



Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

Marta Alves da Silva Arroyo

**Perspectivas para Triagem Genética da
Intolerância à Lactose: Rastreamento do
Polimorfismo -13910 C/T, no gene *MCM6*,
em Neonatos**

**São José do Rio Preto
2010**

Marta Alves da Silva Arroyo

**Perspectivas para Triagem Genética da
Intolerância à Lactose: Rastreamento do
Polimorfismo -13910 C/T, no gene *MCM6*,
em Neonatos**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto para obtenção do Título de Doutor no Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas.

Orientador: Prof. Dr. José Victor Maniglia
Coorientadora: Profa. Dra. Vânia Belintani Piatto

São José do Rio Preto
2010

Arroyo, Marta Alves da Silva

Perspectivas para triagem genética da intolerância à lactose:
Rastreamento do polimorfismo – 13910 C/T, no gene *MCM6*, em
neonatos / Marta Alves da Silva Arroyo

São José do Rio Preto, 2010

73 p.;

Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio
Preto – FAMERP

Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas

Orientador: Prof. Dr. José Victor Maniglia

Coorientadora: Profa. Dra. Vânia Belintani Piatto

1. Análise Molecular; 2. Gene *MCM6*; 3. Lactase; 4. Má absorção da
lactose; 5. Hipolactasia; 6. Polimorfismo

Marta Alves da Silva Arroyo

**Perspectivas para Triagem Genética da
Intolerância à Lactose: Rastreamento do
Polimorfismo -13910 C/T, no gene *MCM6*, em
Neonatos**

Banca Examinadora

Tese para Obtenção do Grau de Doutor

Presidente e Orientador: **Prof. Dr. José Victor Maniglia**

2º Examinador: **Profa. Dra. Agdamar Affini Suffredini**

3º Examinador: **Profa. Dra. Ana Regina Chinelato Fernandes**

4º Examinador: **Prof. Dr. Luis Carlos de Mattos**

5º Examinador: **Prof. Dr. Antonio Carlos Tonelli Gusson**

Suplentes: **Profa. Dra. Regina Célia Bortoleto Amantini**

Profa. Dra. Dorotéia Rossi Silva Souza

São José do Rio Preto, 17/05/2010

SUMÁRIO

Dedicatória.....	i
Agradecimento Especial	ii
Agradecimentos	iii
Epígrafe	v
Lista de Figuras.....	vi
Lista de Tabelas e Quadros	viii
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	ix
Resumo.....	x
Abstract.....	xi
1. Introdução	01
1.1. Lactose.....	04
1.2. Lactase.....	08
1.3. Definições.....	10
1.4. Quadro Clínico da Intolerância à Lactose.....	15
1.5. Diagnóstico da Intolerância à Lactose.....	17
1.6. Genética Molecular da Intolerância à Lactose.....	22
1.7. Objetivos	25
2. Material e Método	26
2.1. Investigação Molecular.....	28
2.1.1. Extração de DNA Genômico.....	28

2.1.1.1. Protocolo de Extração de DNA a Partir de Sangue Total, por Meio do Kit de Extração de DNA Genômico	28
2.1.2. Detecção do Polimorfismo -13910 C/T	31
2.1.2.1. Amplificação do Gene <i>MCM6</i> pelo Teste da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	31
2.1.2.2. Análise de Restrição (Técnica da RFLP) do Fragmento Amplificado do Gene <i>MCM6</i>	33
2.2. Análise Estatística	35
3. Resultados	36
3.1. Extração do DNA Genômico	37
3.2. Técnica da PCR para Amplificação do Gene <i>MCM6</i>	38
3.3. Técnica da RFLP (Digestão Enzimática) do Fragmento Amplificado do Gene <i>MCM6</i>	38
4. Discussão.....	42
5. Conclusões	55
6. Referências Bibliográficas.....	57
7. Anexos.....	72

- ✓ Aos **pacientes** e aos **pais dos recém-nascidos**, que sem o consentimento e cooperação este estudo não seria possível. Esta contribuição é extremamente importante para permitir a continuidade das pesquisas científicas a fim de proporcionar um futuro melhor às crianças.

**"Teu Pai, que vê em segredo,
te recompensará..."**

(Mateus 6:4)

Agradecimento Especial

- ✓ Ao meu orientador **Prof. Dr. José Victor Maniglia**, agradeço o carinho, o apoio, a dedicação e, principalmente, a confiança em mim e em meu trabalho!

**“O Senhor te guiará continuamente...
e serás como um jardim regado...”**

(Isaías 58:11)

Agradecimentos

- ✓ Aos meus pais **Arlindo** (*in memoriam*) e **Arinda**, pelo exemplo de trabalho, amor e confiança com que me ensinaram a caminhar pela vida.
- ✓ Aos meus filhos **Lucas** e **Gabriel**, meus maiores estímulos, assim como pelos momentos em que estive ausente deles.
- ✓ Ao meu esposo **Paulo** por sua compreensão, incentivo e apoio irrestrito.
- ✓ A **minha família** pela confiança e carinho de sempre.
- ✓ À minha coorientadora **Profa. Dra. Vânia Belintani Piatto** pela paciência, dedicação, assim como pelos preciosos ensinamentos essenciais para a realização deste estudo, minha eterna gratidão e admiração.
- ✓ À **Faculdade de Medicina** e ao **Hospital de Base de São José do Rio Preto**, nas pessoas de seus diretores, pela oportunidade que tive para a realização deste trabalho.
- ✓ À **Pós-Graduação** da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, na pessoa de seu coordenador e demais colaboradores.
- ✓ Aos **recém-nascidos** e seus pais que por meio do consentimento e cooperação possibilitaram a execução deste estudo.

- ✓ Aos **médicos, enfermeiras e auxiliares de enfermagem** do Centro Obstétrico do Hospital de Base pelo auxílio na coleta de sangue dos recém-nascidos.

- ✓ Aos **funcionários da biblioteca** da FAMERP, pela boa vontade no auxílio às pesquisas bibliográficas.

- ✓ As **amigas do Serviço de Fonoaudiologia** do Hospital de Base de São José do Rio Preto pelo apoio recebido.

- ✓ Aos **meus amigos** pelo incentivo e estímulo.

- ✓ A **todas as pessoas** direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta investigação.

"Na sobrevivência dos indivíduos e raças favorecidas, durante a luta constante e recorrente pela existência, vemos uma forma poderosa e incessante de seleção".

"Não é a espécie mais forte que sobrevive, tampouco a mais inteligente. É a mais adaptável às mudanças".

