



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

CLAUDIA MARA RIBEIRO

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA VARIANTE GENÉTICA
MTHFR 677C>T (RS1801133) SOBRE A SUSCETIBILIDADE
À ESCLEROSE MÚLTIPLA, INCAPACIDADE POR
AGRAVAMENTO E PROGRESSÃO DA DOENÇA**

LONDRINA
2024

CLAUDIA MARA RIBEIRO

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA VARIANTE GENÉTICA
MTHFR 677C>T (RS1801133) SOBRE A SUSCETIBILIDADE
À ESCLEROSE MÚLTIPLA, INCAPACIDADE POR
AGRAVAMENTO E PROGRESSÃO DA DOENÇA**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial, Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora.

Orientadora: Profa. Dra. Edna Maria Vissoci Reiche
Co-orientadora: Profa. Dra. Sayonara Rangel Oliveira

i

LONDRINA
2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

R484a Ribeiro, Claudia Mara.

Avaliação dos efeitos da variante genética *MTHFR* 677C>T (rs1801133) sobre a suscetibilidade à esclerose múltipla, incapacidade por agravamento e progressão da doença / Claudia Mara Ribeiro. - Londrina, 2024.
140 f. : il.

Orientador: Edna Maria Vissoci Reiche.

Coorientador: Sayonara Rangel Oliveira.

Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial, 2024.

Inclui bibliografia.

1. Esclerose múltipla - Tese. 2. Homocisteína - Tese. 3. Variante genética rs1801133 no gene *MTHFR* - Tese. 4. Incapacidade por agravamento - Tese. I. Reiche, Edna Maria Vissoci. II. Oliveira, Sayonara Rangel. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial. IV. Título.

CDU 61

CLAUDIA MARA RIBEIRO

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA VARIANTE GENÉTICA
MTHFR 677C>T (RS 1801133) SOBRE A SUSCETIBILIDADE
À ESCLEROSE MÚLTIPLA, INCAPACIDADE POR
AGRAVAMENTO E PROGRESSÃO DA DOENÇA**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial, Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Dra. Edna Maria Vissoci Reiche
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Damacio Ramon Kaimen Maciel
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Karen Brajão de Oliveira
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Marcell Alysson Batisti Lozovoy
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Dra. Tamires Flauzino Luz
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 18 de abril de 2024

AGRADECIMENTOS

À Deus pela bondade, cuidado e amor dispensados a mim em todos os momentos e por capacitar-me para essa conquista.

Aos meus filhos Alan, Nicole e Kelvin pelo carinho, incentivo, apoio e compreensão nos momentos de ausência. Eu amo vocês.

Aos meus pais Rubens e Raquel pelo apoio e amor incondicional, cuidado e por tornarem esta trajetória mais amena.

À minha irmã Ana Paula pelo carinho, apoio, mensagens de ânimo e o bom humor de sempre.

À minha orientadora Profa. Dra. Edna Maria Vissoci Reiche pelos conhecimentos transmitidos, dedicação, atenção, inspiração e orientação ao longo desse trabalho.

À minha co-orientadora Profa. Dra. Sayonara Rangel Oliveira pela disponibilidade, colaboração, amizade e conhecimentos compartilhados.

À Profa. Dra. Daniela Frizon Alfieri pela parceria, amizade e dedicação.

Aos meus amigos do Setor de Toxicologia do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina, pelo companheirismo, compreensão e incentivo.

“Cada um terá a vista da montanha que subir.”

Ícaro Fonseca

RIBEIRO, Claudia Mara. Avaliação dos efeitos da variante genética *MTHFR* 677C>T (rs1801133) sobre a suscetibilidade à esclerose múltipla, incapacidade por agravamento e progressão da doença. 2024. 140f. Tese de doutorado (Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2024.

RESUMO

Introdução: Vários mecanismos fisiopatológicos estão envolvidos na patogênese da esclerose múltipla (EM), entre eles a elevação dos níveis da homocisteína (Hcy). Variantes no gene *MTHFR* associadas ao aumento da Hcy são descritas; no entanto, os resultados são conflitantes sobre seu papel na fisiopatologia da EM. **Objetivos:** Realizar uma revisão da literatura sobre a relação entre a variante genética *MTHFR* 677C>T, níveis de Hcy, vitamina B12 e folato e sua associação com a suscetibilidade e fisiopatologia da EM; avaliar os efeitos da variante genética *MTHFR* 677C>T (rs1801133) sobre a suscetibilidade, incapacidade e progressão da doença. **Métodos:** Na revisão da literatura, utilizou-se as bases de dados *PubMed/US National Library of Medicine/USA* para a busca de artigos originais publicados no idioma Português e Inglês, no período de 1990 a 2023. Realizou-se, também, um estudo caso-controle em que foram avaliados 163 pacientes com EM e 226 indivíduos controles. O grau de incapacidade dos pacientes foi avaliado pela Escala Expandida do Estado de Incapacidade (EDSS) e a progressão da doença foi avaliada pela escala *Multiple Sclerosis Severity Score* (MSSS). A genotipagem da variante *MTHFR* 677C>T foi realizada pela reação em cadeia da polimerase em tempo real. Foram avaliados os valores plasmáticos de marcadores inflamatórios como a proteína C reativa (PCR), interleucina (IL)2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, interferon (IFN)- γ , fator de necrose tumoral (TNF)- α e seus receptores solúveis (sTNFR1 e sTNFR2) e marcadores metabólicos como homocisteína, folato, 25 hidroxivitamina D [25(OH)D] e adiponectina. Dois novos escores foram propostos: índice de atividade inflamatória (IAI) composto pelos valores de citocinas de macrófagos M1 (IL-6 e TNF- α) + citocinas Th1 (IL-2 e IFN- γ) + citocinas Th17 (IL-6 e IL-17) e citocinas regulatórias Th2 + T regulatórias (IL-4 e IL-10) e TNF- α +sTNFR1+sTNFR2; índice de gravidade da EM composto por o diagnóstico da EM + EDSS + MSSS. **Resultados:** No artigo 1, foram selecionados 30 estudos que avaliaram a associação dos níveis de Hcy, folato e vitamina B12 entre os pacientes com EM e indivíduos saudáveis. Os principais resultados encontrados foram: 18 estudos descreveram valores elevados de Hcy em pacientes com EM comparados aos controles; em relação aos valores de folato, 3 estudos mostraram diminuição e 1 estudo mostrou aumento nos pacientes com EM comparados aos controles. Em relação aos valores de vitamina B12, 8 estudos os valores foram menores nos pacientes comparados aos controles. Quando avaliada a possível associação entre a variante genética *MTHFR* 677C>T e a EM, foram selecionados 11 estudos realizados em diferentes populações; 5 artigos mostraram associação e 6 apresentaram resultados discordantes. No artigo 2, os resultados mostraram que a variante genética *MTHFR* 677 C>T não foi associada com a suscetibilidade à EM, incapacidade por agravamento e progressão da incapacidade ($p>0,05$); 21,8% da variação da incapacidade foi explicada pela idade, IAI e PCR (todos positivamente associados); 54,4% da variação do índice de gravidade foi devido a idade, IAI, Hcy, folato e PCR

(todos positivamente) e adiponectina, sexo masculino, índice de massa corporal variante *MTHFR* 677 C>T no modelo recessivo e 25(OH)D (todos negativamente). Em pacientes e controles, 16,6% da variação nos valores de Hcy foram explicados pelo genótipo em homozigose (TT) da variante do *MTHFR*, sexo masculino e idade (positivamente associados) e folato (negativamente associado). **Conclusão:** Pelo artigo 1 verificou-se que os valores de Hcy foram mais consistentemente elevados em pacientes com EM, enquanto os níveis de folato e vitamina B12 foram conflitantes. Em relação à associação entre a variante genética *MTHFR* 677C>T e EM em populações distintas, 5 estudos mostraram associação, enquanto 6 estudos mostraram resultados discordantes, portanto, há necessidade de mais estudos em outras populações. No artigo 2, os resultados mostraram que não houve associação entre os genótipos da variante 677 C>T do *MTHFR* e a EM, incapacidade por agravamento e progressão da doença; no entanto, o genótipo TT desta variante mostrou efeitos indiretos sobre a suscetibilidade à EM e agravamento da incapacidade, e estes efeitos seriam mediados pela Hcy.

Palavras-chave: Esclerose Múltipla; Homocisteína, polimorfismo genético, rs1801133, *MTHFR*; Incapacidade por agravamento

RIBEIRO, Claudia Mara. Assessment of the effects of the *MTHFR* 677C>T (rs1801133) genetic variant on susceptibility to multiple sclerosis, disability worsening and disease progression. 2024. 140p. Doctoral Thesis. (Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2024.

ABSTRACT

Background: Several pathophysiological mechanisms are involved in the pathogenesis of multiple sclerosis (MS), among them the elevation of homocysteine (Hcy) levels. Variants in the *MTHFR* gene associated with increased Hcy have been described; however, results are conflicting regarding its role in the pathophysiology of MS. **Objectives:** To review the literature regarding the relationship between the *MTHFR* 677C>T genetic variant, Hcy, vitamin B12, and folate levels and their association with the susceptibility and pathophysiology of MS; to evaluate the effects of the *MTHFR* 677C>T (rs1801133) genetic variant on susceptibility, disability and disease progression. **Material and Methods:** In the literature review, the PubMed/US National Library of Medicine/USA databases were used to search for original articles published in Portuguese and English, in period of 1990 to 2023. A case-control study was also carried out in which 163 and 226 healthy individuals were evaluated. The disability of MS patients was assessed using the Expanded Disability Status Scale (EDSS) and the disease progression was assessed using the Multiple Sclerosis Severity Score (MSSS). Genotyping of the *MTHFR* 677C>T variant was performed by real-time polymerase chain reaction. Plasma levels of inflammatory biomarkers, such as C-reactive protein (CRP), interleukin (IL)-2, IL-4, IL-6, IL-10, interferon (IFN)- γ , tumor necrosis factor (TNF)- α and the soluble TNF receptors (sTNFR1 and sTNFR2), as well as biochemical biomarkers, including the levels of Hcy, folate, adiponectin, and 25 hydroxyvitamin D [25(OH)D] were determined. Two new scores were proposed: the first, called the inflammatory activity index (IAI), was obtained with the values of cytokines of M1 macrophages (IL-6 and TNF- α) + Th1 cytokines (IL-2 and IFN- γ) + Th17 cytokines (IL-6 and IL-17) and regulatory cytokines of Th2+T (Treg) (IL-4 and IL-10) and TNF- α +sTNFR1+sTNFR2; the second was an MS severity index, composed of EDSS+MSSS+MS diagnosis. **Results:** In review study, 30 studies were selected that evaluated the association of Hcy, folate and vitamin B12 levels between patients with MS and healthy individuals. The main results found were: 18 studies described high Hcy values in patients with MS compared to controls; regarding folate values, 3 studies showed a decrease and 1 study showed an increase in MS patients compared to controls; regarding vitamin B12 values, in 8 studies the values were lower in patients compared to controls. When evaluating the possible association between the *MTHFR* 677C>T genetic variant and MS, 11 studies carried out in different populations were selected; 5 articles showed an association and 6 presented discordant results. In the case-control study, the results showed no association between the *MTHFR* 677C>T genetic variant and susceptibility to MS, disability worsening and progression of disability ($p>0.05$); 21.8% of the variation in disability was explained by age, IAI and CRP (all positively associated); 54.4% of the variation in the severity index was due to age, IAI, Hcy, folate, and CRP (all positive), as well as adiponectin, male sex, body mass index, the *MTHFR* 677C>T variant in the recessive model and 25(OH)D (all negatively). In patients and controls, 16.6% of the variation in Hcy level values was explained by the homozygous genotype (TT) of the *MTHFR* 677C>T variant, male sex and age (positively associated) and folate (negatively associated). **Conclusion:** The

review study showed that the Hcy levels were more consistently high in patients with MS, while the folate and vitamin B12 levels were conflicting. Regarding the association between the *MTHFR* 677C>T genetic variant and MS in different populations, 5 studies showed an association, while 6 studies showed discordant results; therefore, more studies should be carried out in other populations. In case-control study, the main results showed no association between the *MTHFR* 677 C>T variant and MS, disability worsening and progression of the disease; however, the TT genotype of this variant showed indirect effects on susceptibility to MS and disability worsening, and these effects would be mediated by Hcy.

Keywords: Multiple Sclerosis; Homocysteine; genetic polymorphism, *MTHFR* rs1801133, disability worsening,

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Prevalência global da esclerose múltipla	17
Figura 2 – Prevalência da esclerose múltipla no Brasil	18
Figura 3 – Representação gráfica das formas clínicas da esclerose múltipla.....	20
Figura 4 – Escala expandida do estado de incapacidade (EDSS) aplicada à esclerose múltipla	21
Figura 5 – Imunopatogênese da esclerose múltipla	26
Figura 6 – Metabolismo da homocisteína.....	28
Figura 7 - Mecanismos de toxicidade da homocisteína.....	32
Figura 8 - Localização e efeito da variante genética 677C>T do <i>MTHFR</i>	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPA	Receptor Alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico
ATP	Adenosina trifostato
BHE	Barreira hematoencefálica
CBS	Cistationina beta-sintase
CIS	<i>Clinicaly isolated syndrome</i> (Síndrome clinicamente isolada)
CSE	Cistationina gama-liase
Cys	Cisteína
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDSS	Escala Expandida do Estado de Incapacidade
EM	Esclerose Múltipla
EMPP	Esclerose Múltipla Primariamente Progressiva
EMRR	Esclerose Múltipla Remitente-Recorrente
EMSP	Esclerose Múltipla Secundariamente Progressiva
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EROs	Espécies reativas de oxigênio
Hcy	Homocisteína
HHcy	Hiperhomocisteinemia
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i> (Antígeno leucocitário humano)
HU	Hospital Universitário
IAI	Índice de atividade inflamatória
IC	Intervalo de confiança
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular 1
IFN- γ	Interferon γ
IL	Interleucina
LB	Linfócito B
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LT	Linfócito T
MCP-1	Proteína de quimioatração de monócitos 1
Met	Metionina
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> (Complexo principal de histocompatibilidade)

MSSS	<i>Multiple Sclerosis Severity Score</i> (Escore de Gravidade da Esclerose Múltipla)
MTHFR	Enzima metilenotetrahidrofolato redutase
NF- κ B	<i>Nuclear factor kappa B</i> (Fator nuclear <i>kappa B</i>)
NMDA	Receptor N-metil-D-aspartato
NO	Óxido nítrico
OR	<i>Odds ratio</i>
PCR	Proteína C reativa
RMN	Ressonância magnética nuclear
RNA	Ácido ribonucleico
SAH	S-adenosil-homocisteína
SAM	S-adenosilmetionina
SNC	Sistema nervoso central
TNF	Fator de necrose tumoral
sTNFR1	Receptor solúvel do TNF tipo 1
sTNFR2	Receptor solúvel do TNF tipo 2
TGF- β	Fator de transformação do crescimento
Th	T <i>helper</i>
Treg	T reguladora
UEL	Universidade Estadual de Londrina
VCAM-1	Molécula de adesão celular vascular 1
5-metilTHF	5-metiltetrahidrofolato
5,10-metilenotHF	5,10-metilenotetrahidrofolato
25(OH)D	25-hidroxivitamina D

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	Aspectos Gerais e Epidemiologia da EM.....	16
1.2	Diagnóstico e Formas Clínicas.....	18
1.3	Etiopatogenia da EM.....	21
1.4	Metabolismo da Homocisteína.....	27
1.5	Mecanismos de Toxicidade da Homocisteína e sua Associação com EM.....	30
1.6	Variante Genética 677C>T do <i>MTHFR</i> , Hiperhomocisteinemia e EM.....	32
2	JUSTIFICATIVA	37
3	OBJETIVOS	38
3.1	Objetivo Geral.....	38
3.2	Objetivos Específicos	38
4	MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1	Aspectos Éticos.....	39
4.2	Delineamento.....	39
4.3	Amostra.....	39
4.4	Critério de exclusão.....	40
4.5	Dados demográficos, epidemiológicos, antropométricos e clínicos.....	40
4.6	Coleta de Material Biológico.....	41
4.7	Análise da Variante 677C>T do Gene <i>MTHFR</i>	41
4.8	Marcadores Inflamatórios e Bioquímicos.....	42
4.9	Análise Estatística.....	42

5	RESULTADOS.....	44
----------	------------------------	-----------

Artigo 1	<i>Methylenetetrahydrofolate reductase</i> rs1801133 (677C>T) genetic variant, homocysteine, folate, and vitamin B12 levels in patients with multiple sclerosis: a scoping review.....	45
-----------------	--	----

Artigo 2	The effects of the <i>MTHFR</i> 677C>T (rs1801133) genetic variant on susceptibility and disability in multiple sclerosis patients are mediated by homocysteine	79
-----------------	---	----

6	CONCLUSÃO.....	121
----------	-----------------------	------------

7	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	123
----------	---	------------

8	REFERÊNCIAS.....	125
----------	-------------------------	------------

ANEXOS

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UEL.....	135
ANEXO B – Critérios de McDonald 2017.....	136

APÊNDICES

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE).....	137
APÊNDICE B - Questionário para coleta de dados demográficos, clínicos e terapêuticos.....	140

1 1 INTRODUÇÃO

2 1.1 Aspectos Gerais e Epidemiologia da EM

3 A esclerose múltipla (EM) é uma doença inflamatória crônica
4 imunomediada, desmielinizante e neurodegenerativa que acomete o sistema nervoso
5 central (SNC). A EM apresenta o envolvimento de vários mecanismos fisiopatológicos
6 como inflamação, desmielinização, perda de oligodendrócitos, comprometimento dos
7 axônios, estresse oxidativo e mecanismos de reparo, embora estes eventos não
8 estejam presentes em todos os pacientes de maneira uniforme (Miller *et al.*, 2012).

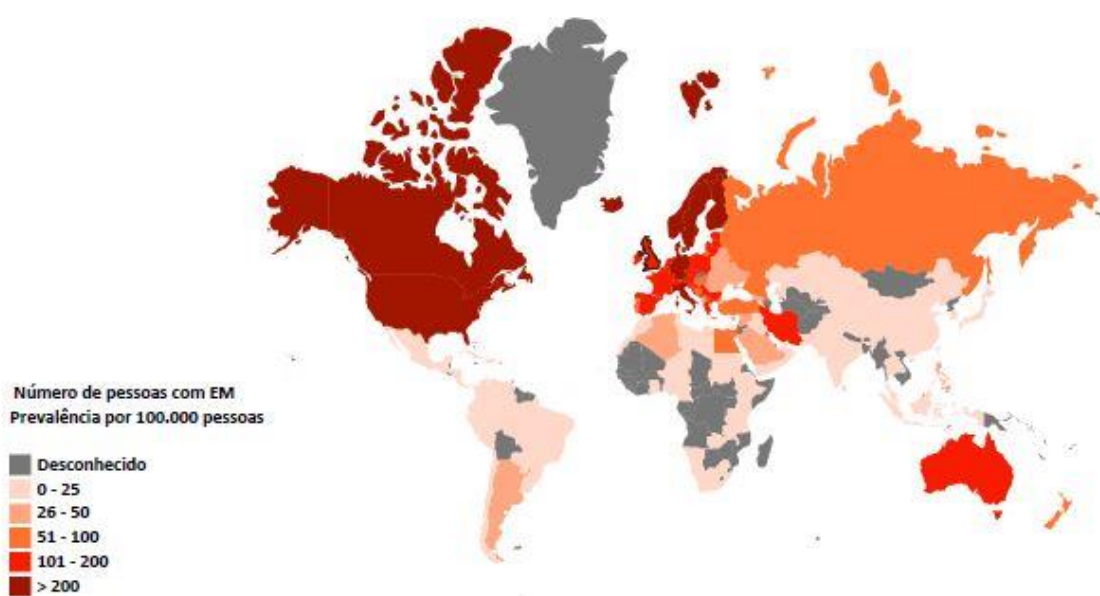
9 Na maioria dos casos, a idade de início da EM ocorre entre 20 a 40 anos e
10 as mulheres são duas a três vezes mais afetadas e iniciam a doença mais
11 precocemente que os homens. Todavia, em relação a forma progressiva primária da
12 EM (EMPP), o sexo feminino apresenta menor prevalência, enquanto que os homens
13 apresentam progressão mais evidente (Oh; Vidal-Jordana; Montalban, 2018; Ysraelit;
14 Correale, 2019).

15 Os pacientes com EM podem apresentar uma grande variedade de sinais e
16 sintomas, incluindo alterações na visão, fala, mobilidade, equilíbrio, cognição e função
17 do esfíncter que são, em grande parte, determinados pela localização e extensão das
18 lesões desmielinizantes que podem estar situadas no nervo óptico, medula espinhal,
19 substância branca periventricular e tronco cerebral (Oh; Vidal-Jordana; Montalban,
20 2018).

21 Estima-se que 2,8 milhões de pessoas em todo o mundo sofram de EM,
22 com uma prevalência global de 35,9 em cada 100.000 habitantes, sendo considerada
23 uma das causas mais comuns de incapacidade neurológica em adultos jovens
24 (Walton *et al.*, 2020; Reich; Lucchinetti; Calabresi, 2018). No entanto, sua prevalência
25 varia consideravelmente entre os países, de menos de 25 casos em cada 100.000
26 habitantes em áreas denominadas de baixo risco, como a maior parte da África e Ásia
27 Oriental, a mais de 100 casos em cada 100.000 habitantes em áreas de alto risco,
28 como norte e centro da Europa, América do Norte e sudeste da Austrália (Walton *et al.*,
29 2020). Considera-se que esta variação ocorra em função das características
30 étnicas, ambientais e geográficas de cada população (Correa; Paredes; Martinez,
31 2016).

1 A prevalência de EM tem aumentado em todas as regiões do mundo ao
2 longo dos últimos dez anos. Este aumento pode ser atribuído ao aumento da doença
3 *per si* e/ou pela melhoria no acesso ao serviço médico e maior precisão no seu
4 diagnóstico (Koch- Henriksen; Magyari, 2021). A **Figura 1** mostra a prevalência
5 mundial da EM em 2020, segundo *Multiple Sclerosis International Federation* (MSIF,
6 2020).

7
8 **Figura 1.** Prevalência global da esclerose múltipla



9
10
11 **Fonte:** *Multiple Sclerosis International Federation* (2020).

12 A prevalência da esclerose múltipla (EM) varia entre os diferentes países, de menos de 25 casos em
13 cada 100.000 habitantes em áreas denominadas de baixo risco, como a maior parte da África e Ásia
14 Oriental, de 101 a > 200 casos em cada 100.000 habitantes em áreas de alto risco, como norte e centro
15 da Europa, América do Norte e sudeste da Austrália.

16
17 No Brasil, de acordo com uma revisão sistemática publicada por Pereira *et al.*
18 (2015), a prevalência média encontrada para a EM foi de 8,69 casos em cada 100.000
19 habitantes. No entanto, devido a aspectos geográficos, demográficos e históricos de
20 cada região, observou-se uma grande variabilidade entre os valores máximos e
21 mínimos, que oscilaram entre 27,2 casos em cada 100.000 habitantes na região Sul
22 e 1,36 casos em cada 100.000 habitantes na região Nordeste (**Figura 2**). Além disso,
23 seguindo o perfil mundial, a EM no Brasil afeta com maior frequência mulheres e em
24 Caucasianos (Gonçalves *et al.*, 2021).

1 **Figura 2.** Prevalência da esclerose múltipla no Brasil.



2

3 **Fonte:** Pereira *et al.* (2015).

4 A prevalência de esclerose múltipla no Brasil varia de 4 a 5 casos em cada 100.000 habitantes na
5 região Norte até 26 casos em cada 100.00 habitantes na região Sul. A cidade de Recife (PE) apresentou
6 a menor prevalência com 1,36 casos em cada 100.000 habitantes e a cidade de Santa Maria (RS)
7 apresentou a maior prevalência, com 27,2 casos em cada 100.000 habitantes.

8

9 **1.2 Diagnóstico e Formas Clínicas**

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

O diagnóstico da EM é estabelecido a partir da integração de achados clínicos, de imagem e laboratoriais. A demonstração de evidências da disseminação no tempo e no espaço utilizando a imagem de ressonância magnética nuclear (RMN) permite um diagnóstico mais seguro e ajuda a excluir outras doenças neurológicas. Critérios diagnósticos conhecidos como critérios de McDonald evoluíram à medida que a tecnologia dos exames de imagem também avançou, tornando-os mais simples e mais acessíveis a uma proporção maior da população, mantendo a sensibilidade e especificidade (Wildner, Stasiolek, Matysiak, 2020; Thompson *et al.*, 2018a).

Algumas mudanças foram implementadas na revisão dos critérios de McDonald de 2017, tais como o restabelecimento do exame do líquido cefalorraquidiano (LCR) para a pesquisa da presença de bandas oligoclonais e um protocolo padronizado para acompanhamento de pacientes com suspeita ou EM

1 clinicamente definida pelo exame de RMN (Thompson *et al*, 2018b; Wildner, Stasiolek,
2 Matysiak, 2020).

3 De acordo com a classificação revisada do curso clínico da EM, há quatro
4 fenótipos principais: síndrome clinicamente isolada (CIS), remitente-recorrente
5 (EMRR), primariamente progressiva (EMPP) e secundariamente progressiva (EMSP)
6 (Lublin *et al.*, 2014; Thompson *et al.*, 2018a). A forma CIS é a manifestação inicial e
7 mais comum da EM, afeta os nervos ópticos, tronco cerebral ou medula espinhal; pode
8 ser definida como um episódio agudo ou subagudo de disfunção neurológica devido
9 à desmielinização inflamatória que dura mais de 24 horas e ocorre na ausência de
10 febre, infecção e encefalopatia (Klineova, Lublin, 2018). A EMRR é a forma mais
11 comum da doença e acomete, aproximadamente, 85% de todos os pacientes no início
12 da doença e é caracterizada pela presença de surtos bem definidos com recuperação
13 parcial ou completa dos sintomas e ausência de progressão entre os episódios
14 (Pozzilli *et al*, 2023). A forma EMSP é uma evolução natural da EMRR em cerca de
15 80% dos casos após 20 anos do diagnóstico, sendo caracterizada pela deterioração
16 contínua das funções neurológicas com ou sem surtos agudos (Vidal-Jordana,
17 Montalban, 2017; Pozzilli *et al*, 2023). A EMPP acomete em torno de 15% dos
18 pacientes com EM, apresenta-se com o curso progressivo desde o início dos sintomas
19 e evolui de forma lenta e estável e sem surtos aparentes (Pozzilli *et al*, 2023). A **Figura**
20 **3** mostra as principais formas clínicas da EM.

21

22

23

24

25

26

27

28

29

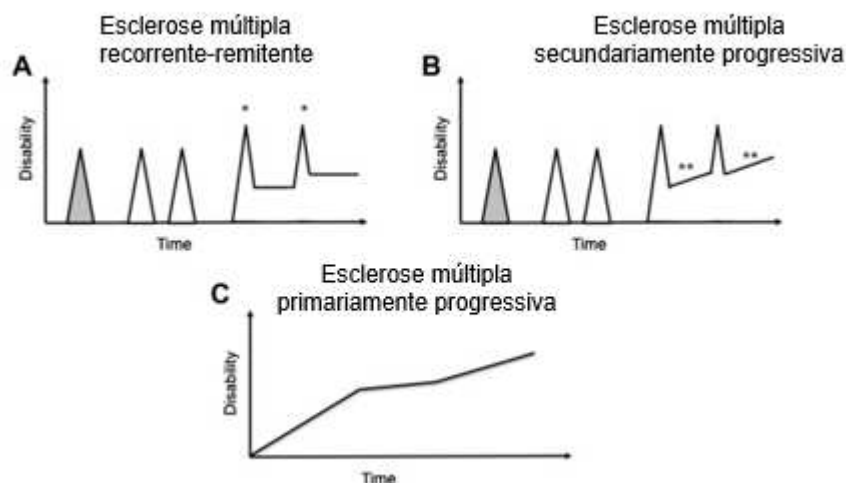
30

31

32

33

1 **Figura 3.** Representação gráfica das formas clínicas da esclerose múltipla



2

3 **Fonte:** Adaptado de Vidal-Jordana e Montalban (2017).

4 Na esclerose múltipla (EM) recorrente remitente (A), após o primeiro evento ou também denominado
 5 síndrome clinicamente isolada (cinza claro) novos surtos ocorrerão, com recuperação total ou parcial
 6 (asterisco). Após este período inicial, alguns pacientes evoluem para a fase progressiva da doença
 7 (duplo asterisco), com ou sem surtos sobrepostos, que constitui a EM secundariamente progressiva
 8 (B). Na EM primariamente progressiva(C), os pacientes apresentam uma deterioração neurológica
 9 progressiva e estável desde o início.

10

11 O grau de incapacidade em pacientes com EM pode ser avaliado utilizando-se
 12 a Escala Expandida do Estado de Incapacidade (EDSS), sugerida por Kurtzke (1983).
 13 O EDSS é uma escala ordinal e varia de 0 (exame neurológico normal) a 10 (óbito
 14 devido a EM), uma vez que quantifica a incapacidade por agravamento da doença
 15 ocorrida ao longo do tempo. Entre os sistemas funcionais quantificados estão os
 16 piramidais, cerebelares, do tronco cerebral, sensitivos, vesicais, intestinais, visuais e
 17 mentais (Kurtzke, 1983). Na maioria dos estudos, os pacientes são categorizados com
 18 incapacidade leve ($EDSS < 3,0$) ou moderada/grave ($EDSS \geq 3,0$) (Kallaur *et al.*, 2017).
 19 A **Figura 4** mostra a EDSS e os níveis de comprometimento da doença.

20

21

22

23

24

1 **Figura 4.** Escala Expandida do Estado de Incapacidade (EDSS)



2

3 **Fonte:** Adaptado de Kurtzke (1983).

4 A Escala Expandida do Estado de Incapacidade (EDSS) é uma escala ordinal que quantifica a
 5 incapacidade por agravamento da doença ocorrida ao longo do tempo. Os escores variam de 0 (exame
 6 neurológico normal) a 10 (óbito devido à EM) e refletem o comprometimento dos sistemas funcionais
 7 como piramidais, cerebelares, do tronco cerebral, sensitivos, vesicais, intestinais, visuais e mentais.

8

9 Ao longo do tempo, os pacientes com EM podem apresentar alterações nos
 10 escores de incapacidade. A progressão da incapacidade pode ser avaliada utilizando
 11 o escore de gravidade da EM (*Multiple Sclerosis Severity Score*, MSSS), sendo
 12 amplamente adotado como padrão referência para avaliação do acúmulo de
 13 incapacidade na EM (Kister; Kantarci, 2020). Proposto por Roxburgh *et al.* (2005), uma
 14 pontuação do MSSS é atribuída de acordo com o EDSS de um paciente, comparado
 15 com o EDSS de uma ampla base de dados de pacientes com duração semelhante da
 16 doença. O escore $\geq 5,0$ denota velocidade maior que a média de acúmulo de
 17 incapacidade (Koch *et al.*, 2015).

18

19 **1.3 Etiopatogenia da EM**

20

21

22 A etiologia da EM ainda não é totalmente esclarecida; porém, sugere-se
 23 que fatores genéticos, epigenéticos, imunológicos e ambientais interagindo com
 24 fatores de risco modificáveis, como os de alterações metabólicas, estejam envolvidos
 25 com a patogênese da doença (Thompson *et al.*, 2018a). Ainda não está claro quais
 fatores são responsáveis pela heterogeneidade na apresentação clínica e curso

1 clínico da EM, assim como diferenças nas alterações morfológicas observadas na
2 RMN e na avaliação histopatológica, funções neurológicas afetadas e resposta ao
3 tratamento. Evidências sugerem que esta heterogeneidade seja atribuída aos
4 diferentes mecanismos fisiopatológicos envolvidos da EM, como desregulação da
5 resposta imune inata e adaptativa, estresse oxidativo e alterações metabólicas, em
6 associação com fatores genéticos e ambientais (Sospedra; Martin, 2016).

7 Entre os fatores ambientais, os mais frequentes incluem o tabagismo,
8 obesidade, latitude geográfica (em geral a exposição ao sol e raios ultravioleta UV-B
9 tendem a diminuir com o aumento da latitude), deficiência de 25-hidroxivitamina D
10 [25(OH)D] e infecções virais, principalmente envolvendo o vírus Epstein-Barr
11 (Nourbakhsh, Mowry, 2019). Alguns estudos têm mostrado que o microbioma
12 intestinal, da pele e das vias aéreas poderia estar associado com respostas
13 autoimunes e inflamatórias, contribuindo para a patogênese na EM (Chu *et al.*, 2018).

14 Mais de 200 variantes genéticas têm sido consideradas de risco para o
15 desenvolvimento da EM, em que cada variante teria um pequeno efeito no risco da
16 doença e diferentes combinações dessas variantes provavelmente contribuem para a
17 suscetibilidade em diferentes pacientes (Baranzini; Oksenberg, 2017). A maioria
18 dessas variantes codifica moléculas envolvidas no sistema imunológico, tais como os
19 genes *HLA* localizados no cromossomo 6, incluindo variantes nos alelos *HLA-*
20 *DRB1*15:01*, *HLA-DRB1*0301* e *HLA-DRB1*1303* expressos nas células da resposta
21 imune inata que estão associados a um maior risco do que outros distúrbios
22 imunológicos sistêmicos (Filippi *et al.*, 2018; Hemmer *et al.*, 2015). Algumas variantes
23 genéticas, particularmente aquelas localizadas nos *loci HLA*, podem interagir com
24 fatores de risco ambientais. Por exemplo, o alelo *HLA-DRB1*15:01*, que está
25 associado ao maior risco de EM, confere um risco significativamente maior de EM
26 entre fumantes, em indivíduos com infecção pelo vírus Epstein-Barr e naqueles com
27 obesidade na adolescência (Filippi *et al.*, 2018; Murúa; Farez; Quintana, 2022).
28 Estudo prévio realizado pelo nosso grupo de pesquisa em pacientes com EM
29 provenientes de Londrina e região norte do Paraná, Sul do Brasil, demonstrou que o
30 alelo *HLA-DRB1*15* em heterozigose foi positivamente associado à suscetibilidade
31 para a EM e poderia ser considerado um marcador genético de susceptibilidade à
32 doença. O estudo demonstrou, também, uma associação negativa entre o alelo *HLA-*
33 *DRB1*11* em homozigose e EM, sugerindo que este alelo poderia ser considerado um
34 marcador genético de resistência à EM nessa população (Kaimen-Maciel *et al.*, 2009).

1 Vários componentes patogênicos podem estar presentes no curso da EM
2 tais como inflamação, desmielinização, perda de oligodendrócitos e comprometimento
3 axonal. Estes mecanismos acontecem pela infiltração das células do sistema imune
4 periférico no SNC levando à formação de lesões ou placas, que são características
5 da doença (Dendrou; Fugger; Friese, 2015; Díaz; Zarco; Rivera, 2019). Além do
6 infiltrado de células inflamatórias mononucleares, como linfócitos T (LT),
7 monócitos/macrófagos e linfócitos B (LB), as lesões também apresentam axônios
8 desmielinizados, número reduzido de oligodendrócitos, axônios transeccionados e
9 proliferação de astrócitos com consequente gliose (Díaz; Zarco; Rivera, 2019).

10 Estudos destacam os LT e LB como componentes centrais na fisiopatologia
11 da EM e sugerem que são células autorreativas e podem ser ativadas na periferia para
12 tornarem-se células efetoras no SNC (Thompson, 2018a). Evidências indicam que a
13 EM tem início com a ativação das células T CD4⁺ autorreativas na periferia que
14 escaparam dos mecanismos de tolerância central e periférica. Indivíduos
15 geneticamente susceptíveis ao entrarem em contato com estímulos ambientais, como
16 infecção viral, podem desencadear reações imunogênicas ao reconhecer moléculas
17 ou células com peptídeos semelhantes aos da mielina (Yamout; Alroughani, 2018
18 Dendrou; Fugger; Friese, 2015). Células apresentadoras de antígenos, como
19 macrófagos e células dendríticas entram em contato com o antígeno e, pela expressão
20 de moléculas coestimulatórias e do complexo principal de histocompatibilidade (MHC)
21 de classe II, apresentam o antígeno para os linfócitos T CD4⁺ naíves no tecido
22 periférico, implicando em sua ativação (Fontoura; Garren, 2010). Estes linfócitos
23 ativados podem se diferenciar em vários subtipos de células funcionalmente distintas
24 incluindo T *helper* (Th)1, Th2, Th17 e células T regulatórias (Treg) (Grigoriadis; Van
25 Pesch, 2015; Hemmer; Kerschensteiner; Korn, 2015).

26 As células Th1 são caracterizadas, principalmente, pela ampla produção de
27 citocinas pró-inflamatórias, tais como fator de necrose tumoral (TNF)- α , interferon
28 (IFN)- γ e interleucina (IL)-2, as quais podem iniciar e perpetuar danos axonais nas
29 lesões mais precoces e a desmielinização na EM, pela ativação da resposta citotóxica
30 e humoral (Liu *et al.*, 2022). Já os LT citotóxicos exercem citotoxicidade direta na
31 bainha de mielina, enquanto que a imunidade humoral mediada por LB, produzirá
32 anticorpos contra componentes da mielina, que ativam as proteínas do sistema
33 complemento, contribuindo para a lesão da bainha de mielina (Dendrou; Fugger;
34 Friese, 2015).

1 As células Th2 caracterizam-se pela produção das citocinas anti-
2 inflamatórias IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 e estão associadas com a inibição da resposta
3 Th1 pela IL-10 que podem estar evidentes na fase de remissão da EM. As citocinas e
4 seus receptores são importantes moléculas na evolução das lesões da EM e os níveis
5 de citocinas pró e anti-inflamatórias são correlacionados com as mudanças na
6 atividade da doença (Amedei; Prisco; D'Elios, 2012; Dargahi *et al.*, 2017).

7 A subpopulação de células Th17 está primariamente envolvida no recrutamento
8 de neutrófilos e, em menor extensão, de monócitos para os sítios de infecção e
9 inflamação com a produção de citocinas IL-21, IL-22 e IL-17. Sua diferenciação a partir
10 de Th0, depende da estimulação por citocinas pro-inflamatórias tais como IL-1, IL-6 e
11 fator de transformação do crescimento beta (TGF- β). Evidências mostram que estas
12 células estão intimamente associadas a patogênese da EM, contribuindo na
13 degradação da barreira hematoencefálica (BHE) e interferindo no processo de
14 remielinização. De fato, níveis elevados de IL-17 estão presentes nas lesões do SNC,
15 LCR e no sangue periférico de pacientes com EM (Dargahi *et al.*, 2017).

16 Além disso, as células T CD4⁺ podem diferenciar-se em células Tregs que
17 desempenham uma função imunomoduladora sobre as células Th1 e Th17,
18 contribuem para a manutenção da tolerância contra autoantígenos e previnem a
19 autoimunidade. As células Tregs têm função anti-inflamatória e secretam as citocinas
20 IL-10 e TGF- β (Bar-Or; Li, 2021; Liu *et al.*, 2022). A atividade exacerbada das células
21 T efectoras na EM poderia ser o resultado da função reduzida ou insuficiente das
22 células Treg (Danikowski; Jayaraman; Prabhakar, 2017). Estudos prévios relataram
23 que amostras de sangue periférico de pacientes com EM apresentaram uma redução
24 significativa do número e função das células Treg quando comparadas a indivíduos
25 saudáveis (Viglieta *et al.*, 2004; Haas *et al.*, 2005).

