

PADRÃO DE METILAÇÃO DO DNA NO GENE DO RECEPTOR DE OCITOCINA (OXTR) EM UMA AMOSTRA PEDIÁTRICA COM TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA (TEA) E SEUS GENITORES ATENDIDOS NO INSTITUTO DE PSIQUIATRIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO (IPUB/UFRJ)

**PETHERSEN JOSÉ MORAES DOS REIS BUENO ROCHA**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO  
Campos dos Goytacazes – RJ  
Fevereiro – 2026

PADRÃO DE METILAÇÃO DO DNA NO GENE DO RECEPTOR DE OCITOCINA (OXTR) EM UMA AMOSTRA PEDIÁTRICA COM TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA (TEA) E SEUS GENITORES ATENDIDOS NO INSTITUTO DE PSIQUIATRIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO (IPUB/UFRJ)

**PETHERSEN JOSÉ MORAES DOS REIS BUENO ROCHA**

Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia pelo Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia.

Orientador (a): Prof. Dr. Álvaro Fabrício Lopes Rios

Campos dos Goytacazes – RJ  
Fevereiro – 2026

## FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pelo autor.

R672 Rocha, Pethersen José Moraes dos Reis Bueno.

PADRÃO DE METILAÇÃO DO DNA NO GENE DO RECEPTOR DE OCITOCINA (*OXTR*) EM UMA AMOSTRA PEDIÁTRICA COM TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA (TEA) E SEUS GENITORES ATENDIDOS NO INSTITUTO DEPSIQUIATRIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO (IPUB/UFRJ). / Pethersen José Moraes dos Reis Bueno Rocha. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2026.

105 f. : il.  
Inclui bibliografia.

Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia, 2026.

Orientador: Álvaro Fabrício Lopes Rios.

1. Transtorno do Espectro Autista. 2. Epigenética. 3. Metilação do DNA. 4. *OXTR*. 5. Ocitocina. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 570


PADRÃO DE METILAÇÃO DO DNA NO GENE DO RECEPTOR DE OCITOCINA (OXTR) EM UMA AMOSTRA PEDIÁTRICA COM TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA (TEA) E SEUS GENITORES ATENDIDOS NO INSTITUTO DE PSIQUIATRIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO (IPUB/UFRJ)

## PETHERSEN JOSÉ MORAES DOS REIS BUENO ROCHA

Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia pelo Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia.


Aprovado em 23 de fevereiro de 2026

Banca examinadora:

Documento assinado digitalmente  
 MILTON MASAHIKO KANASHIRO  
Data: 25/02/2026 17:28:27-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Dr. Milton Masahiko Kanashiro (Doutor em Biociências e Biotecnologia) – UENF


Documento assinado digitalmente  
 VICTOR MARTIN QUINTANA FLORES  
Data: 25/02/2026 10:51:58-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Dr. Victor Martin Quintana Flores (Doutor em Biociências e Biotecnologia) – UENF

---

Dra. Juliana Rodrigues Leopoldo (Doutora em Bioquímica) – UFV

Documento assinado digitalmente  
 ALVARO FABRICIO LOPES RIOS  
Data: 06/03/2026 08:23:57-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Dr. Álvaro Fabrício Lopes Rios (Doutor Ciências Biológicas) – UENF  
(Orientador)



Governo do Estado do Rio de Janeiro  
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro  
Diretoria do Centro de Biociências e Biotecnologia

## ANEXO

Prezados membros da Comissão Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia,

Venho por meio desta, confirmar que o discente Pethersen José Moraes dos Reis Bueno Rocha, foi aprovado por unanimidade em sua defesa de mestrado.

Devido a problemas com o site de assinatura eletrônica do governo federal, a Profa. Dra. Juliana Rodrigues Leopoldo (UFV) não conseguiu assinar os documentos da defesa.

Mesmo assim, confirmo que a Dra. Juliana aprovou o candidato Pethersen José Moraes dos Reis Bueno Rocha.

Grato.

**Campos dos Goytacazes, 06 março de 2026**



Documento assinado eletronicamente por **Alvaro Fabricio Lopes Rios**, Professor, em 06/03/2026, às 08:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento nos art. 28º e 29º do [Decreto nº 48.209, de 19 de setembro de 2022](#) e no art. 4º do [Decreto nº 48.013, de 04 de abril de 2022](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [http://sei.rj.gov.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=6](http://sei.rj.gov.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=6), informando o código verificador **126432717** e o código CRC **F821BD80**.

Referência: Processo nº SEI-260002/000669/2026

SEI nº 126432717

Avenida Alberto Lamego, 2000, - Bairro Pq. Califórnia, Campos dos Goytacazes/RJ, CEP 28013-602

Telefone: - [www.uenf.br](http://www.uenf.br)

## DEDICATÓRIA

*Dedico esta etapa àquele que, desde minha tenra idade, incentivou-me a estudar e a construir minha trajetória profissional.*

*Sua visão da educação, sua inteligência e sua incansável sede pelo conhecimento moldaram meu caráter e impulsionaram meu crescimento moral e profissional.*

*Sua dedicação à formação de seus filhos espirituais jamais foi limitada por sua enfermidade, nem mesmo quando se aproximava sua partida.*

*Sua presença permanece viva em nós, assim como seu legado, e este mestrado é uma prova concreta de tudo o que semeou.*

*Padre José Olavo Pires Trindade,  
(In memoriam).*

## AGRADECIMENTOS

À Deus e à Nossa Senhora, fonte de toda graça, por me sustentarem nos momentos de incerteza, por fortalecerem minha fé e por me concederem inúmeras bênçãos ao longo deste percurso. Sem a presença constante, o amparo espiritual e a providência divina, a conclusão desta etapa não teria sido possível.

Aos meus pais e à minha irmã, meu alicerce, por todo o amor, sacrifício, abdições e compreensão. A distância física nunca diminuiu a presença de vocês em minha vida; pelo contrário, foi o apoio incondicional da minha família que me permitiu seguir adiante na busca pela realização dos meus sonhos.

À minha namorada, Luísa, por caminhar ao meu lado com paciência, resiliência e carinho, mesmo quando as circunstâncias se mostraram adversas. Seu apoio, compreensão e afeto foram fundamentais para que eu não desistisse nos momentos mais difíceis.

Aos meus amigos do mestrado, companheiros de jornada, por dividirem comigo os desafios cotidianos dos experimentos, das aulas, dos prazos e das responsabilidades acadêmicas. A convivência e o apoio mútuo tornaram essa caminhada mais leve e significativa.

A todos os técnicos e professores do Laboratório de Biotecnologia e do Laboratório de Melhoramento Genético e Reprodução Animal, pelo suporte técnico, pela disponibilidade e pela colaboração constante ao longo da execução dos experimentos.

À Dra. Laina Quagliato, colaboradora deste projeto, e às alunas Izabely e Angélica, pela valiosa contribuição no envio das amostras, sempre com solicitude, parceria e elevado compromisso científico.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Álvaro Fabrício Lopes Rios, por me acolher em seu laboratório, confiar no meu trabalho e me apresentar ao campo da epigenética. Sua orientação, disponibilidade e exemplo profissional foram fundamentais para minha formação científica e pessoal.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), por proporcionar um ambiente de aprendizado, crescimento intelectual e amadurecimento pessoal e profissional ao longo desta trajetória.

Às instituições UENF, CAPES e FAPERJ, pelo fomento e incentivo à pesquisa científica, sem os quais a realização deste trabalho não teria sido possível.

Por fim, a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para esta conquista, deixo minha sincera gratidão.

Muito obrigado!

“A solução é formar bem a juventude”  
(Pe. José Olavo Pires Trindade – *In Memoriam*)

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	23
1.1	Transtornos Mentais e do Neurodesenvolvimento	23
1.2	Epigenética na etiologia dos Transtornos do Neurodesenvolvimento	28
1.3	O TEA	33
1.4	O gene do receptor de ocitocina ( <i>OXTR</i> )	40
1.4.1	A ocitocina	40
1.4.2	O receptor de ocitocina ( <i>OXTR</i> )	42
1.4.3	A metilação do gene <i>OXTR</i> e associação ao TEA	47
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	49
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	51
3.1	Geral	51
3.2	Específicos	51
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b>	52
4.1	Contexto do estudo	52
4.2	População do estudo e critérios de elegibilidade	53
4.3	Coleta de amostras e dados dos participantes	54
4.4	Extração de DNA do sangue periférico	56
4.5	Regiões analisadas no gene <i>OXTR</i>	57
4.6	Reação em Cadeia da Polimerase - PCR	60
4.7	Análise quantitativa dos níveis de metilação do DNA	60
4.7.1	Digestão Enzimática por enzima sensível à metilação - HpaII	61
4.7.2	PCR em tempo real para quantificação da metilação	61
4.8	Análise Estatística	62
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b>	63
5.1	Caracterização das amostras do estudo	63
5.1.1	Dados sociodemográficos	63
5.1.2	Gestacionais e perinatais	65
5.1.3	Distribuição geográfica	67
5.2	Associações entre as variáveis sociodemográficas e clínicas e a escala de CARS <sup>68</sup>	
5.3	Metilação do DNA na região -934 em portadores de TEA autistas versus seus genitores	69
5.4	Metilação do DNA na região -934 e correlação variáveis sociodemográficas e clínicas	73
5.4.1	Idade	73

5.4.2	Sexo e raça.....	76
5.4.3	Variáveis gestacionais e perinatais .....	79
5.4.4	Histórico clínico.....	83
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>86</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>94</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>96</b>

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1-** Agrupamento dos Transtornos do Neurodesenvolvimento segundo DSM-V, CID-10 e CID-11. 25
- Tabela 2-** Sequência dos primers utilizados para amplificação e quantificação da metilação das regiões gênicas do estudo. 59
- Tabela 3- Características sociodemográficas dos portadores de TEA e de seus genitores.** As variáveis categóricas foram apresentadas como frequência absoluta e relativa [n (%)], enquanto as variáveis contínuas foram descritas por mediana e intervalo interquartil (IQR). 62
- Tabela 4- Características gestacionais e pré-natais dos participantes da pesquisa.** Os dados incluem características do parto, tempo gestacional, idade materna, presença de problemas na gestação, uso de substâncias e realização de pré-natal. Variáveis categóricas são apresentadas como n (%), e variáveis contínuas como mediana (intervalo interquartil, IQR). 64
- Tabela 5- Características clínicas e de desenvolvimento dos portadores de TEA.** Os dados incluem desenvolvimento da linguagem e da marcha, histórico de alergias e psiquiátrico familiar, e avaliação do comportamento por meio da Escala de CARS. Variáveis categóricas são apresentadas como n (%) e variáveis contínuas como mediana (intervalo interquartil, IQR). 65

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Mapa mental dos Transtornos Mentais de acordo com o DSM-V. **Fonte:** Elaborado pelo autor (2026) 25
- Figura 2**- Esquema representativo dos fatores ambientais externos e internos aos quais o indivíduo está exposto ao longo do ciclo de vida. **Fonte:** Adaptado de Wild (2012). 29
- Figura 3** - Processo de metilação e desmetilação da citosina. **Fonte:** Elaborado pelo autor (2026). 31
- Figura 4** - Mapa de distribuição dos casos de TEA entre o sexo masculino e feminino no mundo até 2021. **Fonte:** Adaptado de IHME (2026) 35
- Figura 5** -Tabela extraída do censo 2022 do IBGE, demonstrando a prevalência de autismo na população brasileira (em %) e por sexo. **Fonte:** IBGE (2025). 36
- Figura 6** - Estrutura do gene OXTR. As caixas em preto correspondem aos éxons não transcritos, enquanto a porção em verde indica a região codificante do gene. O segmento compreendido entre os éxons 1 e 3 caracteriza uma ilha CpG. As regiões MT1–MT4 representam porções do gene previamente definidas como regiões de estudo por Kusui et al. (2001). No interior da região MT2 localiza-se o sítio CpG –934, destacando-se, abaixo, a região investigada no presente trabalho, incluindo o sítio de restrição reconhecido pela enzima HpaII, em vermelho. **Fonte:** Adaptado de Kusui et al. (2001) e Yuksel et al.(2016). 43
- Figura 7** -Vias de sinalização do receptor OXTR. **Fonte:** Adaptado de Devost, Wrzal e Zingg (2008). 44
- Figura 8** - Fluxograma representativo do delineamento do estudo e das etapas de recrutamento dos participantes. **Fonte:** Elaborado pelo autor (2026) 55
- Figura 9 - Visualização genômica da região do gene OXTR no UCSC Genome Browser.** A imagem apresenta a organização estrutural do gene, com destaque para éxons e íntrons (barra azul e linhas tracejadas, respectivamente), além da densidade de sítios CpG ao longo do locus. As trilhas inferiores representam perfis de metilação do DNA obtidos a partir de diferentes tecidos humanos, incluindo regiões cerebrais (ex.: córtex pré-frontal) e sangue de cordão umbilical, evidenciando variações teciduais nos níveis de metilação ao longo da região analisada. A região destacada em azul corresponde a porção analisada no estudo, sobre uma região de variação

tecidual entre indivíduos. A escala genômica é indicada no topo da figura, permitindo a identificação precisa das coordenadas cromossômicas. **Fonte:** USCS (2026) 58

**Figura 10 - Distribuição dos participantes atendidos no IPUB/UFRJ.** O mapa mostra a distribuição geográfica dos participantes por regiões, preservando a privacidade. O IPUB/UFRJ, local de atendimento, está indicado com o ícone vermelho. Os demais ícones representam a residência do bairro de um ou mais participantes, sem expor endereços exatos (Elaborado pelo autor através do Google My Maps, 2026). 66

**Figura 11 - Distribuição dos níveis de metilação da região -934 do gene OXTR em portadores de TEA e seus genitores.** Os valores de metilação (%) são apresentados como boxplots, com a linha central indicando a mediana, as caixas representando o intervalo interquartil (Q1-Q3) e as hastes indicando os valores mínimos e máximos. Os pontos sobrepostos correspondem aos valores individuais de cada amostra. Em média, os filhos apresentaram  $\Delta = 1,45\%$  em relação às genitores ( $\Delta$  mediana = 0,73%). A comparação entre os grupos foi realizada pelo teste de Mann-Whitney ( $p = 0,2633$ ). **Fonte:** Elaborado pelo autor (2026). 67

**Figura 12 - Comparação da metilação do DNA entre filhos e genitores na região -934 do gene OXTR.** Heatmap mostrando o perfil de metilação de dois grupos (Filhos e Genitores) na região -934 do gene OXTR. A intensidade da cor indica o nível de metilação, onde tons mais escuros representam valores mais altos e tons mais claros valores mais baixos. A escala à direita indica os valores absolutos de metilação. A diferença entre os pares apresentou-se estatisticamente significativa ( $p < 0,0001$ ). **Fonte:** Elaborado pelo autor (2026). 68

**Figura 13 - Gráfico dos níveis de metilação da região -934 do OXTR em genitores (eixo Y) e filhos (eixo X).** Cada barra representa um par genitor-filho; a linha diagonal indica igualdade de metilação. Embora os filhos apresentem metilação consistentemente mais elevada, a correlação de Spearman não foi significativa ( $r_s = 0,30$ ;  $p = 0,19$ ). **Fonte:** Elaborado pelo autor (2026). 70

**Figura 14 - Associação entre a idade das crianças com TEA e os níveis de metilação do DNA no sítio CpG -934 do gene OXTR.** Gráfico de dispersão representando a relação entre a idade das crianças diagnosticadas com transtorno do espectro autista (TEA) (eixo x) e os níveis de metilação do DNA no sítio CpG -934 do gene OXTR (eixo y). Cada barra corresponde a um indivíduo analisado. A associação entre as variáveis foi avaliada por meio do teste de correlação de Spearman, não

sendo observada correlação significativa entre a idade e os níveis de metilação. A linha contínua representa o ajuste de regressão linear utilizado apenas para visualização da tendência dos dados, enquanto as linhas pontilhadas indicam o intervalo de confiança de 95%. **Fonte:** Elaborado pelo autor (2026). 72

**Figura 15 - Associação entre idade dos genitores e metilação do DNA no sítio CpG -934 do gene OXTR.** Gráfico de dispersão ilustrando a relação entre a idade dos genitores (eixo x) e os níveis de metilação do DNA no sítio CpG -934 do gene OXTR (eixo y). Cada barra representa um indivíduo. A correlação entre as variáveis foi analisada por meio do teste de correlação de Spearman, evidenciando uma associação negativa moderada, mas não significativa. A linha contínua corresponde ao ajuste de regressão linear para fins ilustrativos, e as linhas pontilhadas representam o intervalo de confiança de 95%. **Fonte:** Elaborado pelo autor (2026).

73

**Figura 16 - Associação entre idade materna durante a gestação e metilação do DNA no sítio CpG -934 do gene OXTR em crianças.** Gráfico de dispersão representando a relação entre a idade materna durante a gestação (eixo x) e os níveis de metilação do DNA no sítio CpG -934 do gene OXTR nas crianças (eixo y). Cada barra corresponde a um indivíduo analisado. A associação entre as variáveis foi avaliada por meio do teste de correlação de Spearman, indicando uma correlação negativa moderada. A linha contínua representa o ajuste da regressão linear utilizado apenas para visualização da tendência dos dados, enquanto as linhas pontilhadas indicam o intervalo de confiança de 95%. **Fonte:** Elaborado pelo autor (2026). 74

**Figura 17- Comparação dos níveis de metilação do DNA no sítio CpG -934 do gene OXTR entre crianças do sexo masculino e feminino.** Gráfico de barras representando os níveis de metilação do DNA (%5mC) no sítio CpG -934 do gene OXTR em crianças diagnosticadas com transtorno do espectro autista (TEA), estratificadas de acordo com o sexo biológico. As barras representam a mediana dos valores de metilação em cada grupo, e as hastes indicam a dispersão dos dados. A comparação entre os grupos masculino e feminino foi realizada por meio do teste não paramétrico de Mann-Whitney, sendo observada diferença estatisticamente significativa entre os sexos ( $p < 0,05$ ), indicada pelo asterisco. **Fonte:** Elaborado pelo autor (2026). 75

**Figura 18 - Metilação do OXTR em portadores de TEA segundo raça/cor.** Gráfico de barras representando os níveis de metilação do DNA (%5mC) no sítio CpG -934

do gene OXTR em crianças com TEA, de acordo com a raça/cor. As barras correspondem à medida de tendência central e as hastes à variabilidade. A comparação entre os grupos foi realizada por teste de Kruskal–Wallis, não assumindo distribuição normal dos dados, considerando-se um nível de significância de 5% ( $p > 0,05$ ). **Fonte:** Elaborado pelo autor (2026). 76

**Figura 19 - Metilação do OXTR em genitores segundo raça/cor.** Gráfico de barras mostrando os níveis de metilação do DNA (%5mC) no sítio CpG -934 do gene OXTR em genitores, estratificados por raça/cor autodeclarada. As barras representam a medida de tendência central, com hastes indicando a dispersão dos dados. As diferenças entre os grupos foram avaliadas por teste de Kruskal–Wallis, não assumindo distribuição normal dos dados, considerando-se um nível de significância de 5% ( $p > 0,05$ ). **Fonte:** Elaborado pelo autor (2026). 77

**Figura 20- Metilação do OXTR segundo o tipo de parto.** Gráfico de barras comparando os níveis de metilação do DNA no sítio CpG -934 do gene OXTR em crianças nascidas por parto normal e cesariana. As barras representam a mediana e as hastes a variabilidade dos dados. A comparação entre os grupos foi realizada pelo teste de Mann–Whitney, não sendo observada diferença estatisticamente significativa (ns). **Fonte:** Elaborado pelo autor (2026). 78

**Figura 21 - Associação entre problemas gestacionais e metilação do OXTR no filho.** Gráfico de barras mostrando os níveis de metilação do DNA no sítio CpG -934 do gene OXTR em filhos de mães com e sem relato de problemas durante a gestação. As barras representam a mediana, com hastes indicando a dispersão dos dados. A análise foi conduzida utilizando o teste de Mann–Whitney, não sendo observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (ns). **Fonte:** Elaborado pelo autor (2026). 79

**Figura 22 - Associação entre uso de substâncias durante a gestação e metilação do OXTR no filho.** Gráfico de barras representando os níveis de metilação do DNA no sítio CpG -934 do gene OXTR em filhos de mães com e sem histórico de uso de substâncias durante a gestação. As barras indicam a mediana e as hastes a variabilidade dos dados. A comparação entre os grupos foi realizada pelo teste de Mann–Whitney, não sendo observada diferença estatisticamente significativa (ns). **Fonte:** Elaborado pelo autor (2026). 81

**Figura 23 - Associação entre a idade de início da fala e os níveis de metilação do DNA no sítio CpG -934 do gene OXTR em crianças e adolescentes com TEA.**

O gráfico apresenta a distribuição dos níveis de metilação (%5mC) de acordo com a idade de início da fala, categorizada em antes de 1 ano, entre 1 ano e 1 ano e 6 meses, e após os 2 anos. Cada ponto representa um indivíduo, enquanto as barras indicam a mediana e a dispersão dos dados. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as medianas dos grupos (teste de Kruskal–Wallis,  $p = 0,607$ ).

**Fonte:** Elaborado pelo autor (2026).

82

**Figura 24 - Associação entre a idade de início da marcha e os níveis de metilação do DNA no sítio CpG -934 do gene OXTR em crianças e adolescentes com TEA.**

O gráfico apresenta a distribuição dos níveis de metilação (%5mC) de acordo com a idade de início da marcha, categorizada em antes de 1 ano, entre 1 ano e 1 ano e 6 meses, e após os 2 anos. Cada ponto representa um indivíduo, enquanto as barras indicam a mediana e a dispersão dos dados. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as medianas dos grupos (teste de Kruskal–Wallis,  $p = 0,522$ ). **Fonte:** Elaborado pelo autor (2026).

83

**Figura 25 - Figura 25. Comparação dos níveis de metilação do DNA (%5mC) no sítio CpG -934 do gene OXTR em portadores de TEA com e sem histórico familiar psiquiátrico/neurológico.** Os dados estão apresentados como mediana e intervalo interquartil representados por barra, com os pontos individuais representando cada participante. A comparação entre os grupos foi realizada por meio do teste de Mann–Whitney, não sendo observadas diferenças estatisticamente significativas entre as medianas ( $p > 0,05$ ). **Fonte:** Elaborado pelo autor (2026).

84

## LISTA DE ABREVIATURAS

- **%5mC** – Percentual de 5-metilcitosina
- **APA** – American Psychiatric Association (Associação Americana de Psiquiatria)
- **ARID1B** – AT-Rich Interaction Domain 1B
- **ASH1L** – ASH1 Like Histone Lysine Methyltransferase
- **CARS** – Childhood Autism Rating Scale
- **CHD8** – Chromodomain Helicase DNA Binding Protein 8
- **CID-10** – Classificação Internacional de Doenças, 10ª edição
- **CID-11** – Classificação Internacional de Doenças, 11ª edição
- **CpG** – Dinucleotídeo citosina-fosfato-guanina
- **CT** – Cycle Threshold
- **CYP2E1** – Citocromo P450, família 2, subfamília E, membro 1
- **DAWBA** – Development and Well-Being Assessment
- **DLGAP2** – Proteína associada ao disco grande 2
- **DNA** – Ácido desoxirribonucleico
- **DNMTs** – DNA metiltransferases
- **DOHAD** – Developmental Origin of Health and Disease (Origem Desenvolvimentista da Saúde e da Doença)
- **DSM-III** – Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 3ª edição
- **DSM-IV** – Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4ª edição
- **DSM-V** – Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5ª edição
- **DSM-V-TR** – Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5ª edição, texto revisado
- **EDTA** – Ácido etilenodiamino tetra-acético
- **EcoRI** – Enzima de restrição EcoRI
- **FMR1** – Fragile X Mental Retardation 1
- **GC** – Conteúdo de guanina e citosina
- **Gi** – Subunidade inibitória da proteína G
- **GPCR** – G-Protein Coupled Receptor (Receptor Acoplado à Proteína G)
- **GRCh38/hg38** – Genome Reference Consortium Human Build 38
- **HPA** – Eixo Hipotálamo–Hipófise–Adrenal
- **HpaII** – Enzima de restrição HpaII
- **IBGE** – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

- **IHME** – Institute for Health Metrics and Evaluation
- **IIQ** – Intervalo Interquartil
- **IPUB** – Instituto de Psiquiatria
- **IPUB/UFRJ** – Instituto de Psiquiatria da Universidade Federal do Rio de Janeiro
- **KADS-PL (KSADS-PL)** – Kiddie Schedule for Affective Disorders and Schizophrenia – Present and Lifetime Version
- **Kb** – Quilobase
- **KMT2A** – Lysine Methyltransferase 2A
- **KpnI** – Enzima de restrição KpnI
- **LBT** – Laboratório de Biologia Translacional
- **MAPK** – Mitogen-Activated Protein Kinase
- **MECP2** – Methyl-CpG-Binding Protein 2
- **M.I.N.I.** – Mini International Neuropsychiatric Interview
- **mM** – Milimolar
- **MPAs** – Minor Physical Anomalies (Anomalias Físicas Menores)
- **MSRED-qPCR** – Methylation-Sensitive Restriction Enzyme Digestion followed by quantitative PCR
- **MT** – Methylation Target (Alvo de metilação)
- **NaCl** – Cloreto de sódio
- **ncRNAs** – RNAs não codificantes
- **ng** – Nanograma
- **NH<sub>4</sub>Cl** – Cloreto de amônio
- **NH<sub>4</sub>CO<sub>3</sub>** – Carbonato de amônio
- **NLGN** – Neuroligin
- **NRXN** – Neurexin
- **OMS** – Organização Mundial da Saúde
- **OX** – Ocitocina
- **OXTR** – Receptor de Ocitocina
- **PBMC** – Peripheral Blood Mononuclear Cells (Células Mononucleares do Sangue Periférico)
- **PCR** – Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)
- **pH** – Potencial hidrogeniônico
- **PI3K-mTOR** – Via fosfatidilinositol-3-quinase / mechanistic target of rapamycin
- **PKC** – Protein Kinase C

- **PLC** – Phospholipase C
- **rpm** – Rotações por minuto
- **RhoA** – Ras Homolog Family Member A
- **ROK** – Rho-associated kinase
- **SAM** – S-adenosilmetionina
- **SARS-CoV-2** – Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2
- **SDS** – Dodecil sulfato de sódio
- **SETD5** – SET Domain Containing 5
- **SHANK3** – SH3 and Multiple Ankyrin Repeat Domains 3
- **SLC6A4** – Solute Carrier Family 6 Member 4 (Transportador de serotonina)
- **SNP** – Single Nucleotide Polymorphism (Polimorfismo de nucleotídeo único)
- **TDAH** – Transtorno do Déficit de Atenção com Hiperatividade
- **TEA** – Transtorno do Espectro Autista
- **TETs** – Ten-Eleven Translocation dioxygenases
- **TLH** – Tampão de lise de hemácias
- **TNDs** – Transtornos do Neurodesenvolvimento
- **Tris-HCl** – Tris(hidroximetil)aminometano-cloridrato
- **TSC1/2** – Tuberous Sclerosis Complex 1 e 2
- **TSS** – Transcription Start Site (Sítio de início da transcrição)
- **TCLE** – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
- **uL (μL)** – Microlitro
- **uM (μM)** – Micromolar
- **UFRJ** – Universidade Federal do Rio de Janeiro
- **USCS (UCSC)** – University of California Santa Cruz Genome Browser
- **UTIN** – Unidade de Terapia Intensiva Neonatal

## RESUMO

O Transtorno do Espectro Autista (TEA) é uma condição complexa do neurodesenvolvimento, caracterizada por prejuízos persistentes na comunicação e interação social, associados a padrões restritos e repetitivos de comportamento, com heterogeneidade clínica e etiológica. Evidências indicam que a arquitetura genética do TEA, embora relevante, é insuficiente para explicar isoladamente a variabilidade fenotípica, reforçando o papel de mecanismos epigenéticos como mediadores das interações entre predisposição genética e exposições ambientais ao longo do desenvolvimento. Nesse contexto, a metilação do DNA destaca-se como um mecanismo regulatório central, capaz de modular a expressão gênica de forma dinâmica e sensível às experiências precoces. Entre os sistemas neurobiológicos implicados no TEA, o sistema da ocitocina tem recebido atenção especial devido à sua atuação na sociabilidade, no vínculo afetivo e na cognição social. A ação da ocitocina depende da expressão do seu receptor, codificado pelo gene *OXTR*, cuja regulação epigenética tem sido associada a diferenças individuais em comportamento social, conectividade funcional cerebral e vulnerabilidade a transtornos do neurodesenvolvimento. Estudos prévios apontam que regiões regulatórias do *OXTR*, especialmente a região promotora MT2 e o sítio CpG-934, constituem alvos epigeneticamente sensíveis e funcionalmente relevantes. Assim, investigamos o padrão de metilação do DNA no sítio CpG-934 do gene *OXTR* em portadores de TEA e seus respectivos genitores, em uma amostra brasileira, além de explorar sua relação com variáveis sociodemográficas, gestacionais, perinatais e clínicas. Os resultados evidenciaram um perfil epigenético diferencial entre gerações, caracterizado por níveis mais elevados de metilação do CpG-934 nos portadores de TEA em comparação aos genitores, especialmente em análises pareadas. Adicionalmente, foram observadas variações nos níveis de metilação associadas a algumas características investigadas, reforçando a complexidade regulatória desse locus epigenético. Em conjunto, os achados contribuem para a compreensão do papel da metilação do *OXTR* no TEA e destacam a relevância de investigações epigenéticas na população brasileira, ampliando o entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos no transtorno.

**Palavras-chave:** Transtorno do Espectro Autista; Epigenética; Metilação do DNA; *OXTR*; Ocitocina.

## ABSTRACT

Autism Spectrum Disorder (ASD) is a complex neurodevelopmental condition characterized by persistent impairments in communication and social interaction, associated with restricted and repetitive patterns of behavior, and marked by substantial clinical and etiological heterogeneity. Evidence indicates that the genetic architecture of ASD, although relevant, is insufficient to fully explain the phenotypic variability, reinforcing the role of epigenetic mechanisms as mediators of interactions between genetic predisposition and environmental exposures throughout development. In this context, DNA methylation stands out as a central regulatory mechanism capable of dynamically modulating gene expression in a manner sensitive to early-life experiences. Among the neurobiological systems implicated in ASD, the oxytocin system has received particular attention due to its involvement in sociability, attachment, and social cognition. The effects of oxytocin depend on the expression of its receptor, encoded by the OXTR gene, whose epigenetic regulation has been associated with individual differences in social behavior, brain functional connectivity, and vulnerability to neurodevelopmental disorders. Previous studies indicate that regulatory regions of the OXTR gene, especially the MT2 promoter region and the CpG-934 site, constitute epigenetically sensitive and functionally relevant targets. Thus, we investigate the DNA methylation pattern at the CpG-934 site of the OXTR gene in individuals with ASD and their respective parents, in a Brazilian sample, as well as to explore its relationship with sociodemographic, gestational, perinatal, and clinical variables. The results revealed a differential epigenetic profile between generations, characterized by higher levels of CpG-934 methylation in individuals with ASD compared to their parents, particularly in paired analyses. Additionally, variability in DNA methylation levels was observed in association with some of the investigated characteristics, reinforcing the regulatory complexity of this epigenetic locus. Taken together, these findings contribute to a better understanding of the role of OXTR DNA methylation in ASD and highlight the relevance of epigenetic investigations in the Brazilian population, expanding knowledge of the molecular mechanisms underlying the disorder.

