)

# Bioestimuladores de Colágeno no Tratamento da Flacidez Facial

## Collagen Biostimulators in the Treatment of Facial Sagging

Renato Antônio Feitosa<sup>a</sup>, Thais Bruna Ferreira da Silva<sup>b</sup>

a: Graduando em Biomedicina da Escola de Ciências da Saúde das Faculdades Metropolitanas Unidas - FMU, Brasil

b: Biomédica, Mestre em Biomedicina pela Universidade São Paulo – USP, Brasil

### RESUMO

Alguns fatores aceleram o envelhecimento da pele, tais como os extrínsecos que são causados por ações relacionados ao meio ambiente, estilo de vida, tabagismo, álcool, entre outros e fatores intrínsecos que são causados pela ação do tempo, fatores genéticos, hormonais e metabólicos. Esses fatores, isolados ou em conjunto, podem levar a perda de firmeza e sustentação da pele, absorção óssea e diminuição do volume dos compartimentos de gorduras faciais. A busca por procedimentos que possam desacelerar ou reverter esses efeitos continua crescendo a cada ano no mundo e é nesse cenário que entram os bioestimuladores de colágeno, com a promessa de melhorar a firmeza, sustentação e elasticidade da pele e com isso trazer o rejuvenescimento facial. O objetivo deste trabalho é avaliar a eficácia dos principais bioestimuladores de colágeno injetáveis, biodegradáveis e absorvíveis no tratamento da flacidez e rejuvenescimento facial. A metodologia baseia-se na revisão de literatura com análise de artigos científicos. Pode-se concluir que os bioestimuladores de colágeno demonstram ser eficazes como um produto capaz de prevenir ou reverter os sinais do envelhecimento.

**Descritores:** bioestimuladores de colágeno, envelhecimento da pele, rejuvenescimento

### ABSTRACT

Some factors accelerate skin aging, such as extrinsic factors that are caused by actions related to the environment, lifestyle, smoking cigarettes, alcohol, among others, and intrinsic factors that are caused by the action of time, genetic, hormonal, and metabolic factors. These factors, alone or together, can lead to loss of firmness and support of the skin, bone absorption, and decrease in the volume of facial fat compartments. The search for procedures that can slow or reverse these effects continues to grow every year in the world and it is in this scenario that collagen biostimulators come in with the promise of improving firmness, support and elasticity of the skin and thus bring facial rejuvenation. The aim of this study is to evaluate the efficacy of the main injectable, biodegradable, and absorbable collagen biostimulators in the treatment of facial sagging and rejuvenation. The methodology is based on a literature review with analysis of scientific articles. It can be concluded that collagen biostimulators have proven to be effective as a product capable of preventing or reversing the signs of aging.

**Descriptors:** collagen biostimulators, Skin Aging, rejuvenation

### INTRODUÇÃO

A busca pelo ideal de beleza faz com que cada vez mais aumente o número de pessoas em busca de procedimentos estéticos que possam retardar ou reverter o envelhecimento cutâneo, sendo uma das principais preocupações a flacidez facial, pois com o passar do tempo a pele passa por mudanças na sua estrutura decorrentes de processos intrínsecos que

são as mudanças que ocorrem em decorrência da passagem do tempo, fatores genéticos, hormonais e metabólicos e os fatores extrínsecos que são causados por ações relacionadas ao meio ambiente e estilo de vida, tais como umidade do ar, poluição, exposição solar, tabagismo, entre outros, que isoladas ou em conjunto podem favorecer a perda de colágeno e elastina desencadeando a flacidez da pele, perda da sustentação óssea e compartimentos de gorduras que podem provocar alterações nos contornos e estruturação da face.

O envelhecimento facial acontece principalmente pela diminuição da capacidade sintética e funcional dos fibroblastos o que conseqüentemente leva a diminuição da elastina e fibras de colágeno, diminuição da matriz extracelular que vem acompanhada de mudanças na estrutura e integridade da pele, tais como perda de volume, flacidez e diminuição na qualidade da textura da pele.<sup>1</sup>

Os fibroblastos dérmicos são responsáveis por sintetizar importantes proteínas da matriz extracelular que têm papel fundamental na sustentação da pele tais como colágenos, fibras elásticas, proteoglicanos e oligossacarídeos.<sup>2</sup>

O envelhecimento cutâneo é classificado em processo intrínseco e extrínseco. O intrínseco, também conhecido como cronológico, é o inevitável, sendo decorrente da passagem do tempo, fatores genéticos, estado hormonal e metabólico. O extrínseco é causado por ações do meio ambiente, estilo de vida, poluição, exposição solar, tabagismo, alimentação, álcool entre outros.<sup>2,7</sup>

Com o passar do tempo a pele irá sofrer mudanças decorrentes desses fatores, sendo as mais notadas através da musculatura, flacidez da pele, perda de sustentação óssea, compartimentos de gordura, gerando alterações nos contornos e estruturação facial.<sup>7</sup>

Como meio de desacelerar ou reverter esses sinais de envelhecimento e flacidez facial encontram-se os bioestimuladores de colágeno que são substâncias a serem injetadas na derme profunda, subderme ou camada supraperioeteal que ao ser injetada estimulará a produção de colágeno, sendo um tratamento minimamente invasivo, tendo efeito gradual e com resultados visíveis após alguns meses da aplicação, melhorando a flacidez da pele.<sup>5,6</sup>

Os bioestimuladores de colágeno são classificados de acordo com a sua durabilidade e absorção pelo organismo existindo os semipermanente que são biodegradáveis e absorvidos pelo próprio organismo por um determinado período de tempo por mecanismos fagocitários e nessa categoria temos a hidroxiapatita de cálcio (caHA), o ácido Poli-L-láctico (PLLA) e a policaprolactona (PCL) e existem os bioestimuladores que são classificados como não biodegradável como é o caso do polimetilmetacrilato (PMMA) que não será objeto de estudo deste trabalho.<sup>4,6</sup>

O mecanismo de ação consiste basicamente na interação de células fagocitárias com as partículas de bioestimuladores que resultam em uma resposta inflamatória controlada induzindo fibroblastos na deposição de colágeno no local lesionado. A aplicação é feita com cânula na forma diluída ou pura em locais onde há perda de colágeno e tem indicação do fabricante para aplicação.<sup>7</sup>

Inicialmente, no local lesionado há deposição de colágeno tipo III em torno das microesferas de bioestimuladores e deposição de colágeno tipo I na periferia e com o passar do tempo há uma remodelação do colágeno tipo III que resultará no predomínio de colágeno tipo I no tecido neoformado.<sup>8</sup>

A hidroxiapatita de cálcio (CaHA) é um bioestimulador de colágeno que há mais de 20 anos vem sendo utilizada para correções de defeitos ósseos e incontinência urinária de estresse, mas em 2006 obteve aprovação do *FDA (Food and Drugs Administration)* para tratamento de portadores de HIV para lipoatrofia facial e em 2009 para tratamentos estéticos.<sup>2</sup>

A (CaHA) é composta por microesferas lisas e uniformes produzidas sinteticamente e suspensas em um gel à base de carboximetilcelulose de sódio tendo uma proporção de 30% das microesferas com diâmetro entre 25 µm a 45 µm e 70% do gel carreador, sendo o *Radiesse®* a marca mais utilizada, podendo ser utilizada na sua forma pura na apresentação de seringa de 1,5 ml ou diluída. As microesferas formam uma estrutura suportando o crescimento interno de fibroblastos que de forma gradual depositam componentes na matriz extracelular. O gel se dissipa, deixando as microesferas no local da injeção, estimulando a produção do colágeno, podendo ser injetados em sulco nasogeniano, comissura oral, mento, malar, arco zigomático, fossa temporal, podendo utilizar no rosto em sua fórmula natural na seringa ou diluída com soro. Existem algumas marcas comerciais do produto: *Biocrystal, Cientific, Crystalys, Diamond e Radiesse*, sendo esse último o mais conhecido fabricado pela *Merz Pharma*.<sup>1</sup>

A hidroxiapatita de cálcio é um produto biocompatível e biodegradável, semipermanente que possui durabilidade de doze a dezoito meses, variando de acordo com o metabolismo e idade, sendo os eventos adversos mais comuns leves edemas, hematomas, eritemas e dor no local da aplicação, desaparecendo de 1 a 5 dias.<sup>7,10</sup>

Os fibroblastos naturais e aqueles envelhecidos quando sofrem ação da hidroxiapatita de cálcio em rugas e sulcos apresentam força contrátil maior que na ausência deles, sendo que alguns estudos mostraram efeito positivo da (CaHA) no envelhecimento cutâneo.<sup>3</sup>

O ácido poli-L-lático (PLLA) é um bioestimulador de colágeno descoberto em 1954 pelo *Centre National de la Recherche Scientifique*, em Lyon na França, sendo produzido primeiramente para contração muscular, sendo derivada do ácido lático.<sup>7</sup>

O PLLA foi originalmente desenvolvido na Europa com a marca comercial *New-fill* e vem sendo utilizado na estética desde 1999 em mais de 30 países. Em 2004 foi aprovado pela *Food and Drug Administration* para tratamento da lipoatrofia associada ao HIV com a marca comercial *Sculptra®*, consistindo em um polímero sintético da família dos ácidos alfa-hidróxidos, o ácido lático sendo um bioestimulador absorvível, semipermanente sendo apresentado em forma de pó liofilizado PLLA na concentração de 150 mg e com os excipientes carmelose sódica a 90 mg e manitol 127,5 mg em frasco estéril transparente que comporta até 10ml. O diâmetro das partículas é de 40 µm a 63 µm. A durabilidade depende do metabolismo de cada indivíduo, mas em média 12 a 18 meses. As marcas mais utilizadas é o *Renova Elleva®* da *Innovapharma* e o *Sculptra®* da *Galderma*.<sup>1,7,8</sup>

O PLLA deve ser diluído em 8 ml de água destilada 24h a 72h antes da aplicação, sendo sua estabilidade alcançada após 72h em temperatura ambiente e é indicado para depressões cutâneas, sulcos, rugas, correções volumétricas, flacidez, contorno facial, região malar, pescoço, mento, mandíbula, entre outras, mas é contra indicada em regiões perioral e periorbitais, bem como região labial.<sup>1,8,9</sup>

A ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) em 2021 aprovou a utilização do *Sculptra®* sem a necessidade de aguardar 24h a 72h antes da aplicação. Com a utilização de um agitador para homogeneização das partículas do PLLA é possível a aplicação imediata.<sup>1</sup>

Os efeitos adversos podem ocorrer principalmente nos locais de aplicação, como equimoses, hematomas, edemas, pápulas, nódulos ou granulomas. Após cada tratamento o paciente deve ser orientado a massagear a área por cinco vezes ao dia, cinco minutos durante cinco dias, garantindo a distribuição do produto e prevenindo a formação de nódulos.<sup>9</sup>

O PLLA se decompõe por hidrólise não enzimática convertendo o polímero de ácido polilático em monômero de ácido lático, sendo metabolizado em dióxido de carbono (CO) e água (H<sub>2</sub>O) e excretado pela urina e fezes, bem como sistema respiratório.<sup>11</sup>

A policaprolactona (PCL) é um bioestimulador de colágeno que surgiu na Holanda com o nome comercial de *Ellansé®* sendo fabricada pela *Sinclair Pharmaceuticals* trazendo uma proposta inovadora de um produto absorvível. O peso molecular correspondente do polímero determina o tempo de sua degradação via hidrólise, sendo assim pela sua formulação a microesfera é garantida pelos prazos em anos de um (S), dois (M), três (L) e quatro (E). A microesfera apresenta na sua composição 30% de PCL e 70% um gel carreador

carboximetilcelulose (CMC) que provém de fontes não animais, não humanas, não bacterianas e não é reticulado.<sup>1,11</sup>

O *Ellansé®* promete duas ações em uma, sendo preenchedor e bioestimulador. É apresentado em uma seringa de 1ml, trazendo resultados duradouros e naturais, tratando a flacidez facial. As microesferas têm o tamanho de 25 µm a 50 µm sendo seguro para aplicação. Essas esferas se degradam e são metabolizadas em CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O e excretadas por vias normais com o tempo a depender da versão (S,M,L,E) do produto. A versão de 4 anos foi retirada do mercado, porém ainda são comercializadas nos Estados Unidos e Europa.<sup>5,11</sup>

As principais indicações são face, região malar, submalar, sulco nasolabial, sulco labiomentoniano, sulco mental, mento, ângulo da mandíbula e as áreas contraindicadas são glabella, pálpebras e lábios.<sup>1,5,11</sup>

Os efeitos adversos incluem infecção, inchaço, erupção cutânea, edema, eritema, hematoma, nódulos e dor na aplicação, sendo transitórios.<sup>5</sup>

A busca por procedimentos estéticos que possam retardar ou reverter os efeitos do envelhecimento, bem como a promessa de produtos bioestimuladores de colágeno que possam tratar da flacidez da pele dão relevância ao estudo que tem por objetivo analisar a eficácia dos bioestimuladores de colágeno no tratamento da flacidez facial.

## MÉTODO

O presente trabalho foi desenvolvido com base em revisão de literatura, cujo levantamento bibliográfico foi realizado nas bases de dados da Revista USP, *Mendeley*, Google Acadêmico e livros. Para seleção dos artigos foram considerados os mais recentes de 2020 a 2022 e foi selecionado um de 2013 por sua relevância neste trabalho. Como critérios de inclusão dos artigos foram considerados os temas tais como bioestimuladores de colágeno, hidroxiapatita de cálcio, ácido poli-l-lático e Caprolactona.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base na revisão de literatura e estudos dos artigos selecionados, os bioestimuladores de colágeno a base de hidroxiapatita de cálcio (*Radiesse®*), ácido poli-l-lático (*Sculptra®*) e policaprolactona (*Ellansé®*), por meio de seus mecanismos de ação, induzem os fibroblastos à produção de colágeno e conseqüentemente à melhora dos tecidos e das propriedades

mecânicas, aumentando a firmeza, melhorando a flacidez facial e a qualidade da pele, sendo capazes de prevenir ou reverter os efeitos do processo de envelhecimento da face.

Vale ressaltar que, apesar de serem produtos seguros, os bioestimuladores podem apresentar efeitos adversos tais como edema, hematoma, eritema, nódulos, entre outros, que desaparecem em alguns dias.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os bioestimuladores de colágeno estudados neste artigo demonstram ser produtos eficazes no tratamento da flacidez facial e, apesar de alguns efeitos adversos, se mostram seguros quando utilizados por profissionais habilitados.

## REFERÊNCIAS

1. Perlingueiro A. Esculpindo Faces: Bioestimuladores. 1 Ed. São Paulo: Editora Napoleão Quintessence, 2022. 32, 216, 217, 218, 249, 255p.
2. Steiner D, Addor F. Envelhecimento Cutâneo. 1 Ed. Rio de Janeiro: Editora GEN, 2014. 11,12, 13p.
3. Oliveira CSFP, Almeida TJS, Martins LO, Sorpreso LATM, Finck NS. Hidroxiapatita de cálcio: uma revisão quanto à eficácia, segurança e imagiologia quando usado como preencher e como bioestimulador. (artigo científico google acadêmico). Brasil, 2021. 04p. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/21689>
4. Lima, NB, Soares ML. Utilização dos bioestimuladores de colágeno na harmonização orofacial. (artigo científico Revista USP). Recife, 2020. 03p. Disponível em: <https://www.revistas.usp.br/clrd/article/view/165832>
5. Santos, PSP, Bioestimuladores de colágeno na harmonização facial: Ellansé -Sculptra – Radiesse. (artigo científico em google acadêmico). Santos, 2021. 17,18,19,26p. Disponível em: <https://faculdefacsete.edu.br/monografia/files/original/f9c624d1a2757639c0e1f81bc8b3405b.pdf>
6. Freitas, GARM. Bioestimuladores de colágeno injetáveis: Ácido Poli-L-lático, Hidroxiapatita de cálcio e Policaprolactona. (artigo científico em google acadêmico). São Paulo, 2021. 05, 14p. Disponível em: <http://www.ciodonto.edu.br/monografia/files/original/6b990e89736c2707ed57f6801e4a9b8f.pdf>
7. Correa A, Silva DS, Santos DI, Radael L, Santos TM. Ação dos bioestimuladores de colágeno semipermanentes para o tratamento de rejuvenescimento facial. (artigo em google acadêmico). Santa Catarina, 2022. 10,11.15p. Disponível em : <https://repositorio.animaeducacao.com.br/bitstream/ANIMA/28186/1/A%c3%87%c3%83O%20DO S%20BIOESTIMULADORES%20DE%20COL%c3%81GENO.pdf>
8. Cunha MZ, Engracia M, Souza LG, Machado Filho CD. Bioestimuladores e seus mecanismos de ação. (artigo disponível em google acadêmico). São Paulo, 2019. 03, 04p. Disponível em: <http://www.surgicalcosmetic.org.br/details/771/en-US/biostimulators-and-their-mechanisms-of-action>

9. Machado Filho CDS, Santos TC, Rodrigues LJ, Rodrigues AP, Marisa GC. Ácido poli-L-láctico: um agente bioestimulador. (artigo disponível em redalyc.org). São Paulo, 2013, 05p. Disponível em: [https://docs.bvsalud.org/biblioref/2016/08/1087/2013\\_345\\_ingles.pdf](https://docs.bvsalud.org/biblioref/2016/08/1087/2013_345_ingles.pdf)
10. Neca CSM, Gondim ACL, Rocha CAS, Silva FG. O uso de bioestimuladores de colágeno a base de hidroxiapatita de cálcio. (artigo disponível em eacademia.org). Brasil, 2022. 04, 05p. Disponível em <https://eacademica.org/eacademica/article/download/237/196/2059>
11. Beserra MS, Siqueira LMS, Peixoto FB. Implicações do uso de bioestimuladores de colágeno no tratamento da face. (artigo disponível em Mendeley). Alagos, 2022. 19,20,24p. Disponível em: <https://www.mendeley.com/catalogue/9113ef9f-3fd9-356f-8655-e344f5ba53b5/>

## **CONTATO**

Renato Antônio Feitosa: [refei2008@hotmail.com](mailto:refei2008@hotmail.com)

# Eficácia de fotoprotetores como prevenção do câncer de pele

## Effectiveness of photoprotectors as skin cancer prevention

Grazielle Prado Alexandre<sup>a</sup>, Stefani Lameze<sup>b</sup>, Priscila Ferreira Silva<sup>c</sup>

a: Farmacêutica Industrial, Mestre e Doutora, Graduanda de Odontologia, docente em cursos de graduação e Pós-graduação do Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas – FMU, Brasil

b: Biomédica, Mestre, Graduanda de Odontologia docente em cursos de graduação e Pós-graduação do Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas – FMU, Brasil

c: Biomédica, Mestre, Doutoranda, docente na Universidade Anhembi Morumbi, Brasil

### RESUMO

De acordo com a Sociedade Brasileira de Dermatologia, o câncer de pele é a neoplasia de maior incidência no Brasil, correspondendo a 33% de todos os diagnósticos. O Instituto Nacional do Câncer (INCA) registra, a cada ano, em torno de 180 novos casos. Os mais comuns são os carcinomas basocelulares e os espinocelulares, já o melanoma é o mais agressivo e representa cerca de 3% dos cânceres. Entre os fatores de risco que contribuem para o aparecimento deste tipo de câncer estão: fatores genéticos e radiação ultravioleta. E estudos epidemiológicos que mostram uma forte associação entre o desenvolvimento de melanoma e a frequência de episódios de queimadura grave induzida pela radiação ultravioleta. Sendo o uso de filtro solar uma das principais medidas de prevenção como prevenção do câncer de pele, os filtros solares são substâncias capazes de absorver, refletir ou refratar a radiação ultravioleta e assim proteger a pele da exposição à luz solar. Esse artigo tem como objetivo, através de revisão de estudos já realizados, verificar a eficácia e a maneira correta do uso de fotoprotetores para prevenir o aparecimento de lesões neoplásicas.

**Descritores:** fotoprotetores solares, câncer, pele

**ABSTRACT:** according to the Brazilian Society of Dermatology, skin cancer is the most prevalent neoplasm in Brazil, accounting for 33% of all diagnoses. The National Cancer Institute (INCA) registers around 180 new cases each year. The most common are basal cell and squamous cell carcinomas, melanoma is the most aggressive and represents about 3% of cancers. Among the risk factors that contribute to the appearance of this type of cancer are: genetic factors and ultraviolet radiation. And epidemiological studies show a strong association between the development of melanoma and the frequency of episodes of severe burn induced by ultraviolet radiation. Being the use of sunscreen one of the main measures of prevention as skin cancer prevention, the sunscreen, are substances capable of absorbing, reflecting or refracting ultraviolet radiation and thus protecting the skin from exposure to sunlight. This article aims to verify the efficacy and correct way of using photo protectors to prevent the appearance of neoplastic lesions.

**Descriptors:** sunscreen agents, cancer, skin

### INTRODUÇÃO

O câncer de pele é a doença mais comum em caucasianos em todo o mundo. Dentre todos os tipos de câncer de pele, o melanoma é o mais agressivo e a mundial desse câncer vem aumentando anualmente a uma taxa mais rápida em comparação com qualquer outro tipo de câncer <sup>1,2</sup>.

Entre os fatores de risco que contribuem para o aparecimento deste tipo de câncer estão: fatores genéticos e radiação ultravioleta. E estudos epidemiológicos, mostraram uma forte associação entre o desenvolvimento de melanoma e a frequência de episódios de queimadura grave induzida pela radiação ultravioleta <sup>3</sup>.

Tendo como uma das principais medidas de prevenção o uso de filtros solares, que são substâncias capazes de absorver, refletir ou refratar a radiação ultravioleta e assim proteger a pele da exposição à luz solar<sup>4</sup>.

Estudos documentaram que a utilização do filtro solar tem sido feita de maneira inadequada e insuficiente, especialmente em feriados e em locais ensolarados. Para proteger a pele contra a radiação UV é importante aplicar uma quantidade suficiente de protetor solar em todos os locais expostos do corpo e não esquecer nenhuma área<sup>5</sup>.

A pele é o maior órgão do corpo, representando quase 12% do peso total do corpo. As radiações UV, causam mutações genéticas no DNA das células podendo gerar células neoplásicas e o principal método de prevenção contra o aparecimento de lesões malignas, é o uso correto do filtro solar <sup>6</sup>.

Estudos realizados anteriormente pela *Food and Drug Administration*, comprovam que para uma real proteção, os filtros solares devem ser aplicados em 2mg/cm<sup>2</sup> de pele de forma homogênea<sup>7</sup>.

Percebe-se um descuido dos consumidores quanto ao uso correto de protetores solares: grande parte não segue as orientações de uso descritas no rótulo da embalagem; na aplicação, a mesma é realizada em apenas algumas partes do corpo; muitos se esquecem de usá-lo e, quando o usam, não ocorre a reaplicação ao longo do dia<sup>8</sup>.

## **MÉTODO**

Trata-se de uma pesquisa bibliográfica de caráter exploratório por meio das bases de dados *Scientific Eletronic Library* online - Scielo, Pub Med/Medline, e literaturas relacionadas a câncer de pele e uso de protetor solar.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A pele é composta por duas camadas: a epiderme e a derme. A epiderme é composta por epitélio pavimentoso, queratinizado e estratificado, com uma camada basal subjacente

apoiada na derme. Na maioria das regiões do corpo a epiderme é dividida em quatro camadas: basal, espinhosa, granular e córnea<sup>9</sup>.

Zonas com maior atrito como palmas das mãos e pés apresentam uma quinta camada chamada de lúcida, entre as camadas córnea e granulosa, composta por uma fina camada de células achatadas parcialmente preenchidas por queratina e sobre elas existe uma cobertura glicolípídica, ambas garantindo impermeabilidade a membrana plasmática<sup>10</sup>.

A camada basal é a mais profunda da epiderme, apresenta morfologia colunar, citoplasma basófilo e núcleo grande e oval. Apresenta filamentos de queratina na sua superfície. O melanócito, que é a célula responsável pela formação de melanina, encontra-se nesta camada. A renovação da epiderme desde a divisão de células basais até a eliminação das lâminas córneas é de 52 a 75 dias<sup>9</sup>.

A camada espinhosa ou de Malpighi é composta por várias células poligonais que se unem por ligações intercelulares entre os queratinócitos adjacentes, nesta camada encontram-se as células de Langerhans que são responsáveis por participar da resposta imune a apresentar antígenos. Compõem de 2 a 8% das células da epiderme<sup>10</sup>.

A camada granular torna-se achatada devido ao processo de diferenciação células das camadas basais. No interior das células granulosas localizam-se diversas proteínas que posteriormente serão ativadas no processo de formação de envelopes celular dos corneócitos<sup>9</sup>.

A camada lúcida é observada nas regiões de palma das mãos e planta dos pés, entre as camadas granulosa e córnea, composta por aproximadamente cinco camadas de queratinócitos achatados garantindo a impermeabilidade da pele<sup>10</sup>.

A camada córnea, possui um formato plano e largo, nesta fase já perderam o núcleo e o citoplasma, gerando assim o processo de descamação natural, não gerando dano ao tecido. A apoptose dessas células faz com que liberem as proteínas que estavam presentes na camada granular formando a barreira lipídica extracelular hidrofóbica, que tem como responsabilidade manter a homeostase do tecido<sup>9</sup>.

Durante as últimas décadas, a camada protetora de ozônio foi danificada e resultou em um aumento significativo da radiação solar que chega à Terra. Como consequência, a incidência de várias doenças e distúrbios relacionados com a exposição excessiva à radiação ultravioleta solar (UV) aumentou assustadoramente nos últimos anos, como as neoplasias cutâneas malignas<sup>11</sup>.

Os raios solares contêm a radiação UV A, B e C. Os raios UVC incidem em um comprimento de onda que varia entre 180 e 290 nm, enquanto os raios UVB incidem entre 290 e 320 nm, e os raios UVA entre 320 e 400 nm. Os raios UVA e UVB são os principais responsáveis pela maior parte das lesões cutâneas devido à excessiva exposição à radiação solar<sup>7</sup>.

A fotocarcinogênese consiste no desenvolvimento de câncer de pele induzido pela radiação ultravioleta que produz complexos radicais, como hidroxila, elétrons aquosos, radicais hidrogênio e superóxido. Esses produtos, são produzidos por reações fotossensíveis diretas e indiretas, que levam a quebra do DNA e danos na base, sendo, letais e mutagênicas. Na pele, a melanina é um importante cromóforo, que age como filtro na absorção das radiações UVA, UVB e VL. A melanina é quem absorve a radiação visível, auxiliando na transformação dessa energia em calor e distribuindo entre os cabelos e vasos sanguíneos (capilares). Também ajuda a eliminar radicais, como as moléculas de hidroxila e oxigênio, preservando o DNA contra a formação de bases de pirimidina<sup>12</sup>.

O câncer de pele pode ser classificado em dois grandes grupos: o melanoma e o não-melanoma. O melanoma é originário dos melanócitos, e é raro se comparado ao não melanoma. No Brasil, de acordo com o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), no ano de 2016, houve 5.670 novos casos de melanoma (sendo 3 mil homens e 2.670 mulheres) e em torno de 1.547 óbitos<sup>7</sup>.

Como a pele é heterogênea, o câncer de pele não-melanoma pode apresentar tumores de diferentes linhagens. Os mais frequentes são o carcinoma basocelular e o carcinoma espinocelular. O carcinoma basocelular, apesar de mais incidente, é o menos agressivo<sup>2</sup>.

Estudos desenvolvidos nos EUA mostraram que a taxa de carcinoma basocelular aumentou com a idade e os homens tiveram uma incidência significativamente maior de CBC do que as mulheres. A incidência entre os americanos com menos de 40 anos, particularmente entre as mulheres<sup>13</sup>.

O carcinoma de células escamosas cutâneas (CEC) é o segundo tipo de câncer mais comum na Austrália. A maioria dos CCEs surgem de lesões de ceratose actínica pré-maligna (QA) que se formam na pele exposta ao sol cronicamente <sup>14</sup>.

O melanoma em si corresponde ao estágio final da carcinogênese melanocítica, na qual a instabilidade genética das células iniciadas leva a um aumento da sua capacidade proliferativa e de invasão. Indivíduos que se expõem à radiação UV, têm aumentado a quantidade de melanócitos, gerando mudanças proliferativas, e essas mudanças são classificadas de acordo com a agressividade<sup>7</sup>.

O câncer de pele é um dos cânceres mais comuns no mundo. A maioria dos cânceres de pele se desenvolve a partir da exposição à radiação ultravioleta, principalmente da exposição ao sol. As maiores taxas de incidência de câncer de pele em todo o mundo estão na Austrália e na Nova Zelândia, onde duas em cada três pessoas são diagnosticadas em sua vida<sup>15, 16</sup>.

O uso de protetores solares previne queimaduras na pele e evita danos mais graves para o ser humano. No entanto, evitar a exposição solar entre as 11 horas e as 17 horas, usar vestuário adequado, adequar a exposição ao fototipo da pele, ingerir água durante os períodos de exposição, usar óculos escuros e renovar a aplicação do protetor solar a cada duas horas, são algumas formas de complementar o efeito preventivo do protetor solar<sup>17</sup>.

A cor de pele é tradicionalmente definida pelo sistema de tipos de pele proposto por Fitzpatrick em 1988 (Tabela 1), que caracteriza os indivíduos em seis fototipos de pele (I-VI) e a susceptibilidade à queimadura solar<sup>9</sup>.

Quadro 1 - Classificação dos fototipos de Fitzpatrick		
Fototipos	Características	Sensibilidade ao Sol
I - Branca	Queima com facilidade, nunca bronzeia	Muito sensível
II - Branca	Queima com facilidade, bronzeia muito pouco	Sensível
III - Morena Clara	Queima moderadamente, bronzeia moderadamente	Normal
IV - Morena Moderada	Queima pouco, bronzeia com facilidade	Normal
V - Morena Escura	Queima raramente, bronzeia bastante	Pouco sensível
VI - Negra	Nunca queima, totalmente pigmentada	Insensível

**Quadro 1-** Classificação dos fototipos conforme Fitzpatrick<sup>18</sup>.

Em nosso país, a tendência cultural da exposição solar nas praias ainda é muito popular. A maioria dos turistas vão às praias no período de maior incidência de radiação ultravioleta, estando suscetíveis a grandes quantidades de radiação ultravioleta e seus riscos relacionados<sup>12</sup>.

Peles mais morenas são mais melanocompetentes e reduzem a penetração de UVR e as taxas mais rápidas de reparo de DNA, quando comparadas a peles mais claras<sup>12</sup>.

Evidências científicas demonstram o impacto da luz UV nos diferentes fototipos, sendo assim necessário utilizar da tecnologia dos fotoprotetores, prevenindo câncer de pele além da proteção contra fotodermatoses e fotoenvelhecimento<sup>19, 20</sup>.

A radiação ultravioleta (UV) da luz solar pode levar a múltiplos efeitos adversos, incluindo fototoxicidade cutânea (queimadura solar), fotoenvelhecimento e carcinogênese. O UVB

induz diretamente dímeros de ciclopirimidina (CPDs) dentro do DNA genômico (gDNA) de queratinócitos e melanócitos, e tanto a exposição UVA como UVB aumentam a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) que lesam uma variedade de componentes celulares, incluindo o gDNA, e induzir citocinas imunossupressoras. Por este motivo à radiação UV está ligada ao desenvolvimento do câncer cutâneo de melanoma e não-melanoma<sup>21</sup>.

A fotoproteção é um conjunto de medidas que visam reduzir a exposição solar e prevenir o desenvolvimento de dano agudo e crônico na pele<sup>12</sup>.

As formulações fotoprotetoras tópicas apresentam ação física ou química que diminuem o efeito da radiação UV por mecanismos de absorção ação química, por dispersão ou reflexão da radiação ação física. A qualidade de um fotoprotetor depende do seu FPS (Fator de Proteção Solar) à radiação UVB, da medida de proteção PPD (*Persistent Pigment Darkening*) ou UVA-PF (Fator de Proteção à radiação UVA), e das suas propriedades físico-químicas como: formação de película ideal sobre a pele, estabilidade, baixa hidrossolubilidade e hipoalergenicidade<sup>7</sup>.

Temos também o uso de fotoprotetores orais como nicotinamida, que em diversos estudos vêm demonstrando efeitos fotoprotetores contra carcinogênese. Assim, os pesquisadores sugerem o uso de fotoprotetores tópicos associados a fotoprotetores orais na prevenção do cancer<sup>20</sup>.

A utilização de protetor solar é, cada vez mais, uma necessidade, por desempenhar um papel importante na proteção a radiação solar, na prevenção do câncer de pele. Assim sendo, se tornou fundamental desenvolver novos protetores solares, no sentido de incorporar preparações que ofereçam maior eficácia na absorção da radiação UV, ou seja, que permitam uma maior proteção oferecida pelo protetor solar<sup>17</sup>.

É possível observar grande importância da aplicação do filtro solar para prevenir o aparecimento de lesões neoplásicas causadas pelo não uso ou uso inadequado do filtro solar que gera lesões celulares e no DNA.

Estima-se que, no mundo todo, 45% dos cânceres que podem ser prevenidos são cutâneos e que a maioria das mortes causadas pelo melanoma pode ser evitada. Vários estudos mostram a necessidade de medidas educativas de fotoproteção para a população. Mesmo os pacientes que já foram diagnosticados com neoplasias cutâneas nem sempre mudam sua rotina, incluindo os hábitos de bronzeamento<sup>12</sup>.

Autores como Leonrad<sup>1</sup>, Marques<sup>17</sup> e Marzuca<sup>13</sup> afirmaram diversas vezes a importância do uso correto do fotoprotetor para a prevenção dos danos causados pela radiação ultravioleta.