26 Embora a maior contribuição na patogênese da EM ser derivada das
27 células T, as células B têm sido fortemente envolvidas pela sua relação com a
28 atividade e, principalmente, com a progressão da doença. Acredita-se que essa
29 contribuição decorra de diferentes mecanismos, tais como apresentação de antígenos
30 às células T, secreção de citocinas pró-inflamatórias ou anti-inflamatórias, transporte
31 de antígenos de órgãos linfoides secundários e produção de autoanticorpos contra
32 diferentes componentes da mielina, do axônio e dos neurônios (Haase; Linker, 2021).
33 O aumento da produção de anticorpos no CNS, pode ser detectado, por exemplo, pela
34 elevada taxa da síntese de imunoglobulinas e a presença de bandas oligoclonais

1 restritas ao LCR (Filippi *et al.*, 2018). As células B de pacientes com EM manifestam
2 uma elevação anormal na produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-6,
3 fator estimulador das colônias de granulócitos e macrófagos, TNF- α e linfotóxina- α , e
4 são deficientes nas citocinas regulatórias, tais como a IL-10 (Filippi *et al.*, 2018; Haase;
5 Linker, 2021).

6 Após a diferenciação dos LT nos tecidos periféricos, ocorre a migração
7 destas células através da BHE para o SNC. Este processo de transmigração é
8 facilitado pela expressão e ativação de várias moléculas de adesão, quimiocinas e
9 metaloproteinases (Filippi *et al.*, 2018). Após entrar no SNC, as células T autorreativas
10 podem ser reativadas pelas células apresentadoras de antígenos, tais como a
11 micróglia, células dendríticas e LB. Esta reativação resulta no recrutamento e ativação
12 de células adicionais para o local de inflamação, secreção de várias citocinas,
13 quimiocinas, metaloproteinases e outros mediadores, bem como a ativação da
14 micróglia, contribuindo para a desmielinização e dano neuronal (Milo; Miller, 2014;
15 Filippi *et al.*, 2018). A **Figuras 5** mostra os principais mecanismos envolvidos na
16 patogênese da esclerose múltipla.

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

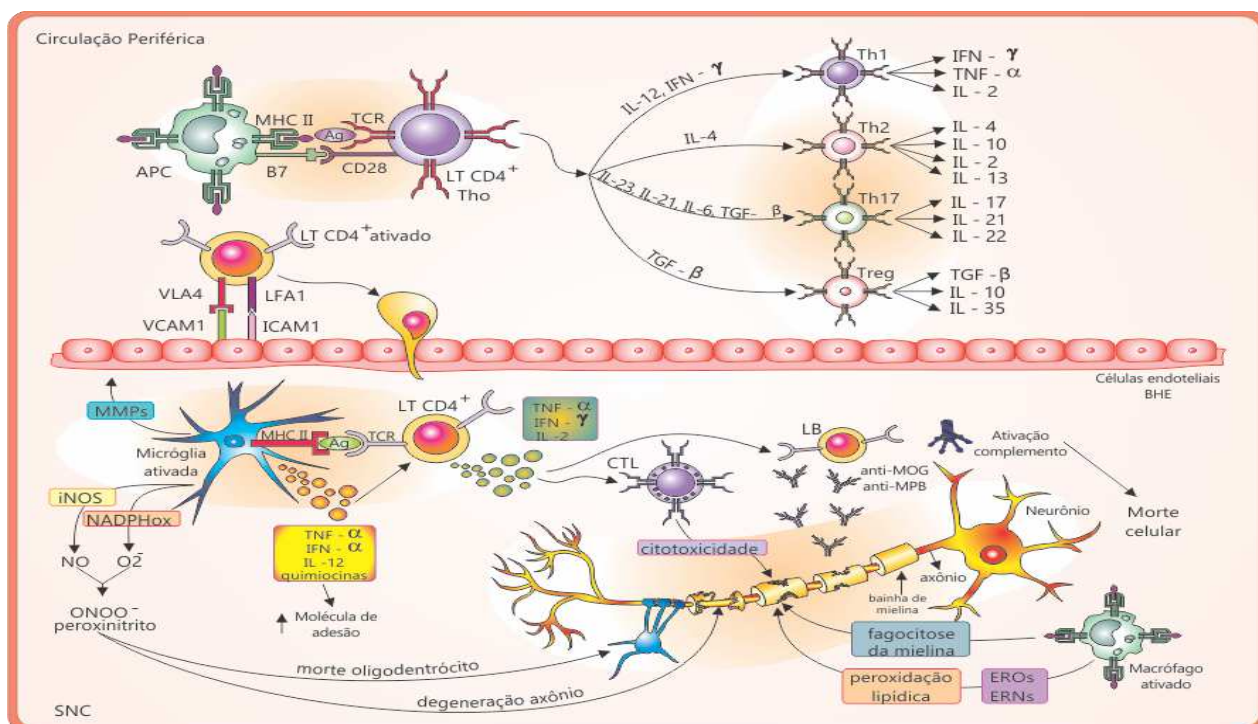
31

32

33

34

1 **Figura 5. Imunopatogênese da esclerose múltipla**



2

3 **Fonte:** Oliveira *et al.* (2014).

4 Macrófagos da circulação periférica apresentam antígenos que compartilham epítopos semelhantes
 5 aos da mielina aos linfócitos T CD4⁺ *naïves* (Th0) que, após ativados, podem se diferenciar em Th1,
 6 Th2, Th17 e linfócitos T reguladores (Treg). Os linfócitos T ativados ligam-se às células endoteliais por
 7 meio das moléculas de adesão (VLA liga-se na VCAM e LFA1 liga-se na ICAM-1), facilitando a entrada
 8 destas células no SNC através da BHE. No parênquima nervoso ocorre um novo contato do linfócito T
 9 CD4⁺ com a micróglia (macrófagos residentes no SNC). Nesta fase de reativação, a micróglia torna-se
 10 ativada e produz grande quantidade de mediadores pró-inflamatórios como TNF-α, IFN-α, IL-12,
 11 metaloproteínas de matriz (MMPs) e quimiocinas e aumenta a expressão das moléculas de adesão.
 12 Há, também, aumento da expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e da nicotinamida
 13 dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH) responsáveis pela produção de óxido nítrico (NO) e ânion
 14 superóxido (O₂⁻), respectivamente. Estas duas moléculas levam à formação de peroxinitrito que é um
 15 importante oxidante envolvido na lesão do axônio e oligodendrócitos na EM. Os linfócitos T CD4⁺
 16 ativados produzem citocinas como IL-12 e IFN-γ que estimulam os linfócitos B (LB) na produção de
 17 anticorpos, principalmente anticorpos contra a glicoproteína da mielina de oligodendrócitos (anti-MOG)
 18 e anticorpo contra a proteína básica da mielina (anti-MBP), com posterior ativação do sistema
 19 complemento, levando à morte celular. Estas citocinas também estimulam os linfócitos T citotóxicos
 20 (CTL) a produzirem citocinas que agem diretamente nas lesões desmielinizantes. Os macrófagos
 21 perivascularmente ativados produzem espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de
 22 nitrogênio (ERNs) que ao reagirem com os lipídios poli-insaturados da mielina provocam peroxidação
 23 lipídica e fagocitose da mielina.

24

25

26

27

28

29

30

31

32

Além dos mecanismos imunológicos, alterações metabólicas também podem estar envolvidas na patogênese da EM. Estudos têm mostrado que o aumento dos níveis plasmáticos de homocisteína (Hcy) é considerado um importante fator de risco para doenças neurodegenerativas e pode contribuir na patogênese ou progressão de várias destas doenças, incluindo a EM (Tawfik *et al.*, 2021).

1 1.4 Metabolismo da Homocisteína

2 A Hcy é um aminoácido sulfurado, não essencial, produto metabólico
3 intermediário da transformação da metionina (Met) em cisteína (Cys) (Lin; Meng;
4 Song, 2019), sendo este o único meio pelo qual a Hcy é produzida em humanos.
5 Normalmente, a Hcy é encontrada em diferentes formas no plasma: ligada a proteínas,
6 principalmente a albumina, formando pontes dissulfeto com essas proteínas (70 –
7 80%), associada com outras moléculas de Hcy para formar dissulfeto ou com outros
8 tióis (20 – 30%) e como tiol livre (~1%) (Koklesova *et al.*, 2021).

9 A conversão da Met em Hcy ocorre em um processo de 3 passos:
10 primeiramente a enzima metionina adenosiltransferase catalisa a transferência de um
11 grupo adenosina do ATP para Met resultando na formação de S-adenosilmetionina
12 (SAM). No segundo passo, a SAM, que é considerada um doador universal de grupo
13 metil, transfere este grupo para moléculas receptoras, como DNA, RNA, proteínas e
14 lipídios usando a enzima metiltransferase, resultando na formação de S-adenosil-
15 homocisteína (SAH). No passo final, a SAH é clivada pela enzima S-adenosil-
16 homocisteína hidrolase para produzir a Hcy. Como a metilação é essencial para
17 funções celulares em todos os órgãos, a Hcy é formada em todos os tecidos; além
18 disso, o potencial de metilação das células é definido pela proporção entre SAM e
19 SAH (Moretti *et al.*, 2021; Poddar, 2021).

20 Depois de formada, a Hcy pode seguir duas vias metabólicas: a
21 transulfuração e a remetilação. Na transulfuração, a Hcy é convertida em cisteína por
22 uma reação catalisada pelas enzimas cistationina beta-sintetase (CBS) e cistationina
23 gama-liase (CSE), tendo como cofator o fosfato de piridoxal (forma ativa da vitamina
24 B6) (Esse *et al.*, 2019; Zaric *et al.*, 2019). O processo da transulfuração é irreversível
25 e ocorre principalmente no fígado, rins, pâncreas e intestino delgado e é o único modo
26 que o organismo dispõe para reduzir ou eliminar quantidades excessivas de
27 aminoácidos tóxicos contendo enxofre, incluindo a Hcy (Zaric *et al.*, 2019). A Cys
28 formada a partir da Hcy por transulfuração é finalmente oxidada em sulfato e excretada
29 na urina (Kriebitzsch *et al.*, 2011).

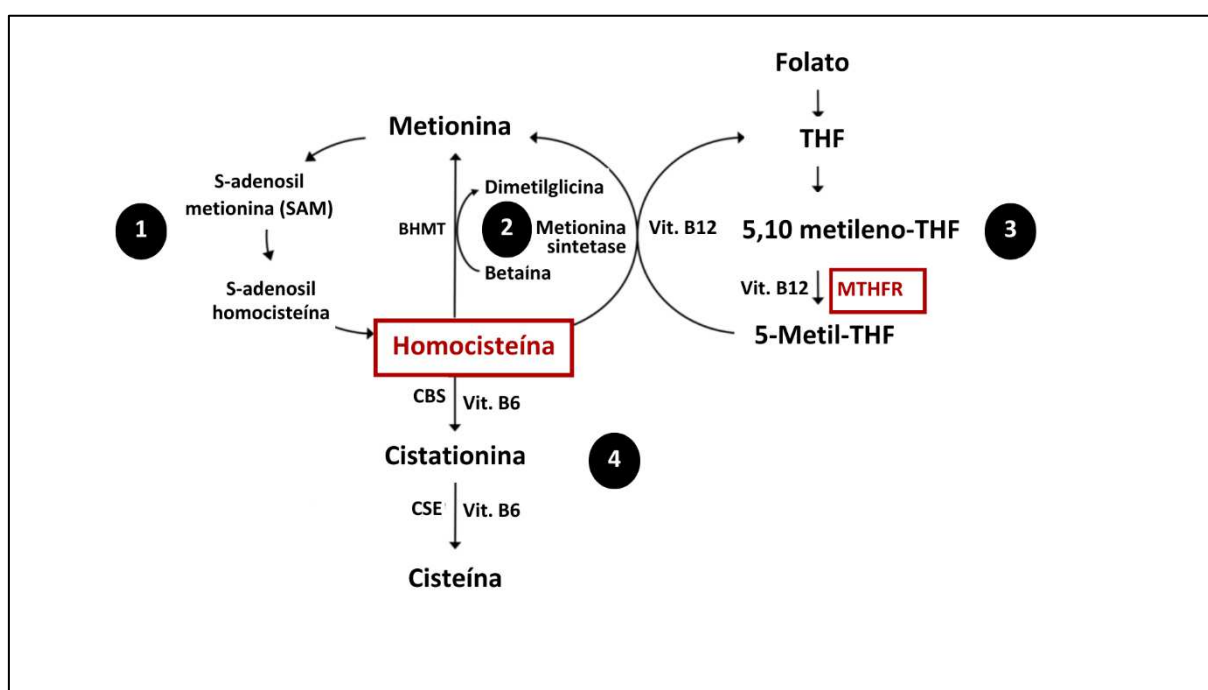
30 Em condições normais, aproximadamente 50% da Hcy é remetilada para
31 formar a Met. Este processo pode ocorrer por meio de duas vias distintas: a primeira
32 via utiliza a betaína como doador do grupo metil e é catalisada pela enzima betaína-
33 homocisteína metiltransferase, expressa primariamente no fígado e rim (Esse, 2019).
34 Na segunda via, conhecida como ciclo dos folatos, há dependência do substrato 5-

1 metiltetrahidrofolato (5-metilTHF), proveniente da metabolização do 5,10
 2 metilenotetrahidrofolato (5,10-metilenoTHF) pela enzima 5,10-metilenotetrahidrofolato
 3 redutase (MTHFR). O folato na forma de coenzima 5-metilTHF pode atuar como
 4 doador do grupo metil para a Hcy em uma reação catalisada pela enzima metionina
 5 sintase, e vitamina B12 como cofator (Škovierová *et al.*, 2016). A **Figura 6** ilustra,
 6 resumidamente, o metabolismo da Hcy.

7

8 **Figura 6 – Metabolismo da homocisteína**

9



10

11 **Fonte:** Adaptado de Yuan *et al.* (2021)

12 Principais vias do metabolismo da homocisteína: 1) a homocisteína é formada pela desmetilação da
 13 metionina, via formação de dois compostos intermediários, S-adenosilmetionina (SAM) e S-adenosil-
 14 homocisteína (SAH); 2) depois de formada, a homocisteína pode ser remetida à metionina por meio
 15 de 2 vias: a primeira via utiliza a betaína como doador do grupo metil e é catalizada pela enzima betaína-
 16 homocisteína metiltransferase (BHMT); 3) na segunda via, o doador do grupo metil é o 5-
 17 metilenotetrahidrofolato (5-MTHF), forma principal do folato no plasma, produzido a partir da redução
 18 do 5,10-metilenotetrahidrofolato pela enzima 5,10-metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR). A
 19 transferência do grupo metil para a homocisteína é feita mediante ação da enzima metionina-sintetase
 20 (MS), que tem como cofator a vitamina B12; 4) A via da transulfuração tende a ocorrer pela ativação
 21 de enzimas dependentes da vitamina B6, como a cistationina β-sintase (CBS) e cistationina-gama-liase
 22 (CSE), e da regulação negativa da via de remetilação nas situações de excesso de metionina.

23

24

25 A capacidade intrínseca para diferenciar entre as vias da transulfuração e
 26 remetilação da Hcy e promover a adaptação frente a diferentes níveis de ingestão de
 27 Met na dieta é coordenada pela SAM, a qual pode atuar como inibidor alostérico para

1 MTHFR ou como um ativador da CBS. Na ocorrência de baixa ingestão de Met, há
2 elevada produção de MTHFR, favorecendo a remetilação devido à baixa concentração
3 de SAM; todavia, na presença suficiente de Met, a Hcy produz Cys pela ação da
4 enzima CBS (Koklesova, *et al.*, 2021; Moretti, 2021).

5 Em indivíduos saudáveis, os níveis plasmáticos de Hcy mantêm-se abaixo
6 de 15 $\mu\text{mol/L}$, com variações de acordo com idade e sexo. A definição de
7 hiperhomocisteinemia (HHcy) é controversa, mas pode ser definida como níveis
8 plasmáticos em jejum acima de 15 $\mu\text{mol/L}$, e pode ser classificada como leve (16-30
9 $\mu\text{mol/L}$), moderada (31-100 $\mu\text{mol/L}$) e grave (>100 $\mu\text{mol/L}$) (Koklesova *et al.*, 2021).

10 De forma geral, as principais causas da HHcy podem ser atribuídas a
11 fatores genéticos e ambientais. Os fatores genéticos estão relacionados a variações
12 nos genes que codificam as enzimas envolvidas no metabolismo da Hcy, tais como a
13 metionina sintase, MTHFR e CBS (Skoverová *et al.*, 2016). A HHcy grave é
14 encontrada na homocistinúria clássica, que é uma doença genética rara causada pela
15 deficiência da enzima CBS, enquanto a HHcy leve tem sido relacionada à variante do
16 gene *MTHFR* (Wyse *et al.*, 2021).

17 Entre os fatores ambientais responsáveis pela presença de HHcy estão as
18 deficiências de folato, vitamina B12 e de vitamina B6. Estudos prévios mostraram que
19 em cerca de dois terços das pessoas diagnosticadas com HHcy, algumas
20 consequências ocorrem devido a níveis reduzidos de uma ou mais vitaminas e seus
21 cofatores no sangue (Koklesova *et al.*, 2021; Zaric *et al.*, 2019). Além do mais, o
22 consumo excessivo e crônico de álcool, café, tabaco, a inatividade física,
23 envelhecimento, algumas doenças como hipotireoidismo e falência renal crônica, bem
24 como vários medicamentos, tais como metformina e metotrexato, podem contribuir
25 para a elevação dos níveis de Hcy (Bonetti *et al.*, 2016; Wyse *et al.*, 2021).

26 Estudos prévios têm demonstrado uma forte correlação entre níveis
27 elevados de Hcy com várias doenças, tais como doenças vasculares, doença renal
28 crônica, osteoporose, doença gastrointestinal, câncer e desenvolvimento de
29 malformações congênitas (Škovierová *et al.*, 2016). Além disso, estudos clínicos
30 sugerem que o nível elevado de Hcy é um fator de risco independente para doenças
31 neurológicas, como doença de Parkinson, demência, doença de Alzheimer e EM
32 (Koklesova *et al.*, 2021).

33 O cérebro é um órgão particularmente sensível aos efeitos da Hcy; uma vez
34 que sua neurotoxicidade é favorecida pela ausência de duas importantes vias

1 metabólicas de eliminação: a conversão da Hcy para Met mediada pela betaína e a
2 transsulfuração da Hcy para Cys (Škovierová *et al.*, 2016). Estudos mostraram que
3 pacientes com EM apresentaram aumento significativo nos níveis de Hcy quando
4 comparados a indivíduos saudáveis (Ramsaransing *et al.*, 2006; Salemi *et al.*, 2010;
5 Moghaddasi *et al.*, 2013). Nesse contexto, várias hipóteses têm sido propostas para
6 demonstrar os efeitos neurotóxicos da Hcy e sua participação na patogênese da EM.

7

8 **1.5 Mecanismos de Toxicidade da Homocisteína e sua Associação com EM**

9

10 Níveis aumentados de Hcy podem ter efeitos prejudiciais nos neurônios e vasos
11 sanguíneos, incluindo estresse oxidativo, disfunção mitocondrial, acúmulo de cálcio
12 citosólico, ativação de vias apoptóticas e excitotóxicas, indução de neuroinflamação e
13 disfunção endotelial. Hcy induz a geração de estresse oxidativo via aumento na
14 produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), que podem atuar sobre lipídios,
15 proteínas e sobre o DNA ou, por redução na produção de defesas antioxidantes
16 (Lehotský *et al.*, 2016). Estudos têm demonstrado que a auto-oxidação da Hcy
17 promove a geração de EROs, como o radical superóxido (O_2^-) e peróxido de
18 hidrogênio (H_2O_2) que, posteriormente, é convertido a radical hidroxila (OH^-) (Esse *et al.*,
19 2019). Estudos prévios também mostraram que o aumento do estresse oxidativo
20 contribui para o desenvolvimento da disfunção endotelial (Au-Yeung *et al.*, 2004; Topal
21 *et al.*, 2004; Hoffman, 2011).

22 O endotélio possui diversas funções essenciais, tais como o ajuste do tônus
23 vascular, permeabilidade, coagulação, inflamação e crescimento celular (Su, 2015;
24 Sena; Pereira; Seíça, 2013). A disfunção endotelial resulta do rompimento na
25 integridade celular, ocasionando dilatação deficiente do endotélio principalmente
26 devido à redução na biodisponibilidade do óxido nítrico (NO) (Vallance; Chan, 2001).
27 Evidências mostram que o estresse oxidativo pode induzir a inativação oxidativa do
28 NO, um potente vasodilatador, e a desativação da NO sintase endotelial (eNOS)
29 diminuindo a biodisponibilidade de NO e estimulando a expressão das moléculas de
30 adesão, tais como molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1), molécula de adesão
31 vascular-1 (VCAM-1), proteína de quimioatração de monócitos (MCP-1) e E-selectina.
32 Por outro lado, o aumento do estresse oxidativo também pode ativar a
33 metaloproteinase-9 e o fator de transcrição nuclear *kappa* B (NF- κ B) (Sun, 2010).

1 Em condições normais, o NF-kB está presente no citosol na forma inativa;
2 todavia, na presença de alguns estímulos, tais como a presença de EROs, ocorre sua
3 ativação e deslocamento para o núcleo para ativar a cascata inflamatória, estimulando
4 a produção de moléculas de adesão, quimiocinas e citocinas, tais como TNF- α , IL-1 e
5 IFN- γ nas células endoteliais e contribuindo para o recrutamento de leucócitos e
6 inflamação (Pushpakumar; Kundu; Sem, 2014; Su, 2015; Esse *et al.*, 2019).

7 O papel da disfunção endotelial na patogênese da EM tem sido ativamente
8 estudado, uma vez que a ruptura da BHE e a migração transendotelial de leucócitos
9 ativados é um dos primeiros e mais importantes mecanismos na patogênese da
10 doença (Dubchenko *et al.*, 2020). A Hcy pode exercer um efeito modulatório sobre a
11 função celular do sistema imune adaptativo, induzindo a proliferação e diferenciação
12 das células Th1 e Th17, bem como a produção de suas respectivas citocinas IFN- γ e
13 IL-17 (Feng *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2017; Gao; Li; Chen, 2018). Estas células
14 exercem uma função crucial na patogênese da EM uma vez que podem contribuir no
15 processo inflamatório e ruptura da BHE pela ação da IL-17 (Kebir *et al.*, 2007; Melnikov
16 *et al.*, 2019).

17 A Hcy também pode exercer o efeito neurotóxico pelo mecanismo da
18 excitotoxicidade, atuando como agonista dos receptores de glutamato, o N-metil-D-
19 aspartato (NMDA), e o alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico (AMPA).
20 Com a estimulação excessiva destes receptores, há um aumento na concentração
21 intracelular de cálcio, bem como na produção de EROs, e ativação das caspases com
22 consequente dano e apoptose neuronal (Škovierová *et al.*, 2016). Estudos apoiam a
23 hipótese de que o efeito excitotóxico da Hcy pode ser um dos fatores que contribuem
24 para a neurodegeneração cerebral, o qual desempenha um papel decisivo na
25 progressão da EM (Ansari *et al.*, 2014; Russo *et al.*, 2008; Fahmy *et al.*, 2018). Os
26 dados sobre a associação da HHcy com a progressão da EM vieram de um estudo
27 realizado por Teunissen e colaboradores (2008), os quais demonstraram a correlação
28 entre a concentração de Hcy e a progressão clínica da doença com a observação
29 prospectiva dos pacientes. Além disso, de acordo com estudo prévio publicado pelo
30 nosso grupo, pacientes com maiores níveis plasmáticos de Hcy mostraram
31 progressão mais rápida da doença, avaliada pelo MSSS e maior incapacidade de
32 acordo com o EDSS (Oliveira *et al.*, 2018).

33 Outro possível aspecto da participação da Hcy na patogênese da EM é a
34 hipometilação da proteína básica da mielina, a qual se desenvolve devido a redução

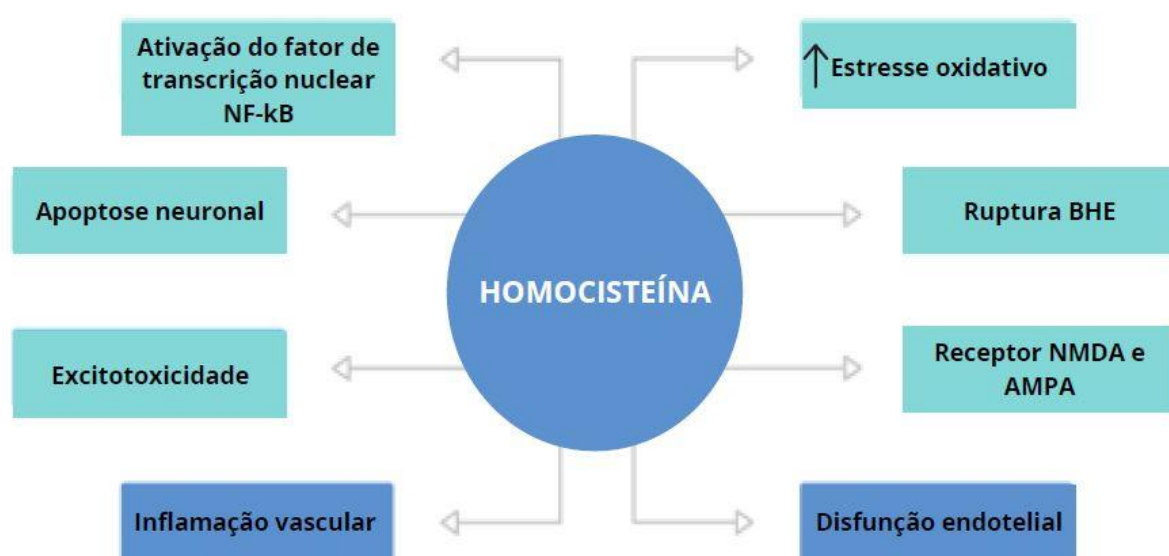
1 da disponibilidade da SAM, um importante doador de grupo metil, em função de níveis
 2 elevados da Hcy. A hipometilação da proteína básica da mielina torna a mielina menos
 3 hidrofóbica, mais instável e suscetível a dano oxidativo e inflamatório favorecendo a
 4 degeneração da bainha de mielina (Zoccolella *et al.*, 2012; Dardiotis *et al.*, 2017;
 5 Hayes; Ntambi, 2020). A **Figura 7** apresenta os principais mecanismos de toxicidade
 6 da Hcy.

7

8

9

Figura 7 – Mecanismos de toxicidade da homocisteína



10

11 **Fonte:** O próprio autor.

12 A homocisteína exerce o papel de toxicidade pelo aumento do estresse oxidativo, com ativação do fator
 13 de transcrição nuclear *kappa* B (NF-kB), inflamação vascular e disfunção endotelial, com ruptura da
 14 barreira hematoencefálica (BHE). Além disto, a homocisteína pode exercer o efeito neurotóxico pelo
 15 mecanismo da excitotoxicidade, atuando como agonista dos receptores de glutamato, o N-metil-D-
 16 aspartato (NMDA) e o alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico (AMPA), contribuindo para
 17 dano e apoptose neuronal.

18

19

20 **1.5.1 Variante Genética 677C>T do *MTHFR*, hiperhomocisteinemia e EM**

21

22

23

24

25

26

27

28

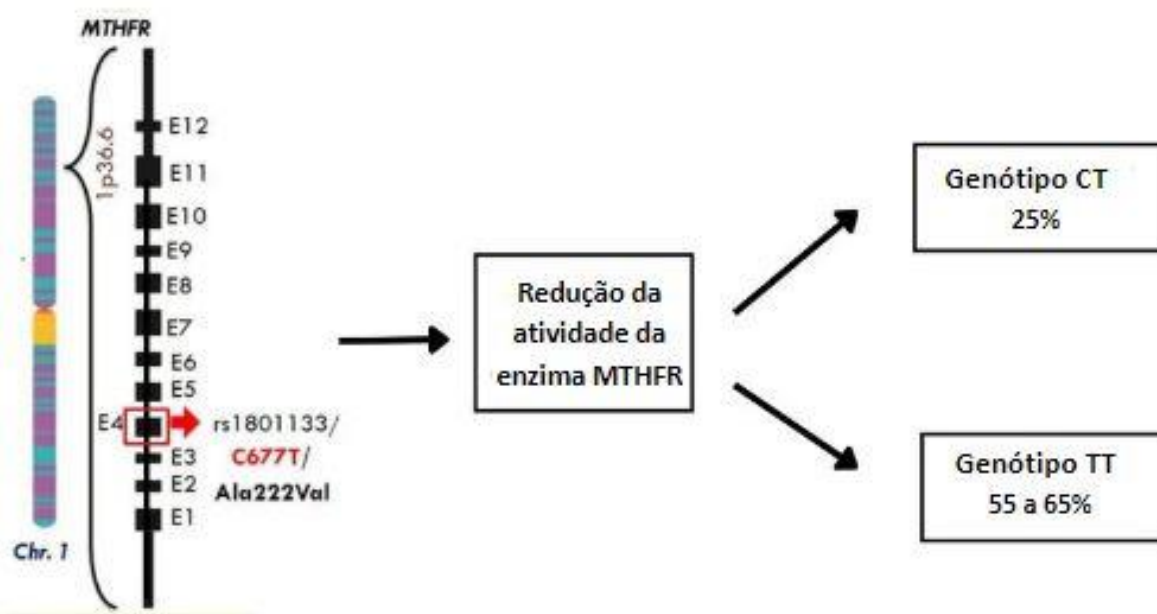
Como visto anteriormente, a MTHFR é uma enzima essencial no metabolismo da Hcy, uma vez que está envolvida na via da transmetilação com a conversão da Hcy para Met. A concentração plasmática da Hcy é influenciada por uma complexa interação entre fatores ambientais e genéticos, tais como as variações nos genes que codificam as enzimas envolvidas no metabolismo da Hcy, de forma especial a MTHFR (Lentz; Haynes, 2004; Liew; Gupta, 2015). O gene humano que codifica esta enzima

1 está localizado no braço curto do cromossomo 1 (1p36.3) e contém 12 éxons, os quais
2 codificam proteínas diméricas com subunidades de 70 a 77 kilodalton (Goyette *et al.*,
3 1994; Frosst *et al.*, 1995; Liew; Gupta, 2015).

4 Em humanos, mais de 20 variantes têm sido relatadas no gene *MTHFR*; no
5 entanto, as variantes 677C>T (rs1801133) e 1298A>C (1801131) são as mais comuns
6 e estudadas e que afetam a atividade da enzima MTHFR (Kang *et al.*, 1988;
7 Škovierová *et al.*, 2016). Na variante 677C>T, há uma substituição pontual da citosina
8 (C) pela timina (T) localizada no nucleotídeo 677, no éxon 4, resultando na troca do
9 aminoácido alanina pela valina na posição 222 da enzima MTHFR (Frosst *et al.*, 1995).
10 Esta substituição única do aminoácido resulta na deficiência da ligação do
11 dinucleotídeo flavina/adenina, na perda do folato e na redução da atividade da enzima
12 MTHFR (Muntjewerff *et al.*, 2006). Em indivíduos heterozigotos (genótipo CT), a
13 atividade da enzima MTHFR é reduzida em 25%, enquanto nos homozigotos para o
14 alelo variante (genótipo TT), a redução é de 55 a 65% (Bagley; Selhub, 1998; Ueland
15 *et al.*, 2001; Cong *et al.*, 2009) (**Figura 8**).

16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34

1 **Figura 8** – Localização e efeito da variante genética 677C>T do *MTHFR*



2

3 **Fonte:** O próprio autor

4 O gene *MTHFR* está localizado no cromossomo 1p36.6 e apresenta 12 éxons. No éxon 4, ocorre a
 5 variante rs1801133, onde a Citosina é substituída pela Timina no nucleotídeo 677, o que resulta na
 6 substituição do aminoácido alanina pela valina na posição 222 da proteína. Esta variante genética reduz
 7 a atividade da enzima MTHFR, em 25% nos indivíduos com o genótipo em heterozigose CT e de 55-
 8 65% nos indivíduos com o genótipo em homozigose para o alelo variante (TT). MTHFR: metil
 9 tetrahidrofolato redutase; C: citosina; T: timina; Ala: alanina; Val: valina; Chr: cromossomo.

10

11

12 A redução da atividade enzimática da MTHFR para catalisar a conversão do
 13 5,10-metilenoTHF para 5-metilTHF resulta na elevação dos níveis plasmáticos de Hcy.
 14 Enquanto os indivíduos homozigotos para o alelo variante apresentam aumento
 15 significativo dos níveis de Hcy, os indivíduos heterozigotos apresentam elevação
 16 moderada (Liew; Gupta, 2015). De fato, estudos confirmaram estes resultados,
 17 particularmente quando os níveis de ácido fólico estão diminuídos (Frederiksen *et al.*,
 18 2004; Lima *et al.*, 2007; Liew *et al.*, 2015).

19 A frequência da variante 677C>T do gene *MTHFR* apresenta grande
 20 variabilidade na distribuição mundial. Em um estudo de meta-análise, os resultados
 21 mostraram que a frequência global do alelo T e do genótipo TT foram de 24,0% e 7,7%
 22 respectivamente. Além disso, o estudo demonstrou que a menor frequência para o
 23 alelo T foi encontrada na África; no entanto, a população Caucasiana apresentou a
 24 maior frequência para o alelo T e o genótipo TT (Yadav *et al.*, 2017).

25 A variante 677 C>T do gene *MTHFR* tem sido considerada um fator de risco
 26 para várias doenças, tais como defeitos do tubo neural (Godbole *et al.*, 2011), diabetes

1 mellitus tipo 1 (Benes *et al.*, 2007), doença cardiovascular (Frosst *et al.*, 1995; Lakshmi
2 *et al.*, 2010), espondilite anquilosante (Lu *et al.*, 2022), psoríase (Kilic *et al.*, 2017) e
3 câncer (Kotsopoulos *et al.*, 2008). Além disso, estudos têm mostrado que esta variante
4 pode estar associada com várias condições neurológicas como doença de Alzheimer
5 (Rai, 2016a), autismo (Rai, 2016b), esquizofrenia (Yadav *et al.*, 2016), doença de
6 Parkinson (Liu *et al.*, 2018), acidente vascular cerebral (Jiang *et al.*, 2017) e EM
7 (Cakina *et al.*, 2019).

8 Vários estudos têm avaliado a possível associação entre a variante 677C>T e
9 a EM nas diferentes populações mundiais; porém, os resultados são discordantes.
10 Enquanto quatro estudos caso-controle encontraram associação do alelo T com a EM
11 (Alatab *et al.*, 2011; Cevik *et al.*, 2014; Naglhibalhassaini *et al.*, 2015; Cakina *et al.*,
12 2019), outros três estudos não confirmaram esta associação (Fekih-Mrissa *et al.*,
13 2013b; Klots *et al.*, 2010; Tajouri *et al.*, 2006).

14 Cevik e colaboradores (2014) avaliaram a associação entre a variante *MTHFR*
15 677 C>T e a EM em 130 pacientes Turcos e concluíram que houve uma significativa
16 associação quando os pacientes foram comparados com os controles de acordo com
17 os genótipos CC x CT + TT [*odds ratio* (OR): 2,35 com intervalo de confiança (IC) de
18 95%: 1,45-3,82, p=0,0005]. Estes resultados mostraram que nesta população, o alelo
19 T da variante mostrou associação com a EM. Posteriormente, Naglhibalhassaini e
20 colaboradores (2015) publicaram um estudo caso-controle na população Iraniana em
21 que avaliaram 180 pacientes com EM. Comparado com controles, estes autores
22 observaram uma significativa associação entre a variante 677C>T do *MTHFR* e o risco
23 de desenvolver EM. Indivíduos portadores do alelo T (genótipos CT e TT)
24 apresentaram maior suscetibilidade a EM quando comparados aos portadores do
25 genótipo CC (OR para CT = 2,9, IC de 95% = 1,88-4,49; OR para TT = 6,23, IC de
26 95% = 3,08-12,59).

27 Em 2019, Cakina e colaboradores realizaram um estudo caso-controle na
28 população Turca envolvendo 80 pacientes com EM e mostraram uma associação
29 positiva da variante 677C>T do *MTHFR* com a doença. Os resultados demonstraram
30 que a frequência do genótipo homozigoto TT foi significativamente maior em pacientes
31 do que nos controles; porém, os autores não avaliaram a associação dos níveis de
32 Hcy e folato com a variação genética (Cakina *et al.*, 2019).

33 Em uma meta-análise, Lu e colaboradores (2022) avaliaram nove estudos,
34 envolvendo 1227 casos de EM e 1426 controles, que investigaram a associação entre

1 a variante 677C>T do gene *MTHFR* e a EM. Os resultados mostraram uma
2 significância estatística limítrofe entre esta variante genética e a presença de EM no
3 modelo genético recessivo (OR = 1,57, IC de 95%= 1,03-2,38), demonstrando que a
4 variante estudada poderia ser um fator de risco para EM.

5 Por outro lado, alguns estudos não encontraram associação entre a variante
6 *MTHFR* 677C>T e a EM. Tajouri e colaboradores (2006) avaliaram esta variante em
7 pacientes com EM e controles na população Australiana, pareados por sexo, idade e
8 etnia, e mostraram que a frequência do genótipo em homozigose para o alelo variante
9 (TT) foi ligeiramente maior no grupo com EM em comparação aos controles (16%
10 *versus* 11%); porém, essa associação não atingiu significado estatístico (p=0,15) e
11 com este resultado não foi possível estabelecer a associação desta variante genética
12 na suscetibilidade à EM na população Australiana.

13 De igual forma, não foi encontrada associação entre a variante 677C>T e
14 pacientes com a forma clínica EMRR e controles na população da Alemanha (Klotz *et*
15 *al.*, 2010) e da Tunísia (Fekih-Mrissa *et al.*, 2013b). Alatab e colaboradores (2010)
16 avaliaram a associação entre a variante 677C>T do *MTHFR* e pacientes Iranianos
17 com EM e encontraram que o alelo T foi 1,7 vezes mais presente no grupo de
18 pacientes. Além disso, os autores mostraram que indivíduos com o alelo T
19 desenvolveram a doença quase quatro anos antes quando comparados aos
20 indivíduos portadores do alelo C. Diante destes resultados, os autores concluíram que
21 ter o alelo T da variante 677C>T poderia representar uma vulnerabilidade para uma
22 idade mais precoce de início da EM. No entanto, a distribuição genotípica não foi
23 significativamente diferente entre os grupos de pacientes e de controles.

24 Em uma meta-análise, Lee e colaboradores (2015) avaliaram a possível
25 associação entre a variante 677C>T do *MTHFR* e a suscetibilidade a EM. Os autores
26 incluíram seis estudos, envolvendo 830 pacientes com EM de diferentes etnias como,
27 Turca (Cevik *et al.* 2014), Árabe (Fekih-Mrissa *et al.*, 2013b; Alatab *et al.*, 2011) e
28 Caucasiana (Klotz *et al.*, 2010; Tajouri *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 1997). Considerando
29 todos os pacientes, os resultados mostraram que não houve associação entre o alelo
30 T e a EM (OR=1,014, IC de 95%= 0,803-1,280, p=0909). Tomados juntos, estes
31 resultados conflitantes apontam para a necessidade de estudos adicionais que
32 envolvam indivíduos de outras populações mundiais.