**Keywords:** Autism Spectrum Disorder; Epigenetics; DNA methylation; OXTR; Oxytocin.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Transtornos Mentais e do Neurodesenvolvimento

Os transtornos mentais, comportamentais e do neurodesenvolvimento constituem um importante problema de saúde pública em escala global, afetando aproximadamente 13% da população mundial (Sowa-Kucma; Stachowicz, 2023). Segundo o Manual Diagnóstico e Estatístico dos Transtornos Mentais (5ª edição), os transtornos mentais correspondem a síndromes caracterizadas por perturbações clinicamente significativas nos domínios cognitivo, emocional e comportamental, estando associadas a disfunções em mecanismos psicológicos, biológicos, genéticos, físico-químicos ou relacionados ao desenvolvimento do funcionamento cerebral (APA, 2014).

Essas condições encontram-se, em geral, vinculadas a sofrimento psíquico e a diferentes graus de incapacidade, podendo comprometer a realização das atividades sociais, acadêmicas e profissionais pelo indivíduo (APA, 2014; Christensen *et al.*, 2020). Estimativas globais indicam que cerca de uma em cada três pessoas desenvolverá algum transtorno mental ao longo da vida, e, embora muitos desses quadros respondam ao tratamento, sua presença frequentemente implica perdas substanciais de saúde, estigmatização social, marginalização e períodos de redução da capacidade laboral, com repercussões econômicas importantes (Christensen *et al.*, 2020).

Dois sistemas classificatórios são amplamente utilizados em âmbito mundial para o diagnóstico e a categorização dos transtornos mentais, a Classificação Internacional de Doenças, em sua 10ª e 11ª edições (CID-10 e CID-11), elaborada pela Organização Mundial da Saúde (Gaebel; Stricker; Kerst, 2020), e o Manual Diagnóstico e Estatístico dos Transtornos Mentais, em sua 5ª edição com texto revisado (DSM-5-TR), publicado pela Associação Americana de Psiquiatria (APA, 2014).

No contexto brasileiro, a CID-10 ainda constitui o principal instrumento oficial adotado no sistema público de saúde, embora esteja prevista a implementação progressiva da CID-11 a partir de 2027, conforme estabelecido pela Nota Técnica nº 91/2024 do Ministério da Saúde (Brasil, 2024). Paralelamente, o DSM-5-TR é amplamente utilizado por profissionais e pesquisadores da área da saúde mental no

país, sobretudo em contextos clínicos, acadêmicos e de pesquisa, sendo considerado complementar à CID (Ribeiro; Marteleto, 2023).

Esses sistemas classificatórios diferenciam-se quanto à forma de organização e agrupamento dos transtornos mentais. O DSM-5-TR organiza essas condições em 20 categorias diagnósticas, enquanto a CID-10 agrupa os transtornos mentais e comportamentais em 11 categorias principais, codificadas de F00 a F99. A CID-11 promoveu uma reestruturação substancial dessa classificação, organizando os transtornos mentais em 21 agrupamentos distintos e incorporando explicitamente os Transtornos do Neurodesenvolvimento como uma categoria específica, alinhando-se à concepção adotada no DSM-5-TR, como mostrado pela Tabela 1. Essa reorganização permitiu reunir condições que, anteriormente, encontravam-se dispersas em diferentes categorias diagnósticas (OMS, 2022). Vale ressaltar que os transtornos do desenvolvimento foram incorporados pela primeira vez às classificações diagnósticas no DSM-III, no qual o TEA passou a integrar essa categoria diagnóstica. Posteriormente, com a publicação do DSM-5, foi estabelecida a categoria dos transtornos do neurodesenvolvimento (TNDs), concebida como um agrupamento mais amplo e integrador de condições caracterizadas por alterações no desenvolvimento neurológico (Morris-Rosendahl; Crocq, 2020).

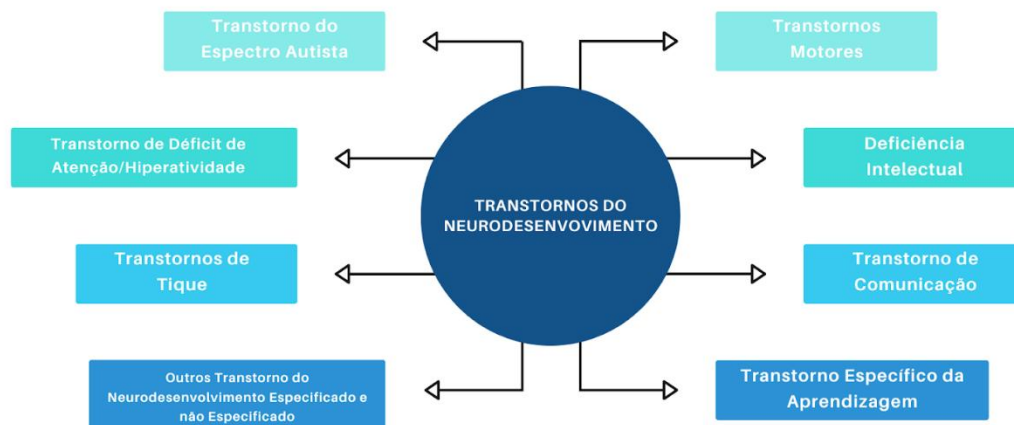
O desenvolvimento do capítulo de Transtornos Mentais, Comportamentais ou do Neurodesenvolvimento da CID-11 representou o processo mais amplo e participativo da história das classificações psiquiátricas, envolvendo especialistas de diferentes regiões do mundo, profissionais da saúde mental e usuários dos serviços (Gaebel; Stricker; Kerst, 2020).

**Tabela 1-** Agrupamento dos Transtornos do Neurodesenvolvimento segundo DSM-V, CID-10 e CID-11.

DSM-V-TR	CID-10	CID-11
-Transtorno do Neurodesenvolvimento (299, 307, 314, 315, 317-319).	-Retardo Mental (F70-73 e 78-79; -Transtornos do desenvolvimento psicológico (F80-82, 84, 88 e 89); e - Transtornos do comportamento e transtornos emocionais que aparecem habitualmente durante a infância ou a adolescência (F90 e 95).	-Transtornos do Neurodesenvolvimento (6A00–6A0Z).

**Fonte:** Elaborado pelo autor (2026)

Nesse contexto, ainda pelo Manual Diagnóstico e Estatístico dos Transtornos Mentais (5ª edição) os Transtornos do Neurodesenvolvimento são definidos como um grupo de condições com início no período do desenvolvimento, caracterizadas por déficits que produzem prejuízos persistentes no funcionamento pessoal, social, acadêmico ou ocupacional. Esse grupo inclui a deficiência intelectual, os transtornos da comunicação, o TEA, o transtorno do déficit de atenção com hiperatividade, os transtornos motores do neurodesenvolvimento, incluindo os transtornos de tiques, e os transtornos específicos da aprendizagem, entre outros (APA, 2014) (Figura 1).



**Figura 1** - Mapa mental dos Transtornos Mentais de acordo com o DSM-V. **Fonte:** Elaborado pelo autor (2026)

Os transtornos do neurodesenvolvimento resultam da interrupção de eventos rigorosamente coordenados do desenvolvimento cerebral e afetam mais de 3% das crianças em todo o mundo. Apresentam etiologia heterogênea e estão associados a comprometimentos cognitivos, comunicacionais, comportamentais adaptativos e psicomotores (Lukens; Eyo, 2022; Parenti *et al.*, 2020). Do ponto de vista genético, diferentes tipos de alterações, incluindo rearranjos cromossômicos, variações no número de cópias, inserções ou deleções e mutações pontuais, têm sido associados aos transtornos do neurodesenvolvimento. Alterações em vias regulatórias centrais, como o eixo PI3K-mTOR, bem como mutações em genes reguladores da transcrição e remodeladores de cromatina, exercem efeitos pleiotrópicos que dificultam a correlação direta entre genótipo e fenótipo (Velarde; Cardenas, 2022; Parenti *et al.*, 2020).

Além dos fatores genéticos, o ambiente pré-natal exerce papel fundamental no neurodesenvolvimento, atuando como um modulador crítico das trajetórias neurobiológicas iniciais (Lukens; Eyo, 2022; Doi; Usui; Shimada, 2022). Evidências indicam que a ativação imune materna, o estresse psicológico, a desnutrição e a exposição a drogas durante a gestação estão fortemente associados ao aumento do risco de transtornos do neurodesenvolvimento e transtornos psiquiátricos na prole, especialmente quando essas exposições ocorrem em janelas sensíveis do desenvolvimento fetal (Behnia *et al.*, 2015; Di Gesù *et al.*, 2024).

O cérebro em desenvolvimento apresenta elevada vulnerabilidade ao longo dos três trimestres gestacionais, período no qual ocorrem eventos críticos como a formação do tubo neural, a proliferação e migração neuronal, a sinaptogênese e a maturação progressiva dos circuitos neurais. Alterações nesses processos podem resultar em mudanças estruturais e funcionais duradouras, afetando domínios como cognição, comportamento social e regulação emocional (Doi; Usui; Shimada, 2022). Nesse contexto, infecções maternas, mesmo na ausência de transmissão vertical do agente infeccioso, são capazes de induzir respostas inflamatórias sistêmicas caracterizadas pela liberação de citocinas pró-inflamatórias que atravessam a placenta e afetam diretamente o cérebro fetal, interferindo na organização dos circuitos neurais e aumentando a suscetibilidade a desfechos neuropsiquiátricos (Chmielewska *et al.*, 2019).

Diversos fatores ambientais específicos têm sido associados a alterações no neurodesenvolvimento, incluindo deficiência de ácido fólico, exposição ao ácido valproico, uso de antidepressivos durante a gestação, exposição a substâncias tóxicas, tabagismo, parto prematuro, baixo peso ao nascer e restrição de crescimento intrauterino. Esses fatores podem atuar isoladamente ou de forma combinada, influenciando processos epigenéticos, inflamatórios e hormonais que modulam a expressão gênica durante o desenvolvimento cerebral (Vidovic *et al.*, 2023; Muller *et al.*, 2022).

Além disso, mudanças climáticas e condições ambientais adversas têm sido apontadas como elementos agravantes desses riscos, uma vez que contribuem para o aumento do estresse materno, da insegurança alimentar e da exposição a poluentes ambientais, intensificando respostas fisiológicas maternas capazes de impactar negativamente o ambiente intrauterino e, conseqüentemente, o neurodesenvolvimento fetal (Doi; Usui; Shimada, 2022; Zuccarello *et al.*, 2022).

No nível celular, o neurodesenvolvimento envolve a consolidação refinada das conexões neurais por meio da formação, manutenção e poda sináptica, processos altamente dinâmicos nos quais as células da glia desempenham papel central. A microglia e os astrócitos atuam não apenas na manutenção da homeostase sináptica e no suporte metabólico aos neurônios, mas também na modulação da plasticidade sináptica e na resposta inflamatória do sistema nervoso central (Kim; Cho; Yoon, 2020).

Em condições fisiológicas, essas células participam do refinamento dos circuitos neurais, entretanto, em contextos patológicos, a ativação excessiva ou desregulada da glia resulta na liberação exacerbada de citocinas pró-inflamatórias, aumento da citotoxicidade, eliminação sináptica aberrante e alterações na plasticidade sináptica. Esses mecanismos têm sido amplamente implicados na fisiopatologia dos transtornos do neurodesenvolvimento, incluindo o TEA, contribuindo para alterações duradouras na conectividade neural e no funcionamento dos circuitos envolvidos na sociabilidade, comunicação e regulação emocional (Kim; Cho; Yoon, 2020; Botelho; Silva; Borbely, 2024).

A complexidade clínica dos transtornos do neurodesenvolvimento, marcada por ampla heterogeneidade fenotípica, sobreposição de sintomas e altas taxas de comorbidade, representa um desafio significativo para o diagnóstico diferencial. No caso do TEA, recomenda-se uma avaliação abrangente e sistemática conduzida por profissionais especializados, com rastreamento precoce e repetido ao longo da infância, considerando a possibilidade de regressão ou surgimento tardio de sintomas (Olson; Bishop; Thurm, 2024).

## 1.2 Epigenética na etiologia dos Transtornos do Neurodesenvolvimento

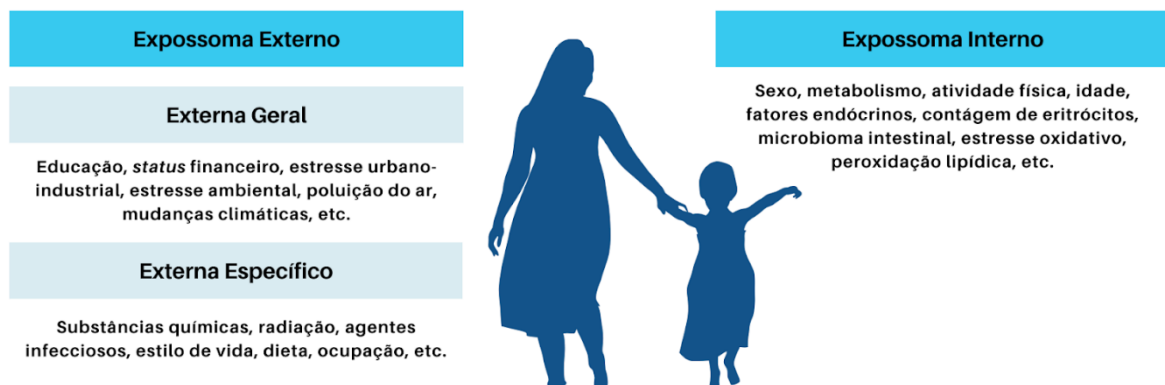
Os períodos intrauterino e neonatal são marcados por eventos moleculares e de programação gênica essenciais para a diferenciação celular e a formação dos diferentes tecidos e órgãos que constituem o indivíduo (Kanherkar *et al.*, 2014). Entretanto, inúmeros estudos têm demonstrado que falhas nessas etapas do desenvolvimento humano estão correlacionadas ao surgimento de doenças crônicas. Entre as patologias mais associadas, destacam-se as doenças metabólicas, coronarianas, além de transtornos mentais (Mendonça *et al.*, 2023; Bianco-Miotto *et al.*, 2017; Moore *et al.*, 2017; Montirosso *et al.*, 2016).

Uma hipótese para explicar esse fenômeno foi proposta pelo médico epidemiologista David James Purslove Barker, hoje conhecida como Origem Desenvolvimentista da Saúde e Doença (*Developmental Origin of Health and Disease – DOHAD*). Essa hipótese surge mediante observações que sugeriram uma maior associação entre ocorrência de doenças coronarianas em indivíduos que nasceram com baixo peso, sugerindo que o surgimento de doenças complexas tem origem em falhas nos mecanismos de desenvolvimento humano (Barker, 2007). Esses impactos são gerados à medida que o indivíduo é exposto a condições de estresse durante os períodos embrionário, fetal e neonatal. Essa exposição contribui para distúrbios na neuroplasticidade, impactando o desenvolvimento estrutural do cérebro, especialmente o córtex frontal e o sistema límbico (Azoulay *et al.*, 2022; Chmielewska *et al.*, 2019).

Os fatores de estresse ambientais podem ser tanto intrínsecos quanto extrínsecos e, no contexto intrauterino e neonatal, ambos exercem impacto significativo sobre o desenvolvimento. Entre os fatores extrínsecos destacam-se a

nutrição materna inadequada durante a gestação, o nível de interação materno-infantil após o parto, o estresse comportamental na primeira infância, a exposição dos progenitores e das crianças a poluentes e agentes químicos, especialmente agrotóxicos, o consumo de drogas ilícitas pela mãe durante a gestação e infecções recorrentes. Por sua vez, os fatores intrínsecos decorrem de alterações fisiológicas resultantes da exposição do indivíduo a esses fatores externos (Zuccarello *et al.*, 2022; Ho *et al.*, 2017).

Neste contexto, Wild (2012) surge o conceito de “expossoma”, no qual o ambiente é compreendido em um sentido amplo, englobando todos os fatores não genéticos. O conceito de expossoma complementa o genoma ao oferecer uma descrição abrangente das exposições às quais o indivíduo está submetido ao longo da vida. Essas exposições podem ser organizadas em três grandes categorias: exposições internas, exposições externas específicas e exposições externas gerais. A mensuração do expossoma é viabilizada, em grande parte, pelo uso das abordagens ômicas.



**Figura 2-** Esquema representativo dos fatores ambientais externos e internos aos quais o indivíduo está exposto ao longo do ciclo de vida. **Fonte:** Adaptado de Wild (2012).

Assim, o número de casos de neurodesenvolvimento atípico e de outros transtornos psiquiátricos em crianças nos últimos anos tem sido crescente. Dessa forma, estudos têm relacionado esse aumento a alterações epigenéticas nesses

pacientes (Maenner *et al.*, 2020). Nesse contexto, o estresse prolongado e a falha na resposta ao estresse têm sido amplamente associados ao surgimento de desordens mentais, uma vez que os mecanismos epigenéticos desencadeados por eventos adversos na infância ou na fase adulta afetam a atividade fisiológica de vias centrais da resposta ao estresse, como as vias serotoninérgica, dopaminérgica, noradrenérgica, glutamatérgica, ocitoninérgica e, principalmente, o eixo Hipotálamo–Hipófise–Adrenal (HPA) (Vidovic *et al.*, 2023; Chmielewska *et al.*, 2019).

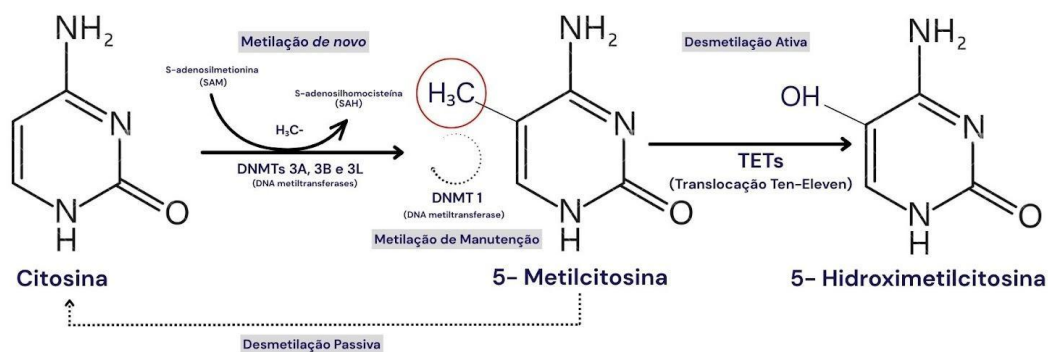
Embora indivíduos com suscetibilidade genética não apresentem necessariamente disfunções, a interação entre fatores genéticos e ambientais, mediada por mecanismos epigenéticos, desempenha papel fundamental na determinação dos desfechos em saúde. Nesse sentido, a epigenética preenche as lacunas entre essas duas esferas, sendo influenciada pelo estilo de vida e pelas experiências precoces. Evidências indicam que quanto mais precoce a exposição a eventos adversos, maiores e mais persistentes tendem a ser os impactos epigenéticos observados (Salvatore; Dick, 2018; Alshaya, 2022).

Nas últimas décadas, houve um aumento significativo nos estudos que associam exposições ambientais pré e pós-natais a alterações epigenéticas em crianças. Exemplos clássicos incluem os impactos da fome holandesa (Dutch Famine – 1944–1945) (Heijmans *et al.*, 2008), experiências de violência sexual (Barker *et al.*, 2020; McGowan *et al.*, 2009), depressão materna durante a gestação ou no período pós-parto (Mendonça *et al.*, 2019; Mendonça *et al.*, 2023), internação em unidades de terapia intensiva neonatal (UTIN) (Montirosso *et al.*, 2016; Provenzi *et al.*, 2015), infecção materna por SARS-CoV-2 durante a gestação (Hill *et al.*, 2023) e o consumo de alimentos ricos em vitamina D e doadores de grupos metil pela mãe durante a gravidez (Vaiserman; Lushchak, 2019; Anderson *et al.*, 2018).

Nesse cenário, a epigenética trouxe importantes contribuições para a compreensão de como as células se adaptam a eventos estressantes. Embora o genoma constitua o ponto de partida para a expressão fenotípica, mecanismos epigenéticos modulam a transcrição gênica, permitindo que o genótipo responda de forma dinâmica às influências ambientais. Esse processo é essencial para garantir respostas fisiológicas adequadas e a manutenção da homeostase, favorecendo a sobrevivência do indivíduo (Dee; Ryznar; Dee, 2023; Sanwald *et al.*, 2021). Entre

esses mecanismos destacam-se a metilação do DNA, a atuação de RNAs não codificantes (ncRNAs) e as modificações covalentes de histonas, como metilação, fosforilação, ubiquitinação, acetilação e sumoilação (Zhang; Lu; Chang, 2020).

A metilação do DNA constitui um dos mecanismos epigenéticos mais amplamente investigados e envolve a adição de um grupamento metil ( $-CH_3$ ) à posição 5' de citosinas em dinucleotídeos CpG, formando a 5-metilcitosina (5mC) (Andrew *et al.*, 2023). Esse processo ocorre de duas maneiras: *de novo* e de manutenção. No primeiro, enzimas denominadas DNA metiltransferases (DNMTs), como 3A, 3B e 3L, utilizam doadores de grupo metil como a S-adenosilmetionina (SAM) como precursor para obter um grupo metil ( $-CH_3$ ) que será incorporado ao carbono cinco da citosina. No segundo caso, enzimas como DNMT1 são responsáveis por manter a metilação já existente, uma etapa importante após a reprogramação epigenética nos estágios iniciais do desenvolvimento embrionário. Por fim, há duas maneiras conhecidas de desmetilação, a ativa e passiva. Na ativa, enzimas metilcitosinas dioxigenases, como translocação Ten-Eleven (TETs) atuam hidroxilando o carbono cinco metilado. A desmetilação passiva ocorre de forma espontânea e sem auxílio de enzimas (Andrew *et al.*, 2023). O processo de metilação e desmetilação está descrito na figura 3.



**Figura 3** - Processo de metilação e desmetilação da citosina. **Fonte:** Elaborado pelo autor (2026).

De modo complementar, os ncRNAs exercem um papel fundamental na

organização da cromatina, na tradução de RNAs mensageiros e na montagem de complexos proteicos funcionais (López-Jiménez; Andrés-León, 2021).

Alterações epigenéticas, como padrões alterados de metilação do DNA, modificações de histonas e expressão de ncRNAs, têm sido identificadas em tecidos de pacientes com doenças crônicas, transtornos mentais, incluindo autismo, TDAH, esquizofrenia, depressão, obesidade, diabetes, doenças coronarianas e câncer (Mendonça *et al.*, 2023; Wuet *et al.*, 2022; Jovčevska; Videti, 2021). Nesse contexto, o processo de metilação do DNA destaca-se como o mecanismo epigenético mais estudado, sendo apontado como um fator explicativo dos impactos de eventos adversos ocorridos na fase intrauterina e na primeira infância sobre o eixo HPA e sobre genes reguladores de neurotransmissores (Muller *et al.*, 2022).

A metilação do DNA no cérebro é um processo altamente dinâmico e reversível, regulado de forma precisa por enzimas escritoras, leitoras e apagadoras, que ajustam finamente os níveis de metilação ao longo do desenvolvimento e da vida. Esse mecanismo exerce papel central na proliferação e diferenciação de células-tronco neurais, na diferenciação neuronal, na sinaptogênese e na maturação do sistema nervoso, além de participar ativamente da plasticidade sináptica, da aprendizagem e da memória (Price *et al.*, 2016; Singh; Santosh; Ramaswami, 2025; Tian *et al.*, 2023; Xie *et al.*, 2023).

No contexto do desenvolvimento infantil, a metilação do DNA atua como uma memória molecular das exposições ambientais precoces, especialmente no período neonatal, quando o metiloma apresenta regiões altamente variáveis. Evidências indicam que apenas cerca de 25% dessa variabilidade é explicada pelo genótipo, enquanto a maior parte decorre da interação entre fatores genéticos e o ambiente intrauterino, destacando a sensibilidade desse processo às experiências iniciais (Younesian *et al.*, 2022).

Essas modificações epigenéticas moldam cascatas de regulação gênica nos neurônios, ajustando progressivamente a produção e a função celular de acordo com as demandas do ambiente. Embora os padrões de metilação sejam estabelecidos durante a embriogênese e, em grande parte, mantidos ao longo da vida adulta, eles podem sofrer alterações tanto em fases críticas do desenvolvimento quanto durante o

envelhecimento (Younesian *et al.*, 2022). A metilação do DNA está diretamente envolvida na regulação da expressão gênica no tecido cerebral e nos processos de diferenciação neuronal. Alterações nesse mecanismo, como o aumento das taxas de metilação, estão associadas à repressão da transcrição gênica, especialmente em regiões ricas em dinucleotídeos CpG, como os promotores gênicos (Tabano *et al.*, 2023; Vidovic *et al.*, 2023; Sanwald *et al.*, 2021).

Embora o diagnóstico de transtornos psiquiátricos ainda se baseie predominantemente na identificação de sinais e sintomas clínicos (Molnar-Szakcas; Kupis; Uddin, 2022), evidências indicam que a análise do perfil de metilação do DNA em células do sangue periférico pode refletir, ao menos parcialmente, alterações ocorridas no tecido cerebral. Esse achado possibilita a correlação entre padrões epigenéticos e a gravidade dos sintomas clínicos, conferindo à metilação do DNA um potencial papel como biomarcador molecular para tais patologias (Vidovic *et al.*, 2023; Tabano *et al.*, 2023; Chmielewska *et al.*, 2019). Além disso, há evidências de que essas alterações epigenéticas podem ser prevenidas ou até mesmo revertidas por meio de intervenções terapêuticas, reforçando a importância da caracterização e identificação dessas modificações em recém-nascidos e crianças (Bleker *et al.*, 2020; Bleker *et al.*, 2019).

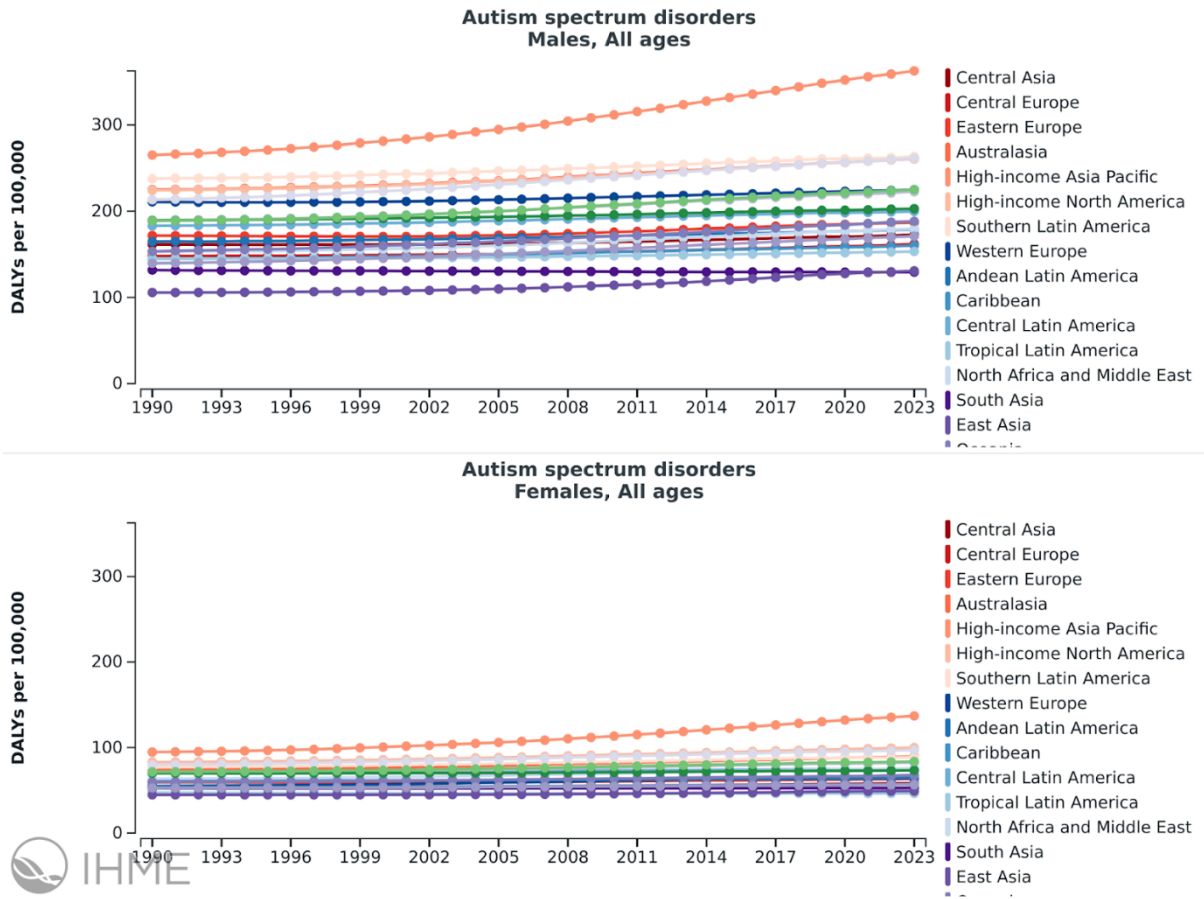
### **1.3 O TEA**

Nesse contexto mais amplo do neurodesenvolvimento, o TEA é descrito como uma condição caracterizada por dificuldades persistentes na comunicação e na interação social, associadas a padrões restritos e repetitivos de comportamento, interesses ou atividades, apresentando ampla heterogeneidade fenotípica (Wang *et al.*, 2023; Jiang *et al.*, 2022; Love *et al.*, 2024). Essa heterogeneidade manifesta-se não apenas na gravidade dos sintomas centrais, mas também na diversidade de trajetórias desenvolvimentais, perfis cognitivos, níveis de funcionamento adaptativo e manifestações comórbidas, como alterações de apego, ansiedade, estresse e dificuldades emocionais, reforçando o caráter dimensional, contínuo e multifacetado do espectro (Tafolla; Singer; Lord, 2025).

A identificação precoce de sinais comportamentais atípicos, incluindo alterações na atenção conjunta, na orientação social auditiva e visual e na

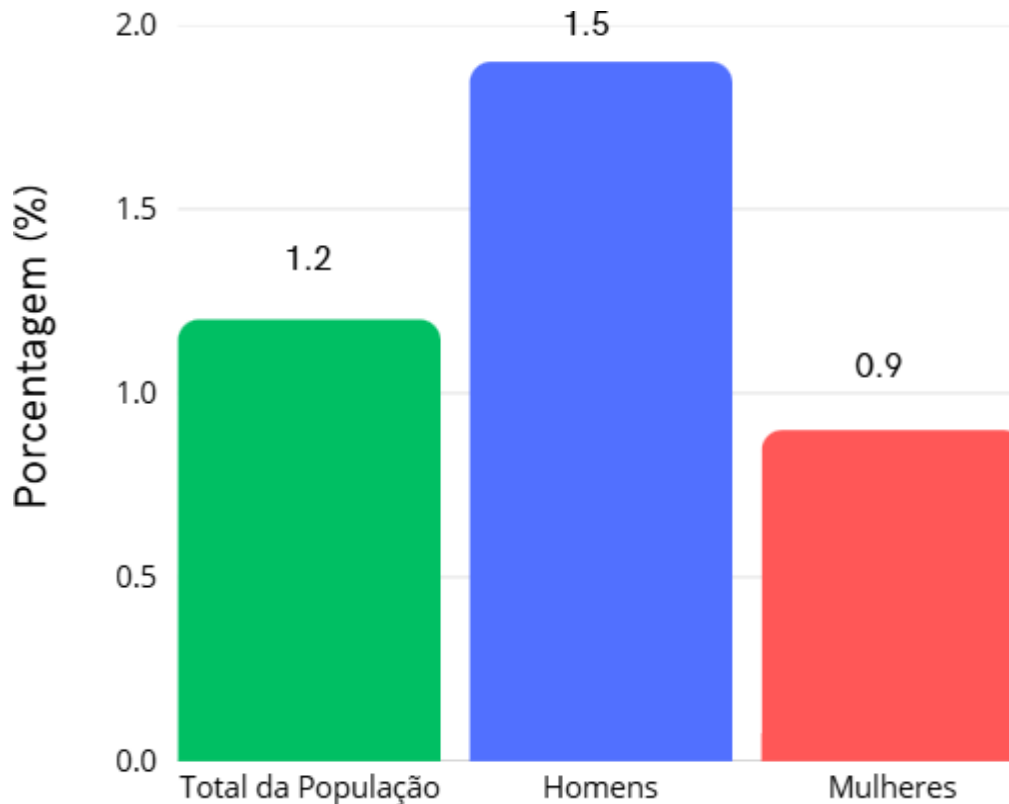
responsividade social, sugere que os mecanismos subjacentes ao TEA se organizam desde fases iniciais do desenvolvimento, período no qual circuitos neurais envolvidos na sociabilidade, na comunicação e na regulação emocional encontram-se em intensa maturação (Botelho; Silva; Borbely, 2024). Nesse sentido, déficits de atenção conjunta configuram marcadores particularmente relevantes, dada sua associação consistente com desfechos posteriores, sobretudo no desenvolvimento da linguagem e da comunicação funcional, sendo observados com maior frequência em crianças com TEA ou em risco para o transtorno quando comparadas a controles neurotípicos (Pobee *et al.*, 2013; Rijlaarsdam *et al.*, 2018). Vale ressaltar que os sintomas do TEA persistem ao longo do desenvolvimento, sendo comumente evidenciados por comprometimentos na atenção conjunta e na orientação social nas modalidades auditiva e visual (Spanos *et al.*, 2021).

