

FATORES GENÉTICOS DO HOSPEDEIRO INFLUENCIAM A COMPOSIÇÃO DE SEU MICROBIOMA INTESTINAL? DADOS DA COORTE DE NASCIMENTOS DE PELOTAS DE 2004

ETIENE DIAS ALVES¹; MARINA XAVIER CARPENA²; MARIA CAROLINA BORGES³; ALICIA MATIJASEVICH⁴; INÁ DOS SANTOS⁵; LUCIANA TOVO-RODRIGUES⁶

¹Universidade Federal de Pelotas, RS, Brasil – etienediasnutri@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas, RS, Brasil - marinacarpena@hotmail.com

³Universidade de Bristol, Bristol, UK – m.c.borges@bristol.ac.uk

⁴Universidade de São Paulo, SP, Brasil - alicia.matijasevich@usp.br

⁵Universidade Federal de Pelotas, RS, Brasil - inasantos.epi@gmail.com

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

1. INTRODUÇÃO

A microbiota intestinal consiste em uma comunidade complexa de micróbios que colonizam o trato gastrointestinal (NEISH, 2010). Diversos estudos sugerem uma relação entre a microbiota intestinal e características de saúde e doença, como doenças cardiovasculares, doenças inflamatórias, doenças imunológicas, obesidade, diabetes *mellitus* e doenças neurodegenerativas via eixo intestino-cérebro (JOVEL, DIELEMAN, KAO, MASON, & WINE, 2018).

Fatores ambientais, como dieta e uso de medicamentos, afetam a composição microbiana (CUEVAS-SIERRA, MILAGRO, ARANAZ, MARTÍNEZ, & RIEZU-BOJ, 2021). Entretanto, estudos recentes também indicam que o perfil genético do hospedeiro influencia a composição microbiana, associando variantes genéticas a diferenças no perfil microbiano (BUBIER, CHESLER, & WEINSTOCK, 2021). Achados na literatura indicam que os polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) explicam cerca de 1,9% (ROTHSCHILD et al., 2018) a 8,8% (GOODRICH et al., 2016) da variabilidade da composição da microbiota intestinal.

Os estudos de associação ampla do genoma (GWAS) são ferramentas robustas para a identificação de variantes genéticas, livre de hipóteses, associadas ao desfecho de interesse, provendo mais informações sobre a etiologia genética e mecanismos relacionados a características multifatoriais. O GWAS mais recente para a composição do microbioma intestinal, realizado por HUGHES et al. (2020), apresenta dados sequenciados do gene 16S RNA ribossomal e a genética de indivíduos de três coortes adultas de origem europeia: *Flemish Gut Flora Project* (N = 2.223), *FoCus* (N = 950) e *PopGen* (N = 717). Como resultado, foram identificados regiões do genoma estatisticamente associados ($P = 1.57 \times 10^{-10}$) a diferentes táxons até o nível de gênero. As associações apontam o papel relevante de genes envolvidos em rotas como enriquecimento da expressão gênica para tecidos como cérebro, rim, cólon, estômago e intestino delgado, além de associação com colesterol total, circunferência da cintura e outras características obesogênicas (HUGHES et al., 2020).

Considerando a relevância de estudos como o de HUGHES et al. (2020) para a compreensão de fatores determinantes da composição da microbiota intestinal e a carência de estudos em amostras latino americanas e países de baixa e média renda, torna-se importante investigar se as variantes observadas no GWAS são, também, associadas a composição da microbiota intestinal na população brasileira, durante a adolescência.

2. METODOLOGIA

A amostra do presente estudo é composta por participantes da Coorte de Nascimentos de 2004 de Pelotas, Rio Grande do Sul, um estudo longitudinal de monitoramento de saúde com os 4.231 nascidos vivos daquele ano na área urbana da cidade (BARROS et al., 2006). Quando os participantes completaram 12 anos, parte da amostra foi convidada para participar de um subestudo com o objetivo de avaliar o microbioma intestinal e seus determinantes. Para participar desta amostra do subestudo, 497 participantes foram pré-selecionados em 2017 e após, foi realizada uma seleção aleatória a partir dos estratos de escore-z de IMC para representar o espectro da distribuição de IMC-para-idade. Foram excluídos participantes que apresentavam comprometimento cognitivo, que estivessem gestantes no momento da entrevista ou no período de seis meses pós-parto.

A coleta de fezes foi realizada pelos adolescentes em seus domicílios com o tubo plástico Norgen Biotek® e kit coletor que continha papel coletor de fezes Fe-Col®. Posteriormente, as amostras foram recolhidas pela equipe do estudo e armazenadas em temperatura controlada, seguindo informação do fabricante (18° a 20°C) no Centro de Pesquisas Epidemiológicas Dr. Amílcar Gigante da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL). As amostras foram enviadas para a Universidade de Toronto, no Canadá para processamento. O DNA foi extraído das amostras usando o kit ZymoBIOMICS DNA Miniprep e armazenado a -20°C até o processamento. Em todas as amostras, foram sequenciadas as hiperegiones V3-V4 do gene 16S rRNA.