33

34

2 JUSTIFICATIVA

Os dados na literatura sobre a associação entre a variante 677C>T do gene *MTHFR* com os níveis de Hcy e folato e o desenvolvimento da EM realizados em populações mundiais com diferentes características geográficas, climáticas e étnicas são contraditórios. Além disso, ao nosso conhecimento, não há estudos que avaliaram o envolvimento desta variante com a EM na população brasileira. Tendo em vista que a EM é uma doença complexa e clinicamente heterogênea, propor modelos preditores que incluam marcadores genéticos, clínicos e laboratoriais podem auxiliar a prever prognóstico e progressão da doença. Desta forma, os dados obtidos neste estudo poderão contribuir para o melhor entendimento da fisiopatologia da EM, bem como os mecanismos envolvidos na suscetibilidade, incapacidade por agravamento e progressão da doença.

1 **3 OBJETIVOS**

2

3 **3.1 Objetivo Geral**

4

5 Avaliar o envolvimento da variante 677C>T (rs1801133) do gene *MTHFR* com
6 a suscetibilidade à EM, incapacidade por agravamento e progressão da doença.

7

8

9 **3.2 Objetivos Específicos**

10

11 • Realizar uma revisão da literatura para discutir a possível associação entre os
12 níveis de Hcy, vitamina B12, folato e a variante genética 677C>T do *MTHFR* com
13 a suscetibilidade da EM;

14 • Avaliar a frequência alélica e genotípica da variante 677C>T do gene *MTHFR*
15 em pacientes com EM e grupo controle;

16 • Comparar os níveis plasmáticos da Hcy e folato em pacientes com EM e grupo
17 controle;

18 • Avaliar os níveis dos biomarcadores inflamatórios e perfis de citocinas entre
19 pacientes com EM e grupo controle;

20 • Avaliar a associação entre a variante genética 677 C>T do *MTHFR* com os
21 valores de Hcy, folato, incapacidade por agravamento e progressão da doença;

22 • Propor um modelo preditor para o diagnóstico da EM, avaliação da
23 incapacidade por agravamento e progressão da doença.

24

25

26

27

28

29

30

31

1 4 MATERIAIS E MÉTODOS

2

3 4.1 Aspectos Éticos

4 O protocolo de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa
5 Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, com o Parecer
6 de Aprovação no. 159/10, CAAE no. 22290913.9.0000.5231, em 30 de agosto de 2010
7 (ANEXO A). Todos os indivíduos foram convidados a participarem voluntariamente da
8 pesquisa, informados, em detalhes, sobre o estudo a ser desenvolvido e assinaram o
9 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE A).

10

11 4.2 Delineamento

12 Inicialmente, realizou-se um estudo de revisão de literatura (revisão de escopo)
13 com busca de artigos de revisão sistemática, originais (caso-controle, longitudinais,
14 coorte) e de meta-análise na base de dados bibliográficos de acesso público
15 *PubMed/US National Library of Medicine/National Institutes of Health/USA*, em idioma
16 Inglês e Português, no período de 1990 a 2023. Na busca foram utilizados os
17 seguintes descritores do *Medical Subject Headings (MeSH)*: *homocysteine and*
18 *multiple sclerosis OR folate and multiple sclerosis OR vitamin B12 and multiple*
19 *sclerosis; MTHFR 677 C>T and multiple sclerosis*. Simultaneamente, realizou-se um
20 estudo caso-controle para contemplar os objetivos propostos nesta tese.

21

22 4.3 Amostra

23 Os pacientes com EM foram convidados a participarem do estudo ao se
24 apresentarem para consulta no Ambulatório de Doenças Desmielinizantes do
25 Ambulatório de Especialidades do Hospital Universitário de Londrina (HU/UEL), no
26 período de janeiro de 2013 a dezembro de 2015. A amostra foi obtida por conveniência
27 de tempo e local. Foram avaliados 163 pacientes com EM de ambos os sexos, dos
28 quais 141 pacientes não faziam suplementação com folato, com idade entre 18 a 70
29 anos, diagnosticados segundo os critérios de McDonald (Polman *et al.*, 2011).
30 estavam em fase de remissão clínica da EM, em um período de recuperação sem
31 episódios de surtos nos três meses anteriores à admissão no estudo. O grupo controle
32 foi composto de 226 indivíduos saudáveis, adultos, ambos os sexos, selecionados,
33 consecutivamente, entre os doadores de sangue fidelizados do Hemocentro Regional
34 de Londrina. Os indivíduos avaliados deste grupo não apresentavam características

1 clínicas ou laboratoriais de doenças autoimunes, renal, cardíaca, gastrointestinal,
2 hepática, inflamatória ou oncológica.

3 O grau de incapacidade por agravamento dos pacientes foi avaliado por meio
4 do EDSS, com escores que variaram de 0,0 a 10,0 (Kurtzke, 1983). De acordo com
5 os escores, os pacientes foram categorizados com incapacidade leve (EDSS < 3,0) e
6 moderada /grave (EDSS ≥ 3,0) (Kallaur *et al.*, 2017). Para avaliar a progressão da
7 incapacidade, utilizou-se a escala MSSS, de acordo com o método proposto por
8 Roxburgh *et al.* (2005), e escore ≥ 5,0 foi considerado progressão mais rápida de
9 incapacidade (Koch *et al.* 2015). Para calcular o MSSS de cada paciente, utilizou-se
10 o EDSS e o tempo de diagnóstico da doença; desta forma, observou-se a rapidez da
11 progressão da incapacidade (Roxburgh *et al.*, 2005). Foi proposto um índice único de
12 gravidade da EM extraído do diagnóstico de EM os escores EDSS e MSSS e foi
13 denominado como EM-EDSS-MSSS.

14 Todos os indivíduos envolvidos neste estudo relataram não fazerem uso de
15 bebidas alcoólicas regularmente e não praticavam exercício físico regularmente.

16

17 **4.4 Critérios de exclusão**

18 Foram excluídos do estudo os pacientes com diagnóstico de outras doenças
19 autoimunes, entre elas a neuromielite óptica e com doenças infecciosas. Pacientes
20 em uso de ácido fólico foram inseridos no estudo somente na análise estatística para
21 determinação da frequência da variante genética do *MTHFR* 677 C>T, sendo
22 excluídos para as demais análises estatísticas.

23

24 **4.5 Dados demográficos, epidemiológicos, antropométricos e clínicos**

25 Foram coletados dados demográficos (idade, sexo, etnia), epidemiológicos
26 (hábitos de vida como tabagismo), antropométricos (peso, altura e índice de massa
27 corporal) e clínicos (formas clínicas, EDSS e terapia para EM) dos indivíduos inseridos
28 no estudo. Os dados foram coletados pela aplicação de um questionário padrão
29 (APÊNDICE B), respondidos pelos pacientes ou seus responsáveis e pelos indivíduos
30 do grupo controle. A etnia foi classificada de acordo com a autopercepção do indivíduo
31 da cor da sua pele como Caucasiano e não Caucasiano (IBGE, 2011). Os dados
32 foram, também, obtidos por meio de consulta aos prontuários médicos e à base de
33 dados LABHOS do Laboratório de Análises Clínicas do HU/UEL. As medidas
34 antropométricas avaliadas foram peso corporal (Kg) e altura (m), obtidas por

1 interrogatório durante a aplicação do questionário. O índice de massa corporal foi
2 calculado como peso (Kg) dividido pela altura (m) ao quadrado e expresso em kg/m².
3 Outros dados também foram obtidos, como circunferência abdominal (cm), tabagismo,
4 hipertensão arterial sistêmica, síndrome metabólica de acordo com os critérios
5 definidos na literatura (Grundy *et al.*, 2006) e diabetes mellitus tipo 2. A pressão arterial
6 sistólica e a pressão arterial diastólica foram medidas duas vezes e utilizada a média
7 das duas medidas na análise. O uso de medicamentos anti-hipertensivos foi um
8 indicativo de hipertensão arterial sistêmica (James *et al.*, 2014) e a diabetes mellitus
9 tipo 2 foi definida com uma glicemia de jejum ≥ 126 mg/dL e/ou uso de medicamento
10 hipoglicemiante (*American Diabetes Association*, 2014).

11

12 **4.6 Coleta de Material Biológico**

13 Para análise dos marcadores laboratoriais, a coleta de sangue periférico, com
14 anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético e sem anticoagulante, foi realizada
15 após um período de 12 horas de jejum. O material foi encaminhado imediatamente ao
16 laboratório para registro, processamento e armazenamento das amostras. O material
17 foi centrifugado a 2.500 r.p.m. por 10 minutos e alíquotas de *buffy-coat*, plasma e soro
18 foram armazenados no *freezer* a -80°C até o momento de uso. Todos os pacientes e
19 controles, bem como suas respectivas amostras, foram identificados por número e
20 letra para garantir o anonimato e confidencialidade dos indivíduos e dos resultados
21 obtidos.

22

23 **4.7 Análise da Variante 677C>T do Gene *MTHFR***

24 O DNA genômico foi extraído com o kit de extração de DNA (Biopur® Biometrix
25 Diagnóstica, Curitiba, Paraná) de acordo com instruções do fabricante, com algumas
26 modificações, como o volume de *buffy-coat* utilizado (200 μ L) e a temperatura do
27 tampão de eluição (70°C). O DNA extraído foi quantificado utilizando o equipamento
28 espectrofotômetro NanoDrop 2000c® (*ThermoScientific, Waltman, 15 MA, USA*) com
29 leitura em 260 nm e avaliada a pureza pela razão de leitura em 260/280 nm. A variante
30 677C>T do gene *MTHFR* (rs1801133) foi avaliada por reação em cadeia da
31 polimerase em tempo real com o uso de sondas TaqMan®. Foi utilizado um ensaio
32 validado (C_32060205_10, *Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA*) com
33 *primers* específicos e sondas fluorescentes para determinação dos genótipos
34 ([VIC/FAM] GGC AAA CAA TAA ATG TAATAG TAG G[C/T]A AAT TTG TGC TAT GTT

1 AGA GGT CTT). Os níveis de fluorescência dos produtos da reação em cadeia da
2 polimerase em tempo real foram avaliados pelo equipamento *StepOne (Applied*
3 *Biosystems, Foster City, CA, USA)*.

4 5 **4.8 Marcadores Inflamatórios e Bioquímicos**

6 Os valores plasmáticos de Hcy, 25(OH)D e folato foram determinados por
7 quimioluminescência em micropartículas, utilizando o equipamento Architect
8 (Architect i2000SR®, Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, USA). Os níveis séricos de
9 ácido úrico foram avaliados por um autoanalisador bioquímico (*Dimension Dade AR®;*
10 *Dade Behring, Deerfield, IL, USA*), utilizando métodos padronizados e reagentes
11 disponíveis comercialmente. Os níveis séricos da proteína C reativa (PCR) foram
12 quantificados por imunoturbidimetria de alta sensibilidade (*Architect C8000®,*
13 *Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, USA*). Os valores plasmáticos de adiponectina foram
14 mensurados por ensaio de imunoabsorção enzimática em sanduiche (*sandwich*
15 *enzyme-linked immunosorbent assay - ELISA*) usando um ensaio comercial (*Ready-*
16 *Set Go! Set®, San Diego, CA, USA*).

17 Os valores plasmáticos das interleucinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IFN- γ ,
18 TNF- α , receptores solúveis do TNF- α (sTNFR1) e sTNFR2 foram determinados por
19 reagentes customizados de imunofluorimetria utilizando multiplex (Novex Life
20 Technologies®, Frederick, MD, USA) para plataforma Luminex® (MAGPIX®, *Luminex*
21 *Corp, Austin, TX, USA*). Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as
22 instruções dos fabricantes.

23

24 **4.9 Análise Estatística**

25

26 As variáveis contínuas foram expressas em média \pm desvio padrão (DP). As
27 variáveis categóricas foram expressas em número absoluto (n) e porcentagem (%). A
28 análise de variância (ANOVA) foi utilizada para avaliar as diferenças nas variáveis
29 contínuas entre os grupos de estudo, e as análises de tabelas de contingência (teste
30 de χ^2 ou teste Exato de Fisher quando apropriado) para verificar as associações entre
31 as variáveis. Foi efetuada uma análise univariada de modelo linear geral (GLM) para
32 avaliar as diferenças nos biomarcadores entre os três subgrupos de estudo: HC e EM
33 com EDSS < 3,0 e EDSS \geq 3,0. As diferenças múltiplas entre pares foram avaliadas

1 com testes de diferença mínima significativa (LSD) protegidos. A análise de regressão
2 múltipla foi utilizada para prever variáveis dependentes. Os resultados das
3 comparações múltiplas foram corrigidos para a taxa de descoberta falsa (FDR)
4 (Benjamini *et al.*, 1995). Foi efetuada uma análise de regressão logística binária com
5 EM ou subgrupos de EM como variáveis dependentes e os biomarcadores como
6 variáveis de entrada. Foram calculados o OR com IC de 95% e a exatidão da
7 classificação (com sensibilidade e especificidade). Os valores de pseudo-R² de
8 Nagelkerke foram utilizados como medida do tamanho do efeito. Os resultados destas
9 análises de regressão foram objetos de *bootstrap* utilizando 5.000 amostras de
10 *bootstrap* e os últimos resultados são apresentados se os resultados não forem
11 concordantes.

12 A análise dos mínimos quadrados parciais (SmartPLS) (Ringle *et al.* 2015) foi
13 utilizada para medir as associações de mediação múltipla em várias etapas entre os
14 biomarcadores (variáveis de entrada) e o índice de gravidade da EM. Este último foi
15 introduzido como um vetor latente extraído das pontuações EDSS e MSSS e do
16 diagnóstico de EM. Todos os biomarcadores foram introduzidos como indicadores
17 únicos, exceto o IAI, que foi introduzido como um vetor latente extraído de diferentes
18 perfis de determinadas citocinas e receptores de citocinas da resposta imune. Ambos
19 os vetores latentes foram introduzidos como modelos reflexivos.

20 Todos os testes foram bicaudais e foi utilizado um valor de $p < 0,05$ para
21 determinar a significância estatística. As análises estatísticas foram efetuadas
22 utilizando o IBM SPSS Windows versão 25, 2017.

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

5 RESULTADOS

Os resultados obtidos neste trabalho foram apresentados e discutidos em dois artigos descritos a seguir.

O primeiro artigo (de revisão de escopo da literatura) tem o título “*Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) rs1801133 (677C>T) genetic variant, homocysteine, folate, and vitamin B12 levels in patients with multiple sclerosis: a scoping review*” e discute a possível associação entre os valores de Hcy, folato, vitamina B12 a variante genética *MTHFR 677C>T* com a EM.

O segundo artigo (original) tem o título “*The effects of the MTHFR 677C>T (rs1801133) genetic variant on susceptibility and disability in multiple sclerosis patients are mediated by homocysteine*”, foi submetido à revistas internacionais e recebeu o doi: 10.21203/rs.3.rs-947647/v3 na Plataforma *Research Square*. Sua última submissão foi na revista *Journal of Neuroimmunology*, com fator de impacto 3,3.

1 **Artigo 1. *Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 677C>T rs1801133***
2 **genetic variant, homocysteine, folate, and vitamin B12 levels in patients with**
3 **multiple sclerosis: a scoping review**

4
5 Claudia Mara Ribeiro¹, Sayonara Rangel Oliveira², Daniela Frizon Alfieri³, Andrea
6 Name Colado Simão^{1,2,3}, Edna Maria Vissoci Reiche^{1,4,5}

7
8 ¹Clinical and Laboratory Pathophysiology Postgraduate Program, Health Sciences
9 Center, State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil;

10 ²Department of Pathology, Clinical Analysis, and Toxicology, Health Sciences Center,
11 State University of Londrina, Paraná, Brazil;

12 ³Department of Pharmaceutical Sciences, Health Sciences Center, State University of
13 Londrina, Londrina, Paraná, Brazil;

14 ⁴Health Sciences Postgraduate Program, Health Sciences Center, State University of
15 Londrina, Londrina, Paraná, Brazil

16 ⁵Pontifical Catholic University of Paraná, School of Medicine, Londrina, Paraná, Brazil

17
18
19 Corresponding author: Edna Maria Vissoci Reiche, Postgraduate Program of Clinical and
20 Laboratory Pathophysiology, Health Sciences Center, State University of Londrina,
21 Londrina, Paraná, Brazil; Av. Robert Koch, 60, CEP 86.038-440, Londrina, Paraná, Brazil.

22 Phone/FAX number: +55-43-3371-2619. e-mail: reiche@sercomtel.com.br ORCID: 0000-
23 0001/6507-2839.

24
25
26
27
28
29
30
31
32
33

1 **Abstract**

2 Multiple sclerosis (MS) is a neurodegenerative disease characterized by inflammation,
3 demyelination, and diffuse axonal degeneration throughout the central nervous system
4 caused by an interaction between genetic, immunological, and environmental factors.
5 High levels of homocysteine (Hcy), as well as deficiency of vitamin B12, vitamin D and
6 folic acid are some of the environmental variables related with the pathogenesis of MS
7 and have been extensively studied in patients with the disease; however, the results
8 are conflicting. Moreover, the relevance of the *MTHFR* 677C>T variation in the
9 pathogenesis of MS has been investigated worldwide with conflicting results. In this
10 scenario, a scoping review was carried out to discuss the relationship between the
11 *MTHFR* 677C>T genetic variant, Hcy, vitamin B12, and folate levels and their
12 association with the susceptibility and pathophysiology of MS. In the scoping review,
13 the PubMed/US National Library of Medicine/USA databases were used to search for
14 original articles (cross-sectional, case-control), systematic reviews, and meta-analysis
15 published in Portuguese and English, in the period of 1990 to 2023. A total of 30 studies
16 were selected, including 24 case-controls, 4 meta-analyses, 1 retrospective and 1
17 longitudinal. Among them, 18 studies found higher Hcy levels in MS patients than
18 controls, 8 studies showed that the difference in Hcy levels was not significant, and
19 4 studies did not evaluate the Hcy levels. Regarding the folate levels, 16 studies
20 showed no difference between MS patients and controls, 3 studies showed lower
21 values, in 1 study showed higher values than controls, and 10 studies did not evaluate
22 the folate levels. Regarding vitamin B12 levels, 12 studies showed no significant
23 difference between MS patients and controls, 8 studies showed that MS patients had
24 lower levels than controls, and 10 studies did not evaluate vitamin B12 levels.
25 Regarding the *MTHFR* 677C>T variant, 11 studies evaluated the possible association
26 between this genetic variant and MS; among them, 5 studies demonstrated an
27 association and 6 presented discordant results. All these studies only evaluated the
28 possible association between the variant and susceptibility to MS, with contradictory
29 results, and none of them evaluated the Hcy and folate levels. Taken together, the
30 results of the present scoping review suggested that more studies should be carried
31 out in different populations to evaluate the possible association between the *MTHFR*
32 677C>T genetic variant and the susceptibility, disability worsening, and progression of
33 MS.

34

1 **Keywords:** MS, multiple sclerosis; Hcy, homocysteine; Methylenetetrahydrofolate
2 reductase; MTHFR

3

4

5 **1. Introduction**

6

7 Multiple sclerosis (MS) is a neurodegenerative disease characterized by
8 inflammation, demyelination, and diffuse axonal degeneration throughout the central
9 nervous system (CNS) (Noseworthy et al., 2000). The blood-brain barrier (BBB)
10 disruption and the recruitment of activated immune cells from the peripheral blood into
11 CNS are early events in the development of inflammatory MS lesions (Kuenz et al.,
12 2005).

13 Although the etiology of MS is not fully characterized, it has been recognized
14 that interactions between genetic, immunological, and environmental variables
15 contribute to the autoimmune inflammatory process (Karussis, 2014). MS development
16 cannot be predicted based on genotype alone because even the strongest major
17 histocompatibility complex (MHC) class II- linked risk genes are incompletely
18 penetrant. Therefore, modifiable environmental exposures may determine whether MS
19 develops in individuals who carry risk genes. Elevated levels of homocysteine (Hcy)
20 and deficiencies of cobalamin (vitamin B12), 25-hydroxyvitamin D [25(OH)D], and folic
21 acid (vitamin B9) are all significant environmental variables related with the
22 pathogenesis of MS (Dyment; Eber; Sadovnick, 2004; Ineichen et al., 2014; Miller et
23 al., 2005; Nylander; Hafler, 2012; Sumelahti et al., 2013; Zhu; He; Liu, 2011; Oliveira
24 et al., 2018).

25 Hcy is considered a pro-inflammatory biomarker whose plasma levels are
26 controlled by a variety of physiological and acquired factors and their interactions,
27 including age, sex, medications, and *MTHFR* genetic variations (Zeng et al., 2017;
28 Ghosh; Klare; Shetty, 2007; Nikfardiam et al., 2001). Deficiencies in folate and vitamin
29 B12 cause elevated serum Hcy (Homocysteine Lowering Trialists C, 2005) by inhibiting
30 its conversion to methionine, essential for DNA and RNA synthesis, thereby causing a
31 neurotoxin effect of activating aspartate receptor and cell death (Diaz-Arrastia, 2000;
32 Reynolds, 2006). Furthermore, modifications involving methylation could destabilize
33 myelin structures by triggering hypomethylation of myelin basic protein, a cardinal
34 component of myelin in the CNS (Kim et al., 2003).

1 Increased levels of Hcy may have harmful effects on neurons and blood vessels,
2 including oxidative stress, mitochondrial dysfunction, cytosolic calcium accumulation,
3 apoptotic and excitotoxic pathway activation, induction of neuroinflammation, and
4 endothelial dysfunction. High levels of Hcy may also sensitize neurons to oxidative
5 stress via oxidation of sulfhydryl groups subsequently resulting in generation of
6 reactive oxygen species (ROS), such as superoxide and hydrogen peroxide (Kruman
7 et al., 2000). Additionally, hyperhomocysteinemia (HHcy) has been significantly
8 associated and/or correlated with cognitive impairment, visual abnormalities, and
9 clinical progression in patients with MS (Russo et al., 2008; Teunissen et al., 2008). All
10 these mechanisms are considered relevant in the pathogenesis or progression of
11 cardio and cerebrovascular and neurodegenerative diseases, such as epilepsy
12 (Gorgone et al., 2009), dementia (Nishi et al., 2014), stroke (Holmes et al., 2011),
13 Parkinson's disease (Fan et al., 2020; Kocer et al., 2016), Alzheimer's disease
14 (Bhargava et al., 2018), and MS (Pan et al., 2019; Seshadri, 2006; Faraci; Lentz, 2004;
15 Ho et al., 2002; Petras et al., 2014; Zoccolella et al., 2012). Furthermore, there is strong
16 evidence that Hcy itself can induce BBB disruption (Kamath et al., 2006).

17 The levels of Hcy, folate, and vitamin B12 have been extensively studied in
18 patients with MS; however, the results are conflicting (Li et al., 2020). Moreover, the
19 relevance of the *MTHFR* 677C>T variation in the pathogenesis of MS has been
20 investigated in genetically distinct worldwide populations, with conflicting results (Lee
21 et al., 2015). Taking these inconsistent findings into consideration, we undertook a
22 scoping review to discuss the association between Hcy, folate, and vitamin B12 in MS,
23 as well as the association between the *MTHFR* 677C>T (rs1801133) genetic variant
24 with the susceptibility and pathophysiology of MS.

25

26 **2. Methods**

27

28 *2.1 Search Strategy, inclusion, and exclusion criteria*

29

30 A literature scoping review study was carried out with a search for original,
31 systematic review, case-control, and meta-analysis articles in the publicly accessible
32 bibliographic database PubMed/US National Library of Medicine/National Institutes of
33 Health/USA, in English and Portuguese, from 1990 to 2023. The following Medical
34 Subject Headings (MeSH) were used in the search: "homocysteine and multiple

1 sclerosis” OR “folate and multiple sclerosis” OR “vitamin B12 and multiple sclerosis”;
2 “*MTHFR* 677C>T and MS”. Additional articles were retrieved by checking references
3 that were cited in the selected articles. The exclusion criteria were as follows:
4 overlapping data and inability to ascertain the number of major and minor frequencies
5 of the genotypes.

6

7 *2.2 Data Extraction*

8 The authors (CMR and EMVR) reviewed and extracted simultaneously the data
9 using a predefined form in the Excel. The following information was extracted: the first
10 author's name, year of publication, country, design, sample size (cases and controls),
11 Hcy, folate and vitamin B12 results, as well as *MTHFR* 677 C>T genotyping results.
12 Interviewer disagreements were resolved by a third author (SRO). The raw data were
13 double checked by all the authors.

14

15 **3. Results**

16

17 *3.1 Eligible Studies*

18

19 The literature review identified 115 articles that appeared to be relevant to the
20 review of the Hcy, folate, and vitamin B12 in MS; moreover, 15 articles that appeared
21 to be relevant to the review of the association between the *MTHFR* 677 C>T in MS
22 susceptibility. Therefore, a total of 130 articles were selected for further analysis.
23 Among them, 88 were excluded after review of title and abstract due to different
24 reasons. The full texts of the remained 42 studies were read. Among them, one did not
25 have the available full text. Finally, 41 studies met the inclusion criteria and were
26 enrolled in the present scoping review, including 30 investigating Hcy, folate, and
27 vitamin B12 in MS, and 11 reporting the association between the *MTHFR* 677 C>T in
28 MS. The flowchart of the selected studies is in the Figure 1.

29

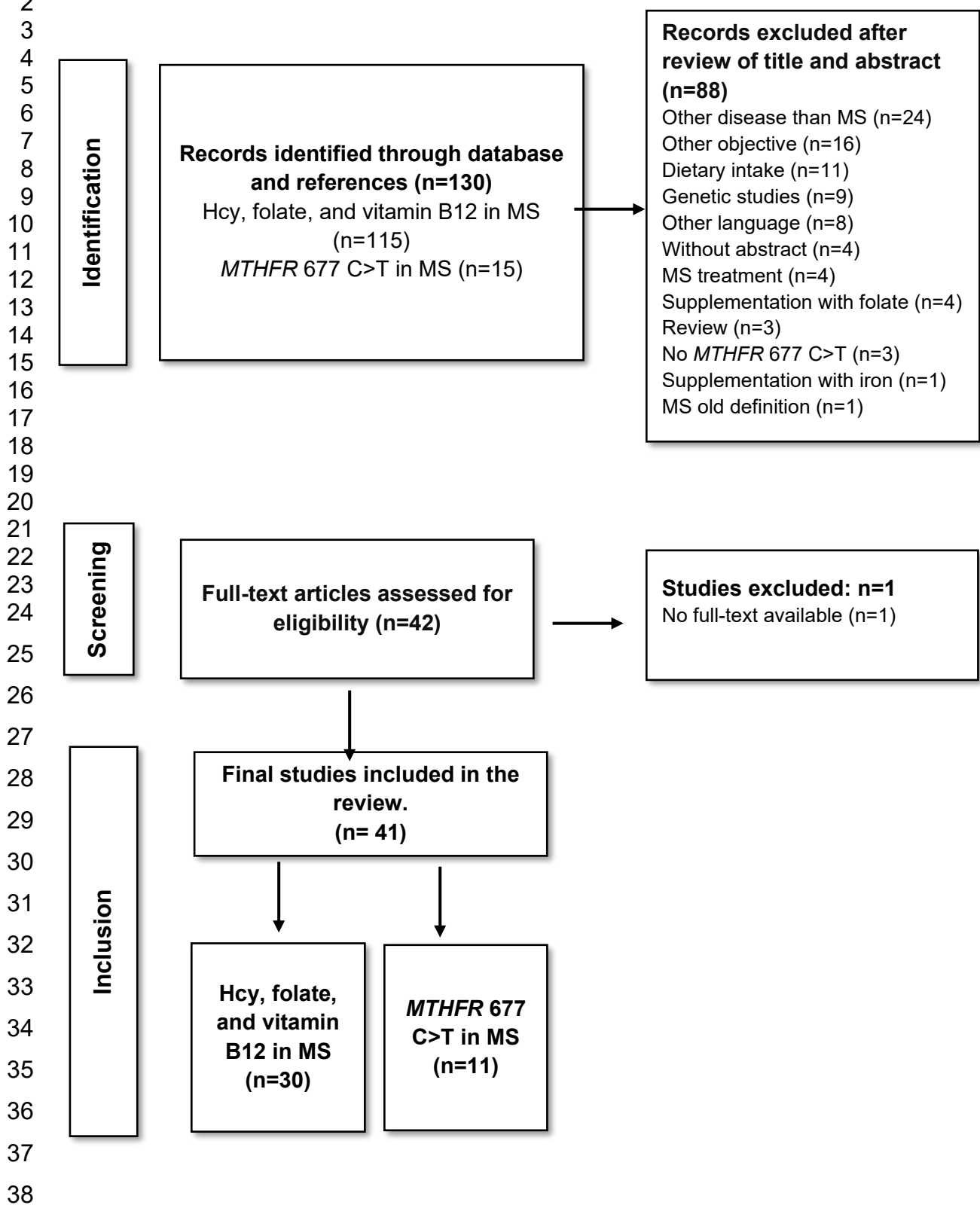
30

31

32

33

1 **Figure 1** Flowchart of the selection studies



39 Hcy: homocysteine; MS: multiple sclerosis; *MTHFR*: *Methylenetetrahydrofolate reductase* gene; C:
40 cytosine; T: thymine

1 The results of Hcy, folate and vitamin B12 investigated in patients with MS in
2 different worldwide population are summarized in Table 1.

3 Table 2 summarizes the reviewed studies that evaluated the *MTHFR* 677C>T
4 variant in patients with MS.

6 **4. Discussion**

8 The results of Hcy, folate, vitamin B12, as well as the role of the *MTHFR* 677C>T
9 variant in the pathophysiology of MS have been investigated in patients with MS in
10 different worldwide population and the results are very conflicting. The results of the
11 current scoping review are discussed in detail.

13 *4.1 Homocysteine metabolism*

15 Methionine is first converted to S-Adenosylmethionine (SAM) through the
16 catalytic action of methionine adenosyltransferase enzymes (MATs) and ATP. SAM
17 acts as major methyl donor in the cell, and after donating the methyl group, it is
18 converted to S-adenosyl homocysteine (SAH), which is hydrolyzed to Hcy. The two
19 main pathways, remethylation and transsulfuration, balance the level of methionine
20 and Hcy in the body (Škovierová et al., 2016; Sharma et al., 2015).

21 Two distinct routes exist for the remethylation of Hcy back to methionine to
22 complete the methyl cycle. The first reaction is dependent on the presence of B
23 vitamins and folate. The folate in the form as a coenzyme N-5-methyl tetrahydrofolate
24 (THF) can donate a methyl group to Hcy in a reaction catalyzed by the vitamin B12-
25 dependent enzyme methionine synthase (MS). Thus, both folate and vitamin B12
26 status play an important role in Hcy balance within the cell and subsequently the
27 plasma level circulation. The second route for Hcy remethylation uses betaine as a
28 methyl group donor, which is synthesized from choline by betaine-homocysteine S-
29 methyltransferase (BHMT). BHMT-dependent remethylation of Hcy occurs primarily in
30 liver, kidney and lens, whereas the folate/vitamin B12-dependent route is found
31 universally in all tissues (Esse et al., 2019; Škovierová et al., 2016). Transsulfuration
32 is the main pathway for methionine disposal, through which Hcy combines with serine
33 and forms cystathionine with the help of the enzyme cystathionine β -synthase (CBS).
34 The enzyme- γ cystathionase works on cystathionine to form cysteine which is used in

1 the synthesis of other protein-like glutathione, and the rest of cysteine is excreted via
2 urine (Sharma et al., 2015).

3 These aforementioned pathways are coordinated by SAM, which have a
4 specific role as an allosteric inhibitor for the methylenetetrahydrofolate reductase
5 (MTHFR) reaction and acts as an activator of cystathionine β -synthase. In the
6 presence of sufficient methionine, Hcy produces cysteine through the enzyme CBS.
7 However, in the event of methionine deficiency, Hcy can be remethylated to salvage
8 methionine through the enzyme N5, N10-methylenetetrahydrofolate reductase
9 (Selhub, 1999; Faeh, 2006; Ferrier, 2014).

10 Hcy is commonly found in blood plasma in four different forms: circulates as free
11 thiol (1%), remains disulfide-bound to plasma proteins such as albumin (70–80%), and
12 combines with other Hcy to form the dimer Hcy or combines with other thiols (20–30%).
13 In healthy humans, the optimal total concentration of Hcy (tHcy) in plasma is in the
14 range of 5.0 and 15.0 $\mu\text{mol/L}$ (high-performance liquid chromatography method) or
15 5.0–12.0 $\mu\text{mol/L}$ (immunoassay method) (Koklesova et al., 2021).

16 Elevated levels of Hcy in blood plasma ($>15 \mu\text{mol/L}$) is a systemic medical
17 condition known as HHcy. The range of Hcy between 16 and 30 $\mu\text{mol/L}$ is classified
18 as moderate, 31–100 $\mu\text{mol/L}$ as intermediate, and above 100 $\mu\text{mol/L}$ as severe HHcy
19 (Yoshitomi et al., 2020; Škovierová et al., 2016).

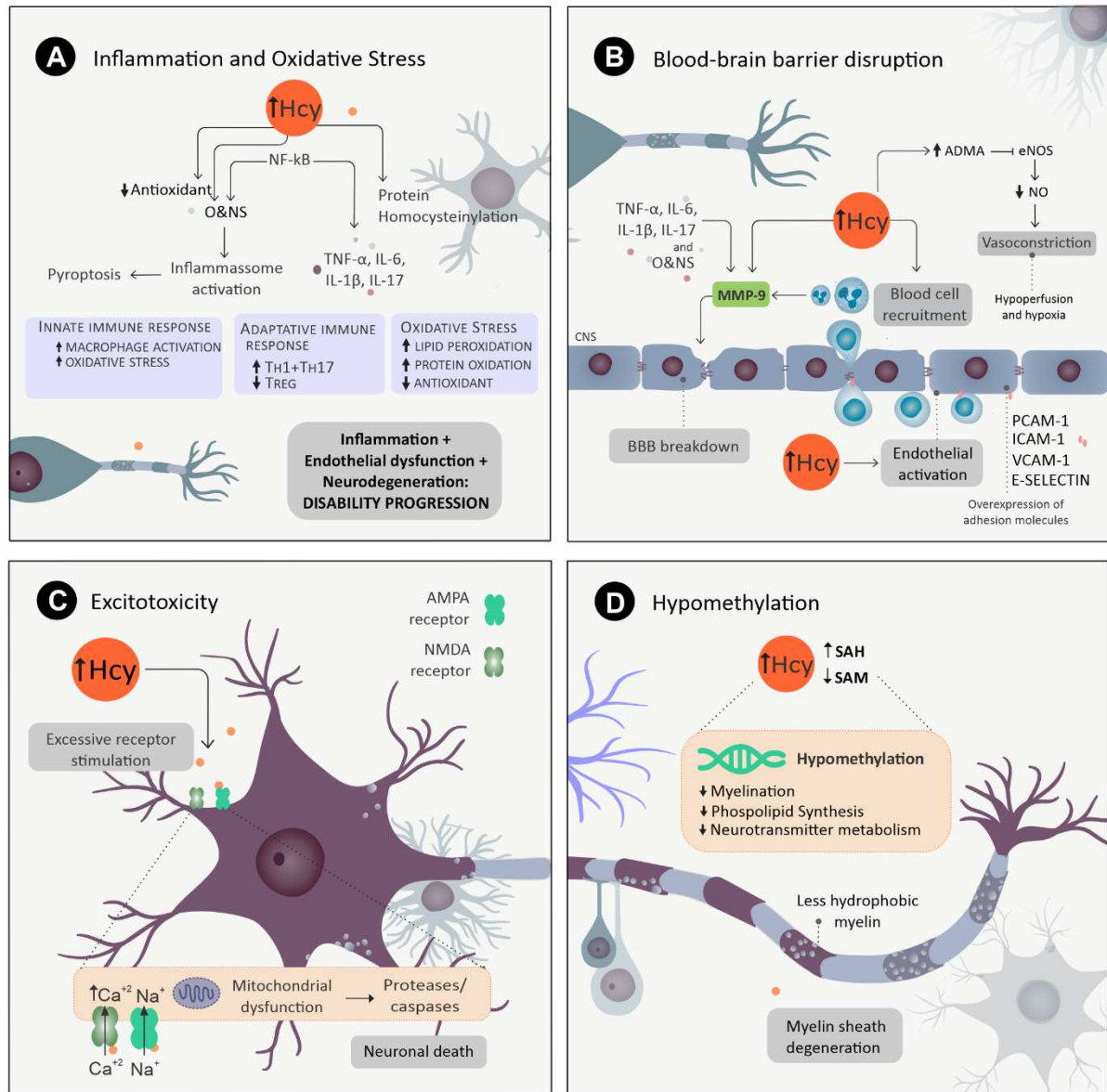
20

21 *4.2 Association between Hcy, folate and vitamin B12 levels with MS*

22

23 It is hypothesized that the nervous system may be particularly sensitive to Hcy
24 as it promotes excitotoxicity by stimulation of the N-methyl-D-aspartate (NMDA)
25 receptors and damages neuronal DNA hence triggering apoptosis in neuronal cells
26 (Kruman et al., 2000; Ho et al., 2002). Evidence shows that Hcy may impair endothelial
27 function through the production of ROS and reduction of the bioavailability of nitric
28 oxide (NO), a potent vasodilator. Reduction in NO production can contribute to
29 endothelial activation through the upregulation of adhesion molecules, such as
30 intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular adhesion molecule-1 (VCAM-1),
31 E-selectin, and macrophage chemoattractant peptide-1 (MCP-1) (Yuyun et al., 2018).
32 Likewise, an increase in oxidative stress can stimulate the expression of
33 proinflammatory cytokines and adhesion molecules in endothelial cells via the
34 transcription nuclear factor kappa B (NF- κ B) pathway (Barroso et al., 2016). The

1 interest in studying endothelial function in MS is due to the fact that the dysregulation
 2 of the BBB and the transendothelial migration of leukocytes is one of the first and most
 3 important links in the pathogenesis of MS (Dubchenko et al., 2020). **The Figure 2**
 4 summarized the main pathophysiological mechanisms involved in the MS.
 5



6
 7 **Figure 2 Pathophysiological mechanisms involved with the increased homocysteine (Hcy) in**
 8 **multiple sclerosis (MS).** **A:** Inflammation and oxidative stress through increased oxidative and
 9 nitrosative stress, inflammasome activation, and pyroptosis, activation of the NF-kB with production of
 10 pro-inflammatory cytokines, such as TNF- α , IL-6, IL-1 β , and IL-17, decreased antioxidant defenses, and
 11 increased protein homocysteinylation. All these mechanisms cause activation of innate and adaptive
 12 immune responses, with inflammation, endothelial dysfunction, and neurodegeneration, contributing to
 13 the disability progression. **B:** Blood-brain barrier disruption through increased oxidative and nitrosative
 14 stress, pro-inflammatory cytokines TNF- α , IL-6, IL-1 β , and IL-17, increased expression of MMP-9,
 15 upregulation of adhesion molecules, such as ICAM-1, VCAM-1, E-selectin, and MCP-1, transendothelial
 16 migration of leukocytes; increased ADMA that inhibits the eNOS, and consequently, decreased NO,
 17 causing vasoconstriction, hypoperfusion and hypoxia. **C:** Excitotoxicity: excessive receptors stimulation
 18 (AMPA and NMDA), mitochondrial dysfunction, activation of proteases and caspases, and neuronal

1 death. **D:** Hypomethylation: increased SAH and decreased SAM, with decreased myelination,
2 phospholipid synthesis, and neurotransmitter metabolism, that cause a less myelin hydrophobic, and
3 myelin sheath degeneration. NF- κ B: nuclear factor kappa B; TNF- α : tumor necrosis factor alpha; IL:
4 interleukin; MMP-9: matrix metalloproteinase 9; ICAM-1: intracellular adhesion molecule-1; VCAM-1:
5 vascular adhesion molecule-1; MCP-1: macrophage chemoattractant peptide-1; NMDA: N-methyl-D-
6 aspartate; ADMA: asymmetric dimethylarginine; eNOS: endothelial nitric oxide synthase; NO: nitric
7 oxide; AMPA: alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico; SAH: S-adenosil-homocysteine; SAM:
8 S-Adenosilmethionine.
9

10 While some investigations showed increased Hcy levels and decreased levels
11 of vitamin B12 and folate in MS patients compared to controls (Baig; Ali, 1995; Vrethem
12 et al., 2003; Besler; Comoglu, 2003; Ramsaransing et al., 2006; Moghaddasi et al.,
13 2013), other studies reported no differences between patients with MS and their
14 controls in levels of Hcy (Kocer et al., 2009; Teunissen et al., 2008; Triantafyllou et al.,
15 2008), vitamin B12 and folate (Russo et al., 2008; Kocer et al., 2009). A meta-analysis
16 carried out by Zhu et al. (2011) revealed higher levels of Hcy and lower vitamin B12 in
17 MS than controls, while no significant difference for folate.