De acordo com estimativas do *Global Burden of Disease Study 2021 Autism Spectrum* (Santomauro *et al.*, 2025), aproximadamente 61,8 milhões de indivíduos em todo o mundo encontravam-se no espectro autista em 2021, o que corresponde a cerca de uma em cada 127 pessoas. A prevalência global por idade foi estimada em 788,3 casos por 100.000 habitantes. Quando estratificada por sexo, essa prevalência correspondeu a 1.064,7 casos por 100.000 homens (898,5–1.245,7) e 508,1 casos por 100.000 mulheres (424,6–604,3), evidenciando maior prevalência do transtorno entre indivíduos do sexo masculino (Figura 4).



**Figura 4** - Mapa de distribuição dos casos de TEA entre os sexos masculino e feminino no mundo até 2021. **Fonte:** Adaptado de IHME (2026)

Dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, provenientes do Censo Demográfico 2022, indicam que aproximadamente 2,4 milhões de pessoas no Brasil possuem diagnóstico de TEA, correspondendo a 1,2% da população brasileira. A prevalência do diagnóstico foi maior entre os homens (1,5%) em comparação às mulheres (0,9%), totalizando cerca de 1,4 milhão de homens e 1,0 milhão de mulheres com diagnóstico de TEA (IBGE, 2022) (Figura 5).



**Figura 5** - Gráfico adaptado do censo 2022 do IBGE, demonstrando a prevalência de autismo na população brasileira (em %) e por sexo. **Fonte:** IBGE (2025).

O efeito protetor feminino tem sido amplamente proposto para explicar a menor prevalência em indivíduos do sexo feminino, sugerindo que meninas necessitam de uma maior carga genética ou biológica para manifestar o transtorno. Como consequência direta desse modelo, quando o diagnóstico de TEA ocorre em meninas, os quadros clínicos tendem a ser mais graves, frequentemente associados a comprometimentos mais evidentes do neurodesenvolvimento (Dougherty *et al.*, 2022; Jacquemont *et al.*, 2014; Wigdor *et al.*, 2022). Além disso, meninas sem atraso significativo de linguagem ou deficiência intelectual podem permanecer subdiagnosticadas, uma vez que os sinais clínicos tendem a ser mais sutis, contribuindo para a sub-representação feminina nas estatísticas diagnósticas. Esse conjunto de fatores ajuda a explicar o fato de o TEA pode chegar a quatro vezes mais frequente em indivíduos do sexo masculino do que no feminino (Dougherty *et al.*, 2022; Jacquemont *et al.*, 2014; Wigdor *et al.*, 2022).

Nesse contexto, evidências indicam que alterações em genes ligados ao cromossomo X contribuem de forma significativa para a suscetibilidade ao transtorno, especialmente em indivíduos do sexo masculino, que possuem apenas uma cópia

funcional desse cromossomo e associado ao mecanismo de inativação do cromossomo X específico apenas no sexo feminino, torna-os mais vulneráveis aos efeitos de variantes patogênicas (Parenti *et al.*, 2020; Lukens; Eyo *et al.*, 2022). Entre os genes do cromossomo X associados a transtornos do neurodesenvolvimento, destaca-se o *MECP2*, cuja mutação é responsável pela síndrome de Rett, um distúrbio monogênico que compartilha características clínicas relevantes com o TEA, incluindo déficits sociais, de comunicação e alterações comportamentais. O *MECP2* atua como um regulador transcricional global, ligando-se ao DNA metilado e controlando a expressão de um grande número de genes envolvidos no desenvolvimento cerebral, na plasticidade sináptica e na maturação dos circuitos neurais (Parenti *et al.*, 2020; Lukens; Eyo *et al.*, 2022).

Do ponto de vista etiológico, o TEA é reconhecido como uma condição complexa e multifatorial, na qual as contribuições genéticas desempenham papel central, embora não sejam suficientes para explicar isoladamente a herdabilidade estimada e a expressiva variabilidade clínica observada (Velarde; Cárdenas, 2022; Love *et al.*, 2024). Estudos de genética molecular e genômica indicam que o TEA apresenta uma arquitetura poligênica, envolvendo variantes comuns de pequeno efeito, variantes raras de maior impacto e variações no número de cópias (CNVs), que afetam genes relacionados a processos fundamentais do neurodesenvolvimento, como migração neuronal, sinaptogênese, plasticidade sináptica, equilíbrio excitatório-inibitório e regulação transcricional (Abedini *et al.*, 2023; Jiang *et al.*, 2022).

Entre as CNVs mais consistentemente associadas ao TEA destacam-se duplicações e deleções em regiões cromossômicas como 15q11–q13, 16p11.2, 22q11.2, 1q21.1, 3q29, 7q11.23, 15q13.3, 17q12 e 22q13.33, muitas das quais envolvem genes essenciais para a formação e manutenção das sinapses, remodelação da cromatina e controle da expressão gênica (Jiang *et al.*, 2022; Abedini *et al.*, 2023). Outros genes amplamente relacionados ao TEA incluem *SETD5*, *CHD8*, *ASH1L*, *ARID1B*, *KMT2A*, *NRXN*, *NLGN*, *SHANK3*, *TSC1/2*, *FMR1* que codificam proteínas atuantes como reguladores transcricionais ou remodeladores de cromatina, fundamentais para o controle da expressão gênica durante o neurodesenvolvimento, a maturação das conexões excitatórias e inibitórias corticais e a organização dos circuitos neurais, alterações nesses genes resultam em efeitos pleiotrópicos e

contribuem para a elevada variabilidade fenotípica observada no espectro autista (Lukens; Eyo *et al.*, 2022; Parenti *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2023).

Além disso, o gene *SLC6A4*, que codifica o transportador de serotonina responsável pela regulação dos níveis desse neurotransmissor na fenda sináptica, tem sido associado ao TEA, sendo que disfunções no sistema serotoninérgico e mutações nesse gene foram relatadas em indivíduos com o transtorno, especialmente em contextos de exposição pré-natal a antidepressivos inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS) (Parenti *et al.*, 2020; Doi; Usui; Shimada, 2022; Lukens; Eyo *et al.*, 2022).

Nesse cenário, a distinção entre TEA síndrômico e não síndrômico surge como uma abordagem conceitual relevante. O TEA síndrômico refere-se aos casos em que o fenótipo autista ocorre no contexto de síndromes genéticas bem definidas, como a síndrome do X frágil, a síndrome de Rett, a esclerose tuberosa, a síndrome de Phelan-McDermid e a síndrome de Angelman, geralmente associadas a mutações monogênicas ou CNVs de grande efeito (Jiang *et al.*, 2022; Silva, 2025). Por outro lado, o TEA não síndrômico, que representa a maioria dos casos diagnosticados, caracteriza-se pela ausência de uma síndrome genética única claramente definida, resultando da interação complexa entre múltiplas variantes genéticas, fatores ambientais e contextuais ao longo do desenvolvimento (Love *et al.*, 2024; Velarde; Cárdenas, 2022).

Ainda, considerando que o TEA não constitui uma condição etiologicamente homogênea, Miles *et al.* (2005) propuseram a distinção entre autismo complexo e autismo essencial, com base principalmente na presença ou ausência de anomalias físicas menores (MPAs) e outros sinais de alterações precoces da morfogênese. Em parte dos casos, o autismo está associado a alterações globais do desenvolvimento fetal, configurando o chamado autismo complexo, no qual se incluem condições síndrômicas e cromossômicas reconhecidas, como síndrome do X frágil, síndrome de Sotos, esclerose tuberosa, exposição pré-natal ao ácido valpróico, rubéola congênita e síndrome de Möbius. Estima-se que esses quadros representem cerca de 20% dos casos de autismo classificados como complexos, sendo caracterizados por maior frequência de deficiência intelectual, epilepsia, alterações estruturais cerebrais e piores desfechos prognósticos.

Ainda para Miles *et al.* (2005), o autismo essencial refere-se aos casos nos quais não há evidências de dismorfologia ou de insultos precoces à morfogênese, sugerindo um desenvolvimento estrutural inicial relativamente preservado. Esse subtipo apresenta maior predominância do sexo masculino, maior agregação familiar e maior risco de recorrência entre irmãos, indicando um componente genético mais fortemente herdável. Indivíduos com autismo essencial tendem a apresentar melhores desfechos cognitivos e funcionais

Nesse contexto, a epigenética assume papel central como elo entre predisposição genética e ambiente. Mecanismos epigenéticos, como a metilação do DNA, modificações de histonas e a regulação por RNAs não codificantes, permitem que exposições ambientais modulem a expressão gênica sem alterar a sequência do DNA, influenciando de forma dinâmica os programas do desenvolvimento neural (Rangasamy *et al.*, 2013; Torres *et al.*, 2023). Evidências crescentes indicam que indivíduos com TEA apresentam padrões epigenéticos diferenciais em genes relacionados à função sináptica, regulação imune, neuroinflamação e comportamento social, contribuindo para a diversidade fenotípica observada no espectro (Kuodza *et al.*, 2024).

Modelos contemporâneos descrevem o TEA como resultado de interações gene-ambiente ao longo de janelas críticas do desenvolvimento, especialmente durante os períodos pré-natal e perinatal, quando o cérebro se encontra particularmente sensível a sinais ambientais (Behnia *et al.*, 2015; Di Gesù *et al.*, 2024). Fatores como estresse materno, ativação imune, disfunções metabólicas, uso de medicamentos, exposição a contaminantes ambientais, alterações nutricionais e prematuridade têm sido associados a modificações epigenéticas persistentes, capazes de influenciar trajetórias do neurodesenvolvimento, sobretudo em indivíduos geneticamente suscetíveis (Botelho; Silva; Borbely, 2024; Love *et al.*, 2024).

Dentro desse arcabouço, a placenta ocupa posição central como interface biológica entre o ambiente materno e o feto, desempenhando papel crucial na mediação de sinais hormonais, metabólicos e inflamatórios durante a gestação. Alterações nos padrões de metilação do DNA placentário e na expressão gênica têm sido associadas a exposições pré-natais adversas e a desfechos neurocomportamentais na infância, reforçando a noção de que a programação do

neurodesenvolvimento pode ser modulada ainda no ambiente intrauterino (Stocorro *et al.*, 2023).

De forma complementar, estudos intergeracionais sugerem que exposições ambientais podem induzir alterações epigenéticas persistentes e potencialmente transmissíveis, afetando a expressão de genes associados ao comportamento social e ao risco para o TEA em gerações subsequentes (Martínez *et al.*, 2022). Entre esses genes, destaca-se o gene do receptor de ocitocina (OXTR), cuja regulação epigenética tem sido associada a diferenças individuais na sociabilidade, no vínculo afetivo e na modulação emocional, domínios frequentemente alterados em indivíduos com TEA (Lal *et al.*, 2025).

Assim, o sistema da ocitocina emerge como um mediador biológico central na interface entre genética, epigenética e ambiente, integrando sinais sociais e emocionais ao desenvolvimento neural. Evidências indicam que alterações na expressão e na metilação do *OXTR* podem ser influenciadas por experiências precoces, estresse e inflamação, contribuindo para perfis fenotípicos distintos dentro do espectro autista (Evenepoel *et al.*, 2023; Moerkerke *et al.*, 2021; Ghamari *et al.*, 2024).

## **1.4 O gene do receptor de ocitocina (OXTR)**

### **1.4.1 A ocitocina**

A ocitocina é um nonapeptídeo produzido no hipotálamo e liberado para a circulação periférica e no sistema nervoso central (Mohr; Meyerhof; Richter, 1995; Wei *et al.*, 2023; Evenepoel *et al.*, 2023; Moerkerke *et al.*, 2021). Sua síntese é atribuída principalmente a neurônios situados em regiões como os núcleos supraóptico e paraventricular, integrando o sistema hipotálamo–neuro-hipofisário, com transporte para a neuro-hipófise e liberação na corrente sanguínea ou dendriticamente no sistema nervoso central, onde atua como neuromodulador e neurotransmissor (Maud *et al.*, 2018; Hasan *et al.*, 2024; Pierzynowska *et al.*, 2023; Mohr; Meyerhof; Richter, 1995; Wei *et al.*, 2023). Além disso, tecidos periféricos como glândula adrenal, ovário, útero e testículos podem sintetizar ocitocina, sugerindo atuação também como regulador parácrino (Mohr; Meyerhof; Richter, 1995; Wei *et al.*, 2023).

Do ponto de vista fisiológico, a ocitocina foi historicamente associada à contração uterina durante o trabalho de parto e à ejeção do leite durante a lactação, sendo um dos primeiros hormônios peptídicos com estrutura primária identificada, posteriormente sintetizado e aplicado clinicamente na indução e aumento do trabalho de parto (Kimura *et al.*, 2003; Mohr; Meyerhof; Richter, 1995; Monstein *et al.*, 2004). Além de suas funções periféricas clássicas nas contrações uterinas e ejeção do leite (Friebe-Hoffmann *et al.*, 2007b; Filippi *et al.*, 2002; Péqueux *et al.*, 2005; Jeng *et al.*, 1996), a ocitocina também regula processos de secreção celular, comunicação celular, crescimento tumoral, cicatrização, proliferação, sobrevivência e crescimento celular, e alívio da dor (Lee *et al.*, 1998; Wei *et al.*, 2023).

Sendo reconhecidamente um agente uterotônico endógeno, a sensibilidade do miométrio à ocitocina é associada diretamente ao aumento da expressão do seu receptor (Zlatnik *et al.*, 2000). Também é descrito que a ocitocina aumenta conexões excitatórias e promove efeito desinibitório no hipocampo, consolidando potenciação de longo prazo e associando-se a mudanças comportamentais. (Çaliskan; Sahin; Guldag, 2021).

Além de suas funções periféricas, a ocitocina desempenha papel central na modulação de comportamentos sociais, emocionais e afiliativos, incluindo formação de vínculos afetivos, comportamento materno, empatia, confiança, generosidade, contato visual, reconhecimento social e regulação do estresse e da ansiedade (Jack; Connelly; Morris, 2012; Maud *et al.*, 2018; Hasan *et al.*, 2024; Kumsta *et al.*, 2013; Wei *et al.*, 2023; Israel *et al.*, 2009). A ocitocina também está envolvida no processamento de estímulos emocionalmente carregados, como expressões faciais, reduzindo a atividade da amígdala diante de estímulos de valência negativa (Jack; Connelly; Morris, 2012; Hasan *et al.*, 2024; Wei *et al.*, 2023).

Ainda nesse contexto, a ocitocina atua como modulador chave de comportamentos socioemocionais, incluindo apego mãe-filho, laços de casal, consolo e reconhecimento social, e a ação no cérebro por meio da sinalização do seu receptor, afeta cognição social ao aumentar saliência e sensibilidade à recompensa de sinais sociais (Andari *et al.*, 2020; Feldman *et al.*, 2012). A ocitocina apresenta-se como mediador chave de comportamentos afiliativos e pró-sociais, incluindo vínculo interpessoal, apego e sintonia social, com projeções ocitoninérgicas para circuitos

sociais e de recompensa, como a amígdala (Evenepoel *et al.*, 2023). Esse hormônio atua como uma molécula chave para comunicação social, comportamento afiliativo e cognição social em mamíferos, e déficits de comunicação social e vínculo são descritos como parte do fenótipo autista (Israel *et al.*, 2009). Ademais, a ocitocina e seu receptor também possuem funções cardiovasculares e vasculares no cérebro e periferia, incluindo vasoconstrição de microvasos e vasodilatação de grandes artérias (Monstein *et al.*, 2004).

O comportamento social é um componente fundamental da vida de diversas espécies animais, permitindo a interação entre indivíduos e o compartilhamento de experiências, necessidades e objetivos comuns. Processos como cuidado parental, formação de vínculos, cooperação, convergência emocional e agressividade são amplamente conservados ao longo da evolução, indicando que a sociabilidade possui bases biológicas compartilhadas e não é exclusiva da espécie humana (Kuteykin-Teplyakov; Maldonado, 2014)

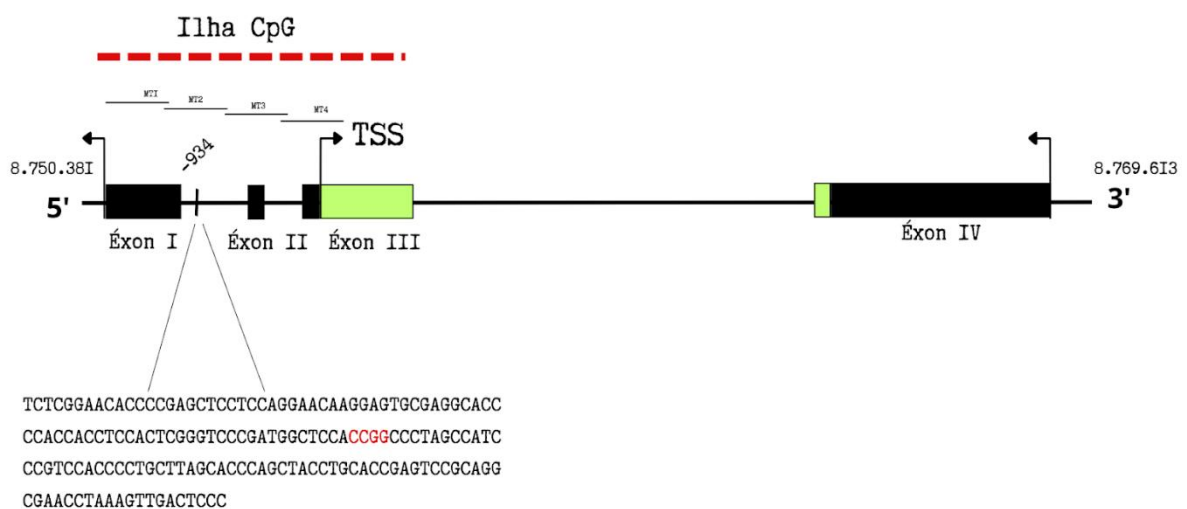
Do ponto de vista clínico, a administração intranasal de ocitocina vem sendo explorada como abordagem para facilitar o desenvolvimento social e reduzir a incapacidade associada ao autismo, centrado no controle do estresse e ansiedade social e no aumento de atenção e percepção de sinais sociais. (Moerkerke *et al.*, 2024).

A sinalização ocitoninérgica também é sensível ao ambiente e modulada na primeira infância, associando níveis periféricos de ocitocina e expressão do receptor a vínculo parental e afiliação (Feldman *et al.*, 2012). A ação da ocitocina depende da expressão do seu receptor, codificado pelo gene *OXTR*, e variações na expressão do *OXTR* são descritas como relevantes para a função do sistema endógeno de ocitocina (Evenepoel *et al.*, 2023).

#### **1.4.2 O receptor de ocitocina (OXTR)**

O gene *OXTR* humano é descrito como cópia única, localizado no cromossomo 3p25–3p26, com estrutura aproximada de 17 kb, contendo quatro éxons e três

íntrons e codifica um receptor de aproximadamente 388–389 aminoácidos (Maud *et al.*, 2018; Hasan *et al.*, 2024; Wei *et al.*, 2023; Towers *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2020; Israel *et al.*, 2009) (Figura 6). Sua expressão é específica do tipo celular e regulada ao longo do desenvolvimento (Towers *et al.*, 2018). O receptor é expresso em múltiplos tecidos, incluindo tecido cerebral, renal, uterino, ovariano, glândula mamária, células lactotróficas, testículo, epidídimo, ductos reprodutivos, timo, coração, rim e cérebro (Thibonnier *et al.*, 1998; Monstein *et al.*, 2004; Kimura *et al.*, 2003).

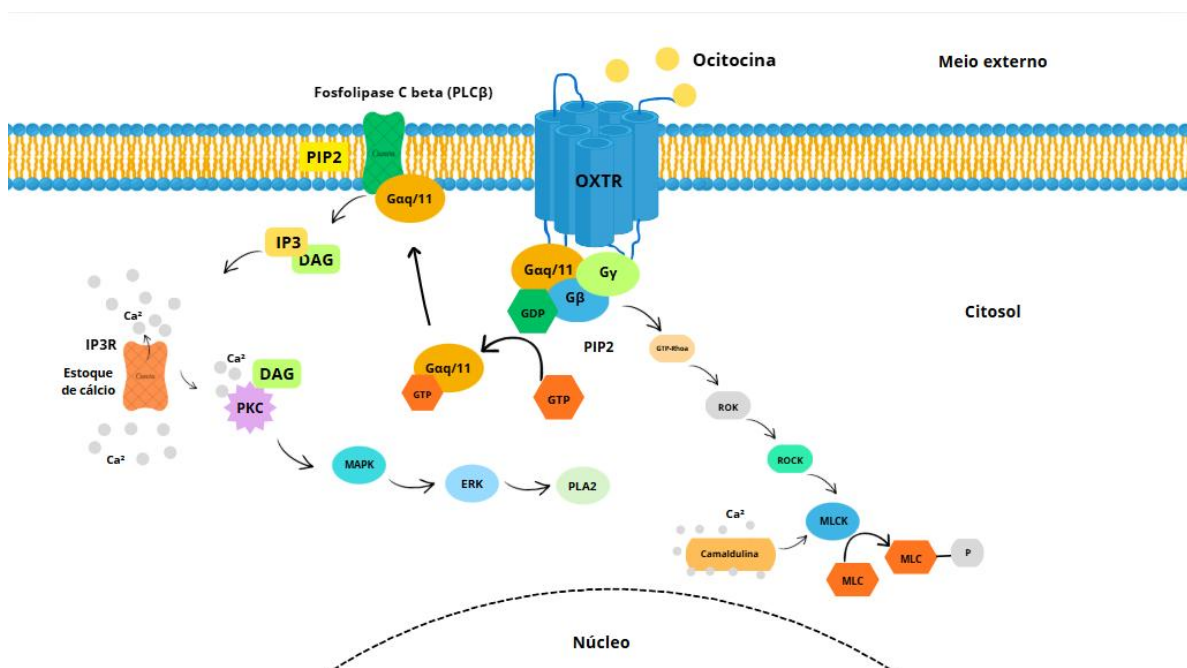


**Figura 6** - Estrutura do gene *OXTR*. As caixas em preto correspondem aos éxons não transcritos, enquanto a porção em verde indica a região codificante do gene. O segmento compreendido entre os éxons 1 e 3 caracteriza uma ilha CpG. As regiões MT1–MT4 representam porções do gene previamente definidas como regiões de estudo por Kusui *et al.* (2001). No interior da região MT2 localiza-se o sítio CpG -934, destacando-se, abaixo, a região investigada no presente trabalho, incluindo o sítio de restrição reconhecido pela enzima *HpaII*, em vermelho. **Fonte:** Adaptado de Kusui *et al.* (2001) e Yuksel *et al.* (2016).

No sistema nervoso central, o *OXTR* é amplamente expresso em regiões associadas à cognição e interação social, incluindo córtex pré-frontal, amígdala, hipocampo, núcleo accumbens, estriado, área tegmental ventral, septo lateral, ínsula, córtex cingulado anterior e substância cinzenta periaquedutal (Hasan *et al.*, 2024; Maud *et al.*, 2018; Wei *et al.*, 2023; Pierzynowska *et al.*, 2023). Estudos em modelos animais indicam que a expressão do *OXTR* no córtex pré-frontal está associada à formação de laços afetivos, comportamento materno e regulação da ansiedade,

enquanto sua expressão na amígdala está relacionada à regulação do medo e do comportamento social (Hasan *et al.*, 2024; Maud *et al.*, 2018).

O OXTR é um receptor acoplado à proteína G (GPCR) com sete domínios transmembranares, podendo acoplar-se a diferentes subunidades de proteína G e ativar cascatas como MAPK, PKC e PLC, com implicações para crescimento, viabilidade e sobrevivência neuronal (Pierzynowska *et al.*, 2023; Çaliskan; Sahin; Guldag, 2021; Thibonnier *et al.*, 1998) (Figura 7). As cascatas de sinalização associadas ao OXTR incluem modulação de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  regulados por voltagem e ativação de MLC, estimulação de PLC e PKC pela via PIP2–PI3, ativação de MAP quinase, ativação de cPLA2 e ativação de RhoA/ROK (Pierzynowska *et al.*, 2023). Essa sinalização resulta em respostas contráteis, secretoras, inflamatórias, metabólicas e transcricionais, dependendo do tecido alvo (Lee *et al.*, 1998; Friebe-Hoffmann *et al.*, 2007a; Friebe-Hoffmann *et al.*, 2007b; Zlatnik *et al.*, 2000; Pierzynowska *et al.*, 2023; Çaliskan; Sahin; Guldag, 2021; Van Kesteren *et al.*, 1996). Também é descrito que receptores de ocitocina podem acoplar-se a vias mitogênicas envolvendo MAP quinase via subunidade  $G_i$ , associando-se a proliferação celular, efeitos mitogênicos em determinados contextos (Monstein *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 1998).



**Figura 7 - Vias de sinalização do receptor OXTR.** A sinalização mediada pela ocitocina inicia-se com a ligação do neuropeptídeo ao seu receptor específico, o OXTR, um receptor acoplado à

proteína G localizado na membrana plasmática, promovendo ativação da proteína G heterotrimérica, principalmente da subunidade  $G\alpha_q/11$ . A ativação dessa subunidade leva à estimulação da fosfolipase C beta ( $PLC\beta$ ), que cliva o fosfolípido PIP2 em dois segundos mensageiros, IP3 e DAG. O IP3 difunde-se pelo citosol e se liga aos seus receptores no retículo endoplasmático, promovendo a liberação de  $Ca^{2+}$  intracelular, enquanto o DAG, em conjunto com o aumento do  $Ca^{2+}$  citosólico, ativa a proteína quinase C (PKC). A ativação da PKC desencadeia a cascata das MAP quinases, incluindo ERK, contribuindo para a modulação de processos como proliferação, diferenciação e sobrevivência celular, além de ativar a fosfolipase A2 (PLA2), integrando respostas metabólicas e inflamatórias. Paralelamente, a ativação do OXTR também pode recrutar a via RhoA/ROCK, culminando na ativação da MLCK dependente do complexo  $Ca^{2+}$ -calmodulina e na fosforilação da cadeia leve da miosina (MLC), promovendo reorganização do citoesqueleto e alterações na contratilidade celular. **Fonte:** Adaptado de Devost, Wrzal e Zingg (2008).

No desenvolvimento fetal, o OXTR é formado principalmente em células mioepiteliais da glândula mamária e no miométrio e endométrio uterinos ao final da gestação, e o sistema OXT/OXTR participa de parto, lactação e contato psicológico mãe-filho. Além disso, o sistema OXT/OXTR é modulador de comportamentos sexuais, sociais e relacionados ao estresse, com papéis adicionais no desenvolvimento do sistema nervoso, incluindo regulação do crescimento do neocórtex, manutenção do suprimento sanguíneo e modulação do sistema nervoso autônomo via via vagal. A ocitocina e o OXTR também possuem papéis anti-inflamatório, antioxidante e analgésico, com envolvimento sugerido em prevenção de diabetes, dislipidemia e aterosclerose (Pierzynowska *et al.*, 2023).

Ainda nesse contexto, o receptor de ocitocina é relacionado ao comportamento de apego em bebês, sendo o apego entendido como estratégia de regulação de estresse, com perfis comportamentais distintos entre bebês com vínculo seguro e inseguro (Chen *et al.*, 2011).

Genes envolvidos na sinalização ocitoninérgica, particularmente o gene *OXTR*, estão entre os mais extensivamente estudados na pesquisa sobre autismo, devido ao papel central da ocitocina na cognição social e no comportamento afiliativo (Wieting *et al.*, 2023; Hasan *et al.*, 2024; Wei *et al.*, 2023; Kumsta *et al.*, 2013). Meta-análises e estudos de associação genética identificaram efeitos significativos de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) no *OXTR* em indivíduos com TEA, incluindo o rs53576, localizado no íntron 3, associado à variação no comportamento social, na busca por apoio social e na regulação epigenética do gene (Rijlaarsdam *et al.*, 2018; Israel *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2011; Kumsta *et al.*, 2013).

Nessa perspectiva do campo da genética do comportamento social, outras variantes do *OXTR* têm sido associadas a fenótipos sociais e vulnerabilidade a transtornos sociais e afetivos, incluindo TEA, ansiedade e depressão (Rijlaarsdam *et al.*, 2018; Feldman *et al.*, 2012). Polimorfismos como *rs2254298* e *rs1042778* são citados como associados a processos sociais e emocionais e susceptibilidade a TEA e transtorno depressivo maior, e alelos específicos foram associados a concentrações plasmáticas mais baixas de ocitocina em determinados grupos (Feldman *et al.*, 2012).

Outros polimorfismos, como *rs2268490*, *rs237887* e *rs1042778*, foram associados a tomada de decisão pró-social em observações de jogos econômicos, reforçando o lugar do *OXTR* em aspectos de comportamento pró-social (Israel *et al.*, 2009). O alelo A do *rs53576* é um dos mais descritos como vinculado a comportamento parental menos sensível, maior reatividade ao estresse e menor busca por suporte emocional, enquanto o alelo G aparece associado a apego inseguro em adultos deprimidos (Chen *et al.*, 2011).

Assim, o gene *OXTR* é repetidamente associado como candidato relevante por sua associação com comportamento social e cognição, e muitos estudos apontam relações entre genótipo *OXTR*, risco de diagnóstico e diferenças em comportamento social (Hopkins *et al.*, 2023; Pobee *et al.*, 2013; Evenepoel *et al.*, 2023).

Modelos animais reforçam a hipótese biológica ao descrever que camundongos *knockout* para *OXTR* exibem sociabilidade reduzida e perfis comportamentais semelhantes a modelos com traços de autismo, com reduções em comportamentos interativos e investigação social em diferentes testes (Pobee *et al.*, 2013). Essas evidências se articulam com o argumento de que alterações no sistema ocitoninérgico do cérebro desempenham papel importante na fisiopatologia do TEA (Evenepoel *et al.*, 2023).

No entanto, é descrito que as análises de polimorfismos do *OXTR*, isoladamente, não são suficientes para concluir sobre o papel do *OXTR* no TEA, levando a um deslocamento do foco para outras camadas regulatórias, incluindo epigenética (Pierzynowska *et al.*, 2023).