As variáveis de desfecho do estudo são as abundâncias relativas dos táxons com associações observadas em HUGHES et al. (2020): os gêneros *Veillonella*, *Ruminococcus* e *Dialister* que pertencem ao filo *Firmicutes*; o gênero *Parabacteroides* do filo *Bacteroidetes*; a classe *Gammaproteobacteria* e a família *Sutterellaceae* do filo *Proteobacteria* e o gênero *Bifidobacterium* que pertence ao filo *Actinobacteria*.

As variáveis de exposição do estudo são as variantes genéticas observadas associadas aos táxons acima. A coleta de amostra de saliva (Oragene GenotekVR - kit 250) para extração do DNA foi realizada em 2010 e o DNA genômico foi extraído e genotipado usando Global Screening Array v.2 (Illumina). Os sete SNPs são: rs150018970, rs116865000, rs4494297, rs7118902, rs13207588, rs117338748 e rs4988235. Foram aplicados filtros considerando equilíbrio de Hardy-Weinberg de valor $p > 0.01$ e a frequência do alelo de menor frequência (FAM ou MAF) $\leq 1\%$.

A operacionalização das variáveis do desfecho foi realizada de acordo com o descrito em HUGHES et al. (2020). Táxons que não fossem detectados em mais de 5% dos indivíduos da amostra foram dicotomizados (presença/ausência do táxon – modelo P/A). Os táxons com ampla detecção (em mais de 95% dos indivíduos da amostra) foram considerados como um modelo contínuo de abundância (modelo AB). Para a análise de associação entre os SNPs e os táxons do microbioma intestinal foram realizadas regressão logística (Odds ratio (OR) e Intervalo de Confiança de 95% (IC95%)) e regressão linear (β e IC95%), conforme natureza do desfecho. Assumiu-se um modelo genético aditivo para os testes. Sexo e os 10 componentes principais foram utilizados como covariáveis na análise ajustada. As análises de associação foram realizadas no software PLINK, versão 1.9 (PURCELL et al., 2007). Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. O acompanhamento da coorte e o subestudo foram aprovados pelo Comitê de Ética da FAMED-UFPEL, Comissão Nacional de Ética em Pesquisa e subestudo também foi aprovado pela Universidade de Toronto e pelo *Hospital for Sick Children Research Ethics Board* do Canadá.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No total, foram obtidos dados válidos do microbioma de 364 participantes, pois duas amostras foram excluídas após controle de qualidade. Em sua maioria, a amostra foi composta por adolescentes do sexo masculino (52,8%), que se autodeclararam de cor da pele branca (68,0%) e pertencentes a famílias dos quintis mais baixo (4º e 5º quintis) de renda familiar (41,5%). Das sete variantes de interesse, o SNP rs116865000 foi removido após o controle de qualidade (MAF = 0.008). Os táxons que apresentaram dados de abundância relativa para mais de 95% da amostra foram analisados pelo modelo AB devido a ampla detecção, são eles: *Ruminococcus* e *Parabacteroides*. Os demais táxons foram dicotomizados em presença/ausência.

A Tabela 1 apresenta o resultado das análises de associação. O alelo A do SNP rs7118902 mostrou-se significativamente associado com gênero *Dialister* (OR = 0,49; IC 95% = 0,24; 0,97), corroborando com o efeito protetor do alelo A para o gênero *Dialister* do GWAS original. O gênero *Dialister* pertence ao filo *Firmicutes* e parece estar associado a indução da resposta inflamatória do hospedeiro e a uma maior expressão em pacientes obesos, sugerindo que pode ser utilizado como um biomarcador para a obesidade (MENA-VÁZQUEZ et al., 2023). O SNP rs7118902 está localizando no cromossomo 11 e é uma variante íntron do gene *SORL1* (Sortilin Related Receptor 1), o qual codifica uma proteína que pertence à família de receptores de lipoproteína de baixa densidade. Adicionalmente, esse gene foi associado à obesidade e circunferência da cintura (PARKS et al., 2013; SMITH et al., 2010), que estão associados a interações dietéticas, podendo justificar sua associação com o gênero *Dialister*.

Tabela 1. Associação ajustada entre as variantes genéticas do hospedeiro e os táxons do microbioma intestinal aos 12 anos de idade. Coorte de Nascimentos de 2004 de Pelotas, Brasil.