18 In the 90's, a pioneer study did not observe significative differences in the serum
19 folate and vitamin B12 when patients with different neurological conditions were
20 compared, including MS, myelopathies, Alzheimer's-type dementia, non-Alzheimer's
21 type dementia, and a reference group with a neurological disease from which no
22 association with low vitamin B12 or low folate concentrations is known (Nijst et al.,
23 1990).

24 Moghaddasi et al. (2013) showed that mean plasma levels of vitamin B12,
25 folate, and Hcy in MS patients were significantly different in comparison with the
26 controls. In addition, there were significant correlations between mean serum Hcy
27 levels and duration of disease and treatment with interferon (IFN)- β . In MS patients,
28 Hcy levels were higher among those on IFN- β therapy. These authors concluded that
29 the serum levels of vitamin B12 and folate decreased in relapsing-remitting MS
30 (RRMS) patients, but Hcy levels increased significantly and recommend regular
31 checking of the serum levels of Hcy in patients who use disease-modifying drugs
32 (Moghaddasi et al., 2013). Another meta-analysis with a mixed-race sample showed
33 that MS patients display elevated Hcy blood levels compared to the controls, but no
34 significant difference in either vitamin B12 or folate (Dardiotis et al., 2017). However,
35 two of these meta-analysis studies (Zhu et al., 2011; Dardiotis et al., 2017) failed to
36 take some critical factors into account, including sex, age, disease phase and/or
37 severity, and/or race of study population.

1 Oliveira et al. (2018) showed that the levels of Hcy are significantly higher in MS
2 patients than in controls, as well as in those with moderate/high disability compared to
3 those with mild disability. A case-control study and meta-analysis revealed no
4 significant difference in folate levels or the frequency of folate deficiency between MS
5 patients and controls (Pan et al., 2019). In a case-control study, Pan et al (2019)
6 showed higher frequency of HHcy in the Chinese MS cases than controls, consistent
7 with some other studies (Ramsaransing et al., 2006; Sahin et al., 2007; Triantafyllou
8 et al., 2008; Vrethem et al., 2003), but inconsistent with other previous studies
9 (Kararizou et al., 2013; Rio et al., 1994; Teunissen et al., 2008). In a meta-analysis,
10 Pan et al. (2019) showed that patients with MS tend to have increased blood Hcy levels
11 compared to controls and that vitamin B12 deficiency was found only in their study. MS
12 patients of Chinese origin and those in relapse MS may showed decreased levels of
13 vitamin B12, underscoring that Hcy and vitamin B12 may contribute to pathogenesis
14 of the disease, and vitamin B12 may correlate with MS relapse.

15 Further, Li et al. (2020), in a meta-analysis, also reported that patients with MS
16 had higher Hcy levels than controls, but no significant changes in vitamin B12 or folate
17 levels between MS and controls. Moreover, higher Hcy was observed among the
18 patients with RRMS clinical form than controls and no difference in Hcy levels was
19 observed between patients with the secondary progressive MS (SPMS) or primary
20 progressive MS (PPMS) clinical forms and controls (Li et al., 2020). One reasonable
21 explanation to the high Hcy levels in MS patients without vitamin B12 or folate
22 deficiency, could be variants in the genes coding for MTHFR or for any other enzymes
23 in the trans-sulphuration pathway (Aksungar et al., 2008).

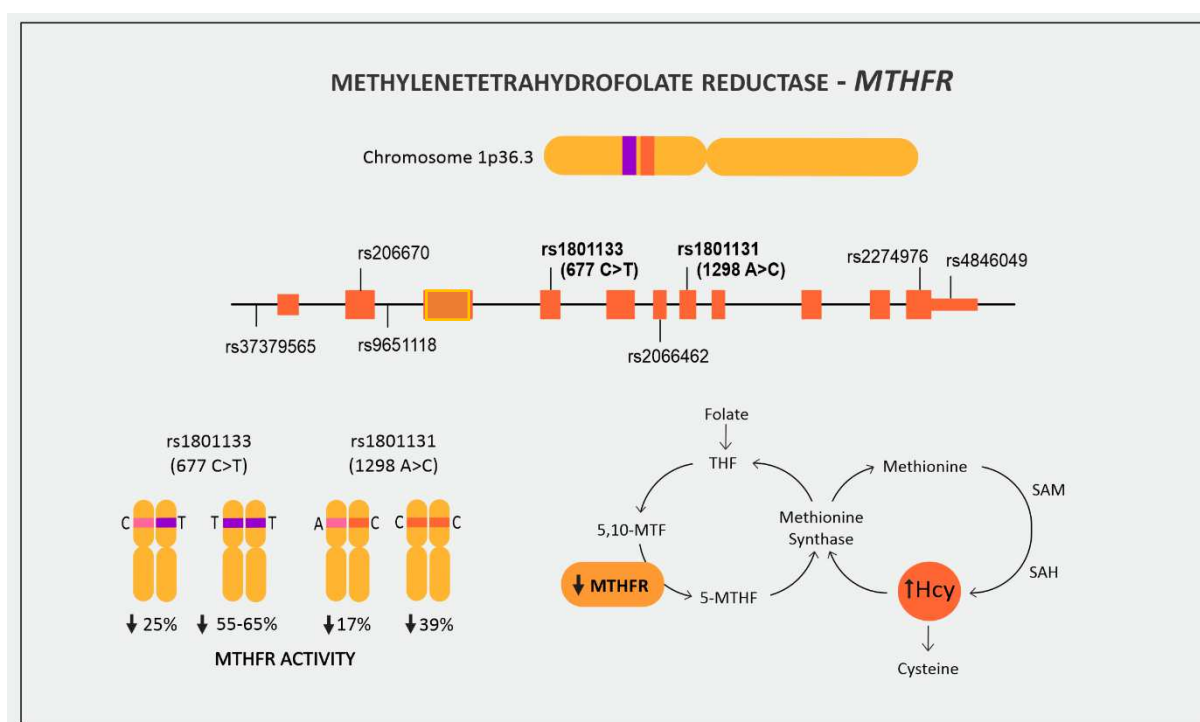
24
25

26 *4.3 Association between MTHFR rs1801133 (677C>T) genetic variant and* 27 *homocysteine in multiple sclerosis patients*

28

29 *MTHFR* gene is located on the short arm of chromosome 1 (chr1p36.3) in
30 humans, between 11,785,723 to 11,806,103 nucleotides, and contains several
31 missense genetic variants that cause altered amino acid in the protein product (Figure
32 3). Among them, rs1801133 (677 C>T) and rs1801131 (1298 A>C) are the most widely
33 studied (Lu et al., 2022). The rs1801133 (677C>T) is located in the exon 4 and consists
34 of a transition of Cytosine (C) to Thymine (T) in the position 677, leading to an alanine to

1 valine substitution in the 222 amino acid of the protein (p.Ala222Val or A222V) (Frosst
 2 et al., 1995; Weisberg et al., 1998). The rs1801131 (1298 A>C) consists of a transition
 3 of Adenine (A) to C at the nucleotide position 1298, leading to a glutamate to alanine
 4 substitution. Both the single nucleotide variants (SNVs) were related to the reduction
 5 of the MTHFR enzymatic activity and higher levels of Hcy (Lu et al., 2022). The
 6 prevalence of the *MTHFR* 677C>T genetic variant differs among ethnic groups varying
 7 from 1.0% or less in sub-Saharan African and United States (US) Blacks to 25.0% or
 8 more in Italians and US Hispanics (Raghubeer and Matsha, 2021).



9
 10
 11
 12
 13
 14
 15
 16
 17
 18
 19
 20
 21
 22
 23
 24
 25
 26
 27
 28
 29
 30

Figure 3 The *MTHFR* gene location. The *MTHFR* gene is located on chromosome 1p36.6 and has 12 exons. Two most studied variants are located in the exon 4 (1801133) where cytosine is replaced by thymine at nucleotide 677, which results in the replacement of the amino acid alanine by valine at position 222 of the protein; the other variant is located in the exon 7 (rs1801131) where a adenine is replaced by a cytosine at nucleotide 1298, which results in glutamate to alanine substitution. These genetic variants reduce the activity of the MTHFR enzyme: the 677 C>T reduces 25 to 30% in individuals with the heterozygous CT genotype and 55-65% in individuals with the homozygous genotype for the variant allele (TT), while the 1298 A>C reduces 17% in individuals with the heterozygous AC genotype and 39% in individuals with the homozygous genotype for the variant allele (CC). Briefly, Hcy is formed by the demethylation of methionine, via the formation of two intermediate compounds, S-adenosylmethionine (SAM) and S-adenosylhomocysteine (SAH); 2) once formed, homocysteine can be remethylated to methionine via 2 pathways: the first pathway uses betaine as the methyl group donor and is catalyzed by the enzyme betaine-homocysteine methyltransferase; in the second route, the methyl group donor is 5-methylenetetrahydrofolate (5-MTHF), the main form of folate in plasma, produced from the reduction of 5,10-methylenetetrahydrofolate by the enzyme 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (5,10 MTHFR). The transfer of the methyl group to homocysteine is carried out through the action of the enzyme methionine synthetase. The reduction of the MTHFR activity impairs the remethylation of the homocysteine and increases its plasma levels. The *MTHFR* gene exons are indicated as red regions. Numbers represent the single nucleotide variant (SNV) sequence number, which corresponds to the gene rs-number in the annotation.

1 The most studied and clinically significant *MTHFR* genetic variant is the
2 rs1801133 (677C>T). There are reports of racial-ethnic disparities in the distribution of
3 the *MTHFR* 677C>T variant (Kim; Kang; Kim, 2002; Franco et al., 1998), as well as a
4 relationship between the *MTHFR* 677C>T variant and elevated Hcy levels (Fekih-
5 Mrissa et al., 2013a; Lajin et al., 2012; Li et al., 2015; Li; Fu; Dong, 2018). The *MTHFR*
6 677 C>T variant is associated with HHcy in the general population (Engbersen et al.,
7 1995; Jacques et al., 1996; Chambers et al., 2000; Ferik-Mrissa et al., 2013a; Fong et
8 al., 2011; Lajin et al., 2012; Li et al., 2018; Li et al., 2015). The *MTHFR* enzyme activity
9 is 55–65% reduced among the individuals carrying the TT genotype and 25% reduced
10 among those carrying the CT genotype compared with the enzyme activity of
11 individuals carrying the CC genotype (Bagley; Selhub, 1998; Ueland et al., 2001; Cong
12 et al., 2009).

13 The role of the *MTHFR* 677C>T variant in the pathophysiology of MS has been
14 evaluated in some genetically specific worldwide populations with inconsistent results.
15 While five case-control studies (Alatab et al., 2011; Cevik et al., 2014; Naghibalhossaini
16 et al., 2015; Cakina et al., 2019; Lu et al., 2022) demonstrated an association between
17 the T allele with MS, other six studies failed to confirm this association (Huang et al.,
18 1997; Fekih-Mrissa et al., 2013b; Klots et al., 2010; Tajouri et al. 2006; Lee et al., 2015;
19 Chorazi et al., 2019). Two reasons may explain the association between *MTHFR*
20 677C>T variant and MS. First, the disease may have an impact on Hcy levels and may
21 modify the action of *MTHFR* gene variations. Second, the genotype may be linked to
22 illness risk, presumably through altered folate and Hcy metabolism (Ueland et al.,
23 2001; Mattson, 2002).

24 Cevik et al. (2014) investigated a possible association between the *MTHFR*
25 gene 677C>T variant and MS in Turkish patients and a significant association was
26 observed when the patients were compared with the controls according to the CC
27 genotype *versus* the CT + TT genotypes. These results showed that the T allele of the
28 677C>T variant was associated with MS susceptibility in Turkish population.
29 Naghibalhossaini *et al.* (2015) reported that the CT genotype of *MTHFR* 677C>T
30 variant showed a higher risk of MS incidence for both cases with the recessive (TT vs.
31 CT + CC) and codominant (CT vs. CC) pattern of inheritance [for TT vs. CC: odds ratio
32 (OR) = 6.23, 95% confidence interval (CI) = 3.08- 12.59 and CT vs. CC: OR = 2.9, 95%
33 CI = 1.88-4.49, respectively] in comparison with controls. In agreement, Cakina et al
34 (2019) showed a positive association between *MTHFR* 677C>T and MS, but these

1 authors did not evaluate the association between the levels of Hcy and folate with the
2 genetic variation. In their study, the frequency of the homozygous TT genotype of the
3 *MTHFR* 677C>T variant was significantly higher in MS patients than in controls (Cakina
4 et al., 2019).

5 One meta-analysis evaluated nine studies that investigated the association
6 between the *MTHFR* 677C>T variant with MS risk, involving 1227 cases and 1426
7 controls (Lu et al., 2022) and the results showed a borderline statistical significance
8 between the genetic variant and the presence of MS in a recessive genetic model (OR
9 = 1.57, 95% CI, 1.03-2.38), demonstrating that the *MTHFR* 677C>T variant could be a
10 risk factor for MS (Lu et al., 2022).

11 However, some studies have found no association between the *MTHFR* 677
12 C>T genetic variant and MS susceptibility. Tajouri et al. (2006) genotyped the *MTHFR*
13 677C>T variant of Australian MS patients and unaffected control subjects, matched for
14 sex, age and ethnicity and the homozygous variant *MTHFR* genotype (TT) was slightly
15 over-represented in the MS group (16.0% *versus* 11.0%), but this variation failed to
16 reach statistical significance ($p=0.15$) and this result does not support a major role for
17 this functional gene variation in MS susceptibility. No association was also observed
18 between the *MTHFR* 677C>T variant among the patients with RRMS and controls from
19 a German population (Klotz et al., 2010) and from Tunisian (Fekih-Mrissa et al.,
20 2013b). In a meta-analysis study (Lee et al., 2015), the possibility of type II or false-
21 negative errors was discussed, since the authors evaluated only six studies, with
22 heterogeneity in terms of clinical forms of MS and confounding variables, as well as
23 ethnic specificity with the inclusion of individuals from Germany (Klotz et al., 2010),
24 Iran (Alatab et al., 2011; Naghibalhossaini et al., 2015), Turkey (Cevik et al., 2014;
25 Cakina et al., 2019) , Tunisia (Fekih-Mrissa et al., 2013b), and Australia (Tajouri et al.,
26 2006). Alatab et al (2011) investigated the association of MS and *MTHFR* 677C>T
27 from Iranian MS patients and controls subjects and the results showed that the
28 genotype distribution was not significantly different between patient and control groups;
29 however, the T allele was 1.7 times more present in the patient group. Moreover, the
30 authors described that subjects carrying the T allele developed MS disease almost four
31 years sooner than those with other genotypes, concluding that carrying the T allele of
32 677C>T variant might be a predisposition to earlier onset of MS.

33 The disparities observed between the data from the studies may be due to
34 various reasons, with the most notable being genetic and geographical differences

1 among populations. These disparities can be influenced by many environmental
2 factors, distinct evolutionary histories of the genes causing complex diseases, such as
3 MS, allele frequency, genomic location on chromosomes, and different linkage
4 disequilibrium (LD) among different population. Moreover, inadequate statistical power
5 and publication bias (Lu et al., 2022; Chorazi et al., 2019).

7 **5. Conclusion**

8 Taken all together, the results of Hcy in MS patients were more
9 consistently increased while the folate and B12 vitamin levels were conflicting.
10 Regarding the association between the *MTHFR* 677C>T genetic variant and MS in
11 distinct populations, 5 studies showed an association, while 6 studies showed
12 discordant results. Altogether, these aforementioned conflicting results point to the
13 need for additional studies involving individuals from different world populations to
14 validate these results and advance our understanding regarding the physiopathology
15 of MS.

20 **References**

- 21
22 Aksungar FB, Topkaya AE, Yildiz Z, Sahin S, Turk U. Coagulation status and
23 biochemical and inflammatory markers in multiple sclerosis. *J Clin Neurosci*. 2008
24 Apr;15(4):393-7. doi: 10.1016/j.jocn.2007.02.090
25
26 Alatab S, Hossein-Nezhad A, Mirzaei K, Mokhtari F, Shariati G, Najmafshar A.
27 Inflammatory profile, age of onset, and the *MTHFR* polymorphism in patients with
28 multiple sclerosis. *J Mol Neurosci*. 2011;44(1):6-11. doi: 10.1007/s12031-010-9486-y.
29
30 Ashtari F, Salehi AS, Shaigannezhad V. Serum homocysteine level in patients with
31 multiple sclerosis. *Journal of Research in Medical Sciences* 2005; 10 (5): 302-304
32
33 Baig SM, Ali Qureshi G. Homocysteine and vitamin B12 in multiple sclerosis. *Biog*
34 *Amines* 1995; 11: 479–85.

- 1 Bagley PJ, Selhub J. A common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase
2 gene is associated with an accumulation of formylated tetrahydrofolates in red blood
3 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:13217–220. doi: 10.1073/pnas.95.22.13217
4
- 5 Barroso M, Kao D, Blom, HJ, Tavares de Almeida I, Castro R, Loscalzo J, Handy DE.
6 S-adenosylhomocysteine induces inflammation through NFkB: A possible role for
7 EZH2 in endothelial cell activation. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1862(1):82-92. doi:
8 10.1016/j.bbadis.2015.10.019.
9
- 10 Besler HT, Comoglu S. Lipoprotein oxidation, plasma total antioxidant capacity and
11 homocysteine level in patients with multiple sclerosis. *Nutr Neurosci*. 2003 Jun ;6(3),
12 189–96. doi: 10.1080/1028415031000115945.
13
- 14 Bhargava S, Bhandari A, Choudhury S. Role of homocysteine in cognitive impairment
15 and Alzheimer’s disease. *Indian J Clin Biochem*. 2018;33:16–20. doi:10.1007/s12291-
16 017-0646-5.
17
- 18 Bystrická Z, Laubertová L, Ďurfinová M, Paduchová Z. Methionine metabolism and
19 multiple sclerosis. *Biomarkers*. 2017 Dec;22(8):747-754. doi:
20 10.1080/1354750X.2017.1334153
21
- 22 Cakina S, Ocak O, Ozkan A, Yucel S, Ozisik Karaman HI. Relationship between
23 genetic polymorphisms MTHFR (C677T, A1298C), MTR (A2756G) and MTRR (A66G)
24 genes and multiple sclerosis: a case-control study. *Folia Neuropathol*. 2019;57(1):36-
25 40. doi: 10.5114/fn.2019.83829.
26
- 27 Cevik B, Yigit S, Karakus N, Aksoy D, Kurt S, Ates O. Association of
28 methylenetetrahydrofolate reductase gene C677T polymorphism with multiple
29 sclerosis in Turkish patients. *J Investig Med*. 2014; 62(8):980–4.
30
- 31 Chambers JC, Obeid OA, Refsum H, Ueland P, Hackett D, Hooper J, Turner RM,
32 Thompson SG, Kooner JS. Plasma homocysteine concentrations and risk of coronary
33 heart disease in UK Indian Asian and European men. *Lancet*. 2000;355:523–7.

- 1 Chorąży M, Wawrusiewicz-Kurylonek N, Gościak J, Posmyk R, Czarnowska A, Więsik
2 M, Kapica-Topczewska K, Krętowski AJ, Kochanowicz J, Kułakowska A. Association
3 between polymorphisms of a folate - homocysteine - methionine - SAM metabolising
4 enzyme gene and multiple sclerosis in a Polish population. *Neurol Neurochir Pol.*
5 2019;53(3):194-198. doi: 10.5603/PJNNS.a2019.0019.
6
- 7 Cong Y, Guo X, Liu X, Cao D, Jia X, Xiao X, Li S, Fang S, Zhang Q. Association of the
8 single nucleotide polymorphisms in the extracellular matrix metalloprotease-9 gene
9 with PACG in southern China. *Mol Vis.* 2009; 15:1412-7.
10
- 11 Dardiotis E, Arseniou S, Sokratous M, Tsouris Z, Siokas V, Mentis AA, Michalopoulou
12 A, Andravizou A, Dastamani M, Paterakis K, Bogdanos D, Brotis A. Vitamin B12, folate,
13 and homocysteine levels and multiple sclerosis: A meta-analysis *Mult Scler Relat*
14 *Disord.* 2017 Oct;17:190-7. doi: 10.1016/j.msard.2017.08.004. Epub 2017 Aug 16.
15
- 16 de Carvalho Jennings Pereira WL, Flauzino T, Alfieri DF, Oliveira SR, Kallaur AP,
17 Simão ANC, Lozovoy MAB, Kaimen-Maciel DR, Maes M, Reiche EMV. Immune-
18 inflammatory, metabolic and hormonal biomarkers are associated with the clinical
19 forms and disability progression in patients with multiple sclerosis: A follow-up study. *J*
20 *Neurol Sci.* 2020 Mar 15;410:116630. doi: 10.1016/j.jns.2019.116630.
21
- 22 Diaz-Arrastia, R. Homocysteine and neurologic disease. *Arch. Neurol.* 2000;57(10):
23 1422–7.
- 24 Dubchenko E, Ivanov A, Spirina N, Smirnova N, Melnikov M, Boyko A, Gusev E,
25 Kubatiev A. Hyperhomocysteinemia and Endothelial Dysfunction in Multiple Sclerosis.
26 *Brain Sci.* 2020 Sep;10(9):637. doi: 10.3390/brainsci10090637
27
- 28 Ďurfinová M, Procházková L, Petrleničová D, Bystrická Z, Orešanská K, Kuračka L,
29 Líška B. Cholesterol level correlate with disability score in patients with relapsing-
30 remitting form of multiple sclerosis. *Neurosci Lett.* 2018 Nov 20;687:304-307. doi:
31 10.1016/j.neulet.2018.10.030.
32
- 33 Dyment DA, Ebers GC, Sadovnick AD. Genetics of multiple sclerosis. *Lancet Neurol.*

- 1 2004; 3:104-10. doi: 10.1016/s1474-4422(03)00663-x
2
- 3 Engbersen A, Franken DG, Boers G, Stevens E, Trijbels F, Blom HJ. Thermolabile 5,
4 10-methylenetetrahydrofolate reductase as a cause of mild hyperhomocysteinemia.
5 *Am J Hum Genet.* 1995;56:142.
6
- 7 Esse R, Barroso M, Tavares de Almeida I et al. The Contribution of Homocysteine
8 Metabolism Disruption to Endothelial Dysfunction: State-of-the-Art. *Int J Mol Sci.* 2019
9 Feb;20(4):867.
10
- 11 Faeh D, Chiolerio A, Paccaud F. Homocysteine as a risk factor for cardiovascular
12 disease: should we (still) worry about? *Swiss Med Wkly.* 2006;136:745–56.
13
- 14 Ferrier DR. *Biochemistry.* Lippincott Williams & Wilkins; 2014. ISBN 978–1–4511–
15 7562–2.
16
- 17 Fahmy EM, Elfayoumy NM, Abdelalim AM, Sharaf SA, Ismail RS, Elshebawy H.
18 Relation of serum levels of homocysteine, vitamin B12 and folate to cognitive functions
19 in multiple sclerosis patients. *Int J Neurosci,* 2018;128(9):835-41.
20
- 21 Fan X, Zhang L, Li H, Chen G, Qi G, Ma X, Jin Y. Role of homocysteine in the
22 development and progression of Parkinson’s disease. *Ann Clin Transl Neurol.* 2020
23 Nov;7(11):2332-8. doi: 10.1002/lt.51227.
24
- 25 Faraci FM, Lentz SR. Hiperhomocysteinemia, oxidative stress and cerebral vascular
26 dysfunction. *Stroke* 2004; 35:345–7. doi: 10.1161/01.STR.0000115161.10646.67.
27
- 28
- 29 Fekih-Mrissa N, Mrad M, Klai S. Methylenetetrahydrofolate reductase (C677T and
30 A1298C) polymorphisms, hyperhomocysteinemia, and ischemic stroke in Tunisian
31 patients. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2013a; 22(4):465-9. doi:
32 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2013.03.011.
33
- 34 Fekih Mrissa N, Mrad M, Klai S, Zaouali J, Sayeh A, Mazigh C, Nsiri B, Machgoul S,

- 1 Gritli N, Mrissa R. Association of methylenetetrahydrofolate reductase A1298C
2 polymorphism but not of C677T with multiple sclerosis in Tunisian patients. *Clin Neurol*
3 *Neurosurg.* 2013b Sep;115(9):1657-60. doi: [10.1016/j.clineuro.2013.02.025](https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2013.02.025)
4
- 5 Fong CS, Shyu HY, Shieh JC, Fu YP, Chin TY, Wang HW, Cheng CW. Association of
6 MTHFR, MTR, and MTRR polymorphisms with Parkinson's disease among ethnic
7 Chinese in Taiwan. *Clin Chim Acta* 2011; 412: 332-8. doi: [10.1016/j.cca.2010.11.004](https://doi.org/10.1016/j.cca.2010.11.004).
8
- 9 Franco RF, Araujo AG, Guerriero JF, Elion J, Zago MA. Analysis of the 677 CT
10 mutation of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in different ethnic groups.
11 *Thromb Haemost* 1998;79:119–21
12
- 13 Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJ, den
14 Heijer M, Kluijtmans LA, van den Heuvel LP, et al. A candidate gene risk factor for
15 vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat.*
16 *Genet.* 1995; 10: 111-3. Doi: [10.1038/ng0595-111](https://doi.org/10.1038/ng0595-111)
17
- 18 Gao S, Li H, Xiao H, Yao G, Shi Y, Wang Y, Zhou X, Yu H. Association of MTHFR
19 677T variant allele with risk of intracerebral haemorrhage: a meta-analysis. *J Neurol*
20 *Sci.* 2012;323:40-5.
21
- 22 Ghosh K, Khare A, Shetty S. Fasting plasma homocysteine levels are increased in
23 young patients with acute myocardial infarction from Western India. *Indian Heart J.*
24 2007; 59(3): 242–5.
25
- 26 Gorgone, G.; Caccamo, D.; Pisani, L.R.; Curro, M.; Parisi, G.; Oteri, G.; Ientile, R.;
27 Rossini, P.M.; Pisani, F. Hyperhomocysteinemia in patients with epilepsy: Does it play
28 a role in the pathogenesis of brain atrophy? A preliminary report. *Epilepsia* 2009; 50:
29 33–6. doi: [10.1111/j.1528-1167.2008.01967.x](https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2008.01967.x)
30
- 31 Holmes, MV, Newcombe P, Hubacek JA, Sofat R, Ricketts, SL, Cooper J.; Breteler,
32 M.M.B.; Bautista, L.E.; Sharma, P.; Whittaker, J.C.; et al. Effect modification by
33 population dietary folate on the association between MTHFR genotype, homocysteine,
34 and stroke risk: A meta-analysis of genetic studies and randomized trials. *Lancet*

- 1 2011;378: 584–94. doi: 10.1016/S0140-6736(11)60872-6.
2
- 3 Homocysteine Lowering Trialists' Collaboration. Dose-dependent effects of folic acid
4 on blood concentrations of homocysteine: a meta-analysis of the randomized trials.
5 *Am J Clin Nutr* 2005; 82(4):806-12. doi: 10.1093/ajcn/82.4.806
6
- 7 Ho PI, Ortiz D, Rogers E, Shea TBI. Multiple aspects of homocysteine neurotoxicity:
8 glutamate excitotoxicity, kinase hyperactivation and DNA damage. *J Neurosci Res.*
9 2002; 70(5):694–702.
10
- 11 Huang WX, He B, Hillert J. A methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism
12 in multiple sclerosis. *Eur J Neurol.* 1997 Mar;4(2):185-7. doi: 10.1111/j.1468-
13 1331.1997.tb00325.x.
14
- 15 Ineichen BV, Keskitalo S, Farkas M, Bain N, Kallweit U, Weller M, Klotz L, Linnebank
16 M. Genetic variants of homocysteine metabolism and multiple sclerosis: a case-control
17 study. *Neurosci Lett.* 2014; 562:75-8. doi: 10.1016/j.neulet.2014.01.008
18
- 19 Jacques PF, Bostom AG, Williams RR, Ellison RC, Eckfeldt JH, Rosenberg IH, Selhub
20 J, Rozen R. Relation between folate status, a common mutation in
21 methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations.
22 *Circulation* 1996;93:7–9.
23
- 24 Jamroz-Wisniewska A, Beltowski J, Bartosik-Psujek H, Wójcicka G, Rejdak K.
25 Processes of plasma protein N-homocysteinylation in multiple sclerosis. *Int J Neurosci,*
26 2017;127(8):709-15. doi: 10.1080/00207454.2016.1241782.
27
- 28 Kamath AF, Chauhan AK, Kisucka J, Dole VS, Loscalzo J, Handy DE, Wagner DD.
29 Elevated levels of homocysteine compromise blood-brain barrier integrity in mice.
30 *Blood.* 2006 Jan 15;107(2):591-3. doi: 10.1182/blood-2005-06-2506.
31
- 32 Kararizou E, Paraskevas G, Triantafyllou N, Koutsis G, Evangelopoulos ME,
33 Mandellos D, Sfagos C, Kapaki E. Plasma homocysteine levels in patients with multiple
34 sclerosis in the Greek population. *J Chin Med Assoc.* 2013; 76(11): 611-4.

- 1 Karussis D. The diagnosis of multiple sclerosis and the various related demyelinating
2 syndromes: a critical review. *J Autoimmun* 2014; 48-49:134-42. [doi:](#)
3 10.1016/j.jaut.2014.01.022.
4
- 5 Kim, J.K., Mastronardi, F.G., Wood, D.D., Lubman, D.M., Zand, R., Moscarello, M.A..
6 Multiple sclerosis: an important role for post-translational modifications of myelin basic
7 protein in pathogenesis. *Mol. Cell Proteom* 2003; 2 (7), 453–62.
8
- 9 Kim NK, Kang GD, Kim HJ. Genetic polymorphisms of 5,10-methylenetetrahydrofolate
10 reductase (MTHFR C677T and A1298C) in healthy Koreans. *Korean J Genet* 2002;
11 24:227–234.
12
- 13 Klotz L, Farkas M, Bain N, Keskitalo S, Semmler A, Ineichen B, Jelcic J, Klockgether
14 T, Kölsch H, Weller M, Linnebank M. The variant methylenetetrahydrofolate reductase
15 c.1298A > C (p.E429A) is associated with multiple sclerosis in a German case-control
16 study. *Neurosci Lett*. 2010;468(3):183-5. [doi: 10.1016/j.neulet.2009.10.057](#)
17
- 18 Kocer B, Guven H, Comoglu SS. Homocysteine levels in Parkinson's disease: is
19 entacapone effective? *Biomed Res Int*. 2016;2016:7563705. [doi:](#)
20 10.1155/2016/7563705.
21
- 22 Kocer B, Engur S, Ak F, Yilmaz M. Serum vitamin B12, folate, and homocysteine levels
23 and their association with clinical and electrophysiological parameters in multiple
24 sclerosis. *J Clin Neurosci*. 2009; 16(3):399-403. [doi: 10.1016/j.jocn.2008.05.015](#).
25
- 26 Koklesova L, Mazurakova A, Samec M, Biringner K, Samuel SM, Büsselberg D, Kubatka
27 P, Golubnitschaja O. Homocysteine metabolism as the target for predictive medical
28 approach, disease prevention, prognosis, and treatments tailored to the person. *EPMA*
29 *J*. 2021; 12(4):477-505. [doi: 10.1007/s 13167-021-00263-0](#).
30
- 31 Kruman II, Culmsee C, Chan SL, Kruman Y, Guo Z, Penix L, Mattson MP.
32 Homocysteine elicits a DNA damage response in neurons that promotes apoptosis and
33 hypersensitivity to excitotoxicity. *J Neurosci*. 2000;20(18):6920-6. [doi:](#)
34 10.1523/JNEUROSCI.20-18-06920.2000.

- 1 Kuenz B, Lutterotti A, Khalil M, Ehling R, Gneiss C, Deisenhammer F, Reindl M, Berger
2 T. Plasma levels of soluble adhesion molecules sPECAM-1, sP-selectin and sE-
3 selectin are associated with relapsing-remitting disease course of multiple sclerosis. J
4 Neuroimmunol. 2005; 167(1-2):143-9. doi: 10.1016/j.jneuroim.2005.06.019
5
- 6 Lajin B, Alhaj Sakur A, Michati R, Alachkar A. Association between MTHFR C677T
7 and A1298C, and MTRR A66G polymorphisms and susceptibility to schizophrenia in
8 a Syrian study cohort. Asian J Psychiatr 2012; 5:144-9. doi: [10.1016/j.ajp.2012.03.002](https://doi.org/10.1016/j.ajp.2012.03.002)
9
- 10 Lee YH, Seo YH, Kim JH, Choi SJ, Ji JD, Song GG. Meta-analysis of associations
11 between MTHFR and GST polymorphisms and susceptibility to multiple sclerosis.
12 Neurol Sci. 2015; 36(11):2089-96. doi: 10.1007/s10072-015-2318-7.
13
- 14 Li M, Fu B, Dong W. Correlations between plasma homocysteine and MTHFR gene
15 polymorphism and white matter lesions. Folia Neuropathol 2018; 56:301-7.
16 doi: 10.5114/fn.2018.80863.
17
- 18 Li X, Yuan J, Han J, Hu W. Serum levels of Homocysteine, Vitamin B12 and Folate in
19 Patients with Multiple Sclerosis: an Updated Meta-Analysis. Int J Med Sci. 2020;
20 17(6):751-61. doi: 10.7150/ijms.42058.
21
- 22 Li WX, Dai SX, Zheng JJ, Liu JQ, Huang JF. Homocysteine metabolism gene
23 polymorphisms (MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTR A2756G and MTRR A66G)
24 jointly elevate the risk of folate deficiency. Nutrients 2015; 7:6670-87. doi:
25 10.3390/nu7085303
26
- 27 Lu M, Peng K, Song L, Luo L, Liang P, Liang Y. Association between Genetic
28 Polymorphisms in Methylenetetrahydrofolate Reductase and Risk of Autoimmune
29 Diseases: A Systematic Review and Meta-Analysis. Dis Markers. 2022 May
30 31;2022:4568145. doi: 10.1155/2022/4568145
31
- 32 Miller A, Korem M, Almog R et al. Vitamin B12, demyelination, remyelination and repair
33 in multiple sclerosis. J Neurol Sci 2005; 233: 93-7. doi: 10.1016/j.jns.2005.03.009.
34

- 1 Moghaddasi M, Mamarabadi M, Mohebi N, Razjouyan H, Aghaei M. Homocysteine,
2 vitamin B12 and folate levels in Iranian patients with Multiple Sclerosis: a case control
3 study Clin Neurol Neurosurg. 2013; 115(9):1802-5. doi:
4 10.1016/j.clineuro.2013.05.007.
5
- 6 Mattson MP, Kruman II, Duan W. Folic acid and homocysteine in age-related disease.
7 Ageing Res Rev 2002; 1(1): 95-111. doi: 10.1016/s0047-6374(01)00365-7.
8
- 9 Mititelu RR, Albu CV, Bacanoiu MV, Padureanu V, Padureanu R, Olaru G, Buga AM,
10 Balasoiu M. Homocysteine as a Predictor Tool in Multiple Sclerosis. Discoveries
11 (Craiova). 2021 Sep 28;9(3):e135. doi: 10.15190/d.2021.14.
12
- 13 Naghibalhossaini F, Ehyakonandeh H, Nikseresht A, Kamali E. Association Between
14 MTHFR Genetic Variants and Multiple Sclerosis in a Southern Iranian Population. Int
15 J Mol Cell Med. 2015; 4(2):87-93.
16
- 17 Nijst TQ, Wevers RA, Schoonderwaldt HC, Hommes OR, de Haan AF. Vitamin B12
18 and folate concentrations in serum and cerebrospinal fluid of neurological patients with
19 special reference to multiple sclerosis and dementia. J Neurol Neurosurg Psychiatry.
20 1990 Nov;53(11):951-4. doi: 10.1136/jnnp.53.11.951
21
- 22 Nikfardjam M, Graf S, Hornykewycz S, Zorn G, Huber-Beckmann R, Wojta J, Huber K.
23 Homocysteine plasma levels in young patients with coronary artery disease. Relation
24 to history of acute myocardial infarction and anatomical extent of disease. Thromb.
25 Res. 2001 Sep 30;103 Suppl 1:S35-9. doi: 10.1016/s0049-3848(01)00295-x.
26
- 27 Nishi, A.; Numata, S.; Tajima, A.; Kinoshita, M.; Kikuchi, K.; Shimodera, S.; Tomotake,
28 M.; Ohi, K.; Hashimoto, R.; Imoto, I.; et al. Meta-analyses of blood homocysteine levels
29 for gender and genetic association studies of the MTHFR C677T polymorphism in
30 schizophrenia. Schizophr. Bull. 2014;40:1154–1163. doi: 10.1093/schbul/sbt154
31
- 32 Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG. Multiple Sclerosis. N
33 Engl J Med. 2000; 343:938–952.
34

- 1 Nylander A, Hafler DA. Multiple sclerosis. *J Clin Invest* 2012; 122: 1180-8. doi:
2 10.1172/JCI58649.
3
- 4 Oliveira SR, Flauzino T, Sabino BS, Kallaur AP, Alfieri DF, Kaimen-Maciel DR,
5 Morimoto HK, de Almeida ERD, Lozovoy MAB, Reiche EMV, Dichi I, Simão ANC.
6 Elevated plasma homocysteine levels are associated with disability progression in
7 patients with multiple sclerosis. *Metab Brain Disease* 2018; 33(5):1393-99. doi:
8 10.1007/s11011-018-0224-4
9
- 10 Pan L, Yin Y, Chen J, Ma Z, Chen Y, Deng X, Zhang HT, Leng H, Wu K. Homocysteine,
11 vitamin B12, and folate levels in patients with multiple sclerosis in Chinese population:
12 A case-control study and meta-analysis. *Mult Scler Relat Disord* 2019; 36:101395. doi:
13 10.1016/j.msard.2019.101395.
14
- 15 Petras M, Tatarkova Z, Kovalska M, Mokra D, Dobrota D, Lehotsky J, Drgova A.
16 Hyperhomocysteinemia as a risk factor for the neuronal system disorders. *J Physiol*
17 *Pharmacol.* 2014; 65(1):15-23.
18
- 19 Raghubeer S, Matsha TE. Methylene tetrahydrofolate (MTHFR), the One-Carbon Cycle,
20 and Cardiovascular Risks. *Nutrients.* 2021; 13(12):4562. doi: 10.3390/nu13124562.
21
- 22 Ramsaransing GS, Fokkema MR, Teelken A, Arutjunyan AV, Koch M, De Keyser J.
23 Plasma homocysteine levels in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.*
24 2006; 77(2):189-92. doi: 10.1136/jnnp.2005.072199.
25
- 26 Reynolds EH, Bottiglieri T, Laundry M, Crellin RF, Kirker SG. Vitamin B12 metabolism
27 in multiple sclerosis. *Arch Neurol.* 1992 Jun;49(6):649-52. doi:
28 10.1001/archneur.1992.00530300089014.
- 29 Reynolds, E. Vitamin B12, folic acid, and the nervous system. *Lancet Neurol.* 2006;
30 5(11): 949-60. doi: 10.1016/S1474-4422(06)70598-1.
31
- 32 Ríó J, Montalban J, Tintoré M, Codina A, Malinow MR. Serum homocysteine levels in
33 multiple sclerosis. *Arch Neurol.* 1994 Dec;51(12):1181. doi:
34 10.1001/archneur.1994.00540240025007.

