

AVALIAÇÃO DO PAPEL DO GENE DA LACTASE NA SUSCEPTIBILIDADE AO TRANSTORNO DE DÉFICIT DE ATENÇÃO E HIPERATIVIDADE (TDAH): POTENCIAL MECANISMO PARA EXPLICAR A RELAÇÃO OBSERVACIONAL ENTRE TDAH E ALTERAÇÕES DO MICROBIOMA INTESTINAL

ETIENE DIAS ALVES¹; MARINA XAVIER CARPENA²; LUIS AUGUSTO ROHDE³; MARA HELENA HUTZ⁴; MARIA CAROLINA BORGES⁵; LUCIANA TOVO-RODRIGUES⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – etienediasnutri@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – marinacarpena_@hotmail.com

³Universidade Federal do Rio Grande do Sul - lrohde@terra.com.br

⁴Universidade Federal do Rio Grande do Sul– mara.hutz@ufrgs.br

⁵Universidade de Bristol - m.c.borges@bristol.ac.uk

⁶Universidade Federal de Pelotas – luciana.tovo@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Crescente número de evidências mostram que a microbiota intestinal está intimamente relacionada à saúde do hospedeiro e envolvida na etiologia de distúrbios psiquiátricos (DEMONTIS et al., 2019; MEDEIROS & COSTA, 2020; NI et al., 2022). O “eixo microbioma-intestino-cérebro”, está envolvido nessa comunicação bidirecional entre os microrganismos que habitam o microbioma intestinal e o sistema nervoso central (MONTIEL-CASTRO, GONZÁLEZ-CERVANTES, BRAVO-RUISECO, & PACHECO-LÓPEZ, 2013).

Um dos transtornos do neurodesenvolvimento mais comuns na infância e adolescência é o transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH), caracterizado por um conjunto de sintomas comportamentais de impulsividade, hiperatividade e desatenção (DEMONTIS et al., 2019). Estima-se que a prevalência mundial seja aproximadamente 5% (WOO et al., 2014). O TDAH é o resultado de complexas interações entre diversos fatores ambientais e genéticos (GRIMM, KRANZ, & REIF, 2020). Investigações recentes mostram associação entre aumento na diversidade alfa quanto na abundância de *Bifidobacterium* e a presença de TDAH (AARTS et al., 2017; WANG et al., 2020). Assim, sugere-se que alterações do microbioma possam contribuir tanto para o agravamento dos sintomas quanto no tratamento do transtorno (ABD EL BAAKI et al., 2021). Entretanto, os potenciais mecanismos para tal associação ainda não são claros.

Um dos genes do hospedeiro cuja associação é mais consistente com padrões de composição do microbioma intestinal é o gene da enzima lactase (*LCT*), cujas variantes estão relacionadas à intolerância à lactose (hipolactasia), ou seja, a incapacidade de degradar a lactose (SANNA, KURILSHIKOV, VAN DER GRAAF, FU, & ZHERNAKOVA, 2022). Variantes genéticas nesse gene foram associadas a diferenças na abundância de bactérias *Bifidobacterium* do microbioma intestinal (GOODRICH et al., 2016), sugerindo que o gene *LCT* do hospedeiro desempenhe uma função na modulação da regulação do microbioma intestinal (QIN et al., 2022).

Interessantemente, sabe-se que o TDAH está intimamente relacionado a alterações alimentares, como aquelas relacionadas ao consumo de leite e derivados (YAGHMAIE, KOUDELKA, & SIMPSON, 2013). Alguns artigos mostraram a relação entre TDAH e intolerância à lactose, sugerindo que indivíduos com TDAH teriam maior risco para hipolactasia comparado com controles saudáveis (PARK et al., 2012).

Considerando as informações acima, pode-se supor que o gene *LCT* seja, também importante para explicar a susceptibilidade ao TDAH, e poderia emergir como um mecanismo para explicar a alteração de perfil de microbioma intestinal reportado em indivíduos afetados. Entretanto, não foi encontrado nenhum estudo que investigue a

relação entre TDAH e variantes em *LCT*. Nesse sentido, o objetivo do presente resumo foi verificar se existe associação entre polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) relatados anteriormente como variantes funcionais no gene *LCT* e TDAH em uma amostra clínica brasileira.