Com base no levantamento de dados, foi avaliado que o número de pacientes diagnosticados com câncer de pele no mundo tem aumentado, principalmente em regiões onde a população apresenta fototipos mais baixos como países da Oceania, Europa e Canadá.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conclui-se que com o aumento da incidência em casos de câncer de pele, como carcinomas espinocelulares e basocelulares, relatados em todo o mundo, o uso de agentes fotoprotetores tem aumentado ao longo dos anos. Houve melhora sintomática e redução nos casos de câncer de pele quando agentes fotoprotetores são utilizados de forma terapêutica ou profilática, indicando a necessidade de promover e regularizar sua aplicação<sup>22</sup>. O uso de protetor solar é um comportamento que pode ajudar a reduzir o risco de câncer de pele, entre outras doenças<sup>8</sup>. O alto índice de melanomas e não melanomas atribuídos à exposição solar UVR ressalta o potencial de prevenção desses cânceres<sup>5</sup>.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Leonardi GC, Falzone L, Salemi R, Zanghi A, Spandidos DA, Mccubrey JA, Candido S, Libra M. Cutaneous melanoma: From pathogenesis to therapy (Review). *Int J Oncol*. 2018 Apr;52(4):1071-1080. doi: 10.3892/ijo.2018.4287. Epub 2018 Feb 27. PMID: 29532857; PMCID: PMC5843392. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29532857/> Acesso: 02/06/2023
2. Zink SR. Câncer de pele: a importância do seu diagnóstico, tratamento e prevenção. *Revista HUPE*, Rio de Janeiro, 2014;13 (Supl. 1):76-83. doi: 10.12957/rhupe.2014.12256. Disponível em: <https://www.e-publicacoes.uerj.br/index.php/revistahupe/article/view/12256>. Acesso: 02/06/2023
3. Cortez DAG, ES Machado, SCSD Vermelho, JJV Teixeira e Cortez LER. O conhecimento e a utilização de filtro solar por profissionais da beleza. *Ciência & Saúde Coletiva*, 2016; 21(7): 2267-2273. doi: 10.1590/1413-81232015217.00302015. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/csc/a/vTYR5kYBRBhyWcwYdWX3DPt/abstract/?lang=pt>. Acesso: 02/05/2023
4. Lopes FM, Cruz RO, Batista KA. Radiação ultravioleta e ativos utilizados nas formulações de protetores solares. *Ensaio e Ciência Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde*. 2012;16 (4): 183-199. Disponível em: <https://www.redalyc.org/pdf/260/26029236014.pdf>. Acesso: 02/05/2023
5. Marzuka AG, Book SE. Basal cell carcinoma: pathogenesis, epidemiology, clinical features, diagnosis, histopathology, and management. *Yale J Biol Med*. 2015;88(2):167-179. PMID: 26029015; PMCID: PMC4445438. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26029015/>. Acesso: 02/05/2023
6. Dan L. Longo. *Manual de Oncologia Harris*, 2. ed. Mc Graw Hill 2015.
7. Silva P. *Farmacologia*, 8a. edição. 2017.
8. Vergílio MM, Filho PAR. O comportamento do consumidor de protetor solar: influência dos aspectos sensoriais no hábito de fotoproteção e motivação de compra. *Surg. Cosmet. Dermatol*. 2020;12 (3 ): 237-44. Disponível em:

[http://www.surgicalcosmetic.org.br/Content/imagebank/pdf/v12/12\\_n3\\_791\\_pt.pdf](http://www.surgicalcosmetic.org.br/Content/imagebank/pdf/v12/12_n3_791_pt.pdf). Acesso: 02/05/2023

9. Tassinary J, Goelzer F, Peelings Químicos Magistrals e abordagens terapêuticas. 1. edição. 2018
10. Pavani AA, Fernandes TRL. Plasma Rico em Plaquetas, no Rejuvenescimento Cutâneo Facial, uma Revisão de Literatura. Revista Uningá [Internet]. 2017, Paraná. [Acesso em: 4. Fev. de 2022. Disponível em: <http://revista.uninga.br/index.php/uningareviews/article/view/1943/1539> . Acesso: 02/05/2023
11. Napagoda MT, Malkanthi BM, Abayawardana SA, Qader MM, Jayasinghe L. Photoprotective potential in some medicinal plants used to treat skin diseases in Sri Lanka. BMC Complement Altern Med. 2016 Nov 24;16(1):479. doi: 10.1186/s12906-016-1455-8. PMID: 27881112; PMCID: PMC5121953. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27881112/>. Acesso: 04/05/2023
12. Schalka S, Steiner D, Ravelli FN, Steiner T, Terena AC, Marçon CR, et al. Brazilian Consensus on Photoprotection. Na. Bras Dermatol. 2014;89(6 Suppl 1):S5. doi: 10.1590/abd1806-4841.20143971. PMID: 25761256; PMCID: PMC4365470. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25761256/> Acesso: 04/05/2023
13. Marzuka AG, Book SE. Basal cell carcinoma: pathogenesis, epidemiology, clinical features, diagnosis, histopathology, and management. Yale J Biol Med. 2015;88(2):167-179. PMID: 26029015; PMCID: PMC4445438. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26029015/>. Acesso: 02/05/2023
14. Wood DLA, Lachner N, Tan JM, et al. A Natural History of Actinic Keratosis and Cutaneous Squamous Cell Carcinoma Microbiomes. *mBio*. 2018;9(5):e01432-18. doi: 10.1128/mBio.01432-18. PMID: 30301852; PMCID: PMC6178618. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30301852/>
15. Doran CM, Ling R, Byrnes J, et al. Estimating the economic costs of skin cancer in New South Wales, Australia. BMC Public Health. 2015;15:952. doi: 10.1186/s12889-015-2267-3. PMID: 26400024; PMCID: PMC4581089. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26400024/> Acesso: 12/05/2023
16. Wood DLA, Lachner N, Tan JM, et al. A Natural History of Actinic Keratosis and Cutaneous Squamous Cell Carcinoma Microbiomes. *mBio*. 2018;9(5):e01432-18. doi: 10.1128/mBio.01432-18. PMID: 30301852; PMCID: PMC6178618. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30301852/> Acesso: 02/05/2023
17. Marques DR da SM. A Radiação Solar e a utilização de Protetores Solares: uma investigação centrada em professores, alunos e manuais escolares de Física e Química. [Internet]. 2014. [Acesso em: 4. Fev. de 2022].Disponível em: <https://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/34832/1/Diana%20Raquel%20da%20Silva%20Mouta%20Marques.pdf>.
18. Suzuki HS, Hammersclunidt M, Kakizaki P, Mukai MM. Comparação do fototipo entre caucasianos e orientais. Surg Cosmet Dermatol 2011;3(3):193-6. Disponível em: [http://www.surgicalcosmetic.org.br/Content/imagebank/pdf/v3/3\\_n3\\_144\\_pt.pdf](http://www.surgicalcosmetic.org.br/Content/imagebank/pdf/v3/3_n3_144_pt.pdf) Acesso: 02/05/2023
19. Castilho IG, Sousa MAA, Leite RMS. Fotoexposição e fatores de risco para câncer da pele: uma avaliação de hábitos e conhecimentos entre estudantes universitários. An. Bras. Dermatol. 2010;85(2):173-8. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abd/a/8BJc9LYQbjhGCmTgwRzBnKG/?format=pdf> Acesso 02/05/2023
20. Passeron T, Lim HW, Goh CL, Kang HY, Ly F, Morita A, Ocampo Candiani J, Puig S, Schalka S, Wei L, Dréno B, Krutmann J. Photoprotection according to skin phototype and dermatoses: practical recommendations from an expert panel. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2021 Jul;35(7):1460-

1469. doi: 10.1111/jdv.17242. Epub 2021 May 4. PMID: 33764577; PMCID: PMC8252523. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33764577/> Acesso: 02/05/2023

21. Deng Y, Ediriwickrema A, Yang F, Lewis J, Girardi M, Saltzman WM. A sunblock based on bioadhesive nanoparticles. *Nat Mater*. 2015; 14 (12):1278-1285. doi: 10.1038/nmat4422. Epub 2015 Sep 28. PMID: 26413985; PMCID: PMC4654636. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26413985/>

22. Latha MS, Martis J, Shobha V, et al. Sunscreening agents: a review. *J Clin Aesthet Dermatol*. 2013;6(1):16-26. PMID: 23320122; PMCID: PMC3543289. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23320122/> Acesso: 02/05/2023

## **CONTATO**

Grazielle Prado Alexandre: [grazialexandre@yahoo.com.br](mailto:grazialexandre@yahoo.com.br)

# **A utilização do sequenciamento do exoma para diagnóstico do Transtorno do Espectro Autista (TEA) não síndrômico: uma revisão bibliográfica**

## **The use of exome sequencing for the diagnosis of non-syndromic Autism Spectrum Disorder (ASD): a literature review**

Larissa Dourado de Almeida<sup>a</sup>, Tamires Vieira Albuquerque Lira<sup>a</sup>, Victor Hugo Gomes Almeida Vieira<sup>a</sup>,  
Messias Oliveira Pacheco<sup>b</sup>

a. Graduando do Curso de Biomedicina do Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas – FMU, Brasil

b. Biomédico, Docente do Curso de Biomedicina do Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas – FMU, Brasil

### **RESUMO**

Com o avanço de pesquisas foi ampliado o entendimento e a relação da genética com o transtorno do espectro autista (TEA), que é compreendido clinicamente como um conjunto de condições que são representadas pelo comprometimento do comportamento social. Atualmente o cenário clínico para diagnósticos ainda é considerado um desafio pois não existe um teste definitivo. Apesar do TEA ter causas multifatoriais que é o principal obstáculo para o seu diagnóstico, a genética é um potencial agente influenciador, com centenas de genes candidatos. Genes estes que frequentemente são responsáveis por ações no sistema nervoso, sendo que a ocorrência de uma variante genética pode influenciar em seu funcionamento a partir de vias de sinalização sinápticas específicas. Visto isso, este trabalho tem como objetivo realizar uma revisão bibliográfica do uso do sequenciamento completo do exoma para diagnóstico de casos de TEA com foco no quadro não síndrômico, debatendo seus benefícios bem como limitações e perspectivas. Foi realizada uma revisão bibliográfica de artigos científicos com as palavras-chave: TEA, sequenciamento completo do exoma e sequenciamento de nova geração, TEA não síndrômico. As pesquisas aqui reunidas elaboram e reforçam a importância do uso de sequenciamento do DNA para pesquisa e diagnóstico do autismo ou outras condições que possam ser afetadas por tal.

**Descritores:** autismo, transtorno do espectro autista, sequenciamento do exoma, sequenciamento de nova geração

### **ABSTRACT**

With the advancement of research, the understanding and relationship between genetics and autism spectrum disorder (ASD) has been expanded, which is clinically understood as a set of conditions that are represented by the impairment of social behavior. Currently, the clinical scenario for diagnoses is still considered a challenge because there is no definitive test. Although ASD has multifactorial causes, which is the main obstacle to its diagnosis, genetics is a potential influencing agent, with hundreds of candidate genes. These genes are often responsible for actions in the nervous system, and the occurrence of a genetic variant can influence its functioning. Given this, this work aims to carry out a literature review of the use of whole exome sequencing for the diagnosis of ASD cases with a focus on non-syndromic conditions, debating its benefits as well as limitations and perspectives. A bibliographic review of scientific articles was performed with the keywords: ASD, whole exome sequencing and next generation sequencing, non-syndromic ASD. The research gathered here elaborates and reinforces the importance of

using DNA sequencing for research and diagnosis of autism or other conditions that may be affected by it.

**Descriptors:** autismo, autism spectrum disorder, exome sequencing, next generation sequencing

## INTRODUÇÃO

O Transtorno do Espectro Autista (TEA) é definido como a ocorrência de comprometimento social e comportamentos ou interesses restritos e repetitivos<sup>1</sup>. Esses sintomas são frequentemente relatados de forma que haja comorbidade com outros sintomas neuropsiquiátricos, incluindo deficiência intelectual, atraso no desenvolvimento, convulsões e transtorno de déficit de atenção<sup>1</sup>.

O TEA é classificado com base em uma distinção exclusiva de critérios clínicos, portanto, pode ser síndrômico e não síndrômico<sup>2</sup>. O termo “síndrômico” refere-se a condições nas quais o TEA ocorre em conjunto com fenótipos adicionais e/ou características dismórficas e na maioria dos casos a etiologia genética é conhecida como, por exemplo, síndrome do X-frágil, síndrome de Rett, esclerose tuberosa, entre outras<sup>2</sup>.

Em contrapartida, a definição de TEA “não síndrômico” se refere ao “autismo clássico”, conforme descrito por Kanner, no qual nenhum sintoma adicional está presente<sup>3</sup>. Nestes casos, fatores ambientais e genéticos são considerados como fatores etiológicos importantes do TEA não síndrômico, ou seja, existem desafios em considerar apenas um único gene<sup>4</sup>.

As tecnologias de sequenciamento de DNA têm desempenhado papéis importantes na biologia molecular na área de pesquisa e nos testes diagnósticos na aplicação clínica<sup>5</sup>. A plataforma de primeira geração, sequenciamento de Sanger, foi desenvolvida por Fred Sanger em 1977, e tem sido usada por décadas em pesquisa e genética clínica<sup>5</sup>. Três décadas depois, o sequenciamento de nova geração (NGS) ou sequenciamento massivo paralelo, um método de sequenciamento simultâneo de milhões de fragmentos de DNA (ou DNA complementar), foi rapidamente adotado no laboratório clínico devido à sua capacidade de analisar simultaneamente vários genes ou regiões gênicas com um teste único em comparação com os métodos tradicionais<sup>6</sup>.

Apesar de não existir um único gene responsável pelo TEA não síndrômico, diversos trabalhos destacaram o potencial do sequenciamento exoma para identificar variantes atraso no

desenvolvimento ou TEA <sup>7</sup>. Portanto, este trabalho visa realizar uma revisão de literatura acerca do uso do sequenciamento do exoma na pesquisa do TEA não síndrômico.

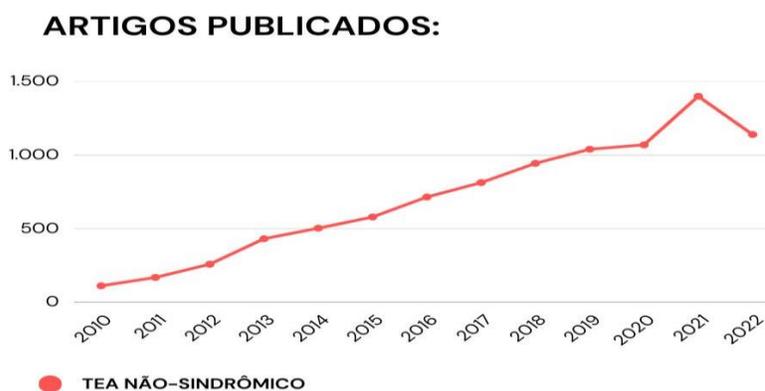
## METODOLOGIA

O presente estudo trata-se de um artigo de revisão bibliográfica em relação a aplicação do sequenciamento do exoma na pesquisa de pacientes com TEA não síndrômico e foi realizado mediante busca de artigos no banco de dados eletrônicas PUBMED (*National Library of Medicine and The National Institute of Health*). Foram selecionados os trabalhos em línguas inglesa e portuguesa, publicados no período de 2000 a 2021. Os artigos selecionados contemplavam pelo menos duas das palavras-chaves utilizadas. TEA não síndrômico; sequenciamento completo do exoma; sequenciamento de nova geração; diagnóstico genético; variantes genéticas. Não foram utilizados trabalhos que abordassem a pesquisa em TEA síndrômico.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A busca realizada nas bases de dados resultou em mais de 10 mil artigos com o tema TEA e TEA não síndrômico. É notável uma crescente em relação ao tema como mostra o gráfico 1. Na imagem podemos ver que dos anos 2010 a 2022, houve um aumento considerável de publicações e pesquisas publicadas em relação ao tema, sendo o ano de 2021 com o maior número de trabalhos, demonstrando que a pesquisa acompanhou o progresso dentro da tecnologia aplicada à genética médica. Em relação ao TEA não síndrômico que é o foco deste artigo, durante o levantamento bibliográfico foi localizado cerca de 9.635 trabalhos publicados.

**Gráfico 1**, onde é possível observar a porcentagem de artigos científicos sobre TEA não síndrômico publicados entre 2010 - 2022



O exoma é composto por aproximadamente 1-2% do genoma humano, mas contém cerca de 85% das variantes patogênicas conhecidas<sup>4</sup>. Por isso, essa metodologia é uma ferramenta muito robusta para auxílio no diagnóstico molecular de muitas condições clínicas<sup>4</sup>.

O sequenciamento do exoma é realizado por meio do NGS podendo ser utilizada uma amostra biológica do paciente, como sangue ou saliva, líquido amniótico, entre outras para o isolamento de DNA com kits comerciais específicos, purificação do DNA genômico e captura dos éxons para o sequenciamento<sup>8</sup>. As sequências geradas serão alinhadas de acordo com um genoma referência para que as alterações sejam identificadas e filtradas a partir de técnicas de bioinformática, com pesquisas e relações entre os resultados de bancos de dados genômicos para correlação genótipo e fenótipo, a depender da suspeita<sup>8</sup>.

A tecnologia do NGS foi desenvolvida por diferentes empresas comerciais<sup>9</sup>. Em geral, os fluxos de trabalho das diferentes tecnologias de sequenciamento incluem as etapas: preparação do template incluindo extração de ácido nucleico, preparação de biblioteca incluindo amplificação clonal e sequenciamento e alinhamento de leituras curtas, com análise e interpretação de variantes/alterações<sup>9</sup>.

O NGS pode ser aplicado como um painel que contemple genes direcionados para um fenótipo/condição, como o sequenciamento do exoma (sequenciamento dos exons de todos os genes, com suas regiões flanqueadoras), genoma completo ou sequenciamento de DNA mitocondrial<sup>10</sup>.

Estima-se que variantes em mais de 400 genes e variações do número de cópias (CNVs) (microdeleções e microduplicações) deleções e duplicações podem representar variantes de alto a moderado risco para a TEA<sup>12</sup>.

A utilização de exames moleculares na clínica de doenças genéticas permite também a avaliação do risco de recorrência familiar e aconselhamento genético que pode auxiliar no prognóstico e perspectiva terapêutica uma vez que, além de ajudar na identificação da etiologia, consegue identificar áreas que necessitam de suporte<sup>12</sup>. Embora um exame genético tenha todos esses benefícios, um estudo americano demonstrou que tais exames estão longe de serem recomendados pelos médicos, e apenas 17% os prescrevem aos seus pacientes<sup>12</sup>.

Na última década, o NGS facilitou a identificação de variantes e a avaliação de variações genéticas raras de único nucleotídeo ou de baixa frequência que antes eram indetectáveis usando tecnologias baseadas em arrays<sup>5</sup>. O sequenciamento completo do exoma permitiu a detecção de variantes deletérias que alteram a sequência codificadora de proteínas e a identificação de

diversos genes significativamente associados ao TEA. A descoberta de genes bem-sucedidos com conjuntos de dados genômicos funcionais aumentou a compreensão da neurobiologia do TEA e, em última análise, facilitou o desenvolvimento de intervenções terapêuticas eficazes. Além disso, as variantes encontradas a partir do NGS no sequenciamento do exoma podem ser confirmadas com o sequenciamento de Sanger, principalmente quando são localizadas mutações que envolvem regiões genômicas complexas<sup>5</sup>.

O poder de pesquisa do número de genes descobertos que evidenciam o TEA foi potencializado pelo NGS, uma vez que alguns destes genes alteram amplamente o desenvolvimento do TEA enquanto outras mutações raras e de novo são mais específicas. Existem aproximadamente 102 genes que implicam no risco individual de desenvolvimento do TEA, porém é importante o estudo da associação entres os fenótipos e genótipos desses genes de risco<sup>13</sup>.

Consequentemente foram identificados vários loci que podem contribuir para o fenótipo em adição ao mapeamento desses estudos, genes candidatos funcionais e abordagens proteômicas identificaram variantes em genes específicos que afetam a suscetibilidade de desenvolvimento do TEA<sup>14</sup>.

Evidenciou-se dois principais traços ligados ao TEA: a esquizofrenia e a alteração do nível de aprendizado. Apesar disso, a comunidade médica tem levantado a influência de alterações raras em genes que possam sofrer grande impacto clínico em quadros de TEA, um desses genes, por exemplo, é o *KMT2E* que apresenta tanto risco comum como variação de risco raro individual para expressar o autismo<sup>14</sup>.

De acordo com o banco de dados Sfar Gene, o gene *KMT2E* indicado no estudo citado também foi reportado um total de 16 vezes, onde 9 delas era associado ao TEA, o banco de dados também demonstra que das variantes encontradas 78 eram variantes raras<sup>23</sup>.

Uma classe de mutações relevantes é aquela que afeta os genes associados às vias de sinalização como fatores de iniciação da tradução, responsáveis por iniciar a síntese de proteínas nos ribossomos. Essas mutações podem levar a um desequilíbrio na produção de proteínas essenciais para o desenvolvimento e função cerebral adequados<sup>15</sup>.

A alteração nos níveis de funcionamento de proteínas sinápticas pode acarretar problemas de cognição e de desenvolvimento, com o autismo como consequência, podendo também ter causas de insuficiência de Shank3, neuroxinas ou neuroliginas<sup>11</sup>.

A tradução dependente de atividade desempenha um papel crucial no desenvolvimento sináptico adequado e na plasticidade cerebral<sup>16</sup>. Durante esse processo, proteínas específicas de ligação ao mRNA, como a FMRP (Proteína do atraso cognitivo do X-frágil/ Fragile X Mental Retardation Protein), têm a capacidade de regular a tradução em neurônios, influenciando assim a síntese de proteínas necessárias para o funcionamento neuronal adequado<sup>16</sup>.

A FMRP, é uma proteína que desempenha um papel importante na regulação da tradução em neurônios. Deficiências na expressão ou função da FMRP foram associadas ao autismo e a defeitos cognitivos<sup>16</sup>. Essas alterações podem levar a um desequilíbrio na síntese de proteínas críticas para a formação de sinapses e para a plasticidade sináptica, que são processos essenciais para o desenvolvimento e funcionamento normal do cérebro <sup>16</sup>.

Além disso, os *RNA-binding proteins* (RNA BPs) podem ser detectados também dentro do formato do sequenciamento de RNA a partir do NGS, ajudando a compreender melhor quais mRNAs são regulados por essas proteínas e como suas alterações podem afetar a função cerebral <sup>17</sup>. Através da identificação desses alvos de mRNA é possível obter novos direcionamentos sobre as vias de sinalização envolvidas no desenvolvimento do autismo e defeitos cognitivos específicos que não estejam claros apenas no sequenciamento do DNA dentro dos éxons <sup>18</sup>.

As principais vias celulares subjacentes ao TEA estão interconectadas por meio da atividade neuronal<sup>20</sup>. Variantes de risco bem estabelecidas são encontradas em genes que funcionam em três vias celulares críticas: função sináptica, sinalização WNT (Sitio de Integração Relacionado ao Wntless) e tradução<sup>20</sup>. Essas três vias são altamente integradas: a sinalização WNT controla os principais programas transcricionais que afetam a maturação neuronal e a formação de circuitos neurais, que também dependem da atividade sináptica durante o desenvolvimento; a tradução localizada na sinapse está subjacente à plasticidade sináptica e à cognição, enquanto a tradução sináptica é estimulada pela atividade sináptica. É importante ressaltar que as três vias respondem e são afetadas pela atividade neuronal <sup>20</sup>.

Na verdade, variantes penetrantes não codificadoras que interrompem o padrão normal de *splicing* do RNA mensageiro (mRNA), mesmo que ocorram fora dos dinucleotídeos essenciais de *splicing* GT e AG, frequentemente chamadas de variantes de *splicing* críptico, têm sido reconhecidas há muito tempo por desempenhar um papel significativo em doenças genéticas raras<sup>19</sup>. No entanto, as mutações de *splicing* críptica são frequentemente negligenciadas na prática clínica devido ao entendimento incompleto do código de *splicing* e à dificuldade resultante

em identificar com precisão variantes que afetam a *splicing* fora dos dinucleotídeos GT e AG essenciais<sup>19</sup>.

O *splicing* é um tipo de processamento de RNA no qual as sequências denominadas introns são removidas, enquanto as sequências remanescentes (exons) são unidas formando um RNA maduro, que pode ser mensageiro ou não codificante<sup>20</sup>. Esta é uma forma de regulação importante, pois contribui, após o evento de transcrição, para o controle da expressão dos genes<sup>20</sup>.

No processamento conhecido por *splicing* alternativo, diferentes exons de um mesmo pré RNA podem ser utilizados na produção de diferentes RNAs maduros, e assim gerar proteínas distintas a partir de um único gene, caso essas variações encontrem-se em regiões codificantes. Dessa forma, o *splicing* alternativo pode levar a um grande aumento na diversidade de proteínas. O que permite que informações específicas de um único gene se modifiquem dependendo de sinais do ambiente, gerando transcritos maduros distintos, e conferindo assim uma maior plasticidade à expressão gênica<sup>21</sup>.

A importância de investigar o *splicing* alternativo no TEA é dada pelo fato de que vários genes implicados em distúrbios neurológicos têm atividade de ligação ao *RNA92*<sup>22</sup>. Foi relatado em uma pesquisa que o *FMRP* interage com a proteína de ligação ao RNA *RBM14* para regular o *splicing* alternativo de pelo menos dois genes com funções neuronais importantes (*Zfyve27* e *Mapt*) em camundongos<sup>22</sup>. Esta descoberta indica que o *FMRP* poderia ter um papel mais amplo na regulação do *splicing*, embora no momento da escrita, possíveis mudanças em perfis de *splicing* alternativos ainda não tenham sido abordadas no nível transcriptômico em pacientes com síndrome do X frágil. Essas observações enfatizam a necessidade de uma análise cuidadosa dos eventos de *splicing* interrompidos no autismo<sup>22</sup>.

De acordo com Ahmet o Caglayan foi observado que as neuroliginas e neuroxinas cerebrais interagem entre si, sendo expressas em neurônios pré-sinápticos, que sofrendo alterações de causa genética possam expressar características clínicas em pacientes com TEA<sup>3</sup>. O gene Neuroxina 1 (*NRXN1*), localizado no cromossomo 2p16.3 codifica uma variante do peptídeo de sinal da Neuroxina 1, na sua funcionalidade essa proteína de superfície celular neuronal pode estar presente no reconhecimento e na adesão celular, formando junções intracelulares por meio da ligação às neuroliginas, havendo como forte fator de sinalização a investigação do gene mutado da Neuroxina em indivíduos com autismo<sup>3</sup>.

Um estudo realizado por Levinson e El-Husseini, analisou o papel da interação Neurologinas-Neuroxinas na maturação e funcionamento das sinapses, assim como através dos mecanismos dessas proteínas, quando defeituosas, podem levar ao autismo<sup>22</sup>. Além destes, outros genes mutados podem alterar a funcionalidade de proteínas responsáveis fatores de sinalizações sinápticas que possam justificar características dentro do quadro de TEA<sup>23</sup>.

Dentro da classificação não sindrômica, autores como Cosemans, Ohashi, Rauch, Souza CB, et al., relataram genes e tipos de mutações afetadas a partir de amostras às quais os indivíduos possuíam características clínicas relevantes em sintonia aos achados genéticos, o quadro 1, aborda os principais estudos em variação com a metodologia de interesse e o número de casos reportados.

**Quadro 1** – Lista de artigos que evidenciam tipos de mutações e genes afetados para casos de TEA não sindrômico.

<b>Autor e ano</b>	<b>Genes afetados</b>	<b>Tipos de mutações</b>	<b>Metodologias</b>	<b>Classificação de estudo</b>	<b>Amostras</b>
	<i>DMTN</i> ,				29.085
Cosemans et al. 2021 *	<i>EGR3</i> , <i>FGF17</i> , <i>LGI3</i> , <i>PHYHIP</i> e <i>PPP3CC</i>	Deleção 8p21.3 (de novo, VUS)	Sequenciamento de Exoma, SNP-array	TEA Não-sindrômico	indivíduos 70 casos (CNVs) 19584 controles (Coe et al.)
	<i>OPRL1</i> , <i>SCTR</i> ,	Non-synonymu	Microarray	TEA	42 indivíduos, 2
Ohashi et al. 2021 *	<i>RELN</i> , <i>BDKRBI</i> , <i>RELN</i> e <i>EHMT1</i>	s, SNVs, indels, Splice Site	CGH, Sequenciamento de todo exoma	Não-sindrômico	casos (WES), 48 indivíduos, 3 casos (CGH)
Rauch et al. 2012 *	<i>STXBP1</i> , <i>SYNGAP1</i> e <i>SCN2A</i>	LoF, Missense	Sequenciamento de Exoma	TEA Não-sindrômico	51 indivíduos, 45 casos (variantes de novo), 20 controles

Fontes BMC, Souza CB. 2022 *	<i>MET, RELN, SLC6A4, PTEN, TSC1, TSC2.</i>	De novo	Sequenciamento (NGS)	TEA Não-sindrômico	Artigo Teórico
------------------------------------	---	---------	-------------------------	-----------------------	----------------

\*LoF: variantes que afetam a função de uma proteína, podem ser patogênicas ou benignas

\*VUS: Variantes de significado incerto sobre as quais ainda não existem informações concretas sobre a probabilidade de serem patogênicas ou benignas a partir dos reportes de casos em bancos de dados genéticos

Dentre os genes citados, é importante ressaltar a frequência e consequência expressiva dessas mutações no paciente portador, além destes temos os genes *NLGN3* e *NLGN4*, respectivamente localizados nos *loci* cromossômicos Xq13 e Xq22.23, foram encontrados mutados em 1 a cada 100 indivíduos que apresentam o TEA, em que o fenótipo clínico da mutação do *NLG* humano é heterogêneo, sendo assim esses portadores normalmente não apresentam características dismórficas, no entanto eles podem passar por regressões no início da manifestação dessa condição, caracterizado pela perda de marcos sociais e verbais <sup>4</sup>.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dentre as possibilidades que o sequenciamento nos traz, a comunidade científica tem levantado discussões importantes ao longo dos anos a partir de amostras e pacientes que ajudam a formar uma elucidação maior sobre a frequência de causas genéticas do TEA e a importância do sequenciamento para relação e diagnóstico clínico.

## REFERÊNCIAS

1. McCombie WR, McPherson JD, Mardis ER. Next-Generation Sequencing Technologies. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine. 2018 Nov 26;9(11):a036798
2. Cook EH, Lindgren V, Leventhal BL, Courchesne R, Lincoln A, Shulman C, Lord C, Courchesne E. 1997. Autism or atypical autism in maternally but not paternally derived proximal 15q duplication. Am J Hum Genet 60: 928–934.
3. Weiss LA., Arking DE, Daly MJ, Chakravarti A. A genome-wide linkage and association scan reveals novel loci for autism. Nature 461, 802–808 (2009).
4. Caclayan AO. Genetic causes of syndromic and non-syndromic autism. Developmental Medicine, Child Neurology. 2010 Jan 5;52(2):130–8.
5. Freitas De Oliveira L. Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento [Internet]. 2019 [cited 2023 Jun 17].

6. Huang J, Liu J, Tian R, Liu K, Zhuang P, Sherman HT, Budjan C, Fong M, Jeong Min-Seo e Kong Xue-Jun. A Next Generation Sequencing-Based Protocol for Screening of Variants of Concern in Autism Spectrum Disorder (2021).
7. Yohe S, Thyagarajan B. Review of Clinical Next-Generation Sequencing. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* [Internet]. 2017 Nov;141(11):1544–57.
8. Freitas AM de, Brunoni D, Mussolini JL. Transtorno do Espectro Autista: estudo de uma série de casos com alterações genéticas. *Cadernos de Pós-Graduação em Distúrbios do Desenvolvimento*. 2017;17(2)
9. McCombie WR, McPherson JD, Mardis ER. Next-Generation Sequencing Technologies. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2018 Nov 26;9(11):a036798
10. Cook EH, Lindgren V, Leventhal BL, Courchesne R, Lincoln A, Shulman C, Lord C, Courchesne E. 1997. Autism or atypical autism in maternally but not paternally derived proximal 15q duplication. *Am J Hum Genet* 60: 928–934.
11. Aldahmesh MA, Mohamed JY, Alkuraya HS, Verma IC, Puri RD, Alaiya AA, Rizzo WB, Alkuraya FS. 2011. Recessive mutations in ELOVL4 cause ichthyosis, intellectual disability, and spastic quadriplegia. *Am J Hum Genet* 89: 745–750.
12. Bourgeron T. From the genetic architecture to synaptic plasticity in autism spectrum disorder. *Nat Rev Neurosci*. 2015;16(9):551-63. Review.
13. Buxbaum JD. Multiple rare variants in the etiology of autism spectrum disorders. *Dialogues Clin Neurosci*. 2009;11(1):35-43. doi: 10.31887/DCNS.2009.11.1/jdbuxbaum. PMID: 19432386; PMCID: PMC3181906.
14. Satterstrom FK, Kosmicki JA, Wang J, Breen MS, De Rubeis S, An JY, et al. Large-Scale Exome Sequencing Study Implicates Both Developmental and Functional Changes in the Neurobiology of Autism. *Cell* [Internet]. 2020 Feb;180(3):568-584.e23.
15. Kalkman, HO. A review of the evidence for the canonical Wnt pathway in autism spectrum disorders. *Molecular Autism* 3, 10 (2012). Disponível em: <https://doi.org/10.1186/2040-2392-3-10>
16. Leão D. Sequenciamento de nova geração: explorando aplicações clínicas de dados de Targeted Gene Panel e Whole Exome Sequencing. *Ufrgsbr* [Internet]. 2017 [cited 2023 Jun 17];
17. Quesnel-Vallières M., Weatheritt RJ., Cordes SP. *et al.* Autism spectrum disorder: insights into convergent mechanisms from transcriptomics. *Nat Rev Genet* 20, 51–63 (2019). Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41576-018-0066-2>
18. Kelleher RJ 3rd, Bear MF. The autistic neuron: troubled translation? *Cell*. 2008 Oct 31;135(3):401-6. doi: 10.1016/j.cell.2008.10.017. PMID: 18984149.
19. Jaganathan K, Kyriazopoulou Panagiotopoulou S, McRae JF, et al. Predicting Splicing from Primary Sequence with Deep Learning. *Cell*. 2019;176(3):535-548.e24. doi:10.1016/j.cell.2018.12.015
20. Gebauer F., Schwarzl T., Valcárcel J. *et al.* RNA-binding proteins in human genetic disease. *Nat Rev Genet* 22, 185–198 (2021). Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41576-020-00302-y>

21.Darnell JC. Defects in translational regulation contributing to human cognitive and behavioral disease. *Curr Opin Genet Dev.* 2011 Aug;21(4):465-73. doi: 10.1016/j.gde.2011.05.002. Epub 2011 Jul

19.PMID: 21764293; PMCID: PMC3166213.