- 1 Russo C, Morabito F, Luise F, Piromalli A, Battaglia L, Vinci A, Trapani Lombardo V,
2 de Marco V, Morabito P, Condino F, Quattrone A, Aguglia U. Hyperhomocysteinemia
3 is associated with cognitive impairment in multiple sclerosis. *J. Neurol.* 2008; 255 (1):
4 64–69. doi.org/10.1007/s00415-007-0668-7
5
- 6 Sandyk R, Awerbuch GI. Vitamin B12 and its relationship to age of onset of multiple
7 sclerosis. *Int J Neurosci.* 1993 Jul-Aug;71(1-4):93-9. doi:
8 10.3109/00207459309000596.
9
- 10 Sahin S, Aksungar FB, Topkaya AE, Yildiz Z, Boru UT, Ayalp S, Karsidag S. Increased
11 plasma homocysteine levels in multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2007; 13(7):945-6. doi:
12 10.1177/1352458506075503.
13
- 14 Salemi G, Gueli MC, Vitale F, Battaglieri F, Guglielmini E, Ragonese P, Trentacosti A,
15 Massenti MF, Savettieri G, Bono A. Blood lipids, homocysteine, stress factors, and
16 vitamins in clinically stable multiple sclerosis patients. *Lipids Health Dis.* 2010 Feb
17 18;9:19. doi: 10.1186/1476-511X-9-19.
18
- 19 Selhub J. Homocysteine metabolism. *Annu Rev Nutr.* 1999;19:217–46.
20 doi:10.1146/annurev.nutr.19.1.217.
21
- 22 Seshadri S. Elevated plasma homocysteine levels: risk factors or risk marker for the
23 development of dementia and Alzheimer’s disease? *J Alzheimer Dis.* 2006; 9:393–
24 398. doi: 10.3233/jad-2006-9404
25
- 26 Skovierová H, Mahmood S, Blahovcová E, Hatok J, Lehotský J, Murín R. Effect of
27 homocysteine on survival of human glial cells. *Physiol. Res.* 2016; 64: 747–754.
28
- 29 Sharma M, Tiwari M, Tiwari RK. Hyperhomocysteinemia: Impact on
30 Neurodegenerative Diseases *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2015;117(5):287-96. doi:
31 10.1111/bcpt.12424.
32
- 33 Sternberg Z, Leung C, Sternberg D, Li F, Karmon Y, Chadha K, Levy E. The
34 prevalence of the classical and non-classical cardiovascular risk factors in multiple

- 1 sclerosis patients. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2013 Feb 1;12(1):104-11. doi:
2 10.2174/18715273111312010016.
- 3
- 4 Tajouri L, Martin V, Gasparini C, Ovcarić M, Curtain R, Lea RA, Haupt LM, Csurhes P,
5 Pender MP, Griffiths LR. Genetic investigation of methylenetetrahydrofolate reductase
6 (MTHFR) and catechol-O-methyl transferase (COMT) in multiple sclerosis. *Brain Res*
7 *Bull*. 2006; 69(3):327-31. doi: 10.1016/j.brainresbull.2006.01.005.
- 8
- 9 Teunissen CE, Killestein J, Kragt JJ, Polman CH, Dijkstra CD, Blom HJ. Serum
10 homocysteine levels in relation to clinical progression in multiple sclerosis. *J Neurol*
11 *Neurosurg Psychiatry* 2008;79(12):1349-1353.
- 12
- 13 Triantafyllou N, Evangelopoulos ME, Kimiskidis VK, Kararizou E, Boufidou F,
14 Fountoulakis KN, Siamouli M, Nikolaou C, Sfagos C, Vlaikidis N, Vassilopoulos D.
15 Increased plasma homocysteine levels in patients with multiple sclerosis and
16 depression. *Ann Gen Psychiatry*. 2008; 9;7:17. doi: 10.1186/1744-859X-7-17.
- 17
- 18 Ueland PM, Hustad S, Schneede J, Refsum H, Vollset SE. Biological and clinical
19 implications of the MTHFR C677T polymorphism. *Trends Pharmacol Sci*. 2001;
20 22:195-201. doi: 10.1016/s0165-6147(00)01675-8
- 21
- 22 Vrethem M, Mattsson E, Hebelka H, Leerbeck K, Osterberg A, Landtblom AM, Balla
23 B, Nilsson H, Hultgren M, Brattström L, Kågedal B. Increased plasma homocysteine
24 levels without signs of vitamin B12 deficiency in patients with multiple sclerosis
25 assessed by blood and cerebrospinal fluid homocysteine and methylmalonic acid. *Mult*
26 *Scler*, 2003; 9(3): 239-245.
- 27
- 28 Yoshitomi R, Nakayama K, Yamashita S, Kumazoe M, Lin T-A, Mei C-Y, Marugame
29 Y, Fujimura Y, Maeda-Yamamoto M, Kuriyama S, et al. Plasma homocysteine
30 concentration is associated with the expression level of folate receptor 3. *Sci Rep*.
31 2020; 10:10283. doi: 10.1038/s41598-020-67288-9.
- 32

- 1 Yuyun MF, Ng LL, Ng GA. Endothelial dysfunction, endothelial nitric oxide
2 bioavailability, tetrahydrobiopterin, and 5-methyltetrahydrofolate in cardiovascular
3 disease. Where are we with therapy? *Microvasc. Res.* 2018; 119: 7–12.
4
- 5 Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S, Rozen R. A second genetic polymorphism
6 in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme
7 activity. *Mol Gen Metab.* 1998; 64:169–172. doi: 10.1006/mgme.1998.2714.
8
- 9 Zeng Q, Li F, Xiang T et al. Influence of food groups on plasma total homocysteine for
10 specific MTHFR C677T genotypes in Chinese population. *Mol Nutr Food Res.* 2017;
11 61(2):1600351. doi: 10.1002/mnfr.201600351
12
- 13 Zoccolella S, Tortorella C, Iaffaldano P, Direnzo V, D’Onghia M, Paolicelli D, Livrea P,
14 Trojano M. Elevated plasma homocysteine levels in patients with multiple sclerosis are
15 associated with male gender. *J. Neurol.* 2012; 259 (10), 2105–2110.
16
- 17 Zhu Y, He ZY, Liu HN. Meta-analysis of the relationship between homocysteine,
18 vitamin B(1)(2), folate, and multiple sclerosis. *J Clin Neurosci*, 2011, 18(7): 933-938.
19 doi: 10.1016/j.jocn.2010.12.022.
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33

1 **Table 1** Results of homocysteine, folate and vitamin B12 in patients with multiple
 2 sclerosis and controls in different population worldwide

Country	Design	Sample	Hcy	Folate	Vit B12	Reference
Netherlands	Retrospective	58 MS 40 OND ^a 157 NC ^b	NA	NS	NS	Nijst et al. (1990)
England	Case-control	29 MS 17 NC ^c 31 HC	NA	NA	↓MS	Reynolds et al. (1992)
USA	Case-control	28 RRMS 17 PMS Age onset of disease <18 years (n=10) and > 18 years (n=35)	NA	NA	↓ in those who the age of onset of MS <18 years	Sandyk; Awerbuch (1993)
Spain	Case-control	38 MS 20 HC	NS	NA	NA	Rio et al. (1994)
Turkey	Case-control	24 SPMS 24 HC	NS MS vs. HC. ↑ Hcy in MS when vit B12 and folate were lower	NS	NS	Besler et al. (2003)
Sweden	Case-control	72 MS 23 HC	↑ MS	NS	NS	Vrethem et al. (2003)
Iran	Case-Control	35 MS 30 HC	↑ MS	NA	NA	Ashtari et al. (2005)
Netherlands	Case-control	88 MS 57 HC	↑ MS	NS	NS	Ramsaransing et al. (2006)
Turkey	Case-control	30 RRMS 21 HC	↑ MS	NS	NS	Sahin et al. (2007)

Country	Design	Sample	Hcy	Folate	Vit B12	Reference
Turkey	Case-control	42 RRMS 31 HC	↑ in RRMS vs HC, in both sexes	NS	NS	Aksungar et al. (2008)
Italy	Case-control	MS: 94 HC: 53	↑MS	NS (MS: 24 HC: 35)	NA	Russo et al. (2008)
Netherlands	Case-control	219 MS 152 HC	NS	NA	NA	Teunissen et al. (2008)
Greece	Case-control	65 RRMS 60 HC	↑ RRMS	NS	NS	Triantafyllou et al. (2008)
Turkey	Case-control	35 MS 30 HC	NS	NS	NS	Kocer et al. (2009)
Italy	Case-control	28 RRMS 12 SPMS 80 HC	↑ in MS vs HC NS in SPMS vs RRMS	NS	NS	Salemi et al. (2010)
	Meta-analysis	639 MS 430 HC	↑MS	NS	↓MS	Zhu et al. (2011)
Iran	Case-control	75 RRMS 75 HC	↑MS	↓MS	↓MS	Moghaddasi et al. (2013)
Greece	Case-control	46 MS 42 HC	NS	NA	NA	Kararizou et al. (2013)
USA	Case-control	206 MS 142 NC ^d	NA	↑MS	↓MS	Sternberg et al (2013)
Slovakia	Case-control	45 MS 37 HC	NS	NA	NA	Bystrichá et al (2017)
	Meta-analysis	1013 MS 843 HC	↑MS	NS	NS	Dardiotis et al. (2017)
Poland	Case-control	25 RRMS 36 SPMS 44 HC	↑ RRMS vs. HC	NA	NA	Jamroz-Wisniewska et al. (2017)

Country	Design	Sample	Hcy	Folate	Vit B12	Reference
			↑ SPMS vs. HC			
Slovakia	Case-control	169 MS (139 RRMS + 30 SPMS) 38 HC	NS	NA	NA	Durfinová et al (2018)
Egypt	Case-control	45 MS 20 HC	NS ↑ in patients with cognitive dysfunction	NS	NS	Fahmy et al., (2018)
Brazil	Case-control	152 RRMS 20 SPMS 8 PPMS 204 HC	↑ in MS vs. HC ↑ SPMS+PP MS vs. RRMS	NA	NA	Oliveira et al (2018)
China	Case-control	80 MS 80 HC	↑ HHcy in MS than HC	NS	↓ in MS with relapse	Pan et al. (2019)
China	Meta-analysis	80 MS 80 HC 86 NC ^e	↑ MS	NS	↓ in relapsing Ms than HC	Pan et al. (2019)
Brazil	Longitudinal T0, T8, T16	119 RRMS 18 SPMS 3 PPMS	↑ in SPMS +PPMS vs. RRMS ↑ in T0 predicted disability in T16	↓ in T16 vs T0 ↓ in T8 predicted disability	NA	De Carvalho et al. (2020)

Country	Design	Sample	Hcy	Folate	Vit B12	Reference
	Meta-analysis	1738 MS 1424 HC	↑ in MS than HC; ↑ in RRMS than HC	NS	NS	Li et al. (2020)
Romania	Case-Control	10 RRMS 10 SPMS 10 HC	↑ in MS ↑ SPMS than RRMS	↓ in SPMS than RRMS	↓ in SPMS than RRMS	Mititelu et al. (2021)

1 ↑: increased; ↓: decreased; OND: other neurological diseases; NC: neurological
2 controls; HC: healthy controls; MS: multiple sclerosis, RRMS: relapsing-remitting MS,
3 SPMS: secondary progressive MS, PPMS: primary progressive MS, NA: not analyzed,
4 NS: Not Significant, HHcy: hyperhomocysteinemia; T0: sample obtained in the
5 baseline; T8: sample obtained after 8 months of follow-up; T16: sample obtained after
6 16 months of follow-up; a: Myelopathy, Alzheimer's type dementia; non-Alzheimer'
7 type dementia; b: patients with a neurological disease from which no association with
8 low vitamin B12 or low folate concentrations is known. c: 32 had tension headache, 27
9 migraine, 15 spondylotic lumbar or cervical spinal diseases, six benign intracranial
10 hypertension, and two had peripheral vestibular disease; d: patients suffering from
11 meningiomas and acoustic neuromas, non-inflammatory, non-autoimmune diseases
12 of the brain; e: patients with peripheral vertigo or sleep disorders.

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

1 **Table 2. Frequency and effects of the *MTHFR* 677 C>T genetic variant in patients**
 2 **with multiple sclerosis in different population worldwide**

Population	Design	Sample	Frequency*	Effect	Reference
Sweden	Case-control	150 MS 95 HC 15 HC partner of MS	CC: 57% CT:37% TT:6.0%	NS	Huang et al (1997)
Australian	Case-control	104 MS patients 104 controls	CC:53.0% CT:31.0% TT:16.0%	NS	Tajouri et al. (2006)
German	Case-control	138 RRMS patients 138 age-and sex-matched controls		NS	Klotz et al. (2010)
Iranian	Case-Control	194 patients (151 RRMS 14 SPMS 29 PPMS) 230 sex-and age-matched controls	CC:54.1% CT: 38.2% TT: 7.7%	T allele was associated with MS and the development of disease almost 4 years sooner	Alatab et al. (2011)
Tunisian	Case-Control	80 MS patients 200 age-and sex-matched controls	CC: 48.7% CT: 47.5% TT: 3.75%	NS	Fekih-Mrissa et al. (2013b)

Population	Design	Sample	Frequency*	Effect	Reference
Turkish	Case- Control	130 MS patients: (126 RRMS+4 SPMS) 150 matched controls	CC: 42.3% CT: 50.8% TT: 6.9%	T allele was associated with MS susceptibility; the association was observed in the dominant model (CC versus CT + TT genotypes)	Cevik et al. (2014)
Iranian	Meta-analysis	1179 MS patients 1361 controls		NS	Lee et al. (2015)
Iranian	Case- Control	180 MS patients (128 RRMS, 43 SPMS, 9 PPMS) 231 age-and sex-matched controls	CC:35.0% CT:46.1% TT:18.9%	CT genotype showed association with MS in recessive and codominant models	Naghibalh ossaini et al. (2015)
Turkish	Case- Control	80 MS patients: 55 RRMS, 15 SPMS and 10 PPMS 80 controls	CC:40.0% CT:37.5% TT: 22.5%	The frequency of the TT genotype was higher in MS than controls	Cakina et al. (2019)
Polish	Case- control	174 RRMS patients 186 HC	CC:54.0% CT:38.5% TT:7.5%	NS for the MS susceptibility	Choraży et al. (2019)

Population	Design	Sample	Frequency*	Effect	Reference
Turkish	Meta-analysis	1227MS patients 1426 controls		The TT genotype in a recessive model was associated with MS and could be a risk factor for MS (OR: 1.57, 95% CI: 1.03-2.38)	Lu et al. (2022)

1 *: frequency of MTHFR 677 C>T genotypes in MS patients; MS: multiple sclerosis,
2 RRMS: relapsing-remitting MS, SPMS: secondary progressive MS, PPMS: primary
3 progressive MS; NS: no significant; OR: odds ratio; CI: confidence interval; MTHFR:
4 methylenetetrahydrofolate reductase; CC: homozygous genotype for the C allele
5 (major); TT: homozygous genotype for the T allele (variant); CT: heterozygous
6 genotype for the C and T alleles.

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

1 **ARTIGO 2**

2 **The effects of the *MTHFR* 677C>T (rs1801133) genetic variant on susceptibility and disability**
3 **worsening in multiple sclerosis patients are mediated by homocysteine**

4 Claudia Mara Ribeiro¹, Sayonara Rangel Oliveira^{1,2}, Tamires Flauzino³, Daniela Frizon Alfieri⁴, Andrea
5 Name Colado Simão^{1,2}, Marcell Alysson Batisti Lozovoy^{1,2}, Michael Maes^{5,6}, Edna Maria Vissoci
6 Reiche^{1,7,8}

7

8 ¹ Postgraduate Program of Clinical and Laboratory Pathophysiology, Health Sciences Center, State
9 University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil;

10 ² Department of Pathology, Clinical Analysis, and Toxicology, Health Sciences Center, State University of
11 Londrina, Paraná, Brazil;

12 ³ Experimental Pathology Postgraduate Program, Biological Sciences Center, State University of Londrina,
13 Londrina, Paraná, Brazil;

14 ⁴ Department of Pharmaceutical Sciences, Health Sciences Center, State University of Londrina, Londrina,
15 Paraná, Brazil

16 ⁵IMPACT Strategic Research Centre, School of Medicine, Deakin University, Geelong, Victoria,
17 Australia;

18 ⁶Department of Psychiatry, King Chulalongkorn Memorial Hospital, Chulalongkorn, Bangkok,
19 Thailand

20 ⁷Postgraduate Program of Clinical and Laboratory Pathophysiology, Health Sciences Center, State
21 University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil;

22 ⁸Catholic Pontifical University, School of Medicine, Campus Londrina, Health Sciences Center, State
23 University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil

24

25 **Address for correspondence:** Edna Maria Vissoci Reiche, Postgraduate Program of Clinical and
26 Laboratory Pathophysiology, Health Sciences Center, State University of Londrina, Londrina, Paraná,

1 Brazil; Av. Robert Koch, 60, CEP 86.038-440, Londrina, Paraná, Brazil. Phone/FAX number: +55-43-
2 3371-2619. e-mail: reiche@sercomtel.com.br ORCID: 0000-0001/6507-2839.

3

4 **Author's email and ORCID:**

5 Claudia Mara Ribeiro - maraclaudia16@gmail.com; ORCID: 0000-0001-8976-7993

6 Sayonara Rangel Oliveira – sayonaracazarin@gmail.com; ORCID: 0009-0000-7673-2329

7 Tamires Flauzino – t.flauzino@hotmail.com; ORCID: 0000-0001-6658-8810

8 Daniela Frizon Alfieri – frizon.alfieri@gmail.com; ORCID: 0000-0002-0217-9329

9 Andrea Name Colado Simão – deianame@uel.br; ORCID: 0000-0002-2073-6782

10 Marcell Alysson Batisti Lozovoy – marcell_lozovoy@hotmail.com; ORCID: 0000-0002-4023-9548

11 Michael Maes – dr.michaelmaes@hotmail.com; ORCID: 0000-0002-2012-871X

12 Edna Maria Vissoci Reiche – reiche@sercomtel.com.br; ORCID: 0000-0001-6507-2839

13

14 **Funding**

15 The study was supported by Coordination for the Improvement of Higher Level of Education Personnel
16 (CAPES) of Brazilian Ministry of Education: Finance Code 001.

17

18 **Conflict of interest**

19 There is no conflict of interest to declare. None of the authors are involved in the publication process or
20 have a financial or other beneficial interest in the products or concepts mentioned in the submitted
21 manuscript.

22

23 **Availability of data and material**

24 The data and materials are available.

25

26 **Authors' contributions**

27 1) conception and design of the study: ANCS, EMVR, MM; 2) acquisition of data: CMR, SRO, TF,
28 DFA; 3) laboratory analysis: CMR, TF, DFA, MABL; 4) statistical analysis: MM; 5) analysis and

1 interpretation of data: CMR, SRO, ANCS, MM, EMVR; 5) drafting of the manuscript, tables and
2 figures: CMR, SRO, MM, EMVR; 6) manuscript review: CMR, SRO, MM, EMVR. All authors have
3 read and approved the final manuscript.

4

5 **Compliance with ethical standards**

6 The protocol was approved by the Institutional Research Ethics Committees of University of
7 Londrina, Paraná, Brazil (CAAE: 22290913.9.0000.5231) and all of the individuals invited were
8 informed in detail about the research and gave written informed consent.

9

10 **Human rights**

11 All procedures performed in this study involving human participants were in accordance with
12 the ethical standards of the Institution and/or National Research Committee and with the World Medical
13 Association 1964 Helsinki Declaration.

14

15 **Standards for reporting**

16 The manuscript was prepared taken into account the recommendations of the guidelines hosted
17 by the Strengthening the Reporting of Observational studies in Epidemiology (STROBE). STROBE is
18 used for observational studies (cohort, case-control, or cross-sectional designs) according to the
19 STROBE statement (www.strobe-statement.org)

20

21 **Consent to participate**

22 Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

23

24 **Consent for publication**

25 The studied participants were informed about the present research, and a written consent form
26 was taken from all of them before their enrollment. Moreover, all the authors and co-authors participated
27 and contributed sufficiently in the research, and all of them concur with the submission. The manuscript
28 has been approved by the responsible authorities where the work was carried out.

1 **Abstract**

2 The aim was to investigate the association between *MTHFR* 677C>T (rs1801133) variant, homocysteine
3 and folate levels with multiple sclerosis (MS) susceptibility, disability worsening and disability
4 progression. One hundred and sixty-three MS patients and 226 controls were included. The patients
5 were categorized using the Expanded Disability Status Scale (EDSS) as mild (EDSS<3) and
6 moderate/high (EDSS≥3) disability. Disability progression was evaluated using Multiple Sclerosis
7 Severity Score (MSSS) and the *MTHFR* 677C>T variant was genotyped using real time polymerase
8 chain reaction. Plasma levels of some inflammatory biomarkers were determined. The results showed
9 no association between the *MTHFR* 677 C>T genotypes and MS susceptibility, disability and disability
10 progression ($p>0.05$); 21.8% of the disability variance was explained by age, inflammatory activity
11 index (IAI) and C-reactive protein (CRP) (all positively associated); 54.4% of the severity index (MS-
12 EDSS-MSSS) was explained by the regression on age, IAI, homocysteine, folate, and CRP (all
13 positively) and adiponectin, body mass index, and 25-hydroxyvitamin D (all negatively), female sex and
14 the *MTHFR* 677 TT genotype. In patients and controls, 16.6% of the variance in the homocysteine was
15 explained by the *MTHFR* 677 TT genotype and age (both positively), folate (negatively) and male sex.
16 In conclusion, The *MTHFR* 677C>T variant was not directly associated with MS susceptibility,
17 disability, and disability progression; however, the TT genotype showed indirect effects on MS
18 susceptibility and disability mediated by homocysteine.

19

20 **Keywords:** multiple sclerosis; methylenetetrahydrofolate reductase; *MTHFR*; homocysteine; folate;
21 inflammation

22

23

24

25

1 1. Introduction

2 Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory illness caused by an autoimmune response.
3 It is characterized by demyelination of the central nervous system (CNS), which is frequently followed
4 by progressive and irreversible neurological impairment. Although the etiology of MS is not fully
5 characterized, it has been recognized that interactions between genetic and environmental variables
6 contribute to the autoimmune inflammatory process (Karussis et al., 2014). Vitamin D, folate, and B12
7 deficiency, as well as elevated homocysteine levels, are all significant environmental variables related
8 with the pathogenesis of MS (Oliveira et al 2018a; Ineichen et al., 2014; Nylander and Hafler, 2012;
9 Zhu et al., 2011; Miller et al 2005; Dyment et al. 2004; Sumelahti et al., 2003).

10 Hyperhomocysteinemia, or elevated homocysteine levels, may have harmful effects on neurons
11 and blood vessels, including endothelial dysfunction and oxidative damage, contributing to the
12 development of neurodegenerative disorders such as MS (Pan et al., 2019; Seshadri, 2006; Faraci and
13 Lentz, 2004; Ho et al., 2002). Previous research has revealed elevated plasma homocysteine levels in
14 patients with MS when compared to healthy controls (Oliveira et al., 2018a; Moghaddasi et al., 2013;
15 Ramsaransing et al., 2006). Homocysteine levels are significantly higher in MS patients than in controls,
16 as well as in those with moderate/high disability compared to those with mild disability (Oliveira et al.,
17 2018a). Discrepancies have been observed regarding the relationships between MS and plasma
18 homocysteine, vitamin B12, and folate levels. While some studies found that MS patients had higher
19 homocysteine levels and lower vitamin B12 and folate levels than controls (Janroz-Wisniewska et al.,
20 2017; Moghaddasi et al., 2013), others found no difference in homocysteine, vitamin B12, or folate
21 levels between MS patients and controls (Kocer et al., 2009; Teunissen et al 2008; Triantafyllou et al.,
22 2008).

23 Homocysteine is a pro-inflammatory biomarker whose plasma levels are controlled by a variety
24 of physiological and acquired factors and their interactions, including age, sex, medications, and
25 *MTHFR* genetic variations (Zeng et al., 2017; Ghosh et al., 2007; Nikfardjam et al., 2001). The *MTHFR*
26 gene encodes methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR), a critical enzyme involved in the
27 metabolism of folate and homocysteine (Goyette et al., 1998). MTHFR catalyzes the reduction of 5,10-
28 methylenetetrahydrofolate to 5-methylenetetrahydrofolate, the predominant folate form in plasma and a

1 carbon donor for homocysteine remethylation to methionine (Brattström et al., 1998). Numerous genetic
2 variations in the *MTHFR* have been found, the most studied and clinically significant of which is the
3 677C>T (rs1801133) in exon 4, which results in the substitution of alanine for valine at position 222
4 (p.Ala222Val or A222V) of the protein (Weisberg et al., 1998; Frosst et al., 1995). There have been
5 reports of racial-ethnic disparities in the distribution of the *MTHFR* 677C>T variant (Kim et al., 2002;
6 Franco et al., 1998), as well as a relationship between the *MTHFR* 677C>T variant and homocysteine
7 levels in MS patients (Li et al., 2015; Fekih-Mrissa et al., 2013; Lajin et al., 2012; Fong et al., 2011; Li
8 et al., 2008).

9 Regarding the association between the *MTHFR* 677 C>T genetic variant and MS, three case-
10 control studies established a relationship between the T allele and MS (Cakina et al., 2019; Cevik et l.,
11 2014; Naghibalhossaini et al., 2015), while others (Alatab et al., 2011; Ferih-Mrissa et al., 2013; Klotz
12 et al., 2010; Tajouri et al., 2006) did not. A two-sample of Mendelian Randomization study (Peng et al
13 2021) carried out in European descent population showed a negative association between 13 genetically
14 predicted higher circulating homocysteine levels and MS risk, including the *MTHFR* 677 C>T
15 (rs1801133). These results point to the need for additional studies involving individuals from genetically
16 different populations. Moreover, given the lack of knowledge regarding the relationship between
17 *MTHFR* 677C>T (rs1801133), homocysteine, and folate in MS patients and their role in the clinical
18 course of the disease, the purpose of this study was to determine whether the *MTHFR* 677C>T variant
19 and plasma homocysteine and folate levels are associated with MS susceptibility, as well as with
20 disability, disability progression, and inflammatory biomarkers.

21

22 **2. Material and methods**

23 2.1 Subjects

24 The case-control study included 163 MS patients, adults and both sexes, consecutively recruited
25 from the Demyelinating Diseases Outpatient of the State University of Londrina, Londrina, Paraná,
26 South Brazil, one of the specialized reference centers for the diagnosis and treatment of MS at the Parana

1 State, Southern Brazil. The MS diagnosis was established according to the McDonald criteria (Polman
2 et al, 2011). The patients were clinically evaluated for disability using the Expanded Disability Status
3 Scale (EDSS) (Kurtzke, 1983). Based on their EDSS scores, the patients were divided into two groups:
4 EDSS < 3 (mild disability) and EDSS \geq 3 (moderate/high disability). Disability progression was
5 evaluated using the Multiple Sclerosis Severity Score (MSSS), as proposed elsewhere (Roxburg et al.,
6 2005) and score \geq 5.0 denoted higher than the average speed of disability accumulation (Koch et al.,
7 2005).

8 All MS patients were in the remission clinical phase, defined as the period of recovery with no
9 relapse episodes within the last three months prior to the time of enrollment in the study. As controls,
10 226 healthy individuals (HC) were selected among blood donors of the Regional Blood Bank of
11 Londrina, from the same geographic region of the MS patients. None of the study's participants had
12 clinical symptoms or laboratory biomarkers for cardiovascular, thyroid, kidney, hepatic, gastrointestinal,
13 or oncologic disorders, as well as other inflammatory and autoimmune diseases. Demographic,
14 epidemiological, and anthropometric data (for MS patients and HC), as well as clinical history and the
15 use of therapy for MS before the inclusion in this study (for MS patients) were obtained using a standard
16 questionnaire at the admission of the individuals. Body mass index (BMI) was calculated as weight (kg)
17 divided by height (m) squared and the ethnicity was classified according to individual's self-perception
18 of skin color as Caucasian and non-Caucasian (Brazil, 2011). Other data were obtained including waist
19 circumference, current smoking, systemic arterial hypertension (SAH), metabolic syndrome (MetS)
20 (Grundy et al., 2006) and type 2 diabetes mellitus (T2DM). Systolic blood pressure (SBP) and diastolic
21 blood pressure (DBP) were measured twice and the mean of these two measurements was used in the
22 analysis. Moreover, use of antihypertensive medication was an indication of SAH (James et al., 2014).
23 T2DM was defined as a fasting serum glucose \geq 126 mg/dL and/or use of hypoglycemic medication
24 (American Diabetes Association, 2014).

25 The protocol was approved by the Institutional Research Ethics Committees of University of
26 Londrina, Paraná, Brazil (CAAE: 22290913.9.0000.5231) and all of the individuals invited were
27 informed in detail about the research and gave written informed consent.

1 2.2 Blood samples

2 Peripheral blood samples were drawn after 12 h of fasting using vacuo system tubes
3 (Vacutainer System™, Becton-Dickinson, New Jersey, U.S) with and without ethylenediamine tetra-
4 acetic acid (EDTA) as anticoagulant. The specimens were centrifuged at 2,500 rpm for 10 minutes
5 within 2 hours after sampling. The buffy-coat, plasma and sera were frozen at -80° C until analysis.

6 7 8 2.3 MTHFR 677C>G Genetic Variant Genotyping

9 Genomic DNA was extracted from the buffy-coat of peripheral blood cells using a resin column
10 procedure (Biopur, Biometrix Diagnostika, Curitiba, Brazil) following the manufacturer's instructions.
11 DNA concentration was measured using a spectrophotometer at 260 nm (NanoDrop 2000c™, Thermo
12 Scientific, Waltman, MA, USA) and the DNA purity was assessed by 260/280 nm ratio. The *MTHFR*
13 677C>T (rs1801133) variant was determined using TaqMan™ allelic discrimination validated assay on
14 real-time polymerase chain reaction (qPCR) system (StepOne™, Applied Biosystems by Life
15 Technologies, Carlsbad, CA, USA) with the allele-specific fluorogenic oligonucleotide probe
16 (C__1202883_20). The reaction was performed using 5 ng of genomic DNA, 0.25 µL TaqMan™ SNP
17 Genotyping Assay 40x (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) containing two sequence-specific
18 primers and two allele-specific TaqMan™ MGB probes with a reporter dye at its 5' end (VIC™ or
19 FAM™), 5 µL TaqMan™ Universal Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Negative
20 and positive controls were also included in the reactions.

21 22 2.4 Inflammatory Biomarkers

23 Plasma levels of homocysteine, folate, and vitamin D, measured as 25 dihydroxyvitamin D [25-
24 OH)D] were determined by chemiluminescence microparticle immunoassay (CMIA, Architect™,
25 Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, USA). The reference values for homocysteine are up to 9.0 µmol/L
26 (male) and up to 7.0 µmol/L (female); for the folate, the values are 3.1-20.5 ng/mL, as recommended by
27 the manufacturers. Uric acid plasma levels were evaluated using a biochemical auto-analyzer
28 (Dimension Dade™ AR Dade Behring, Deerfield, IL, USA). C-reactive protein (CRP) determined with
29 high sensitivity assay (hsCRP) using turbidimetry (Architect C8000™, Abbott Laboratory, Abbott Park,

1 IL, USA), and plasma levels of interleukin (IL)-2, IL-4, IL-6, IL-10, interferon (IFN)- γ , tumor necrosis
2 factor (TNF)- α , soluble TNF- α receptor (sTNFR)1 and sTNFR2 were determined using
3 immunofluorimetric method with microspheres multiplex immunoassay (Novex™ Life Technologies,
4 Frederick, USA) for Luminex platform in MAGPIX™ instrument (Luminex Corp., TX, USA).

5 Two new composed scores were proposed in the present study: the first, namely as inflammatory
6 activity index (IAI), was entered as a latent vector extracted from macrophage M1 cytokines (IL-6 and
7 TNF- α) + T helper (Th)1 cytokines (IL-2 and IFN- γ) + Th17 cytokines (IL-6 and IL-17), Th2+T
8 regulatory (Treg) cytokines (IL-4 and IL-10) and TNF- α +sTNFR1+sTNFR2. The second score, namely
9 MS-severity index (MS+ EDSS+MSSS) was entered as a latent vector extracted from the EDSS and
10 MSSS scores and the diagnosis of MS.

11

12 *2.5 Statistical analysis*

13 Analysis of variance (ANOVA) was employed to assess differences in continuous variables
14 between study groups, and analysis of contingency tables (chi-square test or Exact Fisher test when
15 appropriate) to check associations between classifications. Univariate general linear models (GLM)
16 analysis was performed to assess the differences in biomarkers between three subgroups (HC and two
17 patient classes). Multiple pair-wise differences were assessed with protected Least Significant
18 Difference (LSD) tests. Automatic multiple regression analysis was employed to predict dependent
19 variables (e.g., the EDSS or MSSS scores) using explanatory variables (e.g., biomarkers, age, sex, and
20 BMI). An automatic stepwise (step-up) method was used with a p-to-enter of 0.05 and p-to-remove 0.06
21 while checking R^2 changes, homoscedasticity (using White and modified Breusch-Pagan tests for
22 homoscedasticity), multicollinearity (using tolerance and VIF), and multivariate normality (Cook's
23 distance and leverage). Results of multiple comparisons were p-corrected for false discovery rate (FDR)
24 (Benjamini and Hochberg, 1995). Automatic binary logistic regression analysis was conducted with MS
25 or MS subgroups as dependent variables and the biomarkers as input variables. Odds ratios (OR) with
26 95% confidence intervals (CI) and the accuracy of classification (with sensitivity and specificity) were
27 computed and Nagelkerke's pseudo- R^2 values were used as effect size measurement. The results of these

1 regression analyses were always bootstrapped using 5.000 bootstrap samples and the latter results are
2 shown if the results are not concordant. All tests are two-tailed and a p-value of 0.05 was employed to
3 determine statistical significance. Statistical analyses were carried out using IBM SPSS Windows
4 version 25, 2017.

5 Partial Least Squares (SmartPLS) analysis (Ringle et al., 2005) was used to measure the multi-
6 step multiple mediation associations between biomarkers (input variables) and the MS-severity index.
7 The latter was entered as a latent vector extracted from the EDSS and MSSS scores and the diagnosis
8 MS (MS+EDSS+MSSS). All biomarkers were entered as single indicators except IAI, which was
9 entered as a latent vector extracted from different immune profiles. Both latent vectors were entered as
10 reflective models. Consequently, complete PLS path analysis using 5.000 bootstrap samples was
11 performed only when the outer and inner models complied with pre-specified quality data: a) all outer
12 model loadings on both latent vectors are > 0.7 at $p < 0.001$ and all latent vectors show good construct
13 validity as indicated by Cronbach's alpha (> 0.7), composite reliability (> 0.7), rho A (> 0.8), and
14 average variance extracted (AVE) > 0.5 ; b) the overall fit of the model is adequate as indicated by
15 Standardized Root Mean Squared Residual (SRMR) < 0.08 ; and c) Confirmatory Tetrad analysis
16 indicates that both latent vectors models are not mis-specified as reflective models. PLS predict with
17 10-fold cross-validation was used to assess the predictive performance when analyzing new data.
18 Predicted-Oriented Segmentation analysis, Multi-Group Analysis and Measurement Invariance
19 Assessment were employed to examine compositional invariance.

20

21 3. Results

22 3.1 Sociodemographic and clinical data

23 **Table 1** shows the sociodemographic and clinical data of the HC and MS patients divided into
24 those with and without an increased EDSS score (≥ 3 as threshold value). This table presents the data on
25 all HC and the selected group of MS patients who were not treated with folic acid ($n=141$) because all
26 computations (except the genotypic associations) are calculated using this data set. Among these 141

1 MS patients, 58 (41.1%) presented mild disability (EDSS <3) and 83 (58.9%) presented moderate/high
2 disability (EDSS \geq 3). Univariate analysis showed that MS patients with moderate/high disability were
3 older and showed a higher frequency of MetS than those with mild disability and HC ($p < 0.001$). Patients
4 with moderate/high disability showed a higher frequency of SAH and T2DM than HC ($p = 0.011$ and
5 $p = 0.049$, respectively). There were no significant differences regarding sex, BMI, ethnicity and smoking
6 between the three study groups. Patients with moderate/high disability showed higher duration of disease
7 and disability progression than those with mild disability ($p < 0.001$). There were significantly more
8 patients with progressive clinical forms (SPMS+PPMS) in the patient group with EDSS \geq 3 as compared
9 with the EDSS < 3 group.

10 3.2 Biomarker data in MS subgroups

11 **Table 2** shows the biomarker assessment in HC and MS patients divided into two subgroups
12 using the EDSS score. The table (calculated on the selected study groups) shows the measurements of
13 the non-genetic biomarkers in the study groups. We found that folate and homocysteine were
14 significantly higher in MS patients than in HC, whereas adiponectin was reduced in both patient groups.
15 There were no significant differences in 25(OH)D and uric acid between the three groups. CRP was
16 higher in patients with an EDSS score \geq 3 *versus* those with EDSS < 3; however, the difference was not
17 significant. The M1, Th1, Th17, and Th2 Treg cytokine values were significantly different between the
18 three study groups and increased from HC to MS patients with EDSS < 3 and to MS patients with
19 EDSS \geq 3. The levels of TNF- α and their soluble receptors sTNFR1 and sTNFR2 was significantly higher
20 in MS patients with EDSS \geq 3 than in the two other groups (EDSS < 3 and HC). These differences
21 remained significant after FDR p-correction.

22

23

24

25

1 3.3 Genetic data in MS subgroups

2 Both the HC group ($\chi^2=0.01$, $df=1$, $p=0.907$) and total study group ($\chi^2=0.15$, $df=1$, $p=0.698$) were in
3 Hardy-Weinberg equilibrium regarding the *MTHFR* allelic frequencies. **Table 3** shows the genetic
4 variant assessment in HC and MS patients divided into two subgroups using the EDSS score. The table
5 (computed on the total sample) shows that there were no significant associations between these
6 diagnostic groups and the *MTHFR* genotypes using different genetic models.