Táxon	SNP ID	AE	FAE	Medida de efeito do presente estudo* (IC95%)	Valor p
F_Sutterelaceae ^a	rs4494297	T	0.01	OR = 0,02 (2,096e-06; 114,9)	0,359
G_Bifidobacterium ^a	rs4988235	A	0.29	OR = 2,08 (0,31; 13,77)	0,448
G_Dialister ^a	rs7118902	A	0.42	OR = 0,49 (0,24; 0,97)	0,039
G_Veillonella ^a	rs117338748	A	0.02	OR = 1,55 (0,01; 287,7)	0,869
G_Ruminococcus ^b	rs150018970	A	0.01	β = -0,08 (-1,73; 1,56)	0,921
G_Parabacteroides ^b	rs13207588	A	0.15	β = -0,13 (-0,53; 0,28)	0,537

F = Família; G = Gênero; ^aModelo P/A; ^bModelo AB; AE = alelo de efeito; FAE = Frequência do alelo de efeito

*Ajuste para sexo e os componentes principais

Não observamos associação para as demais hipóteses testadas. Diferenças nas amostras, como idade e ancestralidade são potenciais fatores para explicar a falta de associação, bem como o tamanho amostral (N =364).

4. CONCLUSÕES

A associação observada entre rs7118902 e gênero *Dialister* demonstra que, ao menos parcialmente, os achados foram replicados em uma população com

ancestralidade e faixa etária diferente do GWAS original, sugerindo que a genética do hospedeiro possa ter relevância na composição da microbiota intestinal, apesar de modesta. Contudo, mais estudos com maior poder estatístico e outros elementos moleculares são necessários para representar mecanismos que expliquem a relação entre a genética do hospedeiro e a composição da microbiota intestinal.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARROS, A. J. D., Santos, I. d. S. d., Victora, C. G., Albernaz, E. P., Domingues, M. R., Timm, I. K., . . . Barros, F. C. (2006). Coorte de nascimentos de Pelotas, 2004: metodologia e descrição. *Revista de Saúde Pública*, 40.
- BUBIER, J. A., CHESLER, E. J., & WEINSTOCK, G. M. (2021). Host genetic control of gut microbiome composition. *Mammalian Genome*, 32(4), 263-281. doi:10.1007/s00335-021-09884-2
- CUEVAS-SIERRA, A., MILAGRO, F. I., ARANAZ, P., MARTÍNEZ, J., & RIEZU-BOJ, J. (2021). Gut Microbiota Differences According to Ultra-Processed Food Consumption in a Spanish Population. *Nutrients*, 13(8)(2072-6643 (Electronic)). doi:10.3390/nu13082710
- 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*(1934-6069 (Electronic)).
- HUGHES, D. A., Bacigalupe, R., Wang, J., Rühlemann, M. A.-O., Tito, R. Y., Falony, G., . . . Raes, J. (2020). Genome-wide associations of human gut microbiome variation and implications for causal inference analyses. *Nature*(2058-5276 (Electronic)).
- JOVEL, J., DIELEMAN, L. A., KAO, D., MASON, A. L., & WINE, E. (2018). Chapter 10 - The Human Gut Microbiome in Health and Disease. In M. Nagarajan (Ed.), *Metagenomics* (pp. 197-213): Academic Press.
- MENA-VÁZQUEZ, N., Ruiz-Limón, P., Moreno-Indias, I., Manrique-Arija, S., Lisbona-Montañez, J. M., Rioja, J., . . . Fernández-Nebro, A. (2023). Adiposity is associated with expansion of the genus *Dialister* in rheumatoid arthritis patients. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 160, 114388. doi:https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.114388
- NEISH, A. S. (2010). Microbes in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology*, 136(1)(1528-0012 (Electronic)).
- PARKS, Brian W., Nam, E., Org, E., Kostem, E., Norheim, F., Hui, Simon T., . . . Lusi, Aldons J. (2013). Genetic Control of Obesity and Gut Microbiota Composition in Response to High-Fat, High-Sucrose Diet in Mice. *Cell Metabolism*, 17(1), 141-152. doi:10.1016/j.cmet.2012.12.007
- PURCELL, S., NEALE, B., TODD-BROWN, K., THOMAS, L., FERREIRA, M. A. R., BENDER, D., . . . Sham, P. C. (2007). PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet*, 81(3)(0002-9297 (Print)).
- ROTHSCHILD, D., Weissbrod, O., Barkan, E., Kurilshikov, A., Korem, T., Zeevi, D., . . . Segal, E. (2018). Environment dominates over host genetics in shaping human gut microbiota. *Nature*, 555(7695), 210-215. doi:10.1038/nature25973
- SMITH, E. N., Chen, W., Kähönen, M., Kettunen, J., Lehtimäki, T., Peltonen, L., . . . Murray, S. S. (2010). Longitudinal genome-wide association of cardiovascular disease risk factors in the Bogalusa heart study. *PLoS Genet.*, 6(9)(1553-7404 (Electronic)).