### 1.4.3 A metilação do gene *OXTR* e associação ao TEA

Como descrito anteriormente, a epigenética caracteriza-se como um conjunto de alterações na atividade gênica transmitidas em divisões celulares sem mudança na sequência de DNA, incluindo metilação do DNA, modificação de cromatina e controle por RNAs não codificantes, como microRNAs (Kumsta *et al.*, 2013; Park *et al.*, 2019; Mor *et al.*, 2015). A metilação em regiões promotoras é descrita como mecanismo que tipicamente reprime a transcrição, enquanto outras modificações epigenéticas como acetilação de histonas são descritas como associadas ao aumento de atividade transcricional (Park *et al.*, 2019).

A presença de ilhas CpG é destacada como fundamento estrutural da regulação epigenética, com ilhas CpG frequentemente relacionadas a regiões promotoras e a expressão gênica ativa quando não metiladas, mas associadas à repressão transcricional quando metiladas (Kusui *et al.*, 2001; Kumsta *et al.*, 2013). A modulação epigenética do *OXTR* tem sido associada a traços sociais autistas e ao cérebro autista, com hipermetilação observada no córtex temporal e relações com conectividade funcional em repouso envolvendo teoria da mente, circuito de recompensa e redes de saliência e atenção (Cheong *et al.*, 2025).

No gene humano *OXTR*, é descrita uma ilha CpG extensa que se estende aproximadamente de ~140 pb *upstream* até mais de 2.300 pb *downstream* do sítio de início de transcrição, com regiões internas ("*methylation target*": MT1–MT4) usadas para estudo de metilação em diferentes tecidos, como descrito na figura 6 acima (Kusui *et al.*, 2001; Kimura *et al.*, 2003; Towers *et al.*, 2018).

Entre essas regiões, destaca-se a sub-região denominada MT2, localizada dentro da ilha CpG promotora do *OXTR*, a montante do região de início da transcrição (TSS), a qual tem sido consistentemente apontada como funcionalmente relevante para a regulação transcricional do gene (Kusui *et al.*, 2001; Kumsta *et al.*, 2013). Kusui *et al.* (2001) demonstraram, por meio de ensaios com gene repórter, que a ilha CpG do *OXTR* possui atividade promotora significativa e que sua metilação resulta em supressão acentuada da transcrição. De forma particularmente relevante, esses autores identificaram que a deleção da região MT2 em construtos metilados levou à recuperação parcial da atividade transcricional, indicando que essa sub-região

concentra os elementos mais sensíveis à metilação do DNA. Esses achados estabeleceram a MT2 como um núcleo funcional crítico para o silenciamento epigenético do *OXTR*.

Dentro da região MT2, a região -934 emergiu como um dos alvos mais investigados em estudos epigenéticos humanos, especialmente no contexto do TEA. Gregory *et al.* (2009) demonstraram hipermetilação significativa desse CpG em indivíduos com TEA, tanto em células mononucleares do sangue periférico quanto no tecido do córtex temporal, sugerindo que alterações epigenéticas nessa região não se restringem ao compartimento periférico. De forma consistente com a hipótese de silenciamento gênico mediado por metilação, os autores observaram redução da expressão do mRNA do *OXTR* associada ao aumento da metilação nos sítios CpG -934 e -924, ambos localizados na região MT2 (Gregory *et al.*, 2009).

Esses achados foram posteriormente corroborados por estudos independentes. Kumsta *et al.* (2013) relataram aumento da metilação nos CpGs -860, -934 e -959 da região MT2 em indivíduos com autismo, tanto em sangue periférico quanto em tecido cerebral, além de associarem a metilação do CpG -934 a diferenças na ativação de regiões cerebrais envolvidas na percepção social.

A relevância biológica do CpG -934 também é sustentada por sua localização em uma região promotora rica em elementos regulatórios. Estudos estruturais do gene *OXTR* demonstraram que essa região contém sítios de ligação para fatores de transcrição, como SP1, além de elementos responsivos a hormônios esteróides, ainda que não possua um elemento clássico de resposta ao estrogênio totalmente palindrômico (Harony-Nicolas *et al.*, 2014). A metilação de CpGs localizados nesse contexto pode interferir no recrutamento de fatores de transcrição ou favorecer a ligação de proteínas repressoras, contribuindo para a redução da atividade transcricional do gene (Harony-Nicolas *et al.*, 2014).

Embora grande parte da literatura enfatize a hipermetilação da região -934 em contextos patológicos, estudos anteriores já haviam demonstrado que o *OXTR* apresenta padrões de metilação dependentes do tecido e do estado funcional. Mizumoto *et al.* (1997) identificaram metilação diferencial no terceiro íntron do *OXTR*, mostrando que tecidos não expressivos, como leucócitos periféricos, apresentam

hipermetilação associada à repressão gênica, enquanto tecidos expressivos, como o miométrio, exibem padrões relativamente hipometilados. Esses dados indicam que a metilação do OXTR atua como um mecanismo regulatório dinâmico, e não como uma marca epigenética fixa.

Adicionalmente, Towers *et al.* (2018) demonstraram que a regulação epigenética do OXTR envolve não apenas a metilação clássica da 5-metilcitosina (5mC), mas também a participação de mecanismos ativos de desmetilação mediados por enzimas da família TET, especialmente durante o desenvolvimento. Nesse estudo, regiões homólogas à ilha CpG promotora do OXTR, incluindo áreas correspondentes à MT2, apresentaram metilação diferencial associada à redução da expressão do receptor no hipocampo, reforçando a importância dessas regiões regulatórias no controle fino da transcrição gênica.

Em conjunto, os estudos disponíveis indicam que a região MT2 do gene OXTR, e particularmente o sítio CpG -934, constitui um elemento epigeneticamente sensível e funcionalmente relevante para a regulação da expressão do receptor de ocitocina e à manifestação de fenótipos comportamentais relacionados ao TEA (Muzimoto *et al.*, 1997; Gregory *et al.*, 2009; Kumsta *et al.*, 2013; Harony-Nicolas *et al.*, 2014; Towers *et al.*, 2018).

## 2 JUSTIFICATIVA

Apesar dos avanços significativos na identificação de variantes genéticas raras associadas ao Transtorno do Espectro Autista (TEA), evidências indicam que nenhum gene isolado é capaz de explicar mais de 1% dos casos individualmente, e que, mesmo de forma coletiva, as contribuições genéticas diretas permanecem limitadas a menos de 10% dos casos, reforçando a natureza complexa e multifatorial do transtorno (Kuodza *et al.*, 2024; Parenti *et al.*, 2020; Velarde; Cárdenas, 2022). Esses dados sustentam o entendimento de que a etiologia do TEA envolve interações dinâmicas entre predisposição genética e fatores ambientais ao longo do desenvolvimento (Kuodza *et al.*, 2024; Love *et al.*, 2024; Evenepoel *et al.*, 2023).

Nesse contexto, a epigenética, particularmente a metilação do DNA, emerge como um mecanismo biologicamente plausível para mediar as interações gene-ambiente, permitindo que exposições ambientais influenciem a expressão gênica sem

alterar a sequência do DNA (Andrew *et al.*, 2023; Sanwald *et al.*, 2021; Kuodza *et al.*, 2024). Alterações epigenéticas consistentes têm sido observadas em genes associados ao TEA, incluindo CYP2E1, DLGAP2 e, de forma recorrente, o gene do receptor de ocitocina (*OXTR*), sugerindo seu papel central na fisiopatologia do transtorno (Kuodza *et al.*, 2024; Gregory *et al.*, 2009; Kumsta *et al.*, 2013).

A relevância do *OXTR* no contexto do TEA é sustentada por seu envolvimento direto na modulação da sociabilidade, do vínculo afetivo, da cognição social e do processamento de sinais sociais, domínios tipicamente comprometidos no espectro autista (Israel *et al.*, 2009; Evenepoel *et al.*, 2023; Hasan *et al.*, 2024). Estudos prévios demonstraram que alterações nos padrões de metilação do *OXTR*, especialmente em regiões regulatórias funcionalmente relevantes, como a região promotora MT2 e o sítio CpG -934, associam-se a mudanças na expressão gênica, à conectividade funcional de circuitos sociais e a fenótipos comportamentais relacionados ao TEA, embora os resultados ainda sejam heterogêneos e dependentes do contexto amostral, etário e tecidual (Gregory *et al.*, 2009; Kumsta *et al.*, 2013; Puglia *et al.*, 2015; Moerkerke *et al.*, 2021; Evenepoel *et al.*, 2023).

A revisão de Kuodza *et al.* (2024) destaca que a maioria dos estudos epigenéticos em TEA concentra-se em populações da América do Norte, Europa e Ásia, regiões nas quais fatores ambientais específicos, como exposição a poluentes, disruptores endócrinos, tabagismo materno e aspectos do estilo de vida, têm sido associados a alterações na metilação do DNA (Kuodza *et al.*, 2024; Behnia *et al.*, 2015; Stocorro *et al.*, 2023).

Em contraste, regiões como África, Oceania e América do Sul permanecem amplamente sub-representadas na literatura, apesar de apresentarem contextos ambientais, socioeconômicos e demográficos distintos, potencialmente relevantes para a compreensão da etiologia do TEA (Kuodza *et al.*, 2024; Evenepoel *et al.*, 2023). Nesse cenário, destaca-se a ausência de estudos que investiguem a metilação do gene *OXTR* em indivíduos com TEA no Brasil (Kuodza *et al.* 2024).

Dessa forma, a investigação do padrão de metilação do DNA no sítio CpG -934 do gene *OXTR* em portadores de TEA e seus respectivos genitores, em uma amostra brasileira, justifica-se pela necessidade de ampliar o entendimento sobre os

mecanismos epigenéticos associados ao transtorno em populações sub-representadas (Gregory *et al.*, 2009; Kumsta *et al.*, 2013; Kuodza *et al.*, 2024). Além disso, a abordagem intergeracional adotada permite explorar diferenças epigenéticas entre gerações e avaliar possíveis associações com variáveis gestacionais, perinatais, clínicas e sociodemográficas, contribuindo para uma compreensão mais integrada da complexidade regulatória do *OXTR* no contexto do TEA (Gregory *et al.*, 2009; Towers *et al.*, 2018; Moerkerke *et al.*, 2021).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Geral**

Investigar o padrão de metilação do DNA no sítio CpG -934, na porção MT2, do gene do receptor de ocitocina (*OXTR*) em indivíduos com Transtorno do Espectro Autista (TEA) e em seus respectivos genitores atendidos no Instituto de Psiquiatria da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), bem como sua associação com variáveis sociodemográficas, gestacionais, perinatais e clínicas, a fim de compreender os mecanismos epigenéticos envolvidos na modulação do fenótipo comportamental associado ao TEA.

#### **3.2 Específicos**

- Descrever o perfil sociodemográfico, condições gestacionais e perinatais, e histórico clínico e de desenvolvimento dos portadores de TEA e de seus respectivos genitores incluídos no estudo;
- Comparar os níveis de metilação do DNA na região do CpG -934 do gene *OXTR* entre portadores de TEA e seus respectivos genitores, considerando análises pareadas;
- Avaliar a correlação entre os níveis de metilação do DNA no sítio CpG -934 do gene *OXTR* entre genitores e filhos, investigando possíveis padrões intergeracionais;

- Investigar a associação entre os níveis de metilação do *OXTR* e variáveis sociodemográficas;
- Analisar a relação entre variáveis gestacionais e perinatais e os níveis de metilação do DNA no sítio CpG -934 do *OXTR* nos portadores de TEA;
- Explorar a associação entre variáveis clínicas e de desenvolvimento e os níveis de metilação do DNA no sítio CpG -934 do gene *OXTR*.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Contexto do estudo

O presente estudo constitui-se como um desdobramento do projeto principal intitulado “*O papel de marcadores inflamatórios nos transtornos mentais*”, iniciado no ano de 2024, sob coordenação da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Laiana Azevedo Quagliato, médica psiquiatra e professora adjunta de Psiquiatria da Infância e Adolescência do Instituto de Psiquiatria da Universidade Federal do Rio de Janeiro (IPUB/UFRJ). O projeto matriz tem como objetivo investigar a associação entre processos de neuroinflamação e a fisiopatologia dos transtornos mentais, servindo como base clínica e biológica para o desenvolvimento de outros estudos com abordagens específicas.

A proposta foi previamente submetida à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), tendo sido aprovada sob o número de registro 13970819.4.0000.5263, garantindo as prerrogativas éticas inerentes a pesquisas envolvendo seres humanos.

Nesse contexto, o presente projeto caracteriza-se como um estudo observacional, transversal e de abordagem quantitativa, desenvolvido com o objetivo de caracterizar o perfil de metilação do DNA em regiões específicas do gene do receptor de ocitocina (*OXTR*). Foram realizadas análises comparativas entre crianças e adolescentes diagnosticados com TEA e seus respectivos genitores, bem como investigações da associação entre os níveis de metilação do DNA e variáveis clínicas e sociodemográficas.

## 4.2 População do estudo e critérios de elegibilidade

As amostras biológicas utilizadas neste estudo consistiram em DNA genômico extraído a partir de sangue periférico coletado de crianças e adolescentes diagnosticados com TEA e de seus respectivos genitores. Os participantes foram recrutados por meio de atendimento clínico realizado pela equipe médica do IPUB/UFRJ, no período compreendido entre dezembro de 2024 e julho de 2025, nas dependências do Instituto de Psiquiatria, localizado no município do Rio de Janeiro.

A amostra contemplou participantes residentes no município do Rio de Janeiro e em municípios da Região Metropolitana, bem como um participante oriundo de outro estado.

Para a confirmação diagnóstica de TEA, os pacientes foram avaliados por psiquiatras infantis com base nos critérios do *Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais* (DSM-V), sendo a gravidade do transtorno aferida por meio da Escala de Avaliação do Autismo Infantil (*Childhood Autism Rating Scale – CARS*). A escala é composta por 15 domínios avaliativos, com pontuação variando de 15 a 60 pontos, permitindo a classificação dos indivíduos como sem autismo (15–30), autismo leve a moderado (30–36) ou autismo grave (36–60) (Moon *et al.*, 2019).

Adicionalmente, os genitores das crianças e adolescentes incluídos no estudo foram avaliados por meio da *Mini International Neuropsychiatric Interview* (M.I.N.I.), entrevista diagnóstica estruturada baseada nos critérios do DSM-IV e da CID-10, utilizada para rastreamento dos principais transtornos psiquiátricos (Sheehan *et al.*, 1998). Todos os genitores avaliados apresentaram aptidão para participação, não sendo identificadas condições psiquiátricas que inviabilizassem sua inclusão.

Foram incluídas no estudo crianças e adolescentes com idade entre 0 e 17 anos e 11 meses, com diagnóstico confirmado de TEA, estabelecido por psiquiatra infantil e validado por um segundo profissional integrante da equipe, por meio da aplicação dos instrumentos *Development and Well-Being Assessment* (DAWBA) ou *Kiddie Schedule for Affective Disorders and Schizophrenia – Present and Lifetime Version* (KSADS-PL), conforme a faixa etária do participante. Foram excluídos indivíduos com diagnóstico de doenças autoimunes, em uso de imunossupressores ou quimioterapia, com diagnóstico de diabetes ou hipertensão arterial

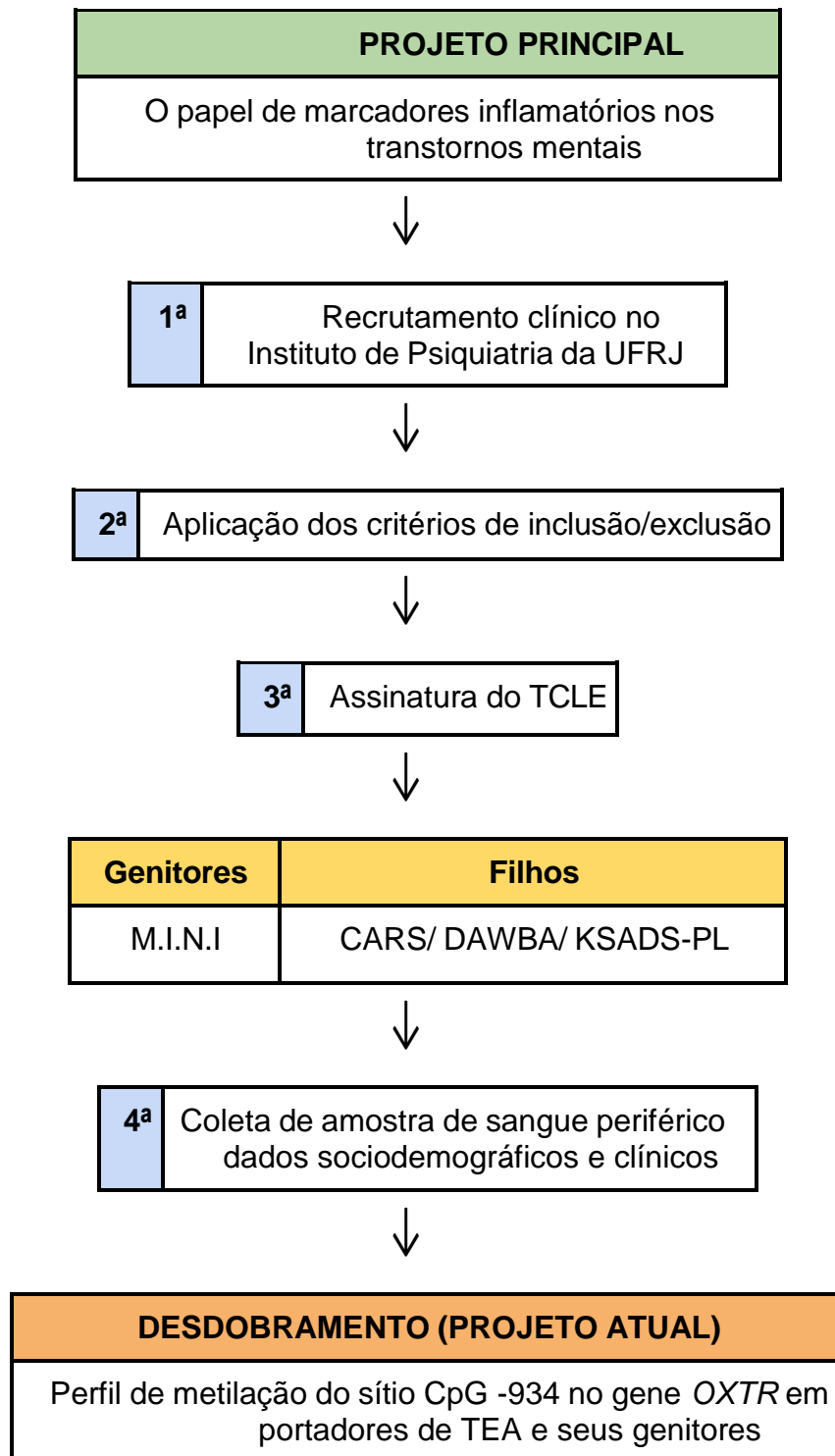
descompensada, infecção ativa no momento da coleta ou histórico de doenças crônicas, como hepatite B ou infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), considerando o potencial impacto dessas condições sobre processos inflamatórios e mecanismos epigenéticos.

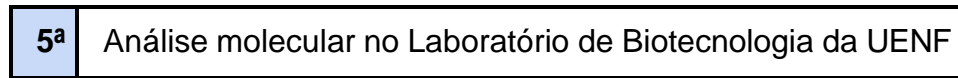
### **4.3 Coleta de amostras e dados dos participantes**

A coleta das amostras biológicas foi realizada após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) pelos genitores, sendo conduzida por profissionais da saúde integrantes da equipe de pesquisa. As amostras de sangue periférico foram coletadas em tubos BD Vacutainer® contendo EDTA como anticoagulante. Após a coleta, volumes entre 500 µL e 1,5 mL de sangue foram aliquotados em microtubos devidamente identificados e armazenados a -80 °C, até o momento da extração do DNA genômico. No total, foram disponibilizadas para análise molecular 34 amostras de crianças e adolescentes com TEA e 39 amostras de genitores, cedidas em colaboração ao Laboratório de Biotecnologia (LBT) da Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF), sob a supervisão do Prof. Dr. Álvaro Fabrício Lopes Rios.

A coleta de dados clínicos e sociodemográficos foi realizada por meio do preenchimento de formulários estruturados pelos genitores. Foram obtidas informações referentes a: (i) dados sociodemográficos da criança e do genitor, incluindo data de nascimento (idade), estado civil, escolaridade, raça/cor, vínculo empregatício, renda familiar e endereço; (ii) dados gestacionais e perinatais, tais como tipo de parto, acompanhamento pré-natal, ocorrência de problemas durante a gestação e uso de substâncias nesse período; e (iii) dados clínicos, abrangendo o desenvolvimento neuropsicomotor (idade de aquisição da fala e da marcha), presença de alergias conhecidas, histórico de internações, uso de medicamentos e histórico psiquiátrico familiar. Os formulários utilizados para a coleta dos dados clínicos, sociodemográficos, gestacionais e perinatais foram autorreferidos, sendo preenchidos pelos genitores das crianças e adolescentes participantes do estudo.

O delineamento do estudo, bem como as etapas de recrutamento, avaliação diagnóstica, critérios de elegibilidade, pareamento biológico e coleta das amostras, estão sintetizados no fluxograma apresentado abaixo.





**Figura 8** - Fluxograma representativo do delineamento do estudo e das etapas de recrutamento dos participantes. **Fonte:** Elaborado pelo autor (2026)

#### 4.4 Extração de DNA do sangue periférico

A extração de DNA das amostras biológicas coletadas foi realizada utilizando o protocolo de tratamento com proteinase K seguido de extração por NaCl 5M adaptado de Olerup e Zetterquist (1992). Inicialmente, para o isolamento de PBMCs (células mononucleares do sangue periférico), as amostras foram descongeladas entre 2°C à 8°C, em geladeira, e transferidas para um tubo cônico para centrifuga, de 15 mL. Foram adicionados dois volumes de tampão de lise de hemácia (TLH) [NH<sub>4</sub>Cl (114mM); NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (1mM)] a um volume do sangue total. As amostras foram incubadas em gelo durante 30 minutos, a fim de potencializar a lise seletiva de hemácias, com inversão de 10 vezes a cada 10 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 2.500 rpm por 15 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensão em TLH e o processo repetido até que houvesse o mínimo possível de hemácias residuais.

A fim de otimizar a recuperação de DNA, o *pellet* de leucócitos foi ressuspensão em 200uL de tampão de lise de núcleos (TLN) [Tris-HCl (10mM); NaCl (400mM); EDTA pH 8,2 (2mM)] e vortexado por oito segundos, etapa adaptada de Miller *et al.* (1988). A suspensão foi transferida para um microtubo de 2mL, para iniciar o tratamento enzimático com proteinase K. Foram adicionados às amostras de células: 80 µL de tampão de proteinase K, 80 µL de água ultrapura, 10 µL de SDS 20% e 20 µL de proteinase K. O mix foi homogeneizado com o pipetador e incubado a 55°C *overnight* (12-16h).

O próximo passo consistiu na extração com NaCl 5M. Para evitar choque térmico com a solução refrigerada de cloreto de sódio, as amostras foram incubadas na geladeira por aproximadamente 15 minutos. Em seguida, foram adicionados 120 µL de NaCl 5M às amostras tratadas, seguidos de agitação por aproximadamente oito

segundos no vórtex, a fim de permitir o aumento da força iônica na solução e a precipitação de proteínas e restos celulares. Assim, as amostras foram centrifugadas a 13.400 rpm por oito minutos, resultando na formação de um *pellet* correspondente às proteínas desnaturadas. O sobrenadante foi transferido para outro tubo, aproximadamente 400 µL, e foram adicionados 1000µL de etanol absoluto. A solução foi homogeneizada por duas a três inversões e incubada a -20°C por 24h, a fim de potencializar a concentração de DNA.

No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas a 13.400 rpm por 10 minutos, formando um *pellet* correspondente ao DNA concentrado. Para remover resíduos da extração, foi adicionado 1 mL de etanol 70%, seguido de nova centrifugação a 13.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante será descartado, e o precipitado foi seco à temperatura ambiente por 15 minutos, com os tubos invertidos sobre um papel filtro. Por fim, as amostras serão ressuspensas em 50 µL de água ultrapura e aquecidas a 37°C por uma hora para diluição do material extraído.

Após a extração de DNA de cada amostra, foi utilizado o espectrofotômetro (NanoDrop2000) para avaliar a pureza do DNA utilizando 1 µL de cada amostra. Verificou-se a relação 260/280 nm (nanômetros) e 260/230 nm para avaliar a presença de proteínas e contaminantes, respectivamente. O critério de aceitabilidade do DNA foi: concentração mínima de 30ng/uL e a relação das densidades ópticas 260/280 e 260/230 entre 1.8 e 2.0 e 1.8 e 2.2, respectivamente. Levando em consideração o tempo e as condições de estocagem das amostras até o início do processamento, algumas amostras não apresentaram bons resultados de extração, não sendo utilizadas no estudo. O número amostral utilizado foi de 21 portadores de TEA e 19 genitores.

#### **4.5 Regiões analisadas no gene *OXTR***

Foi analisado um sítio CpG à 934 pb após o sítio de início da transcrição (TSS), a montante do promotor gênico, selecionada com base em evidências previamente descritas na literatura como região relevante e associada a alterações nos padrões de metilação do DNA em indivíduos com TEA (TEA) (Andari *et al.*, 2020; Gregory *et al.*, 2009; Behnia *et al.*, 2015; Ebner *et al.*, 2019; Wieting *et al.*, 2023).

Para delimitar as porções específicas a serem analisadas na região gênica e orientar o desenho dos *primers* destinados à quantificação da metilação do DNA, foram utilizadas as coordenadas do genoma humano de referência GRCh38/hg38, chr3:8.750.381–8.769.613 para o gene *OXTR* disponível no banco de dados público da Universidade da Califórnia Santa Cruz (UCSC Genome Browser: <https://genome.ucsc.edu/>).

Durante essa etapa, foram considerados diferentes *tracks* de anotação genômica, incluindo a localização de ilhas CpG, a densidade de dinucleotídeos CpG ao longo do gene e marcas epigenéticas descritas em bases de dados do ENCODE e dados provenientes de análises de perfis quantitativos de metilação do DNA em tecidos específicos, como cérebro e sangue (Figura 9).



**Figura 9 - Visualização genômica da região do gene *OXTR* no UCSC Genome Browser.** A imagem apresenta a organização estrutural do gene, com destaque para éxons e íntrons (barra azul e linhas tracejadas, respectivamente), além da densidade de sítios CpG ao longo do locus. As trilhas inferiores representam perfis de metilação do DNA obtidos a partir de diferentes tecidos humanos, incluindo regiões cerebrais (ex.: córtex pré-frontal) e sangue de cordão umbilical, evidenciando variações teciduais nos níveis de metilação ao longo da região analisada. A região destacada em azul corresponde a porção analisada no estudo, sobre uma região de variação tecidual entre indivíduos. A escala genômica é indicada no topo da figura, permitindo a identificação precisa das coordenadas cromossômicas. **Fonte:** UCSC (2026)

O desenho dos *primers* foi realizado utilizando os softwares Primer3plus (<https://www.primer3plus.com>) e OligoAnalyzer™ (<https://www.idtdna.com>), a partir das sequências depositadas no UCSC Genome Browser, considerando parâmetros como tamanho do amplicon, conteúdo de GC (%), temperatura de anelamento (*melting temperature* – Tm), especificidade das sequências e ausência de estruturas

secundárias, incluindo formação de dímeros e *hairpins*. As sequências dos *primers* utilizados no estudo encontram-se descritas na tabela 2.

**Tabela 2-** Sequência dos primers utilizados para amplificação e quantificação da metilação das regiões gênicas do estudo.

Gene	Primer	Sequência (5'-3')	Amplicon (pb)
OXTR	Forward	GGGAGTCAACTTTAGGTTCCG	161
OXTR	Reverse	CTCTCGGAACACCCCGAG	

**Fonte:** Elaborado pelo autor (2026).

#### 4.6 Reação em Cadeia da Polimerase - PCR

Para validar a atividade dos *primers* projetados foi realizada a amplificação por PCR convencional utilizando DNA genômico previamente extraído. A reação foi conduzida em concentrações definidas pelo fabricante do mix da PCR utilizado (Applied Biosystems) em um volume final de 10 µL, utilizando: 1X de SYBR™ Green Universal Master Mix; 0,15 µM de cada primer; 20ng/µL de DNA molde; e água para PCR.

Para determinar a temperatura ótima de anelamento dos primers, foi realizado um gradiente de temperatura a 58°C, 60°C e 62°C. O programa de amplificação consistiu em ciclo de desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 58°/60/62°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos. Após os 40 ciclos, houve um ciclo de extensão final a 72°C por 10 minutos. Os produtos amplificados foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 1%, submetidos à corrida a 100 V por 90 minutos. Os *primers* demonstraram desempenho consistente e eficiente nas três temperaturas de anelamento testadas.

#### 4.7 Análise quantitativa dos níveis de metilação do DNA

A análise quantitativa dos níveis de metilação do DNA (%5mC) foi realizada por *Methylation-Sensitive Restriction Enzyme Digestion and Real-Time Quantitative PCR* (MSRED-qPCR). As porcentagens de metilação do DNA foram calculadas utilizando a

fórmula  $5mC\% = 100 \times 1/2^{-(\Delta Ct)}$  ( $\Delta Ct$  = média do Ct da amostra digerida – média do Ct da amostra não digerida), conforme o protocolo adaptado de Gomes *et al.* (2009).

#### 4.7.1 Digestão Enzimática por enzima sensível à metilação - HpaII

Foram identificados, nas regiões gênicas analisadas, um sítio de corte único para a enzima de restrição sensível à metilação *HpaII* (C'CGG), por meio de *tracks* nas sequências depositadas no USCS Genome Browser e confirmadas pelo software NebCutter v 3.0.23 da New England Biolabs. A sequência e região de corte da enzima estão destacados na figura 6 (item 1.4.2) (Vincze, Posfai, Roberts, 2003).

O processo de digestão ocorreu com a incubação de 200 a 300 ng de DNA genômico com cinco unidades de enzima *HpaII*, 1X de tampão 10X rCuTsmarT Buffer e água ultrapura, num volume final de 10µL a 37°C, por quatro horas, seguido de uma inativação enzimática à 80°C por 20 minutos, conforme orientação do fabricante (New England Biolabs). Foram utilizadas amostras controles do ensaio de digestão, na qual a enzima de restrição foi substituída por água para completar o volume.

#### 4.7.2 PCR em tempo real para quantificação da metilação

Para o ensaio de PCR quantitativa em tempo real, a reação foi realizada no termociclador StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems), com o uso do marcador fluorescente para DNA de dupla fita SYBR Green® PCR Master Mix. O volume final da reação foi de 10 µL, contendo 150 nM de cada primer, 1X de 2X SYBR® Green PCR Master Mix (SYBR Green) (Applied Biosystems), água ultrapura para PCR e 10 - 20ng de DNA *template*. Cada reação foi realizada em duplicata, sendo a amostra positiva a digerida e a negativa a não digerida. A distribuição das amostras na placa de 96 poços foi feita com um micropipetador monocanal eletrônico.

As condições de ciclagem incluíram uma *holding* inicial de 95°C por 10 minutos; seguido por 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 60°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos, Por fim, uma etapa de curva de *melting* com desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento a 60° por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos. Os ensaios de qPCR foram realizados em triplicatas biológicas. Os dados obtidos do Cycle Thresold (CT) foram utilizados

para obtenção da %5mC, sendo considerados desvio padrão de 0,5 (½) ciclo entre as replicatas de cada amostras.