22.Sci Transl Med. Manuscrito do autor; disponível no PMC 2015 em 25 de maio. Publicado na forma final editada como: *Sci Transl Med.* 13 de junho de 2012; 4(138): 138ra78.doi: 10.1126/scitranslmed.300354

23.Ronemus M, Iossifov I, Levy D, Wigler M. The role of de novo mutations in the genetics of autism spectrum disorders. *Nat Rev Genet.* 2014;15(2):133-41. Review. Disponível em: <https://gene.sfari.org/>

## **CONTATO**

Tamires Vieira Albuquerque Lira: tamireslirabiomed@gmail.com

# O uso das células tronco para o tratamento do Alzheimer

## The use of stem cells for the treatment of Alzheimer's disease

Alanys Caraça Raymundo<sup>a</sup>, Renata Ruoco Loureiro<sup>a</sup>

a: Graduanda do curso de Biomedicina do Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas – FMU, Brasil

b: Biomédica, Docente de Biomedicina do Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas – FMU, Brasil

### RESUMO

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa progressiva que afeta a memória e funções cognitivas. Foi descrita por Alois Alzheimer, em 1907, e afeta milhões de pessoas. A doença passa por três estágios principais e envolve a formação de placas senis e emaranhados neurofibrilares no cérebro. O tratamento atual é principalmente sintomático e inclui inibidores de acetilcolinesterase, que causam inúmeros efeitos colaterais. Pesquisas recentes em modelos animais exploraram o potencial das células-tronco (CTs) para regenerar o tecido cerebral danificado pelo Alzheimer, com resultados promissores, incluindo a capacidade de se diferenciar em células neuronais e liberar fatores de crescimento e moléculas anti-inflamatórias. Essa pesquisa tem como objetivo compreender a fisiopatologia e tratamentos disponíveis para a DA, avaliando a utilização da terapia CTs. Foi usado para a pesquisa desse estudo de revisão bibliográfica, os artigos publicados nas bases de dados: PubMed, Scielo e Google Acadêmico.

**Descritores:** alzheimer, terapia celular, célula-tronco, mesenquimais

### ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurodegenerative disease that affects memory and cognitive functions. It was described by Alois Alzheimer in 1907 and affects millions of people. The disease progresses through three main stages and involves the formation of senile plaques and neurofibrillary tangles in the brain. Current treatment is primarily symptomatic and includes acetylcholinesterase inhibitors, which have numerous side effects. Recent research in animal models has explored the potential of stem cells (SCs) to regenerate brain tissue damaged by Alzheimer's, with promising results, including the ability to differentiate into neuronal cells and release growth factors and anti-inflammatory molecules. This research aims to understand the pathophysiology and available treatments for AD, evaluating the use of SCs therapy. For this literature review study, articles published in the following databases were used: PubMed, Scielo, and Google Schola

**Descriptors:** alzheimer, cell therapy, stem cell, mesenchymal

### INTRODUÇÃO

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa progressiva e irreversível, que afeta principalmente a memória e outras funções cognitivas <sup>1</sup>. Foi descrita pela primeira vez pelo neuropatologista Alois Alzheimer, em 1907 <sup>1</sup>.

A DA de acometimento tardio geralmente ocorre de forma esporádica em pessoas com cerca de 60 anos, enquanto a DA de acometimento precoce, que tem uma incidência em pacientes com cerca de 40 anos, é mais recorrente em famílias <sup>1</sup>. Cerca de 1,2 milhões de pessoas

vivem com alguma forma de demência e, por ano, 100 mil novos casos são diagnosticados<sup>2</sup>. De acordo com as estimativas da *Alzheimer's Disease International*, esses números poderão chegar a 74,7 milhões até 2030 e 131,5 milhões até 2050, mostrando que DA caracteriza uma crise global <sup>2</sup>.

De acordo com o Ministério da Saúde, em 2015, as frequências no registro pela mortalidade foram maiores nas regiões sudeste e menores na região norte, com registros somados em um total de 59,45% e 1,65% respectivamente <sup>3</sup>. O Alzheimer constitui mundialmente um grave problema de saúde pública e seus custos como tempo, perda de produtividade, expectativas negativas de familiares, limitações específicas de diagnóstico e tratamento, são responsáveis por repercussões na qualidade de vida de um grande número de idosos, já que os tratamentos atuais para a doença seguem sendo apenas sintomáticos, onde nenhum fármaco é capaz de impedir a progressão da doença <sup>3</sup>.

O FDA (Food and Drug Administration), órgão regulatório de medicamentos dos EUA, aprovou dois tipos de medicamentos para tratar a Doença de Alzheimer: Inibidores da acetilcolinesterase (Donepezila, Rivastigmina e Galantamina) e Memantina <sup>4</sup>. Esses medicamentos visam tratar os sintomas cognitivos da doença, como perda de memória, confusão mental e lentidão do raciocínio <sup>4</sup>. Embora não possam deter o dano cerebral causado pela doença, eles podem ajudar a diminuir ou estabilizar os sintomas por um período limitado, agindo nos processos envolvidos na comunicação entre as células nervosas do cérebro <sup>4</sup>.

Os efeitos colaterais dos medicamentos para o Alzheimer muitas vezes são complexos e podem ser considerados desafios significativos <sup>5</sup>. Esses medicamentos são projetados para atuar em processos químicos e biológicos no cérebro, visando diminuir a progressão da doença e aliviar os sintomas cognitivos e comportamentais <sup>5</sup>. No entanto, essa interação delicada pode desencadear respostas não intencionais em outras partes do corpo, resultando em efeitos colaterais <sup>5</sup>. A complexidade do cérebro é um fator crucial nesse contexto <sup>5</sup>. O cérebro é um órgão altamente interconectado, onde diferentes áreas e sistemas estão intrincadamente envolvidos em uma variedade de funções <sup>5</sup>. Quando medicamentos são introduzidos para modificar processos específicos relacionados à doença de Alzheimer, existe a possibilidade de que essas intervenções afetem outras funções cerebrais <sup>5</sup>. Além disso, o desenvolvimento de medicamentos para o cérebro enfrenta desafios únicos devido à barreira hematoencefálica, uma barreira protetora que regula o que pode entrar no cérebro a partir do sistema circulatório <sup>5</sup>.

A terapia com células-tronco (CTs) representa uma das abordagens terapêuticas avançadas atualmente em investigação para tratar a doença de Alzheimer <sup>6</sup>. Seu objetivo é substituir as células cerebrais danificadas por CTs saudáveis, capazes de se reproduzir e se diferenciar

em novas células cerebrais funcionais <sup>6</sup>. Uma característica importante dessa abordagem é que, frequentemente, as CTs utilizadas no transplante são do próprio paciente (autólogas), o que reduz consideravelmente o risco de rejeição, reações imunológicas e efeitos adversos <sup>6</sup>.

Essa pesquisa tem como objetivo compreender a fisiopatologia e tratamentos disponíveis para a DA, além de avaliar sobre a utilização da terapia com CTs, verificando sua patogênese, se apresenta resultados positivos em pesquisas clínicas e se pode ser válida futuramente.

## **METODOLOGIA**

A metodologia usada para esse estudo foi de revisão bibliográfica, usando como base os artigos publicados nas seguintes bases de dados: PubMed, Scielo e Google Acadêmico, utilizando os descritores “alzheimer”, “células-tronco”, “terapia celular” e “fisiopatologia”. Foram escolhidos artigos mais recentes para dados epidemiológicos, tratamentos e a pesquisa clínica, variando entre 2015 e 2023. Para informações fisiopatológicas os dados mais recentes variam entre 2000 e 2003.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Fisiopatologia da Doença de Alzheimer (DA)**

A DA é uma proteinopatia de evolução lenta, que atinge o cérebro; caracterizada pela atrofia cortical com morte neuronal e considerável aumento dos ventrículos e sulcos cerebrais <sup>7</sup>. Afeta principalmente as áreas hipocámpais e corticais associadas, que são responsáveis pelas funções cognitivas e motoras, regulação do comportamento emocional, processamento de informação e aprendizado, e consolidação da memória <sup>7</sup>. Por isso, lesões nessas áreas podem causar os sintomas motores, cognitivos e psiquiátricos <sup>7</sup>.

A DA é marcada por estágios, podendo ser três (leve, moderado e grave), ou sete, como foi tratado por POIRIER e GAUTHIER<sup>8</sup>, como estágios mais detalhados <sup>8</sup>.

A fisiopatologia da doença pode ser separada em macroscópica e histológica <sup>8</sup>. Na macroscópica, é descrita pela formação de placas senis e emaranhados neurofibrilares, sendo esses uma agregação da proteína Tau, que leva a um processo neurodegenerativo com neuroinflamação <sup>8</sup>. Na histológica, observa-se a presença da proteína Tau hiperfosforilada, com agregados de peptídeo  $\beta$  amiloide, redução da densidade sináptica, ativação de células da glia e perda neuronal, incluindo as células do sistema colinérgico, onde a transmissão está relacionada a aprendizagem e consolidação da memória <sup>8</sup>.

A proteína Tau, está associada aos microtúbulos, e tem como função estabiliza-los, mantendo sua estrutura e interação entre a actina e os neurofilamentos<sup>8</sup>. A proteína  $\beta$  amiloide deriva da clivagem da proteína precursora amiloide (PPA), que é uma glicoproteína transmembrana presente nos neurônios, acredita-se que esta proteína possui função de proteção do cérebro contra infecções e neuroplasticidade<sup>8</sup>. A clivagem da PPA, descrita pela cascata de Flood, em 1994, pode ser não amiloidogênica, feita pela enzima  $\alpha$ -secretase, onde seu produto é clivado posteriormente por  $\gamma$ -secretase que gera um peptídeo pequeno e solúvel; ou amiloidogênica, clivada pela  $\beta$ -secretase e depois pela  $\gamma$ -secretase, que dá origem a um peptídeo com sequência de 40 ou 42 aminoácidos (aa), insolúvel e predisposto a agregar-se<sup>8</sup>. Acredita-se que a forma A- $\beta$ -42 seja a mais tóxica, já que dois aminoácidos a mais estão relacionados à maior tendência a se dobrar mal e agregar, formando oligômeros, causando modificações na função cognitiva<sup>8</sup>. Essas conformações oligoméricas causam distúrbios na sinapse e geram ativação de células da glia e inflamação<sup>8</sup>.

Os astrócitos e as micróglia também possuem um papel importante na patologia da DA, já que essas alterações de acúmulo proteico extracelulares se distribuem por todo o córtex, se fixando nas paredes dos vasos e liberando moléculas pro-inflamatórias e proteases de forma excessiva pelos astrócitos<sup>8</sup>. À medida que as micróglia fazem fagocitose, também liberam óxido nítrico, glutamato e radicais superóxidos que lesionam ainda mais o tecido saudável<sup>8</sup>. Essa inflamação pode aumentar o risco de DA<sup>8</sup>.

A causa da doença vem sendo discutida desde os anos 70, onde começaram a surgir as primeiras hipóteses etiológicas<sup>8</sup>. A hipótese de disfunção glutamatérgica foi proposta nos anos 80, e supõe que a morte neuronal pode ocorrer por ativação excessiva do sistema glutamatérgico, responsável por gerar um aumento nos níveis de cálcio intracelular devido ao acúmulo de  $\beta$  amiloide, o que conduz à alterações mitocondriais, levando a degeneração<sup>9</sup>.

Em 1991, foi proposta a hipótese da cascata amiloide, que considera a detecção de agregados proteicos, a partir da presença de A $\beta$  (fator central da doença), responsável por desencadear muitos dos outros achados histopatológicos, sendo considerada a explicação mais complexa, levando em conta fatores genéticos<sup>10</sup>. Entende-se que os agregados amiloides são responsáveis pela destruição neuronal colinérgica, pela atrofia do núcleo basal de Meynert, que produz a colina acetiltransferase<sup>10</sup>. A falta desta enzima afeta diretamente a formação de oligômeros e esses oligômeros são retratados como capazes de alterar a composição das sinapses, levando a dano e perda da neuroplasticidade que leva a perda de neurotransmissores importantes<sup>10</sup>.

## Terapia atual

Atualmente, o tratamento farmacológico para pessoas com algum tipo de demência é paliativo e apenas sintomático <sup>11</sup>. Nenhum fármaco usado e testado foi capaz de intervir e alterar a progressão da doença <sup>11</sup>. Os tratamentos escolhidos para DA são focados na melhora da hipofunção colinérgica, sendo a abordagem mais eficaz a inibição da acetilcolinesterase <sup>11</sup>.

A tacrina foi a primeira droga experimentada e utilizada, seu efeito foi pequeno e benéfico para os sintomas cognitivos, entretanto, após os primeiros relatos promissores em relação ao seu uso, os seguintes foram insuficientes e levantaram preocupações e dúvidas sobre sua hepatotoxicidade e toxicidade dose-dependente, responsável pelos efeitos colaterais colinérgicos (vômito, dores abdominais e diarreia) <sup>11</sup>.

O donepezil, foi o segundo anticolinesterásico a ser aprovado, apresentando eficácia no tratamento com doses de 5 a 10 mg, porém, estudos feitos em comparação com placebo mostraram que a vantagem dos pacientes medicados desapareceu após 28 semanas de tratamento, e não mudaram a evolução natural da doença <sup>11</sup>. Em relação aos efeitos adversos, apenas pacientes que receberam 10mg/dia apresentaram os sintomas adversos como câimbras, náuseas e vômitos, os que receberam 5mg/dia mostraram melhor balanço do medicamento entre eficácia e tolerância <sup>11</sup>.

A rivastigmina, é um inibidor pseudo-irreversível da acetilcolinesterase e da butirilcolinesterase, ensaios incluídos em uma metanálise mostraram que a dose de 6-12 mg/dia foi associada a uma melhoria de 2,1 pontos de PDS no Alzheimer – Subscore Cognitivo (ADAS-Cog), comparada ao grupo placebo, e 2,2 pontos de PDS após 26 semanas <sup>11</sup>. Já o tratamento com dose baixa (1-4 mg/dia) mostrou um pequeno benefício de 0,8 ADAS-Cog <sup>11</sup>. O uso da dosagem mais alta de rivastigmina mostrou um número maior nos efeitos adversos com náuseas, vômitos, diarreias, anorexia, cefaleia, síncope e tonturas <sup>11</sup>.

A galantamina é um inibidor reversível e competitivo de acetilcolinesterase, com pouca atividade inibitória da butirilcolinesterase <sup>11</sup>. Estudos apontaram que as doses diárias de 16-32 mg, em relação a função cognitiva, mostraram uma alta taxa de melhoria na escala ADAS-Cog <sup>11</sup>. A avaliação de incapacidade por demência forneceu resultados significativos a favor do tratamento em doses de 24-32 mg/dia, todavia, este medicamento também apresenta efeitos adversos gastrointestinais agudos e levou a maioria da população estudada a abandonar o tratamento <sup>11</sup>.

O metrifonato é um inibidor irreversível da acetilcolinesterase, seu resultado no tratamento do Alzheimer foi descrito e publicado por Becker e col. (1998), mostrando que o uso de doses em mg alternadas foi considerado adequada para induzir a inibição da acetilcolinesterase das

hemácias em 50%-70% <sup>11</sup>. O medicamento se mostrou bem tolerável, com eficácia e tolerância semelhante ao donepezil <sup>11</sup>. Além disso, mostrou benefícios sobre a cognição e o comportamento dos indivíduos <sup>11</sup>. Por outro lado, o princípio ativo do metrifonato, 2,2,2-tricloro-1-hidroxietil dimetil fosfonato, é usado como inseticida e apresenta suspeita de causar neuropatia retardada, após intoxicação aguda <sup>11</sup>. Os testes *in vitro* para as enzimas humanas, de acordo com Johson em 1982, apresentaram resultados três vezes maiores que em cérebro de galinha e sugeriram um aumento do perigo da neuropatia retardada <sup>11</sup>.

A memantina é um antagonista não competitivo dos receptores NMDA (N-metil-d-aspartato), de afinidade moderada e dependente de voltagem <sup>12</sup>. As últimas pesquisas com esse medicamento, mostraram que os pacientes que receberam tratamento com Memantina demonstraram um alargamento do intervalo QT (parâmetro do exame de eletrocardiograma que mede em milissegundos o período necessário para a despolarização e repolarização do tecido ventricular miocárdico), em média, por volta do quinquagésimo dia de uso <sup>12</sup>. De forma interessante, a interrupção do tratamento resultou em um retorno temporário às condições eletrofisiológicas anteriores <sup>12</sup>. Dados também indicam que há uma prevalência de disfunções na condução cardíaca quando os esquemas terapêuticos envolvem doses a partir de 20mg <sup>12</sup>. É importante observar que pacientes idosos frequentemente apresentam vários fatores de risco que contribuem para o alargamento do intervalo QT, especialmente quando estão em tratamento com Memantina <sup>12</sup>.

Além dos sintomas cardiovasculares, também foi relatado sintomas como: bradicinesia (lentidão dos movimentos), disartria (dificuldade na articulação da fala) e enfraquecimento muscular e articular em pacientes, foi constatada a presença de coréia (movimentos involuntários, desordenados e repetitivos), distonia (alteração na contração muscular e no tônus) e dano ao endotélio da córnea com o desenvolvimento da Síndrome da Secreção Inapropriada do Hormônio Antidiurético (SSIHAD), entre outros efeito colaterais mais frequentemente relatados nesses pacientes, como a diarreia, tontura, cefaleia, insônia, inquietação, excitação e cansaço <sup>12</sup>.

### **Células-Tronco (CT)**

CTs são células precursoras com capacidade de auto-renovação e diferenciação ilimitada, podendo dar origem a vários tipos teciduais <sup>13</sup>. Estas células podem ser chamadas de CT, quando obtidas a partir de tecido embrionário, ou CT adultas, quando encontrada em tecidos adultos; e de acordo com a quantidade de vias que podem seguir, o nível de plasticidade e para qual porção de um organismo funcional ela pode contribuir, são classificadas como: totipotentes, pluripotentes e multipotentes <sup>13</sup>.

As CTs totipotentes, são encontradas alguns dias a após a fertilização e podem originar qualquer célula do corpo, incluindo as células que formam a placenta e anexos durante o desenvolvimento embrionário <sup>14</sup>.

As CTs pluripotentes são capazes de produzir qualquer tipo de tecido, porém não são capazes de originar placenta e anexos embrionários <sup>14</sup>. Constituem a massa de células interna do blastocisto <sup>14</sup>. Mesmo existindo em menor número, essas células também estão presentes em indivíduos adultos e, se proveniente da medula óssea, podem originar células do sangue, cartilagem, osso, músculo, tecido conjuntivo e pele <sup>14</sup>.

As CTs multipotentes estão presentes no indivíduo adulto, sendo mais diferenciadas <sup>14</sup>. Estas células são caracterizadas de acordo com o tecido que derivam e são capazes de gerar novas células apenas do respectivo órgão, possibilitando a manutenção e regeneração tecidual <sup>14</sup>. Relacionado a origem, elas podem ser CTs embrionárias, vindas da massa interna de um blastocisto (embrião prematuro) ou células germinativas embrionárias (CGE) derivadas do tecido fetal de um estágio mais avançado, da espinha gonodal <sup>14</sup>.

CTs adultas são encontradas em vários órgãos e tecidos do indivíduo adulto, com participação na homeostase tecidual, gerando novas células devido a renovação fisiológica ou em resposta a um agravo <sup>14</sup>. Normalmente estão em estado quiescente, se localizando em regiões específicas essenciais para seu desenvolvimento e manutenção <sup>14</sup>.

As CTs neuronais passaram a ser estudadas a pouco tempo, onde foi contestado que, mesmo após o nascimento e em indivíduos adultos, a neurogênese ocorre em diferentes regiões do cérebro, e estas regiões possuem CTs adultas, desfazendo a antiga ideia de que o sistema nervoso central (SNC) era incapaz de fazer renovação celular e remodelação estrutural <sup>14</sup>. Células endoteliais e astrócitos, estão sendo apontados como fonte de CTs neuronais adultas multipotentes <sup>14</sup>. Normalmente, a proliferação destas células, são estimuladas em resposta a fatores mitogênicos e possuem a capacidade de derivar neurônios, astrócitos, oligodendrócitos e outras variedades de células <sup>14</sup>.

CTs derivadas do tecido muscular possuem características de multipotencialidade e auto renovação, com importante função no desenvolvimento muscular pós-natal, regeneração e hipertrofia <sup>14</sup>. Apresentam limitada capacidade proliferativa e são obtidas em quantidades restritas <sup>14</sup>. Para ser usada em terapias celulares é necessário estimular a expansão usando fatores de crescimento, e seus testes mostram que *in vitro*, são capazes de se diferenciar em osteoblastos e de melhorar a regeneração óssea <sup>14</sup>.

CTs epiteliais estão localizadas na epiderme e apresentam propriedades como: ciclo celular lento, alto potencial proliferativo, localização em nichos de proteção, capacidade de

manutenção e de reparo do tecido residente, além de um longo período de vida <sup>14</sup>. Usualmente, após uma injúria, estas células vão produzir os tipos celulares característicos do seu próprio tecido <sup>14</sup>.

As primeiras CTs adultas identificadas com caráter de pluripotencialidade são as do sistema hematopoiético <sup>15</sup>. Essas são derivadas de uma única célula-mãe, chamada de CT hematopoiética, totipotente <sup>15</sup>. Sua característica principal é a capacidade de auto renovação e a pluripotencialidade <sup>15</sup>. Com um estímulo apropriado essas células originam um compartimento para células comprometidas com uma determinada linhagem hematológica, as células formadoras de colônias (CFC), que são as precursoras imediatas das células maduras do sangue periférico <sup>15</sup>.

As CTs mesenquimais (CTM) estão presentes em regiões perivasculares de todos os tecidos adultos, principalmente na medula óssea (MO) <sup>16</sup>. São caracterizadas por serem uma população de células multipotentes, com capacidade de produzir qualquer tipo celular necessário, desde osteoblastos, até neurônios e células renais, além de expressarem muitas moléculas bioativas que atuam modulando a resposta inflamatória, angiogênese e mitose das células envolvidas no processo de reparação tecidual <sup>16</sup>. A responsabilidade pelo *turnover* e manutenção dos tecidos, bem como pela geração de tecidos mesodérmicos e não mesodérmicos, é atribuída às MSC devido à sua alta plasticidade <sup>16</sup>.

### **Terapia com células-tronco (CTs)**

Na DA, a ação terapêutica das CTs pode ser, principalmente, para reduzir seus efeitos fisiopatológicos <sup>17</sup>. Isso acontece por meio de mecanismos bioquímicos que têm como prognóstico promissor a redução de disfunções cognitivas e de memória, segundo testes realizados em camundongos <sup>17</sup>. Tal redução dos efeitos se dá pela substituição de células neuronais degeneradas ou lesadas e a ativação da neurogênese endógena, ou seja, a formação de novas células neurais <sup>17</sup>.

Existem diferentes fontes de CTs utilizadas neste tipo de terapia experimental. As CTs embrionárias, CTs neurais, CTs mesenquimais obtidas de cordão umbilical e a medula óssea e CTs pluripotentes induzidas, também conhecidas como iPSCs, do inglês *induced pluripotent stem cells*, que são obtidas a partir de células somáticas reprogramadas geneticamente <sup>18</sup>.

As pesquisas feitas nos últimos 5 anos, usaram diferentes tipos de CTs e diferentes modelos animais, alternando rotas de entrega e mecanismos terapêuticos <sup>19</sup>.

No teste com CTs neuronais embrionárias murinas, utilizou-se o modelo animal B6C3 de camundongos transgênicos e a administração foi feita por meio de injeção estereotáxica bilateral intra-hipocampal<sup>19</sup>. O mecanismo terapêutico empregado consistiu na modulação da resposta inflamatória e foram observados resultados iniciais após 10 semanas de intervenção<sup>19</sup>. Verificou-se uma migração significativa das células doadoras, com 14,6% de neurônios, 36,2% de astrócitos e 28,5% de diferenciação fenotípica em oligodendrócitos<sup>19</sup>. Houve uma melhora na memória espacial, avaliada por meio do labirinto aquático de Morris, e uma diminuição na expressão das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-6 e de TNF- $\alpha$ ; entretanto, não foram observadas alterações nos níveis de A $\beta$ <sup>19</sup>.

O estudo que utilizou CTs neuronais embrionárias humanas, a entrega das células foi realizada por meio da injeção estereotáxica intraventricular bilateral, no modelo NSE-APPswe de camundongos transgênicos, com o objetivo de modular a resposta imune inflamatória e a atividade da micróglia, bem como proteger contra a neurotoxicidade causada pela placa de A $\beta$ <sup>19</sup>. Após 7 semanas, observou-se uma extensa migração das células doadoras, sendo que 80% das células mantiveram o fenótipo do SNC<sup>19</sup>. Houve uma melhora na memória espacial, redução dos níveis de tau fosforilada, placas A $\beta$ , astrogliose e apoptose, além de uma diminuição das citocinas pró-inflamatórias<sup>19</sup>. Também foi observado um aumento nos níveis de neurotrofina cerebral e na densidade sináptica no hipocampo<sup>19</sup>.

Além disso, foram realizados mais dois testes utilizando CTs neuronais embrionárias<sup>19</sup>. No modelo Tg2576 de camundongos transgênicos, foi feita a injeção estereotáxica intra-hipocampal bilateral com  $2,5 \times 10^5$  células<sup>19</sup>. O mecanismo terapêutico utilizado visava fornecer suporte neurotrófico para a neurogênese endógena e conectividade sináptica<sup>19</sup>. Após 5 semanas de intervenção, as células doadoras foram observadas na região do giro denteado, sendo 70% neurônios e 20% com diferenciação fenotípica em astrócitos<sup>19</sup>. Houve uma melhora na memória espacial, aumento da neurogênese endógena no giro denteado e redução nos níveis de A $\beta$ <sup>19</sup>. No modelo 3xTG-AD, uma injeção estereotáxica intra-hipocampal bilateral foi realizada com  $1 \times 10^5$  células utilizando o mesmo mecanismo terapêutico<sup>19</sup>. Nesse caso, as células doadoras foram encontradas na sub-região do hipocampo CA1<sup>19</sup>. Houve sobrevivência celular, melhora na memória espacial (avaliada por meio do labirinto de Morris e da tarefa de reconhecimento de objetos novos- NOR), aumento nos níveis de proteínas sinápticas no hipocampo, tau solúvel, insolúvel e tau fosforilada, e níveis de A $\beta_{40}$  e A $\beta_{42}$  permaneceram inalterados<sup>19</sup>.

As CTs mesenquimais derivadas do sangue do cordão umbilical humano foram administradas em camundongos transgênicos do modelo APP/PS1<sup>19</sup>. Foram realizadas três injeções intra-hipocampais bilaterais com um intervalo de duas semanas entre cada uma delas<sup>19</sup>. O objetivo

do tratamento era modular a resposta inflamatória e a atividade da micróglia, além de possuir propriedades anti-amiloidogênicas<sup>19</sup>. Após 41 dias da primeira injeção, observou uma melhora na memória espacial, redução nos níveis de tau fosforilada e diminuição da expressão vascular de A $\beta$ 40 e BACE-1 (beta-secretase 1) no córtex e hipocampo, além de uma redução nas citocinas pró-inflamatórias e um aumento na citocina anti-inflamatória IL-4<sup>19</sup>.

CTs mesenquimais derivadas da placenta humana foram utilizadas em camundongos que receberam uma infusão cerebral Ab<sub>-1-42</sub>, através de injeção intravenosa<sup>19</sup>. O objetivo foi fornecer suporte neurotrófico para a neurogênese endógena, além de modular a inflamação, a resposta imune da micróglia e ter um efeito anti-amiloidogênico<sup>19</sup>. Após duas semanas, os seguintes resultados foram observados: as células doadoras foram encontradas de forma limitada no hipocampo e não apresentaram diferenciação neuronal<sup>19</sup>. Houve uma melhora na memória espacial, uma redução nos níveis de APP cerebral (afasia progressiva primária) e BACE1 (beta-secretase 1) além de uma diminuição na atividade das enzimas  $\beta$  e  $\gamma$ -secretase<sup>19</sup>. Também foram observados níveis reduzidos de ativação de astrócitos e micróglia, uma atenuação na apoptose induzida por A $\beta$ <sub>1-42</sub> no hipocampo e um comprometimento da diferenciação endógena<sup>19</sup>. Além disso, houve uma redução na expressão das proteínas inflamatórias iNOS (óxido nítrico induzível sintase) e COX-2, bem como uma diminuição na expressão de várias citocinas pró-inflamatórias<sup>19</sup>.

CTs mesenquimais do cordão umbilical humano e as CTs mesenquimais derivadas da geleia de Warton foram administradas por meio de injeção estereotáxica intra-hipocampal em camundongos transgênicos do modelo B6C3-Tg, com o objetivo de modular a inflamação e a resposta imune da micróglia<sup>19</sup>. Após 4 semanas do procedimento, verificou-se a ausência das células doadoras, mas houve uma melhora na memória espacial<sup>19</sup>. Especificamente no grupo tratado com CTs mesenquimais derivadas da geleia de Warton, foram observados os seguintes resultados: aumento dos níveis de sinapsina 1 no hipocampo, redução na deposição de A $\beta$  no hipocampo e diminuição nos níveis de A $\beta$ <sub>40</sub> e A $\beta$ <sub>42</sub> solúveis<sup>19</sup>. Além disso, houve um aumento no número de micróglia ativadas por M2, redução das citocinas pró-inflamatórias e aumento na citocina anti-inflamatória<sup>19</sup>.

As CTs mesenquimais derivadas do tecido adiposo humano, foram administradas nos modelos Tg2576 e 3xTg-AD por meio de injeção intravenosa<sup>19</sup>. Após 6 semanas, no grupo Tg2576, observou-se uma melhora na memória espacial<sup>19</sup>. No grupo 3xTg-AD, após 12 semanas, foram observados os resultados: as células doadoras foram encontradas no baço, fígado e pulmão, porém não foram detectadas no cérebro<sup>19</sup>. Houve uma redução no número e tamanho das placas A $\beta$ <sup>19</sup>. Na primeira semana, houve um aumento da densidade de

micróglia ativada no hipocampo, mas essa densidade diminuiu na semana 12<sup>19</sup>. Também foi observado aumento na micróglia de caráter fagocítico<sup>19</sup>. Em relação a resposta inflamatória, houve uma redução nas citocinas pró-inflamatórias na primeira semana e um aumento nas citocinas anti-inflamatórias (IL-10 e TNF- $\beta$ ) na semana 12<sup>19</sup>. Em adição, houve um aumento nos níveis de enzimas responsáveis pela degradação do A $\beta$ <sup>19</sup>.

As CTs mesenquimais derivadas da medula óssea murinas foram aplicadas em modelos APP/PS1 por meio de injeção intravenosa<sup>19</sup>. Durante o período de 1 a 4 semanas, observou-se a presença das células doadoras no córtex cerebral, hipocampo, medula óssea, pulmão e fígado<sup>19</sup>. No entanto, não teve redução nos níveis totais de A $\beta$ <sup>19</sup>. Após 4 semanas, foi notado a deposição vascular da proteína pE3-Ab, bem como o aumento no número de placas A $\beta$  com tamanho inferior a 50 micrômetros<sup>19</sup>. Também foi observada uma redução nos níveis de ativação de astrócitos e micróglia ramificada, assim como uma diminuição na presença de micróglia nos córtices cerebral e hipocampal<sup>19</sup>. Houve uma redução nos níveis de TNF- $\alpha$  no hipocampo, bem como nos níveis de IL-6, e um aumento nos níveis do receptor de prostaglandina PTGER no hipocampo<sup>19</sup>.