7

8 3.4 Prediction of MS and subgroups using biomarkers

9 **Table 4**, regression #1, shows the results of a binary logistic regression analysis with MS as
10 dependent variable and HC as reference group and all biomarkers shown in Table 2 as explanatory
11 variables while allowing for the effects of age, sex, BMI, MetS, SAH, and T2DM. We found that folate,
12 homocysteine, IAI, and age (all positively), adiponectin (negatively) and female sex were significant
13 predictors of MS ($\chi^2=327.38$, $df=6$, $p<0.001$) with a Nagelkerke pseudo- R^2 value of 0.788 and an
14 accuracy of 89.0% (sensitivity=84.7% and specificity=92.2%). The *MTHFR* 677C>T genotypes were
15 not significant in this model. Regression #2 shows that the disability (MS patients with $EDSS \geq 3$ versus
16 those with $EDSS < 3$ as reference group) was significantly ($\chi^2=31.69$, $df=3$, $p<0.001$) associated with
17 increased age, IAI, and CRP (all positively) with a Nagelkerke pseudo- R^2 value of 0.271 and an accuracy
18 of 71.6% (sensitivity=74.7% and specificity=67.2%). The *MTHFR* genotypes were again not significant.

19 3.5 Prediction of EDSS and MSSS scores by biomarkers

20 **Table 5** shows the results of multiple regression analyses with the MS-EDSS-MSSS scores as
21 dependent variables and all biomarkers as explanatory variables while allowing for the age, sex, BMI,
22 SAH, and T2DM. We found that 21.8% of the variance in the EDSS score in MS patients was explained
23 by age, IAI and CRP (all positively associated). IAI and CRP (both positively) and 25(OH)D
24 (negatively) predicted 10.9% of the variance in the MSSS score. Not one of the genotypic *MTHFR*
25 677C>T models was significant in these regression models (#1 and #2). The third multiple regression

1 in Table 5 shows that 54.4% of the variance in the MS-EDSS-MSSS score was explained by the
2 regression on age, IAI, homocysteine, folate, and CRP (all positively associated) and adiponectin, BMI,
3 and vitamin D3 (all negatively associated), female sex and the *MTHFR* TT genotype.

4

5 *3.6 Prediction of homocysteine and folate using MTHFR 677C>T genotypes*

6 **Table 6** shows the results of multiple regression analyses with homocysteine, folate and IAI as
7 dependent variable in four different analyses. In the total study group, we found that 16.6% of the
8 variance in homocysteine was explained by the *MTHFR* TT genotype and age (both positively) and
9 folate (negatively) and male sex. In the HC group, the same variables predicted 15.9% of the variance
10 in homocysteine levels. In the total study group, 4.5% of the variance in folate levels was predicted by
11 the *MTHFR* codominant model (negatively) and age (positively). We found that 11.7% of the variance
12 in the IAI was explained by the regression on adiponectin and age (both negatively) and folate
13 (positively) and the *MTHFR* genotypic models were not significant in this regression.

14

15 *3.7 Results of PLS analysis*

16 The associations between the *MTHFR* genotypic models and homocysteine with folate as
17 putative mediator (while allowing for the effects of age, sex, and BMI) were firstly examined in the HC
18 group. **Figure 1** shows the results of complete PLS path analysis conducted on 5.000 bootstrap samples.
19 We found that 15.9% of the variance in homocysteine was explained by the TT genotype, age, and folate
20 (all positively) and male sex. In addition, 5.7% of the variance in folate was predicted by the codominant
21 *MTHFR* genotype. Most importantly, the specific indirect effect of this codominant model on
22 homocysteine mediated by folate was not significant ($t=1.64$, $p=0.14$). Folate partly mediated the effects
23 of age on homocysteine ($t=2.45$, $p=0.014$). All in all, there were significant direct effects of the TT
24 genotype, but not any of the other genotypes, on homocysteine.

1 Consequently, we have examined the same associations in the total study group after entering
2 the other biomarkers of MS, namely IAI (entered as a latent vector extracted from the M1, Th1, Th17
3 and Th2Treg cytokine profiles), adiponectin, uric acid, age, sex, CRP, BMI (all entered as single
4 indicators). The outcome variable, named MS-EDSS-MSSS, was a latent vector extracted from MS,
5 EDSS, and MSSS, which thus is an index of MS and its severity. We used a multi-step multiple
6 mediation model whereby the effects of the *MTHFR* genotypes (recessive and codominant models), age,
7 sex and BMI could be explained by the biomarkers. **Figure 2** shows the PLS path model using complete
8 PLS path analysis on 5.000 bootstrap samples and after feature selection, PLS predict analysis,
9 prediction-oriented segmentation with multi-group analysis. This figure shows only the significant
10 pathways. The overall fit of this model was adequate with SRMR=0.019. Moreover, the construct
11 reliabilities of both latent vectors were adequate, namely Cronbach $\alpha > 0.9$, rho A and composite
12 reliability > 0.936 , and AVE > 0.78 . The outer model loadings on both latent vectors were all > 0.82
13 with $p < 0.0001$. Blindfolding showed that the construct cross-validated redundancies were adequate,
14 namely the MS latent vector 0.099 and IAI 0.480. We found that 56.0% of the variance in MS-EDSS-
15 MSSS latent vector was explained by the direct effects of adiponectin and uric acid (both negatively),
16 homocysteine, folate, CRP, and age (all positively). Furthermore, 33.8% of the variance in uric acid was
17 explained by age, sex and BMI, and 20.2% of the variance in CRP by sex and BMI.

18 Most importantly, there were significant indirect effects of the *MTHFR* TT genotype on MS
19 mediated by homocysteine ($t=2.01$, $p=0.022$) and of *MTHFR* codominant model which was mediated
20 by folate ($t=-2.01$, $p=0.045$). There were no other significant indirect effects or direct effects of *MTHFR*
21 genotypes on the MS-EDSS-MSSS index. Nevertheless, analyses of the total direct effects showed that
22 only the *MTHFR* TT genotype ($t=2.22$, $p=0.027$), but not the codominant model ($t=-1.87$, $p=0.062$) had
23 a significant effect on MS-EDSS-MSSS. Predicted-Oriented Segmentation analysis coupled with Multi-
24 Group Analysis and Measurement Invariance Assessment showed that full compositional invariance
25 was obtained. The Q^2 Predict values of all endogenous construct indicators were positive indicating that
26 they outperform the most naïve benchmark (the prediction error is smaller than the error of the most
27 naïve benchmark).

4. Discussion

The primary finding of this work is that the *MTHFR* 677C>T variation influences MS susceptibility indirectly via the elevated homocysteine levels associated with the TT genotype in the recessive model. Indeed, homocysteine levels have a direct impact on the inflammatory response, as measured by the IAI index, and consequently on the course of MS disability. Another significant finding is that the *MTHFR* 677C>T genotypes had no direct effect on the disability or progression of disability in MS patients. Other biomarkers, such as age, IAI, and CRP, showed an effect on the EDSS and MSSS scores. Together, these biomarkers had a significant effect on disability, as measured by the EDSS. Additionally, a panel of biomarkers for IAI, CRP, and 25(OH)D had a small effect on disability progression. On the other hand, the *MTHFR* 677C>T variant was associated with a minor influence on MS diagnosis, disability, and progression of disability. In fact, other variables were also involved in these clinical biomarkers of the MS.

4.1 *MTHFR* C677T and multiple sclerosis and homocysteine

The role of the *MTHFR* 677C>T variation in the pathogenesis of MS has been investigated in several genetically distinct worldwide populations with contradictory results. Our findings corroborate prior studies that demonstrated no association between the *MTHFR* 677C>T variation and susceptibility to MS (Ferih-Mrissa et al., 2013; Klotz et al., 2010; Tajouri et al., 2006). However, other case-control studies established a relationship between the T allele and MS (Alatab et al., 2011; Cakina et al., 2019; Cevik et al., 2014; Naghibalhossaini et al., 2015). Several factors could account for these seemingly contradictory outcomes. First, the MS is heterogeneous in terms of clinical characteristics, as distinct subgroups of individuals may share a variety of hereditary variables that predispose them to the disease. Second, whereas some alleles of candidate genes may be highly related with disease in one population, they may be weak or absent in another due to the existence of additional genetic variables or genetic-environment interactions, such as smoking, nutrition, and lifestyle habits (Li et al., 2020). Third, MS development cannot be predicted only based on the genotype, as even the greatest major histocompatibility complex (MHC) class II-linked risk genes for MS are only partially penetrant (Oksenberg et al., 2001). Fourth, conflicting findings regarding the association between the *MTHFR*

1 variant and MS may be explained by the study design, sample size, time points at which biomarkers
2 were tested, and, technically, by use of different laboratory methods for measuring homocysteine and
3 folate.

4 In the current investigation, we found that the TT genotype, together with age, folate levels and
5 male sex, explained 16.6% of the variance in homocysteine in all participants and 15.9% among those
6 healthy individuals, underscoring that homocysteine levels are dependent of different factors, and age,
7 sex, folate, and the *MTHFR* TT genotype may exert a modest effect on its levels. The association
8 between the *MTHFR* 677C>T variant and elevated homocysteine levels is well recognized in both the
9 general population (Chambers et al., 2000; Jacques et al., 1996; Engbersen et al., 1995). Individuals
10 carrying the TT genotype have a 55–65% reduction in MTHFR enzyme activity, while those carrying
11 the CT genotype have a 25% reduction in enzyme activity (Cong et al., 2009; Ueland et al., 2001).

12 Homocysteine is a sulfur-containing non-essential amino acid that acts as an intermediary in the
13 methionine metabolism pathway. It can be metabolized by two different reactions: trans-sulfuration or
14 remethylation. The reduction of 5,10-methylenetetrahydrofolate to 5-methyltetrahydrofolate by the
15 MTHFR enzyme is required for the methylation of homocysteine to methionine (Brattström et al., 1998;
16 Goyette et al., 1998). This enzyme acts as a link between two essential metabolic pathways, regulating
17 one-carbon metabolism, nucleotide synthesis, and the synthesis of the universal methyl donor S-
18 adenosyl methionine (SAM). Patients with a MTHFR deficiency have elevated homocysteine levels
19 (Goyette et al., 1998).

20 In terms of folate levels and the genetic variant explored in this work, our findings indicated that
21 age, and the *MTHFR* 677C>T variant explained 4.5% of the variance in folate levels across all
22 participants using a codominant model (CC vs. CT vs. TT). Individuals carrying the CT genotype
23 exhibited an intermediate folate phenotype compared to those carrying the two homozygous genotypes
24 (CC and TT), with the highest folate levels in CC carriers, intermediate levels in CT carriers, and the
25 lowest levels in TT carriers. Our hypothesis that the *MTHFR* 677C>T variant regulates homocysteine
26 and folate levels (in a recessive model CC+CT vs. TT) may be proven. Additionally, in HC group, this
27 variant and the same explanatory variables account for 15.9% of the variance in homocysteine levels.

28

1 *4.2 Homocysteine and folate levels in multiple sclerosis*

2 Our results indicated that MS patients had significantly higher homocysteine and folate levels
3 than controls. Previous investigations have found that MS patients had higher plasma homocysteine
4 levels than controls (Oliveira et al., 2018a; Moghaddasi et al., 2013; Ramsaransing et al., 2006). We
5 previously demonstrated that MS patients had elevated homocysteine levels and that
6 hyperhomocysteinemia is related with disease progression as measured by the MSSS (Oliveira et al.,
7 2018a). Li et al. found that individuals with MS had higher homocysteine levels than controls, but no
8 significant changes in vitamin B12 or folate levels between MS and controls.

9 In line with previous studies, we found that elevated homocysteine levels were positively
10 associated with MS, implying that hyperhomocysteinemia may be a risk factor for this
11 neuroinflammatory illness (Seshadri, 2006; Zhu et al., 2011). Homocysteine has been found to be toxic
12 to brain cells and to cause neuronal damage via a variety of mechanisms, such as: 1) predisposing
13 neurons to oxidative stress (Faraci and Lentz, 2004; Kruman et al., 2000); 2) through excitotoxicity
14 stimulating N-methyl-D-aspartate receptors (NMDA); 3) DNA damage in neurons, apoptosis and cell
15 death (Reynolds, 2006; Ho et al., 2002; Diaz-Arrastia, 2000); 4) inflammation in the CNS (Obeid et al.,
16 2007); 5) impairment of T and B lymphocyte responses (Dubchenko et al., 2002); and 6) decreased S-
17 adenosyl methionine (SAM) levels, which are required for myelin basic protein (MBP) methylation
18 (Mattson and Shea, 2003).

19 Regarding the folate levels in MS, some studies showed lower levels (Moghaddasi et al., 2013;
20 Ramsaransing et al., 2006) as well as no difference between patients with MS and controls (Li et al.,
21 2020; Dardiotis et al., 2017; Zhu et al., 2011; Kocer et al., 2009; Sahin et al., 2007; Vrethen et al., 2003).
22 However, two of these meta-analyses (Dardiotis et al., 2017; Zhu et al., 2011) omitted crucial variables
23 such as sex, age, disease phase and/or severity, and/or ethnic origin of study populations. Moreover, a
24 case-control study and meta-analysis revealed no significant difference in folate levels or the frequency
25 of folate deficiency between MS patients and controls (Pan et al., 2019). Another meta-analysis (Li et
26 al., 2020) demonstrated a high degree of heterogeneity of studies, which may contribute to the apparent
27 discrepancy in data relating folate and MS. Additionally, some studies specifically excluded participants

1 who had not taken folic acid supplementation, while others did not account for confounding variables,
2 such as food and medication use, which may interfere with the association between folate and MS.

3 In contrast to some previous studies (Moghaddasi et al., 2013; Ramsaransing et al., 2006), we
4 detected higher folate levels in MS patients than in controls. Two possible explanations may be
5 discussed. First, MS patients may have decreased folate receptor (FR)- β expression than controls.
6 During inflammation, activated macrophages ingest folate predominantly via of FR- β , which has
7 roughly 1000 times the affinity for folate as the reduced folate carrier (Hilgenbrink and Low, 2005; Turk
8 et al., 2002). According to animal tests and tissue autopsy from MS patients vs. controls, a study (Elo et
9 al., 2021) demonstrated that macrophages express FR- β during the active phase of MS. Because all our
10 MS patients were in clinical remission of the illness, there would be less FR- β expression in the cells
11 and thus more folate available in the circulation than in controls. Additionally, macrophages expressing
12 functional FR- β are abundant in both CNS and peripheral inflammatory sites (Yoshitomi et al., 2002).
13 Second, the hypothesis may be supported by the observation that plasma homocysteine is negatively
14 correlated with the expression of FR (Lynn et al., 2015). Additionally, previous study showed that low
15 levels of homocysteine enhance FR- β expression, but excessive high concentrations have the opposite
16 effect (Cui et al 2020). Because our MS patients had elevated homocysteine levels, we can presume that
17 they have lower FR- β expression, resulting in decreased folate internalization into cells and increased
18 folate levels in the blood.

19 *4.3 Inflammation, homocysteine, MS disability and disability progression*

20 Regarding the combination of a panel of biomarkers associated with MS, our findings indicated
21 that adiponectin levels and male sex were negatively associated with MS, whereas folate and
22 homocysteine, IAI, and age were positively associated with MS. Studies have established a strong
23 association between elevated homocysteine levels and inflammation in both human and animal models
24 (Álvarez-Sánchez et al., 2020; Liu et al., 2012). Homocysteine elevations promote inflammatory
25 responses in the mouse brain by activation of microglia and increased production of pro-inflammatory
26 cytokines such as IL-1 β and TNF- α (Elshebiny et al., 2020). Homocysteine has been linked to
27 inflammation via a variety of mechanisms, including the expression of adhesion molecules, leukocyte

1 adhesion, endothelial dysfunction, oxidative stress, and decreased nitric oxide bioavailability (Holven
2 et al., 2001).

3 MS is not driven by a single cytokine, but rather by a complex interplay of pro- and anti-
4 inflammatory cytokines, as demonstrated in human and animal studies (Wagner et al., 2020). Taking
5 this into account, we analyzed a wide inflammatory and anti-inflammatory cytokine profile, expressed
6 as the IAI, a score computed as the first principal component of the major cytokines produced by M1,
7 Th1, Th17, Th2, and Treg cells, as well as TNF- α + sTNFR1 + sTNFR2 values. We found that MS is
8 associated with elevated IAI levels, consistent with previous studies, highlighting the critical
9 significance of an imbalance between inflammatory and anti-inflammatory responses as a fundamental
10 element in the pathophysiology of MS (Mezzaroba et al., 2020; Imitola et al., 2004; Musabak et al 2001).
11 Additionally, we demonstrated higher TNF- α , IL-17, and IFN- γ levels in MS patients compared to
12 controls in previous research (Ribeiro et al., 2019). Another study showed that changes in the EDSS
13 over a 16-month period were related with changes in IL-17 (positively) and IL-4 (negatively), regardless
14 of the clinical forms of MS, treatment modality, smoking status, age, or SAH. Additionally, this
15 investigation found that, in addition to homocysteine, IL-6 and IL-4 levels were positively associated
16 with progressive forms of MS vs. RRMS, whereas 25(OH)D was negatively associated with RRMS (de
17 Carvalho et al., 2020).

18 Adiponectin is the most abundant anti-inflammatory adipokine in plasma and regulates the pro-
19 inflammatory nuclear factor kappa B (NF- κ B) signaling pathway (Yokota et al 2004), decreases the
20 expression of pro-inflammatory cytokines TNF- α , IL-6, and IFN- γ , and increases the expression of anti-
21 inflammatory molecules such as IL-10 and IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) (Wolf et al., 2004),
22 highlighting its role in MS-related inflammation modulation (Kvistad et al., 2018).

23 We also found that age, IAI, and CRP levels were associated with moderate/high disability in
24 MS. Additionally, IAI and CRP were positively associated with disability progression, whereas
25 25(OH)D was negatively associated. These findings corroborate previous studies (de Carvalho et al.,
26 2020; Oliveira et al., 2018b; Mandia et al 2014) indicating that vitamin D deficiency is associated with
27 disability progression in MS patients. Vitamin D has significant immunomodulatory effects and has

1 been associated to the regulation of the inflammatory response (Oliveira et al 2018b; Ascherio et al.,
2 2010;), including inhibition of the NF- κ B pathway (Cohen-Lahav et al., 2006), downregulation of pro-
3 inflammatory cytokines such as TNF- α , IL-6, IL-12, and IFN- γ , and upregulation of anti-inflammatory
4 Treg and Th2 cells and their cytokines (Boonstra et al., 2001). These findings demonstrated that a variety
5 of pathways contribute to disease progression regardless of relapses.

6 Although all the MS patients were clinically in remission, we found disease progression.
7 Although at least 12 drugs have been approved as disease-modifying treatments for MS, the major
8 challenge for clinicians is identifying the subjects most likely to develop an aggressive, rapidly
9 progressing form of the disease at the onset of the disease to initiate high-impact treatments before severe
10 disability develops. Simultaneously, patients with mild forms should avoid overtreatment, which has
11 significant benefits for safety, quality of life, and total resource allocation (Seccia et al., 2021; Rotstein
12 and Montalban, 2019).

13 At least some limitations apply to the findings in this paper. First, the case-control design does
14 not allow inferences on causal relationship between the variables evaluated. Second, key critical lifestyle
15 variables, such as dietary intake and vitamin B12 levels, were not controlled. Third, the study of a single
16 specific genetic variant (*MTHFR* 677C>T) excludes an assessment of the complicated link between the
17 multifaceted etiology of MS and other genetic variables. Fourth, the study included individuals with a
18 variety of clinical forms of MS and were treated with a variety of MS medications, although all the
19 patients were in the disease's remission clinical phase and the results were adjusted for clinical forms
20 and MS therapy. Despite these limitations, some strengths should be highlighted, including the
21 integration of MS patient data with new composite measures of established biomarkers, such as IAI,
22 TNF- α + its receptors, and MS-EDSS-MSSS, the latter of which may more accurately reflect the MS
23 clinical course. Additionally, the study used robust methods for genotyping *MTHFR* 677C>T, measuring
24 laboratory biomarkers, and developing in-depth statistical models.

25

26 **5. Conclusion**

27 Taken together, these findings provide important insights into the role of the *MTHFR* 677C>T
28 variant, homocysteine, and folate, and the inflammatory response in the underlying pathophysiological

1 mechanisms of MS. While the *MTHFR* 677C>T variant was not shown to be related with MS, disability,
2 or disability progression, the TT genotype has an indirect effect on MS susceptibility and disability via
3 homocysteine but not folate levels. These findings emphasize the intricate interaction of genetic factors
4 with inflammatory and anti-inflammatory mechanisms in the susceptibility, disability worsening, and
5 disability progression of MS, and suggest additional potential new targets that may help define the
6 concept of precision medicine in MS management and patient care.

7 8 **6. References**

9
10 Alatab S, Hossein-Nezhad A, Mirzaei K et al. Inflammatory profile, age of onset, and the MTHFR
11 polymorphism in patients with multiple sclerosis. *J Mol Neurosci*. 2011; 44(1):6–11.
12 doi: [10.1007/s12031-010-9486-y](https://doi.org/10.1007/s12031-010-9486-y)

13
14 Álvarez-Sánchez N, Álvarez-Ríos AI, Guerrero JM et al. Homocysteine and C-reactive protein levels
15 are associated with frailty in older Spaniards: The Toledo Study for Healthy Aging. *J Gerontol A Biol*
16 *Sci Med Sci*. 2020; 75(8):1488-1494. doi: [10.1093/gerona/glz168](https://doi.org/10.1093/gerona/glz168)

17
18 American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes--2014. *Diabetes Care*. 2014;
19 37(Suppl 1): S14-80. doi: [10.2337/dc14-S014](https://doi.org/10.2337/dc14-S014).

20
21 Ascherio A, Munger KL, Simon KC. Vitamin D and multiple sclerosis. *Lancet Neurol*. 2010; 9(6):599-
22 612. doi: [10.1016/S1474-4422\(10\)70086-7](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70086-7).

23
24 Bagley PJ, Selhub J. A common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is associated
25 with an accumulation of formylated tetrahydrofolates in red blood cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;
26 95:13217–13220. doi: [10.1073/pnas.95.22.13217](https://doi.org/10.1073/pnas.95.22.13217)

27

- 1 Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach
2 to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* 1995; 57 (1):
3 289-300. doi.org/10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x
4
- 5 Boonstra A, Barrat FJ, Crain C et al. 1alpha,25-Dihydroxyvitamin d3 has a direct effect on naive CD4(+)
6 T cells to enhance the development of Th2 cells. *J Immunol.* 2001; 167(9):4974-4980. doi:
7 10.4049/jimmunol.167.9.4974
8
- 9 Brattström L, Wilcken DE, Ohrvik J et al. Common methylenetetrahydrofolate reductase gene mutation
10 leads to hyperhomocysteinemia but not to vascular disease: the result of a meta-analysis. *Circulation.*
11 1998; 98(23):2520-2526. doi: 10.1161/01.cir.98.23.2520
12
- 13 Brazil. Brazilian Institute of Geography and Statistics (IBGE) (2011) Characteristics of the population
14 and households: results of the universe.
15 [https://ww2.ibge.gov.br/english/estatistica/populacao/censo2010/caracteristicas_da_populacao/default](https://ww2.ibge.gov.br/english/estatistica/populacao/censo2010/caracteristicas_da_populacao/default_caracteristicas_da_populacao.shtm)
16 [_caracteristicas_da_populacao.shtm](https://ww2.ibge.gov.br/english/estatistica/populacao/censo2010/caracteristicas_da_populacao/default_caracteristicas_da_populacao.shtm). Accessed 3 Jul 2018.
17
- 18 Cakina S, Ocak O, Ozkan A et al. Relationship between genetic polymorphisms MTHFR (C677T,
19 A1298C), MTR (A2756G) and MTRR (A66G) genes and multiple sclerosis: a case-control study. *Folia*
20 *Neuropathol.* 2019; 57(1):36-40. doi: 10.5114/fn.2019.83829.
- 21 Cevik B, Yigit S, Karakus N et al. Association of methylenetetrahydrofolate reductase gene C677T
22 polymorphism with multiple sclerosis in Turkish patients. *J Investig Med.* 2014; 62(8):980–984.
23 doi: [10.1097/JIM.000000000000107](https://doi.org/10.1097/JIM.000000000000107)
24
- 25 Chambers JC, Obeid OA, Refsum H et al. Plasma homocysteine concentrations and risk of coronary
26 heart disease in UK Indian Asian and European men. *Lancet.* 2000; 355:523–527. doi: [10.1016/S0140-](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(99)93019-2)
27 [6736\(99\)93019-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(99)93019-2)
28

- 1 Cohen-Lahav M, Shany S, Tobvin D et al. Vitamin D decreases NFkappaB activity by increasing I
2 kappa B alpha levels. *Nephrol Dial Transplant*. 2006; 21(4):889-897. doi: 10.1093/ndt/gfi254.
3
- 4 Cong Y, Guo X, Liu X et al. Association of the single nucleotide polymorphisms in the extracellular
5 matrix metalloprotease-9 gene with PACG in southern China. *Mol Vis*. 2009; 15:1412-1417
6
- 7 Cui J, Cao C, Hu H et al. Downregulation of folate receptor α contributes to homocysteine-induced
8 human umbilical vein endothelial cell injury via activation of endoplasmic reticulum stress. *Mol Med*
9 *Rep*. 2020; 22 (2): 1631-1638. doi.org/10.3892/mmr.2020.11204
10
- 11 Dardiotis E, Arseniou S, Sokratous M et al. Vitamin B12, folate, and homocysteine levels and multiple
12 sclerosis: a meta-analysis. *Mult Scler Relat Disord*. 2017; 17: 190–197. doi:
13 10.1016/j.msard.2017.08.004
14
- 15 de Carvalho Jennings Pereira WL, Flauzino T, Alfieri DF et al. Immune-inflammatory, metabolic and
16 hormonal biomarkers are associated with the clinical forms and disability progression in patients with
17 multiple sclerosis: A follow-up study. *J Neurol Sci*. 2020; 15;410:116630. doi:
18 10.1016/j.jns.2019.116630
19
- 20 Diaz-Arrastia R Homocysteine and neurologic disease. *Arch. Neurol*. 2000; 57 (10): 1422–1427. doi:
21 10.1001/archneur.57.10.1422
22
- 23 Dubchenko E, Ivanov A, Spirina N, Smirnova N, Melnikov M, Boyko A, Gusev E, Kubatiev A.
24 Hyperhomocysteinemia and Endothelial Dysfunction in Multiple Sclerosis. *Brain Sci*. 2002; 10(9):637.
25 doi: 10.3390/brainsci10090637
26
- 27 Dyment DA, Ebers GC, Sadovnick AD. Genetics of multiple sclerosis. *Lancet Neurol*. 2004; 3: 104-
28 110. doi: 10.1016/s1474-4422(03)00663-x

- 1 Elo P, Li XG, Liljenbäck H et al. Efficacy and tolerability of folate-aminopterin therapy in a rat focal
2 model of multiple sclerosis. *J Neuroinflammation*. 2021; 18(1):30. doi: 10.1186/s12974-021-02073-7
3
- 4 Elsherbiny NM, Sharma I, Kira D et al. Homocysteine Induces Inflammation in Retina and Brain
5 *Biomolecules*. 2020; 10(3):393. doi: 10.3390/biom10030393
6
- 7 Engbersen A, Franken DG, Boers G et al. Thermolabile 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase as a
8 cause of mild hyperhomocysteinemia. *Am J Hum Genet*. 1995; 56(1):142-150
9
- 10 Faraci FM, Lentz SR. Hiperhomocysteinemia, oxidative stress and cerebral vascular dysfunction.
11 *Stroke*. 2004; 35:345–347. doi: 10.1161/01.STR.0000115161.10646.67.
12
- 13 Fekih-Mrissa N, Mrad M, Klai S et al. Association of methylenetetrahydrofolate reductase A1298C
14 polymorphism but not of C677T with multiple sclerosis in Tunisian patients. *Clin Neurol Neurosurg*.
15 2013; 115(9):1657-1660. doi: 10.1016/j.clineuro.2013.02.025
16
- 17 Fong CS, Shyu HY, Shieh JC et al. Association of MTHFR, MTR, and MTRR polymorphisms with
18 Parkinson's disease among ethnic Chinese in Taiwan. *Clin Chim Acta*. 2011; 412: 332-338. doi:
19 [10.1016/j.cca.2010.11.004](https://doi.org/10.1016/j.cca.2010.11.004)
20
- 21 Franco RF, Araujo AG, Guerriero JF et al. Analysis of the 677 CT mutation of the
22 methylenetetrahydrofolate reductase gene in different ethnic groups. *Thromb Haemost*. 1998; 79:119–
23 121.
24
- 25 Frosst P, Blom HJ, Milos R et al. A candidate gene risk factor for vascular disease: a common mutation
26 in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat. Genet*. 1995; 10: 111-113. doi: [10.1038/ng0595-111](https://doi.org/10.1038/ng0595-111)
27

- 1 Ghosh K, Khare A, Shetty S. Fasting plasma homocysteine levels are increased in young patients with
2 acute myocardial infarction from Western India. *Indian Heart J.* 2007; 59(3): 242–245
3
- 4 Goyette P, Pai A, Milos R et al. Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate
5 reductase (MTHFR). *Mamm Genome.*1998; 9:652-656. doi: 10.1007/s003359900838. Erratum in:
6 *Mamm Genome* 1999; 10(2):204.
7
- 8 Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA, Gordon DJ, Krauss RM,
9 Savage PJ, Smith SC Jr, Spertus JA, Costa F. Diagnosis and management of the metabolic syndrome:
10 an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute scientific statement. *Curr
11 Opin Cardiol.* 2006 Jan;21(1):1-6. doi: 10.1097/01.hco.0000200416.65370.a0.
12
- 13 Hilgenbrink AR, Low PS. Folate receptor-mediated drug targeting: from therapeutics to diagnostics. *J
14 Pharm Sci.* 2005; 94:2135–2146. doi: 10.1002/jps.20457
15
- 16 Ho PI, Ortiz D, Rogers E et al. Multiple aspects of homocysteine neurotoxicity: glutamate excitotoxicity,
17 kinase hyperactivation and DNA damage. *J Neurosci Res.* 2002; 70 (5):694–702. doi:
18 10.1002/jnr.10416.
19
- 20 Holven KB, Holm T, Aukrust P et al. Effect of folic acid treatment on endothelium-dependent
21 vasodilation and nitric oxide-derived end products in hyperhomocysteinemic subjects. *Am J Med.* 2001;
22 110, 536–542. doi: 10.1016/s0002-9343(01)00696-9
23
- 24 Imitola J, Chitnis T and Khoury SJ. Cytokines in multiple sclerosis: from bench to bedside. *Pharmacol
25 Ther.* 2005; 106: 163-177. doi: 10.1016/j.pharmthera.2004.11.007
26
- 27 Ineichen BV, Keskitalo S, Farkas M et al. Genetic variants of homocysteine metabolism and multiple
28 sclerosis: a case-control study. *Neurosci Lett.* 2014; 562: 75-78. doi: 10.1016/j.neulet.2014.01.008

- 1 Jacques PF, Bostom AG, Williams RR et al. Relation between folate status, a common mutation in
2 methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. *Circulation*. 1996;
3 93:7–9. doi: [10.1161/01.cir.93.1.7](https://doi.org/10.1161/01.cir.93.1.7)
4
- 5 James PA, Oparil S, Carter BL, et al. Evidence-based guideline for the management of high blood
6 pressure in adults: report from the panel members appointed to the Eighth Joint National Committee
7 (JNC 8). *JAMA*. 2014; 311(5):507-520. doi: 0.1001/jama.2013.284427
8
- 9 Jamroz-Wisniewska A, Beltowski J, Bartosik-Psujek H, et al. Processes of plasma protein N-
10 homocysteinylation in multiple sclerosis. *Int J Neurosci*. 2017; 127(8): 709-715.
11 doi: [10.1080/00207454.2016.1241782](https://doi.org/10.1080/00207454.2016.1241782)
12
- 13 Karussis D. The diagnosis of multiple sclerosis and the various related demyelinating syndromes: a
14 critical review. *J Autoimmun*. 2014; 48-49:134-142. [https://doi: 10.1016/j.jaut.2014.01.022](https://doi.org/10.1016/j.jaut.2014.01.022).
15
- 16 Kim NK, Kang GD, Kim HJ. Genetic polymorphisms of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase
17 (MTHFR C677T and A1298C) in healthy Koreans. *Korean J Genet*. 2002; 24:227–234.
18
- 19 Klotz L, Farkas M, Bain N et al. The variant methylenetetrahydrofolate reductase c.1298A[C (p. E429A)
20 is associated with multiple sclerosis in a German case-control study. *Neurosci Lett*. 2010; 468(3):183–
21 185. doi: [10.1016/j.neulet.2009.10.057](https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.10.057)
22
- 23 Kocer B, Engur S, Ak F et al. Serum vitamin B12, folate, and homocysteine levels and their association
24 with clinical and electrophysiological parameters in multiple sclerosis. *J Clin Neurosci*. 2009;
25 16(3):399-403. doi: 10.1016/j.jocn.2008.05.015.
26
- 27 Koch MW, George S, Wall W et al Serum NSE level and disability progression in multiple sclerosis. *J*
28 *Neurol Sci Mar*. 2005; 15;350(1-2):46-50. doi: 10.1016/j.jns.2015.02.009.

- 1 Kruman II, Culmsee C, Chan SL et al. Homocysteine elicits a DNA damage response in neurons that
2 promotes apoptosis and hypersensitivity to excitotoxicity. *J Neurosci.* 2000; 20(18):6920-6926. doi:
3 10.1523/JNEUROSCI.20-18-06920.2000
4
- 5 Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale
6 (EDSS). *Neurology.* 1983; 33:1444–1452. doi: [10.1212/wnl.33.11.1444](https://doi.org/10.1212/wnl.33.11.1444)
7
- 8 Kvistad SS, Myhrn SS, Holmøy T et al. Serum levels of leptin and adiponectin are not associated with
9 disease activity or treatment response in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2018; 323:73–77. doi:
10 10.1016/j.jneuroim.2018.07.011
11
- 12 Lajin B, Alhaj Sakur A, Michati R et al. Association between MTHFR C677T and A1298C, and MTRR
13 A66G polymorphisms and susceptibility to schizophrenia in a Syrian study cohort. *Asian J Psychiatr.*
14 2012; 5: 144-149. doi: [10.1016/j.ajp.2012.03.002](https://doi.org/10.1016/j.ajp.2012.03.002)
15
- 16 Li M, Fu B, Dong W. Correlations between plasma homocysteine and MTHFR gene polymorphism and
17 white matter lesions. *Folia Neuropathol.* 2008; 56: 301-307. doi: [10.5114/fn.2018.80863](https://doi.org/10.5114/fn.2018.80863)
18
- 19 Li X, Yuan J, Han J et al. Serum levels of Homocysteine, Vitamin B12 and Folate in Patients with
20 Multiple Sclerosis: an Updated Meta-Analysis. *Int J Med Sci.* 2020; 17(6):751-761. doi:
21 10.7150/ijms.42058
22
- 23 Li WX, Dai SX, Zheng JJ et al. Homocysteine metabolism gene polymorphisms (MTHFR C677T,
24 MTHFR A1298C, MTR A2756G and MTRR A66G) jointly elevate the risk of folate deficiency.
25 *Nutrients.* 2015; 7: 6670-6687. doi: [10.3390/nu7085303](https://doi.org/10.3390/nu7085303)
26
- 27 Liu Z, Luo H, Zhang L, et al. Hyperhomocysteinemia exaggerates adventitial inflammation and
28 angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm in mice. *Circ Res.* 2012; 111 (10):1261–

- 1 1273. doi: [10.1161/CIRCRESAHA.112.270520](https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.112.270520)
- 2
- 3 Lynn RC, Poussin M, Kalota A et al. Targeting of folate receptor β on acute myeloid leukemia blasts
4 with chimeric antigen receptor-expressing T cells. *Blood*. 2015; 125(22):3466-3476. doi:
5 10.1182/blood-2014-11-612721
- 6
- 7 Mandia D, Ferraro OE, Nosari G et al. Environmental factors and multiple sclerosis severity: a
8 descriptive study. *Int J Environ Res Public Health*. 2014; 11(6):6417-6432. doi:
9 10.3390/ijerph110606417.
- 10
- 11 Mattson MP, Shea TB. Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative
12 disorders. *Trends Neurosci*. 2003; 26(3): 137-146. 43. doi: 10.1016/S0166-2236(03)00032-8
- 13
- 14 Mezzaroba L, Simão ANC, Oliveira SR et al. Antioxidant and Anti-inflammatory Diagnostic
15 Biomarkers in Multiple Sclerosis: A Machine Learning Study. *Mol Neurobiol*. 2020; 57(5):2167-2178.
16 doi: 10.1007/s12035-019-01856-7
- 17
- 18 Miller A, Korem M, Almog R et al. Vitamin B12, demyelination, remyelination and repair in multiple
19 sclerosis. *J Neurol Sci*. 2005; 233: 93-97. doi: 10.1016/j.jns.2005.03.009
- 20
- 21 Moghaddasi M, Mamarabadi M, Mohebi N et al. Homocysteine, vitamin B12 and folate levels in Iranian
22 patients with Multiple Sclerosis: a case control study. *Clin Neurol Neurosurg*. 2013; 115(9):1802-1805.
23 doi: 10.1016/j.clineuro.2013.05.007
- 24
- 25 Musabak U, Demirkaya S, Genç G. Serum adiponectin, TNF- α , IL-12p70, and IL-13 levels in multiple
26 sclerosis and the effects of different therapy regimens. *Neuroimmunomodulation*. 2011; 18(1):57-66.
27 <https://doi.org/10.1159/000317393>
- 28

- 1 Naghibalhossaini F, Ehyakonandeh H, Nikseresht A et al. Association Between MTHFR Genetic
2 Variants and Multiple Sclerosis in a Southern Iranian Population. *Int J Mol Cell Med.* 2015; (2):87-93
3
- 4 Nikfardjam M, Graf S, Hornykewycz S et al. Homocysteine plasma levels in young patients with
5 coronary artery disease. Relation to history of acute myocardial infarction and anatomical extent of
6 disease. *Thromb Res.* 2001; 103 (Suppl. 1): S35–S39. doi: [10.1016/s0049-3848\(01\)00295-x](https://doi.org/10.1016/s0049-3848(01)00295-x)
7
- 8 Nylander A, Hafler DA. Multiple sclerosis. *J Clin Invest.* 2012; 122: 1180-1188. doi: [10.1172/JCI58649](https://doi.org/10.1172/JCI58649)
9
- 10 Obeid R, McCaddon A, Herrmann W. The role of hyperhomocysteinemia and B-vitamin deficiency in
11 neurological and psychiatric diseases. *Clin Chem Lab Med.* 2007; 45(12): 1590-1606. doi:
12 [10.1515/CCLM.2007.356](https://doi.org/10.1515/CCLM.2007.356)
13
- 14 Oksenberg JR, Baranzini SE, Barcellos LF et al. Multiple sclerosis: genomic rewards. *J*
15 *Neuroimmunol.* 2001; 113(2):171-184. doi: [0.1016/s0165-5728\(00\)00444-6](https://doi.org/0.1016/s0165-5728(00)00444-6).
16
- 17 Oliveira SR, Flauzino T, Sabino BS et al. Elevated plasma homocysteine levels are associated with
18 disability progression in patients with multiple sclerosis. *Metab Brain Disease.* 2018a; 33(5):1393-1399.
19 doi: [10.1007/s11011-018-0224-4](https://doi.org/10.1007/s11011-018-0224-4)
20
- 21 Oliveira SR, Simão ANC, Alfieri DF et al. Vitamin D deficiency is associated with disability and
22 disease progression in multiple sclerosis patients independently of oxidative and nitrosative stress. *J*
23 *Neurol.* 2018b; 381:213-219. doi: [10.1016/j.jns.2017.07.046](https://doi.org/10.1016/j.jns.2017.07.046)
24
- 25 Pan L, Yin Y, Chen J et al. Homocysteine, vitamin B12, and folate levels in patients with multiple
26 sclerosis in Chinese population: A case-control study and meta-analysis. *Mult Scler Relat Disord.* 2019;
27 36:101395. doi: [10.1016/j.msard.2019.101395](https://doi.org/10.1016/j.msard.2019.101395).
28