Charles Robert Darwin (1809-1882)

Lista de Figuras

Figura 1.	Esquema modificado da estrutura química da molécula da lactose.....	04
Figura 2.	Esquema modificado da hidrólise da lactose em monossacarídeos pela enzima lactase.....	08
Figura 3.	Esquema modificado da absorção da lactose. A lactase, presente nas microvilosidades intestinais, hidrolisa a lactose em galactose (Gal) e glicose (Glu), sendo ambas absorvidos com a água, para a circulação sanguínea do lúmen intestinal. A hidrólise tipicamente ocorre no jejuno, o qual tem baixa concentração bacteriana (10^{1-4}ml^{-1}); assim, pouca glicose sofre fermentação.....	09
Figura 4.	Esquema modificado da não absorção da lactose. Devido a ausência da lactase, a lactose que não foi absorvida ocasiona, no cólon, uma alteração osmótica além de sofrer hidrólise pelas bactérias intestinais (níveis acima de $10^{12-14} \text{ml}^{-1}$) com conseqüente fermentação e produção de gases e ácidos graxos.....	17
Figura 5.	a) Mapa da região dos genes <i>MCM6</i> e <i>LCT</i> no cromossomo 2. b) Mapa do gene <i>MCM6</i> . c) Localização dos polimorfismos associados à persistência/não-persistência da lactase, respectivamente, dentro dos introns 9 e 13 do gene <i>MCM6</i> : ♦ - 22018G/A e ♦ - 13910C/T. Figura modificada.....	24
Figura 6.	Fotografia do DNA genômico das amostras identificadas de 1 a 12 em gel de agarose 1%. A seta indica as bandas correspondentes ao DNA de cada amostra. M- marcador 100 pb (Ladder®).....	37

- Figura 7. Fotografia do produto da PCR - fragmento de 216 pb amplificado do gene *MCM6*, em gel de agarose 2%. Coluna 1 - controle 1. Coluna 2 - controle 2. Colunas 3 a 5 - amostras do estudo. B - reação "Branca" (sem DNA). M- marcador 100 pb (Ladder®)..... 38
- Figura 8. Fotografia do produto da RFLP (digestão enzimática) - fragmentos de 216, 126 e 90 pb do gene *MCM6*, em gel de agarose 2%. Coluna 1 - controle 1 positivo (CC - não-persistência da lactase). Coluna 2 - controle 2 negativo (CT - persistência da lactase). Colunas 3 a 5 - amostras do estudo: Coluna 3: CC (não-persistência da lactase); Coluna 4: CT (persistência da lactase); Coluna 5: TT (persistência da lactase). As setas indicam os fragmentos correspondentes às amostras nas Colunas 1 a 5. M- marcador 100 pb (Ladder®).... 39

Lista de Tabelas e Quadros

Tabela 1.	Concentração, em porcentagem, de lactose no leite de mamíferos.....	05
Tabela 2.	Concentração, em porcentagem, de lactose em alguns alimentos lácteos e manufaturados.....	07
Tabela 3.	Distribuição do número de recém-nascidos (n=310) em relação ao genótipo e a frequência genotípica, em porcentagens.....	40
Tabela 4.	Distribuição do total de alelos avaliados (n=620) em relação a frequência alélica de C e T, em porcentagens.....	40
Tabela 5.	Distribuição do número de recém-nascidos (n=310) em relação ao fenótipo e a frequência fenotípica, em porcentagens.....	41
Tabela 6.	Distribuição do gênero dos recém-nascidos (n=310) em relação ao fenótipo, em porcentagens.....	41
Quadro 1.	Sequência dos "primers" para PCR do gene <i>MCM6</i>	32
Quadro 2.	Mitos comuns e realidades práticas.....	51

Lista de Abreviaturas e Símbolos

ATP	-	Trifosfato de adenosina
BsmFI	-	Bacillus stearothermophilus FI
DNA	-	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	-	Desoxinucleotídeos trifosfato
EDTA	-	Ácido etilenodiamino tetra-acético
Gal	-	Galactose
Glu	-	Glicose
LCT	-	Lactase Phlorizin Hidrolase
LPH	-	Lactose
MCM6	-	Minichromosome maintenance 6
OMIM	-	Online Medelian Inheritance in Man
pb	-	Pares de bases
PCR	-	Reação em Cadeia da Polimerase
RFLP	-	Polimorfismo de Comprimento do Fragmento de Restrição
SIDA	-	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

Introdução: A intolerância à lactose tem sido considerada, por muitos anos, como um problema mundial em muitas crianças e adultos. **Objetivos:** investigar a prevalência do polimorfismo -13910 C/T, em um rastreamento neonatal, para o diagnóstico precoce da tolerância/intolerância à lactose. **Material e Métodos:** Estudo de casos em corte transversal em 310 neonatos brasileiros. O DNA foi extraído de leucócitos de sangue de cordão umbilical e *primers* específicos foram usados para amplificar a região do gene *MCM6* que abrange o polimorfismo -13910 C/T, usando as técnicas da Reação em Cadeia da Polimerase e do Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição. **Resultados:** Foram avaliados 160 (52%) recém-nascidos do gênero masculino e 150 (48%) do gênero feminino. Destes, 191 recém-nascidos (62%) apresentaram o genótipo CC (intolerantes à lactose), 95 (31%) o genótipo CT e 24 (7%) o genótipo TT, perfazendo um total de 119 (38%) neonatos tolerantes à lactose. A distribuição do gênero dos recém-nascidos em relação aos fenótipos determinou 97 (32%) do gênero masculino e 94 (30%) do feminino intolerantes à lactose, e 63 (20%) recém-nascidos do gênero masculino e 56 (18%) do feminino tolerantes à lactose não sendo, essa distribuição, estatisticamente significativa ($p=0,801$). **Conclusão:** A análise molecular permitiu identificar a presença ou ausência da variante persistência da lactase em neonatos brasileiros. O diagnóstico molecular pode otimizar o seguimento dos resultados positivos no rastreamento neonatal para a intolerância à lactose.

Palavras-Chave: 1. Análise Molecular; 2. Gene MCM6; 3. Lactase; 4. Má absorção da Lactose; 5. Hipolactasia; 6. Polimorfismo.

Abstract

Introduction: Lactose intolerance has been, for many years, considered as a worldwide problem in many children and adults. **Objective:** The aim is to investigate the prevalence of polymorphism -13910C/T, in a neonatal tracking, for early diagnosis of lactose tolerance/intolerance. **Material and Methods:** A cross-sectional case study of 310 Brazilian newborns. DNA was extracted from leukocyte umbilical cord and specific primers were used to amplify the region that encloses the -13910C/T polymorphism of the *MCM6* gene, using the polymerase chain reaction and the restriction fragment length polymorphism tests. **Results:** One hundred and sixty (52%) male newborns and 150 (48%) female were evaluated. From these, 191 (62%) presented CC genotype (lactose intolerant), 95 (31%) CT genotype, and 24 (7%) TT genotype, comprising a total of 119 (38%) lactose tolerant newborns. According the newborns' gender distribution in relation to the phenotypes has been found 97 (32%) of male gender and 94 (30%) of female gender lactose intolerant, and 63 (20%) male and 56 (18%) female lactose tolerant newborns, not being such distribution statistically significant ($p = 0.801$). **Conclusions:** The molecular analysis made possible the identification of the presence or absence of lactase persistence variant in Brazilian newborns. The neonatal molecular diagnosis can optimize the follow-up of positive results in newborn screening for lactose intolerance.

Key-Words: 1. Molecular Analysis; 2. *MCM6* Gene; 3. Lactase; 4. Lactose Malabsorption; 5. Hypolactasy; 6. Polymorphism.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O fato histórico de que muitos indivíduos do sul Europeu ficaram doentes após ingestão de leite foi primeiramente descrito por Hipócrates, há cerca de 400 anos a.C., mas somente 2000 anos depois é que se descobriu que aqueles sintomas eram causados unicamente por uma intolerância bioquímica ao açúcar do leite.^(1,2) A intolerância à lactose foi identificada no início do século XX,^(3,4) entretanto, somente a partir de 1960 é que suas bases bioquímicas e distribuição étnica foram propriamente definidas.^(4,5)

A intolerância ao leite pode ser atribuída à presença do açúcar do leite, a lactose. Os sintomas da intolerância à lactose são relativamente comuns em crianças mais velhas e adolescentes; entretanto, lesões intestinais associadas são frequentes. A intolerância à lactose é uma entidade distinta da alergia à proteína do leite de vaca, a qual envolve o sistema imune e causa graus variados de lesões na mucosa intestinal. A alergia à proteína do leite de vaca ocorre em 2% a 5% de crianças dentro dos primeiros três meses de vida resolvendo-se, tipicamente, até um ano de idade.⁽⁶⁻⁸⁾