As CTs mesenquimais derivadas da medula óssea humanas foram aplicadas em camundongos com infusão cerebroventricular de A $\beta$ <sub>1-42</sub>, utilizando injeção intravenosa<sup>19</sup>. Durante o experimento, observou-se a diferenciação neuronal das células doadoras no córtex entorrinal e no hipocampo<sup>19</sup>. Esses camundongos ainda apresentaram um melhor desempenho na memória de trabalho, como evidenciado pelo teste do labirinto de braços radiais<sup>19</sup>. Foi também observado uma atenuação dos efeitos prejudiciais na neurogênese, com a diferenciação neuronal ocorrendo no hipocampo em um período entre 2 e 4 semanas após o tratamento<sup>19</sup>. Os resultados mostraram também um aumento na expressão de proteínas de especificação neuronal, como a  $\beta$ -catenina e Ngn1<sup>19</sup>. Essas proteínas desempenham um papel importante no desenvolvimento e diferenciação neuronal<sup>19</sup>.

Precusores neuronais derivados de CTs pluripotentes induzidas (iPSCs) humanas foram utilizados em camundongos transgênicos do modelo PDAPP<sup>19</sup>. Essas células foram aplicadas por meio de injeção estereotáxica intra-hipocampal<sup>19</sup>. O objetivo era promover a regeneração das redes neuronais esgotadas<sup>19</sup>. Após 2 semanas do procedimento, observou-se uma melhora na memória espacial nos camundongos tratados<sup>19</sup>. Após 45 dias, foram observados resultados ainda mais promissores, incluindo aprimoramento da memória espacial, sobrevivência das células doadoras e diferenciação neuronal no hipocampo<sup>19</sup>. As células doadoras expressaram marcadores neuronais colinérgicos e GABAérgicos, indicando a aquisição de fenótipos neuronais específicos<sup>19</sup>.

Diversos estudos pré-clínicos sobre terapias com CTs para a DA apresentaram resultados inconsistentes, o que dificultaram a progressão dessas terapias para ensaios clínicos em humanos <sup>19</sup>. No entanto, evidências de segurança e eficácia de terapias baseadas no uso de CTs mesenquimais em modelos animais, juntamente com sua facilidade de manuseio e isolamento, deram suporte à realização de vários ensaios clínicos humanos <sup>19</sup>.

Um recente ensaio clínico de fase 1 avaliou a segurança e tolerabilidade de CTs mesenquimais alogênicas derivadas de sangue do cordão umbilical humano, que foram injetadas intracranianamente em pacientes com DA <sup>20</sup>. O estudo incluiu nove pacientes com a doença provável, dividido em grupos de baixa dose a alta dose de CTs mesenquimais <sup>20</sup>. No entanto, ao longo de um período de acompanhamento de 24 meses, o transplante de células não foi capaz de retardar o declínio cognitivo, conforme medido pela Escala de Avaliação da Doença de Alzheimer <sup>20</sup>. Além disso, não foram observadas alterações significativas na patologia <sup>20</sup>. Os pesquisadores sugerem que isso pode ser devido, em parte, à dependência da neuroimagem em vez de análises bioquímicas mais sensíveis realizadas post-mortem em estudos com animais <sup>20</sup>.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Conforme o número de casos de pessoas acometidas pela DA continua a aumentar, torna-se cada vez mais importante expandir e aperfeiçoar os estudos sobre as formas terapêuticas que possam reduzir os danos causados pela doença. Atualmente as opções terapêuticas são limitadas e não oferecem uma cura definitiva. As terapias baseadas no uso das CTs apresentaram resultados promissores, mostrando melhora na memória espacial, redução das placas  $\beta$ -amiloides e inflamações.

Entretanto, apesar dos avanços em testes pré-clínicos, o tratamento ainda apresenta muitas lacunas e obstáculos a serem superados e são necessários mais ensaios para estabelecer a segurança e eficácia destes testes em humanos, assim como ferramentas confiáveis de diagnóstico.

A colaboração entre pesquisadores, profissionais da saúde, pacientes e cuidadores é fundamental para avançar na compreensão e no tratamento. É preciso investimento contínuo em pesquisa e políticas de saúde que priorizem o cuidado e o suporte aos pacientes e suas famílias.

## REFERÊNCIAS

1. Smith MDC. Doença de Alzheimer. *Braz J Psychiatry*. 1999;21(2).
2. Alves B. Conhecer a demência, conhecer o Alzheimer: o poder do conhecimento. *Biblioteca Virtual em Saúde MS*.
3. Ferreira ABT, Pires FFR, Fontenele RP, Benito LAO. Mortalidade pela Doença de Alzheimer no Brasil Entre 2000 a 2013. *Acta de Ciências e Saúde*. 2016;1(1):1-16.
4. Reimer DN. Doença de Alzheimer e as opções de tratamento medicamentoso. *Rev Neurologica*. 2020.
5. Minett TS, Bertolucci PH. Terapia Colinérgica na Doença de Alzheimer. *Rev Neurociências*. 2000;8(1):11-14.
6. Militão AD, Barros AM. Doença de Alzheimer: Genética e novos avanços. *Rev Temas em saúde*. 2017;17(1):262-280.
7. Freire DS, Silva AS, Borin FY. A fisiopatologia da doença de alzheimer. *Rev Terra & Cultura*. 2022;38:237-251.
8. Souza ES, Santos AMS, Silva ADD. Doença de alzheimer: Abordagem sobre a fisiopatologia. *Rev Episteme Transversalis*. 2021;12(2):356-81.
9. Falco AD, Cukierman DS, Hauser-Davis RA, Rey NA. Doença de Alzheimer: Hipóteses Etiológicas e Perspectivas de Tratamento. *Rev Química Nova*. 2016;39(1).
10. Delanogare E, Flores D, Souza RM, Souza LD, Moreira EL. Hipótese amiloide e o tratamento da doença de Alzheimer: revisão dos estudos clínicos realizados. *Rev de Ciências da Saúde*. 2019;31(1):84-106.
11. Inouye K, Oliveira GH. Avaliação Crítica do Tratamento Farmacológico Atual para Doença de Alzheimer. *Rev infarma*. 2004;15:11-12.
12. Barbosa FO, Assis GB, Araújo LV, Pinheiro MJ, Lemos GD, Maia CS, et al. Doença de Alzheimer e o uso de memantina: Uma revisão da literatura. *Brazilian Journals of Health Review*. 2020;3(2):2415-2425.
13. Cirne-Lima EO. Células-tronco. *Rev HCPA*. 2007;27(3):66-73.
14. Souza VF, Lima LMC, Reis SRA, Ramalho LMP, Santos JN. Células-tronco: uma breve revisão. *Rev de Ciências Médicas e Biológicas*. 2003;2(2).
15. Filho ST, Treichel TL, Junior JS, Rosa MB, Dalmolin F, Brun MV. Células Tronco Mesenquimais Adultas: Características e Aplicações Experimentais em Animais. *Rev de Veterinária e Zootecnia*. 2013;20.
16. Monteiro BS, Neto NMA, Carlo RJD. Células-tronco mesenquimais. *Rev Ciência Rural*. 2010;40(1).
17. Pessoa MG, Ferraz CR, Albuquerque EL, Barroso JD, Vilar LG, Barros LL, et al. O potencial terapêutico das células-tronco na Doença de Alzheimer. *Research, Society and Development*. 2023;12(5).
18. Han F, Bi J, Qiao L, Arancio O. Stem Cell Therapy for Alzheimer's Disease. *Adv Exp Med Biol*. 2020; 1266:39–55.

19. Duncan T, Valenzuela M. Alzheimer's disease, dementia, and stem cell therapy. *Stem Cell Research & Therapy*. 2017;8(1).

20. Karvelas N, Benett S, Politis G, Kouris NL, Kole C. Advances in stem cell therapy in Alzheimer's disease: a comprehensive clinical trial review. *Stem Cell Investg*. 2022;9(2).

## **CONTATO**

Alanys Caraça Raymundo: [nanycaraca@gmail.com](mailto:nanycaraca@gmail.com)

# Terapia com células T modificadas: avanço para o tratamento de neoplasias malignas

## Modified T-cell therapy: a breakthrough in the treatment of malignant neoplasms

Beatriz Silva Santos<sup>a</sup>, Brenda Evangelista Ribeiro<sup>a</sup>, Renata Ruoco Loureiro<sup>b</sup>

a: Graduanda do curso de Biomedicina do Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas – FMU, Brasil

b: Biomédica, Docente de Biomedicina do Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas – FMU, Brasil

### RESUMO

A terapia com células T modificadas (CAR-T), atualmente vem tendo um avanço significativo na área oncológica. Esta imunoterapia consiste na utilização de linfócitos T retirados dos próprios pacientes através de leucaférese, conseqüentemente passam por modificações genéticas para que então sejam transferidas novamente para os pacientes via transfusão única. Atualmente, esta terapia está em sua quarta geração, em que a primeira geração se resume a somente um sinal e não possuía moléculas de coestimulação, e gradativamente através das gerações as células foram ficando mais complexas, proporcionando assim uma resposta antitumoral maior, um exemplo é que a partir da segunda geração as células começaram a apresentar moléculas coestimuladoras, fazendo com que a resposta antitumoral aumentasse e o tempo de ativação das células no corpo do paciente também fosse maior. A terapia CAR-T atualmente é uma das mais eficazes para o tratamento de tumores de caráter hematológico e para tumores do sistema nervoso central. Mesmo com ótimo prognóstico relacionada a esta terapia há alguns eventos adversos que podem ocorrer sendo as mais comuns a síndrome de liberação de citocinas (CRS), síndrome de neurotoxicidade associado às células efetoras do sistema imune (ICANS), síndrome de encefalopatia (CRES), síndrome linfocítica hemofágica (HLH) e a síndrome de ativação macrófagica (MAS). O tratamento com as células T modificadas é comercializado com o nome de *Kymriah* e *Yescarta*, os dois tendo a sua aprovação no ano de 2017, e atualmente o medicamento *Tecartus*, com aprovação no ano de 2020, é o mais novo medicamento no mercado utilizando esta terapia.

**Descritores:** terapia car-t, células T, linfócitos T

### ABSTRACT

Modified T-cell therapy (CAR-T) is currently making significant progress in the field of cancer. This immunotherapy consists of using T lymphocytes taken from the patients themselves via leukapheresis, which then undergo genetic modifications so that they can be transferred back to the patients via a single transfusion. This therapy is currently in its fourth generation, with the first generation consisting of just one signal and no co-stimulatory molecules. Gradually, over the generations, the cells have become more complex, thus providing a greater anti-tumor response. One example is that from the second generation onwards, the cells began to have co-stimulatory molecules, which increased the anti-tumor response and increased the time it took for the cells to activate in the patient's body. CAR-T therapy is currently one of the most effective treatments for hematological tumors and also for tumors of the central nervous system. Despite the excellent prognosis associated with this therapy, there are some adverse events that can occur, the most common being cytokine release syndrome (CRS), immune effector cell-associated neurotoxicity syndrome (ICANS), encephalopathy syndrome (CRES), hemophagic lymphohistiocytic syndrome (HLH) and macrophage activation syndrome (MAS). Treatment with modified T cells is marketed under the names *Kymriah* and *Yescarta*, both of

which were approved in 2017, and currently the drug Tecartus, approved in 2020, is the newest drug on the market using this therapy.

**Descriptors:** car-t therapy, t-cells, T lymphocytes

## **INTRODUÇÃO**

Novas técnicas vêm sendo inseridas na imunologia, e a terapia com células T modificadas (CAR-T) é uma delas<sup>1</sup>. Com o aprimoramento desta terapia, vem se enquadrando em uma classe muito poderosa contra cânceres, em razão de tratar-se de uma técnica revolucionária que utiliza uma célula viva como meio terapêutico para tratamento de tumores, principalmente em casos de leucemias de pacientes refratários ou que apresentam recaídas<sup>1, 2, 3</sup>. A partir desta terapia, os pacientes com tratamentos limitados e não eficazes podem ter uma nova possibilidade satisfatória e eficaz de melhora onde, em alguns casos, apresentam melhora do estado geral<sup>3</sup>.

Esta imunoterapia consiste na remoção das células imunológicas do paciente para torná-las suscetíveis para combater o câncer<sup>4</sup>. As células escolhidas para seguir com esta terapia são os linfócitos T, já que são os principais componentes do sistema imune, visto que conduzem toda resposta imunológica<sup>4</sup>.

Em vista disso, nesta revisão foi abordado desde o processo inicial da produção das células CAR-T até a sua infusão ao paciente, apresentando também, metodologias empregadas para esta técnica, suas aplicações e alguns relatos de casos reais para reconhecimento e gerenciamento e mostrar a evolução de alguns pacientes<sup>5</sup>.

## **JUSTIFICATIVA**

O tema deste trabalho foi escolhido pois a terapia CAR-T vem se espalhando, desenvolvida, melhorada e revolucionada. Esta terapia está chegando a vários pacientes, o que os dá uma nova qualidade de vida e uma chance de reprimir seus cânceres. Portanto, é uma opção de tratamento transformadora com respostas potencialmente duradouras e até mesmo curativas. Por isso, neste trabalho foi tratado a fundo sobre esta terapia, sua funcionalidade, para quais tumores é indicada, progressão do tratamento, reações adversas e todo o processo para ativação das células CAR-T.

## MÉTODOS

Para a realização deste artigo de revisão literária foram analisados 26 artigos, para a obtenção de informações sobre onde surgiu esta terapia, seu funcionamento, os efeitos que a sua utilização pode causar ao organismo, foram também utilizados estudos de casos.

## DISCUSSÃO

### Surgimento

A imunoterapia antitumoral deu um grande passo no ano de 2013, devido aos estudos e resultados de ensaios clínicos com células CAR-Ts<sup>4</sup>. Estudos revelam eficácia de, em média, 90 % em cânceres como leucemia linfoblástica aguda de células B, em crianças com leucemia linfóide aguda (LLA) e linfomas agressivos não-Hodgkin<sup>4</sup>.

O uso de células T com receptores de antígenos quiméricos teve respostas grandiosas em alguns pacientes, tanto em adultos como em crianças, por isso há uma grande euforia no uso da terapia com CAR-T em crianças em estágios iniciais de leucemia linfoblástica aguda já que houve vários ensaios desta terapia que foram administrados e publicados com sucesso clínico, muitos com remissão completa da doença<sup>6</sup>.

Em agosto de 2017, foi aprovado pelo “*Food and Drug Administration*” (FDA) duas células CAR-T, utilizadas em pacientes com LLA e para adultos com linfomas avançados<sup>6,7</sup>.

### Terapia T-CAR

A terapia T-CAR utiliza células receptoras de antígenos, sendo estes os linfócitos T CD8 extraídos dos próprios pacientes e submetidos a tratamento imunoterápico<sup>8</sup>.

A engenharia por trás das genéticas das células CAR-T levou ao aperfeiçoamento de moléculas que podem reconhecer proteínas presentes na superfície das células tumorais e proporcionar assim a ativação e proliferação das então células modificadas<sup>9</sup>.

O processo de obtenção dos linfócitos T não estimulados é realizado através de leucaférese, depois de extraídas as células são colocadas em ambiente nutritivo onde passam por processos de enriquecimento, onde são apresentados a antígenos específicos do tecido tumoral<sup>10</sup>. O enriquecimento das células CAR-T adotivas pode diferir em *Yescarta* e *Kymriah*<sup>10</sup>.

A primeira terapia com células CAR-T adotivas aprovada foi em 2017 pelo FDA e pela União Europeia em 2018, foi o medicamento tisagenlecleucel comercializado com o nome de

*Kymriah*, este utilizado para o tratamento de leucemias linfoblásticas agudas de células B, doença de Hodgkin, linfoma do centro folicular, linfoma difuso de células B grandes, mieloma múltiplo, linfoma, linfoma não-Hodgkin, tumor do sistema nervoso central<sup>11,12</sup>.

O Axicabtagene ciloleucel, o mesmo sendo comercializado com o nome de *Yescarta*, foi o segundo medicamento aprovado pela FDA também no ano de 2017, o mesmo é recomendado para o tratamento de linfomas não-Hodgkin, tipos de leucemias e linfomas<sup>13,12</sup>.

O medicamento Brexucabtagene autoleucel comercializado com o nome de *Tecartus* é o medicamento mais recente aprovado, 2020 somente nos Estados Unidos, o mesmo é recomendado para o tratamento de leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfoblástica crônica e linfomas de células do manto<sup>12</sup>.

Um CAR portanto, é um receptor geneticamente construído<sup>14</sup>, composto por três domínios principais: a primeira região é de reconhecimento de antígeno extracelular que contém fragmento de cadeia variável (scFV); o segundo domínio é uma região transmembrana que realiza a ancoragem na membrana plasmática dos linfócitos T modificados; a terceira região é a cauda sinalizadora intracelular, esta última área é constantemente modificada constantes partir de estudos e avanços entre as gerações de células T CAR<sup>8,14</sup>.

Sendo assim, as células CAR-T são linfócitos T CD8 geneticamente modificados capazes de reconhecer um amplo espectro de antígenos de superfície celular, atacando então células tumorais de caráter maligno que expressam estes antígenos, por meio de ativação da coestimulação citoplasmática, secreção de citocinas e morte de células tumorais<sup>14</sup>.

Após a conclusão do protocolo, as células obtidas devem ser transfundidas em até 72 horas para o paciente, se não for possível, as células são criopreservadas por até 21 dias<sup>15</sup>.

Com a obtenção das células T modificadas as mesmas são preparadas como produto farmacêutico para que então sejam administradas em uma transfusão única no paciente<sup>9</sup>.

Através da criopreservação é possível realizar múltiplas transfusões do mesmo lote original, onde as restrições de tempo para testar a eficácia e segurança do produto celular são reduzidas<sup>15</sup>. Para a transfusão, a maioria dos estudos considera um nível seguro de  $3 \times 10^6$  células/kg, após atingir o número de células desejadas, elas são lavadas, suspensas em soro fisiológico e transfundidas por acesso venoso periférico<sup>15</sup>.

## Família CAR-T

Atualmente, a terapia com células T modificadas já está em sua quarta geração<sup>10</sup>. A 1ª geração se limitava a apenas um sinal CD3 $\zeta$  e não possuíam moléculas coestimuladoras portanto, sua resposta imunológica no organismo se limitava a apenas algumas semanas, em decorrência estas células estavam mais propensas a sofrer apoptose, seu potencial de expansão in vivo era limitado, ocasionando assim em baixa toxicidade<sup>9</sup>. A 2ª geração é constituída pelo sinal CD3 $\zeta$ , moléculas coestimuladoras (CD28 ou 4-1BB) que são responsáveis por manter as células ativadas proporcionando uma resposta antitumoral mais efetiva<sup>8</sup>. A 3ª geração como observado abaixo (figura 1), consiste na combinação de duas moléculas coestimuladoras CD28+4-1BB<sup>10</sup>. A 4ª geração é a mais recente aprovada para uso e consiste em células com capacidade de liberar citocinas no meio extracelular, em principal a IL-12, ou possuem receptores adicionais<sup>16,17,18</sup>. As células CAR de quarta geração são denominadas como TRUCKs (*T cells redirect for universal cytokine killing*), algumas outras citocinas que podem ser secretadas pelos TRUCKs são IL-2, IL-15, IL-18, IL-7, IL-17, entre outras<sup>16,17,18</sup>.

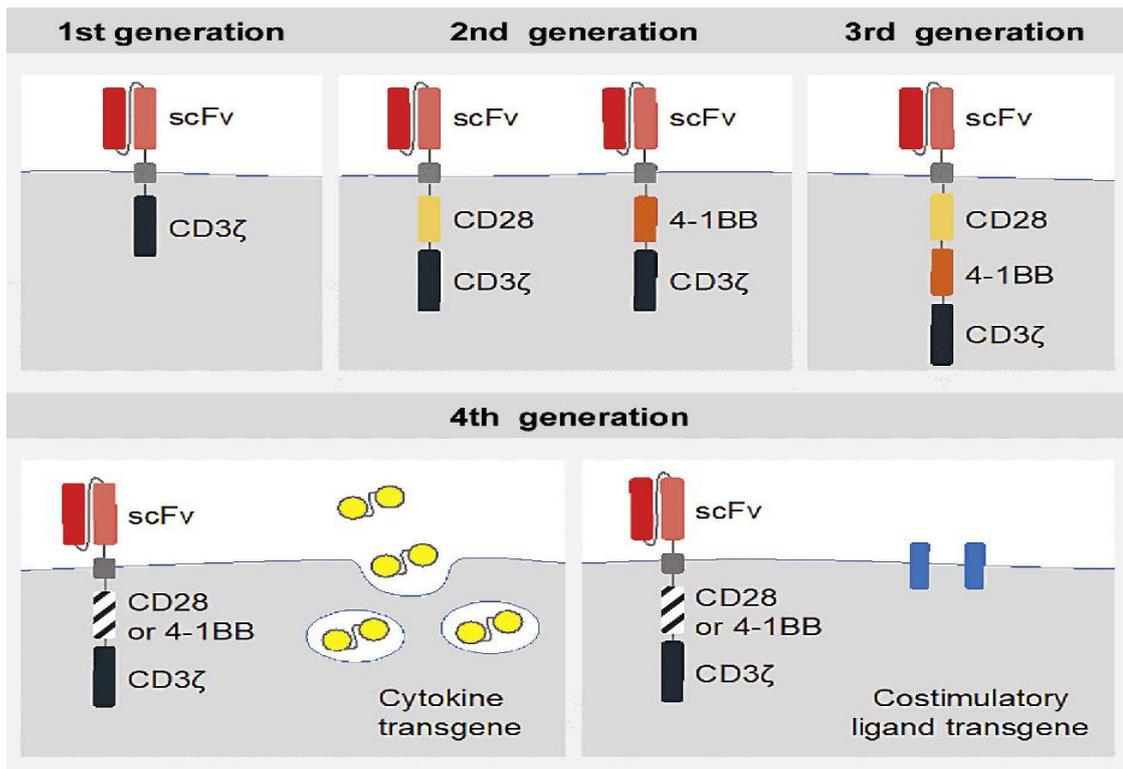


Figura 1: Esquematização do funcionamento de uma célula T modificada. Subklewe M, von Bergwelt-Baildon M, Humpe A. Chimeric antigen receptor T cells: a race to revolutionize cancer therapy. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*. 2019;46(1):15-24.

## Reações Adversas

A maioria dos estudos considera a síndrome de liberação de citocinas (CRS) como a toxicidade mais comum no tratamento, pois este quadro se inicia nos primeiros dias após as infusões, com ambos os tratamentos *Yescarta* e *Kymriah*<sup>8</sup>.

Embora a incidência da CRS seja mais conhecida em doentes sob tratamento com CAR-T, estes sintomas já foram descritos em cenários de transplante de células estaminais de doadores haploide, bem como em terapias baseadas em anticorpos, fármacos antitumorais (como a oxaliplatina e a lenalidomida)<sup>19</sup>. Além disso, também foi reportado em pacientes sob uso de blinatumomab e em terapias com células receptoras de antígeno quimérico natural killer, segundo estudos pré-clínicos<sup>19</sup>.

Citocinas são liberadas em grande quantidade na corrente sanguínea pelas células T modificadas ou por células imunes que respondem às células transfundidas, gerando os efeitos colaterais desta síndrome<sup>20</sup>. Logo, nos aprofundando nas citocinas, sua liberação normalmente ocorre de forma sutil, porém em alguns pacientes pode haver graves reações e risco de vida, no entanto os principais sintomas desta liberação repentina de citocinas são: febre, náuseas, dor de cabeça, irritação na pele, batimento cardíaco acelerado, pressão sanguínea baixa e problemas respiratórios<sup>20</sup>.

A inspeção do início e intensidade da CRS pode ser feita em tempo real uso da PCR. A CRS procede da múltipla sinalização intracelular relacionada com a atividade antitumoral resultando na liberação excessiva de citocinas, como IL-1, IL-2, IL-6 e TNF- $\alpha$ <sup>21</sup>. Foi descoberto que a carga da doença no momento da infusão está diretamente relacionada à gravidade desta síndrome, já que os pacientes que apresentam alta carga tumoral manifestam uma síndrome mais violenta<sup>21</sup>. Portanto, é presumível que níveis altos de citocinas possam ser causadoras de sequelas neurológicas<sup>21</sup>.

Essas reações são diferentes para cada paciente de acordo com o tipo de câncer, avanço da doença, quão saudável está o paciente, e a dose da terapia CAR T que está recebendo<sup>20</sup>. Outros sinais podem ser apontados como preocupantes como hipotensão, infecção, doença renal aguda, hipóxia, apoptose de células B, que aumentam o risco para infecções, pois as imunoglobulinas estarão diminuídas; deste modo os efeitos adversos e colaterais são capazes de levar a morte<sup>20</sup>.

O segundo maior motivo de toxicidade devido a infusão de células CAR-T é a neurotoxicidade, onde estes sintomas aparecem entre o quinto/sexto dia pós infusão e que, assim como a síndrome de liberação de citocinas, também dependem de alguns fatores como: terapias anteriores, tipo de tumor, dose de CAR-T, antígeno marcado e o regime de quimioterapia preparatória para o condicionamento<sup>4</sup>. Esta reação é comumente observada em 23 a 67% dos pacientes que receberam este tratamento para linfomas e 40 a 62% para leucemias<sup>4</sup>. Dentre os sintomas observados nesta neurotoxicidade estão: delírios, encefalopatias, afasia, letargia, tremor, confusão, tontura, disfunção motora, ataxia, distúrbios do sono, mioclonia, dificuldade de concentração, distúrbios de linguagem, fraqueza e depressão do nível de consciência, compõem a síndrome de neurotoxicidade associado às células efetoras imunes (ICANS)<sup>4</sup>.

Outras reações observadas com a infusão de células CAR-T, são a síndrome de encefalopatia (CRES), síndrome linfocítica hemofagocítica (HLH) e a síndrome de ativação macrófaga (MAS)<sup>4</sup>. Os sintomas associados à síndrome de encefalopatia acontecem possivelmente por conta da existência de células CAR-T no líquido cefalorraquidiano (CSF), onde esses pacientes apresentaram desorientação e disfasia<sup>4</sup>. Já na HLH e MAS estão relacionadas a sobreposição com alto grau de CRS, sendo observada em 1% dos pacientes após infusão causando sintomas bem similares a CRS como febre, hipofibrinogenemia e elevados níveis de interleucina 2R (IL-2R)<sup>4</sup>.

Para o tratamento de tumores sólidos existe uma grande diferença, pois todo o processo de caminho realizado pelas células imunológicas é impedido pelos fatores particulares dos tumores sólidos por possuírem uma realidade diferente de tumores hematológicos<sup>4</sup>. As células CAR-T apresentaram dificuldade de infiltração nos tecidos, visto que esses tumores apresentam uma barreira física formada de proteoglicano de heparan sulfato, enquanto em neoplasias hematológicas a infiltração das células CAR-T é facilitada já que as células tumorais estarão no sangue periférico, por onde também ocorre a infusão<sup>4</sup>.

Deste modo, às vezes as células CAR-T podem reconhecer células saudáveis, causando danos a órgãos e diversos efeitos colaterais<sup>20</sup>. Entretanto, apesar de algumas reações graves a porcentagem de complicações em relação a terapias tradicionais é muito menor já que o principal objetivo da terapia com células CAR-T é afetar apenas células tumorais<sup>7</sup>.

### **Relato de casos**

O grupo Carl June publicou o levantamento de um caso de 2011, onde um paciente com leucemia linfocítica crônica (LLC) foi tratado com CAR CD19 de segunda geração<sup>22</sup>. Este

paciente mostrou bons resultados, devido ao grande número de células CAR-T no corpo, a liberação de citocinas causa febre, porém houve remissão completa do câncer e extermínio de todos os linfócitos B normais<sup>22</sup>.

Normalmente em estudos clínicos, o número de células CAR-T é por volta de  $10^9$  a  $10^{11}$ , todavia, este paciente recebeu  $1,42 \times 10^7$  de células, portanto sua resposta clínica antitumoral se manteve os oito meses de acompanhamento do estudo<sup>23</sup>.

Renier Bretjens e Michel Sadelain relataram resultados de um estudo clínico CD19 CAR de segunda geração tratando seis pacientes<sup>23</sup>. Dentre os seis indivíduos, o paciente número 4 (homem, LLC refratária, 69 anos), apresentou hipotensão, dispneia e insuficiência renal após a infusão, levando-o a óbito quatro dias após o procedimento<sup>23</sup>. Já o restante dos pacientes não apresentou toxicidade à dose infundida e toleraram bem a dose de células T modificadas<sup>23</sup>.

Foi realizado um estudo clínico aprovado pelo Comitê de Ética do Primeiro Hospital Afiliado, Faculdade de Medicina, Universidade de Zhejiang, situado em Hangzhou, Zhejiang, na República Popular da China<sup>24</sup>. O estudo pertence à fase Ib e incluiu 17 pacientes com idades entre 18 e 75 anos, com linfomas de grandes células B, abrangendo o DLBCL (Linfoma Difuso de Grandes Células B), o linfoma folicular transformado (tFL) e o linfoma de células do manto (MCL)<sup>24</sup>. Os critérios de inclusão no estudo foram relacionados à presença de células tumorais PDL-1+<sup>24</sup>. O estudo propõe a utilização de terapias bi-CAR-T, que se direcionam ao PD-L1 e ao CD19, com o objetivo de tratar neoplasias hematológicas<sup>24</sup>.

O CAR é construído usando um vetor viral (lentivírus), onde o PD-1 extracelular é modificado e ligado a um promotor de vírus de célula-tronco de camundongo, juntamente com um domínio transmembrana CD28 e sinalização citoplasmática<sup>24</sup>. As células CAR T modificadas com o CD19-PD1 demonstraram uma eficácia superior em comparação com as células T que carregavam apenas o CAR CD19 ou mesmo quando combinadas com anticorpos anti-PD-1, em relação à atividade de combate ao tumor<sup>24</sup>. Adicionalmente, houve um aumento na expressão de genes responsáveis pela formação de memória em células T, o que resultou em um aumento da capacidade citotóxica das células T com o CAR<sup>24</sup>.

Todos os pacientes experimentaram um ou mais efeitos adversos (EA), sendo os graus mais elevados (3 e 4) encontrados em 7 pacientes (41,18%) e 6 pacientes (35,9%) do total de 17<sup>24</sup>. Além disso, não houve relatos de EA de grau 5<sup>24</sup>. Um total de 15 entre os 17 pacientes (88,24%) apresentaram uma forma leve de Síndrome da Liberação de Citocinas (SLC), porém, um paciente faleceu no dia 30 após a infusão da CAR-T devido à progressão do linfoma, sem ter apresentado uma SLC grave ou toxicidades relacionadas à administração da terapia CAR-T<sup>24</sup>.

Dos participantes, 10 (58,8%) alcançaram uma resposta objetiva (RO), enquanto 7 (41,2%) atingiram remissão completa, englobando 1 indivíduo com MCL e 1 com tFL<sup>24</sup>. Um paciente investigado com DLBCL alcançou a remissão completa após receber a terapia CAR-T, porém experimentou uma recidiva CD19+ após 5 meses, confirmada por meio de biópsia<sup>24</sup>. A proporção estimada de sobrevivência livre de progressão (SLP) no 18º mês foi de 80%<sup>24</sup>. Nesse contexto, os autores concluíram que a abordagem CD19-PD1/CD28-CAR-T demonstrou tanta segurança quanto à eficácia no tratamento de linfomas de grandes células B com expressão de PDL-1+<sup>24</sup>.

Em outro estudo de caso, um paciente de 25 anos com o diagnóstico de LLA, com presença de cromossomo philadelfia, já com acometimento do sistema nervoso central, está sendo chamada de leucemia do sistema nervoso central (*nervous system leukemia (CNSL)*)<sup>25</sup>. Havia realizado posteriormente um transplante de células tronco (TCTH), e após quatro meses do procedimento de TCTH houve a progressão da CNSL, conseqüentemente o paciente foi aceito no estudo para a utilização de células T modificadas<sup>25</sup>.

Após a primeira infusão de células CAR T, foi registrado que o paciente apresentou CRS, letargia, hipotensão, incontinência, entre outros sintomas<sup>25</sup>. Foi observado que com o passar dos dias após a infusão o paciente apresentou uma melhora em relação ao seu nível de consciência, mas não apresentou remissão completa, portanto consentiu para uma nova infusão de células CAR T<sup>25</sup>. Após a segunda infusão foi detectado 20% de células CAR T em seu líquido cefalorraquidiano, indicando assim que houve a migração das células para o sistema nervoso central<sup>25</sup>.

Após 8 dias da primeira infusão foi possível observar que somente 3% das células ainda continuavam na corrente sanguínea periférica, esta mensuração foi possível através de teste de PCR<sup>25</sup>. Portanto é possível observar que as células CAR T se mostram com grande potencial para o tratamento de neoplasias malignas de células B<sup>25</sup>.

Os resultados mostram que a co-estimulação de CD28 juntamente com a IL-15R $\alpha$  (CAR 153z), demonstrou uma expansão mais acelerada das células<sup>25</sup>. Sendo assim, os CAR T's de 153z produzem uma quantidade aumentada de citocinas efetoras<sup>25</sup>.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O uso da terapia de células T modificadas para o tratamento de neoplasia malignas e de carácter hematológico, é bastante utilizada e, como observado, com bons prognósticos em relação a sua utilização. Com esta modalidade terapêutica, observa-se uma otimização na

condição de vida dos pacientes devido à manifestação reduzida de agressividade durante o protocolo terapêutico, aliada a uma alta especificidade no combate às células neoplásicas. Isso resulta em taxas de remissão completa da enfermidade que se aproximam dos 95%. Os desfechos evidenciam perspectivas inovadoras para o progresso no âmbito do tratamento das neoplasias. A terapia imunológica utilizando linfócitos T com receptores quiméricos (CAR-T) demonstra, ademais, um progresso notório no âmbito da engenharia de biologia molecular. A habilidade de manipular os linfócitos T autólogos do paciente, mediante a incorporação de um receptor com precisão direcionada à célula neoplásica, e posterior infusão do referido linfócito modificado ao próprio indivíduo, identifica uma redução substancial nos efeitos adversos suscitados pelas terapias convencionais, devido à sua alta especificidade. Não obstante, é evidente que a terapia com células CAR-T permanece em fase de pesquisa, tanto no que concerne aos efeitos colaterais, quanto à sua eficácia global.