#### **4.8 Análise Estatística**

A análise estatística foi conduzida de acordo com a natureza das variáveis (categóricas e/ou numéricas) e com os objetivos propostos no estudo. Inicialmente, a normalidade da distribuição dos dados foi avaliada por meio do teste de Shapiro–Wilk. Considerando a ausência de normalidade para a maioria das variáveis, os dados numéricos foram analisados utilizando testes não paramétricos, incluindo os testes de Kruskal–Wallis e Mann–Whitney. Para a comparação do perfil de metilação do DNA entre genitores e seus respectivos filhos, foi aplicado o teste de Wilcoxon para amostras pareadas. A associação entre as variáveis estudadas foi avaliada por meio da correlação de Spearman e da regressão linear simples. O nível de significância estatística adotado foi de  $p \leq 0,05$ . Os dados provenientes das entrevistas foram submetidos à análise qualitativa de conteúdo, segundo a abordagem categorial-temática. Todas as análises estatísticas e representações gráficas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism, versão 10.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Caracterização das amostras do estudo

#### 5.1.1 Dados sociodemográficos

A caracterização sociodemográfica dos participantes com TEA e de seus respectivos genitores está apresentada na tabela 3. É importante ressaltar que, por se tratar de um questionário autorreferido, observou-se a ausência de respostas para algumas variáveis, decorrente da ausência de resposta por parte de determinados participantes, evidenciado por dados com resultados abaixo no número amostral.

A amostra foi composta por 21 crianças e adolescentes com diagnóstico de TEA, que apresentaram mediana de idade de 11 anos (intervalo interquartil [IIQ]: 8–15), com predominância do sexo masculino (66,7%). Em relação à raça/cor, observou-se maior frequência de indivíduos declarados pardos (10/21; 47,6%), seguidos por brancos (8/21; 38,1%) e pretos (3/21; 14,3%). Quanto à escolaridade, verificou-se distribuição ao longo das etapas da educação básica, com predomínio do ensino fundamental (Fundamental I: 13/20; 61,9% e Fundamental II: 3/20; 14,2%), além da presença de crianças em educação infantil (3/20; 14,2%) e educação especial (1/20; 4,8%).

Em relação aos genitores, foram obtidas informações completas para 19 participantes, com idades variando entre 30 e 69 anos, e mediana de 40 anos (IIQ: 33–54). Houve predominância do sexo feminino (17/19; 89,5%). Quanto à raça/cor autodeclarada dos genitores, observou-se maior frequência de indivíduos pardos (8/19; 42,1%), seguidos por brancos (7/19; 36,8%) e pretos (4/19; 21,1%).

No que se refere ao estado civil dos genitores, predominou a condição de solteiro(a) (8/19; 42,1%), seguida por casado(a) (5/19; 26,3%) e união estável (4/19; 21,1%), havendo ainda um caso de divórcio (1/19; 5,3%).

Quanto ao nível de escolaridade dos genitores, observou-se predomínio de ensino médio completo (10/19; 52,6%), seguido por ensino superior (4/19; 21,1%) e pós-graduação (2/19; 10,5%), com menor frequência de escolaridade fundamental (1/19; 5,3%) e elementar (5,3%).

Quanto ao vínculo empregatício 52,6% (10/19) encontravam-se empregados, enquanto 31,6% (4/19) estavam desempregados, sendo também observados genitores incapacitados para o trabalho (2/19; 10,5%) e aposentados (1/19; 5,3%). A renda familiar concentrou-se principalmente na faixa entre R\$ 1.255,00 e R\$ 2.004,00 (36,8%), seguida pelas faixas de até R\$ 1.254,00 (26,3%) e entre R\$ 2.005,00 e R\$ 8.640,00 (21,1%), indicando predominância de um perfil socioeconômico de baixa a média renda na população estudada.

**Tabela 3- Características sociodemográficas dos portadores de TEA e de seus genitores.** As variáveis categóricas foram apresentadas como frequência absoluta e relativa [n (%)], enquanto as variáveis contínuas foram descritas por mediana e intervalo interquartil (IQR).

Variável	Indivíduos com TEA	Genitores
Idade (anos), mediana (IQR)	Mediana: 11 (IQR: 8–15)	Mediana: 40 (IQR: 32–54)
Sexo, n (%)	Masculino: 14 (66,7%) Feminino: 7 (33,3%)	Feminino: 17 (89,5%) Masculino: 2 (10,5%)
Raça/cor, n (%)	Parda: 10 (47,6,1%) Branca: 8 (38,1%) Preta: 3 (14,3%)	Parda: 8 (42,1,8%) Branca: 7 (36,8%) Preta: 4 (21,1%)
Estado civil, n (%)		Solteira(o): 8 (42,1%) Casada(o): 5 (26, 3%) União estável: 4 (21,1%) Divorciada(o): 1 (5,3%)
Escolaridade, n (%)	Educação infantil: 3 (14,2%) Fundamental I: 13 (61,9%) Fundamental II: 3 (14,2%) Ensino especial: 1 (4,8%)	Ensino médio: 11 (57,8%) Ensino superior: 4 (21,1%) Pós-graduação: 2 (10,5%) Fundamental: 1 (5, 3%) Elementar: 1 (5, 3%)
Vínculo empregatício, n (%)	Não se aplica	Empregada(o): 10 (52,6%) Desempregada(o): 6 (31,6%) Incapacitada(o): 2 (10,5%) Aposentada(o): 1 (5,3%)
Renda familiar, n (%)	Não se aplica	Até R\$ 1.254,00: 5 (26,3%) R\$ 1.255,00–2.004,00: 7 (36,8%) R\$ 2.005,00–8.640,00: 4 (21,1%) ≥ R\$ 8.641,00: 3 (15,8%)

Fonte: Elaborado pelo autor (2026)

### 5.1.2 Gestacionais e perinatais

O histórico gestacional e perinatal dos indivíduos com TEA incluídos no estudo encontra-se sumarizado na Tabela 4. A idade materna no momento da gestação apresentou mediana de 31 anos, com intervalo interquartil entre 19 e 42 anos (n = 19).

Observou-se que a maioria das mães realizou acompanhamento pré-natal durante a gestação (18/21; 85,7%), enquanto uma minoria não realizou acompanhamento pré-natal (2/21; 9,5%).

Quanto à ocorrência de intercorrências ao longo da gestação, verificou-se que parte das mães relatou a presença de problemas gestacionais (11/16; 68,7%), incluindo hipertensão arterial, diabetes gestacional, infecções do trato urinário de repetição, estresse elevado e outras condições clínicas. As demais mães não relataram intercorrências durante a gestação (5/16; 31,3%). Em relação ao uso de substâncias durante a gestação, a maioria das mães negou qualquer uso (12/17; 70,6%). O uso de substâncias foi relatado por 5/17 (29,4%) mães, incluindo consumo de cigarro e bebidas alcoólicas, além de outras substâncias não especificadas.

O tempo gestacional foi homogêneo entre os participantes, com todos os casos apresentando gestação a termo, com duração de 9 meses (21/21; 100%). No que se refere ao tipo de parto, observou-se predomínio de cesáreas (13/21; 61,9%), enquanto os partos vaginais corresponderam a 7/21 (33,3%) dos casos.

**Tabela 4- Características gestacionais e pré-natais dos participantes da pesquisa.** Os dados incluem características do parto, tempo gestacional, idade materna, presença de problemas na gestação, uso de substâncias e realização de pré-natal. Variáveis categóricas são apresentadas como n (%), e variáveis contínuas como mediana (intervalo interquartil, IQR).

Variável	Resultados
Idade materna, mediana (IQR)	31 (19–42)
Realizou pré-natal (sim/não), n (%)	Sim: 18 (85,7%) Não: 2 (9,5 %)
Tempo gestacional, n (%)	9 meses: 21 (100%)

Variável	Resultados
Forma de parto (normal/cesárea), n (%)	Cesária: 13 (61,9%) Normal: 7 (33,3%)
Problemas na gestação (sim/não), n (%)	Sim: 11 (68,7%) Não: 5 (31,3%).
Uso de substâncias na gestação (sim/não), n (%)	Sim: 5 (29,4%) Não 12 (70,6%)

**Fonte:** Elaborado pelo autor (2026)

### 1.1.1. Histórico clínico

Quanto ao desenvolvimento neuropsicomotor dos portadores de TEA, a idade de aquisição das primeiras palavras ( $n = 20$ ) ocorreu predominantemente a partir dos 2 anos (8/21; 38,1%) e no intervalo entre 1 ano e 1 ano e 6 meses (8/21; 38,1%) e antes de 1 ano (5/21; 23,8%). Em relação ao início da marcha ( $n = 21$ ), observou-se maior frequência entre 1 ano e 1 ano e 6 meses (14/21; 66,7%), seguida de antes de 1 ano (5/21; 23,8%) e a partir dos 2 anos (1/21; 4,8%).

No que se refere às alergias conhecidas ( $n = 21$ ), 7/21 (33,3%) relataram pelo menos uma alergia, enquanto 14/21 (66,7%) não relataram. Além disso, a presença de histórico familiar de acompanhamento psiquiátrico/neurológico foi reportada em 9/21 (42,9%) dos casos com informação disponível, ao passo que 11/21 (52,4%) informaram ausência desse histórico. Por fim, a avaliação do perfil comportamental por meio da escala CARS ( $n = 19$ ) apresentou mediana de 35 (IIQ: 35–36), sugerindo relativa concentração dos escores na amostra avaliada. Os dados estão sintetizados na tabela abaixo (tabela 5).

**Tabela 5- Características clínicas e de desenvolvimento dos portadores de TEA.** Os dados incluem desenvolvimento da linguagem e da marcha, histórico de alergias e psiquiátrico familiar, e avaliação do comportamento por meio da Escala de CARS. Variáveis categóricas são apresentadas como n (%) e variáveis contínuas como mediana (intervalo interquartil, IQR).

Variável	Resultados
Idade das primeiras palavras (meses), n (%)	Antes de 1 ano: 5 (23,8%) Entre 1 ano e 1 ano e 6 meses: 8 (38,1%) Após os 2 anos: 8 (38,1%)
Idade para começar a andar (meses), n (%)	Antes de 1 ano: 5 (23,8%) Entre 1 ano e 1 ano e 6 meses: 14 (66,7%) A partir dos 2 anos: 1 (4,8%)
Escore CARS, mediana (IQR)	35 (IQR: 35–36)
Alergia conhecida (sim/não), n (%)	Sim: 7 (33,3%) Não: 14 (66,7%)
Histórico familiar psiquiátrico (sim/não), n (%)	Sim: 9 (42,9%) Não: 11 (52,4%)

**Fonte:** Elaborado pelo autor (2026)

### 5.1.3 Distribuição geográfica

A distribuição geográfica dos participantes do estudo revelou concentração predominante no município do Rio de Janeiro e em sua região metropolitana, refletindo a área de abrangência do atendimento prestado pelo Instituto de Psiquiatria da Universidade Federal do Rio de Janeiro (IPUB/UFRJ). Os participantes residiam majoritariamente em bairros da zona norte e zona oeste do Rio de Janeiro, bem como em comunidades urbanas. Além da capital, observou-se a participação de indivíduos provenientes de municípios da Baixada Fluminense, como Queimados e Mesquita.

De forma pontual, foi registrado um participante residente fora do estado do Rio de Janeiro, no município de Ribeirão Preto, no estado de São Paulo. A figura 10 ilustra a distribuição espacial dos participantes, bem como a localização do IPUB/UFRJ, permitindo visualizar a concentração dos domicílios no estado do Rio de Janeiro e sua proximidade relativa ao centro de referência em saúde mental onde o estudo foi conduzido.



**Figura 10 - Distribuição dos participantes atendidos no IPUB/UFRJ.** O mapa mostra a distribuição geográfica dos participantes por regiões, preservando a privacidade. O IPUB/UFRJ, local de atendimento, está indicado com o ícone vermelho. Os demais ícones representam a residência do bairro de um ou mais participantes, sem expor endereços exatos (Elaborado pelo autor através do Google My Maps, 2026).

## 5.2 Associações entre as variáveis sociodemográficas e clínicas e a escala de CARS

Em função da homogeneidade dos valores, não foi possível identificar associações estatisticamente significativas entre os escores da CARS e variáveis sociodemográficas, clínicas e de metilação analisadas. A dispersão reduzida dos dados limita o poder estatístico das análises de correlação, uma vez que a detecção de relações monotônicas depende de variabilidade suficiente entre as observações. Assim, os resultados sugerem que, nesta amostra, a escala de CARS não apresentou sensibilidade adequada para discriminar gradientes de gravidade que permitissem a identificação de associações estatísticas.

### 5.3 Metilação do DNA na região -934 em portadores de TEA autistas versus seus genitores

Com base nos objetivos do presente estudo, foi avaliado o perfil de metilação da região -934 do gene *OXTR* em portadores de TEA e seus respectivos genitores. A análise comparativa entre os grupos revelou que os níveis de metilação do DNA apresentaram distribuição variável em ambos os grupos (Figura 11). Os portadores de TEA apresentaram uma mediana de metilação superior à observada nas genitores, embora com ampla dispersão dos valores individuais. No grupo de genitores, observou-se uma distribuição mais concentrada, com menores medianas, porém também com *outliers*.

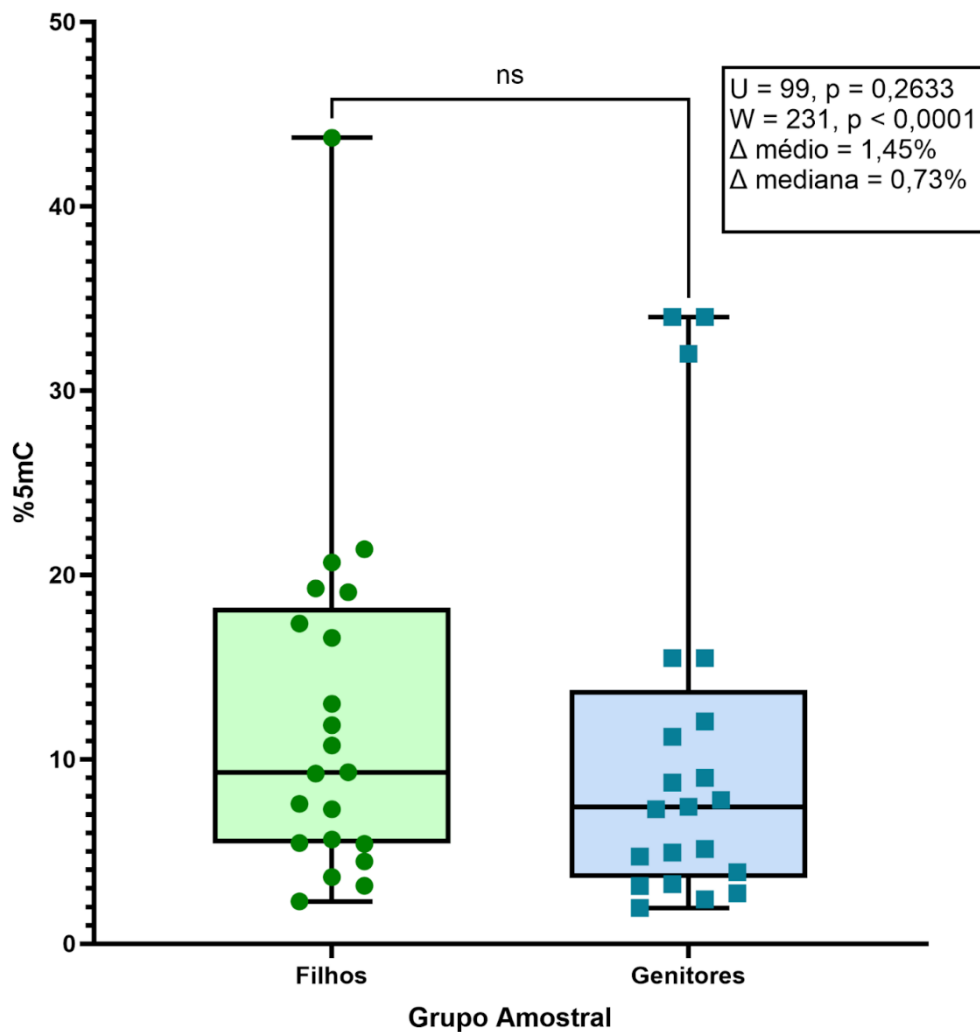
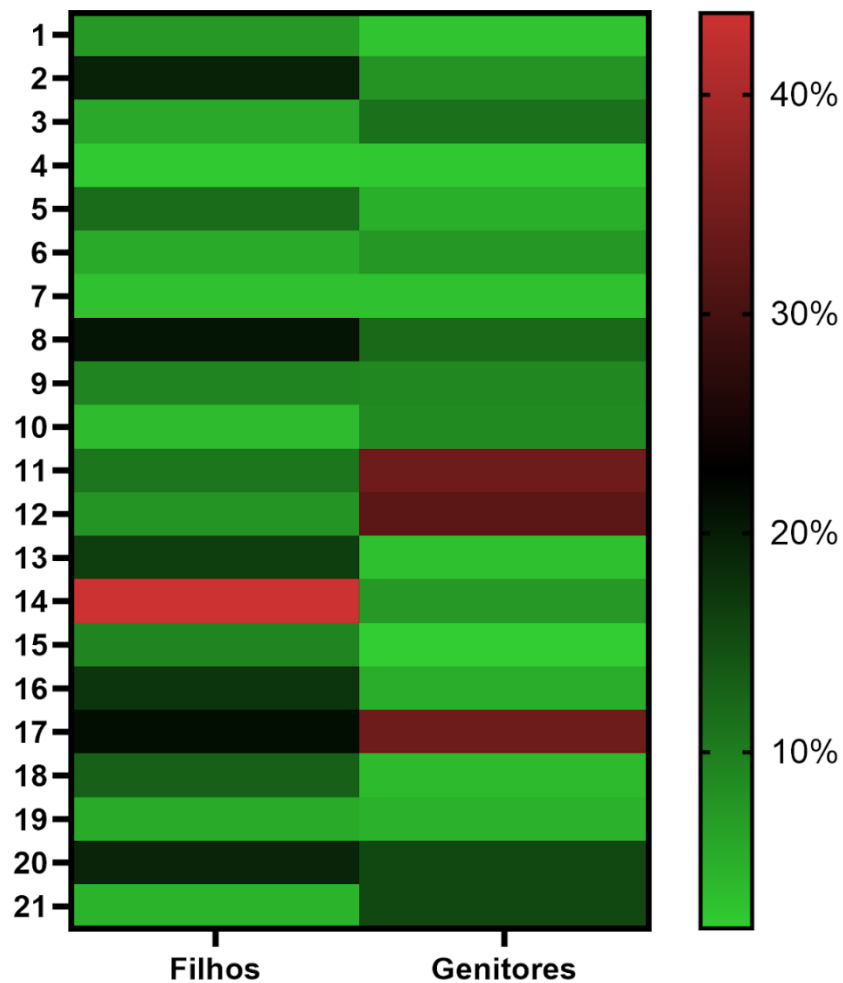


Figura 11 - Distribuição dos níveis de metilação da região -934 do gene *OXTR* em portadores de TEA e seus genitores. Os valores de metilação (%) são apresentados como boxplots, com a linha central indicando a mediana, as caixas representando o intervalo interquartil (Q1-Q3) e as hastes

indicando os valores mínimos e máximos. Os pontos sobrepostos correspondem aos valores individuais de cada amostra. Em média, os filhos apresentaram  $\Delta = 1,45\%$  em relação às genitores ( $\Delta$  mediana =  $0,73\%$ ). A comparação entre os grupos foi realizada pelo teste de Mann–Whitney ( $p = 0,2633$ ). **Fonte:** Elaborado pelo autor (2026).

A análise pelo teste de Wilcoxon (W) para amostras pareadas demonstrou discrepância estatisticamente significativa entre os níveis de metilação entre genitores e filhos, sendo observados valores consistentemente mais elevados nos portadores de TEA em comparação aos seus respectivos genitores, conforme indicado pela soma exclusiva de ranks positivos ( $W = 231$ ;  $p < 0,0001$ ), sendo possível a visualização na figura 12. Além da significância estatística, observou-se tamanho de efeito elevado na comparação pareada entre genitores e filhos ( $r = 0,88$ ), indicando diferença consistente nos níveis de metilação dessa região entre amostras pareadas.

**Comparação da metilação entre filhos e genitores na região -934 do gene OXTR**

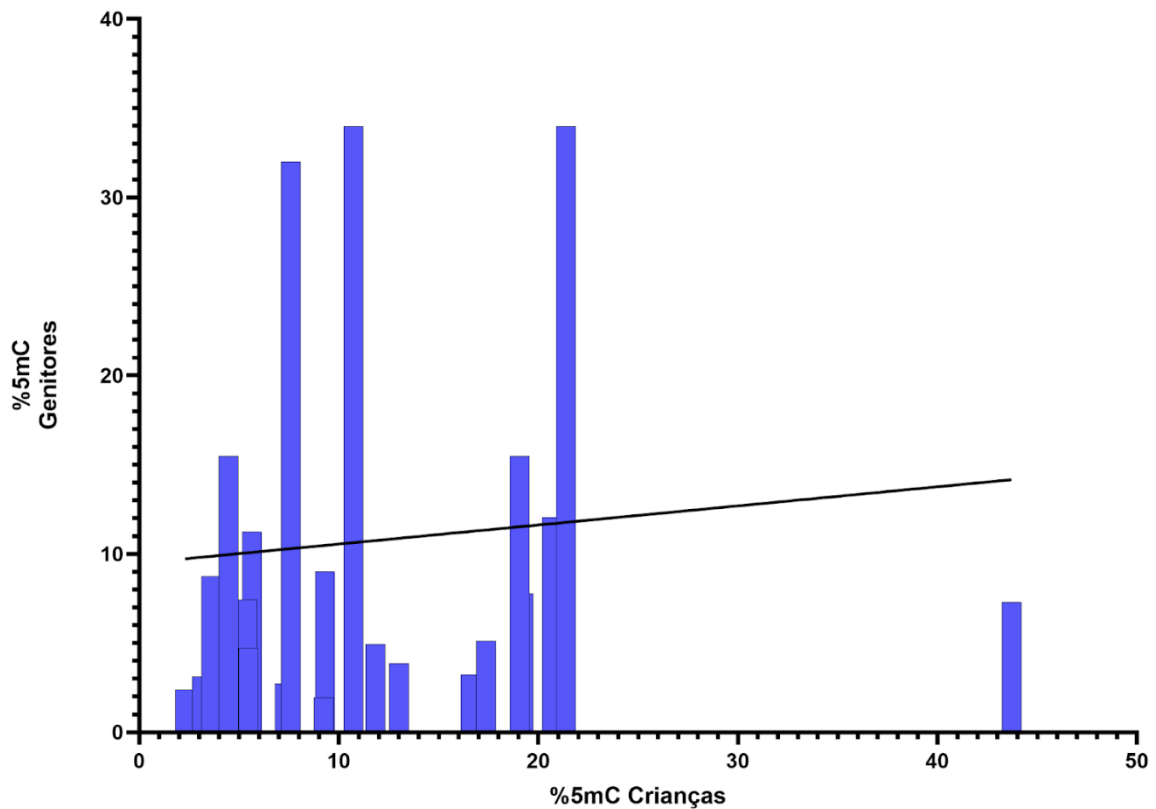


**Figura 12 - Comparação da metilação do DNA entre filhos e genitores na região -934 do gene OXTR.** Heatmap mostrando o perfil de metilação de dois grupos (Filhos e Genitores) na região -934 do gene OXTR. A intensidade da cor indica o nível de metilação, onde tons mais escuros representam

valores mais altos e tons mais claros valores mais baixos. A escala à direita indica os valores absolutos de metilação. A diferença entre os pares apresentou-se estatisticamente significativa ( $p < 0,0001$ ).  
**Fonte:** Elaborado pelo autor (2026).

Em média, a metilação nos filhos foi 1,45% ( $\Delta$  médio) maior que nos genitores ( $\Delta$  mediana = 0,73%). Apesar da diferença, observou-se variação individual considerável. Algumas diferenças foram altas ou baixas, variando de -24,41% a 36,41%, indicando heterogeneidade biológica entre os pares. Esses valores extremos, representados como pontos isolados no *boxplot*, reforçam que, embora a tendência geral seja de maior metilação nos filhos, a magnitude da diferença varia substancialmente entre indivíduos.

Embora os filhos apresentassem metilação consistentemente mais elevada em comparação aos genitores, a análise de correlação de Spearman apresentou correlação positiva fraca, mas não significativa entre os níveis de metilação entre pais e filhos ( $r_s = 0,30$ ; IC 95% = -0,17 a 0,65;  $p = 0,19$ ) (Figura 13). Em análise complementar, foi realizada regressão linear simples com o objetivo de avaliar se a metilação dos genitores seria capaz de predizer os níveis de metilação dos filhos. Não foi observada relação linear significativa entre as variáveis ( $R^2 = 0,009$ ;  $p = 0,668$ ), indicando que a metilação dos genitores não explica de forma linear a variabilidade da metilação nos filhos, nesta amostragem.



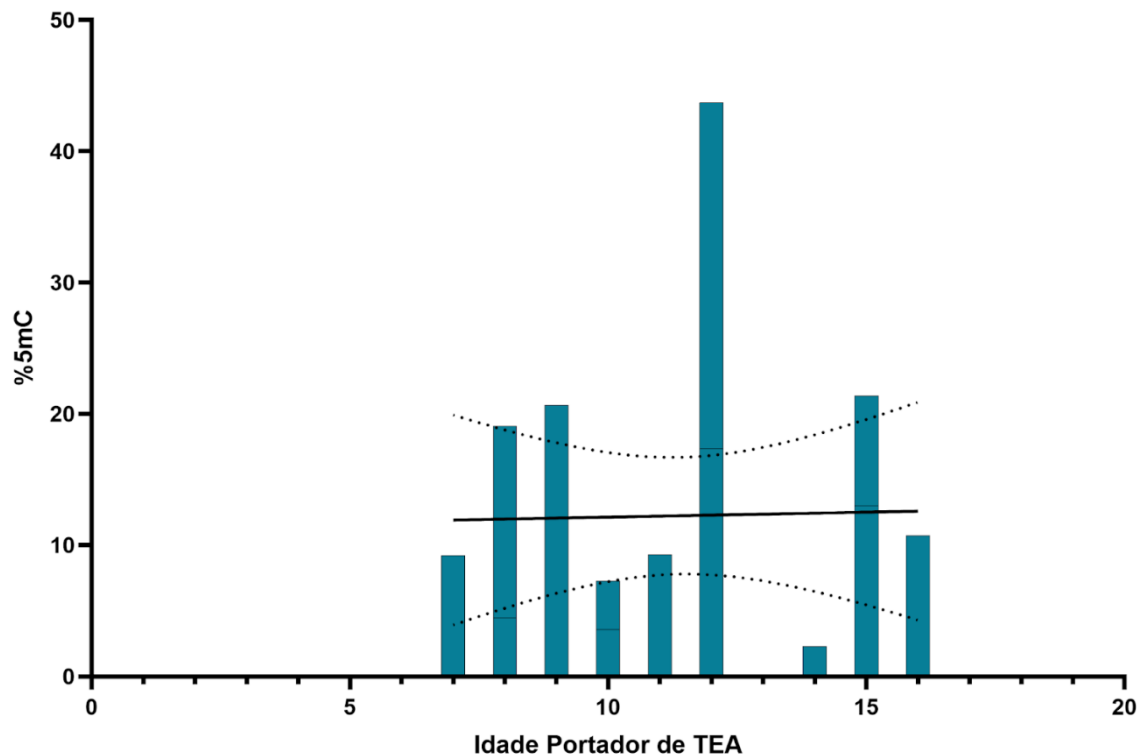
achados indicam que a presença de irmãos não alterou significativamente as conclusões gerais, reforçando a robustez dos resultados observados.

#### **5.4 Metilação do DNA na região -934 e correlação variáveis sociodemográficas e clínicas.**

As associações entre os níveis de metilação do DNA da região gênica analisada e variáveis sociodemográficas e clínicas foram avaliadas por meio de testes de correlação ou comparação entre grupos, de acordo com a natureza das variáveis. Para variáveis contínuas, foi utilizado o teste de correlação de Spearman. Para variáveis categóricas com dois grupos independentes, foram aplicados os testes de Mann–Whitney ou Kolmogorov–Smirnov, conforme apropriado.

##### **5.4.1 Idade**

A correlação entre a idade da criança e os níveis de metilação do DNA no sítio CpG -934 do gene *OXTR* foi avaliada, não sendo observada associação significativa entre as variáveis ( $r = 0,056$ ;  $p = 0,809$ ). A análise de regressão linear corrobora esse achado, uma vez que o modelo não foi significativo ( $F = 0,01$ ;  $p = 0,918$ ), apresentando coeficiente de determinação baixo ( $R^2 = 0,0006$ ), indicando ausência de relação linear entre a idade e a metilação do *OXTR* na amostra analisada. (Figura 14).

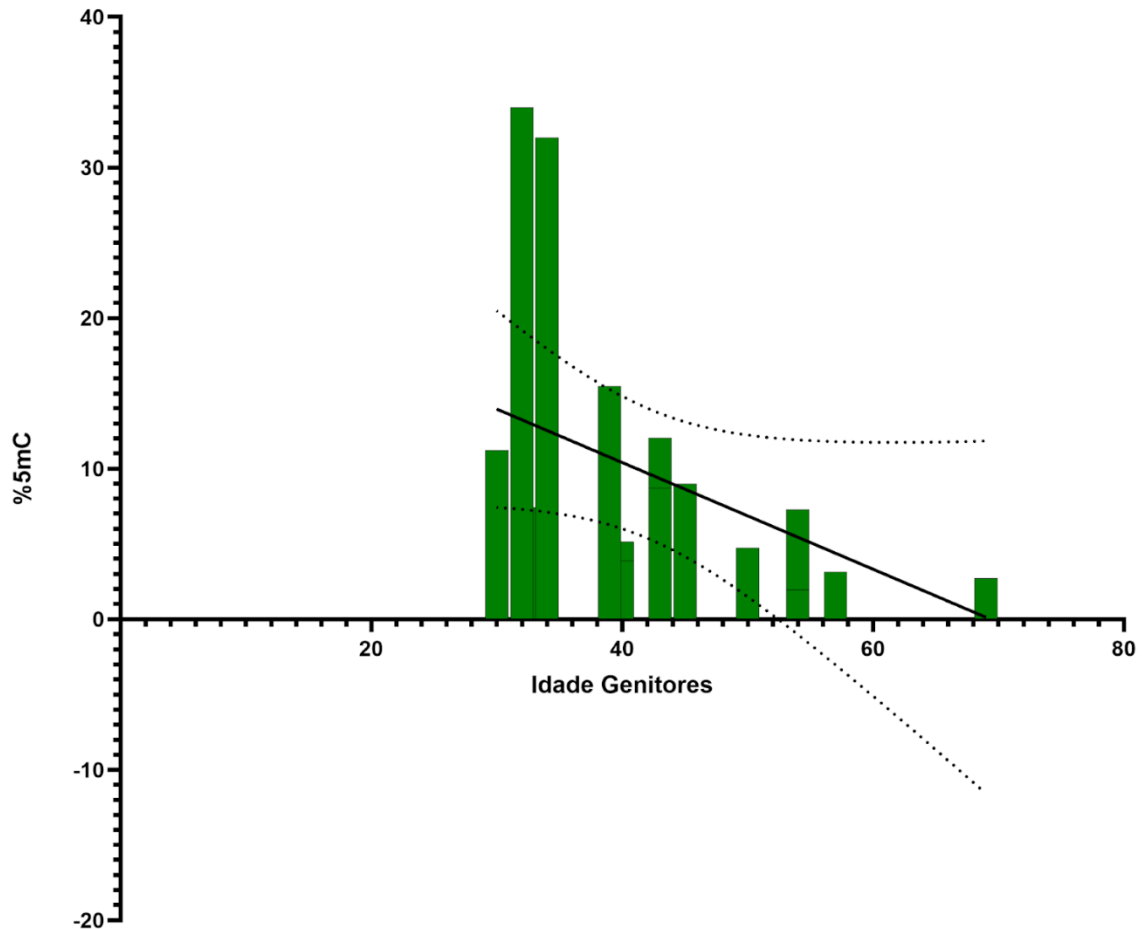


**Figura 14 - Associação entre a idade das crianças com TEA e os níveis de metilação do DNA no sítio CpG -934 do gene *OXTR*.** Gráfico de dispersão representando a relação entre a idade das crianças diagnosticadas com transtorno do espectro autista (TEA) (eixo x) e os níveis de metilação do DNA no sítio CpG -934 do gene *OXTR* (eixo y). Cada barra corresponde a um indivíduo analisado. A associação entre as variáveis foi avaliada por meio do teste de correlação de Spearman, não sendo observada correlação significativa entre a idade e os níveis de metilação. A linha contínua representa o ajuste de regressão linear utilizado apenas para visualização da tendência dos dados, enquanto as linhas pontilhadas indicam o intervalo de confiança de 95%. **Fonte:** Elaborado pelo autor (2026).