A domesticação dos animais, a agricultura e a fabricação de queijos tiveram início há cerca de 10.000 anos por relatos que comerciantes árabes carregavam bolsas feitas de estômago de carneiro cheias de leite. O calor do sol, junto com a liberação da quimosina do estômago (enzima encontrada no compartimento estomacal de ruminantes jovens que catalisa a coagulação do leite, sendo utilizada no preparo de queijos e derivados), fez com que houvesse a separação do leite em uma parte sólida (coalho) e em uma parte líquida

(soro). Essa prática originou-se das grandes civilizações da Babilônia e Assíria, da Mesopotâmia, há 6000-8000 anos. O uso do leite começou, provavelmente, com a criação de camelos e cabras sendo seguido pelo uso do leite de ovelhas e vacas cerca de 1000 a 2000 anos mais tarde. Dados arqueológicos de potes e outros artefatos juntos com escritas antigas, selos e desenhos registram a origem da ingestão de leite ainda mais recente, na Mesopotâmia e Egito há 5000 anos e na África há 7500 anos.⁽⁹⁾

O leite tem sido utilizado como fonte alimentar pelo homem desde a Antiguidade. Porém, nos tempos modernos é que seu consumo vem aumentando, como tem ocorrido com o queijo, seu mais importante derivado. No entanto, a conservação do produto era a principal dificuldade encontrada para a ampliação do consumo. O leite condensado foi, então, um dos primeiros tratamentos utilizados para a maior conservação seguido, mais tarde, pela pasteurização. Foi no século XIX que o leite fresco, antes considerado alimento exclusivo de crianças, começou a ser difundido como um alimento para adultos, graças às campanhas sobre os seus benefícios. Porém, somente na primeira metade do século XX, com a descoberta da importância das vitaminas para a saúde e da adição de vitamina D ao leite, é que as indústrias de laticínios modificaram a imagem do leite: de alimento para crianças, tornou-se o “alimento perfeito” para todas as idades. Os programas de orientação nutricional e as indústrias de alimentos têm estimulado o aumento do consumo de leite *per capita* em todas as partes do mundo. Entretanto, a maioria das populações humanas, inclusive a brasileira, é composta por pessoas que manifestam perda progressiva da capacidade de absorção do açúcar do leite,

a lactose, após o desmame. Em consequência, tais pessoas apresentam sintomas digestivos de gravidade variável após a ingestão de leite.⁽¹⁰⁾

1.1. Lactose

A lactose (beta-galactosil-1-4-glicose) é um dissacarídeo (beta-galactosídeo) composto de glicose e de galactose (Figura 1).⁽¹¹⁾ A única fonte natural desse carboidrato é o leite de mamíferos que possuem placenta. É a primeira fonte de hidrato de carbono para os bebês de mamíferos sendo, no primeiro ano de vida, o açúcar mais importante para o desenvolvimento do lactente.^(10,12)

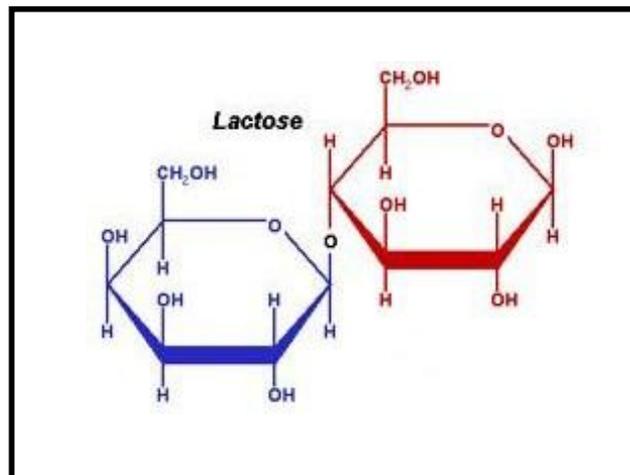


Figura 1. Esquema modificado da estrutura química da molécula da lactose.⁽¹¹⁾

A lactose é sintetizada nas células epiteliais das glândulas mamárias mediante uma reação que depende de duas proteínas, a alfa-lactalbumina e a enzima N-acetil-galactosil-transferase. Sua concentração no leite varia segundo a espécie, sendo cerca de 7% no leite humano e cerca de 5% no leite

de vaca (Tabela 1).⁽¹⁰⁾ O conteúdo de lactose no leite nas várias espécies é proporcional à atividade da alfa-lactalbumina, tendo sido verificado que os mamíferos que não possuem essa proteína também não produzem lactose, o que raramente acontece, por exemplo, em leões marinhos e em morsas do Oceano Pacífico.⁽¹⁰⁾

Tabela 1. Concentração, em porcentagem, de lactose no leite de mamíferos.⁽¹⁰⁾

Produto Lácteo de Mamíferos	Lactose (%)
Leite humano	7,0
Leite de égua	6,4
Leite de ovelha	5,5
Leite de búfala	5,5
Leite de cabra	5,2
Leite de vaca	5,0
Colostro humano	4,6
Leite de camela	1,3-3,3

A concentração de lactose varia de acordo com o produto lácteo sendo que, aqueles que possuem pouca lactose são os que foram submetidos à fermentação por bactérias ou por fungos (Tabela 2).^(2,10,12) No iogurte, 70% da lactose é fermentada em um dia e 90% em dois dias, isto é, quanto mais velho, menos lactose e também mais ácido. No caso dos queijos, a fermentação da lactose por microorganismos produz ácidos, o que favorece a coagulação da proteína do leite, a caseína. Também os queijos, quanto mais velhos e duros,

menor a concentração de lactose. No caso da manteiga, o maior componente é a gordura do leite e também certa quantidade de proteína. Na sua produção ela é batida até formar um creme, que é lavado, momento em que a lactose é eliminada. Por outro lado, a fervura e a pasteurização não alteram o conteúdo de lactose do leite.^(2,10,12)

Tabela 2. Concentração, em porcentagem, de lactose em alguns alimentos lácteos e manufaturados. ^(2,10,12)

Alimentos	Tipo	Lactose (%)
Leite	Em pó semidesnatado (sem diluição)	52
	Em pó desnatado (sem diluição)	35-48
	Em pó integral (sem diluição)	36-38
	Condensado	13-15
	Soro do leite de vaca	5-5,8
	De vaca desnatado	5,2
	Com redução de lactose	1,0
	Fermentado	0,2
Coalho/Nata/Manteiga	Coalhada industrializada ou síria	4,3
	Coalhada caseira	3,1
	Nata fresca hipogordurosa	3,0
	Nata fresca	2,1
	Manteiga	< 0,4
	Nata do leite	0,1
Queijo	<i>Cheddar</i> cremoso hipogorduroso	7,3
	Processado fatiado	5,0
	<i>Cheddar</i> cremoso	4,4
	Ricota desnatada	4,2
	Ricota	4,0
	<i>Cottage</i> hipogorduroso	3,3
	<i>Cottage</i>	3,1
	Minas fresco	1,9
	Requeijão mole	1,8
	Coalho do Nordeste	1,7
	Requeijão	1,6
	Manteiga do Nordeste	1,3
	Minas meia cura	1,1
	Feta	1,4
	Minas curado	0,3
	<i>Mozzarella</i>	0,13
	<i>Brie/Camembert/Cheddar</i>	0,1
	Estepe	0,09
	<i>Gouda</i>	0,07
	Prato	0,03
Parmesão	0,0	
Requeijão Catupiry®	0,0	
Iogurte	Natural	3,7-4,7
	Com mel	3,1-4,7
	Desnatado	2,5-4,2
	De fruta	4
	Líquido	4
	Integral	2-3
	Yakult®	0,7-1,3
Sorvete/ <i>Mousse</i>	Sorvetes que contêm leite	3,2-8,4
	<i>Milk shake</i>	4,5
	<i>Mousse</i> de chocolate	3,8