- 1 Peng, H., Wu, X., Lin, J., & Guan, W. (2021). Genetically predicted circulating homocysteine, vitamin
2 B12, and folate levels and risk of multiple sclerosis: evidence from a two-sample Mendelian
3 randomization analysis. *Mult Scler Relat Disord.* 56: 103255. doi:10.1016/j.msard.2021.10
4
- 5 Polman CH, Reingold SC, Banwell B, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 Revisions
6 to the McDonald criteria. *Ann Neurol.* 2011; 69(2):292–302. doi: 10.1002/ana.22366
7
- 8 Ramsaransing GSM, Fokkema MR, Teelken A et al. Plasma homocysteine levels in multiple sclerosis.
9 *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2006; 77(2):189–192. doi: [10.1136/jnnp.2005.072199](https://doi.org/10.1136/jnnp.2005.072199)
10
- 11 Reynolds E. Vitamin B12, folic acid, and the nervous system. *Lancet Neurol.* 2006; 5 (11): 949–960.
12 doi: 10.1016/S1474-4422(06)70598-1
13
- 14 Ribeiro CM, Oliveira SR, Alfieri DF et al. Tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and its soluble receptors
15 are associated with disability, disability progression and clinical forms of multiple sclerosis. *Inflamm
16 Res.* 2019; 68(12):1049-1059. doi: 10.1007/s00011-019-01286-0
17
- 18 Ringle CM, Wende S, Becker JM. SmartPLS 3. SmartPLS GmbH, Boenningstedt 2005;
19 <http://www.smartpls.com>. Accessed 20 Jul 2021
20
- 21 Rotstein D, Montalban X. Reaching an evidence-based prognosis for personalized treatment of multiple
22 sclerosis. *Nat Rev Neurol.* 2019; 15: 287–300. doi: 10.1038/s41582-019-0170-8
23
- 24 Roxburgh RHSR, Seaman SR, Masterman T et al. Multiple sclerosis severity score: using disability and
25 disease duration to rate disease severity. *Neurology.* 2005; 64:1144–1151. [https://doi.
26 org/10.1212/01.WNL.0000156155.19270.F8](https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000156155.19270.F8).
- 27 Sahin S, Aksungar FB, Topkaya AE et al. Increased plasma homocysteine levels in multiple sclerosis.
28 *Mult Scler.* 2007; 13(7):945-946. doi: 10.1177/1352458506075503

- 1 Seccia R, Romano S, Salvetti M et al. Machine Learning Use for Prognostic Purposes in Multiple
2 Sclerosis. *Life (Basel)* 2021; 11(2):122. doi: 10.3390/life11020122.
3
- 4 Seshadri S. Elevated plasma homocysteine levels: risk factors or risk marker for the development of
5 dementia and Alzheimer 's disease? *J Alzheimer Dis.* 2006; 9:393–398. doi: 10.3233/jad-2006-9404.
6
- 7 Sumelahti ML, Tienari PJ, Hakama M et al. Multiple sclerosis in Finland: incidence trends and
8 differences in relapsing remitting and primary progressive disease courses. *J Neurol Neurosurg
9 Psychiatry.* 2003; 74: 25-28. doi: 10.1136/jnnp.74.1.2
10
- 11 Tajouri L, Martin V, Gasparini C et al. Genetic investigation of methylenetetrahydrofolate reductase
12 (MTHFR) and catechol-O-methyl transferase (COMT) in multiple sclerosis. *Brain Res Bull.* 2006;
13 69(3):327-331. doi: 10.1016/j.brainresbull.2006.01.005
14
- 15 Teunissen CE, Killestein J, Kragt JJ et al. Serum homocysteine levels in relation to clinical progression
16 in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatr.* 2008; 79 (12): 1349–1353.
17 doi: [10.1136/jnnp.2008.151555](https://doi.org/10.1136/jnnp.2008.151555)
18
- 19 Triantafyllou N, Evangelopoulos ME, Kimiskidis VK et al. Increased plasma homocysteine levels in
20 patients with multiple sclerosis and depression. *Ann Gen Psychiatry.* 2008; 7:17. doi: 10.1186/1744-
21 859X-7-17. doi: [10.1186/1744-859X-7-17](https://doi.org/10.1186/1744-859X-7-17)
22
- 23 Turk MJ, Breur GJ, Widmer WR et al. Folate targeted imaging of activated macrophages in rats with
24 adjuvant-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 2002; 46:1947–1955. doi: 10.1002/art.10405
25
- 26 Ueland PM, Hustad S, Schneede J et al. Biological and clinical implications of the MTHFR C677T
27 polymorphism. *Trends Pharmacol Sci.* 2001; 22:195-201. doi: [10.1016/s0165-6147\(00\)01675-8](https://doi.org/10.1016/s0165-6147(00)01675-8)
28

- 1 Vrethem M, Mattsson E, Hebelka H et al. Increased plasma homocysteine levels without signs of
2 vitamin B12 deficiency in patients with multiple sclerosis assessed by blood and cerebrospinal fluid
3 homocysteine and methylmalonic acid. *Mult Scler.* 2003; 9 (3): 239–245. doi:
4 [10.1191/1352458503ms918oa](https://doi.org/10.1191/1352458503ms918oa)
5
- 6 Wagner CA, Roqué PJ, Goverman JM. Pathogenic T cell cytokines in multiple sclerosis. *J Exp Med.*
7 2020; 217(1): e20190460. doi: 10.1084/jem.20190460
8
- 9 Weisberg I, Tran P, Christensen B et al. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate
10 reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol Gen Metab.* 1998; 64:169–172.
11 doi: [10.1006/mgme.1998.2714](https://doi.org/10.1006/mgme.1998.2714)
12
- 13 Wolf AM, Wolf D, Rumpold H. Adiponectin induces the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-
14 1RA in human leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004; 323(2):630–635. doi:
15 [10.1016/j.bbrc.2004.08.145](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.08.145)
16
- 17 Yokota T, Oritani K, Takahashi I et al. Adiponectin, a new member of the family of soluble defense
18 collagens, negatively regulates the growth of myelomonocytic progenitors and the functions of
19 macrophages. *Blood.* 2000; 96(5):1723–1732. doi: [10.1016/j.pharmthera.2004.11.007](https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2004.11.007)
20
- 21 Yoshitomi R, Nakayama K, Yamashita S et al. Plasma Homocysteine Concentration is Associated with
22 the Expression Level of Folate Receptor 3. *Sci Rep.* 2022; 10: 10283. [https://doi.org/10.1038/s41598-](https://doi.org/10.1038/s41598-020-67288-9)
23 [020-67288-9](https://doi.org/10.1038/s41598-020-67288-9)
- 24 Zeng Q, Li F, Xiang T et al. Influence of food groups on plasma total homocysteine for specific MTHFR
25 C677T genotypes in Chinese population. *Mol Nutr Food Res.* 2017; 61(2):1600351. doi:
26 [10.1002/mnfr.201600351](https://doi.org/10.1002/mnfr.201600351)
27

1 Zhu Y, He ZY, Liu HN. Meta-analysis of the relationship between homocysteine, vitamin B12, folate,
2 and multiple sclerosis. *J Clin Neurosci*. 2011; 18(7):933-938. doi: 10.1016/j.jocn.2010.12.022
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30

Table 1 Socio-demographic and clinical data of patients with multiple sclerosis (MS), subdivided according to the disability (EDSS) threshold value of ≥ 3 and healthy controls (HC)

Variables	HC ^A (n= 226)	MS EDSS<3 ^B (n = 58)	MS EDSS ≥ 3 ^C (n = 83)	F/X ²	Df	p value
Age (years)	36.3 (10.6) ^C	36.1 (10.3) ^C	46.4 (14.0) ^{A,B}	25.42	2/363	<0.001
Sex (Female/Male)	155/71	38/20	58/25	0.311	2	0.856
BMI (Kg/m ²)	25.37 (4.47)	25.15 (4.63)	25.64 (5.15)	0.80	2/356	0.821
MetS (No/Yes)	182/39 ^C	51/7 ^C	48/28 ^{A,B}	15.86	2	<0.001
Duration of illness (years)	-	5.57 (4.55) ^C	8.24 (7.76) ^B	5.54	1/139	0.020
Clinical forms				-	-	<0.001
RRMS		58	64			
SPMS		0	14			
PPMS		0	05			
EDSS	-	1.01 (0.86) ^C	4.91 (1.61) ^B	282.86	1/139	<0.001
MSSS	-	1.89 (1.65) ^C	7.02 (2.20) ^B	204.33	1/126	<0.001
Ethnicity C/NC	179/47	47/11	58/25	3.54	2	0.170
SAH (No/Yes)	170/21 ^C	49/9	62/21 ^A	9.11	2	0.011
T2DM (No/Yes)	176/29 ^C	56/2	76/7 ^A	6.02	2	0.049
Smoking (No/Yes)	200/26	54/4	70/13	2.56	2	0.278

Continuous variables were expressed as mean (SD); the categorical variables were expressed as number (n); A: healthy controls; B: MS EDSS <3: Multiple sclerosis patients with EDSS < 3; C: MS EDSS ≥ 3 : Multiple sclerosis patients with EDSS ≥ 3 ; df: degree of freedom; BMI: body mass index; MetS: metabolic syndrome; RRMS: relapsing-remitting multiple sclerosis; SPMS: secondary progressive multiple sclerosis; PPMS: primary progressive multiple sclerosis; EDSS: Expanded Disability Status Score; MSSS: Multiple Sclerosis Severity Score; C: Caucasian; NC: non-Caucasian; SAH: systemic arterial hypertension; T2DM: type 2 diabetes mellitus.

1 **Table 2** Biomarker data in patients with multiple sclerosis (MS) divided according to the disability
 2 (EDSS) threshold of ≥ 3 and controls.

Variables	Controls ^A (n=226)	MS, EDSS<3 ^B (n=58)	MS, EDSS \geq 3 ^C (n=83)	F/X ²	df	p value	R ²
Folate (ng/mL)*	6.07 (0.40) ^{B,C}	10.37 (0.78) ^A	9.61 (0.65) ^A	18.37	2/253	<0.001	0.127
Hcy (μ mol/L)*	10.48(0.27) ^{B,C}	11.46(0.52) ^A	12.67(0.46) ^A	10.03	2/346	<0.001	0.055
Adiponectin (μ g/mL)*	7.34(0.25) ^{B,C}	2.74(0.42) ^A	2.97(0.39) ^A	127.59	2/292	<0.001	0.467
25(OH)D (ng/mL)*	30.11(0.94)	29.52(1.76)	30.32(1.56)	0.89	2/334	0.411	0.005
Uric acid (mg/dL)*	4.32 (0.08)	4.05(0.15)	4.05(0.13)	2.27	2/355	0.105	0.013
CRP (mg/L)*	3.29 (0.67)	2.18 (1.31)	4.97 (1.17)	2.53	2/349	0.081	0.014
M1	-0.562(0.098) ^{B,C}	0.189(0.192) ^{A,C}	1.014(0.169) ^{A,B}	32.89	2/360	<0.001	0.154
Th1	-0.579(0.107) ^{B,C}	0.221(0.209) ^{A,C}	0.779(0.183) ^{A,B}	21.97	2/360	<0.001	0.109
Th17	-0.790(0.104) ^{B,C}	0.474(0.203) ^{A,C}	1.166(0.178) ^{A,B}	49.37	2/360	<0.001	0.215
Th2 + Treg	-0.041(0.103) ^{B,C}	0.802(0.202) ^{A,C}	1.420(0.177) ^{A,B}	85.95	2/359	<0.001	0.324
TNF- α + receptors	-0.178(0.063) ^{B,C}	-0.159(0.122) ^{A,C}	0.581(0.107) ^{A,B}	18.58	2/359	<0.001	0.094

3 *All results of univariate GLM adjusted for age, sex and body mass index (BMI), and performed as log
 4 transformation. EDSS: Expanded Disability Status Score; A: healthy controls; B: Multiple sclerosis patients with
 5 EDSS < 3; C: Multiple sclerosis patients with EDSS \geq 3; df: degree of freedom; R²: Nagelkerke's pseudo-R²
 6 values were used as effect size measurement. Hcy: homocysteine; 25(OH)D: 25-hydroxyvitamin D; CRP: C-
 7 reactive protein. M1: as zIL-6 + zTNF α ; Th1: as zIL-2 + zIFN- γ ; Th17: as zIL-17 + zIL-6; Th2 + Treg: as zIL-
 8 4 + zIL-10; TNF- α + receptors: TNF- α + soluble TNF- α receptors: as zTNF- α + zTNFR1 + zTNFR2

9
 10
 11

1 **Table 3** Genetic data in patients with multiple sclerosis (MS) divided according to the disability,
 2 evaluated using Expanded Disability Status Score (EDSS) threshold of ≥ 3 and controls

Variables	Controls (n=226)	MS, EDSS<3 (n=74)	MS, EDSS \geq 3 (n=89)	F/X ²	df	p value
<i>MTHFR677C>T</i>						
model						
Codominant n (%)	106/97/23	35/31/8	37/43/9	0.94	4	0.919
CC vs. CT vs. TT	(46.9/42.9/10.2)	(47.3/41.9/10.8)	(41.6/48.3/10.1)			
Dominant	106/120	35/39	37/52	0.80	2	0.671
CC vs. CT + TT	(46.9/53.1)	(47.3/52.7)	(41.6/58.4)			
Recessive	203/23	66/8	80/9	0.03	2	0.987
CC + CT vs. TT	(89.8/10.2)	(89.2/10.8)	(89.9/10.1)			
Overdominant	129/97	43/31	46/43	0.86	2	0.649
CC + TT vs. CT	(57.1/42.9)	(58.1/41.9)	(51.7/48.3)			

3 *The categorical variables are expressed as number (n) and percentage (%). All results of univariate GLM
 4 adjusted for age, sex and body mass index (BMI). EDSS: Expanded Disability Status Score; A: healthy controls;
 5 B: Multiple sclerosis patients with EDSS < 3; C: Multiple sclerosis patients with EDSS \geq 3; F/X²: Fischer Exact
 6 Test or Chi -square test; df: degree of freedom; R²: Nagelkerke's pseudo-R² values were used as effect size
 7 measurement. *MTHFR 677C>T* methylenetetrahydrofolate reductase genetic variant with C as the major allele
 8 and T as the minor allele.

9
 10
 11
 12
 13
 14
 15
 16
 17
 18
 19

1 **Table 4** Results of binary logistic regression analysis with multiple sclerosis diagnosis and disability
 2 (EDSS) ≥ 3 as dependent variables

Dependent Variables	Explanatory Variables	B	SE	Wald (df=1)	<i>p</i> value	OR	95% CI
Model #1 MS vs. HC	Adiponectin	-2.718	0.381	53.62	<0.001	0.06	0.03 - 0.13
	Folate	1.535	0.304	25.44	<0.001	4.64	2.56 - 8.43
	Homocysteine	1.116	0.247	20.45	<0.001	3.05	1.88 – 4.95
	IAI	2.052	0.479	18.39	<0.001	7.79	3.05 – 19.90
	Sex (male)	-1.870	0.483	15.00	<0.001	0.15	0.06 – 0.40
Model #2 EDSS ≥ 3 vs. EDSS <3	Age	0.056	0.017	11.40	0.001	1.06	1.02 – 1.09
	Age	0.062	0.016	14.30	<0.001	1.06	1.03 – 1.10
	IAI	0.760	0.355	4.59	0.032	2.14	1.06 – 4.28
	CRP	0.444	0.208	4.56	0.033	1.56	1.04 – 2.34

3

4 OR: odds ratio; CI: confidence interval; MS: Multiple Sclerosis; HC: healthy controls; SE: standard
 5 error; EDSS: Expanded Disability Status Score; IAI: inflammatory activity index, computed as first
 6 principal component extracted from M1, Th1, Th17, Th2Treg, TNF- α + TNFR1 + TNFR2: M1: zIL-6
 7 + zTNF α ; Th1: zIL-2 + zIFN- γ ; Th17: zIL-17 + zIL-6; Th2 + Treg: zIL-4 + zIL-10; TNF- α + receptors:
 8 TNF- α + soluble TNF- α receptors: zTNF- α + zsTNFR1 + zsTNFR2; CRP: C-reactive protein.

9 Model #1: sensitivity=84.7%; specificity=92.2%; accuracy: 89.0%; Nagelkerke pseudo-R²: 0.788.

10 Model #2: sensitivity=74.7%; specificity=67.2%; accuracy: 71.6%; Nagelkerke pseudo-R²: 0.271.

11

12

13

14

15

16

1 **Table 5** Results of multiple regression analysis of multiple sclerosis patients with disability (EDSS) and
 2 severity (MSSS) scores as dependent variables and biomarkers as explanatory variables

Dependent variables	Explanatory variables	B	f	p value	F	df	p value	R ²
	Model #1				13.59	3/146	<0.001	0.218
EDSS in MS	Age	0.329	4.34	<0.001				
	IAI	0.148	2.70	0.008				
	CRP	0.162	2.16	0.033				
	Model #2				5.97	3/146	0.001	0.109
MSSS in MS	IAI	0.199	2.55	0.012				
	CRP	0.184	2.35	0.020				
	25(OH)D	-0.157	-2.01	0.046				
	Model #3				43.39	10/363	<0.001	0.544
EDSS+MSSS + MS in all subjects	Adiponectin	-0.427	-10.08	<0.001				
	Age	0.211	5.28	<0.001				
	IAI	0.250	6.54	<0.001				
	Homocysteine	0.239	6.06	<0.001				
	Folate	0.162	4.10	<0.001				
	Sex (male)	-0.097	-2.48	0.014				
	CRP	0.129	3.22	0.001				
	BMI	-0.113	-2.86	0.004				
	<i>MTFHR</i> <i>677C>T</i> (recessive model)	-0.086	-2.38	0.018				
	25(OH)D	-0.072	-1.98	0.049				

3 df: degree of freedom; R²: Nagelkerke's pseudo-R² values were used as effect size measurement. EDSS:

1 Expanded Disability Status Score; MSSS: Multiple Sclerosis Severity Score; IAI: inflammatory activity
2 index, computed as first principal component extracted from M1, Th1, Th17, Th2, Treg, TNF- α +
3 TNFR1 + TNFR2; CRP: C-reactive protein; BMI: body mass index; *MTHFR* 677C>T
4 methylenetetrahydrofolate reductase genetic variant with C as the major allele and T as the minor allele:
5 recessive model: CC +CT vs. TT

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

1 **Table 6** Results of multiple regression analysis of multiple sclerosis patients with homocysteine, folate,
 2 and inflammatory activity index (IAI) as dependent variables and biomarkers as explanatory variables

Dependent Variables	Explanatory Variables	β	F	p value	F	df	p value	R ²
	Model #1				18.44	4/370	<0.001	0.166
	Age	0.301	6.23	<0.001				
Hcy in all Subjects	Folate	-0.173	-3.56	<0.001				
	Sex (male)	0.178	3.74	<0.001				
	<i>MTHFR 677C>T</i>	0.129	2.69	0.007				
	recessive model							
	Model #2				10.37	4/220	<0.001	0.159
	Folate	-0.269	-4.25	<0.001				
Hcy in HC	<i>MTHFR 677C>T</i>	0.187	3.01	0.003				
	recessive model							
	Age	0.168	2.67	0.008				
	Sex (male)	0.159	2.57	0.011				
	Model #1				8.78	2/372	<0.001	0.045
Folate in all subjects	Age	0.178	3.51	0.001				
	<i>MTHR 677C>T</i>	-0.118	-2.33	0.020				
	codominant model							
	Model #2				16.34	3/370	<0.001	0.117
IAI in all subjects	Adiponectin	-0.267	-5.28	<0.001				
	Folate	0.143	2.78	0.006				
	Age	-0.124	-2.51	0.013				

3 df: degree of freedom; R²: Nagelkerke's pseudo-R² values were used as effect size measurement. : Hcy:
 4 homocysteine; HC: healthy controls; IAI: inflammatory activity index computed as first principal
 5 component extracted from M1, Th1, Th17, Th2, Treg, TNF- α + sTNFR1 + sTNFR2; *MTHFR 677C>T*

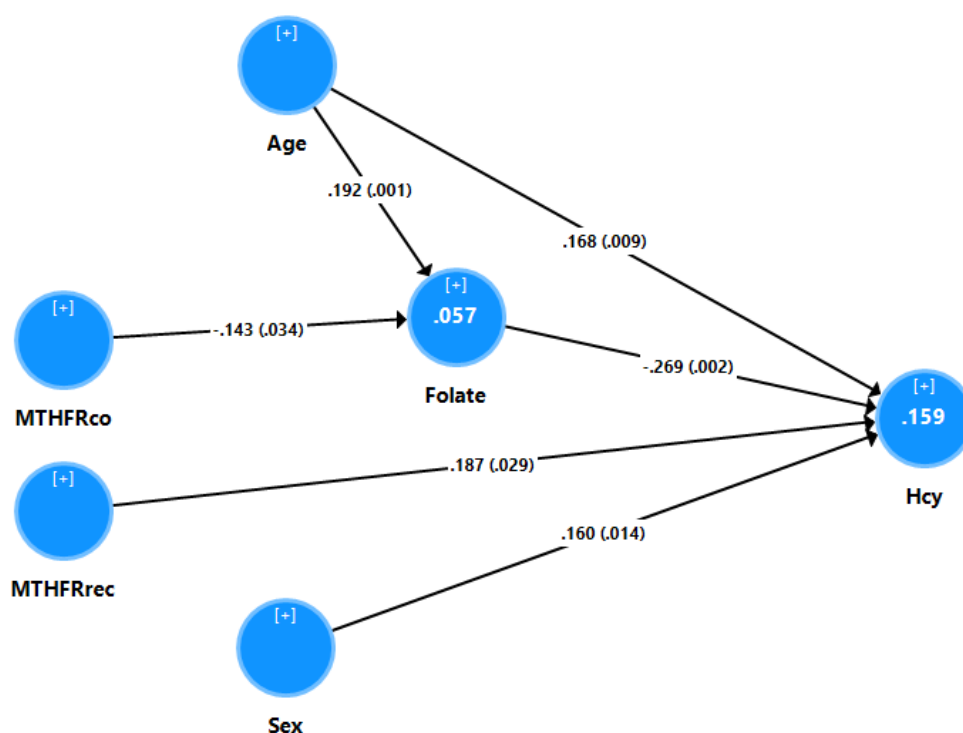
1 methylenetetrahydrofolate reductase genetic variant with C as the major allele and T as the minor allele:

2 recessive model: CC + CT vs. TT; codominant model: CC=-1; CT=0; TT=+1

3

4

5



6

7

8

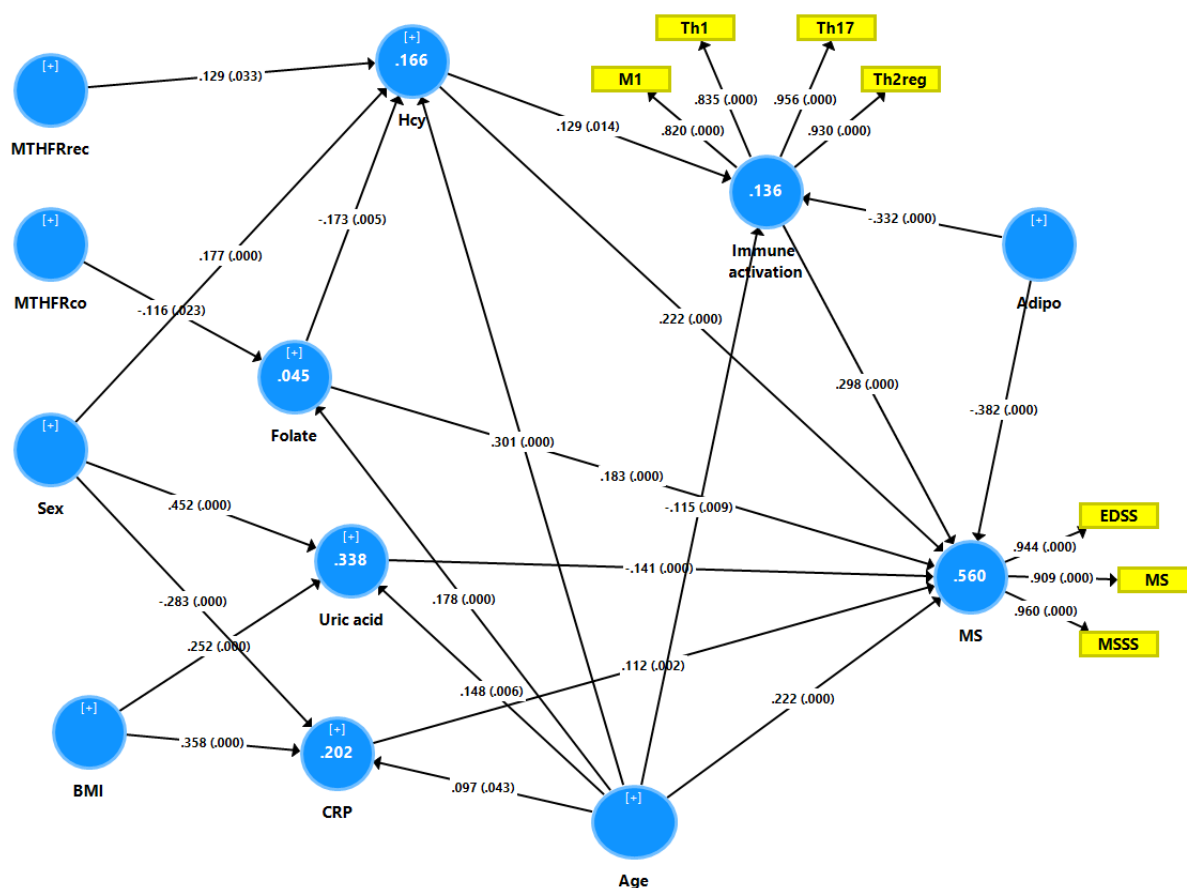
9 **Fig 1** Results of Partial Least Squares (PLS) path analysis performed in healthy controls. This PLS
 10 analysis shows the causal relationships between the *MTHFR* C677T variant (entered as recessive and
 11 codominant models), age and sex (entered as independent variables) and homocysteine (Hcy) (entered
 12 as final dependent variable). Folate was entered as a partial mediator allowing for mediated effects of
 13 the genotypes, age, and sex on Hcy levels. *MTHFRco*: codominant model (CC=-1; CT=0; TT=+1);
 14 *MTHFRrec*: recessive model (CC + CT vs. TT genotypes); Associations are defined as pathways
 15 coefficients with p-values. The white figures in the circles indicate the explained variance.

16

17

18

19

1
23
4

5 **Fig 2** Results of Partial Least Squares (PLS) path analysis performed in all patients with multiple
6 sclerosis (MS) and controls combined. This PLS analysis shows the relationship between the *MTHFR*
7 677C>T variant, demographic and metabolic data, immune activation index (IAI), homocysteine(Hcy)
8 and folate plasma levels, and MS-EDSS-MSSS, an index of MS and its severity, entered as a latent
9 vector extracted from MS diagnosis, disability (EDSS) and disability progression (MSSS). IAI was
10 entered as a latent vector extracted from macrophage M1, T helper (Th)1, Th17, and Th2+T regulatory
11 (Treg) cytokine levels. The other variables were entered as single indicators. Associations are defined
12 as pathways coefficients with p-values. Circles indicate the explained variance. *MTHFR*co: codominant
13 model of the *MTHFR* 677C>T variant (CC=-1; CT=0; TT=1); *MTHFR*rec: recessive model of the
14 *MTHFR* 677C>T variant (CC + CT vs. TT genotypes); BMI: body mass index; CRP: C-reactive protein;
15 EDSS: Expanded Disability Status Score; MSSS: Multiple Sclerosis Severity Score; Adipo: adiponectin;
16 M1: macrophage M1 interleukin (IL)-6 and tumor necrosis factor (TNF)- α ; Th1: T helper 1 IL-2 and
17 interferon (IFN)- γ cytokines; Th17: T helper 17 IL-17 and IL-6 cytokines; Th2reg: T helper 2 and T
18 regulatory IL-4 and IL-10 cytokines.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no Artigo 1 da presente Tese de Doutorado permitem as seguintes conclusões:

- Foram selecionados 30 estudos, dos quais 24 caso-controles, 4 meta-análises, 1 retrospectivo e 1 longitudinal que avaliaram a associação dos níveis de Hcy, folato e vitamina B12 entre os pacientes com EM e indivíduos saudáveis;
- Quanto aos níveis de Hcy em pacientes com EM *versus* controles, 18 estudos revelaram aumento de Hcy, 8 estudos não observaram diferença significativa e 4 estudos não avaliaram este metabólito;
- Em relação aos níveis de folato (EM *versus* controles), um estudo demonstrou aumento dos valores de folato, 3 estudos demonstraram valores diminuídos, em 16 estudos os valores não diferiram significativamente, em 10 estudos, esta variável não foi avaliada.
- Quanto aos níveis de vitamina B12 (EM *versus* controles), 8 estudos demonstram aumento, 12 estudos não verificaram diferença significativa e 10 estudos não avaliaram esta variável;
- A associação entre a variante 677C>T do gene *MTHFR* foi avaliada em 11 estudos realizados em diferentes populações mundiais; destes, 5 estudos demonstraram associação entre esta variante e a EM, enquanto 6 estudos não demonstraram esta associação; no entanto, todos estes estudos não avaliaram os níveis de Hcy e folato nos pacientes com EM e controles.

1 Os resultados obtidos no Artigo 2 da presente Tese de Doutorado
2 permitem as seguintes conclusões:

- 3
- 4 • A variante genética 677C>T do *MTHFR* não apresentou associação com EM entre
5 os grupos de estudo (pacientes com EM e incapacidade leve; pacientes com EM
6 com incapacidade moderada/alta e indivíduos saudáveis) em todos os modelos
7 genéticos avaliados (alélico, codominante, dominante, recessivo e
8 overdominante);
 - 9 • Os níveis plasmáticos de Hcy e folato foram maiores nos pacientes com EM
10 quando comparados aos indivíduos saudáveis;
 - 11 • Os pacientes com incapacidade moderada/alta apresentaram maiores
12 concentrações dos perfis de citocinas produzidas por macrófago M1, Th1, Th17,
13 Th2 + Tregs, e TNF- α e seus receptores solúveis (sTNFR1 e sTNFR2) quando
14 comparados aos controles e ao grupo de pacientes com incapacidade leve;
 - 15 • Quando se avaliou um modelo preditor de incapacidade na EM, a idade e a
16 inflamação (proposta como IAI neste estudo), foram as variáveis que
17 apresentaram um efeito moderado;
 - 18 • Já no modelo preditor de progressão da EM, além da inflamação (IAI), os valores
19 diminuídos de 25(OH)D mostraram um efeito modesto;
 - 20 • A variante genética 677C>T do *MTHFR* não mostrou associação com a
21 suscetibilidade, incapacidade e progressão da EM; todavia, o genótipo em
22 homozigose para o alelo variante T (TT) mostrou um efeito indireto sobre a
23 suscetibilidade à EM e incapacidade da doença mediado pela Hcy.
 - 24 • Os resultados sugerem que o modelo recessivo da variante genética (*MTHFR* TT
25 *versus* CC+CT), IAI, sexo, idade e índice de massa corporal foram preditores do
26 índice de gravidade da EM com um efeito considerável.
- 27
28
29
30
31
32
33
34

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Os dois estudos realizados apresentam limitações que merecem ser discutidas. No artigo 1, propusemos realizar uma revisão de escopo sobre o tema investigado. A revisão de escopo é uma forma de síntese de conhecimento que utiliza uma abordagem sistemática e interativa para identificar e sintetizar um corpo de literatura existente ou emergente sobre um determinado tópico. Além disto, um dos seus objetivos é indicar se há necessidade de uma revisão sistemática com meta-análise. Diante dos nossos resultados, avaliando possíveis vieses de publicação e o peso de cada estudo sobre esses dados, uma revisão sistemática com meta-análise seria mais adequada para esclarecer os resultados conflitantes obtidos.

Quanto ao Artigo 2, algumas limitações merecem ser apontadas, como o delineamento caso-controle que não permite inferências sobre relação causal entre as variáveis avaliadas; o não controle de variáveis como dieta e a não determinação dos valores de vitamina B12; o estudo de uma única variante genética (*MTHFR* 677C>T) exclui uma avaliação mais complexa da relação entre a etiologia multifacetada da EM e outras variáveis genéticas; inclusão de pacientes com diferentes formas clínicas de EM e em tratamento com diferentes medicamentos para EM; no entanto, todos os pacientes estavam em fase clínica de remissão da doença e os resultados foram ajustados para formas clínicas e terapêutica para EM. Apesar dessas limitações, alguns pontos fortes devem ser destacados, como a avaliação de variáveis clínicas e um amplo painel de biomarcadores inflamatórios e metabólicos associados com a fisiopatologia da EM, assim como a proposta de dois escores que poderiam refletir a atividade inflamatória e progressão da doença.

Considerando as limitações apresentadas, estes resultados fornecem informações importantes sobre o papel da variante *MTHFR* 677C>T, da Hcy, do folato e da resposta inflamatória nos mecanismos fisiopatológicos da EM. Embora a variante *MTHFR* 677C>T não tenha demonstrado estar relacionada com EM, incapacidade ou progressão da incapacidade, o genótipo TT mostrou um efeito indireto na suscetibilidade e incapacidade da EM modulado pelo aumento da Hcy. Estas descobertas enfatizam a intrincada interação de fatores genéticos com mecanismos inflamatórios e anti-inflamatórios na suscetibilidade, incapacidade e progressão da incapacidade da EM, e sugerem que a busca por novos potenciais alvos terapêuticos possa contribuir para um melhor manejo da EM nestes pacientes que poderão ser

1 beneficiados com a utilização de medicina personalizada que leve em consideração
2 os perfis genéticos, inflamatórios e metabólicos dos pacientes.

3 Acredito que este estudo vem somar aos previamente desenvolvidos e
4 publicados pelo Grupo de Pesquisa em Imunologia Aplicada da UEL, que tem
5 investigado as complexas interações entre fatores genéticos *HLA* e não-*HLA*, fatores
6 ambientais como o status de vitamina D, estresse oxidativo, desequilíbrio da resposta
7 imune com aumento das citocinas inflamatórias e diminuição das citocinas anti-
8 inflamatórias, alterações hormonais, como prolactina, e alterações metabólicas como
9 resistência à insulina e dislipidemias. Mais algumas peças deste intrigante quebra-
10 cabeça podem ter sido colocadas - o papel da homocisteína, folato, vitamina B12 e da
11 variante MTHFR 677C>T - como contribuição para o melhor entendimento da
12 fisiopatologia da EM, para uma melhor capacitação dos acadêmicos de graduação e
13 de pós-graduação envolvidos no estudo e para a melhoria do atendimento e manejo
14 dos pacientes com EM de nossa população.

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

REFERÊNCIAS

- 1
2
3
- 4 ALATAB, S. *et al.* Inflammatory profile, age of onset, and the MTHFR polymorphism in
5 patients with multiple sclerosis. **Journal of Molecular Neuroscience**, Boston, v. 44,
6 n. 1, p. 6-11, 2011.
- 7 AMEDEI, A.; PRISCO, D.; D'ELIOS, M. M. Multiple sclerosis: the role of cytokines in
8 pathogenesis and in therapies. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel,
9 v. 13, n. 10, p.13438-13460, 2012.
- 10 AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of medical care in diabetes, 2014.
11 **Diabetes Care**, New York, v. 37, p. S14-80, 2014. Suplemento 1.
- 12 ANSARI, R. *et al.* Hyperhomocysteinemia and neurological disorders: a review.
13 **Journal of Clinical Neurology**, Seoul, v. 10, n. 4, p. 281-288, 2014.
- 14 AU-YEUNG, K. K. *et al.* Hyperhomocysteinemia activates nuclear factor-kappa B in
15 endothelial cells via oxidative stress. **Circulation Research**, Baltimore, v. 94, n.1, p.
16 28-36, 2004.
- 17 BARANZINI, S. E.; OKSENBERG, J. R. The genetics of multiple sclerosis: from 0 to
18 200 in 50 years. **Trends in Genetics**, Cambridge, v. 33, n. 12, p. 960-970, 2017.
- 19 BAR-OR, A.; LI, R. Cellular immunology of relapsing multiple sclerosis: interactions,
20 checks, and balances. **The Lancet Neurology**, London, v. 20, n. 6, p. 470-483, 2021.
- 21 BENES, P. *et al.* Methylene tetrahydrofolate reductase polymorphism, type II diabetes
22 mellitus, coronary artery disease, and essential hypertension in the Czech population.
23 **Molecular Genetics and Metabolism**, Orlando, v. 73, n. 2, p. 188-195, 2007.
- 24 BENJAMINI, Y.; HOCHBERG, Y. Controlling the false discovery rate: a practical and
25 powerful approach to multiple testing. **Journal of the Royal Statistical Society.**
26 **Series B (Methodological)**, London, v. 57, n. 1, p. 289-300, 1995.
- 27 BONETTI, F.; BROMBO, G.; ZULIANI, G. The relationship between
28 hyperhomocysteinemia and neurodegeneration. **Neurodegenerative Disease**
29 **Management**, London, v. 6, n. 2, p. 133-145, 2016.
- 30 CAKINA, S. *et al.* Relationship between genetic polymorphisms MTHFR (C677T,
31 A1298C), MTR (A2756) and MTRR (A66G) genes and multiple sclerosis: a case-
32 control study. **Folia Neuropathologica**, Warsaw, v. 57, n. 1, p. 36-40, 2019.
- 33 CEJKOVÁ, S.; KRÁLOVÁ-LESNÁ, I.; POLEDNE, R. Monocyte adhesion to the
34 endothelium is an initial stage of atherosclerosis development. **Cor et Vasa (Polisk)**,
35 v. 58, n. 4, p. 419-425, 2016.