A associação entre a idade dos genitores e os níveis de metilação do DNA no sítio CpG -934 do gene *OXTR* também foi avaliada por meio do teste de correlação de Spearman. Observou-se uma correlação negativa de magnitude moderada, porém não estatisticamente significativa, entre as variáveis ( $r = -0,440$ ;  $p = 0,068$ ), indicando uma tendência de redução da metilação do *OXTR* com o aumento da idade dos genitores, sem evidência robusta de associação monotônica na amostra analisada.

A análise de regressão linear simples indicou que a idade dos genitores explicou aproximadamente 17,7% da variabilidade nos níveis de metilação do *OXTR* ( $R^2 = 0,177$ ). Entretanto, o coeficiente angular não diferiu significativamente de zero

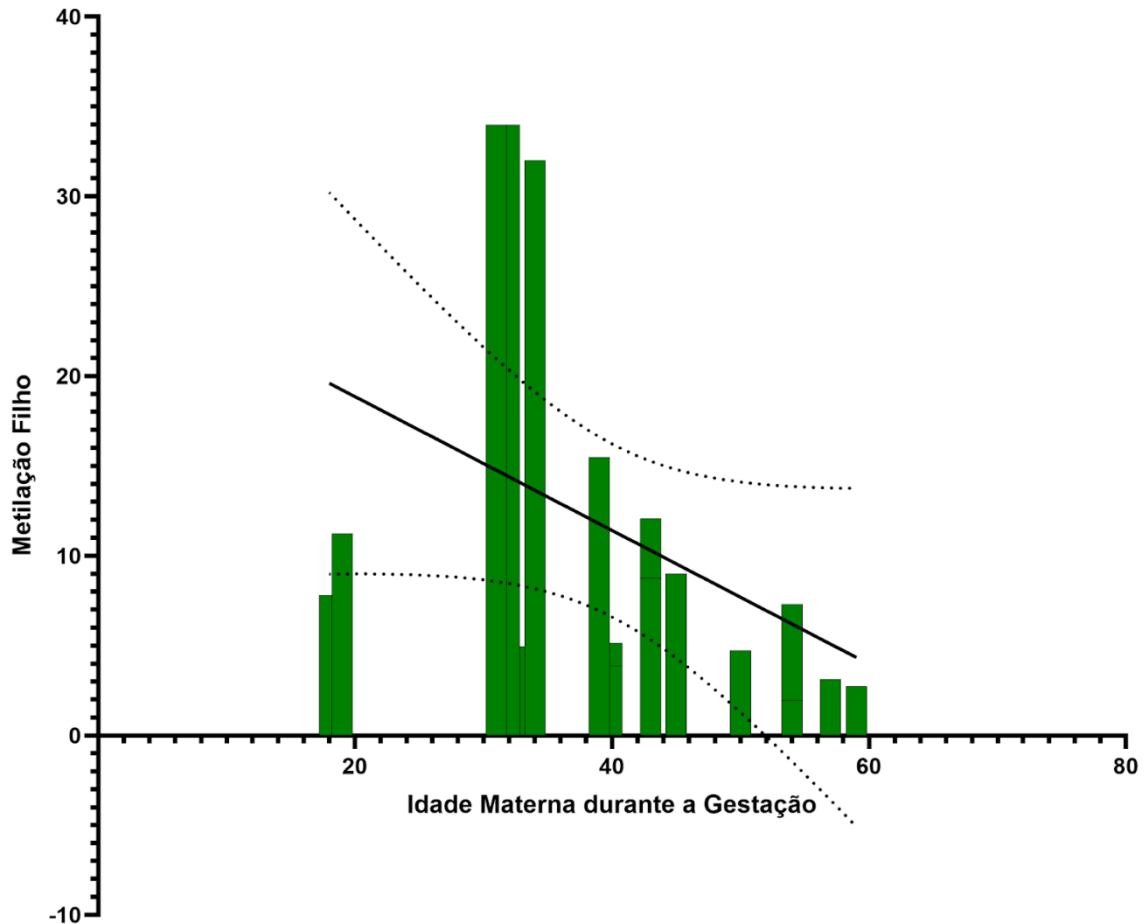
( $F(1,16) = 3,45$ ;  $p = 0,082$ ), corroborando a ausência de associação estatisticamente significativa entre as variáveis (Figura 15).



**Figura 15 - Associação entre idade dos genitores e metilação do DNA no sítio CpG -934 do gene OXTR.** Gráfico de dispersão ilustrando a relação entre a idade dos genitores (eixo x) e os níveis de metilação do DNA no sítio CpG -934 do gene OXTR (eixo y). Cada barra representa um indivíduo. A correlação entre as variáveis foi analisada por meio do teste de correlação de Spearman, evidenciando uma associação negativa moderada, mas não significativa. A linha contínua corresponde ao ajuste de regressão linear para fins ilustrativos, e as linhas pontilhadas representam o intervalo de confiança de 95%. **Fonte:** Elaborado pelo autor (2026).

A associação entre a idade materna durante a gestação e os níveis de metilação do DNA foi avaliada, sendo observada uma correlação negativa moderada e estatisticamente significativa ( $r = -0,512$ ;  $p = 0,025$ ). Esse resultado indica que maiores idades maternas durante a gestação estiveram associadas a menores níveis de metilação do OXTR nos filhos. A análise de regressão linear simples foi realizada de forma complementar e não demonstrou significância estatística ( $F = 3,36$ ;  $p =$

0,084;  $R^2 = 0,165$ ), sugerindo que a relação observada não segue um padrão linear estrito (Figura 16).

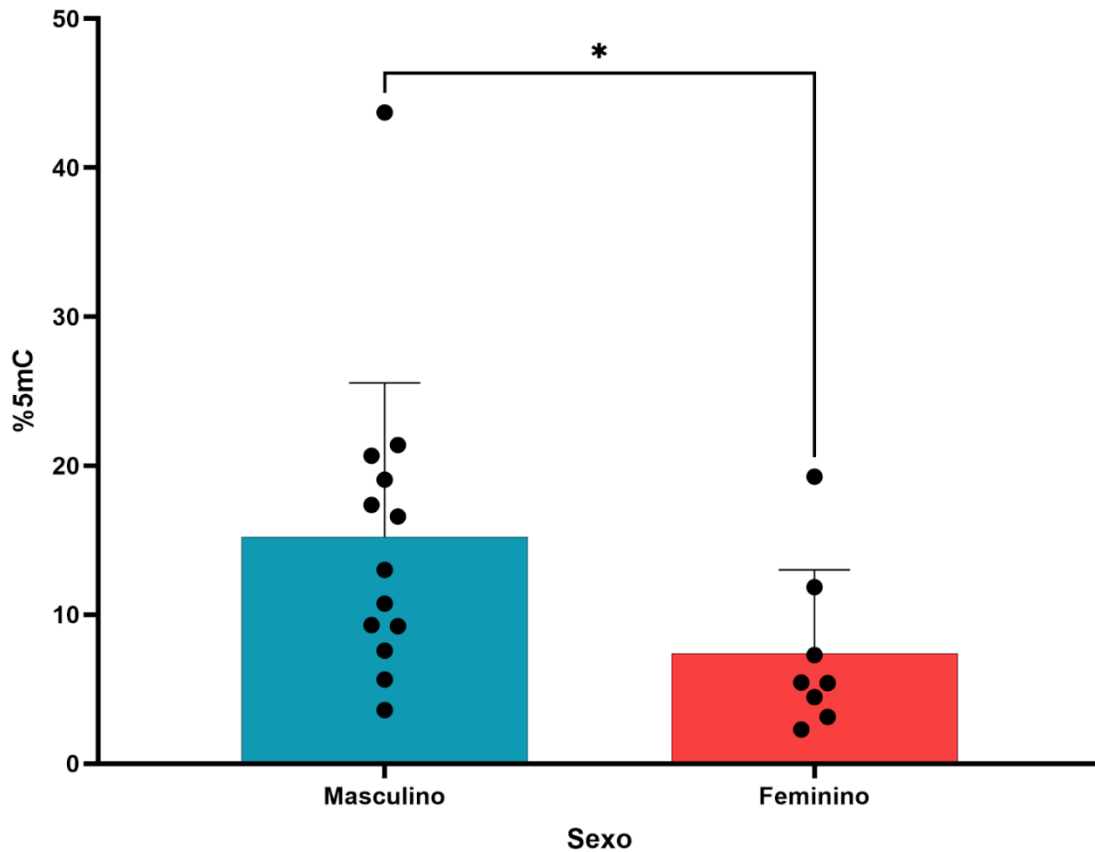


**Figura 16 - Associação entre idade materna durante a gestação e metilação do DNA no sítio CpG -934 do gene *OXTR* em crianças.** Gráfico de dispersão representando a relação entre a idade materna durante a gestação (eixo x) e os níveis de metilação do DNA no sítio CpG -934 do gene *OXTR* nas crianças (eixo y). Cada barra corresponde a um indivíduo analisado. A associação entre as variáveis foi avaliada por meio do teste de correlação de Spearman, indicando uma correlação negativa moderada. A linha contínua representa o ajuste da regressão linear utilizado apenas para visualização da tendência dos dados, enquanto as linhas pontilhadas indicam o intervalo de confiança de 95%. **Fonte:** Elaborado pelo autor (2026).

#### 5.4.2 Sexo e raça

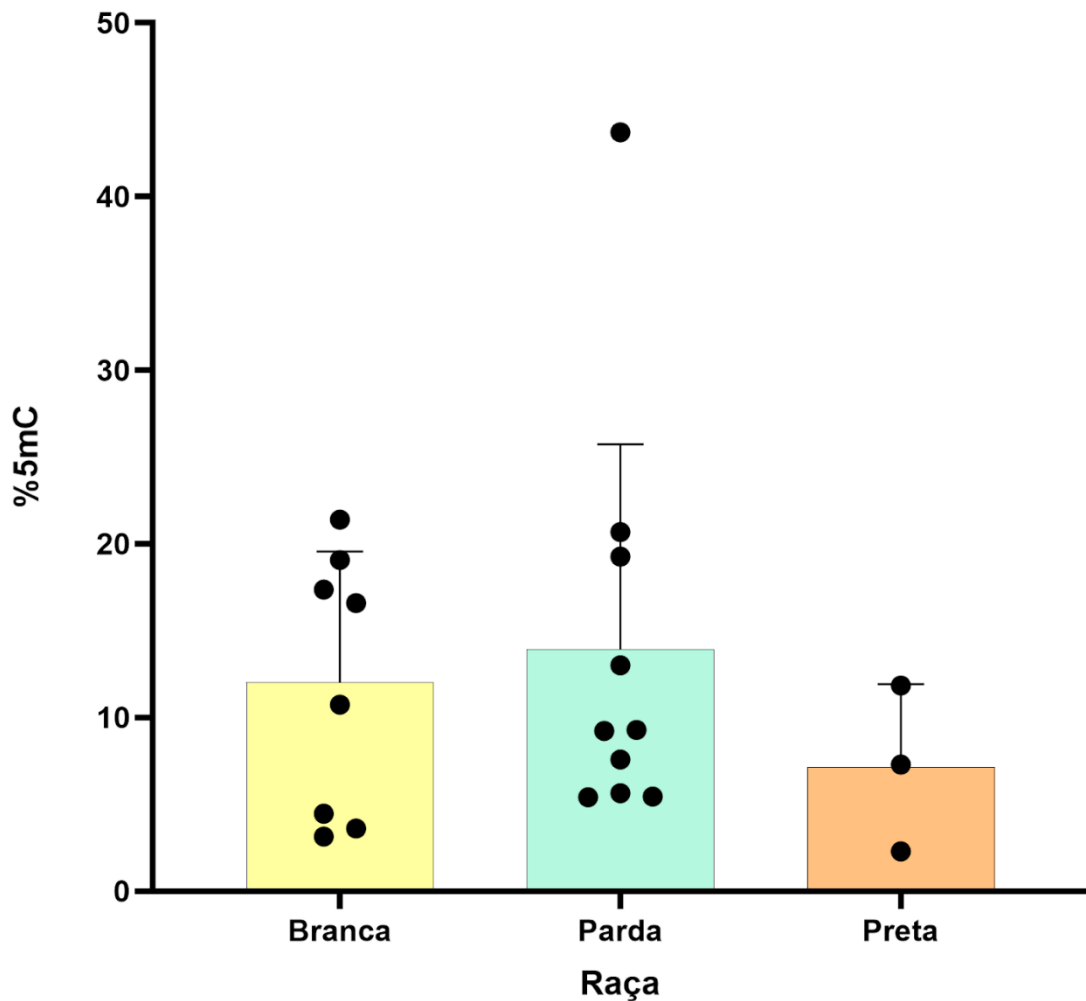
A metilação do DNA no sítio CpG -934 do gene *OXTR* foi comparada entre os portadores de TEA do sexo masculino e feminino por meio do teste de Mann-Whitney. Observou-se diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p = 0,0246$ ), com indivíduos do sexo masculino apresentando níveis mais elevados de metilação (mediana = 13,01%;  $n = 13$ ) em comparação às do sexo feminino (mediana = 5,44%;  $n = 8$ ) (Figura 17). Como análise complementar, foi realizada correlação de Spearman

entre sexo e metilação, confirmando associação negativa moderada ( $r = -0,502$ ;  $p = 0,020$ ), confirmando menores níveis de metilação associados ao sexo feminino.



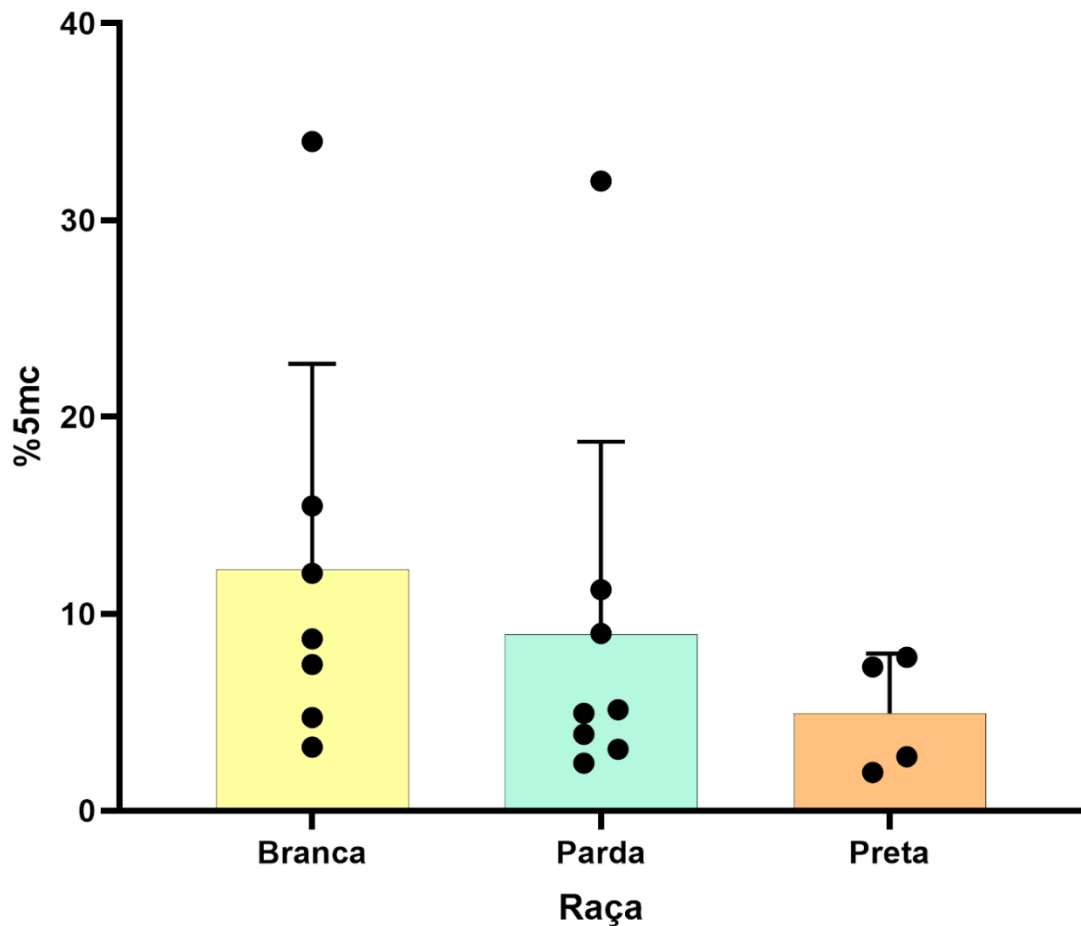
**Figura 17- Comparação dos níveis de metilação do DNA no sítio CpG -934 do gene OXTR entre crianças do sexo masculino e feminino.** Gráfico de barras representando os níveis de metilação do DNA (%5mC) no sítio CpG -934 do gene OXTR em crianças diagnosticadas com transtorno do espectro autista (TEA), estratificadas de acordo com o sexo biológico. As barras representam a mediana dos valores de metilação em cada grupo, e as hastes indicam a dispersão dos dados. A comparação entre os grupos masculino e feminino foi realizada por meio do teste não paramétrico de Mann-Whitney, sendo observada diferença estatisticamente significativa entre os sexos ( $p < 0,05$ ), indicada pelo asterisco. **Fonte:** Elaborado pelo autor (2026).

As diferenças nos níveis de metilação do DNA nessa região entre os grupos de raça/cor dos portadores com TEA foram avaliadas por meio do teste de Kruskal-Wallis. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as medianas de metilação entre os grupos analisados ( $H = 1,311$ ;  $p = 0,539$ ), indicando que a variável raça/cor não esteve associada aos níveis de metilação do *OXTR* na amostra estudada (Figura 18).



**Figura 18 - Metilação do OXTR em portadores de TEA segundo raça/cor.** Gráfico de barras representando os níveis de metilação do DNA (%5mC) no sítio CpG -934 do gene OXTR em crianças com TEA, de acordo com a raça/cor. As barras correspondem à medida de tendência central e as hastes à variabilidade. A comparação entre os grupos foi realizada por teste de Kruskal-Wallis, não assumindo distribuição normal dos dados, considerando-se um nível de significância de 5% ( $p > 0,05$ ). **Fonte:** Elaborado pelo autor (2026).

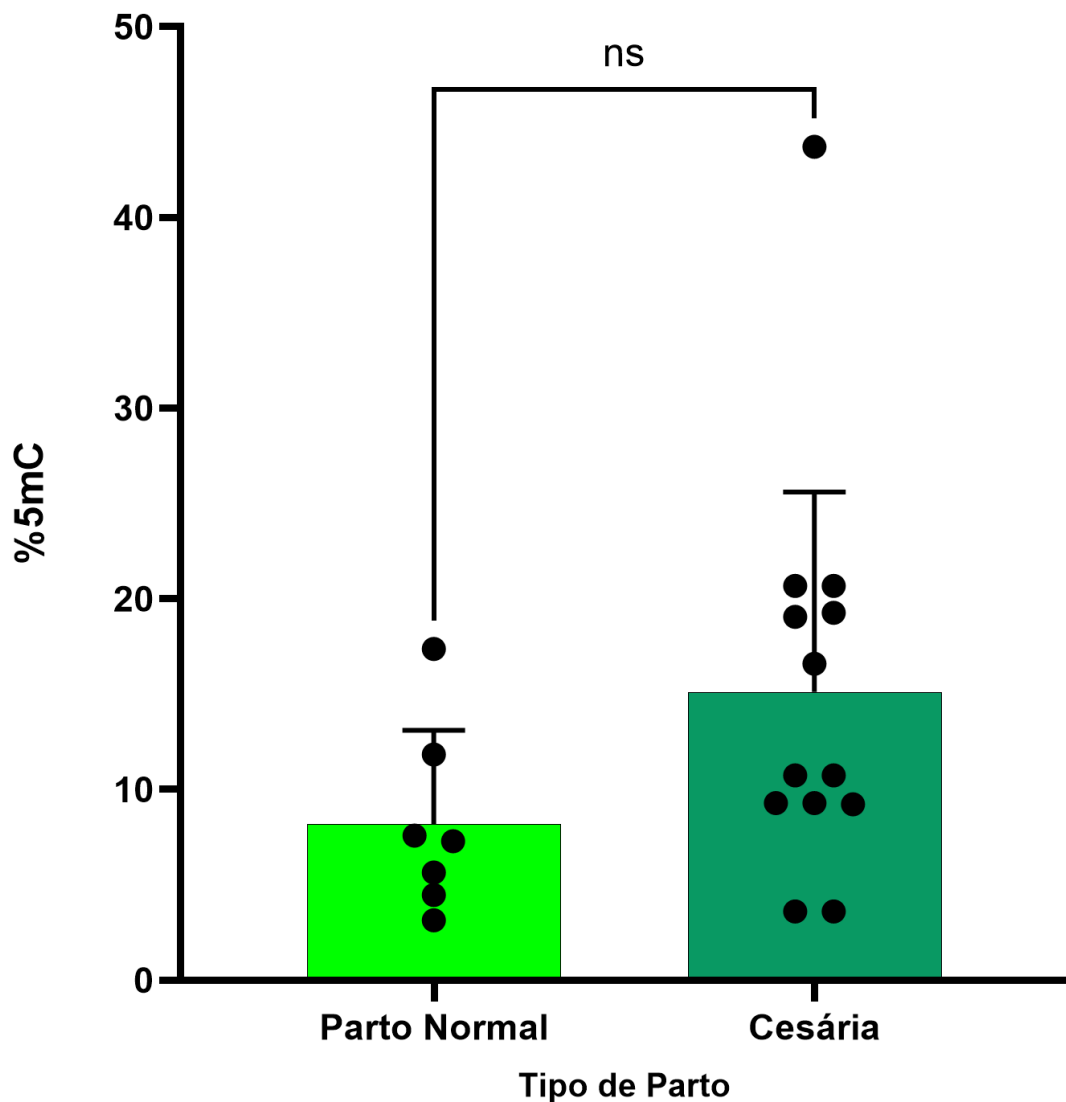
Resultado semelhante foi observado ao se analisar a raça/cor dos genitores em relação à metilação do DNA dos próprios genitores. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos raciais ( $H = 3,072$ ;  $p = 0,2240$ ), indicando que a metilação do OXTR nos genitores não variou de acordo com a raça/cor na amostra analisada (Figura 19).



**Figura 19 - Metilação do *OXTR* em genitores segundo raça/cor.** Gráfico de barras mostrando os níveis de metilação do DNA (%5mC) no sítio CpG -934 do gene *OXTR* em genitores, estratificados por raça/cor autodeclarada. As barras representam a medida de tendência central, com hastes indicando a dispersão dos dados. As diferenças entre os grupos foram avaliadas por teste de Kruskal–Wallis, não assumindo distribuição normal dos dados, considerando-se um nível de significância de 5% ( $p > 0,05$ ).  
**Fonte:** Elaborado pelo autor (2026).

#### 5.4.3 Variáveis gestacionais e perinatais

A relação entre o tipo de parto (parto normal ou cesariana) e os níveis de metilação do DNA no sítio CpG -934 do gene *OXTR* em crianças com TEA foi avaliada por meio do teste não paramétrico de Mann–Whitney. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p = 0,077$ ). As crianças nascidas por parto normal apresentaram mediana de metilação de 7,30% ( $n = 7$ ), enquanto aquelas nascidas por cesariana apresentaram mediana de metilação de 10,75% ( $n = 13$ ). A diferença absoluta entre as medianas foi de 3,45%, assim é possível observar uma tendência de maiores níveis de metilação em crianças nascidas por parto cesariana e maiores níveis de metilação (Figura 20).

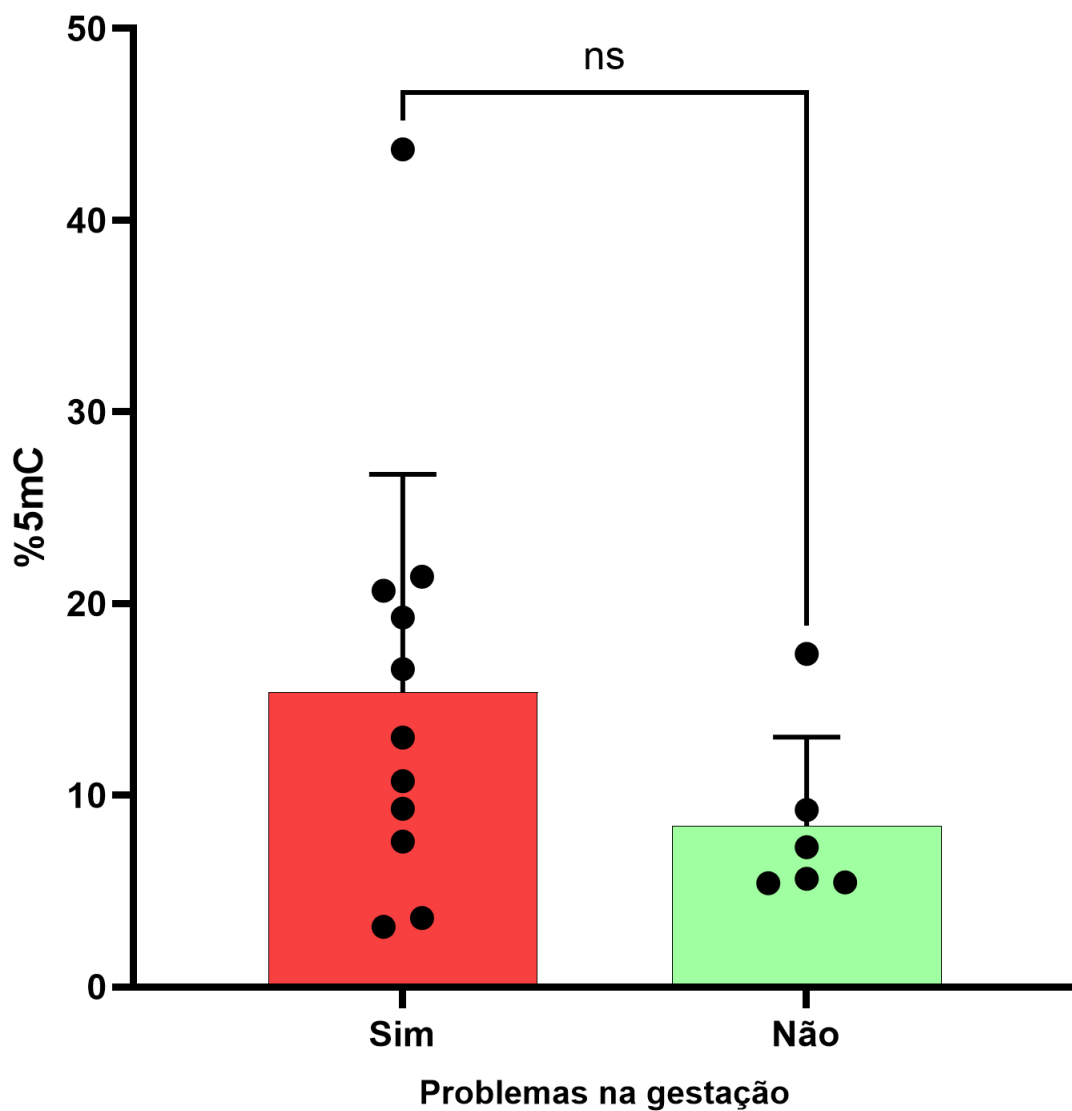


**Figura 20- Metilação do OXTR segundo o tipo de parto.** Gráfico de barras comparando os níveis de metilação do DNA no sítio CpG -934 do gene OXTR em crianças nascidas por parto normal e cesariana. As barras representam a mediana e as hastes a variabilidade dos dados. A comparação entre os grupos foi realizada pelo teste de Mann-Whitney, não sendo observada diferença estatisticamente significativa (ns). **Fonte:** Elaborado pelo autor (2026).

De forma exploratória, foi realizada uma análise de correlação de Spearman após codificação binária do tipo de parto (1= normal e 2 = cesária), a qual indicou uma correlação positiva moderada ( $r = 0,458$ ;  $p = 0,048$ ). No entanto, a análise de regressão linear correspondente não apresentou inclinação significativamente diferente de zero ( $p = 0,085$ ), e o intervalo de confiança do coeficiente angular incluiu valores nulos, indicando instabilidade da associação.

A associação entre a ocorrência de problemas gestacionais maternos e os níveis de metilação do DNA no sítio CpG -934 do gene OXTR nos filhos foi avaliada

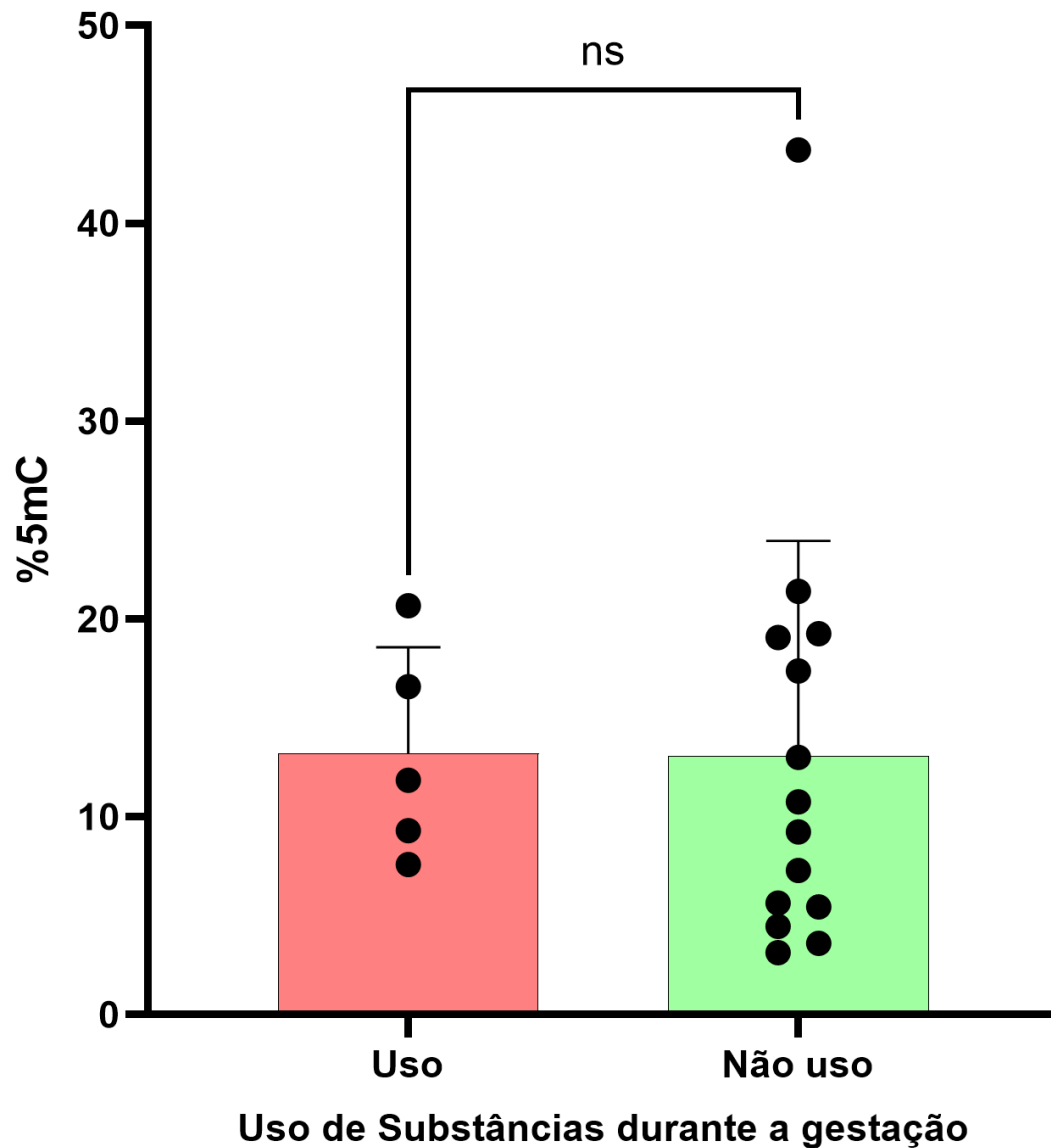
por meio do teste não paramétrico de Mann–Whitney. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos de mães que apresentaram problemas durante a gestação e aquelas sem intercorrências gestacionais ( $p = 0,149$ ). Os filhos de mães que relataram problemas gestacionais apresentaram mediana de metilação de 13,01% ( $n = 11$ ), enquanto os filhos de mães sem problemas gestacionais apresentaram mediana de 6,48% ( $n = 6$ ). Apesar da ausência de significância estatística, observou-se uma tendência a maiores níveis de metilação no grupo exposto a problemas gestacionais maternos, com diferença de medianas de  $-6,54\%$  (Figura 21)



**Figura 21 - Associação entre problemas gestacionais e metilação do OXTR no filho.** Gráfico de barras mostrando os níveis de metilação do DNA no sítio CpG -934 do gene OXTR em filhos de mães com e sem relato de problemas durante a gestação. As barras representam a mediana, com hastes indicando a dispersão dos dados. A análise foi conduzida utilizando o teste de Mann–Whitney, não

sendo observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (ns). **Fonte:** Elaborado pelo autor (2026).