1.2. Lactase

A enzima intestinal hidrolase lactase-florizina (*LPH - lactase-phlorizin hidrolase*), codificada pelo gene lactase (*LCT/LPH, OMIM – 603202*), tem duas atividades enzimáticas: uma, a lactase beta-galactosidásica, a qual é responsável pela hidrólise do dissacarídeo lactose em monossacarídeos glicose e galactose para serem absorvidos pelo epitélio do intestino delgado (Figura 2)⁽¹¹⁾ e outra, a atividade hidrolítica geral beta-glicosidásica para celobiose, celotriose e hidrolase-florizina para hidrólise de glicosil-ceramidas, dissacarídeos encontrados em raízes e cascas de plantas e em algumas algas.⁽¹³⁻¹⁵⁾

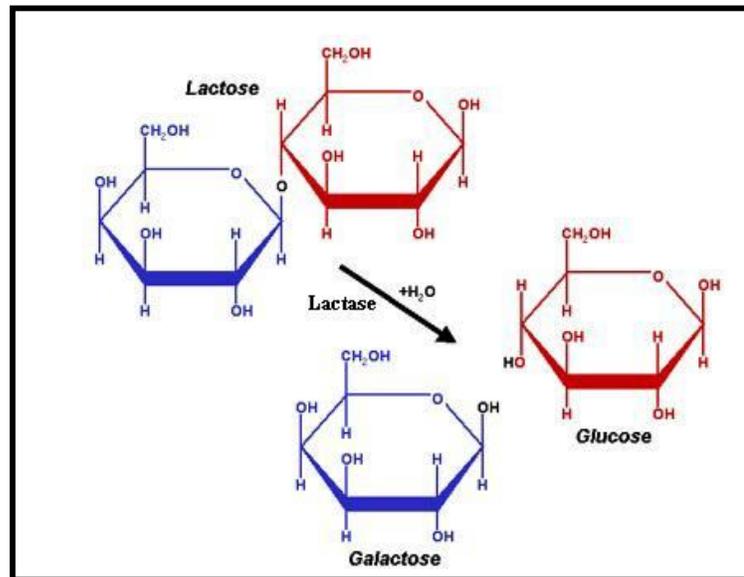


Figura 2. Esquema modificado da hidrólise da lactose em monossacarídeos pela enzima lactase.⁽¹¹⁾

A atividade da enzima é expressa somente no intestino delgado e está restrita aos enterócitos absorptivos das vilosidades intestinais com altos níveis de expressão no jejuno e reduzida atividade no duodeno e íleo distal^(16,17) (Figura 3).⁽²⁾

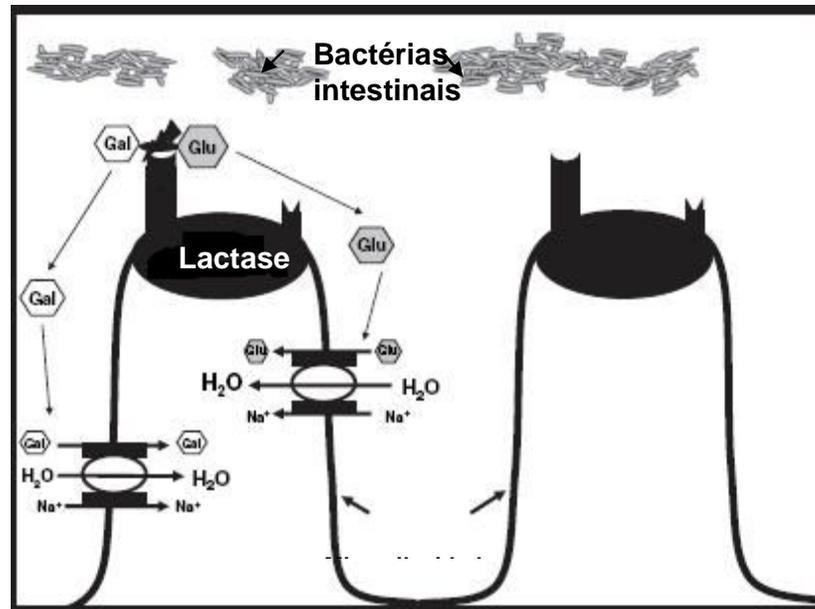


Figura 3. Esquema modificado da absorção da lactose. A lactase, presente nas microvilosidades intestinais, hidrolisa a lactose em galactose (*Gal*) e glicose (*Glu*), sendo ambas absorvidas com a água, para a circulação sanguínea do lúmen intestinal. A hidrólise tipicamente ocorre no jejuno, o qual tem baixa concentração bacteriana (10^{1-4}ml^{-1}); assim, pouca glicose sofre fermentação.⁽²⁾

Uma das características mais interessantes da lactase é a correlação entre sua atividade e o desenvolvimento intestinal. Na espécie humana, ela já está presente no terceiro mês de vida intra-uterina e sua atividade atinge o máximo no período perinatal. A partir do desmame ocorre uma diminuição

fisiológica, sendo que o adulto possui atividade da lactase 10 a 20 vezes menor que a do recém-nascido.^(10,18)

1.3. Definições

Os termos deficiência de dissacaridase (lactase), má absorção de dissacarídeo (lactose) e intolerância ao dissacarídeo são utilizados erroneamente como sinônimos. A sinonímia entre deficiência de lactase e má absorção de lactose existia porque o diagnóstico da deficiência de lactase é feito, comumente, por teste de sobrecarga com lactose e não diretamente, por determinação da atividade da enzima na mucosa intestinal. O termo intolerância à lactose era, com frequência, utilizado com o mesmo sentido de má absorção de lactose e de deficiência de lactase, porque indivíduos com má absorção de lactose geralmente apresentam sinais e sintomas após a ingestão desse açúcar. Mas, como nem sempre há correlação entre essas situações, é necessária uma maior precisão para o uso desses termos aqui relacionados. A não utilização dessas definições, de modo preciso, pode levar a confusões assim como a pontos de vista diferentes em relação aos significados clínico e epidemiológico das mesmas.^(2,8)

- **Má absorção do dissacarídeo lactose:** é a alteração fisiopatológica que se manifesta como intolerância à lactose e é atribuída ao desequilíbrio entre a quantidade de lactose ingerida e a capacidade da lactase em hidrolisar o dissacarídeo. É a expressão clínica e laboratorial da deficiência enzimática.

- **Intolerância ao dissacarídeo lactose:** é definida como a síndrome clínica provocada pela ingestão do mesmo ocorrendo um ou mais dos seguintes sintomas: dor abdominal, diarreia, náuseas, flatulência após a ingestão de lactose ou alimentos contendo lactose. A quantidade de lactose que causará os sintomas varia de indivíduo para indivíduo, dependendo da quantidade consumida, do grau de deficiência de lactase e da composição láctea do alimento. Assim, os termos intolerância ao leite e à lactose devem ser usados somente para indicar os sinais e sintomas gastrintestinais após a ingestão de, respectivamente, leite e lactose.