## REFERÊNCIAS

1. Martho LJ, Degaspero GR, Tarsitano CAB. Imunoterapia com células t-car: bioengenharia contra a leucemia linfoblástica aguda car-t cells. *CuidArte, Enferm.* 2017;168-73.
2. da Costa Pereira V, de Oliveira PAF. Definição das terapias celulares com receptores de antígenos quiméricos (CAR), receptores de células t (TCR) e linfócitos infiltrantes de tumor (TIL). Perspectivas futuras para a cura do câncer/Definition of cellular therapies with receptors of chemical antigens (CAR), t-cell receptors (TCR), and infiltrant tumor lymphocytes (TIL). *Future perspectives for the cure of cancer. Brazilian Journal of Health Review.* 2019;2(2):1105-24.
3. Clé DV, Hirayama AV, Alencar AJ, Costa LJ, Feliciano JV, Mattos ER, et al. Associação Brasileira de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular consensus on genetically modified cells. I: Structuring centers for the multidisciplinary clinical administration and management of CAR-T cell therapy patients. *Hematology, Transfusion and Cell Therapy.* 2021;43:3-12.
4. Rocha MCdS. Terapia com células CAR-T: um avanço na imuno-oncologia. 2018.
5. Gonçalves GAR, Paiva RdMA. Gene therapy: advances, challenges and perspectives. *Einstein (São Paulo).* 2017;15:369-75.
6. Franceschi JL. Terapia celular con linfocitos CAR-T: una droga viviente. *Revista Médica de Panamá-ISSN 2412-642X.* 2017.
7. Canedo J, Santos G, Reis I, Adabo J, Raymundo J, Meirelles L, et al. ANEMIA MEGALOBLÁSTICA: RELATO DE CASO E REVISÃO DE LITERATURA. *Hematology, Transfusion and Cell Therapy.* 2021;43:S472-S3.
8. Pereira VAC. Imunoterapia clínica de células CAR-T usadas contra tumores—uma revisão sistemática. 2023.
9. Roex G, Feys T, Beguin Y, Kerre T, Poiré X, Lewalle P, et al. Chimeric antigen receptor-T-cell therapy for B-cell hematological malignancies: an update of the pivotal clinical trial data. *Pharmaceutics.* 2020;12(2):194.

10. Subklewe M, von Bergwelt-Baildon M, Humpe A. Chimeric antigen receptor T cells: a race to revolutionize cancer therapy. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*. 2019;46(1):15-24.
11. Ali S, Kjekén R, Niederlaender C, Markey G, Saunders TS, Opsata M, et al. The European medicines agency review of Kymriah (Tisagenlecleucel) for the treatment of acute lymphoblastic leukemia and diffuse large B-cell lymphoma. *The oncologist*. 2020;25(2):e321-e7.
12. De Potdc CCR. *Horizonte Tecnológico*. 2021.
13. AIDallal SM. Yescarta: a new era for non-Hodgkin lymphoma patients. *Cureus*. 2020;12(11).
14. Soares JEP. Terapia com células CAR-T: reprogramação celular para o combate de neoplasias malignas.
15. Oliveira TAS. *Imunoterapia de Células T CAR em Neoplasias Linfoides: Aplicações e Limitações*. 2016.
16. Gatti BG, Sabino BA, Pinheiro BM, Tavares Filho CM, Santos DV, Oliveira LAd, et al. As complexidades na imunoterapia T-CAR para pacientes com leucemia linfoblástica aguda. *Trabalho de Conclusão de Curso*. 2019.
17. Gouveia JFS. *Leucemia Linfoblástica Aguda: a aplicação da imunoterapia com células T CAR: Universidade de Lisboa (Portugal)*; 2019.
18. Júnior ATF, Savazzini-Reis B, de Carvalho Zorzanelli BA, Sadovsky CI, Carletti EZB. Imunoterapia: uma revisão sobre os novos horizontes no combate ao câncer. *Revista de Medicina*. 2020;99(2):148-55.
20. Marques R, Oura MJ, Santos M. Síndrome de Libertação de Citocinas em Doentes sob Tratamento Oncológico com CAR-T. *Medicina Interna*. 2022;29(2):149-57.
21. National Cancer Institute. *T-cell Transfer Therapy*. 2022
22. Gomes B, Martins C, Bariani L, Bariani E, Silva A. As Toxicidades que impedem o avanço no tratamento hemato-oncológico com Cart-T Cells. *Hematology, Transfusion and Cell Therapy*. 2021;43:S473.
23. Porter DL, Levine BL, Kalos M, Bagg A, June CH. Chimeric antigen receptor–modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N engl j Med*. 2011;365:725-33.
24. Brentjens R, Yeh R, Bernal Y, Riviere I, Sadelain M. Treatment of chronic lymphocytic leukemia with genetically targeted autologous T cells: case report of an unforeseen adverse event in a phase I clinical trial. *Molecular Therapy*. 2010;18(4):666-8.
25. Liu H, Lei W, Zhang C, Yang C, Wei J, Guo Q, et al. CD19-specific CAR T cells that express a PD-1/CD28 chimeric switch-receptor are effective in patients with PD-L1–positive B-cell lymphoma. *Clinical Cancer Research*. 2021;27(2):473-84.
26. Subklewe M, von Bergwelt-Baildon M, Humpe A. Chimeric antigen receptor T cells: a race to revolutionize cancer therapy. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*. 2019;46(1):15-24.

## CONTATO

Brenda Evangelista: [evangelistabrenda1@gmail.com](mailto:evangelistabrenda1@gmail.com)

# Síndrome de MELAS: fisiopatologia, métodos diagnósticos e tratamentos disponíveis

## MELAS syndrome: pathophysiology, diagnostic methods and available treatments

Beatriz Cruz de Souza<sup>a</sup>, Renata Ruoco Loureiro<sup>b</sup>

a: Graduanda do Curso de Biomedicina do Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas – FMU, Brasil

b: Biomédica, Docente do Curso de Biomedicina do Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas – FMU, Brasil

### RESUMO

A síndrome de MELAS é uma desordem genética rara de origem mitocondrial que não há cura, ocasionando diversos eventos de importância clínica. Suas manifestações clínicas típicas incluem crises de epilepsia associadas a episódios semelhantes a AVC isquêmico, miopatias mitocondriais, acúmulo de lactato sérico e encefalopatias como demência, esses sintomas são ocasionados devido a uma mutação gênica a nível de DNA mitocondrial relacionado ao RNA transportador de leucina, que dá origem a mitocôndrias não funcionais. O diagnóstico é realizado através de quadro clínico que apresentam elevação de ácido láctico sérico, presença de fibras vermelhas rasgadas (RRF) em biópsia muscular e episódios semelhantes ao acidente vascular cerebral (AVC), também são utilizados testes moleculares para constatar a alteração genética do DNA mitocondrial. Os tratamentos disponíveis consistem em aliviar as complicações da síndrome, mas há alguns estudos de terapia gênica que obtiveram resultados significativos para a recuperação de alguns fenótipos da doença. Nesta revisão de literatura elucidamos a fisiopatologia da síndrome de MELAS, métodos diagnósticos e tratamentos disponíveis que conduzem a melhora da qualidade de vida do paciente.

**Descritores:** síndrome de melas, miopatia mitocondrial, encefalopatia, acidose láctica

### ABSTRACT

MELAS syndrome is a rare genetic disorder of mitochondrial origin which there is no cure, causing several events of clinical importance. Its typical clinical manifestations including epileptic seizures associated with stroke-like episodes, mitochondrial myopathies, accumulation of serum lactate and encephalopathies such as dementia, these symptoms are caused due to a gene mutation at the level of mitochondrial DNA related to leucine RNA transporter, which gives rise to non-functional mitochondria. The diagnosis is conducted through clinical picture of elevated serum lactic acid, presence of ragged red fibers (RRF) in muscle biopsy and stroke-like episodes, molecular tests are also used to verify the genetic alteration of mitochondrial DNA. The available treatments consist in relieve the complications of the syndrome, but there are some gene therapy studies that obtained significant results for the recovery of some disease's phenotypes. In this literature review, we elucidate the pathophysiology of the MELAS syndrome, available diagnostic methods and palliative treatments that lead to an improvement in the patient's quality of life.

**Descriptors:** melas syndrome, mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis

## INTRODUÇÃO

Nosso corpo é composto por trilhões de unidades funcionais denominadas células, cada célula possui organelas citoplasmáticas responsáveis pelo funcionamento homeostático dos tecidos que elas compõem através da realização de suas funções como produção, armazenamento, transporte e degradação de moléculas, proteínas, enzimas e outros compostos extracelulares, além de atuarem também em sua própria divisão celular.<sup>[1]</sup> Tudo isso é possível graças ao código genético armazenado no DNA nuclear (nDNA) que transcreve através de seus genes, mensagens que serão traduzidas no citoplasma celular através de sua maquinaria, dando síntese a todos os elementos figurados que compõem os organismos vivos.<sup>[1]</sup>

Destacaremos a mitocôndria, organela citoplasmática de dupla membrana responsável pela fosforilação oxidativa (OXPHOS), ou seja, responsável pela respiração celular, é nessa organela que ocorre a síntese de moléculas denominadas adenosina trifosfato (ATP), unidade de energia obtida através da “queima” de moléculas de alimentos que é de extrema importância para o funcionamento de diversos processos biológicos na maioria dos seres vivos.<sup>[1][2][3]</sup> Cada célula possui centenas de mitocôndrias em seu citoplasma, é na matriz mitocondrial que provém a maior quantidade de ATP gerados através única molécula de glicose.<sup>[1][2]</sup>

O nDNA não é o único responsável pelo armazenamento de genes que codificam a síntese de tudo que dá vida a vida apesar de ser o protagonista de sua função, as mitocôndrias também possuem um DNA dupla fita próprio de formato circular conhecido como DNA mitocondrial (mtDNA), esse mtDNA abrange cerca de 16.500 pares de bases e 37 genes que são responsáveis por codificar 13 subunidades de enzimas que participam do processo de OXPHOS, além de 22 RNAs transportadores (tRNA) e 2 RNAs ribossômicos (rRNA) essenciais para tradução de proteínas funcionais que mantêm a maquinaria mitocondrial em perfeito funcionamento.<sup>[2]</sup>

Durante a divisão celular mitótica, todas as organelas e nDNA são multiplicados e segregados de forma controlada da célula mãe para a célula filha, com exceção das mitocôndrias, que ao realizar a duplicação do mtDNA, distribui suas cópias em mitocôndrias recém-sintetizadas de forma aleatória, as novas mitocôndrias também são distribuídas de forma aleatória para as células filhas, caracterizando o processo de segregação replicativa.<sup>[2]</sup> Considerando que uma célula disponha de mitocôndrias normais, mas há mutação no mtDNA de uma única mitocôndria e, por conta da segregação replicativa, essa mitocôndria mutante acabe por produzir diversas cópias de seu mtDNA durante a divisão celular e dispor-as em novas mitocôndrias recém-sintetizadas, as células filhas poderão receber da célula mãe tanto

mitocôndrias selvagens (funcionais) quanto mitocôndrias mutantes, existe também a possibilidade da célula mãe doar apenas mitocôndrias mutantes para as células filhas, uma vez que esse processo é realizado de forma aleatória.<sup>[2]</sup>

O mesmo acontece na divisão celular meiótica, onde os ovócitos recebem de forma aleatória cópias das mitocôndrias recém-sintetizadas, estes podem ser heteroplásmicos quando há a doação de mitocôndrias que dispõem tanto de mtDNA mutante quanto de mtDNA selvagem, ou homoplásmicos quando há doação apenas de mitocôndrias que dispõem de mtDNA mutante.<sup>[2]</sup> Sabendo que o mtDNA é uma herança materna devido as mitocôndrias dos gametas masculinos serem eliminadas no embrião e supondo que a mãe seja portadora de uma mutação no mtDNA, mesmo sendo uma mutação que provoca fenótipos brandos ou quase que imperceptíveis na mãe, ela pode doar mitocôndrias não funcionais de forma exacerbada para sua prole que podem se direcionar e aglomerar em determinados tipos de tecidos durante o desenvolvimento embrionário e fetal, desencadeando uma síndrome mitocondrial.<sup>[2]</sup>

Todas as características supracitadas cooperam para o quadro multiforme das síndromes que estão relacionadas ao mtDNA, o objetivo deste estudo tratou de abordar a fisiopatologia da síndrome de MELAS, seus sinais e sintomas, métodos diagnósticos e tratamentos paliativos disponíveis atualmente através de revisões bibliográficas acerca do tema.<sup>[2]</sup>

## **JUSTIFICATIVA**

A síndrome de MELAS é uma doença genética rara que acomete drasticamente a qualidade de vida do seu portador, é comum que pacientes portadores desta síndrome desenvolvam dificuldade de deambular, de deglutir, fadiga excessiva, crises convulsivas e episódios semelhantes ao AVC isquêmico, necessitando de cuidados paliativos e até mesmo hospitalizações durante sua vida. É importante ressaltar que o diagnóstico da síndrome de MELAS pode, em muitos casos, não ser tão claro no início devido a seu quadro clínico multiforme, além de sintomas subjacentes que o paciente pode ou não apresentar, sendo facilmente confundida com outras patologias durante os primeiros anos de vida, tornando moroso o encaminhamento ao médico geneticista e podendo levar anos até seu diagnóstico.

Exposto a problemática acima, faz-se importante que o quadro clínico da síndrome de MELAS seja melhor elucidado, através da produção de conteúdo científico sobre sua progressão, quadro clínico, métodos diagnósticos e tratamentos paliativos disponíveis atualmente, visando estimular através da disseminação de conhecimento sobre o tema, a melhora da qualidade e expectativa de vida do portador através do diagnóstico precoce e tratamento adequado, como

já é de praxe em outras doenças genéticas por haver grandes quantidades de conteúdos e pesquisas ativas acerca dos temas no âmbito da genética médica.

## **MÉTODO**

Elaboração de artigo científico teórico através de revisões bibliográficas acerca do tema abordado, utilizando livros e as bases de dados SciELO e PubMed, a plataforma Google Acadêmico também foi consultada para coleta de artigos, foram coletados preferencialmente artigos entre os anos 2000 e 2023. Durante as pesquisas para coleta de dados foram utilizados os termos: síndrome de MELAS, encefalopatias associadas a síndrome de MELAS, miopatias mitocondriais, episódios semelhantes ao AVC na síndrome de MELAS, MELAS syndrome, mutação de tRNA de leucina na síndrome de MELAS, acidose láctica na síndrome de MELAS.

## **FISIOPATOLOGIA DA SÍNDROME DE MELAS**

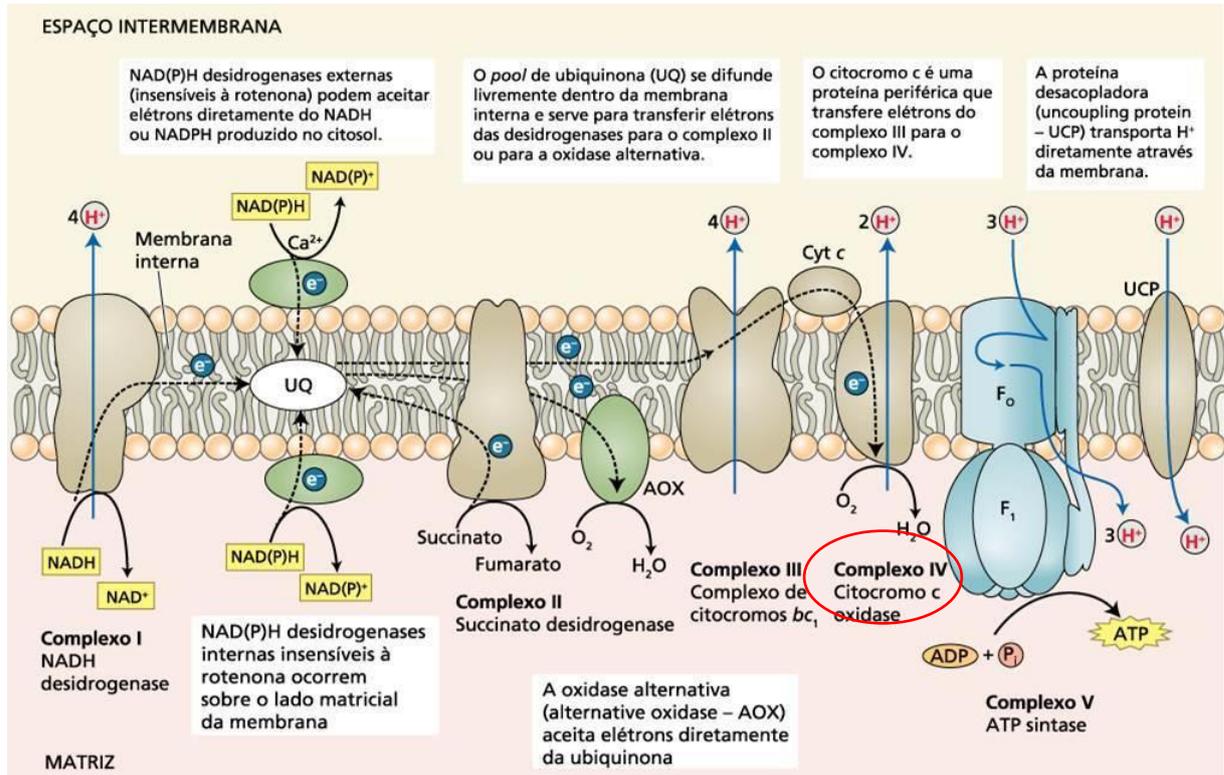
A síndrome de MELAS é uma doença genética de herança materna ocasionada por mutações pontuais no mtDNA que provocam diversas manifestações clínicas, cerca de 80% das pessoas que possuem síndrome de MELAS apresentam a mutação pontual A3243G do RNA transportador de leucina tRNA-UUA, também conhecido como gene MT-TL1, onde há a substituição de base nitrogenada do tipo adenina pelo tipo guanina na posição 3243 da região do mtDNA codificante para o tRNA-UUA, outros 7,5% dos casos estão associados a mutação pontual T3271C, que também se trata de uma substituição de base nitrogenada na mesma região codificadora, desta vez do tipo timina para o tipo citosina na posição 3271 do mtDNA, ambas as mutações ocasionam a tradução do tRNA-UUA não funcional.<sup>[4][5]</sup>

Não é totalmente compreendida a relação entre as mutações e os fenótipos que a doença apresenta, entretanto as alterações supracitadas no mtDNA provocam a deficiência de aminoacilação do tRNA onde o mesmo apresenta dificuldades em disponibilizar a leucina na cadeia de aminoácidos durante a síntese proteica mitocondrial, afetando o processo de OXPHOS que é parcialmente dependente das proteínas sintetizadas in situ, uma vez que algumas delas são codificadas pelo nDNA.<sup>[6]</sup> Ocorre também a modificação de sua posição para o reconhecimento do anticódon UUG, resultando em uma redução da atividade mitocondrial e, conseqüentemente, baixos níveis de produção de moléculas de ATP.<sup>[6]</sup>

O complexo IV da OXPHOS (figura 1), responsável pela transferência de elétrons do complexo III para o complexo IV destaca-se na síndrome de MELAS uma vez que a proteína citocromo

C oxidase (COX) atuante nesse complexo possui 3 de suas 13 subunidades codificadas pelo mtDNA, resultando em sua disfunção e baixa atividade, o que compromete o processo de OXPHOS num todo.<sup>[7]</sup>

FIGURA 1 – Funcionamento normal dos complexos que compõem a cadeia respiratória dentro da matriz mitocondrial, em destaque o complexo IV (ação da proteína citocromo C oxidase), que é afetado na síndrome de MELAS:



Fonte: Taiz, L; Zeiger, E [2012] <sup>[8]</sup>

Os miócitos e neurônios estão mais suscetíveis ao dano, uma vez que demandam particularmente de uma grande quantidade de mitocôndrias que supram o gasto energético através da produção de moléculas de ATP para esses exercerem suas funções fisiológicas corretamente.<sup>[3]</sup> Havendo a presença de distúrbios mitocondriais, as células desses tecidos são severamente acometidas, apresentando falhas funcionais em suas fisiologias.<sup>[3]</sup> Entretanto, a síndrome de MELAS pode atingir diversos tecidos e possuir sintomas subjacentes como o desenvolvimento de Diabetes Mellitus (DM), manifestações psiquiátricas, cardiopatias, ataxia e baixa estatura.<sup>[9]</sup>

## SINAIS E SINTOMAS DA SÍNDROME DE MELAS

É importante salientar que a síndrome de MELAS é uma doença de quadro clínico multiforme onde os sintomas podem iniciar nos primeiros anos de vida ou no início da vida adulta, mas também há casos de início tardio em adultos.<sup>[3]</sup> Suas alterações variam de paciente para

paciente de acordo com sua carga de heteroplasmia, entretanto alguns sintomas são comumente encontrados em quase todos os casos de mutação do tRNA<sup>leu(UUR)</sup>, essas principais alterações fisiopatológicas consistem em: miopatia mitocondrial, encefalopatia, acidose láctica e episódios semelhantes ao acidente vascular cerebral (AVC) isquêmico.<sup>[4][5]</sup>

### **Miopatia mitocondrial**

As miopatias mitocondriais tem sua patogênese diretamente relacionada a taxa de consumo de ATP que o tecido muscular necessita para realizar suas funções, como por exemplo a movimentação músculo esquelética, havendo a falha mitocondrial e redução dos níveis de ATP disponíveis os músculos são comprometidos e o paciente manifesta sintomas como fraqueza muscular, perda da capacidade de deglutição (necessitando de suplemento alimentar por sonda nasogástrica, sonda nasoentérica e até mesmo gastrostomia), oftalmoplegia (paralisia/fraqueza dos músculos oculares), dificuldade de fala, dificuldade para deambular, entre outras.<sup>[9][10][11]</sup>

### **Encefalopatia**

As encefalopatias provocadas pela síndrome de MELAS possuem o mesmo mecanismo de patogênese que a miopatia mitocondrial, os neurônios consomem altas quantidades de moléculas de ATP para realizar suas funções fisiológicas, havendo a baixa da produção destas moléculas logo haverá o comprometimento desse tecido, progredindo para sintomas como demência, cefaléia, convulsões, ataxia, perda auditiva, entre outros.<sup>[5][11]</sup>

Alguns destes sintomas também estão correlacionados às zonas de infarto ocasionadas pelos episódios semelhantes ao AVC e angiopatias de pequenos vasos cerebrais, pois há perda extensa de células neuronais, comprometendo a atividade funcional destas regiões.<sup>[7]</sup>

### **Acidose láctica**

A acidose láctica no quadro da síndrome de MELAS é resultado da ativação das vias anaeróbicas para produção de energia, essa via pode ser ativada pelo organismo através da identificação de músculo esquelético muito ativo ou de um estado de hipóxia, a razão dessa hipóxia pode ser por ausência do oxigênio propriamente dito ou alterações na cadeia respiratória celular, onde há presença do oxigênio, porém as mitocôndrias por algum motivo não são capazes de produzir veemente as moléculas de ATP necessárias, essa baixa de produção de ATP é sinalizada e o organismo a compreende como ausência de matéria prima

para a OXPHOS, como por exemplo o oxigênio, passando a ativar as vias anaeróbicas para suprir essa pseudo ausência como acontece na síndrome de MELAS, esse processo obtém como produto o ácido láctico elevando seus níveis séricos, reduzindo o pH sanguíneo, e, provocando uma acidose metabólica seguida de sintomas como vômitos recorrentes, fadiga extrema, dispneia e fraqueza muscular.<sup>[5][12]</sup>

### **Episódios semelhantes ao AVC**

Os episódios semelhantes ao AVC são eventos não totalmente elucidados em sua patogênese, porém resultam em zonas de infarto no córtex cerebral, chama-se “semelhante” pois seus sintomas são indistinguíveis ao AVC isquêmico ocasionado por hipóxia tecidual derivada de obstrução circulatória proveniente de um coágulo sanguíneo, entretanto não é ocasionado pelo mesmo motivo.<sup>[5]</sup> Estudos relacionam os episódios semelhantes ao AVC com angiopatias provenientes da disfunção mitocondrial do endotélio de pequenos vasos cerebrais, ocasionando oclusão do lúmen vascular, também está correlacionado com as encefalopatias, descrevendo a falha de suporte energético como um dos motivos que levam ao dano neuronal (morte celular), o que desencadeia alguns sintomas subjacentes como: perda de visão, perdas de movimentos e demência.<sup>[13]</sup> Os sintomas relacionados aos episódios semelhantes ao AVC propriamente dito resumem-se a hemiparesia, desvio de rima, afasia, cefaleia, alterações na visão e até convulsões.<sup>[14]</sup>

A angiopatia na síndrome de MELAS também pode estar relacionada ao funcionamento e produção de óxido nítrico (NO) na circulação, o NO é produzido através da arginina, pela ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS), catalisando a conversão de arginina em citrulina, o reverso ocorre a partir da ação das enzimas argininosuccinato sintase e argininosuccinato liase, estas por sua vez são capazes de converter a citrulina em arginina, desta forma ambas são consideradas matéria prima para a produção de NO, sendo a citrulina um aminoácido não essencial, produzido nos enterócitos do intestino delgado através de ações de enzimas mitocondriais e, estas por sua vez estarem comprometidas no quadro de síndrome de MELAS, é considerado uma possível baixa de NO prejudicial, uma vez que o NO possui papel fundamental no relaxamento da musculatura lisa endotelial, necessária para manter o fluxo circulatório viável, uma vez que há baixa na produção de NO esse relaxamento endotelial é comprometido, provocando o comprometimento circulatório da microvascularização em diversos tecidos.<sup>[15]</sup>

## MÉTODOS DIAGNÓSTICOS DISPONÍVEIS

Destacam-se para o diagnóstico da síndrome de MELAS o aumento de lactato sérico, a presença de fibras vermelhas rasgadas (RRF) e vasos sanguíneos fortemente reativos a succinato-desidrogenase (SSV) em biópsia muscular e episódios semelhantes a AVC isquêmico evidenciados em exames de ressonância magnética (RM) ou tomografia computadorizada (TC) do encéfalo.<sup>[10]</sup>

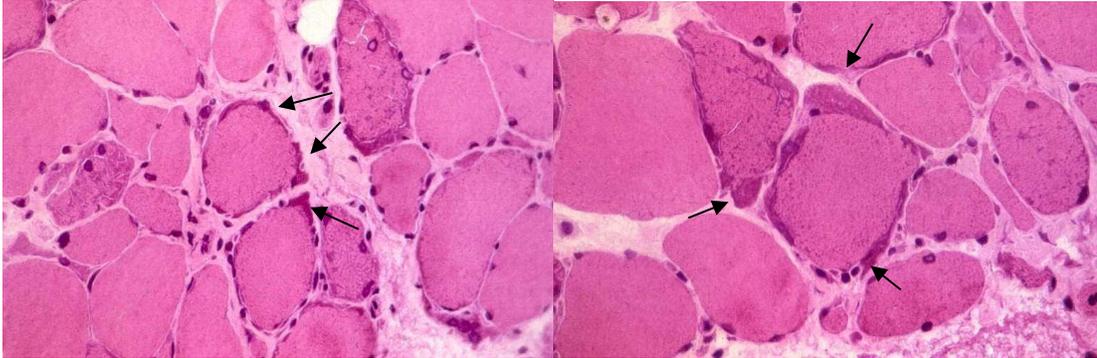
### Lactato sérico

O lactato sérico dosado através de exame bioquímico por ensaio enzimático colorimétrico, durante o método utiliza-se reagentes de kits disponíveis na indústria que através das reações obtidas e análise da capacidade de absorvância da amostra de sangue do paciente em comparação com uma amostra controle disposta no kid utilizado, é possível determinar os níveis de lactato sérico do paciente, o valor de referência gira em torno de 0,5 a 1,6 mmol/L.<sup>[5][12][16]</sup> Níveis anormais, especificamente níveis superiores ao valor de referência, indicam que as vias anaeróbicas lácticas estão sendo utilizadas veemente, esse achado laboratorial combinado com os demais achados supracitados enquadram-se no quadro clínico da síndrome de MELAS.<sup>[5][12][16]</sup>

### Biópsia muscular com presença de RRF e SSV

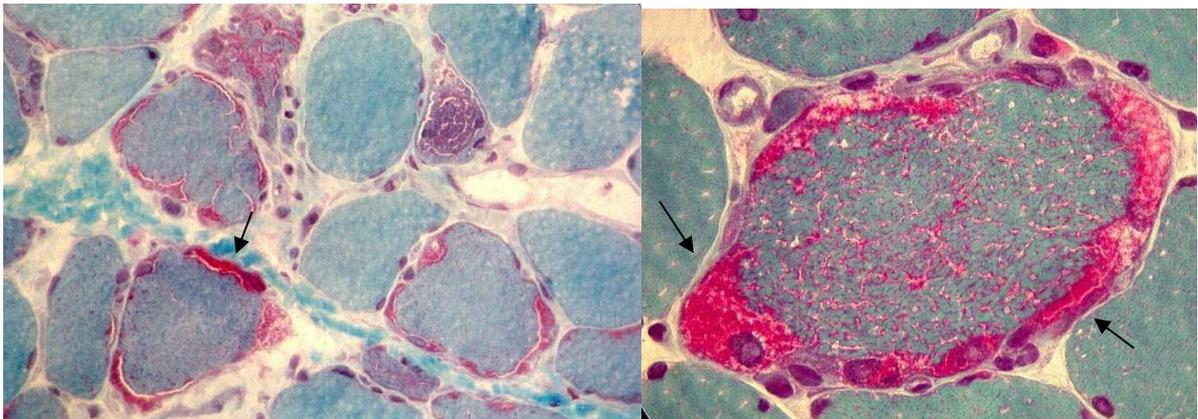
A biópsia muscular é coletada para análise histológica, utiliza-se como marcador a succinato desidrogenase (SDH), enzima característica das membranas mitocondriais, que em coloração de hematoxilina-eosina (HE) apresentam uma cor arroxeada em volta das fibras musculares, formando um anel que evidencia a presença de mitocôndrias em quantidades acima do que é considerado normal (figura 2).<sup>[10][17]</sup> Já no método de coloração tricrômico de gomori (modificado para músculo) as mitocôndrias se apresentam em vermelho, são conhecidas como *ragged red fibers* (RRF) ou, em português, fibras vermelhas rasgadas, ficam dispostas nas bordas das fibras e se apresentam em espessuras irregulares (figura 3).<sup>[17]</sup>

FIGURA 2 – Análise histopatológica em coloração HE evidenciando, através das setas, anéis arroxeados formados por quantidade de mitocôndrias elevadas envolta das fibras musculares:



Fonte: Anatpat-UNICAMP [internet]. [18]

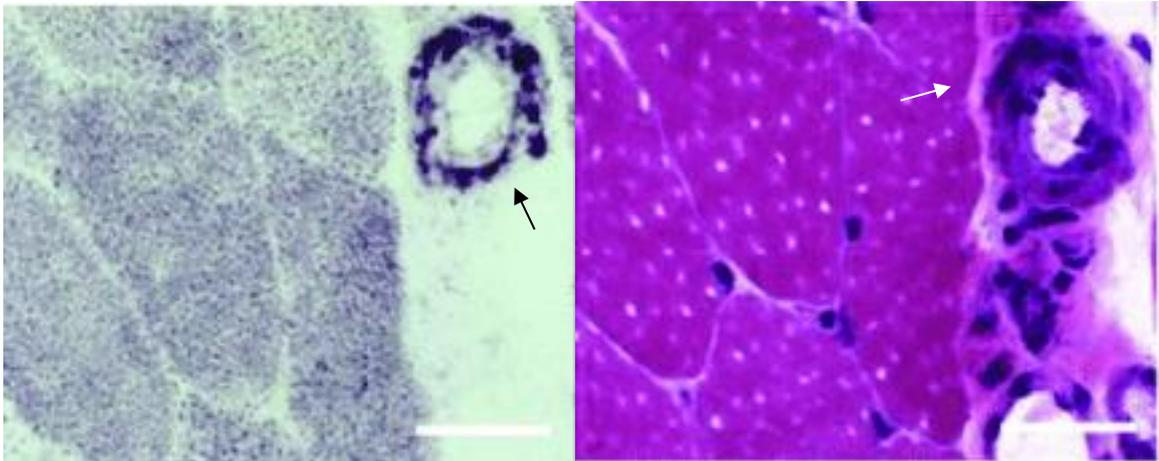
FIGURA 3 - Análise histopatológica com coloração de tricrômico de gomori modificado evidenciando, através das setas, fibras musculares que apresentam acúmulo de atividade mitocondrial demonstrada em espessuras irregulares nas bordas com coloração avermelhada, as conhecidas fibras vermelhas rasgadas (RRF):



Fonte: Anatpat-UNICAMP [internet]. [18]

Vasos sanguíneos fortemente reativos a succinato desidrogenase (SSV) também são observados em biópsia no quadro clínico da síndrome de MELAS indicando a presença de mitocôndrias em níveis elevados, na análise histopatológica é possível visualizar uma forte coloração com granulações nas paredes dos vasos sanguíneos e esse evento é descrito como uma das possíveis causas dos episódios semelhantes ao AVC devido ao dano endotelial e oclusão de pequenos vasos cerebrais (figura 4).<sup>[5]</sup>