- 1 CEVIK, B. *et al.* Association of methylenetetrahydrofolate reductase gene C677T
2 polymorphism with multiple sclerosis in Turkish patients. **Journal of Investigative**
3 **Medicine**, Thorofare, v. 62, n. 8, p. 980–984, 2014.
- 4 CHU, F. *et al.* The roles of macrophages and microglia in multiple sclerosis and
5 experimental autoimmune encephalomyelitis. **Journal of Neuroimmunology**,
6 Amsterdam, v. 318, p. 1-7, 2018.
- 7 CORREA, E.; PAREDES, V.; MARTINEZ, B. Prevalence of multiple sclerosis in Latin
8 America and its relationship with European migration. **Multiple Sclerosis Journal**
9 **Experimental Translational Clinical**, Thousand Oaks, v. 2, p. 1-10, 2016.
- 10 CYRIL, C, *et al.* MTHFR gene variants C677T, A1298C and association with Down
11 syndrome: a case-control study from South India. **Indian Journal of Human**
12 **Genetics**, Mumbai, v. 15, n. 2, p. 60-64, 2009.
- 13 DANIKOWSKI, K. M.; JAYARAMAN, S.; PRABHAKAR, B. S. Regulatory T cells in
14 multiple sclerosis and myasthenia gravis. **Journal of Neuroinflammation**, London,
15 v.14, n. 1, p. 117, 2017.
- 16 DARDIOTIS, E. *et al.* Vitamin B12, folate and homocysteine levels and multiple
17 sclerosis: a meta-analysis. **Multiple Sclerosis and Related Disorders**, Amsterdam,
18 v. 17, p.190-197, 2017.
- 19 DARGAHI, N. *et al.* Multiple sclerosis: Immunopathology and treatment update. **Brain**
20 **Sciences**, Basel, v. 7, n. 7, p. 78, 2017.
- 21 DENDROU, C. A.; FUGGER, L.; FRIESE, M. A. Immunopathology of multiple
22 sclerosis. **Nature Reviews. Immunology**, London, v. 15, n. 9, p. 545-558.
- 23 DÍAZ, C.; ZARCO, L. A.; RIVERA, D. M. Highly active multiple sclerosis: an update.
24 **Multiple Sclerosis and Related Disorders**, Amsterdam, v. 30, p. 215–224, 2019.
- 25 DUBCHENKO, E. *et al.* Hyperhomocysteinemia and endothelial dysfunction in multiple
26 sclerosis. **Brain Sciences**, Basel, v. 10, n. 9, p. 637, 2020.
- 27 ESSE, R. *et al.* The contribution of homocysteine metabolism disruption to endothelial
28 dysfunction: state-of-the-art. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v.
29 20, n. 4, p. 867, 2019.
- 30 FAHMY, E. M. *et al.* Relation of serum levels of homocysteine, vitamin B12 and folate
31 to cognitive functions in multiple sclerosis patients. **The International Journal of**
32 **Neuroscience**, London, v. 128, n. 9, p. 835-841, 2018.
- 33 FEKIH MARISSA, N. *et al.* Association of methylenetetrahydrofolate reductase A1298C
34 polymorphism but not of C677T with multiple sclerosis in Tunisian patients. **Clinical**
35 **Neurology and Neurosurgery**, Amsterdam, v. 115, n. 9, p. 1657-1660, 2013.

- 1 FENG, J. *et al.* Homocysteine activates T cells by enhancing endoplasmic reticulum-
2 mitochondria coupling and increasing mitochondrial respiration. **Protein and Cell**,
3 Oxford, v. 7, n. 6, p. 391-402, 2016.
- 4 FILIPPI, M. *et al.* Multiple sclerosis. **Nature Reviews: Disease Primers**, London, v. 4,
5 n. 1, p. 43, 2018.
- 6 FONTOURA, P.; GARREN, H. Multiple sclerosis therapies: molecular mechanisms
7 and future. **Results and Problems in cell differentiation**, Berlin, v. 51, p. 259-285,
8 2010.
- 9 FREDERIKSEN, J. *et al.* Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism
10 (C677T) hyperhomocystenaemia, and risk of ischemic cardiovascular disease and
11 venous thromboembolism: prospective and case control studies from the Copenhagen
12 City heart study. **Blood**, New York, v.104, n. 10, p. 3046-3051, 2004.
- 13 FROSST, P. *et al.* A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common
14 mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. **Nature Genetics**, New York, v. 10,
15 n. 1, p. 111-113, 1995.
- 16 GAO, X.; LI, J.; CHEN, M. Effect of Homocysteine on the differentiation of CD4+ T cells
17 into Th17 cells. **Digestive Diseases and Sciences**, New York, v. 63, n. 12, p. 3339-
18 3347, 2018.
- 19 GODBOLE, K. *et al.* Maternal one-carbon metabolism, MTHFR and TCN2 genotypes
20 and neural tube defects in India. **Birth Defects Research. Part A, Clinical and**
21 **Molecular Teratology**, Hoboken, v. 91, n. 9, p. 848-856, 2011.
- 22 GONÇALVES, M. V. M. *et al.* Prevalence of multiple sclerosis in key cities of Brazil. A
23 study in Joinville, Southern Brazil. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, São Paulo, v. 79,
24 n. 2, p. 112-126, 2021.
- 25 GOYETTE, P. *et al.* Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA
26 mapping and mutation identification. **Nature Genetics**, New York, v. 7, n. 2, p.195-
27 200,1994.
- 28 GRIGORIADIS, N.; van PESCH. V.; PARADIGMS GROUP. A basic overview of
29 multiple sclerosis immunopathology. **European Journal of Neurology**, Oxford, v. 22,
30 p. 3-13, 2015. Suplemento 2.
- 31 GRUNDY, S. M. *et al.* Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an
32 American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute scientific
33 statement. **Current Opinion in Cardiology**, London, v. 21, n. 1, p. 1-6, 2006.

- 1 HAAS, J. *et al.* Reduced suppressive effect of CD4+CD25high regulatory T cells on
2 the T cell immune response against myelin oligodendrocyte glycoprotein in patients
3 with multiple sclerosis. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v. 35, n. 11, p.
4 3343-3352, 2005.
- 5 HAASE, S.; LINKER, R. A. Inflammation in multiple sclerosis. **Therapeutic Advances**
6 **in Neurological Disorders**, London, v. 14, p. 17562864211007687, 2021.
- 7 HAYES, C. E.; NTAMBI, J. M. Multiple sclerosis: lipids, lymphocytes, and vitamin D.
8 **Immunometabolism**, London, v. 2, n. 3, p. e200019, 2020.
- 9 HEMMER, B.; KERSCHENSTEINER, M.; KORN, T. Role of the innate and adaptive
10 immune responses in the course of multiple sclerosis. **The Lancet Neurology**,
11 London, v.14, n. 4, p. 406-419, 2015.
- 12 HOFFMAN, M. Hypothesis: hyperhomocysteinemia is an indicator of oxidant stress.
13 **Medical Hypotheses**, New York, v. 77, n. 6, p. 1088-1093, 2011.
- 14 HUANG, W. X.; HE, B.; HILLERT, J. A methylenetetrahydrofolate reductase gene
15 polymorphism in multiple sclerosis. **European Journal of Neurology**, Oxford, v. 4, n.
16 2, p. 185-187, 1997.
- 17 INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Censo**
18 **demográfico 2010**. Características da população e dos domicílios: resultados do
19 universo. Rio de Janeiro IBGE, 2011. Disponível em:
20 https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/93/cd_2010_caracteristicas_populacao_domicilios.pdf. Acesso em: 10 out. 2023.
- 22 JAMES, P. A. *et al.* Evidence-based guideline for the management of high blood
23 pressure in adults: report from the panel members appointed to the Eighth Joint
24 National Committee (JNC 8). **Journal of the American Medical Association**,
25 Chicago, v. 311, n. 5, p. 507-520, 2014.
- 26 JIANG, S. *et al.* Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism,
27 hypertension, and risk of stroke: a prospective, nested case-control study. **The**
28 **International Journal of Neuroscience**, London, v. 127, n. 3, 253-260, 2017.
29 doi.org/10.1080/00207454.2016.1183126
- 30 KAIMEN-MACIEL, D. R, *et al.* HLA-DRB1* allele-associated genetic susceptibility and
31 protection against multiple sclerosis in Brazilian patients. **Molecular Medicine**
32 **Reports**, Athens, v. 2, n. 6, p. 993-998, 2009.
- 33 KALLAUR, A. P. *et al.* Cytokine profile in patients with progressive multiple sclerosis
34 and its association with disease progression and disability. **Molecular Neurobiology**,
35 Clifton, v. 54, n. 4, p. 2950-2960, 2017.
- 36 KALLAUR, A. P. *et al.* Genetic polymorphisms associated with the development and

- 1 clinical course of multiple sclerosis. **International Journal of Molecular Medicine**,
2 Athens, v. 28, n. 4, p. 467-479, 2011.
- 3 KANG, S. *et al.* Intermediate homocysteinaemia: a thermolabile variant of
4 methylenetetrahydrofolate reductase. **American Journal of Human Genetics**,
5 Baltimore, v. 43, n. 4, p. 414-421, 1988.
- 6 KEBIR, H. *et al.* Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and
7 central nervous system inflammation. **Nature Medicine**, New York, v. 13, n. 10, p.
8 1173-1175, 2007.
- 9
- 10 KILIC, S. *et al.* Possible association between germline methylenetetrahydrofolate
11 reductase gene polymorphisms and psoriasis risk in a Turkish population. **Clinical and**
12 **Experimental Dermatology**, Oxford, v. 42, n. 1, p. 8-13, 2017.
- 13
- 14 KISTER, I.; KANTARCI, O. H. Multiple sclerosis severity score: concept and
15 applications. **Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)**, v. 26, n. 5, p.
16 548-553, 2020.
- 17
- 18 KLINEOVA, S.; LUBLIN, F. D. Clinical course of multiple sclerosis. **Cold Spring**
19 **Harbor Perspectives in Medicine**, Woodbury, v. 8, n. 9, p. a028928, 2018.
- 20
- 21 KLOTZ, L. *et al.* The variant methylenetetrahydrofolate reductase c.1298A > C
22 (p.E429A) is associated with multiple sclerosis in a German case-control study.
23 **Neuroscience Letters**, Amsterdam, v. 468, n. 3, p. 183-185, 2010.
- 24
- 25 KOCH, M. W. *et al.* Serum NSE level and disability progression in multiple sclerosis.
26 **Journal of the Neurological Sciences**, Amsterdam, v. 350, n. 1-2, p. 46-50, 2015.
- 27
- 28 KOCH-HENRIKSEN, N.; MAGYARI, M. Apparent changes in the epidemiology and
29 severity of multiple sclerosis. **Nature Reviews. Neurology**, London, v. 17, n. 11, p.
30 676-688, 2021.
- 31
- 32 KOKLESOVA, L. *et al.* Homocysteine metabolism as the target for predictive medical
33 approach, disease prevention, prognosis, and treatments tailored to the person. **The**
34 **EPMA Journal**, Dordrecht, v. 12, n. 4, p. 477-505, 2021.
- 35
- 36 KOTSOPOULOS, J. *et al.* Polymorphisms in folate metabolizing enzymes and
37 transport proteins and the risk of breast cancer. **Breast Cancer Research and**
38 **Treatment**, Dordrecht, v. 112, n. 3, p. 585-593, 2008.
- 39
- 40 KRIEBITZSCH, C. *et al.* 1,25-dihydroxyvitamin D3 influences cellular homocysteine
41 levels in murine preosteoblastic MC3T3-E1 cells by direct regulation of cystathionine
42 β -synthase. **Journal of Bone and Mineral Research**, New York, v. 26, n. 12, p. 2991-
43 3000, 2011.
- 44
- 45 KURTZKE, J. F. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded
46 disability status scale (EDSS). **Neurology**, Hagerstown, v. 33, n. 11, p. 1444-1452,
47 1983.
- 48
- 49 LAKSMI, S. V. V. *et al.* Interactions of 5'-UTR Thymidylate Synthase Polymorphism

- 1 with 677C→ T Methylene Tetrahydrofolate Reductase and 66A→ G
2 Methyltetrahydrofolate Homocysteine Methyl-transferase Reductase Polymorphisms
3 Determine Susceptibility to Coronary Artery Disease. **Journal of Atherosclerosis and**
4 **Thrombosis**, Tokyo, v.18, n. 1, p. 56-64, 2010.
- 5
6 LEE, Y. H. *et al.* Meta-analysis of associations between MTHFR and GST
7 polymorphisms and susceptibility to multiple sclerosis. **Neurological Sciences**,
8 Milano, v. 36, n. 11, p. 2089-2096, 2015.
- 9
10 LEHOTSKÝ, J. *et al.* Role of homocysteine in the ischemic stroke and development of
11 ischemic tolerance. **Frontiers in Neuroscience**, Lausanne, v. 10, p. 538, 2016.
- 12
13 LENTZ, S. R.; HAYNES, W. G. Homocysteine: is it a clinically important cardiovascular
14 risk factor? **Cleveland Clinic Journal of Medicine**, Cleveland, v. 71, n. 9, p. 729-734,
15 2004.
- 16
17 LIEW, S. C.; GUPTA, E. D. Methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T
18 polymorphism: epidemiology, metabolism and the associated diseases. **European**
19 **Journal of Medical Genetics**, Amsterdam, v. 58, n. 1, p. 1-10, 2015.
- 20
21 LIMA, L. M. *et al.* Homocysteine and methylenetetrahydrofolate reductase in subjects
22 undergoing coronary angiography. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo,
23 v. 88, n. 2, p. 167-172, 2007.
- 24
25 LIN, X.; MENG, X.; SONG, Z. Homocysteine and psoriasis. **Bioscience Reports**,
26 London, v. 39, n. 11, p. BSR20190867, 2019.
- 27
28 LIU, L. *et al.* MTHFR C677T and A1298C polymorphisms may contribute to the risk of
29 Parkinson's disease: A meta-analysis of 19 studies. **Neuroscience letters**,
30 Amsterdam, v. 662, p. 339-345, 2018.
- 31
32 LIU, R. *et al.* Autoreactive lymphocytes in multiple sclerosis: Pathogenesis and
33 treatment target. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 13, p. 996469, 2022.
- 34
35 LU, M. *et al.* Association between genetic polymorphisms in methylenetetrahydrofolate
36 reductase and risks of autoimmune disease: a systematic review and meta-analysis.
37 **Disease Markers**, New York, v. 2022, p. 4568145, 2022.
- 38
39 LUBLIN, F. D. *et al.* Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013
40 revisions. **Neurology**, Hagerstown, v. 83, n. 3, p. 278-286, 2014.
- 41
42 MELNIKOV, M. *et al.* Dopaminergic therapeutics in multiple sclerosis: focus on Th17-
43 cell functions. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, New York, v. 15, n. 1, p. 37-
44 47, 2020.
- 45
46 MESTAS, J.; LEY, K. Monocyte-endothelial cell interactions in the development of
47 atherosclerosis. **Trends in Cardiovascular Medicine**, New York, v. 18, n. 6, p. 228-
48 232, 2008.
- 49
50 MILLER, E. *et al.* Oxidative modification of patient's plasma proteins and its role in

- 1 pathogenesis of multiple sclerosis. **Clinical Biochemistry**, Tarrytown, v. 45, n. 1-2, p.
2 26-30, 2012.
- 3
- 4 MILO, R.; MILLER, A. Revised diagnostic criteria of multiple sclerosis. **Autoimmunity**
5 **Reviews**, Amsterdam, v. 13, n. 4-5, p. 518-524, 2014.
- 6
- 7 MOGHADDASI, M. *et al.* Homocysteine, vitamin B12 and folate levels in Iranian
8 patients with multiple sclerosis: a case control study. **Clinical Neurology and**
9 **Neurosurgery**, Amsterdam, v. 115, n. 9, p. 1802-1805, 2013.
- 10
- 11 MORETTI, R. *et al.* Homocysteine in neurology: a possible contributing factor to small
12 vessel disease. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 22, n. 4, p.
13 2051, 2021.
- 14
- 15 MULTIPLE SCLEROSIS INTERNATIONAL FEDERATION (MSIF). **Atlas de**
16 **Esclerose Múltipla em 2020**: mapeamento da esclerose múltipla no mundo.
17 Tradução de Associação Brasileira de Esclerose Múltipla. São Paulo: ABEM, 2020.
18 Disponível em: [https://www.abem.org.br/wp-](https://www.abem.org.br/wp-content/uploads/2020/09/AtlasOfMS_3rdEdition_traduzido.pdf)
19 [content/uploads/2020/09/AtlasOfMS_3rdEdition_traduzido.pdf](https://www.abem.org.br/wp-content/uploads/2020/09/AtlasOfMS_3rdEdition_traduzido.pdf). Acesso em: 12 fev.
20 2024.
- 21
- 22 MUNTJEWERFF, J. W. *et al.* Homocysteine, methylenetetrahydrofolate reductase and
23 risk of schizophrenia: a meta-analysis. **Molecular Psychiatry**, Houndmills, v. 11, n. 2,
24 p. 143-149, 2006.
- 25
- 26 MURÚA, S. R.; FAREZ, M. F.; QUINTANA, F. J. The immune response in multiple
27 sclerosis. **Annual Review of Pathology**, Palo Alto, v. 17, p. 121-139, 2022.
- 28
- 29 NAGHIBALHOSSAINI, F. *et al.* Association between MTHFR genetic variants and
30 multiple sclerosis in a Southern Iranian population. **International Journal of**
31 **Molecular and Cellular Medicine**, Babol, v. 4, n. 2, p. 87-93, 2015.
- 32
- 33 NOURBAKHS, B.; MOWRY, E. M. Multiple sclerosis risk factors and pathogenesis.
34 **CONTINUUM: Lifelong Learning in Neurology**, Hagerstown, v. 25, n. 3, p. 596-610,
35 2019.
- 36
- 37 OH, J.; VIDAL-JORDANA, A.; MONTALBAN, X. Multiple sclerosis: clinical aspects.
38 **Current Opinion in Neurology**, London, v. 31, n. 6, p. 752-759, 2018.
- 39
- 40 OLIVEIRA, S. R. *et al.* Immunopathological Mechanisms and Oxidative Stress
41 Damage in Multiple Sclerosis. *In*: DICHI, I. *et al.* **Role of oxidative stress in chronic**
42 **diseases**. CRC Press Taylor & Francis Group. Boca Raton, Florida. p. 549-588, 2014.
- 43
- 44 OLIVEIRA, S. R. *et al.* Elevated plasma homocysteine levels are associated with
45 disability progression in patients with multiple sclerosis. **Metabolic Brain Disease**,
46 Amsterdam, v. 33, n. 5, p. 1393-1399, 2018.
- 47
- 48 PEREIRA, A.B.C.N.G. *et al.* Prevalence of multiple sclerosis in Brazil: a systematic
49 review. **Multiple Sclerosis and Related Disorders**, Amsterdam v. 4, p. 572-579,
50 2015.

- 1
2 PODDAR, R. Hyperhomocysteinemia is an emerging comorbidity in ischemic stroke.
3 **Experimental Neurology**, Orlando, v. 336, p. 113541, 2021.
4
- 5 POLMAN, C. H, *et al.* Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the
6 McDonald criteria. **Annals of Neurology**, New York, v. 69, n. 2, p. 292-302, 2011.
7
- 8 POZZILLI, C. *et al.* Diagnosis and treatment of progressive multiple sclerosis: A
9 position paper. **European Journal of Neurology**, Oxford, v. 30, n. 1, p. 9-21, 2023.
10
- 11 PUSHPAKUMAR, S.; KUNDU, S.; SEN, U. Endothelial dysfunction: the link between
12 homocysteine and hydrogen sulfide. **Current Medicinal Chemistry**, Schiphol, v. 21,
13 n. 32, p. 3662-3672, 2014.
14
- 15 RAGHUBEER, S.; MATSHA, T. E. Metylenetetrahydrofolate (MTHFR), the one-
16 carbon cycle, and cardiovascular risks. **Nutrients**, Basel, v. 13, n. 2, p. 4562, 2021.
17 Doi: 10.3390/nu13124562.
18
- 19 RAI, V. Association of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene C677T
20 polymorphism with autism: evidence of genetic susceptibility. **Metabolic Brain**
21 **Disease**, Amsterdam, v. 31, n. 4, p. 727-735, 2016b.
22
- 23 RAI, V. Folate pathway gene methylenetetrahydrofolate reductase C677T
24 polymorphism and Alzheimer disease risk in Asian population. **Indian Journal of**
25 **Clinical Biochemistry**, New Delhi, v. 31, n. 3, p. 245-252, 2016a.
26
- 27 RAMSARANSING, G. S. M. *et al.* Plasma homocysteine levels in multiple sclerosis.
28 **Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry**, London, v. 77, n. 2, p. 189-
29 192, 2006.
30
- 31 REICH, D. S.; LUCCHINETTI, C. F.; CALABRESI, P. A. Multiple sclerosis. **The New**
32 **England Journal of Medicine**, Boston, v. 378, n. 2, p. 169-180, 2018.
33
- 34 RINGLE, C. M.; WENDE, S.; BECKER, J. M. **SmartPLS 3. SmartPLS GmbH,**
35 **Boenningstedt.** 2015. Disponível em: <http://www.smartpls.com>. Acesso em: 20 jul.
36 2023.
37
- 38 ROXBURGH, R. H. *et al.* Multiple sclerosis severity score: using disability and disease
39 duration to rate disease severity. **Neurology**, Hagerstown, v. 64, n. 7, p. 1144-1151,
40 2005.
41
- 42 RUSSO, C. *et al.* Hyperhomocysteinemia is associated with cognitive impairment in
43 multiple sclerosis. **Journal of Neurology**, Berlin, v. 255, n. 1, p. 64-69, 2008.
44
- 45 SALEMI, G. *et al.* Blood lipids, homocysteine, stress factors and vitamins in clinically
46 stable multiple sclerosis patients. **Lipids in Health and Disease**, London, v. 9, p. 19,
47 2010.
48
- 49 SENA, C. M.; PEREIRA, A. M.; SEIÇA, R. Endothelial dysfunction. A major mediator
50 of diabetic vascular disease. **Biochimica et Biophysica Acta Molecular Basis of**

- 1 **Disease**, Amsterdam v. 1832, n. 12, p. 2216-2231, 2013.
- 2
- 3 ŠKOVIEROVÁ, H. *et al.* The molecular and cellular effect of homocysteine metabolism
4 imbalance on human health. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v.
5 17, n. 10, p. 1733, 2016.
- 6
- 7 SOSPEDRA, M.; MARTIN, R. Immunology of multiple sclerosis. **Seminars in**
8 **Neurology**, New York, v. 36, n. 2, p. 115-127, 2016.
- 9
- 10 SU, J. B. Vascular endothelial dysfunction and pharmacological treatment. **World**
11 **Journal of Cardiology**, Pleasanton, v. 7, n. 11, p. 719-741, 2015.
- 12
- 13 SUN, J. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases are
14 essential for the inflammatory response in cancer cells. **Journal of Signal**
15 **Transduction**, New York, v. 2010, p. 985132, 2010.
- 16
- 17 TAJOURI, L. *et al.* Genetic investigation of methylenetetrahydrofolate reductase
18 (MTHFR) and catechol-O-methyl transferase (COMT) in multiple sclerosis. **Rain**
19 **Research Bulletin**, New York v. 69, n. 3, p. 327-331, 2006.
- 20
- 21 TAWFIK, A. *et al.* Homocysteine and Age-Related Central Nervous System Diseases:
22 Role of Inflammation. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 22, n.
23 12, p. 6259, 2021.
- 24
- 25 TEUNISSEN, C. E. *et al.* Serum homocysteine levels in relation to clinical progression
26 in multiple sclerosis **Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry**, London,
27 v. 79, n. 12, p. 1349-1353, 2008.
- 28
- 29 THOMPSON, A. J. *et al.* Multiple sclerosis. **Lancet (London, England)**, v. 391, n.
30 10130, p. 1622–1636, 2018a.
- 31
- 32 THOMPSON, A. J. *et al.* Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the
33 McDonald criteria. **The Lancet. Neurology**, London, 17(2), 162-173, 2018b.
- 34
- 35 TOPAL, G. *et al.* Homocysteine induces oxidative stress by uncoupling of NO synthase
36 activity through reduction of tetrahydrobiopterin. **Free Radical Biology and Medicine**,
37 Tarrytown, v. 36, n. 12, p. 1532-1541, 2004.
- 38
- 39 VALLANCE, P; CHAN, N. Endothelial function and nitric oxide: clinical relevance.
40 **Heart (British Cardiac Society)**, London, v. 85, n. 3, p. 342-350, 2001.
- 41
- 42 VIDAL-JORDANA, A.; MONTALBAN, X. Multiple sclerosis: epidemiologic, clinical, and
43 therapeutic aspects. **Neuroimaging clinics of North America**, Philadelphia, v. 27, n.
44 2, p. 195-204, 2017.
- 45
- 46 VIGLIETTA, V. *et al.* Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells
47 in patients with multiple sclerosis. **The Journal of Experimental Medicine**, New York,
48 v. 199, n. 7, p. 971-979, 2004.
- 49
- 50 WALTON, C. *et al.* Rising prevalence of multiple sclerosis worldwide: Insights from

- 1 the Atlas of MS, third edition. **Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke,**
2 **England)**, v. 26, n. 4, p. 1816-1821, 2020.
- 3
- 4 WANG, N. *et al.* Homocysteine upregulates interleukin-17A expression via Nsun2-
5 mediated RNA methylation in T lymphocytes. **Biochemical and Biophysical**
6 **Research Communications**, San Diego, v. 493, n. 1, p. 94-99, 2017.
- 7
- 8 WILDNER, P.; STASIOŁEK, M.; MATYSIAK, M. Differential diagnosis of multiple
9 sclerosis and other inflammatory CNS diseases. **Multiple Sclerosis and Related**
10 **Disorders**, Amsterdam, v. 37, p. 101452, 2020.
- 11
- 12 WYSE, A.T. *et al.* Homocysteine and gliotoxicity. **Neurotoxicity Research**,
13 Amsterdam, v. 39, n. 3, p. 966-974, 2021.
- 14
- 15 YADAV, U. *et al.* Distribution of MTHFR C677T gene polymorphism in healthy north
16 Indian population and an updated meta-analysis. **Indian Journal of Clinical**
17 **Biochemistry**, New Delhi, v. 32, n. 4, p. 399-410, 2017.
- 18
- 19 YADAV, U.; KUMAR, P.; GUPTA, S. *et al.* Role of MTHFR C677T gene polymorphism
20 in the susceptibility of schizophrenia: an updated meta-analysis. **Asian Journal of**
21 **Psychiatry**, Amsterdam, v. 20, p. 41-51, 2016. [https://doi.org/10.1016/](https://doi.org/10.1016/j.ajp.2016.02.002)
22 [j.ajp.2016.02.002](https://doi.org/10.1016/j.ajp.2016.02.002)
- 23
- 24 YAMOUT, B.I.; ALROUGHANI, R. Multiple Sclerosis. **Seminars in Neurology**, New
25 York, v. 38, n. 2, p. 212-225, 2018.
- 26
- 27 YSRRAELIT, M. C.; CORREALE, J. Impact of sex hormones on immune function and
28 multiple sclerosis development. **Immunology**, Oxford, v. 156, n. 1, p. 9-22, 2019.
- 29
- 30 ZARIC, B. L. *et al.* Homocysteine and Hyperhomocysteinaemia. **Current Medicinal**
31 **Chemistry**, Schiphol, v. 26, n. 16, 2948-2961, 2019.
- 32
- 33 ZOCCOLELLA, S. *et al.* Elevated plasma homocysteine levels in patients with multiple
34 sclerosis are associated with male gender. **Journal of Neurology**, Berlin, v. 259, n.
35 10, p. 2105-2110, 2012.
- 36
- 37
- 38
- 39
- 40
- 41
- 42
- 43
- 44
- 45
- 46
- 47
- 48

1

ANEXO A

2

Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UEL



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS
 Universidade Estadual de Londrina/ Hospital Universitário Regional Norte do Paraná
 Registro CONEP 268

Parecer PF Nº. 074/09 CAAE Nº. 0070.0.268.000-09 FOLHA DE ROSTO Nº. 251304	Londrina, 20 de abril de 2010.
PESQUISADORA: EDNA MARIA VISSOCI REICHE CCS/PAC	
<p>Prezada Senhora:</p> <p>O "Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina/ Hospital Universitário Regional Norte do Paraná" (Registro CONEP 268) – de acordo com as orientações da Resolução 196/96. do Conselho Nacional de Saúde/MS e Resoluções Complementares, avaliou o projeto:</p> <p align="center">"O PAPEL DO POLIMORFISMO GENÉTICO DO FATOR DE NECROSE TUMORAL BETA (TNF-BETA) E O DESENVOLVIMENTO E CURSO CLÍNICO DE ESCLEROSE MÚLTIPLA NA POPULAÇÃO BRASILEIRA"</p>	
<p>Situação do Projeto: APROVADO</p> <p>Informamos que deverá ser comunicada, por escrito, qualquer modificação que ocorra no desenvolvimento da pesquisa, bem como deverá apresentar ao CEP/UEL relatório final da pesquisa.</p>	
<p align="center">Atenciosamente,</p>  <p align="center">Profª. Dra. Alexandrina Aparecida Maciel</p> <p align="center">Coordenadora Comitê de Ética em Pesquisa-CEP/UEL</p>	

3

4

1

ANEXO B

2 Critérios De McDonald 2017 (revisado e adaptado). Traduzido de Thomson et al., 2017.

Número de surtos	Número de lesões com evidência clínica objetiva	Crítérios adicionais para o diagnóstico de EM
2 ou mais surtos	2 ou mais lesões	Nenhum
2 ou mais surtos	1 lesão + evidência clara de surto anterior envolvendo uma lesão em localização anatômica distinta	Nenhum
2 ou mais surtos	1 lesão	Disseminação no espaço demonstrada por: <ul style="list-style-type: none"> • Novo surto em localização diferente no SNC <p style="text-align: center;">OU</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ressonância Magnética
1 surto	2 ou mais lesões	Disseminação no tempo demonstrada por: <ul style="list-style-type: none"> • Novo surto <p style="text-align: center;">OU</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ressonância Magnética <p style="text-align: center;">OU</p> <ul style="list-style-type: none"> • Presença de bandas oligoclonais no líquido
1 surto	1 lesão	Disseminação no espaço demonstrada por: <ul style="list-style-type: none"> • Novo surto em localização diferente no SNC <p style="text-align: center;">OU</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ressonância Magnética <p style="text-align: center;">E</p> Disseminação no tempo demonstrada por: <ul style="list-style-type: none"> • Novo surto <p style="text-align: center;">OU</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ressonância Magnética <p style="text-align: center;">OU</p> <ul style="list-style-type: none"> • Presença de bandas oligoclonais no líquido

3 EM = Esclerose Múltipla; SNC = Sistema Nervoso Central; LCR = Exame do líquido cefalorraquidiano;
4 IgG = Imunoglobulina G, DIT = Disseminação no Tempo, DIS = Disseminação no Espaço.

5 Nos critérios de McDonald originais (revisão de 2017), não são necessários testes adicionais,
6 entretanto, para efeito deste Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas (PCDT), do Ministério da
7 Saúde-Brasil, adotou-se que qualquer diagnóstico de EM deve ser realizado com acesso à
8 neuroimagem.

9 Fonte: www.gov.br/20210909_relatorio_de_recomendacao_pcdt_emrr_cp_78 Acesso em 31 set 2023

APÊNDICE A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE 1)

Por favor, leia cuidadosamente este consentimento e não hesite em perguntar sobre qualquer dúvida que tenha.

O (A) senhor (a) está sendo convidado (a) a participar, voluntariamente, de um projeto de pesquisa com o título “O papel do polimorfismo genético do fator de necrose tumoral beta (TNF- β) e o desenvolvimento e curso clínico de esclerose múltipla, na população brasileira”. O estudo será desenvolvido sob a coordenação da professora Dra. Edna Maria Vissoci Reiche, do departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas do Centro de Ciências da Saúde da UEL (telefone 43-3371-2321) com a colaboração do professor Dr. Damacio Ramón Kaimen-Maciel, do departamento de Clínica Médica do Centro de Ciências da Saúde (43-3371-2234) e demais professores da UEL. Cabe ao (a) senhor (a) decidir se pretende participar ou não. Caso não tenha condições de ler e/ou compreender as informações contidas neste termo, o mesmo poderá ser assinado e datado por um membro da sua família ou responsável legal.

O projeto de pesquisa tem como objetivo avaliar uma possível associação entre o gene do TNF-beta, uma molécula inflamatória, e a chance de desenvolvimento e curso clínico da esclerose múltipla. Neste momento em que o senhor (a) está sendo convidado (a) a participar do estudo, o diagnóstico de esclerose múltipla e as formas de tratamento já foram definidos pela equipe médica responsável pelo seu atendimento e a sua participação ou não no trabalho depende exclusivamente da sua vontade e não irá absolutamente modificar os rumos do seu tratamento, seja qual for a sua opção (participação ou não no estudo).

A sua participação no estudo implica na utilização de uma amostra do seu sangue, que foi coletada durante sua participação em dois projetos de pesquisa desenvolvidos anteriormente, aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da UEL, coordenados pelo professor Dr. Damacio Ramon Kaimen-Maciel e com a participação de outros pesquisadores. Os projetos estudaram o papel de outros fatores genéticos, como o sistema HLA e o CCR5, no desenvolvimento da esclerose múltipla. O primeiro projeto foi sobre “Genotipagem do sistema de antígeno leucocitário humano (HLA) classe II em pacientes com esclerose múltipla” e teve como objetivo avaliar uma possível associação entre os genes do sistema HLA e a chance de desenvolvimento e curso clínico da esclerose múltipla (Parecer n. 206/05 de 15 de setembro de 2005). Com a amostra de DNA extraído do sangue coletado, determinou-se os alelos dos genes do sistema HLA por métodos de biologia molecular. Os resultados obtidos demonstraram que existe uma associação do HLA com o risco de desenvolvimento e o curso clínico da esclerose múltipla e sugerem que o genótipo do HLA pode ser um biomarcador para a doença.

1 O segundo projeto que o (a) senhor (a) participou foi “Polimorfismo genético do receptor de
2 quimiocina CCR5 e a susceptibilidade e curso clínico da esclerose múltipla” e teve como objetivo avaliar
3 uma possível associação entre o gene do receptor de uma proteína envolvida na resposta inflamatória e
4 a chance de desenvolvimento e curso clínico da esclerose múltipla (Parecer n.207/05, de 15 de setembro
5 de 2005). Com a amostra de DNA extraído do sangue coletado, determinou-se os alelos do gene CCR5
6 por métodos de biologia molecular. Os resultados obtidos demonstraram que existe uma associação
7 entre este gene e presença das lesões observadas na ressonância nuclear magnética dos pacientes com
8 esclerose múltipla, sugerindo um papel deste fator genético no curso clínico da doença e que o genótipo
9 do CCR5 pode ser um biomarcador para a doença.

10 A amostra de sangue coletada durante a sua participação nestes dois projetos de pesquisa foi
11 armazenada no *freezer*, sob a responsabilidade da professora Dra. Edna Maria Vissoci Reiche, no
12 Laboratório de Análises Clínicas do HU, e foi identificada com número, sem a possibilidade da
13 identidade do (a) senhor (a) ser revelada a outras pessoas que não participam do estudo. Solicitamos sua
14 autorização para que esta amostra possa ser utilizada no desenvolvimento de um novo projeto de
15 pesquisa para o estudo de um outro gene chamado fator de necrose tumoral beta (TNF-beta) para avaliar
16 se existe associação entre este gene e o desenvolvimento e progressão da esclerose múltipla. O mesmo
17 estudo já foi realizado em outras populações mundiais mas não foi realizado na população brasileira, e
18 os resultados poderão contribuir para o melhor conhecimento do desenvolvimento da doença assim
19 como a possibilidade de se sugerir novas formas de tratamento da doença na nossa população.

20 Sua decisão para permitir a utilização da amostra armazenada é voluntária e em qualquer
21 momento o (a) senhor (a) pode retirar o consentimento e deixar de participar do estudo, sem
22 qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na instituição. Não haverá necessidade de
23 coletar amostras de sangue específicas para este projeto de pesquisa. Neste documento,
24 solicitamos também ao (a) senhor (a) a autorização para que o material armazenado possa,
25 posteriormente, ser armazenado para uso futuro. Comprometemos a submeter à análise do
26 Comitê de Ética em Pesquisa os novos projetos de pesquisa.

27 Informamos que os dados pessoais fornecidos e os resultados do exame realizado serão mantidos
28 sob sigilo e somente serão utilizados para fins de pesquisa. Durante todas as etapas do projeto, os
29 participantes serão identificados por um número codificado que será utilizado nas análises posteriores
30 para garantir a preservação da integridade do indivíduo, garantir o anonimato e evitar a quebra de
31 confidencialidade. Ao final do projeto, os resultados serão divulgados em forma de artigos científicos e
32 comunicações em eventos científicos, sempre mantendo o sigilo da identidade dos participantes.

33 Declara que está completamente esclarecido sobre a forma como a pesquisa será realizada, não
34 tendo nenhuma dúvida sobre sua natureza e a ausência de riscos na sua participação. Declara também
35 que está ciente de que sua participação é voluntária, de que será informado sobre os resultados da análise

1 genética do gene TNF, objeto deste estudo, durante o seu atendimento, de não terá nenhum ônus e de
2 que poderá se recusar ou abandonar a pesquisa em qualquer momento sem que haja penalização ou
3 prejuízo algum para seu atendimento e tratamento. Está ciente também que o seu tratamento continuará
4 sendo conduzido pelo seu médico e que nenhum pagamento ou benefício será feito ao participante ou
5 aos familiares pela participação no presente estudo.

6 Eu estou disposto a participar dessa pesquisa e compreendi as condições acima descritas,
7 concordo voluntariamente a participar desse estudo.

8 Assinaturas

9 Paciente ou representante legal (caso o paciente esteja impossibilitado de assinar ou compreender o
10 conteúdo deste TCLE)

11 Nome: _____

12 Assinatura: _____ Local e data: _____

13 Profissional que obteve o TCLE

14 Nome: _____

15 Assinatura: _____ Local e data: _____

16
17 Pesquisador responsável: Nome: Professora Dra. Edna Maria Vissoci Reiche

18 Endereço: Departamento de Patologia, Análises Clínicas do Centro de Ciências da Saúde, Hospital
19 Universitário de Londrina. Av. Robert Koch, 60, Vila Operária, CEP 86038-440;

20 Fone: 43-3371-2321 (Imunologia), 43-3371-2670 (Diagnóstico Molecular)

21 Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina:

22 Fone: 43-3371-2490
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36

1 **APÊNDICE B**

2 **Questionário para coleta de dados demográficos, clínicos e terapêuticos**

<i>Dados demográficos</i>		Nº no projeto:	
Nome			
Endereço		Telefone:	
Data de nascimento			
Imunomodulador	<input type="checkbox"/> IFN-β1a <input type="checkbox"/> IFN-β1b <input type="checkbox"/> Glatiramer <input type="checkbox"/> Natalizumabe		
Corticoide	<input type="checkbox"/> Pulsoterapia <input type="checkbox"/> Corticoide oral → mg		
Outros medicamentos			
Doenças associadas			
Etnia	<input type="checkbox"/> Caucasiano <input type="checkbox"/> Negro <input type="checkbox"/> Mulato <input type="checkbox"/> Asiático		
Cor da pele	<input type="checkbox"/> Branca <input type="checkbox"/> Negra <input type="checkbox"/> Pardo <input type="checkbox"/> Amarela		
Exposição solar diária	<input type="checkbox"/> Não se expõe ao sol diariamente <input type="checkbox"/> Baixa exposição (≤ 20 min/dia) <input type="checkbox"/> Exposição solar adequada (> 20 min/dia)		
Usa protetor solar?	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	Frequência:	
Tabagismo	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não		
Consumo de álcool	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não		
Profissão			
Hábitos de dieta	<input type="checkbox"/> Suplementação alimentar <input type="checkbox"/> Antioxidante <input type="checkbox"/> Vitamina <input type="checkbox"/> Dieta específica		
	Obs.:		
<i>Dados Clínicos</i>			
IMC:	Peso:	Altura:	Circunferência:
Forma clínica	<input type="checkbox"/> RR <input type="checkbox"/> SP <input type="checkbox"/> PP <input type="checkbox"/> CIS <input type="checkbox"/> não definida		
EDSS 2013			
Atividade da doença	<input type="checkbox"/> Remissão <input type="checkbox"/> Surto		
Nº de surtos/ ano			
RMN	Nº lesões:	<input type="checkbox"/> Gd+ <input type="checkbox"/> Gd-	Data RMN:
	Local:		Tipo RMN
Inflamação/ Infecção	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	Qual?	
Pós Menopausa	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	Data última menstruação:	