- **Deficiência da dissacaridase lactase:** é a diminuição ou ausência da enzima na membrana do enterócito e o termo deve ser usado somente quando a atividade enzimática está diminuída. Geralmente causa a má absorção do dissacarídeo correspondente e, por conseguinte, os sintomas de intolerância a esse dissacarídeo. No caso da lactase, os termos hipolactasia e alactasia significam, respectivamente, deficiência e ausência de lactase. A deficiência da dissacaridase lactase pode ser primária ou secundária:

a) Deficiência primária de lactase:

A má absorção de lactose consiste da deficiência relativa ou absoluta da atividade da lactase, com mucosa intestinal normal e valores normais das outras enzimas intestinais. Apresenta-se sob três formas: deficiência fisiológica (neonatal), congênita e adquirida:

a₁) deficiência fisiológica (neonatal) ou transitória de lactase: acomete alguns recém-nascidos, principalmente prematuros menores que 34

semanas de gestação, devido à imaturidade do trato gastrointestinal e que se normaliza ao redor da oitava semana de vida.⁽¹⁹⁾

a₂) deficiência primária congênita da lactase: é uma rara condição de caráter autossômico recessivo, na qual há ausência total de lactase desde o nascimento.⁽²⁰⁾ Foi relatada somente em algumas poucas crianças que apresentaram diarreia intratável imediatamente após a introdução de leite humano ou artificial contendo lactose.^(21,22) O padrão histológico é normal na biópsia intestinal, mas ocorre uma concentração de lactase baixa ou completamente ausente. A menos que os sinais sejam reconhecidos rapidamente, a evolução é fatal devido às perdas hídricas e eletrolíticas. O tratamento é a simples remoção e substituição da lactose da dieta, com fórmulas isentas do dissacarídeo.⁽²³⁻²⁵⁾

a₃) deficiência primária adquirida da lactase: também chamada de má absorção ontogenética (especificada pelo genoma) de lactose, de má absorção de lactose do adulto, hipolactasia tipo adulto, não persistência de lactase ou deficiência hereditária de lactase. Foi descrita em 1962,⁽²⁶⁾ sendo caracterizada pela atividade máxima da lactase ao nascimento com diminuição durante a infância e adolescência, permanecendo muito baixa, cerca de 5 a 10% em relação ao nascimento, durante a vida adulta. Não é condição anômala, mas sim o estado fenotípico normal dos mamíferos que mostram declínio exponencial dessa atividade após o desmame. A maioria dos portadores possui a forma tardia da doença, que ocorre após os primeiros quatro a cinco anos de vida, mas apenas 10% a 15% apresentam os sintomas.^(10,18)

a_{3.1}) Epidemiologia

Aproximadamente, 70% da população mundial tem deficiência primária adquirida da lactase. A porcentagem varia de acordo com a etnia e está relacionada ao uso de produtos lácteos na dieta, resultando na seleção genética de indivíduos com a capacidade para digerir a lactose. Em populações com predominância de alimentos lácteos na dieta devido a tradição pastoril, particularmente no norte Europeu, somente 2% da população tem deficiência primária da lactase. Em contraste, de acordo com estudos antropológicos, os povos com alta prevalência de má absorção de lactose do adulto são os que têm tradição agrícola e caçadora e que nunca beberam leite ou que passaram a ingeri-lo há poucos mil anos, mas em forma de produtos lácteos fermentados e, portanto, pobres em lactose. A prevalência da deficiência primária é de 50% a 80% na população hispânica, 60% a 80% em negros, especialmente africanos de origem hamita, e judeus asquenazitas e quase 100% em índios Americanos e Asiáticos, além dos esquimós. Os grupos com prevalência intermediária são grupos mestiços dos anteriores: africanos mestiços de bantos e hamitas, mestiços de europeus com orientais e com índios. A prevalência da idade de início difere entre várias populações. Aproximadamente 20% de crianças hispânicas, asiáticas e negras menores de cinco anos de idade têm evidência de deficiência de lactase e má absorção de lactose enquanto que crianças brancas, tipicamente, não desenvolvem sintomas de intolerância à lactose até os quatro ou cinco anos de idade.^(1,2,8,27)

Apesar de muitos estudos realizados em âmbito mundial,^(1,2,27-30) existem poucos dados publicados acerca da prevalência da intolerância à lactose na

população brasileira. De acordo com esses dados, foi encontrada a frequência de aproximadamente 50% nos caucasóides, 85% nos negróides e 100% nos orientais estando, esses resultados, de acordo com a origem racial dos brasileiros e conforme a região estudada.⁽³¹⁻³⁵⁾

b) Deficiência secundária de lactase: essa deficiência implica em que, uma condição fisiopatológica subjacente que provoca alterações da estrutura histológica do intestino delgado, seja responsável pela deficiência de lactase e consequente má absorção do dissacarídeo lactose. A atrofia da mucosa intestinal leva a uma redução da atividade de todas as dissacaridases, mas a mais atingida é a lactase que chega a 19% do valor normal. A melhora histológica é acompanhada da normalização das outras dissacaridases com exceção da lactase, devido essa enzima demorar semanas ou meses para retornar aos níveis anteriores e, às vezes, isso pode não ocorrer, pois por estar fracamente inserida à membrana, é a mais susceptível de ser perdida por qualquer dano à mucosa.^(2,8)

Os processos que podem alterar a mucosa do intestino delgado com consequente má absorção secundária de açúcares podem ser inespecíficos - diarreia aguda, geralmente bacteriana ou viral, diarreia crônica, desnutrição, parasitoses, entre as quais a ancilostomíase e a giardíase, doença celíaca, fibrose cística, alergia a proteínas, irradiação, enteropatia psoriática, linfomas, drogas que alteram a síntese protéica, como a tetraciclina e os agentes antimitóticos, o metotrexate e a colchicina a qual, além de alterar a síntese protéica, pode inibir a dissacaridase. Também devem ser consideradas as

condições que determinam deficiências relativas de dissacaridases, tais como cirurgias com ressecção do intestino delgado e do estômago.^(10,36-38)

A síndrome do cólon irritável não provoca má absorção secundária de lactose, mas é alta a prevalência dessa condição nos pacientes com a referida síndrome e, nesses, a ingestão de leite pode piorar os sintomas.⁽³⁹⁾ Não se sabe se a SIDA (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) leva à má absorção secundária de lactose, mas essa ocorre em 60% dos casos de aids com diarreia e a ingestão de leite pode contribuir para a piora do quadro intestinal.⁽⁴⁰⁾

O tratamento da deficiência secundária da lactase e má absorção de lactose, geralmente atribuídas a uma condição subjacente, não necessita da eliminação da lactose da dieta, mas sim, do tratamento da condição subjacente. Uma vez que o problema primário é resolvido, produtos que contêm lactose podem ser consumidos normalmente e esses, por serem excelentes fontes de Ca^{+2} e outros nutrientes, não devem ser excluídos da dieta.⁽⁴¹⁻⁴³⁾

1.4. Quadro Clínico da Intolerância à Lactose

Quando há deficiência da atividade da lactase, obviamente, a hidrólise da lactose fica reduzida, o que resulta em má absorção da lactose. Os sintomas da intolerância à lactose, incluindo distensão abdominal, flatulência, cólicas, meteorismo, espasmos, com início cerca de 15 minutos após a ingestão de lactose e de diarreia aquosa e espumante após 30 a 120 minutos, são

independentes da causa da má absorção e diretamente relacionados à quantidade de lactose ingerida e não absorvida devido à fermentação desse açúcar pelas bactérias. Esses sintomas não são necessariamente correlacionados com o grau de deficiência intestinal de lactase. A lactose não absorvida cria um gradiente osmótico que retira fluido e eletrólitos do interior da célula intestinal, levando à diarreia osmótica. Uma porção tão pequena quanto 12g de lactose, que corresponde à quantidade de 200ml de leite, pode ser suficiente para ocasionar os sintomas em crianças com dor abdominal crônica. Em adição, a lactose não absorvida é um substrato para as bactérias intestinais, especialmente no cólon, que metabolizam a lactose produzindo ácidos graxos e gases (metano, dióxido de carbono e hidrogênio), ocasionando flatulência. Quando é produzido suficiente gás intestinal, pelo processo metabólico bacteriano, ocorre distensão abdominal pela estimulação do sistema nervoso intrínseco do intestino, resultando em espasmo visceral^(1,18,44-46) (Figura 4).⁽²⁾