FIGURA 4 – SSV visualizada através de fortes granulações arroxeadas nas paredes dos vasos sanguíneos (identificado por setas), análise histopatológica através de coloração SDH e HE respectivamente:

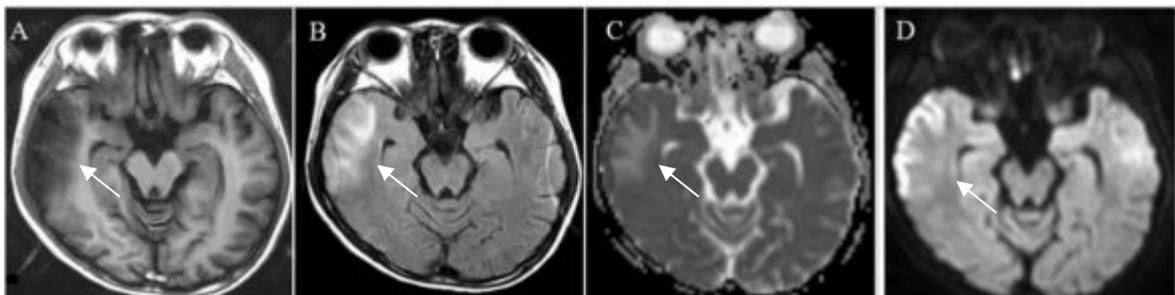


Fonte: Lorenzoni PJ, Scola RH, Kay CSK, Arndt RC, Freund AA, Bruck I [2009] [19]

### Diagnóstico por Imagem

Os exames de imagem são de extrema importância para o diagnóstico da síndrome de MELAS, através de exames de RM e TC do encéfalo é possível observar achados clínicos que indicam os episódios semelhantes ao AVC isquêmicos e comprometimento tecidual ocasionado por encefalopatias, apresentando zonas com lesões corticais, necrose em áreas focais, calcificações dos gânglios da base, perda de volume e edemas (figura 5) provenientes destes eventos de importância clínica.<sup>[7]</sup>

FIGURA 5 – RM de encéfalo em corte axial apresentando por meio de setas brancas zonas hipodensas e hiperdensas (a depender do método utilizado) que evidenciam espessamento (edema) do córtex do lobo temporal direito na área de infarto (episódio semelhante ao AVC). A refere imagem de T1, B refere imagem FLAIR, C e D referem imagem DWI:



Fonte: Fan HC, Lee HF, Yue CT, Chi CS [2021] [20]

## **Métodos moleculares**

Destacam-se para diagnóstico de mutações pontuais para o mtDNA os testes de reação em cadeia da polimerase (PCR) e polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP), seguidos de sequenciamento direto.<sup>[19]</sup> A amostra utilizada para esse tipo de análise provém da biópsia muscular e a técnica utilizada para extrair o mtDNA da amostra pode ser realizada através de fenol-clorofórmio, o método de PCR/RFLP é realizado primeiramente em forma de triagem para identificação de mutações pontuais onde serão utilizados primers de oligonucleotídeos que mimetizam a região codificadora do tRNA-UUA afetado, dando início a síntese de novos fragmentos de fitas dessa mesma região.<sup>[19]</sup> Ciclos de desnaturação, anelamento e extensão são realizados durante um determinado intervalo de tempo e temperatura, após a obtenção dos fragmentos recém-sintetizados pela PCR é realizado a digestão por enzimas endonucleases de restrição específicas, que irão clivar estes fragmentos em locais específicos caso haja a mutação do mtDNA, esses fragmentos clivados possuem determinadas quantidades de pares de base e peso molecular conhecido.<sup>[19]</sup> Após a obtenção do resultado da PCR é utilizado a eletroforese em gel para visualização destes fragmentos, eles irão correr pelo gel e se houve a clivagem dos sítios de restrição específicos, haverá também formação de fragmentos com determinadas quantidades de pares de bases, bandas serão formadas no gel a mesma altura do peso molecular previamente conhecido para a mutação do mtDNA que está sendo investigada, resultando em afetado para essa mutação.<sup>[19]</sup>

É necessário a realização do sequenciamento direto para confirmação da presença de mutação no mtDNA onde o resultado desse método trará a sequência de pares de bases do mtDNA do paciente, evidenciando ou não a mutação.<sup>[19]</sup>

## **TRATAMENTOS ASSOCIADOS AO PROGNÓSTICO DA SÍNDROME DE MELAS**

De forma geral os tratamentos disponíveis associados a síndrome de MELAS consistem em aliviar suas complicações, entretanto não evitam a progressão da doença e faz-se importante ressaltar que não há cura para a síndrome de MELAS até o momento.<sup>[5]</sup>

Por se tratar de uma doença acompanhada pela diversidade de fenótipos a depender do tipo de mutação e do nível de heteroplasmia do paciente, o tratamento seguirá de acordo com os quadros que serão apresentados para cada indivíduo acometido e esse deverá ser acompanhado pelo médico geneticista durante toda sua vida.<sup>[5]</sup> Algumas terapias medicamentosas, acompanhado da prática de exercícios físicos, são comumente utilizadas para portadores da síndrome de MELAS para finalidade paliativa (tabela 1).<sup>[5]</sup>

TABELA 1 – Terapias medicamentosas utilizadas para acompanhamento da síndrome de MELAS:

<b>Medicamento</b>	<b>indicações terapêuticas</b>
<b>Coenzima Q10</b> <b>Edaravona</b>	Terapia antioxidante
<b>Idebenona</b>	Transtornos neurológicos e cognitivos Distúrbios vasculares cerebrais
<b>L-arginina</b>	Regulação do metabolismo energético
<b>L-carnitina</b>	Geração de energia e disposição no organismo
<b>Vitaminas do complexo B</b> <b>Vitamina C</b> <b>Vitamina E</b>	Suplemento vitamínico e antioxidante (vitamina E)

Fonte: Lorenzoni PJ, Werneck LC, Kay CSK, Silvado CES, Scola RH [2015].<sup>[5]</sup>

O manejo da síndrome de MELAS deve incluir também terapias adicionais para os sintomas subjacentes que forem apresentados como desenvolvimento de DM (controle de dieta, agentes hiperglicemiantes e até mesmo terapia com insulina), crises convulsivas (adição de medicamentos anticonvulsivos), cardiopatias (tratamento devidamente adequado para o quadro) cefaleia (adição de medicamentos analgésicos) e antipsicóticos/sedativos caso apresente quadros psíquicos.<sup>[5]</sup> O aconselhamento genético é fortemente indicado para os pacientes, principalmente mulheres em idade fértil pois existe o risco de transferência do gene mutante para sua prole.<sup>[5]</sup>

Um estudo publicado pela Oxford University Press utilizou de tecnologia do DNA recombinante para sintetizar tRNA de leucina por meio da expressão alotópica de RNAs mitocondriais, ou seja, o gene que expressa o tRNA–UUA nas mitocôndrias foi expressado pelo nDNA e transferido para as mitocôndrias posteriormente, a fim de reduzir os impactos ocasionados pelo mtDNA mutante na síntese de proteínas que participam da OXPHOS.<sup>[6]</sup> Esse estudo contou com a utilização do tRNA de lisina de leveduras para recombinação em tRNA de leucina, esses tRNAs modificados foram transferidos para células híbridas afetadas pela mutação do mtDNA em modelo *in vivo* através de um vetor de transfecção, os resultados deste estudo demonstraram sucesso tanto na expressão do gene e síntese do tRNA capaz de transportar a leucina, quanto na transferência deste tRNA para as mitocôndrias, entretanto foram necessárias novas doses de transfecções para manter os níveis destes tRNAs significativos no modelo *in vivo*.<sup>[6]</sup> Outro ponto importante destacado no estudo foi a identificação de aumento dos níveis de COX, ou seja, o complexo IV foi consideravelmente beneficiado e houve a redução dos efeitos da mutação, o estudo concluiu que a abordagem da técnica de expressão alotópica de RNAs mitocondriais pode ser uma ferramenta de sucesso para tratamento de doenças ocasionadas pela mutação do mtDNA que afete a tradução de tRNA em nível mitocondrial, especialmente a síndrome de MELAS.<sup>[6]</sup>

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A síndrome de MELAS é caracterizada por um quadro clínico multiforme, característica essa que explica a dificuldade de seu diagnóstico pois durante os primeiros anos de vida é facilmente confundida com outras condições patológicas. Durante a produção deste artigo foi possível constatar a baixa quantidade de conteúdos científicos disponíveis nas bibliografias acerca do tema, as literaturas que citam a doença possuem poucas informações sobre um quadro tão extenso com inúmeras alterações importantes. Alguns de seus sintomas como os episódios semelhantes ao AVC isquêmico não possuem sua origem totalmente elucidada, o que dificulta o entendimento da doença, bem como seu diagnóstico precoce. Dado exposto a problemática, concluímos necessária a abordagem da síndrome de MELAS neste artigo com o objetivo de alimentar a base pré-existente sobre a doença, é cabível também alertar sobre a importância do desenvolvimento de mais pesquisas e trabalhos acerca do tema, principalmente sobre os tratamentos disponíveis e relatos de casos, visando estimular, através da disseminação de conhecimento confiável, que profissionais do âmbito pediátrico, clínico e genético estejam aptos a direcionar o paciente ao diagnóstico preciso e precoce da doença, iniciando o tratamento adequado que possibilite um bom prognóstico, a fim de beneficiar sua qualidade e expectativa de vida. É necessário também frisar a importância do encaminhamento ao aconselhamento genético para os pacientes e familiares que lidam com essa síndrome.

## REFERÊNCIAS

1. Junqueira LCU, Carneiro J. Biologia celular e molecular. Rio De Janeiro: Guanabara Koogan; 2015.
2. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. Thompson & Thompson genética médica. Rio De Janeiro: Elsevier; 2008.
3. Alberts B. Biologia molecular da célula. Porto Alegre: ArtMed: 2017.
4. Pasternak JJ, Ida Cristina Gubert. Genética molecular humana: mecanismos das doenças hereditárias. Barueri: Editora Manole; 2002.
5. Lorenzoni PJ, Werneck LC, Kay CSK, Silvado CES, Scola RH. When should MELAS (Mitochondrial myopathy, Encephalopathy, Lactic Acidosis, and Stroke-like episodes) be the diagnosis? Arquivos De Neuro-Psiquiatria. 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26517220>
6. Karicheva OZ, Kolesnikova OA, Schirtz T, Vysokikh MY, Mager-Heckel AM, Lombès A, et al. Correction of the consequences of mitochondrial 3243A>G mutation in the MT-TL1 gene causing the MELAS syndrome by tRNA import into mitochondria. Nucleic Acids Research. 2011 Oct 1;39(18):8173–86. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21724600/>

7. Betts J, Jaros E, Perry RH, Schaefer AM, Taylor RW, Abdel-All Z, et al. Molecular neuropathology of MELAS: level of heteroplasmy in individual neurones and evidence of extensive vascular involvement. *Neuropathology and Applied Neurobiology*. 2006 Aug 1; 32(4):359–73. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16866982/>
8. Taiz L, Zeiger E. *Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal*. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. 820 p.
9. Luchesi KF, Soares AS, Silva EAA dos S, Melo JP, Trilha R. Evolução da disfagia em um caso de síndrome MELAS: o olhar dos cuidados paliativos. *Audiol, Commun res*. 2018. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-983917>
10. Baek MS, Kim SH, Lee YM. The Usefulness of Muscle Biopsy in Initial Diagnostic Evaluation of Mitochondrial Encephalomyopathy, Lactic Acidosis, and Stroke-Like Episodes. *Yonsei Medical Journal*. 2019 Jan 1; 60(1):98–105. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6298893/>
11. Hall JE, Guyton AC. *Tratado de fisiologia médica*. 13ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2017.
12. Nelson DL, Cox MM. *Leningher Princípios de Bioquímica*. 6ª ed. Porto Alegre, ArtMed; 2014.
13. Bhatia KD, Krishnan P, Kortman H, Klostranec J, Krings T. Acute Cortical Lesions in MELAS Syndrome: Anatomic Distribution, Symmetry, and Evolution. *American Journal of Neuroradiology*. 2019 Dec 5;41(1):167–73.
14. Cai SS, von Coelln R, Kouo TJ. Migratory stroke-like lesions in a case of adult-onset mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes (MELAS) syndrome and a review of imaging findings. *Radiology Case Reports*. 2016 Dec;11(4):425–9.
15. El-Hattab AW, Adesina AM, Jones J, Scaglia F. MELAS syndrome: Clinical manifestations, pathogenesis, and treatment options. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2015 Sep;116(1-2):4–12.
16. Henry JB, Gubert IC. *Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais*. 21º ed. Barueri, Manole; 2012.
17. Graça CR, Kouyoumdjian JA, Marie SKN. Biópsia muscular com estudo histoquímico: experiência inicial da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto. *Arq ciênc. saúde*. 2008;24–8. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-516790>
18. Anatpat-Unicamp [Internet]. anatpat.unicamp.br. Disponível em: <https://anatpat.unicamp.br/musmiopmitoc.html#:~:text=As%20fibras%20com%20borda%20vermelha>
19. Lorenzoni PJ, Scola RH, Kay CSK, Arndt RC, Freund AA, Bruck I, et al. MELAS: clinical features, muscle biopsy and molecular genetics. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*. 2009 Sep;67(3a):668–76.
20. Fan HC, Lee HF, Yue CT, Chi CS. Clinical Characteristics of Mitochondrial Encephalomyopathy, Lactic Acidosis, and Stroke-like Episodes. *Life*. 2021 Oct 20;11(11):1111.

## CONTATO

Beatriz Cruz de Souza: bea.cruzs98@gmail.com

# Uso da biologia molecular nas ciência forense

## Use of molecular biology in forensic science

Maria Lucia Sala<sup>a</sup>, Erik Cendel Saenz Tejada<sup>b</sup>

a: Graduada em Biomedicina no Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas – FMU, Brasil

b: Biólogo, Universidad Nacional Federico Villareal/Peru, Doutor em Bioquímica Instituto de Química da USP, Brasil

### RESUMO

As ferramentas de biologia molecular aumentaram a capacidade do cientista forense de caracterizar evidências biológicas a ponto de ser possível analisar amostras minúsculas e atingir altos níveis de individualização. Neste estudo de caso, descreveu-se as principais evidências biológicas forenses que estão sendo ou provavelmente serão preenchidas por ferramentas de biologia molecular. Os dados coletados do estudo apontam resultados como as lacunas de conhecimento e novas direções foram identificadas onde a biologia molecular provavelmente guiará o campo da ciência forense. Identificamos algumas dessas áreas onde é necessário mais desenvolvimento: melhorar os limites atuais de tipagem de amostras de baixa quantidade e qualidade; melhorar a eficiência da recuperação e extração de amostras; converter STRs atuais em mini-STRs; selecionar e validar novos mini-STRs; selecionar e validar uma variedade de SNPs para diferentes aplicações; intensificação da multiplexação; desenvolvimento de automação para alto rendimento; desenvolvimento de sistemas especialistas para interpretação de dados; desenvolver capacidades de sequenciamento para triagem de genomas de microrganismos; e testes de campo. Concluimos que o futuro da biologia molecular para a ciência forense é empolgante e dinâmico. Ainda há muito a ser conquistado e os desenvolvimentos da biologia molecular serão essenciais para auxiliar na resolução de crimes e na identificação de desaparecidos.

**Descritores:** ciência forense, biologia molecular, perícia microbiana

### ABSTRACT

Molecular biology tools have increased the forensic scientist's ability to characterize biological evidence to the point where it is possible to analyze tiny samples and achieve high levels of individualization. In this case study, we describe key forensic biological evidence that is being or is likely to be filled in by molecular biology tools. Data collected from the study point to results such as knowledge gaps and new directions were identified where molecular biology is likely to guide the field of forensic science. We identified some of these areas where further development is needed: improving current typing limits for low quantity and quality samples; improve the efficiency of sample recovery and extraction; convert current STRs into mini-STRs; select and validate new mini-STRs; select and validate a variety of SNPs for different applications; multiplexing enhancement; development of automation for high throughput; development of expert systems for data interpretation; develop sequencing capabilities for screening microorganisms genomes; and field tests. We conclude that the future of molecular biology for forensic science is exciting and dynamic. There is still much to be achieved and the developments in molecular biology will be essential to help solve crimes and identify missing people.

**Descriptors:** forensic science, molecular biology, microbial expertise

## INTRODUÇÃO

A ciência forense adotou o uso de ferramentas de biologia molecular de DNA para fins de diagnóstico mais do que qualquer outro campo científico. A disciplina foi impulsionada pela necessidade de técnicas de teste de identidade humana de alta resolução. Nos últimos 20 a 25 anos, a ciência forense desenvolveu e implementou várias tecnologias robustas e confiáveis de tipagem de DNA<sup>1-2</sup>.

Os sucessos permitiram a tipagem confiável de quantidades extremamente mínimas de DNA, com um poder de resolução tal que, em muitos casos, o número de contribuintes de amostras de evidências pode ser reduzido a alguns indivíduos, se não apenas uma fonte. Além disso, as ferramentas de biologia molecular forense são muito confiáveis devido aos requisitos de validação bem definidos<sup>3-4</sup>.

Dada a maturidade do campo forense, pode-se supor que mudanças drásticas na tecnologia não serão buscadas e apenas refinamentos serão adotados. Há menos demandas a serem atendidas tecnologicamente; na verdade, a capacidade de digitar rotineiramente amostras como uma bituca de cigarro ou um único fio de cabelo excedeu as expectativas da maioria dos cientistas que começaram a usar ferramentas de biologia molecular para caracterizar evidências biológicas forenses<sup>3-4</sup>.

Em vez de usar a análise de polimorfismo de comprimento de restrição por métodos de hibridização baseados em Southern blot, os cientistas no campo agora estão usando rotineiramente métodos baseados em PCR juntamente com tecnologias automatizadas de detecção fluorescente<sup>5</sup>. O uso de bancos de dados de amostras de DNA ofensivo e forense contribui para a relutância em mudar. Esses bancos de dados foram desenvolvidos para ajudar a investigar crimes futuros e foram padronizados em um conjunto básico de loci de repetição em tandem curta (STR) ou loci de microssatélites<sup>5-6</sup>.

Devido ao tamanho desses bancos de dados [por exemplo, há mais de 6 milhões de perfis de referência no banco de dados do Sistema de Índice de DNA combinado (CODIS) dos Estados Unidos, há um movimento substancial para manter apenas o repertório atual de marcadores genéticos centrais<sup>6</sup>. Além disso, devido ao gasto substancial de recursos para validar sistemas analíticos de biologia molecular, para equipar um laboratório e para educar e formar profissionais proficientes; assim como os esforços empreendidos para obter admissibilidade no tribunal, os cientistas forenses tendem a não mudar rapidamente as metodologias sólidas<sup>7</sup>.

Pode-se prever, portanto, que provavelmente não haverá mudanças dramáticas nas ferramentas de biologia molecular usadas na ciência forense. Tal visão, no entanto, seria míope porque existem várias áreas onde a biologia molecular poderia oferecer melhorias para

as capacidades do cientista forense. De fato, cabe ao cientista forense estar vigilante e adotar novas tecnologias que beneficiem a sociedade por sua capacidade de analisar amostras mais desafiadoras em um esforço para continuar a inocentar inocentes, aprimorar as habilidades para solucionar crimes e identificar pessoas desaparecidas <sup>7</sup>.

Com o sucesso da análise, há motivação para tentar analisar amostras mais difíceis, como amostras de traços denominadas DNA de toque ou baixo número de cópias (LCN). Os bancos de dados de DNA podem não ter sido totalmente explorados e podem fornecer pistas para novas questões investigativas. Além disso, o campo recentemente desenvolvido de análise forense microbiana explorará tecnologias de alta resolução e alto rendimento além daquelas necessárias para a identificação humana <sup>8</sup>.

Portanto, o futuro da biologia molecular na ciência forense ainda promete ser dinâmico. Prever o futuro nunca é exato e as tecnologias de salto fundamentais não são óbvias. Trinta anos atrás, poucos teriam previsto o método de PCR e o impacto que teve na biologia molecular <sup>8</sup>.

Neste estudo descreveu-se as principais evidências biológicas forenses que estão sendo ou provavelmente serão preenchidas por ferramentas de biologia molecular.

## **MÉTODO**

O método utilizado descreve as principais evidências biológicas forenses com base em artigos relacionados ao tema. Sendo utilizado para pesquisa no idioma inglês, foram também utilizados unitermos como Ciência forense, Biologia molecular, Perícia microbiana. Os critérios de inclusão para a seleção de artigos científicos foram: título, resumo, desenvolvimento, análise forense microbiana e sequenciamento de alto rendimento, automação e teste de campo, com preferência para datas recentes.

## **DESENVOLVIMENTO**

### **Análise forense microbiana e sequenciamento de alto rendimento**

A ameaça do uso terrorista ou criminoso de microrganismos e suas toxinas é uma grande preocupação para a biodefesa e a biossegurança em todo o mundo (64,65). O ataque de cartas com antraz de 2001 demonstrou a vulnerabilidade do público a tais ataques e a incapacidade do governo dos EUA de investigar forensemente as evidências para fins de atribuição <sup>9</sup>.

Isso resultou no nascimento do campo da perícia microbiana. A análise forense microbiana é uma subdisciplina em evolução da ciência forense para analisar evidências de um ato de bioterrorismo, biocrime, fraude ou uma liberação inadvertida para fins de atribuição <sup>9</sup>.

De muitas maneiras, a perícia microbiana não é um campo novo; suas bases e práticas são derivadas de abordagens semelhantes estabelecidas em saúde pública e epidemiologia. A diferença entre forense microbiana e epidemiologia é que a primeira deseja individualizar ainda mais uma amostra. No entanto, as análises forenses microbianas devem abranger o manuseio de amostras, coleta, preservação, seleção de métodos, análise de casos, interpretação de resultados, validação e garantia de qualidade <sup>10</sup>.

Genética molecular, genômica e informática serão centrais para identificação de espécies/estirpes, determinação de virulência, caracterização de patogenicidade e atribuição de fonte. O máximo em atribuição de fonte é ser capaz de individualizar uma amostra de forma que ela possa ser rastreada até uma fonte única. Isso é improvável com os recursos atuais e pode não ser possível em muitos casos devido à natureza das amostras microbiológicas. As investigações epidemiológicas tendem a se concentrar na resolução de espécies e níveis de cepas, que são informações úteis para uma investigação forense microbiana <sup>10</sup>.

No entanto, a ciência forense se esforça para individualizar as amostras: para o ataque de letras de antraz, uma técnica de análise de repetição em tandem de número variável multi-locus (VNTR) foi usada para identificar a bactéria *Bacillus anthracis* como aquela da cepa Ames. Embora os dados da cepa tenham direcionado adequadamente a investigação para fontes laboratoriais, a diferenciação de amostras de laboratório estreitamente relacionadas da mesma cepa foi muito mais desafiadora. Para casos futuros, a tecnologia é necessária para facilitar a identificação desses SNPs únicos, duplicações, exclusões, inserções ou rearranjos – se existirem, que individualizarão melhor as amostras e ajudarão a focar uma investigação<sup>11</sup>.

Ao contrário da identificação humana, onde um conjunto central padronizado de loci pode ser usado para diferenciar indivíduos, o(s) marcador(es) microbiano(s) forense(s) para individualização será(ão) desconhecido(s) e específico(s) do caso. O sequenciamento de todo o genoma é o método preferido para descobrir a variação genética de valor forense <sup>11-12</sup>.

A abordagem mais eficaz para a descoberta abrangente de variação genética, que foi usada nas investigações de cartas de antraz <sup>12</sup>, foi por sequenciamento shotgun de alto rendimento explorando o sequenciamento de Sanger <sup>13</sup>. Embora considerado o padrão ouro da tecnologia de sequenciamento, esse método é trabalhoso, caro, tem cobertura relativamente baixa e apresenta problemas de viés de amostra. Se o resequenciamento de todo o genoma fosse desejado para um repositório de amostras (de algumas a milhares), o custo seria proibitivo. Portanto, são necessários avanços na tecnologia de sequenciamento que aumentem a precisão e a velocidade, reduzam os custos e maximizem a eficiência da análise forense. O resequenciamento de hibridização [como a tecnologia de chip desenvolvida pela Affymetrix

(Santa Clara, CA, EUA)] permite que um número extremamente grande de sondagens seja realizado simultaneamente e forneceria resultados rápidos para a digitação <sup>14</sup>.

Mas, a tecnologia de chip de hibridização pode não ter a sensibilidade de detecção necessária para aplicações forenses. A espectrometria de massa com ionização por dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF), que explora a massa absoluta de uma molécula de ácido nucleico como uma propriedade intrínseca, oferece vantagens sobre as abordagens de hibridização e eletroforese: MALDI-TOF não é sujeito aos caprichos de anomalias eletroforéticas e estrutura secundária de DNA, e não requer moléculas de marcação para detecção. No entanto, não pode ser usado para sequenciar genomas inteiros <sup>15</sup>.

No entanto, as abordagens de molécula única podem ter problemas de amostragem que precisarão ser abordados e as tecnologias atuais, estando mais na fase de prova de conceito, estão longe de serem robustas. É difícil prever quais tecnologias serão selecionadas para análise forense microbiana, mas o sequenciamento de baixo custo, alta cobertura, baixo erro e alto rendimento de genomas de microrganismos inteiros será uma necessidade para apoiar o desenvolvimento dos ensaios de atribuição forense microbiana mais eficazes <sup>15</sup>.

## **Automação**

As demandas de geração, entrada e manutenção de perfis de DNA em um banco de dados nacional de DNA impulsionaram o desenvolvimento da automação. O número de amostras de referência de criminosos condenados, detidos e pessoas desaparecidas continua a aumentar, e a carga é tal que essas amostras não podem continuar a ser digitadas e revisadas manualmente. Robótica e produtos químicos modificados mais adequados para processos automatizados foram desenvolvidos para aumentar o rendimento e os esforços continuarão a melhorar a eficiência da automação <sup>16-17</sup>.

A automação oferece controle de qualidade, resultados consistentes e gerenciamento de dados com menores custos operacionais. Ao remover o componente humano do processo, os resultados tendem a ser mais consistentes e de alta qualidade. O erro é reduzido principalmente ao minimizar a chance de troca de amostra e contaminação residual. Os desenvolvimentos de software permitem o rastreamento do manuseio de amostras ao longo do processo. Volumes de reagentes mais baixos se traduzem em menos consumíveis e menos desperdício. A maior parte da automação concentrou-se na extração de DNA de amostras de referência padrão e algumas estenderam a aplicação a amostras de casos como ossos, cabelos, dentes, pontas de cigarro e esperma. As plataformas robóticas variam e incluem a estação de trabalho robótica Tecan Genesis RSP 150/8 e as estações de manuseio

de líquidos *Tecan Freedom EVO* (Tecan, *Mannedorf*, Suíça), a estação de trabalho de automação *Biomek 2000* (*Beckman Coulter*, *Fullerton*, CA, EUA), o *Plato 3000* sistema robótico (*Rosys/Anthos AG*, *Hombrechtikon*, Suíça) e a estação de trabalho *BioRobot EZ1 System* e *BioRobot 8000* (*Qiagen*, *Dusseldorf*, Alemanha), para citar alguns <sup>16-18</sup>.

O desenvolvimento e implementação de estações de trabalho robóticas requerem químicas alternativas para extração. Algumas partes de uma extração manual não são facilmente acomodadas por um sistema robótico, como extração por solvente orgânico, centrifugação e fervura. Químicas de extração em fase sólida, como o *DNA IQ* (*Promega*, *Madison*, WI, EUA) (92) e o *Qiagen EZ1*, *QIAasympyphony Investigator Kit* e *QIAamp Investigator BioRobot Kit* (*Qiagen*) foram adotados para facilitar a automação da extração <sup>16-19-20</sup>.

É importante quantificar o DNA e normalizar a quantidade que é usada na PCR para obter resultados de tipagem mais consistentes. *Greenspoon e cols* <sup>19</sup> usaram a mesma plataforma robótica (a estação de trabalho de automação *Biomek 2000*) para extração, quantificação de DNA e configuração de PCR, automatizando três partes do processo antes da etapa de PCR. Além disso, os extratos de DNA restantes são transferidos diretamente para tubos de armazenamento para arquivamento de longo prazo. A automação foi e continuará a ser desenvolvida para os protocolos encontrados no laboratório forense. No entanto, esses sistemas robóticos são abordagens de macroescala que ainda precisam capitalizar os benefícios potenciais das tecnologias de microescala (consulte a seção “Testes de campo”). A análise forense do DNA mitocondrial (mtDNA) geralmente fornece resultados para amostras em que as análises de marcadores autossômicos nucleares são difíceis ou impossíveis (como ossos velhos, dentes e fios de cabelo) <sup>7</sup>.

A tipagem geralmente envolve a amplificação por PCR de duas regiões curtas do mtDNA chamadas regiões hipervariáveis 1 e 2 (HV1 e HV2), seguidas pelo sequenciamento direto dos produtos de PCR pelo sequenciamento de Sanger. Este processo é trabalhoso, demorado e caro. Além disso, a análise de dados pode ser confundida por artefatos de sequência, anomalias eletroforéticas, presença de heteroplasmia (ou seja, a presença de mais de uma variante do genoma mitocondrial em um indivíduo) e capacidade limitada de quantificar os componentes de uma amostra mista. Recentemente, a PCR multiplex seguida por espectrometria de massa de tempo de voo com ionização por eletrospray (ESI-TOF-MS) demonstrou ser aplicável para tipagem das regiões hipervariáveis do mtDNA humano, expandindo o potencial de discriminação de um ensaio além do direcionamento específico de SNP <sup>21</sup>.

Além disso, amostras heteroplásmicas podem ser analisadas e a quantidade relativa dos componentes de amostras mistas pode ser determinada (Figura 2). O *T5000 Biosensor* (*Ibis*

*Biosciences Inc., Carlsbad, CA, EUA*) combina estações de trabalho robóticas para PCR e limpeza de amostras (ou seja, dessalinização) com espectrometria de massa, de modo que a tipagem de mtDNA pode ser realizada com pelo menos 10 vezes aumento no rendimento e uma redução de 5 vezes no custo do reagente, sem perda de sensibilidade e pouca ou nenhuma perda de informação em comparação com o sequenciamento tradicional. Esta plataforma é promissora para acomodar facilmente outros ensaios de marcadores genéticos<sup>22</sup>.

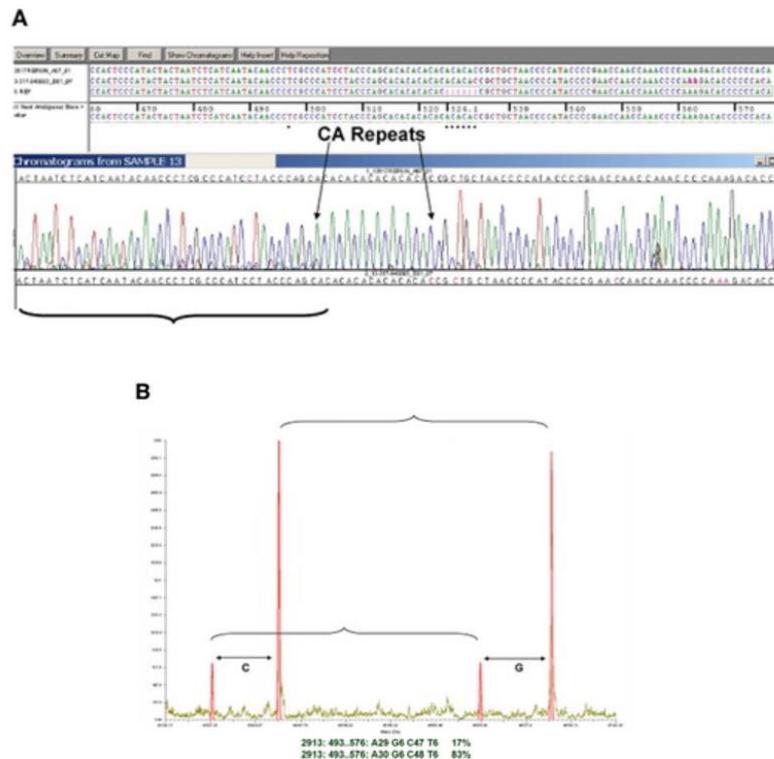


Figura 2. Uma sequência direta por sequenciamento de Sanger exibindo a fita reversa das duas fitas do amplicon de DNA mitocondrial

(A) A região hipervariável 3 da região não codificante do genoma mitocondrial humano contém uma região de repetição de dinucleotídeo CA. A heteroplasma, provavelmente devido ao deslizamento, é o resultado de duas espécies de DNA mitocondrial que diferem no número de repetições CA. A sequência a jusante da região heteroplásmica CA não é interpretável (colchete) para o componente menor. (B) A análise baseada em espectrometria de massa do amplicon detecta ambas as espécies que diferem por uma repetição CA e pode medir com precisão e simultaneamente a abundância relativa dos componentes. A composição de base e as quantidades relativas para ambas as espécies são exibidas. Figura gentilmente cedida por L. McCurdy, FBI Laboratory, Quantico, VA, EUA.