2. METODOLOGIA

Este estudo foi realizado com 259 crianças e adolescentes brasileiros e seus pais, recrutados para o Programa de Transtornos de Déficit de Atenção/Hiperatividade (PRODAH) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. O TDAH foi diagnosticado a partir do processo de avaliação clínica de três etapas, descrito anteriormente (SALATINO-OLIVEIRA et al., 2012), incluindo a aplicação de entrevistas diagnósticas semiestruturadas (Schedule for Affective Disorders and Schizophrenia for School Aged Children Present and Lifetime Version - K-SADS-PL) por assistentes de pesquisa treinados e avaliações clínicas por experientes psiquiatras infantis.

Amostras de sangue foram coletadas e o DNA total foi extraído. A genotipagem foi realizada usando o Infinium PsychArray-24 BeadChip. Marcadores adicionais foram imputados pelo pipeline Rapid Imputation Consortium Pipeline (RicoPili), disponível em <https://github.com/Nealelab/ricopili>. A escolha dos polimorfismos do gene *LCT* foi fundamentada em achados dos estudos de associação ampla do genoma (GWAS) que mostraram associação entre o locus do gene *LCT* e a composição do microbioma intestinal (BLEKHMAN et al., 2015; GOODRICH et al., 2016; KURILSHIKOV et al., 2021; LOPERA-MAYA et al., 2022; QIN et al., 2022; RÜHLEMANN et al., 2021). Foram selecionados sete SNPs para as análises (rs3940549, rs182549, rs4988235, rs2164210, rs1446585, rs56064699, rs3820794).

Para as análises estatísticas, utilizou-se um delineamento de estudo caso-pseudocontrole, que é um procedimento alternativo ao teste de transmissão/desequilíbrio de genótipos no qual o pseudocontrole é criado com os alelos não transmitidos dos pais (SCHWENDER, TAUB, BEATY, MARAZITA, & RUCZINSKI, 2012). Para a análise estatística entre as variantes genéticas escolhidas foi usada regressão logística (Razão de Odds (OR); Intervalo de confiança 95% (IC95%)). As análises de associação foram realizadas no software PLINK, versão 1.9. Um valor nominal de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em maior proporção, a amostra foi composta por meninos (76,4%) e indivíduos de cor da pele branca (83,4%). A média de idade dos participantes foi de 10,42 anos (variando entre 4 e 17 anos) e quase metade dos participantes foi diagnosticado com subtipo combinado de TDAH (47,1%), seguido de TDAH desatento (44,0%).

A tabela 1 apresenta as variantes genéticas do gene *LCT* e sua caracterização molecular e genética. Dentre os sete SNPs avaliados, dois estão localizados no gene *LCT* (rs2164210 e rs56064699) e os demais em regiões à jusante e à montante do gene. Alguns deles estão localizados em genes vizinhos à *LCT*: dois no gene *MCM6* (rs4988235 e rs182549), que é responsável pelo controle da expressão deste gene. E outras três variantes nos genes próximos: *ZRANB3*, *R3HDM1* e *UBXN4*. Um dos SNPs é uma variante intergênica (rs56064699), entre o gene *LCT* e *MCM6*.

Podemos verificar que nenhuma variante esteve estatisticamente associada ao desfecho ($p > 0,05$). A variante rs56064699, em região 5' do gene *LCT*, apesar de não se mostrar associada ao desfecho (IC95% 0,95-1,64), apresentou OR de 1,25, indicando que aqueles indivíduos com alelo A para este SNP, apresentam 25% a mais de susceptibilidade para o TDAH.

Tabela 1. Caracterização dos SNPs incluídos no estudo e estimativas de associação de regressão logística binária considerando casos de TDAH e desenho de pseudocontrole (N = 259 casos e 259 pseudocontroles).