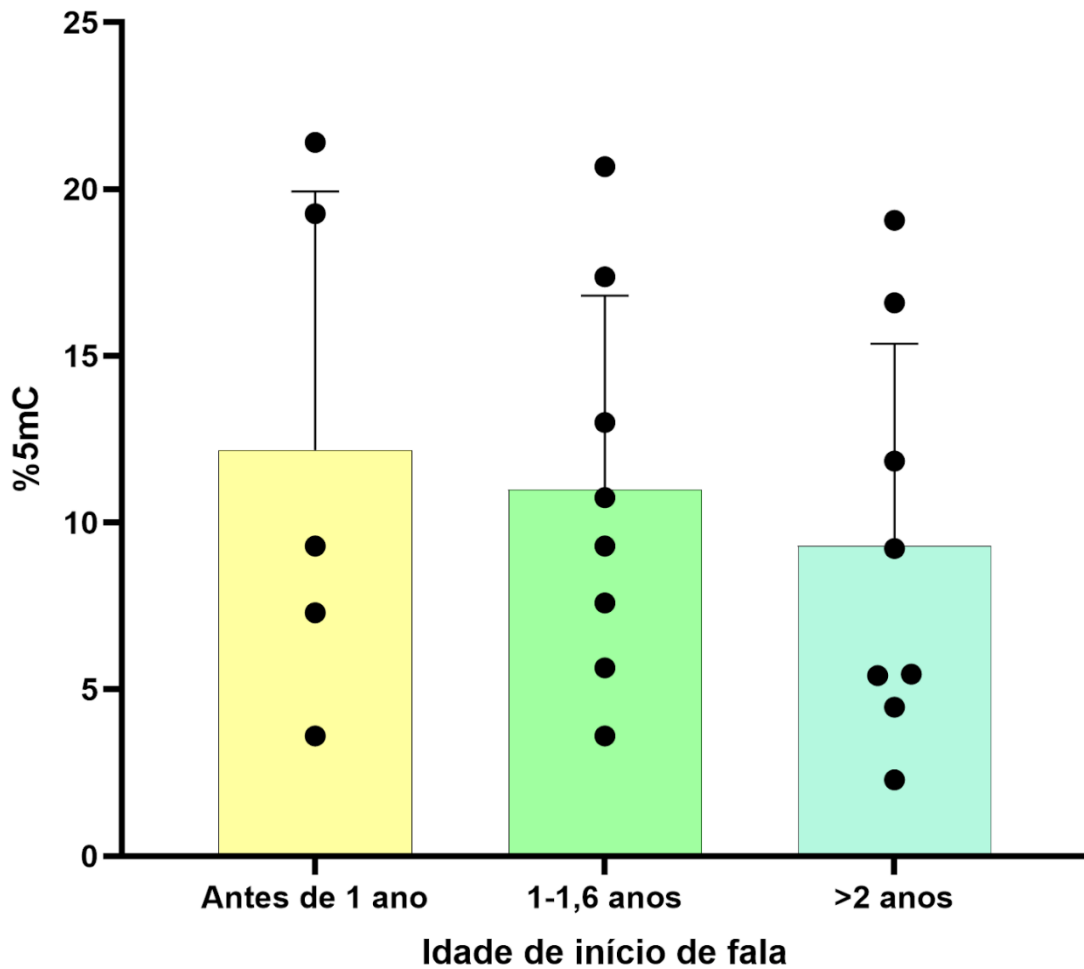
De forma semelhante, a associação entre o histórico materno de uso de substâncias durante a gestação e os níveis de metilação do DNA nessa região nos filhos foi avaliada por meio do teste não paramétrico de Mann–Whitney. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p = 0,559$ ). Os filhos de mães que relataram uso de substâncias durante a gestação apresentaram mediana de metilação de 11,85% ( $n = 5$ ), enquanto os filhos de mães sem histórico de uso apresentaram mediana de 9,99% ( $n = 14$ ). A diferença entre as medianas foi de -1,86%, indicando ausência de variação relevante nos níveis de metilação associada ao uso de substâncias na amostra analisada (Figura 22).



**Figura 22 - Associação entre uso de substâncias durante a gestação e metilação do OXTR no filho.** Gráfico de barras representando os níveis de metilação do DNA no sítio CpG -934 do gene *OXTR* em filhos de mães com e sem histórico de uso de substâncias durante a gestação. As barras indicam a mediana e as hastes a variabilidade dos dados. A comparação entre os grupos foi realizada pelo teste de Mann-Whitney, não sendo observada diferença estatisticamente significativa (ns). **Fonte:** Elaborado pelo autor (2026).

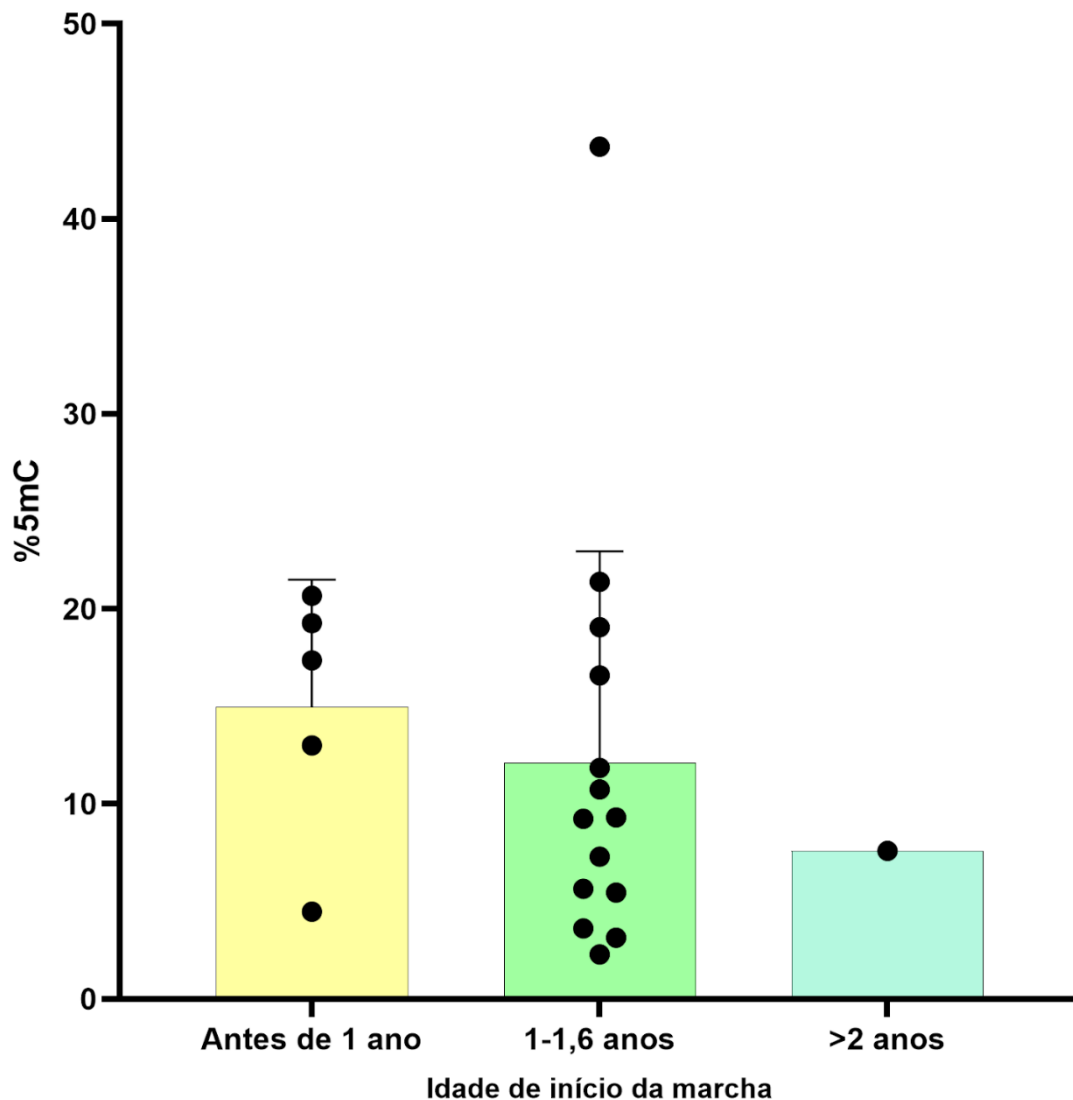
#### 5.4.4 Histórico clínico

As diferenças nos níveis de metilação do DNA no sítio CpG -934 do gene *OXTR* em relação à idade de início da fala dos portadores de TEA foram avaliadas por meio do teste de Kruskal-Wallis. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as medianas de metilação entre os grupos definidos pelas faixas etárias de aquisição da fala ( $H = 1,051$ ;  $p = 0,607$ ) (Figura 23).



**Figura 23 - Associação entre a idade de início da fala e os níveis de metilação do DNA no sítio CpG -934 do gene *OXTR* em crianças e adolescentes com TEA.** O gráfico apresenta a distribuição dos níveis de metilação (%5mC) de acordo com a idade de início da fala, categorizada em antes de 1 ano, entre 1 ano e 1 ano e 6 meses, e após os 2 anos. Cada ponto representa um indivíduo, enquanto as barras indicam a mediana e a dispersão dos dados. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as medianas dos grupos (teste de Kruskal–Wallis,  $p = 0,607$ ). **Fonte:** Elaborado pelo autor (2026).

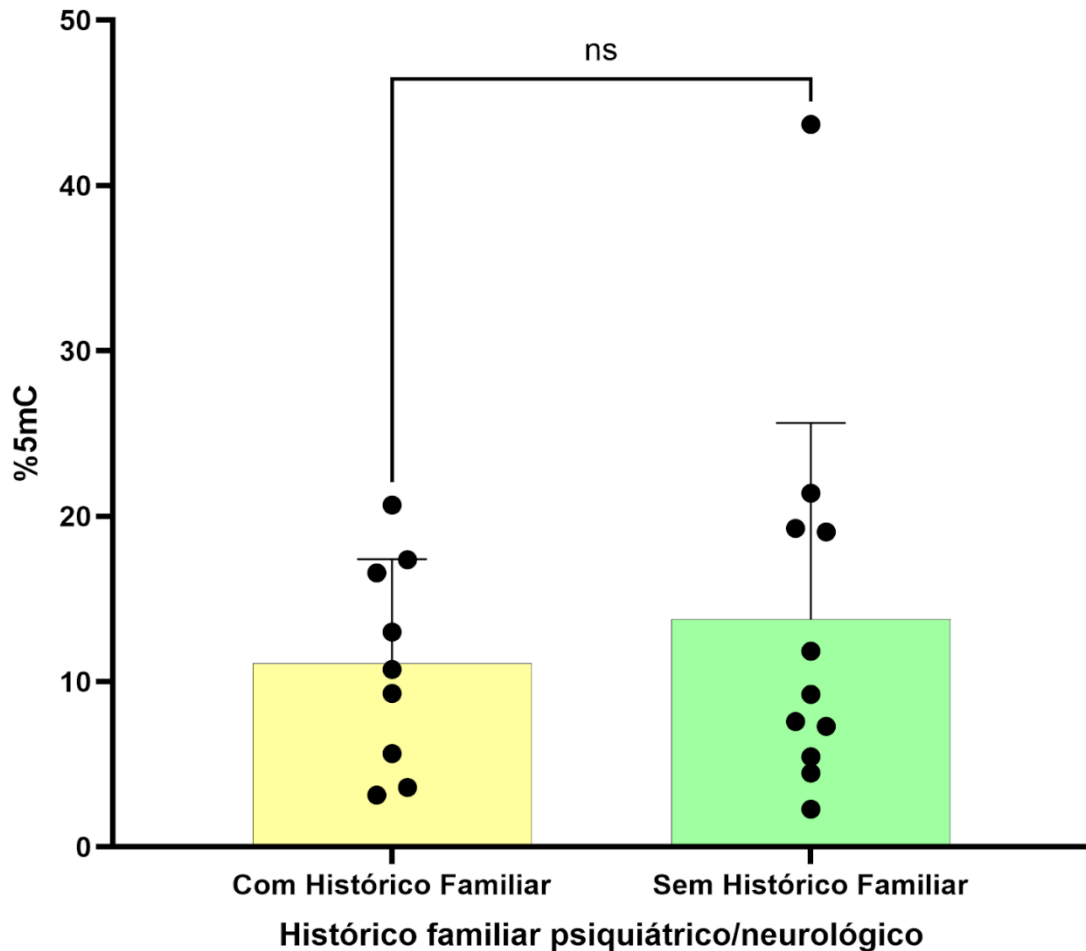
De forma semelhante, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as medianas de metilação entre os grupos definidos pelas faixas etárias de aquisição da marcha ( $H = 1,674$ ;  $p = 0,522$ ) (Figura 24), indicando que, na amostra estudada, o início da marcha e o início de fala não esteve associado aos níveis de metilação do *OXTR*.



**Figura 24 - Associação entre a idade de início da marcha e os níveis de metilação do DNA no sítio CpG -934 do gene *OXTR* em crianças e adolescentes com TEA.** O gráfico apresenta a distribuição dos níveis de metilação (%5mC) de acordo com a idade de início da marcha, categorizada em antes de 1 ano, entre 1 ano e 1 ano e 6 meses, e após os 2 anos. Cada ponto representa um indivíduo, enquanto as barras indicam a mediana e a dispersão dos dados. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as medianas dos grupos (teste de Kruskal–Wallis,  $p = 0,522$ ). **Fonte:** Elaborado pelo autor (2026).

A associação entre a presença de histórico familiar de acompanhamento psiquiátrico e/ou neurológico e os níveis de metilação do DNA no sítio CpG -934 do gene *OXTR* nos portadores de TEA foi avaliada por meio do teste de Mann–Whitney. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos com histórico familiar (mediana = 10,75;  $n = 9$ ) e sem histórico familiar (mediana = 9,23;  $n = 11$ ) ( $U = 47$ ;  $p = 0,8820$ ). A diferença entre as medianas foi de ~1,5%, indicando

ausência de variação relevante nos níveis de metilação associada ao uso de substâncias na amostra analisada (Figura 25).



**Figura 25 - Comparação dos níveis de metilação do DNA (%5mC) no sítio CpG -934 do gene OXTR em portadores de TEA com e sem histórico familiar psiquiátrico/neurológico.** Os dados estão apresentados como mediana e intervalo interquartil representados por barra, com os pontos individuais representando cada participante. A comparação entre os grupos foi realizada por meio do teste de Mann-Whitney, não sendo observadas diferenças estatisticamente significativas entre as medianas ( $p > 0,05$ ). **Fonte:** Elaborado pelo autor (2026).

## 6 DISCUSSÃO

Atualmente, biomarcadores cerebrais e epigenéticos vêm sendo propostos para lidar com a heterogeneidade do TEA, embora sua contribuição para classificação, especialmente em relação a comportamentos atípicos a estímulos sensoriais, ainda seja amplamente desconhecida (Cheong *et al.*, 2025). Assim, o OXTR é sustentado como candidato central para investigação no TEA porque o sistema ocitoninérgico está intimamente ligado à sociabilidade, ao processamento de

sinais sociais e à motivação social, enquanto o próprio TEA é marcado por prejuízos nesses domínios (Evenepoel *et al.*, 2023; Hopkins *et al.*, 2023; Israel *et al.*, 2009). Nesse contexto, a metilação de sítios CpG próximos à região promotora do *OXTR* é apresentada como variável na população, com associação a fenótipos comportamentais (Puglia *et al.*, 2015).

Assim sendo, o presente estudo investigou o padrão de metilação do DNA no sítio CpG -934 do gene do receptor de ocitocina (*OXTR*) em portadores de Transtorno do Espectro Autista (TEA) e seus respectivos genitores, em uma amostragem brasileira, explorando, ainda, sua associação com variáveis sociodemográficas, gestacionais, perinatais e clínicas. De modo geral, os resultados apontam para um perfil epigenético diferencial entre gerações, caracterizado por níveis consistentemente mais elevados de metilação nos portadores de TEA em comparação aos genitores, ao passo que algumas variáveis analisadas, embora indiquem tendências, não apresentaram associações estatisticamente significativas com esse marcador.

Um marco na área dos estudos envolvendo o gene *OXTR* e autismo por análise epigenética da região promotora, foi o trabalho de Gregory *et al.* (2009), que simultaneamente analisou uma região do terceiro íntron do gene, descrevendo hipermetilação em grupos independentes com autismo em comparação a controles, tanto em células mononucleares do sangue periférico quanto no córtex temporal (Gregory *et al.*, 2009).

Nesse estudo, a região MT2, localizada em uma ilha CpG sobreposta aos éxons 1, 2 e 3 foi previamente implicada em expressão tecido-específica do *OXTR*, conectando diretamente o desenho epigenético ao controle regulatório do gene (Gregory *et al.*, 2009; Maud *et al.*, 2018). A segunda ilha CpG é descrita como localizada no terceiro íntron, previamente definida como fragmento *EcoRI-KpnI* menos metilado em DNA miometrial do que em leucócitos periféricos, e essa ilha intrônica foi descrita como fortemente metilada em todos os membros de uma família analisada (Gregory *et al.*, 2009; Muzimoto *et al.*, 1997).

No entanto, na região que sobrepõe os éxons 1–3, vários CpGs diferiram em metilação, com destaque para posições -959, -934, -924, -901 e -860, e o irmão afetado do probando exibiu alta metilação especialmente em -934, -924 e -901. É

ênfatisado que os CpGs -934 e -924 mostraram os maiores aumentos de metilação entre irmão autista e pai não autista, sustentando a hipótese de que hipermetilação em resíduos críticos pode contribuir para o silenciamento gênico e susceptibilidade. Os achados da presente pesquisa foram consistentes com o estudo de Gregory *et al.* (2009) ao observar níveis de metilação significativamente mais elevados no sítio CpG -934 do *OXTR* nos portadores de TEA quando comparados aos seus respectivos genitores, especialmente quando analisados de forma pareada.

Como citado anteriormente, a metilação da região promotora do *OXTR* é variável na população. Em uma amostra de adultos saudáveis, a metilação do sítio CpG -934 foi avaliada como sítio funcional previamente demonstrado como impactante na expressão gênica, com variação de 33% a 72% e diferença por sexo, com mulheres apresentando níveis médios maiores que homens, enquanto idade não foi preditor significativo (Puglia *et al.*, 2015). De forma semelhante, o atual estudo não observou associação significativa entre a idade cronológica dos portadores com TEA e os níveis de metilação do CpG -934.

O estudo de Jack, Conelly e Morris, (2012) demonstrou que a associação entre a metilação do CpG -934 do *OXTR* e a ativação de regiões cerebrais envolvidas na percepção social, como a junção temporoparietal e o córtex cingulado anterior dorsal, foi modulada pela idade dos participantes, sendo mais evidente em indivíduos mais velhos. De forma complementar, Kumsta *et al.* (2013) observaram que a metilação do *OXTR* não se associou a traços de insensibilidade emocional em crianças mais jovens (3–8 anos), mas apresentou associação positiva com esses traços em crianças mais velhas (9–16 anos), indicando um efeito dependente da idade no relacionamento entre metilação do *OXTR* e fenótipos comportamentais.

No entanto, a identificação de associação significativa entre sexo e metilação observada nos portadores de TEA, com maiores níveis de metilação em indivíduos do sexo masculino, merece destaque, em contrapartida aos estudos de Puglia *et al.* (2015) e associado ao estudo de Gregory *et al.* (2009) em análises de PBMCs demonstrando maior nível de metilação nesse sítio CpG e menor expressão do receptor nos participantes do sexo masculino em autistas em relação ao controle. Da mesma forma, Andari e Rilling (2020) relataram aumento de metilação na região em autistas do sexo masculino comparados com neurotípicos. Estudos mais recentes

com amostras pareadas por sexo, como o de Wieting *et al.* (2023) não identificaram diferenças significativas na metilação do *OXTR* entre homens e mulheres, indicando que efeitos sexo-dependentes não são consistentes em todos os contextos experimentais.

De maneira geral, no presente estudo, tanto nos portadores de TEA quanto nos genitores a região analisada apresentou hipometilação e presença de ampla variabilidade individual. De forma semelhante, Yuksel *et al.* (2016), adotando abordagem correlata ao trabalho em questão, utilizando amostras de sangue exploraram blocos regulatórios do promotor agrupados como MT1–MT4, utilizando sítios HpaII sensíveis à metilação para inferir padrões em crianças com TEA e controles. Nesse desenho, foi descrita frequência de metilação menor em TEA em MT1 e MT3 em comparação aos não autistas, com diferenças estatisticamente significativas, enquanto MT2 e MT4 não diferiram entre os grupos, sendo encontrada uma hipometilação relativa, e MT4 foi descrito como altamente não metilado em ambos os grupos (Yuksel *et al.*, 2016). Já estudos como o de Gregory *et al.* (2009), Andari e Rilling (2020) e Kumsta *et al.* (2013), relataram em amostras de crianças e adultos com autismo aumento de metilação nessa região quando comparados com controle.

Nesse contexto, estudos apontam que tanto hipermetilação quanto hipometilação do *OXTR* já foram descritas em TEA, dependendo da idade da amostra, do tecido analisado e do conjunto de CpGs investigados (Yuksel *et al.*, 2016; Moerkerke *et al.*, 2021; Evenepoel *et al.*, 2023), o que não sugerem um padrão único ou uniforme, mas sim a ideia de que o CpG -934 se insere em um contexto regulatório complexo e modulável. A exemplo disso, mesmo entre irmãos, foram observadas, no estudo em questão, diferenças substanciais nos níveis de metilação, reforçando o caráter individualizado dessas marcas epigenéticas, como já discutido por Gregory *et al.* (2009) em análises familiares.

No campo específico da metilação do *OXTR* em TEA, há descrições de resultados divergentes, incluindo padrões de hipermetilação em adultos e achados de hipometilação em crianças, o que sugere dependência do estágio de desenvolvimento, do tecido analisado e dos sítios CpG investigados (Evenepoel *et al.*, 2023; Moerkerke *et al.*, 2021; Andari; Rilling *et al.*, 2020). Revisões descrevem que as

evidências ainda são escassas e heterogêneas, e também apontam limitações relacionadas a idades, classificações diagnósticas, tecidos, sítios CpG e técnicas analíticas (Moerkerke *et al.*, 2021).

Níveis mais elevados de metilação do *OXTR* foram associados a aumento de atividade da amígdala e de regiões envolvidas em percepção facial durante visualização de expressões negativas, além de atenuação da conectividade entre sistemas neurais de suporte à percepção social e níveis mais baixos de metilação foram propostos como indicativos de maior capacidade de utilização de ocitocina disponível por aumento de expressão do receptor, associando menor metilação a menor ativação amigdalar frente a estímulos de raiva e medo e a maior conectividade entre amígdala e ínsula esquerda (Puglia *et al.*, 2015).

É descrito que hipermetilação em regiões do *OXTR* foi associada a menor conectividade funcional entre áreas envolvidas em teoria da mente e que medidas de metilação se relacionaram a escalas quantitativas de responsividade social. (Andari *et al.*, 2020; Moerkerke *et al.*, 2021). Também é descrito que a hipermetilação do *OXTR* em tecidos periféricos pode associar-se à diminuição de expressão do gene no cérebro, reforçando a importância de integrar tecido, desenvolvimento e função (Andari; Rilling *et al.*, 2020).

Estudos mais recentes utilizando sequenciamento de leitura curta não identificaram diferenças significativas na metilação de CpGs do éxon 3 nem da região MT2 do *OXTR* entre adultos com autismo de alto funcionamento e controles pareados, incluindo CpGs frequentemente descritos na literatura como -934 e -924 (Wieting *et al.*, 2023). Outros trabalhos associaram a metilação do *OXTR* a endofenótipos neurais relacionados à cognição social, demonstrando correlação entre maior metilação no CpG -934 e maior ativação da junção temporoparietal e do córtex cingulado anterior dorsal durante tarefas de percepção social (Jack; Connelly; Morris, 2012).

A abordagem experimental baseada em digestão com enzimas sensíveis à metilação e PCR semiquantitativa foi usada para inferir maior metilação em tecido não expressivo em comparação a tecidos indutíveis com destaque de diferenças particularmente marcantes no fragmento MT2 (Kusui *et al.*, 2001). É descrito, ainda, que dentro da região do *OXTR* há um trecho rico em CpG de ~140 a +2300, e que a

porção +176 a +581 é menos metilada em tecidos que expressam *OXTR* do que em tecidos não expressivos, com efeitos de demetilação associados a aumento de mRNA em linha celular HepG2 (Kimura *et al.*, 2003). No recorte de tecido-especificidade, estudos destacaram que o estado de metilação dentro de ilhas CpG do *OXTR* varia entre tecidos como leucócitos periféricos, miométrio e fígado (Kusui *et al.*, 2001; Kimura *et al.*, 2003).

Intervenções farmacológicas também indicam que a metilação do *OXTR* pode ser dinâmica. Estudos com administração intranasal de oxitocina demonstraram redução significativa da metilação do CpG -924, sem efeitos consistentes em CpGs adjacentes como -934 e -914, sugerindo respostas sítio-específicas à modulação ocitoninérgica (Moerkerke *et al.*, 2024). Evidências adicionais indicam que alterações epigenéticas do *OXTR* podem estar associadas a condições como ansiedade social, depressão, transtorno obsessivo-compulsivo e esquizofrenia, reforçando o papel do *OXTR* como gene de vulnerabilidade neuropsiquiátrica (Wei *et al.*, 2023; Towers *et al.*, 2018; Kumsta *et al.*, 2013; Park *et al.*, 2019).

Esses achados, ao enfatizar regiões diferentes e padrões distintos, reforçam a ideia de que a direção do efeito pode depender fortemente do recorte do sítio/região analisada e do contexto amostral (Yuksel *et al.*, 2016; Moerkerke *et al.*, 2021; Evenepoel *et al.*, 2023). De modo coerente com essa leitura, uma revisão descreveu que, entre os poucos estudos comparando diretamente TEA e controles, resultados parecem contraditórios no agregado, mas parte da inconsistência se reduz quando se observa que diferentes trabalhos investigaram tecidos e regiões CpG distintas, com possível efeito do desenvolvimento (Moerkerke *et al.*, 2021).

As análises envolvendo variáveis gestacionais e perinatais não evidenciaram associações estatisticamente significativas com os níveis de metilação do CpG -934. Ainda assim, foram observadas tendências, incluindo maiores medianas de metilação em crianças nascidas por cesariana ou expostas a intercorrências gestacionais, bem como uma correlação positiva moderada entre os níveis de metilação e o tipo de parto. Ademais, o presente estudo identificou uma correlação positiva fraca, embora não estatisticamente significativa, entre os níveis de metilação dos genitores e de seus respectivos filhos. Embora não haja na literatura relatos entre essas associações, a relação entre metilação do *OXTR* e desfechos do desenvolvimento aparece em

contextos perinatais específicos, como prematuridade, em que metilação maior no promotor de *OXTR* em membranas fetais foi descrita em partos pré-termo em comparação ao termo, independentemente do trabalho de parto, e foi descrito aumento de *OXTR* em forma modificada e aumento de marcação peptídica, sugerindo complexidade entre metilação, mRNA e proteína. (Behnia *et al.*, 2015).

Além disso, a relação entre estresse gestacional e metilação do *OXTR* foi explorada em diferentes estudos com resultados divergentes. Rijlaarsdam *et al.* (2018) investigaram múltiplas dimensões do estresse materno pré-natal, incluindo psicopatologia materna, comportamentos de risco e uso de substâncias, e não encontraram associação significativa entre estresse pré-natal e metilação do *OXTR* no sangue do cordão umbilical, contrariando hipótese de que a metilação do *OXTR* mediaría a relação entre estresse gestacional e traços autistas na criança. Em contraste, Stocorro *et al.* (2023), com base no arcabouço teórico das Origens Desenvolvimentais da Saúde e da Doença (DOHaD), relataram que fatores ambientais pré-natais, como estresse psicossocial materno, tabagismo e exposição a poluentes e metais, estiveram associados a alterações na metilação do DNA placentário, incluindo hipometilação do *OXTR* na placenta, na mucosa oral materna e em recém-nascidos.

Esses autores destacam que a relação entre metilação e expressão nem sempre é direta, e que o estudo avaliou apenas uma região do promotor, levantando a possibilidade de que outras regiões tenham associação mais direta com expressão e níveis proteicos (Behnia *et al.*, 2015). Além disso, as marcas epigenéticas podem ser parcialmente reprogramadas durante o desenvolvimento e moduladas por exposições ambientais e contextuais pós-natais (Towers *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2021).

Algumas mães relataram no estudo em questão níveis glicêmicos elevados ao longo da gestação, nesse sentido já foi descrito que hiperglicemia pode suprimir atividade do promotor do *OXTR* em uma faixa de -1100 a -900, e que essa supressão envolve alterações epigenéticas mediadas por estresse oxidativo, com implicações herdáveis e impacto comportamental na prole. A deficiência pré-natal de *OXTR* potencializa déficits sociais associados ao diabetes materno, sustentando a conclusão de que supressão de *OXTR* induzida por diabetes materno contribui para déficits sociais na prole (Liu *et al.*, 2021).

Além disso, no presente estudo, não foram observadas associações entre os níveis de metilação do CpG -934 e os marcos do desenvolvimento motor e de linguagem, nem com os escores da escala CARS. Vale ressaltar que até o momento, nenhuma relação entre essas variáveis foi relatada na literatura. Ademais, a homogeneidade dos escores de CARS limita a capacidade de detectar associações estatísticas.

Uma outra camada de regulação epigenética nesse gene também é descrita na literatura, no âmbito da regulação intrônica. O terceiro íntron do *OXTR* é destacado como região extensa, com mais de 10 kb entre regiões codificadoras, e com evidências de metilação diferencial e interação com proteínas nucleares supressoras (Muzimoto *et al.*, 1997; Kimura *et al.*, 2003).