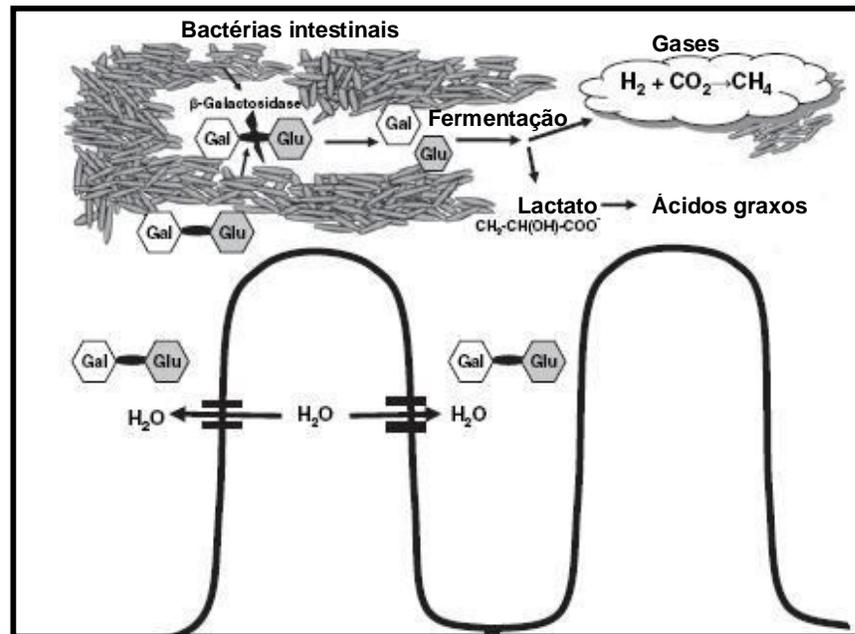


Figura 4. Esquema modificado da não absorção da lactose. Devido a ausência da lactase, a lactose que não foi absorvida ocasiona, no cólon, uma alteração osmótica além de sofrer hidrólise pelas bactérias intestinais (níveis acima de $10^{12-14} \text{ml}^{-1}$) com conseqüente fermentação e produção de gases e ácidos graxos.⁽²⁾

1.5. Diagnóstico da Intolerância à Lactose

Os métodos para investigação e diagnóstico da deficiência da lactase são baseados na fisiopatologia dos sintomas de intolerância à lactose. Assim, a deficiência de lactase pode ser diagnosticada diretamente mediante dosagem da atividade da enzima na mucosa intestinal (biópsia) e, indiretamente, por vários testes baseados na sobrecarga de lactose: curva glicêmica, pesquisa de substâncias redutoras nas fezes e pH fecal, medida do hidrogênio expirado^(8,47) e, além desses, mais recentemente, pelos testes moleculares.⁽⁴⁸⁻⁵²⁾

O diagnóstico da intolerância à lactose também é feito clinicamente pela história que relaciona a ingestão de leite com os sintomas. Deve-se suspeitar quando há diarreia crônica, dor e distensão abdominal relacionados à ingestão de leite ou produtos que contenham lactose. Às vezes o próprio paciente relaciona, mas uma boa anamnese se faz sempre necessária.⁽⁵³⁾

- **Biópsia intestinal**

A realização da biópsia intestinal propicia a dosagem bioquímica da atividade da enzima ou a dosagem semiquantitativa através da histoquímica na mucosa intestinal. A principal desvantagem é que ambos os métodos dependem da realização de biópsia intestinal, o que pode limitar o procedimento, principalmente em crianças. Outra desvantagem decorre de o procedimento revelar a atividade da lactase em um único ponto e não o total da atividade no intestino. Embora essa atividade não seja uniforme ao longo do intestino a dosagem da mesma, ao nível do ligamento de Treitz, parece identificar, com certa eficácia, os indivíduos com e sem deficiência de lactase.^(54,55)

- **Teste de tolerância à lactose**

A curva glicêmica após a ingestão de lactose apresenta resultados que informam melhor a respeito da absorção global de lactose do que a dosagem da atividade da lactase na mucosa intestinal. No teste de sobrecarga com lactose, a interpretação da curva glicêmica é baseada na diferença entre a glicemia de jejum e seu pico máximo. Se ela for menor que 20mg%, a curva glicêmica é chamada plana e significa má absorção da lactose, mesmo em

crianças, e um valor maior que 25mg% é um bom indicador de que há atividade da lactase.^(56,57)

▪ **Pesquisa de substâncias redutoras nas fezes e teste do pH fecal**

A pesquisa de substâncias redutoras nas fezes é um teste simples que diagnostica a má absorção de açúcares quando o resultado é maior ou igual a 0,5%, o que significa a presença do açúcar que não foi absorvido. Esse exame é considerado muito bom para crianças pequenas, mas são descritos resultados falsos positivos em neonatos, principalmente prematuros, e quando há ingestão de ácido ascórbico, ácido nalidíxico e cefalosporinas. Podem ocorrer resultados falsamente negativos se a flora do cólon consumir o açúcar, o que acontece principalmente no adulto, o que torna o teste de pouco valor para se excluir má absorção de lactose. Em relação à glicose fecal, normalmente as fezes não a contém. Então, se a pesquisa semiquantitativa de glicose nas fezes é positiva pode-se fazer o diagnóstico indireto de má absorção dos carboidratos. Resultados falsamente negativos podem ser encontrados se a flora bacteriana não hidrolisar a lactose ou, mesmo que o faça, se ela consumir posteriormente a glicose. Podem ocorrer resultados falsamente positivos quando a concentração plasmática de glicose é muito alta.^(58,59)

O pH fecal, em condições normais, mostra valores em torno de sete. Para que o mesmo abaixe, é necessário que a flora do cólon seja capaz de fermentar um substrato transformando-o em ácidos. O pH fecal menor ou igual a cinco, após a ingestão de lactose, fornece diagnóstico indireto de má absorção de lactose. Apesar de o pH fecal ser um indicador de má absorção de

lactose mais sensível em crianças, ele também pode ter validade no adulto, quando ácido. Entretanto, se após a ingestão do açúcar o pH for normal, não se pode excluir má absorção do mesmo, principalmente se o indivíduo foi submetido à antibioticoterapia anterior ou se a pesquisa não foi feita com fezes frescas, pois os ácidos podem volatilizar-se.^(58,59)

▪ **Teste do hidrogênio expirado (H₂)**

Exame mais simples e cada vez mais aceito é a dosagem do hidrogênio expirado (H₂) após ingestão de carboidratos. Esse se baseia na fermentação bacteriana do açúcar não absorvido pelo intestino delgado, levando ao aparecimento de ácidos orgânicos e gases, como o hidrogênio. A elevação desse último, no ar expirado, indica a má absorção do carboidrato.^(60,61) Como as células dos mamíferos não produzem H₂ no seu metabolismo, 99% da produção desse gás é devida à utilização de substratos fermentáveis por bactérias intestinais sendo que, 10% do H₂ produzido é excretado pelos pulmões em 30 a 90 minutos. Para essa produção, é necessária a presença de grande quantidade de bactérias o que, normalmente, ocorre no cólon e, em caráter excepcional, no intestino delgado quando existe supercrescimento bacteriano. Sendo assim, há relação direta entre a produção intestinal de H₂ e a excreção pulmonar, podendo a medida da concentração do H₂ expirado ser realizada como indicadora da produção de H₂ no intestino. Em adultos, o pico da concentração de H₂ expirado ocorre 120 minutos após a ingestão. Valores altos de H₂ no ar expirado, duas horas após a ingestão de lactose, são compatíveis com o diagnóstico de má absorção de lactose.^(62,63)