SNP	Distância do gene <i>LCT</i>	Localização (BP)	EA	OR	IC95%	p
rs3940549	411.127pb a jusante	136.138.627	A	0,99	0,76 - 1,29	0,966
rs1446585	187.275pb a montante	136.407.479	A	1,05	0,82 - 1,34	0,705
rs3820794	89.208pb a montante	136.505.546	C	1,12	0,87 - 1,44	0,371
rs2164210	Íntron 9	136.580.287	T	1,08	0,84 - 1,38	0,531
rs56064699	2kb a montante	136.595.706	A	1,25	0,95 - 1,64	0,115
rs4988235	63.226pb a jusante	136.608.646	A	1,02	0,78 - 1,32	0,898
rs182549	71.334pb a jusante	136.616.754	T	0,99	0,76 - 1,28	0,926

Siglas: BP: par de base; EA: alelo de base. Genoma de referência humano: GRCh37

De uma maneira geral, os nossos dados não indicam papel relevante do gene *LCT* na susceptibilidade ao TDAH na amostra avaliada. Potenciais explicações para a ausência de associação são: diferenças nas amostras, uma vez que em nosso trabalho a amostra é composta por crianças, enquanto as amostras nos estudos dos quais foram extraídos os SNPs utilizados na associação eram fundamentalmente de adultos. A outra explicação seria referente a variante rs56064699 que está ligada tanto à hipolactasia quanto a deficiência congênita de lactase, esse SNP encontra-se em região com alto desequilíbrio de ligação entre *MCM6* e *LCT*.

Outra explicação poderia se dar pela miscigenação da amostra. Dado o papel que a região geográfica pode ter nessas situações de associações genéticas, sabe-se que europeus apresentam sinais fortes de uma seleção positiva para persistência da lactase (EVERSHED et al., 2022; MATTAR, DE CAMPOS MAZO, & CARRILHO, 2012) e que a população brasileira é bastante miscigenada, apresentando diferentes predisposições genéticas. Entretanto, a amostra proveniente deste estudo apresenta alta contribuição de ancestralidade europeia. Outra explicação para não encontrarmos associação, pode ser o número amostral, que pode ter influenciado o poder estatístico para encontrar associação. É necessário um grande tamanho amostral (casos e controles) para conseguir identificar as regiões associadas a características genéticas complexas.

É possível que outros mecanismos moleculares influenciem a relação TDAH e microbioma. Este trabalho é inédito, assim, não é possível comparar com outros achados da literatura com o mesmo gene.

4. CONCLUSÕES

Até o presente momento, nossos resultados preliminares indicam que os polimorfismos presentes no locus do gene *LCT* não possuem um papel relevante na susceptibilidade do TDAH em crianças. Futuros estudos com maior poder estatístico são necessários para testar a relação entre *LCT* e TDAH. É possível que outros elementos moleculares não explorados aqui possam representar mecanismos que expliquem a relação entre TDAH e alterações da composição do microbioma intestinal.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD EL BAAKI, O. M., ABD EL HAMID, E. R., ZAKI, S. T., ALWAKKAD, A. S. E. D., SABRY, R. N., & ELSHEIKH, E. M. (2021). Diet modification impact on ADHD outcome. *Bulletin of the National Research Centre*, 45(1), 15.