É descrito que a supressão gênica pode ser tão importante quanto a ativação por fatores de transcrição na regulação do *OXTR*, e o íntron 3 foi proposto como envolvido nessa regulação por mediar interação de proteínas supressoras associadas a metilação (Muzimoto *et al.*, 1997). No estudo do íntron 3, a metilação diferencial foi localizada em sítios HpaII/MspI no fragmento KpnI-EcoRI (1,5 kb), com hipometilação no miométrio e perfil mais hipermetilado em leucócitos periféricos, que não expressam o gene (Muzimoto *et al.*, 1997). Essa linha é complementada por discussões que apontam a importância do íntron 3 para regulação transcricional, inclusive por evidências de padrões diferenciais de metilação e ligação a proteínas nucleares na região (Kimura *et al.*, 2003).

Por fim, a relevância de mecanismos epigenéticos se fortalece ao considerar que a metilação do DNA no *OXTR* é variável na população, pode reduzir transcrição e aparece associada tanto a condições psiquiátricas quanto a fenótipos sociais e neurais de processamento socioemocional (Kumsta *et al.*, 2013; Towers *et al.*, 2018; Pierzynowska *et al.*, 2023). Ao mesmo tempo, a literatura descreve que a direção e a localização dessas alterações variam com idade, tecido e região do gene, incluindo regiões promotoras críticas como MT2 e CpGs específicos como -934, assim como elementos supressores intrônicos no íntron 3 (Gregory *et al.*, 2009; Kusui *et al.*, 2001; Muzimoto *et al.*, 1997; Kimura *et al.*, 2003; Yuksel *et al.*, 2016; Moerkerke *et al.*, 2021; Moerkerke *et al.*, 2024).

## 7 CONCLUSÃO

O presente estudo investigou o padrão de metilação do DNA na região regulatória -934 do gene do receptor de ocitocina (*OXTR*) em crianças e adolescentes com Transtorno do Espectro Autista (TEA) e em seus respectivos genitores, explorando sua associação com variáveis sociodemográficas, gestacionais, perinatais e clínicas.

Os resultados demonstraram que os portadores de TEA apresentaram níveis de metilação significativamente mais elevados nessa região quando comparados aos seus genitores, especialmente nas análises pareadas, indicando uma diferença epigenética consistente entre gerações. A ausência de correlação significativa entre os níveis de metilação de genitores e filhos sugere que a metilação da região -934 do *OXTR* não segue um padrão de herança epigenética direta, reforçando a hipótese de que fatores ambientais e contextuais atuantes em períodos críticos do desenvolvimento possam exercer papel relevante na modulação epigenética desse gene.

Adicionalmente, observou-se que a idade dos genitores apresentou tendência à redução dos níveis de metilação, enquanto a idade materna durante a gestação esteve associada a menores níveis de metilação nos filhos, indicando possível influência do contexto gestacional na programação epigenética do *OXTR*. Diferenças significativas entre os sexos foram identificadas, com maiores níveis de metilação observados em indivíduos do sexo masculino, achado que dialoga com a maior prevalência do TEA nesse grupo e com a sensibilidade do sistema oxitocinérgico a influências hormonais e ambientais.

Embora variáveis gestacionais, perinatais e clínicas, como tipo de parto, intercorrências gestacionais, uso de substâncias, marcos do desenvolvimento e histórico familiar psiquiátrico, não tenham apresentado associações estatisticamente significativas com os níveis de metilação, tendências observadas reforçam a relevância biológica dessas exposições e indicam a necessidade de investigações futuras com maior poder estatístico.

A homogeneidade dos escores da escala CARS limitou a identificação de associações entre a gravidade do fenótipo comportamental e os níveis de metilação

do *OXTR*, sugerindo que, nesta amostra, a escala apresentou sensibilidade reduzida para discriminar gradientes clínicos associados a variações epigenéticas.

Do ponto de vista científico, os resultados deste estudo reforçam a relevância da região em estudo como um elemento epigeneticamente sensível no contexto do TEA . A utilização de um desenho pareado genitor-filho contribui para a compreensão da correspondência intergeracional dos padrões de metilação, ampliando a discussão sobre mecanismos de programação precoce do neurodesenvolvimento. Esses achados acrescentam evidências à literatura ao integrar aspectos genéticos, epigenéticos e contextuais, especialmente em uma população brasileira ainda pouco representada em estudos epigenéticos. Do ponto de vista clínico, embora os resultados não permitam aplicação diagnóstica imediata, eles sustentam o potencial da metilação do DNA como biomarcador complementar para compreensão da heterogeneidade fenotípica do espectro autista e para futuras estratégias de estratificação de risco.

Apesar da relevância dos achados apresentados, algumas limitações metodológicas devem ser consideradas na interpretação dos resultados. O delineamento transversal do estudo não permite estabelecer relações causais entre os padrões de metilação do gene *OXTR* e o TEA, restringindo as inferências a associações observadas no momento da coleta. Além disso, o tamanho amostral relativamente reduzido pode limitar o poder estatístico das análises e a generalização dos resultados para outras populações. Ademais, informações clínicas e ambientais autorrelatadas estão sujeitas a vieses de memória ou subnotificação, devendo ser interpretadas com cautela.

Estudos futuros priorizando amostras maiores e mais diversas, possibilita análises estratificadas por sexo, idade e perfis clínicos, bem como maior poder estatístico para a detecção de associações. Delineamentos longitudinais poderão esclarecer a estabilidade dos padrões de metilação do gene *OXTR* ao longo do desenvolvimento e sua relação com trajetórias clínicas e comportamentais.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEDINI, Seyedeh Sedigheh *et al.* A critical review of the impact of candidate copy number variants on autism spectrum disorder. **Mutation Research. Reviews in Mutation Research**, v. 794, n. 108509, p. 108509, 2024.

ALSHAYA, Dalal S. Genetic and epigenetic factors associated with depression: An updated overview. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 29, n. 8, p. 103311, 2022.

American Psychiatric Association. **Manual Diagnóstico dos Transtornos Mentais - 5ª Edição**. Tradução: Nascimento *et al.* Porto Alegre: Artmed, 2014.

ANDARI, Elissar *et al.* Epigenetic modification of the oxytocin receptor gene: implications for autism symptom severity and brain functional connectivity. **Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 45, n. 7, p. 1150–1158, 2020.

ANDARI, Elissar; RILLING, James K. Genetic and epigenetic modulation of the oxytocin receptor and implications for autism. **Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 46, n. 1, p. 241–242, 2021.

ANDERSON, Cindy M. *et al.* Efeitos da suplementação materna de vitamina D no epigenoma materno e infantil. **Breastfeeding medicine: the official journal of the Academy of Breastfeeding Medicine**, v. 13, n. 5, p. 371–380, 2018

ANDREWS, Simon *et al.* Mechanisms and function of de novo DNA methylation in placental development reveals an essential role for DNMT3B. **Nature Communications**, v. 14, n. 1, p. 371, 2023.

AZOULAY, Léa; BOUVATTIER, Claire; CHRISTIN-MAITRE, Sophie. Impact of intra-uterine life on future health. **Annales d'endocrinologie**, v. 83, n. 1, p. 54–58, 2022.

BARKER, D. J. P. The origins of the developmental origins theory. **Journal of Internal Medicine**, v. 261, n. 5, p. 412–417, 2007.

BARKER, V. *et al.* Methylation of glucocorticoid receptor (NR3C1), BDNF and oxytocin receptor genes in association with childhood maltreatment in schizophrenia and schizoaffective disorder. **Schizophrenia Research**, v. 216, p. 529–531, 2020.

BEHNIA, Fara *et al.* Fetal DNA methylation of autism spectrum disorders candidate genes: association with spontaneous preterm birth. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 212, n. 4, p. 533.e1–9, 2015.

BIANCO-MIOTTO, T. *et al.* Epigenetics and DOHaD: from basics to birth and beyond. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, v. 8, n. 5, p. 513–519, 2017.

BLEKER, Laura S. *et al.* Exploring the effect of antenatal depression treatment on children's epigenetic profiles: findings from a pilot randomized controlled trial. **Clinical Epigenetics**, v. 11, n. 1, p. 18, 2019.

BLEKER, Laura S. *et al.* Cognitive behavioral therapy for antenatal depression in a pilot randomized controlled trial and effects on neurobiological, behavioral and cognitive outcomes in offspring 3-7 years postpartum: A perspective article on study findings, limitations and future aims. **Frontiers in Psychiatry**, v. 11, p. 34, 2020.

BOTELHO, Rayane M.; SILVA, Ana Lúcia M.; BORBELY, Alexandre U. The autism Spectrum Disorder and its possible origins in pregnancy. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 21, n. 3, p. 244, 2024.

ÇALIŞKAN, Elif; ŞAHİN, Munise Nur; GÜLDAĞ, Mahmut Alper. Oxytocin and oxytocin receptor gene regulation in Williams Syndrome: A systematic review. **The Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 94, n. 4, p. 623–635, 2021.

CHEN, Frances S. *et al.* Oxytocin receptor (OXTR) polymorphisms and attachment in human infants. **Frontiers in Psychology**, v. 2, p. 200, 2011.

CHEONG, Yongjeon *et al.* Dissecting the heterogeneity of autism spectrum disorder with sensory behavior, brain, and epigenetic factors. **Translational Psychiatry**, v. 15, n. 1, p. 337, 2025.

CHMIELEWSKA, Natalia *et al.* Epigenetic mechanisms of stress and depression. **Psychiatria polska**, v. 53, n. 6, p. 1413–1428, 2019.

CHRISTENSEN, M. K. *et al.* The cost of mental disorders: a systematic review. **Epidemiology and Psychiatric Sciences**, v. 29, n. e161, 2020.

BRASIL. **NOTA TÉCNICA No 91/2024-CGIAE/DAENT/SVSA/MS**. p. 6. 2024. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/notas-tecnicas/2024/nota-tecnica-no-91-2024-cgiae-daent-svsa-ms.pdf/view>>. Acesso em: 15/12/2025.

DAWOOD, M. Y.; LAU, M.; KHAN-DAWOOD, F. S. Localization and expression of oxytocin receptor and its messenger ribonucleic acid in peri-implantation phase human endometrium during control and clomiphene-treated cycles. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 181, n. 1, p. 50–56, 1999.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Censo Demográfico 2022**. Disponível em: <<https://biblioteca.ibge.gov.br/index.php/biblioteca-catalogo?view=detalhes&id=2102011>>. Acesso em: 15/12/2025.

DEE, Garrett; REBECCA; DEE, Colton. Epigenetic changes associated with different types of stressors and suicide. **Cells**. Cells, 2023.

DEVOST, Dominic; WRZAL, Paulina; ZINGG, Hans H. Oxytocin receptor signalling. **Progress in Brain Research**, v. 170, p. 167–176, 2008.

DI GESÙ, Claudia M.; BUFFINGTON, Shelly A. The early life exposome and autism risk: a role for the maternal microbiome?. **Gut Microbes**, v. 16, n. 1, p. 2385117, 2024.

DOI, Miyuki; USUI, Noriyoshi; SHIMADA, Shoichi. Prenatal environment and neurodevelopmental disorders. **Frontiers in Endocrinology**, v. 13, p. 860110, 2022.

DOUGHERTY, Joseph D. *et al.* Can the “female protective effect” liability threshold model explain sex differences in autism spectrum disorder? **Neuron**, v. 110, n. 20, p. 3243–3262, 2022.

EBNER, Natalie C. *et al.* Associations between oxytocin receptor gene (OXTR) methylation, plasma oxytocin, and attachment across adulthood. **International Journal of Psychophysiology: Official Journal of the International Organization of Psychophysiology**, v. 136, p. 22–32, 2019.

ELAGOZ YUKSEL, Mine *et al.* The altered promoter methylation of oxytocin receptor gene in autism. **Journal of Neurogenetics**, v. 30, n. 3–4, p. 280–284, 2016.

EVENEPOEL, Margaux *et al.* Endogenous oxytocin levels in children with autism: Associations with cortisol levels and oxytocin receptor gene methylation. **Translational Psychiatry**, v. 13, n. 1, p. 235, 2023.

FEINBERG, Andrew P. Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease. **Nature**, v. 447, n. 7143, p. 433–440, 2007.

FELDMAN, Ruth *et al.* Sensitive parenting is associated with plasma oxytocin and polymorphisms in the OXTR and CD38 genes. **Biological Psychiatry**, v. 72, n. 3, p. 175–181, 2012.

FILIPPI, S. *et al.* Identification, localization and functional activity of oxytocin receptors in epididymis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 193, n. 1–2, p. 89–100, 2002.

FRIEBE-HOFFMANN, U. *et al.* The influence of interleukin-1beta on oxytocin signalling in primary cells of human decidua. **Regulatory Peptides**, v. 142, n. 3, p. 78–85, 2007a.

FRIEBE-HOFFMANN, Ulrike *et al.* The effect of relaxin on the oxytocin receptor in human uterine smooth muscle cells. **Regulatory Peptides**, v. 138, n. 2–3, p. 74–81, 2007b.

GAEBEL, Wolfgang; KERST, Ariane; STRICKER, Johannes. Classification and diagnosis of schizophrenia or other primary psychotic disorders: Changes from ICD-10 to ICD-11 and implementation in clinical practice. **Psychiatria Danubina**, v. 32, n. 3–4, p. 320–324, 2020.

GHAMARI, Rana *et al.* Association of verbal and non-verbal theory of mind abilities with non-coding variants of OXTR in youth with autism spectrum disorder and typically developing individuals: a case-control study. **BMC Psychiatry**, v. 24, n. 1, p. 30, 2024.

INSTITUTE FOR HEALTH METRICS AND EVALUATION. **Global burden of disease (GBD)**. Disponível em: <<https://www.healthdata.org/research-analysis/gbd>>. Acesso em: 28 jan. 2026.

GOMES, M. V. *et al.* Abnormal methylation at the KvDMR1 imprinting control region in clinically normal children conceived by assisted reproductive technologies. **Molecular Human Reproduction**, v. 15, n. 8, p. 471–477, 2009.

GREGORY, Simon G. *et al.* Genomic and epigenetic evidence for oxytocin receptor deficiency in autism. **BMC Medicine**, v. 7, n. 1, p. 62, 2009.

HARONY-NICOLAS, Hala *et al.* Brain region-specific methylation in the promoter of the murine oxytocin receptor gene is involved in its expression regulation. **Psychoneuroendocrinology**, v. 39, p. 121–131, 2014.

HASAN, Rakibul. The multifaceted role of oxytocinergic system and OXTR gene. **Global Medical Genetics**, v. 11, n. 1, p. 29–33, 2024.

HEIJMANS, Bastiaan T. *et al.* Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 44, p. 17046–17049, 2008.

HILL, Rachel A. *et al.* Maternal SARS-CoV-2 exposure alters infant DNA methylation. **Brain, Behavior, & Immunity - Health**, v. 27, n. 100572, p. 100572, 2023.

HO, Shuk-Mei *et al.* Environmental factors, epigenetics, and developmental origin of reproductive disorders. **Reproductive Toxicology (Elmsford, N.Y.)**, v. 68, p. 85–104, 2017.

HOPKINS, William D. *et al.* Vasopressin, and not oxytocin, receptor gene methylation is associated with individual differences in receptive joint attention in chimpanzees (*Pan troglodytes*). **Autism Research: Official Journal of the International Society for Autism Research**, v. 16, n. 4, p. 713–722, 2023.

ISRAEL, Salomon *et al.* The oxytocin receptor (OXTR) contributes to prosocial fund allocations in the dictator game and the social value orientations task. **PloS One**, v. 4, n. 5, p. e5535, 2009.

JACK, Allison; CONNELLY, Jessica J.; MORRIS, James P. DNA methylation of the oxytocin receptor gene predicts neural response to ambiguous social stimuli. **Frontiers in Human Neuroscience**, v. 6, p. 280, 2012.

JACQUEMONT, Sébastien *et al.* A higher mutational burden in females supports a “female protective model” in neurodevelopmental disorders. **American Journal of Human Genetics**, v. 94, n. 3, p. 415–425, 2014.

JENG, Y. J. *et al.* Molecular cloning and functional characterization of the oxytocin receptor from a rat pancreatic cell line (RINm5F). **Neuropeptides**, v. 30, n. 6, p. 557–565, 1996.

JIANG, Chen-Chen *et al.* Signalling pathways in autism spectrum disorder: mechanisms and therapeutic implications. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 7, n. 1, p. 229, 2022.

JOVČEVSKA, Ivana; VIDETIČ PASKA, Alja. Neuroepigenetics of psychiatric disorders: Focus on lncRNA. **Neurochemistry International**, v. 149, n. 105140, p. 105140, 2021.

KANHERKAR, Riya R.; BHATIA-DEY, Naina; CSOKA, Antonei B. Epigenetics across the human lifespan. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 2, p. 49, 2014.

KIM, Yoo Sung; CHOI, Juwon; YOON, Bo-Eun. Neuron-Glia interactions in neurodevelopmental disorders. **Cells (Basel, Switzerland)**, v. 9, n. 10, p. 2176, 2020.

KIMURA, Ryo *et al.* Dysregulation of the oxytocin receptor gene in Williams syndrome. **Psychoneuroendocrinology**, v. 115, n. 104631, p. 104631, 2020.

KUMSTA, Robert *et al.* Epigenetic regulation of the oxytocin receptor gene: implications for behavioral neuroscience. **Frontiers in Neuroscience**, v. 7, p. 83, 2013.

KUODZA, George E.; KAWAI, Ray; LASALLE, Janine M. Intercontinental insights into autism spectrum disorder: a synthesis of environmental influences and DNA methylation. **Environmental Epigenetics**, v. 10, n. 1, p. dvae023, 2024.

KUSUI, C. *et al.* DNA methylation of the human oxytocin receptor gene promoter regulates tissue-specific gene suppression. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 289, n. 3, p. 681–686, 2001.

KUTEYKIN-TEPLYAKOV, Konstantin; MALDONADO, Rafael. Looking for prosocial genes: ITRAQ analysis of proteins involved in MDMA-induced sociability in mice. *European Neuropsychopharmacology: The Journal of the European College of Neuropsychopharmacology*, v. 24, n. 11, p. 1773–1783, 2014.

LAL, Nand *et al.* An overview of oxytocin integrative mechanisms in autism spectrum disorder. **Discover Mental Health**, v. 5, n. 1, p. 185, 2025.

LEE, K. H.; KHAN-DAWOOD, F. S.; DAWOOD, M. Y. Oxytocin receptor and its messenger ribonucleic acid in human leiomyoma and myometrium. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 179, n. 3 Pt 1, p. 620–627, 1998.

LÓPEZ-JIMÉNEZ, Elena; ANDRÉS-LEÓN, Eduardo. The implications of ncRNAs in the development of human diseases. **Non-Coding RNA**, v. 7, n. 1, p. 17, 2021.

LOVE, Chloe *et al.* Prenatal environmental risk factors for autism spectrum disorder and their potential mechanisms. **BMC Medicine**, v. 22, n. 1, p. 393, 2024.

LUKENS, John R.; EYO, Ukpong B. Microglia and neurodevelopmental disorders. **Annual Review of Neuroscience**, v. 45, n. 1, p. 425–445, 2022.

MAENNER, Matthew J. *et al.* Prevalence and characteristics of Autism spectrum disorder among children aged 8 years - Autism and Developmental Disabilities Monitoring network, 11 sites, United States, 2020. *Morbidity and Mortality Weekly Report. Surveillance Summaries* (Washington, D.C.: 2002), v. 72, n. 2, p. 1–14, 2023.

MARTINEZ, Maria Elena *et al.* Thyroid hormone elicits intergenerational epigenetic effects on adult social behavior and fetal brain expression of autism susceptibility genes. **Frontiers in Neuroscience**, v. 16, p. 1055116, 2022.

MAUD, Catherine *et al.* The role of oxytocin receptor gene (OXTR) DNA methylation (DNAm) in human social and emotional functioning: a systematic narrative review. **BMC Psychiatry**, v. 18, n. 1, p. 154, 2018.

MCGOWAN, Patrick O. *et al.* Epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor in human brain associates with childhood abuse. **Nature Neuroscience**, v. 12, n. 3, p. 342–348, 2009.

MENDONÇA, M. S. *et al.* Epigenetic variation at the SLC6A4 gene promoter in mother-child pairs with major depressive disorder. **Journal of Affective Disorders**, v. 245, p. 716–723, 2019.

MENDONÇA, Mariana S. *et al.* DNA methylation in regulatory elements of the FKBP5 and NR3C1 gene in mother-child binomials with depression. **Journal of Affective Disorders**, v. 331, p. 287–299, 2023.

MILES, J. H. *et al.* Essential versus complex autism: definition of fundamental prognostic subtypes. **American Journal of Medical Genetics**. Part A, v. 135, n. 2, p. 171–180, 2005.

MILLER, S. A.; DYKES, D. D.; POLESKY, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Research**, v. 16, n. 3, p. 1215, 1988.

MIZUMOTO, Y.; KIMURA, T.; IVELL, R. A genomic element within the third intron of the human oxytocin receptor gene may be involved in transcriptional suppression. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 135, n. 2, p. 129–138, 1997.

MOERKERKE, Matthijs *et al.* Endogenous oxytocin levels in autism-A meta-analysis. **Brain Sciences**, v. 11, n. 11, p. 1545, 2021.

MOHR, E.; MEYERHOF, W.; RICHTER, D. Vasopressin and oxytocin: molecular biology and evolution of the peptide hormones and their receptors. **Vitamins and Hormones**, v. 51, p. 235–266, 1995.

MOLNAR-SZAKACS, Istvan; KUPIS, Lauren; UDDIN, Lucina Q. Neuroimaging markers of risk and pathways to resilience in autism spectrum disorder. **Biological Psychiatry: Cognitive Neuroscience and Neuroimaging**, v. 6, n. 2, p. 200–210, 2021.

MONSTEIN, Hans-Jürg *et al.* Oxytocin and oxytocin-receptor mRNA expression in the human gastrointestinal tract: a polymerase chain reaction study. **Regulatory Peptides**, v. 119, n. 1–2, p. 39–44, 2004.

MONTIROSSO, Rosario *et al.* Serotonin transporter gene (SLC6A4) methylation associates with Neonatal Intensive Care Unit stay and 3-month-old temperament in preterm infants. **Child Development**, v. 87, n. 1, p. 38–48, 2016.

MOON, Sun Jae *et al.* Accuracy of the Childhood Autism Rating Scale: a systematic review and meta-analysis. **Developmental Medicine and Child Neurology**, v. 61, n. 9, p. 1030–1038, 2019.

MOORE, Sarah R. *et al.* Epigenetic correlates of neonatal contact in humans. **Development and Psychopathology**, v. 29, n. 5, p. 1517–1538, 2017.

MOR, Michal *et al.* Hypomethylation of miR-142 promoter and upregulation of microRNAs that target the oxytocin receptor gene in the autism prefrontal cortex. **Molecular Autism**, v. 6, n. 1, p. 46, 2015.

MORRIS-ROSENDAHL, Deborah J.; CROCQ, Marc-Antoine. Neurodevelopmental disorders-the history and future of a diagnostic concept. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 22, n. 1, p. 65–72, 2020.

MÜLLER, Svenja *et al.* No long-term effects of antenatal synthetic glucocorticoid exposure on epigenetic regulation of stress-related genes. **Translational Psychiatry**, v. 12, n. 1, p. 62, 2022.

OLERUP, O.; ZETTERQUIST, H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. **Tissue Antigens**, v. 39, n. 5, p. 225–235, 1992.

OLSON, Lindsay; BISHOP, Somer; THURM, Audrey. Differential diagnosis of autism and other neurodevelopmental disorders. **Pediatric Clinics of North America**, v. 71, n. 2, p. 157–177, 2024.

PARENTI, Ilaria *et al.* Neurodevelopmental disorders: From genetics to functional pathways. **Trends in Neurosciences**, v. 43, n. 8, p. 608–621, 2020.

PARK, Caroline *et al.* Stress, epigenetics and depression: A systematic review. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 102, p. 139–152, 2019.

PÉQUEUX, Christel *et al.* Oxytocin receptor pattern of expression in primary lung cancer and in normal human lung. **Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)**, v. 50, n. 2, p. 177–188, 2005.

PIERZYNOWSKA, Karolina *et al.* Roles of the oxytocin receptor (OXTR) in human diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 4, p. 3887, 2023.

POBBE, Roger L. H. *et al.* Oxytocin receptor and Mecp2 308/Y knockout mice exhibit altered expression of autism-related social behaviors. **Physiology & Behavior**, v. 107, n. 5, p. 641–648, 2012.

PRICE, E. Magda *et al.* Profiling placental and fetal DNA methylation in human neural tube defects. **Epigenetics & Chromatin**, v. 9, n. 1, p. 6, 2016.

PROVENZI, Livio *et al.* Pain-related stress during the Neonatal Intensive Care Unit stay and SLC6A4 methylation in very preterm infants. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 9, p. 99, 2015.

PUGLIA, Meghan H. *et al.* Epigenetic modification of the oxytocin receptor gene influences the perception of anger and fear in the human brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 11, p. 3308–3313, 2015.

RANGASAMY, D. *et al.* Activation of LINE-1 retrotransposon increases the risk of epithelial-mesenchymal transition and metastasis in epithelial cancer. **Current Molecular Medicine**, v. 15, n. 7, p. 588–597, 2015.

RIBEIRO, Natasha Coutinho Revoredo; MARTELETO, Regina Maria. El Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales como dispositivo de infocomunicación. **Encontros Bibli Revista Eletrônica de Biblioteconomia e Ciência da Informação**, v. 28, p. 1–16, 2023.

RIJLAARSDAM, Jolien *et al.* Prenatal stress exposure, oxytocin receptor gene (OXTR) methylation, and child autistic traits: The moderating role of OXTR rs53576 genotype. **Autism Research: Official Journal of the International Society for Autism Research**, v. 10, n. 3, p. 430–438, 2017.

SALVATORE, Jessica E.; DICK, Danielle M. Genetic influences on conduct disorder. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 91, p. 91–101, 2018.

SANTOMAURO, Damian F. *et al.* The global epidemiology and health burden of the autism spectrum: findings from the Global Burden of Disease Study 2021. **The Lancet. Psychiatry**, v. 12, n. 2, p. 111–121, 2025.

SANWALD, Simon *et al.* Correction to: Factors related to age at depression onset: the role of SLC6A4 methylation, sex, exposure to stressful life events and personality in a sample of inpatients suffering from major depression. **BMC Psychiatry**, v. 21, n. 1, p. 220, 2021.

SHEEHAN, D. V. *et al.* The Mini-International Neuropsychiatric Interview (M.I.N.I.): the development and validation of a structured diagnostic psychiatric interview for DSM-IV and ICD-10. **The Journal of Clinical Psychiatry**, v. 59 Suppl 20, p. 22- 33;quiz 34-57, 1998.

SILVA, Mariana Oliveira *et al.* Genetic contributions to autism Spectrum Disorder: A review of recent advances. **ARACÊ**, v. 7, n. 3, p. 11675–11685, 2025.

SINGH, Jatinder; SANTOSH, Paramala; RAMASWAMI, Uma. Epigenetic mechanisms in Fabry disease: A thematic analysis linking differential methylation profiles and genetic modifiers to disease phenotype. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 47, n. 10, p. 855, 2025.

SOWA-KUĆMA, Magdalena; STACHOWICZ, Katarzyna. Molecular research on mental disorders. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 8, p. 7104, 2023.

SPANOS, Marina *et al.* Rationale, design, and methods of the Autism Centers of Excellence (ACE) network Study of Oxytocin in Autism to improve Reciprocal Social

Behaviors (SOARS-B). **Contemporary Clinical Trials**, v. 98, n. 106103, p. 106103, 2020.

STOCCORO, Andrea *et al.* Prenatal environmental stressors and DNA methylation levels in placenta and peripheral tissues of mothers and neonates evaluated by applying artificial neural networks. **Genes**, v. 14, n. 4, p. 836, 2023.

TABANO, Silvia *et al.* Mental health and the effects on methylation of stress-related genes in front-line versus other health care professionals during the second wave of COVID-19 pandemic: an Italian pilot study. **European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience**, v. 273, n. 2, p. 347–356, 2023.

TAFOLLA, Maira; SINGER, Hannah; LORD, Catherine. Autism spectrum disorder across the lifespan. **Annual Review of Clinical Psychology**, v. 21, n. 1, p. 193–220, 2025.

THIBONNIER, M. *et al.* Signal transduction pathways of the human V1-vascular, V2-renal, V3-pituitary vasopressin and oxytocin receptors. **Progress in Brain Research**, v. 119, p. 147–161, 1998.

TIAN, Wei *et al.* Single-cell DNA methylation and 3D genome architecture in the human brain. **Science (New York, N.Y.)**, v. 382, n. 6667, p. eadf5357, 2023.

TOWERS, Aaron J. *et al.* Epigenetic dysregulation of Oxtr in Tet1-deficient mice has implications for neuropsychiatric disorders. **JCI Insight**, v. 3, n. 23, 2018.

VAISERMAN, Alexander; LUSHCHAK, Oleh. Prenatal malnutrition-induced epigenetic dysregulation as a risk factor for type 2 diabetes. **International Journal of Genomics**, v. 2019, p. 3821409, 2019.

VELARDE, Myriam; CÁRDENAS, Aland. Autism spectrum disorder and attention-deficit/hyperactivity disorder: challenge in diagnosis and treatment. **Medicina**, v. 82 Suppl 3, p. 67–70, 2022.

VIDOVIČ, Eva *et al.* DNA methylation patterns in relation to acute severity and duration of anxiety and depression. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 45, n. 9, p. 7286–7303, 2023.

VINCZE, Tamas; POSFAI, Janos; ROBERTS, Richard J. NEBcutter: A program to cleave DNA with restriction enzymes. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 13, p. 3688–3691, 2003.

WANG, Ling *et al.* Autism spectrum disorder: Neurodevelopmental risk factors, biological mechanism, and precision therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 3, p. 1819, 2023.

WEI, Jinbao *et al.* Involvement of oxytocin receptor deficiency in psychiatric disorders and behavioral abnormalities. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 17, p. 1164796, 2023.

WIETING, Jelte *et al.* A targeted long-read sequencing approach questions the association of OXTR methylation with high-functioning autism. **Clinical Epigenetics**, v. 15, n. 1, p. 195, 2023.

WIGDOR, Emilie M. *et al.* The female protective effect against autism spectrum disorder. **Cell Genomics**, v. 2, n. 6, p. 100134, 2022.

WILD, Christopher Paul. The exposome: from concept to utility. **International Journal of Epidemiology**, v. 41, n. 1, p. 24–32, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde (CID)**. Disponível em: <<https://www.who.int/classifications/classification-of-diseases>>. Acesso em: 12 autumn. 2025.

WU, Man-Si *et al.* Effects of histone modification in major depressive disorder. **Current Neuropharmacology**, v. 20, n. 7, p. 1261–1277, 2022.

XIE, Wenbing *et al.* DNA methylation patterns separate senescence from transformation potential and indicate cancer risk. **Cancer Cell**, v. 33, n. 2, p. 309–321.e5, 2018.

YOUNESIAN, Samareh *et al.* The DNA methylation in neurological diseases. **Cells (Basel, Switzerland)**, v. 11, n. 21, p. 3439, 2022.

ZHANG, Lian; LU, Qianjin; CHANG, Christopher. Epigenetics in health and disease. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1253, p. 3–55, 2020.

ZLATNIK, M. G. *et al.* Functional oxytocin receptors in a human endometrial cell line. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 182, n. 4, p. 850–855, 2000.

ZUCCARELLO, Daniela *et al.* Epigenetics of pregnancy: looking beyond the DNA code. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 39, n. 4, p. 801–816, 2022.