### Teste de Campo

Existe algum interesse na capacidade de realizar diagnósticos de DNA na cena do crime. Para a forense microbiana e saúde pública, a necessidade é fundamental para poder determinar a presença de microrganismos que são prejudiciais aos seres humanos. Uma cena de biocrime exige que os investigadores usem equipamentos de proteção, dificultando o trabalho por períodos prolongados. Se a cena puder ser determinada primeiro como segura (como no caso

de uma farsa, por exemplo), esse requisito oneroso para coleta de amostras pode ser omitido. A instrumentação para detecção de patógenos deve ser portátil, não apenas transportável. A capacidade de diagnóstico deve ter um alto grau de sensibilidade de detecção e ser capaz de detectar uma ampla gama de patógenos nocivos conhecidos, bem como os genes que conferem patogenicidade, caso a engenharia genética tenha sido usada para modificar um microrganismo inofensivo. A microfluídica é atraente porque permite que as análises de biologia molecular sejam realizadas em plataformas miniaturizadas que integram todos os aspectos da análise, desde a preparação da amostra até a tipagem do ácido nucleico [por exemplo, o conceito *lab-on a chip*] <sup>23-24</sup>.

Os benefícios potenciais adicionais da microfluídica incluem consumo reduzido de amostras e reagentes (diminuindo o custo), menos desperdício, melhor termodinâmica durante a PCR (que possivelmente poderia reduzir os efeitos estocásticos com modelo limitado) e menos contaminação (sendo um sistema fechado integrado). É concebível que a taxa de transferência aumentaria diminuindo o tempo de análise e explorando o processamento paralelo. Os analistas também seriam liberados de alguns processos manuais que ainda estão sobrecarregados com manipulações macrofluídicas. O desenvolvimento nesta área é exemplificado pelos esforços de pesquisa no laboratório Landers (Universidade de Virgínia, Charlottesville, VA, EUA), que demonstrou que uma ampla gama de amostras e até extração diferencial (ou seja, isolar o DNA do esperma do DNA de outras células tipos) podem ser acomodados em um formato microfluídico. Assim, a macroescala de amostras e a microescala de requisitos de análise de extração podem ser superadas. Além disso, eles desenvolveram um sistema integrado que permite que todo o processo, desde a extração da amostra até a eletroforese, seja realizado nele <sup>23-24-25-26</sup> (Figura 3).

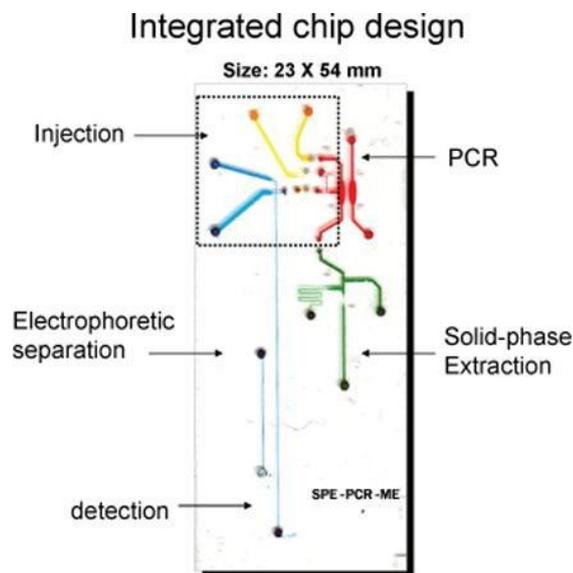


Figura 3. Projeto de um chip integrado para todo o processo de análise de DNA

Existem defensores de um dispositivo microfluídico de teste de campo portátil para realizar a digitação de DNA de identificação humana na cena do crime para identificar rapidamente os suspeitos. Presumivelmente, isso seria gerando um perfil e pesquisando imediatamente um banco de dados de DNA para desenvolver uma pista investigativa. Certamente não seria usado para eliminar suspeitos remanescentes: mesmo que o perpetrador permanecesse na cena do crime, a obtenção de uma amostra de referência exigiria causa provável e, portanto, não é passível de resposta rápida. Uma preocupação significativa seria a possível contaminação de evidências por amostras de referência em um ambiente controlado abaixo do ideal <sup>25</sup>.

A cena do crime é um ambiente caótico e é importante o controle da cena, e esforços devem ser direcionados para a coleta adequada de evidências e para minimizar sua contaminação. Se a tipagem de DNA fosse realizada na cena do crime, profissionais qualificados teriam que ser mobilizados, uma vez que é necessária perícia para tipagem de DNA e interpretação dos perfis de DNA gerados. Essa implantação reduziria o rendimento de um laboratório já lotado: os cientistas estariam ocupados indo e voltando das cenas do crime e só poderiam trabalhar em um caso por vez, e não haveria pessoal qualificado suficiente para analisar o DNA em várias cenas de crime simultâneas. Uma solução é que os cientistas permaneçam remotos e os perfis sejam transmitidos eletronicamente <sup>25</sup>.

Esta abordagem ainda não aborda a necessidade de profissionais devidamente treinados para processar as amostras e realizar a parte analítica do ensaio. Novamente, a preparação da amostra inicial é talvez o maior obstáculo a ser superado, uma vez que as amostras da cena do crime se apresentam de inúmeras maneiras e essas macro amostras podem não ser prontamente passíveis de processamento microfluídico <sup>24-26</sup>.

No entanto, um microdispositivo pode ser útil na cena do crime para coleta e armazenamento de amostras. Raramente o tempo para mover uma amostra da cena do crime para o laboratório é um impedimento. No entanto, o atendimento continua a aumentar enquanto a mão de obra não, concomitantemente. Os sistemas automatizados totalmente integrados prometem aumentar o rendimento, liberando o analista de vários aspectos manuais do processo para que ele possa se concentrar em outros processos mais exigentes. A automação é essencial para atender à crescente demanda por análise de casos e para gerar e inserir amostras em bancos de dados nacionais de DNA <sup>24-26</sup>.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como as lacunas de conhecimento e novas direções foram identificadas onde a biologia molecular provavelmente guiará o campo da ciência forense. Identificamos algumas dessas áreas onde é necessário mais desenvolvimento: melhorar os limites atuais de tipagem de amostras de baixa quantidade e qualidade; melhorar a eficiência da recuperação e extração de amostras; converter STRs atuais em mini-STRs; selecionar e validar novos mini-STRs<sup>7</sup>; selecionar e validar uma variedade de SNPs para diferentes aplicações; intensificação da multiplexação; desenvolvimento de automação para alto rendimento; desenvolvimento de sistemas especialistas para interpretação de dados; desenvolver capacidades de sequenciamento para triagem de genomas de microrganismos; e testes de campo.

Concluimos que o futuro da biologia molecular para a ciência forense é empolgante e dinâmico. Ainda há muito a ser conquistado e os desenvolvimentos da biologia molecular serão essenciais para auxiliar na resolução de crimes e na identificação de desaparecidos.

## REFERÊNCIAS

1. Budowle B, Eisenberg A.J. Forensic Genetics. Emery and Rimoins Principles and Practice of Medical Genetics, Elsevier, Philadelphia, 5th ed, Vol. 1, p. 501–517, 2016.
2. Budowle B, Van Daal A. Forensically relevant SNP classes. *BioTechniques*, 2016.
3. Budowle B, Deadman HA, Murch RS, Baechtel FS. An introduction to the methods of DNA analysis under investigation in the FBI Laboratory. *Crime Lab. Dig.*, 2010.
4. Budowle B, van Daal A. Extracting evidence from forensic DNA analyses: future molecular biology directions. *Biotechniques*. 2009 .
5. Scientific Working Group on DNA Analysis Methods (SWGDM). Revised Validation Guidelines. *Forensic Sci. Commun*, 2014.
6. Martin PD, Schmitter H, Schneider PM. A brief history of the formation of DNA databases in forensic science within Europe. *Forensic Sci. Int.*, 2014.
7. Budowle B, Allard BMW, Wilson MR, Chakraborty R. Forensics and mitochondrial DNA: applications, debates, and foundations. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, 2015.
8. Findlay IR, Frazier A, Taylor, Urquhart A. Single cell DNA fingerprinting for forensic applications. *Nature*, 2010.
9. Budowle B, Schutzer SE, Einseln A, Kelley LC, Walsh AC, Smith JAL, Marrone BL, Robertson J, Campos J. Building microbial forensics as a response to bioterrorism. *Science*, 2013.
10. Morse S A, Khan AS. Epidemiologic investigation for public health, biodefense, and forensic microbiology, Budowle, and S. Schutzer (Eds.), *Microbial Forensics*, 2014.
11. Budowle B, Johnson MD, Fraser CM, Leighton TJ, Murch RS, Chakraborty R. Genetic analysis and attribution of microbial forensics evidence. *Crit. Rev. Microbiol*, 2014.

12. Read, T D, Peterson SN, Tourasse N, Baillie LW, Paulsen IT, Nelson KE, Tettelin H, Fouts DE, et al. The genome sequence of *Bacillus anthracis* Ames and comparison to closely related bacteria. *Nature*, 2014.
13. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010.
14. Drmanac S, Kita D, Labat I, Hauser B, Schmidt C, Burczak JD, Drmanac R. Accurate sequencing by hybridization for DNA diagnostics and individual genomics. *Nat. Biotechnol.*, 2010.
15. Honisch C, Chen Y, Mortimer C, Arnold C, Schmidt O, van den Boom D, Cantor CR, Shah HN, Gharbia SE. Automated comparative sequence analysis by base-specific cleavage and mass spectrometry for nucleic acid-based microbial typing. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2013.
16. Anslinger K, Bayer B, Rolf B, Keil W, Eisenmenger W. Application of the BioRobot EZ1 in a forensic laboratory. *Leg. Med.*, 2015.
17. Tereba A, Flanagan L, Mandrekar P, Olson R. A new, rapid method to separate sperm and epithelial cells. *Profiles in DNA*, 2013.
18. Parson W, Steinlechner M. Efficient DNA database laboratory strategy for high through-put STR typing of reference samples. *Forensic Sci. Int.*, 2013.
19. Greenspoon SA, Sykes KL, Ban JD, Pollard A, Baisden M, Farr M, Graham N, Collins BL, et al. Automated PCR setup for forensic casework samples using the Normalization Wizard and PCR Setup robotic methods. *Forensic Sci. Int.*, 2014.
20. Hanselle T, Otte M, Schnibbe T, Smythe E, Krieg-Schneider F. Isolation of genomic DNA from buccal swabs for forensic analysis, using fully automated silica-membrane purification technology. *Leg. Med.*, 2013.
21. Hall TA, Budowle B, Jiang Y, Blyn L, Eshoo M, Sannes-Lowery KA, Sampath R, Drader JJ, et al.. Base composition analysis of human mitochondrial DNA using electrospray ionization mass spectrometry: a novel tool for the identification and differentiation of humans. *Anal. Biochem.*, 2014.
22. Ecker DJ, Sampath R, Massire C, Blyn LB, Hall TA, Eshoo MW, Hofstadler SA. Ibis T5000: a universal biosensor approach for microbiology. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2017.
23. Horsman KM, Bienvenue JM, Blasier KR, Landers JP. Forensic DNA analysis on microfluidic devices: a review. *J. Forensic Sci.*, 2016.
24. Easley CJ, Karlinsey JM, Bienvenue JM, Legendre LA, Roper MG, Feldman SH, Hughes MA, Hewlett EL, et al. A fully integrated microfluidic genetic analysis system with sample-in-answer-out capability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2014.
25. Norris JV, Manning K, Linke SJ, Ferrance JP, Landers JP. Expedited, chemically enhanced sperm cell recovery from cotton swabs for rape kit analysis. *J. Forensic Sci.* 2016.
26. Wen J, Legendre LA, Bienvenue JM, Landers JP. Purification of nucleic acids in microfluidic devices. *Anal. Chem.*, 2016.

## CONTATO

Maria Lucia Sala: [luciasala2014@gmail.com](mailto:luciasala2014@gmail.com)

# **Associação com transtornos do espectro autista (TEA) e sua modulação: Polimorfismo do gene MTHFR C677T (rs1801133)**

## **Association with Autism Spectrum Disorders (ASD) and its modulation: Polymorphism of the MTHFR C677T gene (rs1801133)**

Mariane Rocha Stellato<sup>a</sup>, Luciene Stellato Chiaramonte<sup>b</sup>, Rogeria Maria Ventura<sup>c</sup>

a: Graduanda do Curso de Nutrição do Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas – FMU, Brasil

b: Graduanda do Curso de Biomedicina do Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas – FMU, Brasil

c: Bióloga, Profa. Dra. Docente do Curso de Biomedicina do Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas – FMU, Brasil

### **RESUMO**

Estudos sugerem que a hereditariedade e fatores genéticos, ambientais e biomoleculares têm importância na etiologia do TEA. Objetivo: Avaliar relação do gene MTHFR C677T (rs1801133), o transtorno do espectro autista (TEA) e sua possível modulação. Metodologia: levantamento da literatura em bases de dados públicos que abrangem o tópico em análise. Resultados: vários estudos foram conduzidos para examinar a possível associação entre os polimorfismos no gene MTHFR C677T e o risco de TEA, devido a sua relação com a redução da atividade enzimática desse gene. A suplementação de ácido fólico na díade mãe-filho se mostra eficiente tanto na redução do desenvolvimento do transtorno do espectro autista em seus descendentes, quanto na melhora do quadro sintomático e comportamental. Estudos demonstram que mulheres no período pré-gestacional que receberam suplementação de multivitamínicos obtiveram um menor risco de filhos com TEA e crianças/adultos diagnosticados também tiveram efeitos benéficos. Além disso, outros nutrientes envolvidos na síntese do folato com a metionina, como as vitaminas B12, B6, colina e antioxidantes, também devem ser levados em consideração, bem como a dieta materna pré-gestacional. Conclusões: O alelo T é comum na população geral: cerca de 12% são homocigotos (genótipo TT), 50% heterocigotos (CT) e, em algumas populações, pode chegar a 67%. A relação MTHFR C677T (rs1801133) e TEA indicam benefícios da suplementação de ácido fólico, vitaminas do complexo B, A, C e E, bem como uma dieta rica em frutas, vegetais, cereais integrais e gorduras. Considerar também enzimas como CBS (homocisteína), COMT (neurotransmissores), MTRR (folato e metilação) e BHMT (conversão de betaína e homocisteína).

**Descritores:** MTHFR; C677T; transtorno do espectro autista (TEA); suplementação de ácido fólico; hereditariedade; fatores genéticos; suplementação; MTRR; CBS; COMT; BHMT

### **ABSTRACT**

Studies suggest that heredity and genetic, environmental, and biomolecular factors play a role in the etiology of autism spectrum disorder (ASD). Objective: To investigate the relationship between the MTHFR C677T gene (rs1801133), autism spectrum disorder (ASD), and its potential modulation. Methodology: A literature review was conducted using public databases covering the topic under analysis. Results: Several studies have explored the possible association between polymorphisms in the MTHFR C677T gene and the risk of ASD due to its connection with reduced enzymatic activity. Supplementation of folic acid in the mother-child dyad has proven effective in reducing the development of ASD in offspring, as well as improving symptomatic and behavioral outcomes. Studies demonstrate that periconceptional maternal multivitamin supplementation lowers the risk of children with ASD and diagnosed children/adults also experience beneficial effects. Additionally, other nutrients involved in folate synthesis and methionine, such as vitamins B12, B6, choline, and antioxidants, should be taken into consideration, along with the periconceptional maternal diet. Conclusions: The T

allele is common in the general population, with approximately 12% being homozygous (TT genotype), 50% heterozygous (CT), and in some populations, this frequency can reach 67%. The relationship between MTHFR C677T (rs1801133) and ASD indicates the benefits of supplementing with folic acid, B complex vitamins, vitamins A, C, and E, as well as a diet rich in fruits, vegetables, whole grains, and fats. Enzymes like CBS (homocysteine), COMT (neurotransmitters), MTRR (folate and methylation), and BHMT (conversion of betaine and homocysteine) should also be considered.

**Descriptors:** MTHFR; C677T; autism spectrum disorder (ASD); folic acid supplementation; heredity; genetic factors; supplementation; MTRR; CBS; COMT; BHMT

## INTRODUÇÃO

O transtorno do espectro autista (TEA) é um transtorno do desenvolvimento que afeta comunicação, a interação social e o comportamento. O TEA é um espectro, o que implica que não existe uma única forma de manifestação, portanto as pessoas com essa condição podem ter diferentes níveis de habilidades e desafios. Algumas podem precisar de apoio significativo para se comunicar e se relacionar com os outros, enquanto outras podem ser mais independentes. A inteligência e o desempenho cognitivo de pessoas com autismo mostram uma ampla variação, incluindo casos com déficits significativos e outros com um funcionamento notavelmente superior.

O aumento da prevalência do transtorno do espectro autista (TEA) em diferentes grupos populacionais e sua natureza complexa, envolvendo múltiplos fatores, tem representado um desafio significativo para cientistas e profissionais da área da saúde na busca por entender suas origens e possíveis fatores de risco. Entre esses elementos investigados, destaca-se o gene MTHFR C677T, que tem despertado crescente interesse devido à sua possível associação com o desenvolvimento do TEA.

A enzima Metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) desempenha um papel fundamental no processo de conversão da homocisteína em metionina, sendo esta última um cofator essencial na regulação da concentração de homocisteína. Tanto a homocisteína quanto o estresse oxidativo estão correlacionados com diversos distúrbios neuropsiquiátricos, incluindo o autismo. Várias variantes da sequência de DNA (polimorfismos genéticos) estão associadas ao gene MTHFR, sendo a C677T a que mais chama atenção como um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP). O polimorfismo MTHFR C677T tende a diminuir a eficiência na produção de grupos metil, o que pode ter efeitos adversos subsequentes na expressão genética e na eficácia da via metabólica de 1 carbono.

## MÉTODO

O propósito dessa pesquisa foi explorar e mapear a literatura científica disponível sobre os polimorfismos do gene MTHFR C677T, sua relação com o TEA e a possível modulação dessa enzima. Analisamos títulos, resumos e resultados dos artigos. Estudos que não estavam de acordo com o objetivo proposto foram desconsiderados. Aqueles pertinentes ao assunto, foram analisados, independentemente do ano de publicação. Do total de 98 artigos, ao final, 80 compuseram este trabalho. O critério de pesquisa foi a procura de artigos em inglês e português, nessa ordem, registrados na base de dados *Medical Publications – PubMed* (<http://www.pubmed.gov>), *Science Direct* ([www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)), *Scientific Electronic Library Online – SciELO* (<http://www.scielo.org>), *Scientific Acadêmico* (<http://scholar.google.com>), *Springer Nature* (<http://link.springer.com>), *Oxford Academic* (<https://academic.oup.com>), *Nature* (<https://www.nature.com>) , *Oxford Academic*; (<https://academic.oup.com>), *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*; (<https://www.jstage.jst.go.jp/>), *American Journal of Medical Genetics* (<https://onlinelibrary.wiley.com/>), até 18 de julho de 2023.

## DISCUSSÃO

O transtorno do espectro autista (TEA) é caracterizado como um transtorno no diferentes genes, neurodesenvolvimento que promove deficiências na interação e comunicação social recíproca e interesses restritos, bem como comportamentos estereotipados repetitivos.<sup>1,2,3</sup> Leo Kanner e Hans Asperger realizaram as primeiras descrições clínicas do transtorno do espectro autista (TEA) na década de 1940.<sup>4</sup> Kanner observou a presença da “solidão das crianças desde o início da vida” como um traço característico do TEA.

A hereditariedade exerce uma forte influência na etiologia do transtorno do espectro do autismo (TEA)<sup>5</sup>, evidenciada pelo maior risco entre parentes de primeiro grau<sup>6,7</sup> e alta concordância entre gêmeos monozigóticos.<sup>8,9</sup> A arquitetura genética do TEA é complexa, envolvendo polimorfismos raros, como variações no número de cópias, variantes de nucleotídeos únicos e anormalidades cromossômicas<sup>10</sup>, bem como polimorfismos comuns de nucleotídeos únicos.<sup>11</sup>

Estima-se que esses polimorfismos contribuam entre 2,5% e 15% e entre 12% e 52% para a etiologia do TEA, respectivamente.<sup>12,13</sup> Além da hereditariedade, vários outros fatores, como genético, ambiental, função autoimune, estresse oxidativo e biomarcadores inflamatórios, foram implicados na etiologia do TEA<sup>14</sup> Nas últimas décadas, foram identificados vários genes suscetíveis ao TEA, que coletivamente representam cerca de 10 a 20% dos casos. O

conhecimento dos genes envolvidos no TEA é uma ferramenta fundamental para investigar a especificidade da condição, bem como as características neurobiológicas e cognitivas compartilhadas com outros distúrbios clinicamente distintos. O objetivo é estabelecer uma ligação entre os genes e os circuitos cerebrais responsáveis pelas funções cognitivas.<sup>15</sup>

A má alimentação, especificamente a deficiência de ácido fólico, parece também desempenhar um papel importante no desenvolvimento do transtorno do espectro autista.<sup>16</sup> Como resultado, em alguns países, como Estados Unidos, Canadá e Brasil, a fortificação de alimentos com ácido fólico tornou-se obrigatória. Um estudo de meta-análise investigou a relação entre os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) no gene MTHFR e o risco de TEA, revelando que o polimorfismo C677T estava associado ao TEA apenas em crianças de países onde não ocorria a fortificação de alimentos, por exemplo, Brasil, Índia, Romênia e China.<sup>17</sup> Embora a fortificação de alimentos com ácido fólico ou o uso de suplementos durante a gravidez tenham apresentado resultados promissores, existe uma hipótese que sugere que as formas polimórficas do gene MTHFR têm atividade reduzida em níveis baixos ou normais de folato, mas apresentam atividade normal em um estado nutricional com níveis mais elevados de folato.

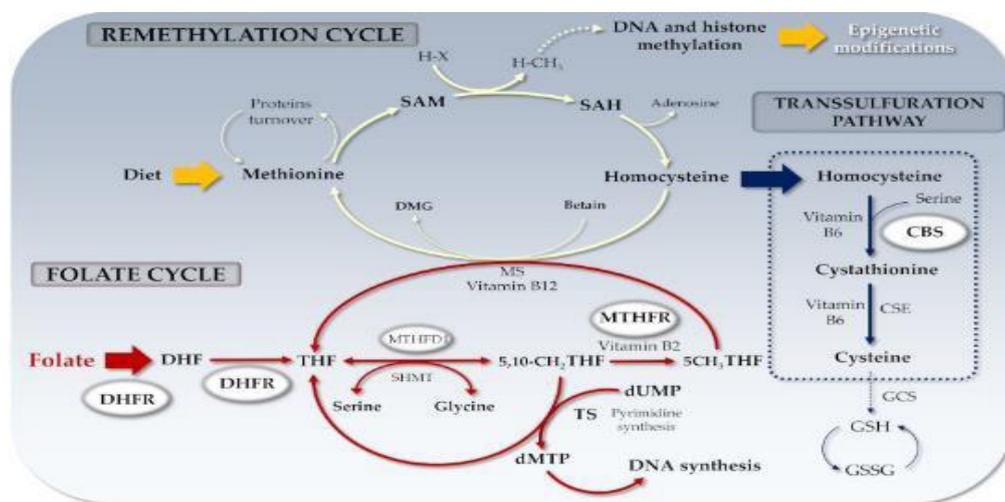
As variantes genéticas maternas relacionadas ao aumento do risco de autismo na ausência de suplementação pré-natal de vitaminas estão associadas a um metabolismo ineficiente do folato e níveis elevados de homocisteína. A enzima MTHFR regula o folato e o genótipo MTHFR 677 TT, está ligado a uma redução de 60% na atividade da enzima, resultando em metabolismo ineficiente do folato, baixos níveis de folato no sangue, elevação dos níveis de homocisteína plasmática e capacidade reduzida de metilação, especialmente em indivíduos com baixos níveis de vitaminas B.<sup>18</sup> A enzima CBS, com a vitamina B6 como cofator, remove permanentemente a homocisteína da via da metionina, desviando-a para a via de transsulfuração na qual a homocisteína é convertida em outros compostos, como cisteína e glutatona. Mutações genéticas no gene CBS também estão associadas a níveis elevados de homocisteína plasmática. O transportador FOLR2 auxilia no transporte de folato e seus derivados para dentro das células, enquanto o transportador TCN2 facilita o transporte de cobalamina (B12). Os genes MTRR e BHMT desempenham um papel nas conversões da homocisteína para metionina, dependendo das vias relacionadas ao folato e à colina/betaina. Variantes genéticas maternas nessas vias e os níveis de homocisteína na mãe estão relacionados à homocisteína no feto.<sup>19</sup> A suplementação de ácido fólico e cobalamina pode reduzir os níveis de homocisteína e eliminar as diferenças de risco de defeitos do tubo neural observadas em diferentes genótipos, incluindo MTHFR 677 TT, CBS rs234715 e MTRR 66 GG.<sup>20,21</sup> Portanto, o aumento do risco de autismo em crianças cujas mães possuem esses genótipos e não receberam suplementação pré-natal de vitaminas durante o período

periconcepcional tem base em mecanismos biológicos. A interação entre a ingestão materna de vitaminas pré-natais e o genótipo COMT 472 AA da criança pode amplificar os efeitos de um gene de suscetibilidade relacionado à metilação. A COMT está envolvida na degradação de neurotransmissores, como a dopamina. Vitaminas B, como o folato, são essenciais para a metilação, incluindo as reações mediadas pela COMT. Altos níveis de homocisteína inibem a atividade do COMT, mas a suplementação de ácido fólico e outras vitaminas B pode reduzir esse efeito.<sup>22</sup> Diferenças estruturais e funcionais em regiões cerebrais, como o hipocampo e o córtex pré-frontal <sup>23</sup>, estão associadas aos diferentes genótipos do COMT, e essas regiões estão implicadas na patologia do autismo e tem um papel importante na degradação de dopamina. <sup>24</sup> A variante genética COMT 472G>A reduz a atividade enzimática e pode estar relacionada ao autismo, especialmente em combinação com fatores nutricionais específicos. A COMT 472G>A pode estar ligada a outras variantes genéticas associadas ao autismo devido à sua localização em uma região suscetível a variação no número de cópias.<sup>25</sup> Estudo de caso-controle sugere que o genótipo COMT 472G>A da criança está associado à suscetibilidade genética ao autismo, principalmente em conjunto com determinados ambientes nutricionais. O metabolismo materno de um carbono pode ter um papel mais significativo do que o metabolismo da criança, uma vez que as outras variantes genéticas na criança não estão relacionadas a um aumento no risco.<sup>26</sup> Outro estudo indica que mães de crianças autistas apresentam alterações genéticas e metabólicas nas mesmas vias. <sup>27</sup>

A regulação do transporte de folato na barreira hematoencefálica (BHE) é importante para o desenvolvimento de terapias para distúrbios neurodegenerativos infantis relacionados a mutações nos sistemas de transporte de folato.<sup>28</sup> Estudos examinaram o papel dos autoanticorpos contra o receptor alfa de folato (FR $\alpha$ ), que bloqueiam a transferência de 5-metiltetraidrofolato (5-MTHF) do plexo coroide para o cérebro, e sua associação com complicações durante a gravidez e transtornos do neurodesenvolvimento.<sup>29</sup> Suplementos orais de ácido fólico podem levar a níveis normais de 5-MTHF no líquido cefalorraquidiano (LCR) e recuperação clínica em pacientes com redução de folato no LCR devido aos autoanticorpos contra o FR.<sup>30</sup>

O folato desempenha um papel importante no desenvolvimento neurológico porque atua como um transportador do grupo metil. A via folato-metionina é crucial para a metilação e síntese do DNA e também para o equilíbrio redox na célula. Nos enterócitos, para entrar no ciclo do folato, o ácido fólico é reduzido a di-hidrofolato (DHF) e, em seguida, a tetra-hidrofolato (THF) pela DHF redutase (DHFR), enzima expressa no fígado e em outros tecidos. THF é metabolizado via serina hidroximetiltransferase e 5,10-metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR), a 5-metil-THF na presença de B2. 5-metil-THF pode atravessar a barreira hematoencefálica e é a forma metabolicamente ativa do folato. Esse composto desempenha

um papel importante na síntese de metionina a partir da homocisteína, atuando como um cofator essencial para a enzima metileno-tetra-hidrofolato redutase (MTHFR). A MTHFR converte o 5,10-metilenotetra-hidrofolato (CH<sub>2</sub>THF) em 5-metil-tetra-hidrofolato (CH<sub>3</sub>THF), facilitando assim a produção de metionina. Níveis adequados de folato e vitamina B são cruciais para manter os níveis de homocisteína baixos. A deficiência de vitaminas B pode levar a um aumento na concentração de homocisteína no organismo, uma condição conhecida como hiper-homocisteinemia. A metabolização da homocisteína ocorre em duas vias distintas, sendo uma de remetilação para metionina e a outra é a transsulfuração para cisteína, conforme figura abaixo:<sup>31</sup>



Ciclo do folato e genes relacionados -> DHF: Dihidrofolato; THF: Tetra-hidrofolato; SAM: S-adenosil metionina; SAH: S-adenosil homocisteína; MTHFR: Metileno-tetra-hidrofolato redutase; RCF: Transportador de folato reduzido; DHFR: Dihidrofolato redutase; dUMP: Monofosfato de uridina; dTMP: Monofosfato de timidina; DMG: Dimetilglicina; MS: Metionina sintase; CBS: Cistationina-β-sintase; H-X: Receptor de metilação; H-CH<sub>3</sub>: Receptor metilado; TS: Timidilato sintase; MTHFD1: Metileno-tetra-hidrofolato desidrogenase-1 (dependente de NADP+); CSE: Cistationina γ-liase; GCS: Sintetase de γ-glutamilcisteína; GSH: Glutationa; GSSG: Glutationa dissulfeto. 32

MTHFR é a enzima crucial no metabolismo do folato-metionina e atua na intersecção entre a metilação e a síntese do DNA. Uma alteração genética comum no gene MTHFR envolve a substituição da timina pela citosina na posição de base 677, o que leva à troca do aminoácido alanina por valina na posição 222 da proteína MTHFR. O polimorfismo C677T está associado a uma diminuição na atividade enzimática (60%) e leva a um aumento na Hcy sérica de cerca de 20%.<sup>33</sup> A própria Hcy está localizada em um ponto de ramificação das vias metabólicas: a remetilação e a via da transsulfuração, na qual as vitaminas do complexo B, ou seja, vitamina B9 (folato), vitamina B12, vitamina B6 e vitamina B2, são necessárias como cofatores. Portanto, níveis inadequados dessas vitaminas podem elevar os níveis plasmáticos de tHcy.<sup>34</sup> Pacientes com TEA (transtorno do espectro autista) apresentavam uma concentração elevada de Hcy no plasma durante o jejum. Além disso, essa redução da

eficiência enzimática pode resultar também na diminuição da produção de GSH (glutathiona), que desempenha um papel importante nos processos de desintoxicação de metais tóxicos no organismo, além de afetar a síntese de neurotransmissores e aumentar a intensidade de processos neuroinflamatórios, câncer e TEA (transtorno do espectro autista), entre outras condições.<sup>35</sup>

MTHFR atua como um dímero e flavina adenina dinucleotídeo (FAD) atua como um cofator para esta enzima, mas a variante da enzima MTHFR se dissocia em monômeros e reduz a atividade da enzima. As frequências do alelo mutante T é relativamente comum na população em geral, sendo aproximadamente 12% para indivíduos homozigotos (genótipo TT), 50% para aqueles com genótipo heterozigoto (CT) e em algumas populações pode chegar a 67%. Portanto, isso indica que em certas populações, de cada 4 pessoas, até 3 podem ser portadoras de pelo menos um alelo T.<sup>36</sup> É importante destacar que a presença do alelo T é observada em mais de 90% dos casos de TEA, e sua presença pode aumentar o risco de desenvolvimento dessa condição em 5 a 20 vezes.<sup>37</sup>

Estudo de caso-controle indicou que os polimorfismos 677C T, quer sejam homozigotos ou heterozigotos, estão fortemente associados ao transtorno do espectro autista. Os indivíduos com genótipo homozigoto (TT) apresentam uma redução de aproximadamente 50% na atividade da enzima MTHFR, enquanto aqueles com genótipo heterozigoto (CT) apresentam uma diminuição de 30% na atividade enzimática medida em seus linfócitos.<sup>38</sup>

Não foram observadas diferenças significativas nas frequências dos alelos ou distribuições dos genótipos, com um nível de significância de  $p < 0,05$ , entre os casos de autismo e os controles não afetados para os polimorfismos MTHFR 677C>T, MTHFR 1298A>C, GST T1 nulo, GCP 156C>T ou MTRR 66A>G. No entanto, foram encontrados aumentos significativos nas razões de chances, frequências de alelos e distribuições de genótipos em crianças autistas para os genes RFC-180A>G, TCN2 776C>G e COMT 472G>A.<sup>39</sup> Na avaliação desses pesquisadores, foi identificada uma maior frequência do alelo MTHFR 677T em crianças autistas em comparação com crianças não autistas, com valores de 16,3% versus 6,5%, resultando em um risco 2,79 vezes maior de autismo.<sup>40</sup> Em uma análise conduzida em crianças autistas, observou-se uma associação entre a presença de pelo menos um alelo T do MTHFR C677T. No entanto, os resultados obtidos não indicaram tal relação entre os genótipos para o MTHFR 677CT e a regressão do desenvolvimento.<sup>41</sup> Em uma avaliação realizada do polimorfismo C677T no gene MTHFR em crianças com TEA e crianças caso controle, não foi encontrada diferenças nas distribuições alélicas e genotípicas.<sup>42</sup> Os resultados de outro estudo revelaram uma maior prevalência do alelo T em crianças com TEA (42,9%) em comparação com o grupo controle (32,3%), sendo essa diferença estatisticamente

significativa com um valor de P de 0,0004. No entanto, não houve diferença significativa na frequência do genótipo heterozigoto 677CT entre o grupo com TEA (47,8%) e o grupo controle (43,2%). Com base nesses achados, os pesquisadores sugeriram que a atividade reduzida da enzima MTHFR é um fator de risco para o autismo apenas em famílias com casos simples do transtorno. Um estudo realizado em uma população chinesa mostrou que a frequência do genótipo TT de MTHFR 677 era significativamente maior em crianças com autismo (16,1%) em comparação com controles (8,6%).<sup>43</sup> A análise desse estudo admitiu que o polimorfismo MTHFR C677T está significativamente associado a um aumento do risco de transtorno do espectro autista (TEA). Essa associação demonstrou ser significativa em todas as comparações realizadas, incluindo frequência de alelos, heterozigotos, homozigotos, modelo dominante e modelo recessivo.<sup>44</sup> Estudo que realizou a genotipagem do polimorfismo MTHFR 677CT onde foram identificados 44 crianças com o genótipo CC, 51 crianças com o genótipo CT e 3 crianças com o genótipo nos casos, no grupo controle, não foram encontrados polimorfismos homozigotos e essa diferença não apresentou significância estatística entre os grupos. O estudo tem limitações devido ao tamanho pequeno da amostra de famílias com autismo e diversas variáveis, como diversidade genética, recrutamento e tamanho da amostra, podem afetar os resultados.<sup>45</sup> Pesquisa egípcia relatou que o genótipo mutante homozigoto 677TT estava presente em 15% das crianças autistas, enquanto o genótipo heterozigoto 677CT ocorreu em 50% do grupo de crianças autistas. Observou-se que o genótipo heterozigoto CT era mais prevalente do que outros genótipos do polimorfismo MTHFR C667 em pacientes com autismo leve a moderado e pacientes com autismo grave, mas não houve diferença significativa.<sup>46</sup> Uma outra meta-análise demonstrou que o polimorfismo do gene MTHFR C677T é um fator de risco para autismo, tendo maior vulnerabilidade entre asiáticos, bem como populações e moradores do Cáucaso. Além disso, o autismo é uma doença multifatorial, portanto, um único polimorfismo genético de suscetibilidade pode ter um efeito moderado.<sup>47</sup>

Os resultados de outra metanálise indicaram uma associação significativa entre o polimorfismo MTHFR C677T e o TEA nos cinco modelos genéticos avaliados: alélico, dominante, recessivo, heterozigoto e homozigoto. Esta metanálise mostrou que o polimorfismo MTHFR C677T é um fator de suscetibilidade para TEA, enquanto o polimorfismo MTHFR A1298C não está associado.<sup>48</sup>

Mais estudos caso-controle se fazem necessários devido à exposição ambiental ou outros fatores de risco para entender melhor o papel do polimorfismo MTHFR C677T na patogênese do autismo.