- BLEKHMANN, R., GOODRICH, J. K., HUANG, K., Sun, Q., BUKOWSKI, R., BELL, J. T., . . . CLARK, A. G. (2015). Host genetic variation impacts microbiome composition across human body sites. **Genome Biology**, 16(1), 191.
- DEMONTIS, D. A.-O., WALTERS, R. A.-O., MARTIN, J., MATTHEISEN, M., ALS, T. A.-O., AGERBO, E. A.-O. X., . . . NEALE, B. A.-O. (2019). Discovery of the first genome-wide significant risk loci for attention deficit/hyperactivity disorder. **Nature Genetics**. (1546-1718 (Electronic)).
- EVERSHED, R. P., DAVEY SMITH, G., ROFFET-SALQUE, M., TIMPSON, A., DIEKMANN, Y., LYON, M. S., . . . THOMAS, M. G. (2022). Dairying, diseases and the evolution of lactase persistence in Europe. **Nature**. 608, 336–345.
- GOODRICH, J. K., DAVENPORT, E. R., BEAUMONT, M., JACKSON, M. A., KNIGHT, R., OBER, C., . . . LEY, R. E. (2016). Genetic Determinants of the Gut Microbiome in UK Twins. **Cell host & microbe**, 19(1934-6069 (Electronic)), 731-743.
- GRIMM, O., KRANZ, T. M., & REIF, A. (2020). Genetics of ADHD: What Should the Clinician Know? **Current Psychiatry Reports**, 22(4), 18.
- KURILSHIKOV, A., MEDINA-GOMEZ, C., BACIGALUPE, R., RADJABZADEH, D., WANG, J., DEMIRKAN, A., . . . ZHERNAKOVA, A. (2021). Large-scale association analyses identify host factors influencing human gut microbiome composition. **Nature Genetics**, 53(2), 156-165.
- LOPERA-MAYA, E. A., KURILSHIKOV, A., VAN DER GRAAF, A., HU, S., ANDREU-SÁNCHEZ, S., CHEN, L., . . . SANNA, S. (2022). Effect of host genetics on the gut microbiome in 7,738 participants of the Dutch Microbiome Project. **Nature Genetics**. v. 54, n. 2, p. 143-151, 2022.
- MATTAR, R., DE CAMPOS MAZO, D. F., & CARRILHO, F. J. (2012). Lactose intolerance: diagnosis, genetic, and clinical factors. **Clinical and Experimental Gastroenterology**. v. 5, p. 113.
- MEDEIROS, C. I. S., & COSTA, T. P. (2020). Repercussão da microbiota intestinal na modulação do sistema nervoso central e sua relação com doenças neurológicas. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**. 19(2), 342-346.
- MONTIEL-CASTRO, A. J., GONZÁLEZ-CERVANTES, R., BRAVO-RUISECO, G., & PACHECO-LÓPEZ, G. (2013). The microbiota-gut-brain axis: neurobehavioral correlates, health and sociality. **Frontiers in Integrative Neuroscience**. v. 7, p. 70.
- NI, J.-J., XU, Q., YAN, S.-S., HAN, B.-X., ZHANG, H., WEI, X.-T., . . . ZHANG, L. (2022). Gut Microbiota and Psychiatric Disorders: A Two-Sample Mendelian Randomization Study. **Front Microbiol**. v.12.
- PARK, S., CHO, S., HONG, Y.-C., YC, H., OH, S.-Y., KIM, J.-W., . . . BHANG, S.-Y. (2012). Association between dietary behaviors and attention-deficit/hyperactivity disorder and learning disabilities in school-aged children. **Psychiatry Res.**, v. 198, n. 3, p. 468-476.
- QIN, Y., HAVULINNA, A. S., LIU, Y., JOUSILAHTI, P., RITCHIE, S. C., TOKOLYI, A., . . . MÉRIC, G. (2022). Combined effects of host genetics and diet on human gut microbiota and incident disease in a single population cohort. **Nature Genetics**, 54(2), 134-142.
- RÜHLEMANN, M. C., HERMES, B. M., BANG, C., DOMS, S., MOITINHO-SILVA, L., THINGHOLM, L. B., . . . FRANKE, A. (2021). Genome-wide association study in 8,956 German individuals identifies influence of ABO histo-blood groups on gut microbiome. **Nature Genetics**. v. 53, n. 2, p. 147-155.
- SALATINO-OLIVEIRA, A., GENRO, J. P., CHAZAN, R., ZENI, C., SCHMITZ, M., POLANCZYK, G., . . . HUTZ, M. H. (2012). Association study of GIT1 gene with attention-deficit hyperactivity disorder in Brazilian children and adolescents. **Genes Brain Behav**. 11(7), 864-868.
- SANNA, S., KURILSHIKOV, A., VAN DER GRAAF, A., FU, J., & ZHERNAKOVA, A. (2022). Challenges and future directions for studying effects of host genetics on the gut microbiome. **Nature Genetics**, 54(2), 100-106. doi:10.1038/s41588-021-00983-z
- SCHWENDER, H., TAUB, M., BEATY, T. H., MARAZITA, M. L., & RUCZINSKI, I. (2012). Rapid testing of SNPs and gene-environment interactions in case-parent trio data based on exact analytic parameter estimation. **Biometrics**. v. 68, n. 3, p. 766-773.
- WOO, H. D., KIM, D. W., HONG, Y. S., KIM, Y. M., SEO, J. H., CHOE, B. M., . . . KIM, J. (2014). Dietary patterns in children with attention deficit/hyperactivity disorder (ADHD). **Nutrients**. v. 6, n. 4, p. 1539-1553.
- YAGHMAIE, P., KOUDELKA, C., & SIMPSON, E. L. (2013). Mental health comorbidity in patients with atopic dermatitis. **J Allergy Clin Immunol.**, 131(1097-6825 (Electronic)).