A medida da concentração de H₂ expirado é um método diagnóstico sensível e específico, mas sofre influência da velocidade de esvaziamento gástrico, do uso de antibióticos, do tipo de alimentação, do pH intestinal e, também, da capacidade das bactérias do cólon em produzir H₂. Cerca de 90% dos adultos possuem bactérias capazes de produzir H₂, o que pode resultar em 10% de resultados falsamente negativos. O teste é útil na triagem de má absorção de lactose da população, por não ser invasivo e não depender do fato de o paciente estar ou não com diarreia. Quanto à sensibilidade do método, ele depende da dose da lactose, podendo detectar a má absorção de até 5g de hidrato de carbono. Resultados falsamente negativos ocorrem quando a flora bacteriana do cólon não é produtora de hidrogênio, quando ela está reduzida (por antibioticoterapia ou por pH ácido do cólon), quando a flora consome o hidrogênio e quando o trânsito intestinal está rápido. Resultados falsamente positivos ocorrem quando há aumento da flora produtora de hidrogênio, às vezes por antibiótico, e quando há confusão com supercrescimento bacteriano que causa pico precoce do hidrogênio expirado.^(64,65)

- **Teste da lactose marcada com 13C**

O teste da lactose marcada com um isótopo não radioativo do carbono (¹³C) foi introduzido para diminuir os falsos resultados de outros testes. Ele se baseia na ingestão de 25g de lactose marcada, dose mais fisiológica, e na coleta de sangue 1 hora após para determinação da glicose-¹³C, por meio da espectrometria de massa. Parece que essa dosagem é sensível e específica e sem muitos falsos resultados. Entretanto, a desvantagem é o preço do

equipamento e, devido a isso, esse teste tem sido usado apenas em pesquisas científicas.^(66,67)

- **Teste genético**

Devido às recentes pesquisas em biologia molecular, os testes genéticos têm ganhado atenção, especialmente pela alta sensibilidade e especificidade para estudo dos genes. Em face à recente descoberta de polimorfismos associados à intolerância à lactose,⁽⁴⁸⁾ testes moleculares estão sendo utilizados para detecção da presença ou ausência da atividade da lactase, não apenas em pacientes adultos como em crianças,^(49,50) inclusive com validação para a prática clínica no Brasil.⁽⁵²⁾

1.6. Genética Molecular da Intolerância à Lactose

A má absorção de lactose do adulto é transmitida hereditariamente por gene autossômico recessivo. A condição oposta - a persistência da atividade da lactase na vida adulta - é transmitida por gene autossômico dominante e possivelmente é um polimorfismo em um gene regulatório, que resulta na capacidade permanente de digerir o açúcar do leite por toda a vida. A persistência da atividade da lactase representa um polimorfismo genético na população humana que envolve a regulação do desenvolvimento.^(48,68)

A persistência da atividade da lactase na vida adulta é um traço humano de polimorfismo para o qual as frequências de alelos foram afetadas pela seleção. Na realidade, o homem sendo um mamífero, estava original e geneticamente programado para se alimentar com leite somente nos primeiros

anos de vida, durante a fase de amamentação. Entretanto, no momento em que se iniciou a domesticação do gado e o leite fresco passou a ser utilizado, houve a expressão da mutação genética para que houvesse adaptação a essa nova realidade. Essa mutação causou a persistência da enzima da lactase, pois o normal seria a diminuição da produção da mesma pelo organismo. Sendo assim, a persistência da atividade da lactase é um traço adaptativo da evolução do homem e os indivíduos que apresentaram o gene mutante para a produção da enzima tiveram vantagens evolutivas sobre os demais deixando, provavelmente, mais descendentes.^(69,70)

Vários polimorfismos têm sido encontrados nos introns e exons do gene da lactase e na sua região promotora, mas nenhum deles, consistentemente, correlaciona-se com a persistência da lactase.⁽⁷¹⁾ Uma recente descoberta foi descrita por um grupo da Finlândia, na qual foram encontrados dois polimorfismos nos introns 9 e 13 do *minichromosome maintenance 6 (MCM6, OMIM - 601806)*.⁽⁴⁸⁾ Os polimorfismos, numerados a partir do códon de iniciação - ATG - do gene *LCT*, são o -13910 C/T no intron 13, localizado 14 Kb acima do gene da lactase e o polimorfismo -22018 G/A no intron 9, localizado 22 Kb acima, os quais, respectivamente, correlacionam-se 100% e 97% com o fenótipo de tolerância/intolerância à lactose^(48,72,73) (Figura 5).⁽²⁷⁾ Os genótipos homocigotos CC e GG têm baixos níveis de lactase (não persistentes à lactase) sendo, portanto, intolerantes à lactose. Os genótipos homocigotos TT e AA têm altos níveis de lactase (persistentes à lactase) e os heterocigotos CT e GA níveis intermediários de lactase, sendo todos tolerantes à lactose. Portanto, o alelo T está presente em todos os indivíduos com persistência da

lactase (tolerantes à lactose) e ausente naqueles com não-persistência (intolerantes à lactose).⁽⁷⁴⁾

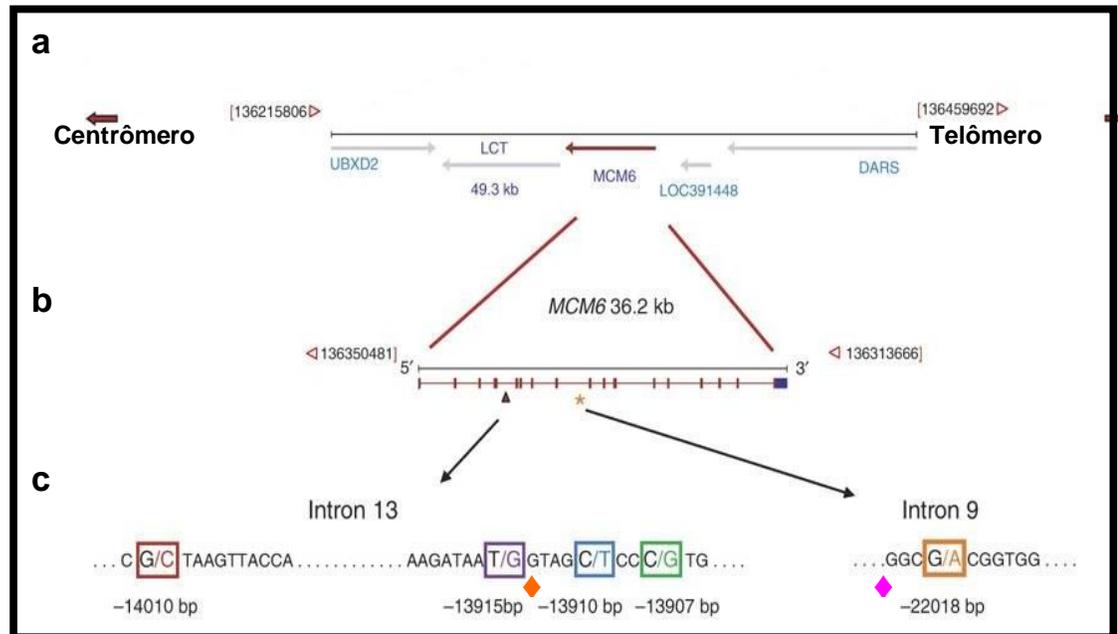


Figura 5. a) Mapa da região dos genes *MCM6* e *LCT* no cromossomo 2. b) Mapa do gene *MCM6*. c) Localização dos polimorfismos associados à persistência/não-persistência da lactase, respectivamente, dentro dos introns 9 e 13 do gene *MCM6*: ♦ -22018G/A e ♦ -13910C/T. Figura modificada.⁽²⁷⁾