### **Suplementação materna de ácido fólico na redução do risco de TEA em descendentes**

Estudos de coorte mostraram que a suplementação preconcepção de ácido fólico materno está associada a benefícios como menor risco de deficiência de linguagem em crianças de 3 anos <sup>49</sup>, aspectos neurológicos positivos <sup>50</sup>, e redução de 14-17% no risco de transtorno do espectro autista (TEA) com suplementos pré-natais de ácido fólico.<sup>51</sup> Essas abordagens personalizadas podem contribuir para melhorias no autismo e no desenvolvimento saudável. Em um estudo de coorte caso-controlado em Israel, foi observado que o uso de suplementos pré-natais de ácido fólico ou multivitamínicos pela mãe, antes ou durante a gravidez, está associado a um risco reduzido de transtorno do espectro autista (TEA) em seus descendentes.<sup>52</sup> Um estudo norueguês demonstrou que o uso de suplementos pré-natais de ácido fólico na época da concepção está relacionado a um risco aproximadamente 45% menor para o TEA. Esse estudo também indicou que o risco de TEA foi maior em crianças cujas mães apresentavam níveis elevados de folato e vitamina B12 no plasma. <sup>53</sup> Em um estudo adicional, foi observado que o uso pré-natal de ácido fólico estava relacionado a menos traços autistas na criança, porém não houve associação entre os traços autistas na prole e a concentração plasmática de folato materno medida no início da gravidez.<sup>54</sup>

### **Suplementação de ácido fólico em crianças diagnosticadas com TEA**

Um estudo controlado e randomizado no Texas demonstrou que indivíduos com transtorno do espectro autista (TEA) que receberam suplementação de ácido fólico (~600 µg) apresentaram melhorias significativas na habilidade intelectual não verbal, sintomas do autismo e desenvolvimento. Níveis elevados de ácido docosa-hexaenoico (DHA), ácido eicosapentaenoico (EPA), carnitina, coenzima Q10 e vitaminas A, B2, B5, B6, B12 e ácido fólico também foram observados. Isso destaca a eficácia de uma abordagem nutricional e dietética completa para melhorar o TEA.<sup>55</sup> Crianças autistas de Omã apresentaram níveis mais elevados de homocisteína em comparação com os controles, enquanto os níveis de folato e vitamina B12 estavam abaixo dos valores de referência considerados deficientes.<sup>14</sup> Em um estudo multicêntrico realizado na China com crianças diagnosticadas com TEA, os níveis séricos de folato foram mais baixos nas crianças com TEA em comparação com aquelas com desenvolvimento normal.<sup>56</sup> O tratamento com ácido fólico melhorou os comportamentos associados ao transtorno do espectro autista (TEA) e o perfil metabólico, especialmente em crianças diagnosticadas precocemente. Isso sugere uma recuperação da função cerebral por meio da redução da homocisteína e do redirecionamento para uma via de proteção contra danos oxidativos e metilação anormal do DNA.<sup>57</sup> Estudos futuros devem

considerar a medição de homocisteína e vitamina B12 durante a concepção e o início da gravidez para entender melhor a associação entre o folato e o TEA.

### **Suplementação materna de multivitamínicos na redução do risco de TEA em descendentes**

Pesquisa mostrou que suplementação de multivitamínicos, especialmente complexo B, a durante o período periconcepcional e 1º trimestre da gravidez reduz o risco de TEA em filhos de mulheres grávidas.<sup>58</sup> Estudo de coorte relacionou o uso prospectivo de vitaminas pré-natais a menor probabilidade de traços autistas, medidos pela escala SRS (Social Responsiveness Scale).<sup>59</sup> Três outros estudos sobre o uso de suplementos multivitamínicos encontraram uma associação inversa significativa entre o uso de MVS e o TEA, com estimativas variando de 0,3 0,69.<sup>52,60,61</sup> Um estudo de caso-coorte em Israel mostrou que o uso de suplementos multivitamínicos antes e durante a gravidez estava associado a uma redução de aproximadamente 65% na probabilidade de transtorno do espectro autista (TEA) em seus descendentes.<sup>52</sup> No entanto, em um estudo prospectivo com uma subamostra considerável, não foi encontrada nenhuma associação entre o uso prospectivo de suplementos multivitamínicos durante o período periconcepcional e o TEA.<sup>62</sup> Um estudo de caso-controle anterior não encontrou associação significativa entre o uso retrospectivo de suplementos multivitamínicos no período em torno da concepção e o risco de autismo.<sup>63</sup>

Um estudo chinês observou que a falta de suplementação de micronutrientes estava associada a um aumento na probabilidade de TEA e traços relacionados ao autismo em comparação com o uso de suplementos.<sup>64</sup> Em estudo de coorte prospectiva MARBLES (um estudo de alto risco familiar que inclui famílias que já tinham pelo menos uma criança com transtorno do espectro autista e acompanha as crianças subsequentes), foi relatado um risco 50% menor de TEA em crianças cujas mães relataram o uso de vitaminas pré-natais durante o primeiro mês de gravidez, em comparação com aquelas cujas mães não relataram o uso durante esse período de tempo.<sup>63</sup>

Para estudos futuros sobre o uso de vitaminas pré-natais em relação ao TEA e aos traços relacionados ao TEA, é importante explorar mais detalhadamente o momento e a frequência do uso, além de avaliar se nutrientes individuais ou sua combinação podem ser os responsáveis por essas associações.<sup>65</sup>

## **Suplementação de multivitamínicos em crianças e adultos diagnosticadas com TEA**

Estudo sobre os efeitos da suplementação das vitaminas e minerais em crianças e adultos com autismo confirma outros estudos que mostraram que a suplementação de vitaminas/minerais é benéfica no tratamento de crianças com autismo.<sup>66</sup> Um estudo de 30 semanas, duplo-cego e controlado por placebo descobriu que uma alta dose de vitamina C reduziu a gravidade do autismo.<sup>67</sup> Outro estudo mostrou que a suplementação de micronutrientes foi comparável ou até mais eficaz do que medicamentos na melhoria dos sintomas do TEA.<sup>68</sup> Além disso, estudos com vitamina B6 em altas doses também mostraram efeitos benéficos.<sup>69</sup>

## **Associação entre dieta materna, risco de TEA e resultados comportamentais**

Em um estudo caso-controle realizado na China, observou-se que o consumo de peixe-agulha antes da fertilização, a preferência por frutas e o consumo de carpa-dourada durante a gestação atuaram como medidas preventivas para o transtorno do espectro autista (TEA) em seus descendentes.<sup>70</sup> Pesquisadores analisaram que a adesão materna a uma dieta mediterrânea no início da gravidez estava relacionada a resultados neurocomportamentais positivos na primeira infância e a diferenças de metilação dependentes do sexo em regiões específicas de MEG3 (Maternally Expressed Gene3, gene não codificante do RNA), IGF2 (Insulin-like Growth Factor 2, gene que codifica uma proteína chamada fator de crescimento semelhante à insulina e SGCE/PEG10 (SGCE está associado a distúrbios neurológicos, enquanto o gene PEG10 é considerado um gene imprinted, o que implica que sua expressão é influenciada pelo padrão de metilação específico do cromossomo herdado do pai).<sup>71</sup> Em um estudo observacional, os resultados indicam que dietas maternas desequilibradas antes da concepção podem aumentar o risco de TEA, enquanto a suplementação de cálcio durante a preparação para a gravidez pode reduzir esse risco. No entanto, são necessários estudos futuros com amostras maiores e informações mais detalhadas para confirmar essas descobertas. Além disso, é importante considerar o estado nutricional materno em relação ao TEA na descendência.<sup>72</sup> Dois estudos de caso-controle chineses relacionaram os hábitos dietéticos maternos desequilibrados com o transtorno do espectro autista (TEA). Uma dieta preconcepção composta principalmente por carne ou vegetais, bem como a falta de consumo de frutas durante esse período e a gravidez, foram associadas a um aumento no risco de TEA em crianças.<sup>70,72</sup> O Estudo de Epigenética em Recém-Nascidos (NEST), um estudo de coorte prospectivo realizado nos Estados Unidos, revelou que seguir uma dieta mediterrânea durante o período periconcepcional reduziu o risco de TEA em crianças. Além disso, observou-se

melhorias nos resultados comportamentais relacionados ao autismo, avaliados pelos domínios de problemas e competência do ITSEA.

Essas descobertas destacam a necessidade de considerar diferentes padrões alimentares em estudos futuros, além da dieta mediterrânea.<sup>73</sup>

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estudos têm examinado o impacto de vários aspectos alimentares, como o consumo de frutas, vegetais, cereais, grãos integrais/gordura total<sup>74</sup> e das vitaminas A, B6, C, E e B12<sup>26</sup>, cereais<sup>63</sup>, relacionados ao TEA. No entanto, mais pesquisas se fazem necessárias para obter um melhor entendimento da interação desses nutrientes e o TEA. Outros nutrientes, como os envolvidos na síntese de metionina com folato, além das vitaminas B12, B6, colina e antioxidantes (vitaminas A, C e E), também devem ser considerados devido aos seus potenciais efeitos no metabolismo e no estresse oxidativo, os quais estão relacionados às vias etiológicas do TEA.<sup>75,76</sup> Além disso, o triptofano<sup>77,78</sup> e os flavonoides têm sido alvo de investigação devido ao seu papel na síntese de serotonina e seus efeitos anti-inflamatórios.<sup>79,80</sup> Considerando essas associações e suas relações mecanísticas, é justificável explorar esses nutrientes em estudos futuros sobre o autismo.<sup>65</sup>

## REFERÊNCIAS

1. Guo BQ, Li HB, Zhai DS, Ding SB. Association of maternal prenatal folic acid intake with subsequent risk of autism spectrum disorder in children: A systematic review and meta-analysis. 2019 Aug 30; 94:109650. doi: 10.1016/j.pnpbp.2019.109650. Epub 2019 May 11.
2. Maia CS, De Menezes KMC, Tenorio FCAM, De Queiroz Júnior JRA, De Souza Maciel GE. Transtorno do espectro autista e a suplementação por ácido fólico antes e durante a gestação. J. bras. psiquiatr. 68 (4) • Oct-Dec 2019 • <https://doi.org/10.1590/0047-2085000000251>.
3. Wang M, Li K, Zhao D, Li L. The association between maternal use of folic acid supplements during pregnancy and risk of autism spectrum disorders in children: a meta-analysis. 2017 Oct 2; 8:51. doi: 10.1186/s13229-017-0170-8.
4. Kanner, L. (1997). Os distúrbios do contato afetivo. In P.S. Rocha (Org.), *Autismos* (pp. 111-170). São Paulo: Escuta. (Trabalho original publicado em 1943).
5. Pugsley K, Scherer SW, Belgrove MA, Hawi Z. Environmental exposures associated with elevated risk for autism spectrum disorder may augment the burden of deleterious de novo mutations among probands. *Molecular Psychiatry* volume 27, pages710–730 (2022)
6. Hansen SN, Schendel DE, Francis RW, Winham GC, Bresnahan M, Levine SZ et al. Recurrence risk of autism in siblings and cousins: A multinational, population-based study. DOI: 10.1016/j.jaac.2018.11.017.

7. Sandin S, Lichtenstein P, Kuja-Halkola R, Larsson H, Hultman CM, Reichemberg A. The familial risk of autism. 2014 May 7;311(17):1770-7. doi: 10.1001/jama.2014.4144.
8. Castelbaum L, Sylvester CM, Zhang Y, Yu Q, Constantino JN. On the nature of monozygotic twin concordance and discordance for autistic trait severity: A quantitative analysis. 2020 Jul;50(4):263-272. doi: 10.1007/s10519-019-09987-2. Epub 2019 Dec 18.
9. Tick B, Bolton P, Happé F, Hutter M, Rijdsdijk F. Heritability of autism spectrum disorders: a meta-analysis of twin studies. 2016 May;57(5):585-95. doi: 10.1111/jcpp.12499.
10. Kenny EM, Cormican P, Furlong S, Heron E, Kenny G, Fahey C et al. Excess of rare novel loss-of-function variants in synaptic genes in schizophrenia and autism spectrum disorders. 2014 Aug;19(8):872-9. doi: 10.1038/mp.2013.127. Epub 2013 Oct 15. Grove J, Ripke S, Als TD, Mattheisen M, Walters RK, Won H et al. Identification of common genetic risk variants for autism spectrum disorder Nature Genetics volume 51, pages431–444 (2019).
11. Grove J, Ripke S, Als TD, Mattheisen M, Walters RK, Won H et al. Identification of common genetic risk variants for autism spectrum disorder Nature Genetics volume 51, pages431–444 (2019).
12. Gaugler T, Klei L, Sanders SJ, Bodea CA, Goldberg AP, Lee AB et al. Most genetic risk for autism resides with common variation. Nature Genetics volume 46, pages881–885 (2014).
13. Iossifov I, O’Roak BJ, Sanders SJ, Ronemus M, Krumm N, Levy D et al. The contribution of de novo coding mutations to autism spectrum disorder. Nature volume 515, pages216–221 (2014)
14. Ali A, Waly MI, Al-Farsi YM, Essa MM, Al-Sharbaty MM, Deth RC. Hyperhomocysteinemia among Omani autistic children: a case-control study Oman 2011;58(4):547-51. Epub 2011 Dec 20.
15. Geschwind DH. Genetics of autism spectrum disorders. 2011 Aug 18. doi:10.1016/j.tics.2011.07.003.
16. Sampaio AC, De Matos Neto FF, Lopes LL, Marques IMM, Tavares RM, De Macedo Fernandes MV et al. Association of maternal folic acid supplementation with autism spectrum disorder: A Systematic Review. Rev. Bras. Ginecol. Obstet. 43 (10) • Oct 2021 • <https://doi.org/10.1055/s-0041-1736298>.
17. Pu D, Shen Y, Wu J. Association between MTHFR gene polymorphisms and the risk of autism spectrum disorders: a meta-analysis. 2013 Oct;6(5):384-92. doi: 10.1002/aur.1300. Epub 2013 May 7.
18. Hustad S, Midttun O, Schneede J, Vollset SE, Grotmol T, Ueland PM. The methylenetetrahydrofolate reductase 677C-->T polymorphism as a modulator of a B vitamin network with major effects on homocysteine metabolism. 2007 May;80(5):846-55. doi: 10.1086/513520. Epub 2007 Mar 13.
19. Lopreato FR, Stabler SP, Carvalho FR, Hirata RDC, Hirata MH, Robi DL et al. 2008. Relationships between gene polymorphisms of folate-related proteins and vitamins and metabolites in pregnant women and neonates. 2008 Dec;398(1-2):134-9. doi: 10.1016/j.cca.2008.09.004. Epub 2008 Sep 11.
20. Boyles AL, Billups AV, Deak KL, Siegel DG, Mehlretter L, Slifer SH et al. Neural tube defects and folate pathway genes: family-based association tests of gene-gene and gene- environment interactions. 2006 Oct;114(10):1547-52. doi: 10.1289/ehp.9166.
21. Wilson A, Platt R, Wu Q, Leclerc D, Christensen B, Yang H, Gravel RA et al. A common variant in methionine synthase reductase combined with low cobalamin (vitamin B12) increases risk for spina bifida. 1999 Aug;67(4):317-23. doi: 10.1006/mgme.1999.2879.
22. Schatz RA, Wilens TE, Sellinger OZ. Decreased transmethylation of biogenic amines after in vivo elevation of brain S-adenosyl-l-homocysteine. 1981 May;36(5):1739-48. doi: 10.1111/j.1471-4159.1981.tb00426.x.

23. Honea R, Verchinski BA, Pezawas L, Kolachana BS, Callicott JH, Mattay VS et al. Impact of interacting functional variants in COMT on regional gray matter volume in human brain. 2009 Mar 1;45(1):44-51. doi: 10.1016/j.neuroimage.2008.10.064. Epub 2008 Nov 21.
24. Egan MF, Goldberg TE, Kolachana BS, Callicott JH, Mazzanti CM, Starub RE et al. Effect of COMT Val108/158 Met genotype on frontal lobe function and risk for schizophrenia. 2001 Jun 5;98(12):6917-doi: 10.1073/pnas.111134598.
25. Lachman HM, Papolos DF, Saito T, YU YM, Szumlanski CL, Weinshilboum RM. Human catechol-O-methyltransferase pharmacogenetics: description of a functional polymorphism and its potential application to neuropsychiatric disorders. 1996 Jun;6(3):243-50. doi: 10.1097/00008571-199606000-00007.
26. Schmidt RJ, Tancredi DJ, Ozonoff S, Hansen RL, Hartiala J, Allayee H et al. Maternal periconceptional folic acid intake and risk of autism spectrum disorders and developmental delay in the CHARGE (Childhood Autism Risks from Genetics and Environment) case-control study. 2012 Jul;96(1):80-9. doi: 10.3945/ajcn.110.004416. Epub 2012 May 30.
27. James SJ, Melnyk S, Jernigan S, Paviv O, Trusty T, Lehman S et al. A functional polymorphism in the reduced folate carrier gene and DNA hypomethylation in mothers of children with autism. 2010 Sep;153B(6):1209-20. doi: 10.1002/ajmg.b.31094.
28. Alan C, Hoque T, Finnell RH, Goldman ID, Bendayan R, Regulation of Reduced Folate Carrier (RFC) by Vitamin D Receptor at the Blood-Brain Barrier. 2017 Sep 26. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.7b00572.
29. Hoxha B, Hoxha M, Domi E, Gervasoni J, Persichilli S, Malaj V et al. Folic Acid and Autism: A systematic review of the current state of knowledge. 2021 Aug 3. doi: 10.3390/cells10081976.
30. Unal ES, Zhao R, Qiu A, Goldman ID. N-linked glycosylation and its impact on the electrophoretic mobility and function of the human proton-coupled folate transporter (HsPCFT)☆. 2008 Mar 20. doi: 10.1016/j.bbamem.2008.03.009.
31. Kataria N, Yadav P, Kumar R, Kumar N, Singh M, Kant R et al. Effect of vitamin B6, B9, and B12 supplementation on homocysteine level and cardiovascular outcomes in stroke patients: A meta-analysis of randomized controlled trials. 2021 May 11. doi: 10.7759/cureus.14958.
32. Tisato V, Silva JA, Longo G et al. Genetics and Epigenetics of One-Carbon Metabolism Pathway in Autism Spectrum Disorder: A Sex-Specific Brain Epigenome? 2021 May 20. doi: 10.3390/genes12050782.
33. Devlin AM, Clarke R, Birks J, Evans JG, Halsted CH. Interactions among polymorphisms in folate-metabolizing genes and serum total homocysteine concentrations in a healthy elderly population. 2006 Mar;83(3):708-13. doi: 10.1093/ajcn.83.3.708.
34. Hiraoka M, Kagawa Y. Genetic polymorphisms, and folate status. 2017 Jul 20. doi:10.1111/cga.12232.
35. Tu WJ, Chen H, He J. Application of LC-MS/MS analysis of plasma amino acids profiles in children with autism. 2012 Nov;51(3):248-9. doi: 10.3164/jcbs.12-45. Epub 2012 Jul 30.
36. Rady PL, Szucs S, Grady J, Hudnall SD, Kellner LH, Nitiwsky H et al. Genetic polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and methionine synthase reductase (MTRR) in ethnic populations in Texas; a report of a novel MTHFR polymorphic site, G1793A. 26 December 2001 <https://doi.org/10.1002/ajmg.10122>
37. Botto LD, Yang Q. 5, 10-Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene Variants and Congenital Anomalies: A Huge Review. American Journal of Epidemiology, Volume 151, Issue 9, 1 May 2000, Pages 862–877, <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a010290>.

38. Boris M, Goldblatt A, Galanko J, James J. Association of MTHFR gene variants with autism. 2004. [https://www.researchgate.net/publication/284651400\\_Association\\_of\\_MTHFR\\_gene\\_variants\\_with\\_autism](https://www.researchgate.net/publication/284651400_Association_of_MTHFR_gene_variants_with_autism).
39. James SJ, Melnyk S, Jernigan S, Cleves MA, Halsted CH, Wong DH et al. Metabolic endophenotype and related genotypes are associated with oxidative stress in children with autism. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2006 Dec 5; 141B (8): 947–956.
40. Mohammad NS, Jain JMN, Chintakindi KP, Singh RP, Naik U, Akella RMD. Aberrations in folate metabolic pathway and altered susceptibility to autism. 2009 Aug;19(4):171-6. doi: 10.1097/YPG.0b013e32832cebd2.
41. Goin-Kochel RP, Porter AE, Peters SU, Shinawi M, Sahoo T, Beaudet AL. The MTHFR 677C→T polymorphism and behaviors in children with autism: exploratory genotype–phenotype correlations. 2009 Apr;2(2):98-108. doi: 10.1002/aur.70.
42. Dos Santos PAC, Longo D, Brandalize APC, Schüller-Faccini L. MTHFR C677T is not a risk factor for autism spectrum disorders in South Brazil. 30 March 2009 <https://doi.org/10.1002/aur.70>.
43. Guo T, Chen H, Liu B, Ji W, Yang C. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms C677T and risk of autism in the Chinese Han population. 2012 Aug;16(8):968-73. doi: 10.1089/gtmb.2012.0091. Epub 2012 Jul 9.
44. Pu D, Shen Y, Wu J. Association between MTHFR gene polymorphisms and the risk of autism spectrum disorders: a meta-analysis. 2013 Oct;6(5):384-92. doi: 10.1002/aur.1300. Epub 2013 May 7.
45. Sener EF, Oztop DB, Ozkul Y. MTHFR Gene C677T Polymorphism in autism spectrum Disorders. 2014 Nov 6. doi: 10.1155/2014/698574.
46. El-Baz F, El-Aal MA, Kamal TM, Sadek AA, Othman AA. Study of the C677T and 1298AC polymorphic genotypes of MTHFR gene in autism spectrum disorder. 2017 Sep 25. doi: 10.19082/5287.
47. Rai V. Association of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene C677T polymorphism with autism: evidence of genetic susceptibility. 2016 Aug;31(4):727-35. doi: 10.1007/s11011-016-9815-0.
48. Li Y, Qiu S, Guo Y, Li Z, Liu Y. Association between MTHFR C677T/A1298C and susceptibility to autism spectrum disorders: a meta-analysis. 24 September 2020 volume 20, Article number: 449 (2020).
49. Roth C, Magnus P, Schjolberg S, Stoltenberg C, Surén P, McKeague IW et al. Folic acid supplements in pregnancy and severe language delay in children. 2011 Oct 12;306(14):1566-73. doi: 10.1001/jama.2011.1433.2011.
50. Christian P, Murray-Kolb LE, Kathry SK, Katz J, Schaefer BA, Cole PM et al. Prenatal micronutrient supplementation and intellectual and motor function in early school-aged children in Nepal. 2010 Dec 22;304(24):2716-23. doi: 10.1001/jama.2010.1861.
51. Nielsen RM, Surén P, Gunnes N, Alsaker ER, Bresnahan M, Hirtz D et al. Analysis of self-selection bias in a population-based cohort study of autism spectrum disorders. 2013 Nov; 27(6): 10.1111/ppe.12077. doi: 10.1111/ppe.12077.
52. Levine SZ, Kodesh A, Viktorin A, Smith L, Uher R, Reichenberg A. Association of maternal use of folic acid and multivitamin supplements in the periods before and during pregnancy with the risk of autism spectrum disorder in offspring. 2018 Feb 1;75(2):176-184. doi: 10.1001/jamapsychiatry.2017.4050.

53. Surén P, Roth C, Bresnahan M, Haugen M, Hornig M, Hirtz D. Association between maternal use of folic acid supplements and risk of autism in children. 2013 Feb 13; 309(6): 570–577. doi: 10.1001/jama.2012.155925.
54. Steenweg de Graff J, Ghassabian A, Jaddoe VWV, Tiemeier H, Roza SJ. Folate concentrations during pregnancy and autistic traits in the offspring. The Generation R Study. 2015 Jun;25(3):431-3. doi: 10.1093/eurpub/cku126. Epub 2014 Jul 31.
55. Adams JB, Audhya T, Geis E, Gehn E, Fimbres V, Pollard EL et al. Comprehensive nutritional and dietary intervention for autism spectrum disorder—A randomized, controlled 12-Month trial. 2018 Mar; 10(3): doi: 10.3390/nu10030369.
56. Li Q, Yang T, Chen L, Dai Y, Wu LJ, Jia FY et al. Serum folate status is primarily associated with neurodevelopment in children with autism spectrum disorders aged three and under—A multi-center study in China. 2021 May 13. doi: 10.3389/fnut.2021.661223.
57. Sun C, Zou M, Zhao D, Xia W, Wu L. Efficacy of folic acid supplementation in autistic children participating in structured teaching: An open-label trial. China. 2016 Jun 7;8(6):337. doi: 10.3390/nu8060337.
58. Schmidt RJ, Hansen RL, Hartiala J, Allayee H, Schimidt LC, Tancredi DJ et al. Prenatal vitamins, one-carbon metabolism gene variants, and risk for autism. 2011 Jul; 22(4): 476–485. doi: 10.1097/EDE.0b013e31821d0e30.
59. Braun JM, Froehlich T, Kalkbrenner A, Pfeiffer CM, Fazili Z, Yolton K et al. Brief report: are autistic behaviors in children related to prenatal vitamin use and maternal whole blood folate concentrations? 2014 Oct;44(10):2602-7. doi: 10.1007/s10803-014-2114-x.
60. De Vilbiss EA, Magnusson C, Gardner RM, Rai D, Newschaffer CJ, Lyall K et al. Antenatal nutritional supplementation and autism spectrum disorders in the Stockholm youth cohort: population-based cohort study. Estocolmo. 2017; 359 doi: <https://doi.org/10.1136/bmj.j4273>.
61. Raghavan R, Riley AW, Volk H, Caruso D, Hironaka L, Sices L et al. Maternal multivitamin intake, plasma folate and vitamin B12 levels and autism spectrum disorder risk in offspring. 2018 Jan;32(1):100-doi: 10.1111/ppe.12414. Epub 2017 Oct 6.
62. Virk J, Liew Z, Olsen J, Nohr EA, Catov JM, Ritz B. Preconceptional and prenatal supplementary folic acid and multivitamin intake and autism spectrum disorders. 2016 Aug;20(6):710-8. doi: 10.1177/1362361315604076. Epub 2015 Sep 25.
63. Schmidt RJ, Iosif AM, Angel EG, Ozoniff S. Association of maternal prenatal vitamin use with risk for autism spectrum disorder recurrence in young siblings. 2019 Apr 1;76(4):391-398. doi: 10.1001/jamapsychiatry.2018.3901.
64. Tan M, Yang T, Zhu J, Li Q, Lai X, Tang T et al. Maternal folic acid and micronutrient supplementation is associated with vitamin levels and symptoms in children with autism spectrum disorders. 2020 Jan; 91:109-115. doi: 10.1016/j.reprotox.2019.11.009. Epub 2019 Nov 21.
65. Zhong C, Tessing J, Lee BK, Lyall K. Maternal dietary factors, and the risk of autism spectrum disorders: A systematic review of existing evidence. 05 October 2020 <https://doi.org/10.1002/aur.2402>.
66. Adams JB, Audhya T, McDonough -Means S, Rubin RA, Quig D, Geis E et al. Effect of a vitamin/mineral supplement on children and adults with autism. 2011 Dec 12; 11:111. doi: 10.1186/1471-2431-11-111.

67. Dolske MC, Spollen J, McKay S, Lancashire E, Tolbert L. A preliminary trial of ascorbic acid as supplemental therapy for autism. Birmingham. 1993 Sep;17(5):765-74. doi: 10.1016/0278-5846(93)90058-z.
68. Adams JB, Holloway C. Pilot study of a moderate dose multivitamin/mineral supplement for children with autistic spectrum disorder. 2004 Dec;10(6):1033-9. doi: 10.1089/acm.2004.10.1033.
69. Adams JB, George F, Audhya T. Abnormally high plasma levels of vitamin B6 in children with autism not taking supplements compared to controls not taking supplements. 2006 Jan-Feb;12(1):59-63. doi: 10.1089/acm.2006.12.59.
70. Gao L, Cui SS, Han Y, Dai W, Su YY, Zhang X. Does periconceptional fish consumption by parents affect the Incidence of autism spectrum disorder and intelligence deficiency? A Case-control study in Tianjin, China. 2016 Dec;29(12):885-892. doi: 10.3967/bes2016.118.
71. House JS, Mendez M, Maguire RL, Gonzales- Nahm S, Huang Z, Daniels J et al. Periconceptional maternal Mediterranean diet is associated with favorable offspring behaviors and altered CpG methylation of imprinted genes. 2018 Sep 7. doi: 10.3389/fcell.2018.00107.
72. Li YM, Shen YD, Li YJ, Xun GL, Liu H, Wu RR et al. Maternal dietary patterns, supplements intake and autism spectrum disorders: A preliminary case-control study. 2018 Dec;97(52):e13902. doi: 10.1097/MD.00000000000013902.
73. Kruizinga I, Visser JC, Van Batenburg-Eddes T, Carter AS, Jansen W, Raat H. Screening for autism spectrum disorders with the brief infant-toddler social and emotional assessment. 2014 May 22;9(5):e97630. doi: 10.1371/journal.pone.0097630.
74. Lyall K, Munger KL, O'Reilly AJ, Santangelo SL, Ascherio A. Maternal dietary fat intake in association with autism spectrum disorders. 2014 May 22;9(5):e97630. doi: 10.1371/journal.pone.0097630.
75. Frustaci A, Neri M, Cesario A, Adams JB, Domenici E, Bernardina BD, Bonassi S. Oxidative stress-related biomarkers in autism: systematic review and meta-analyses. 2012 May 15;52(10):2128-41. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.03.011.
76. Pangrazzi L, Balasco L, Bozzi Y. Oxidative Stress, and Immune System Dysfunction in autism spectrum disorders. 2020 May 6. doi: 10.3390/ijms21093293.
77. Jenkins TA, Nguyen JCD, Polgaze KE, Bertrand PP. Influence of tryptophan and serotonin on mood and cognition with a possible role of the gut-brain Axis. 2016 Jan 20. doi: 10.3390/nu8010056.
78. Steenbergen L, Jongkees BJ, Sellaro R, Colzato LS. Tryptophan supplementation modulates social behavior: A review. 2016 May; 64:346-58. doi: 10.1016/j.neubiorev.2016.02.022.
79. Spencer JPE. Flavonoids and brain health: multiple effects underpinned by common mechanisms. 2009 Dec;4(4):243-50. doi: 10.1007/s12263-009-0136-3.
80. Vafeiadou K, Vauzour D, Lee HY, Rodriguez-Mateos A, Williams RJ, Stencer JPE. The citrus flavanone naringenin inhibits inflammatory signaling in glial cells and protects against neuroinflammatory injury. 2009 Apr 1;484(1):100-9. doi: 10.1016/j.abb.2009.01.016

## CONTATO

Mariane Rocha Stellato: mariane.stellato@gmail.com