O gene *MCM6* foi mapeado por hibridização *in situ* com fluorescência no cromossomo 2, na posição 2q21,⁽⁷⁵⁾ sendo expresso em uma variedade de tecidos humanos adultos e fetais, tendo um importante papel na regulação da replicação do DNA. A persistência/não-persistência da lactase está, portanto, associada a uma variação não-codificante do gene *MCM6* situada acima do gene da lactase, em uma região que parece atuar como um elemento

regulatório de ação *cis* capaz de aumentar a ativação transcricional diferencial da região promotora do gene da lactase.⁽⁶⁸⁾

Embora análises de DNA, específicas em permitir a identificação dos polimorfismos T/C e G/A, terem tornado possível a elucidação da base molecular envolvida na regulação da transcrição do promotor da lactase (*LCT*), com consequente importância no diagnóstico da persistência/não-persistência da atividade da lactase, existem poucos estudos em países em desenvolvimento, especialmente no Brasil^(52,76,77) e, até o presente momento, nenhum em neonatos.

1.7. Objetivos

- ✓ investigar a prevalência do polimorfismo -13910 C/T, com os testes da Reação em Cadeia da Polimerase e do Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição (*Polimerase Chain Reaction Restriction Fragment Length Polymorphism - PCR-RFLP*), em neonatos;
- ✓ ressaltar a importância do rastreamento genético neonatal para o diagnóstico precoce da intolerância à lactose a fim de propiciar o seguimento dos casos positivos e instituir medidas terapêuticas específicas e adequadas.

2. MATERIAL E MÉTODO

2. MATERIAL E MÉTODO

De acordo com as Normas Regulamentadoras de Pesquisa em Seres Humanos, Resolução 196/96 do Ministério da Saúde, o presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, SP (CEP- FAMERP), sob Parecer nº061/2009 (Anexo 1).

No período de Julho a Outubro de 2009 foi realizado um estudo de corte transversal no qual foram avaliados, por técnica molecular, 310 neonatos de ambos os gêneros após assinatura pelos pais do termo de consentimento livre e esclarecido, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa - FAMERP.

Os neonatos selecionados para o estudo obedeceram aos seguintes critérios:

1) Critérios de inclusão:

- a) nascidos no período do estudo, de parto natural ou cirúrgico.
- b) índice de Apgar ≥ 7 no 1º minuto.
- c) sem malformações congênitas aparentes.
- d) nascidos vivos com idade gestacional igual ou superior a 38 semanas.

2) Critérios de exclusão:

- a) índice de Apgar < 7 no 1º minuto.
- b) recém-nascidos com malformações congênitas.
- c) recém-nascidos com sinais sugestivos de síndromes genéticas.
- d) nascidos vivos com idade gestacional inferior a 38 semanas.

2.1. Investigação Molecular

Para os procedimentos de investigação molecular, foram coletados 3,0ml de sangue de cordão umbilical, imediatamente após ligadura do mesmo pelo obstetra da parturiente, sendo armazenado em tubos Vacutainer[®] contendo o anticoagulante (EDTA), homogeneizado logo em seguida e estocado a 4°C por até 3 dias. Todo este procedimento foi realizado no Centro Obstétrico do Hospital de Base de São José do Rio Preto, SP.

2.1.1. Extração de DNA Genômico

O DNA genômico foi extraído das amostras de sangue estocadas usando-se o Kit de extração *GE Illustra - Blood Genomicprep Mini Spin Kit™* (GE Healthcare UK Limited), de acordo com o protocolo do fabricante, e o procedimento realizado no Laboratório de Ensino e Pesquisa em Imunomorfologia (LAEPI) da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, SP (FAMERP).

2.1.1.1. Protocolo de Extração de DNA a Partir de Sangue Total, por Meio do Kit de Extração de DNA Genômico

1ª ETAPA - Lise das Células Sanguíneas:

- 1) Identificar microtubos de 1,5ml.

- 2) Adicionar 20µl de Proteinase K.
- 3) Adicionar 200µl da amostra de sangue.
- RNA-ase opcional.
- 4) Adicionar 400µl da *Lysis Solution* (Solução de Lise): 1ª vez.
- 5) Agitar no Vórtex por 15 segundos para misturar as soluções.
- 6) Incubar em Temperatura Ambiente por 10 minutos com agitações no Vórtex esporádicas para auxiliar a lise celular.
- 7) Visualizar coloração ao final do estágio de vermelha para marrom escura.
- 8) Rápido Spin para homogeneizar a amostra.

2ª ETAPA - Montagem e Ligação

- 1) Colocar a mini-coluna no tubo coletor para cada amostra.
- 2) Abrir a tampa da coluna e colocar cerca de 640µl do lisado (Fase 1) no centro da mesma.
- 3) Fechar a tampa da coluna e colocar na centrífuga.
- 4) Centrifugar por 1 minuto a 11000g.
- 5) Descartar o fluido do tubo coletor que passou pela coluna sem tocar na base da mesma.
- 6) Colocar a coluna de volta no tubo coletor.

3ª ETAPA - Wash 1

- 1) Adicionar 500µl da *Lysis Solution* (Solução de Lise): 2ª vez.
- 2) Centrifugar por 1 minuto a 11000g.

- 3) Descartar o fluido do tubo coletor que passou pela coluna sem tocar na base da mesma.
- 4) Colocar a coluna de volta no tubo coletor.

4ª ETAPA - Wash 2

- 1) Adicionar 500µl da *Wash Buffer* (Tampão de Lavagem).
 - 2) Centrifugar por 3 minutos a 11000g (Se o tempo estiver úmido - aumentar centrifugação para 5 minutos).
- Pré-aquecer o *Elution Buffer* (Tampão de Eluição) a 70°C.
- 3) Descartar o fluido do tubo coletor que passou pela coluna sem tocar na base da mesma.

5ª ETAPA - Eluição

- 1) Colocar cada coluna em microtubos de 1,5ml, ambos corretamente identificados.
- 2) Adicionar 200µl do *Elution Buffer* (Tampão de Eluição) já pré-aquecido a 70°C.
- 3) Incubar por 1 minuto a temperatura ambiente.
- 4) Centrifugar por 1 minuto a 11000g.
- 5) Descartar a coluna.
- 6) Estocar o DNA a 4°C ou -20°C.

2.1.2. Detecção do Polimorfismo -13910 C/T⁽⁷⁷⁾

2.1.2.1. Amplificação do Gene *MCM6* pelo Teste da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para se detectar o polimorfismo -13910 C/T, o fragmento do DNA genômico, que abrange a região do polimorfismo no íntron 13 do gene *MCM6*, foi amplificado pelo teste da PCR, com algumas modificações. Para esta reação, foi utilizado um par de iniciadores ou "primers", que são oligonucleotídeos sintéticos, identificados como *MCM6-LCT(F)* e *MCM6-LCT(R)*. A partir destes, os desoxinucleotídeos trifosfatos (dNTPs) são incorporados, iniciando a amplificação do DNA, respeitando-se a complementaridade de bases (A-T/C-G) sendo obtida, por fim, a amplificação do gene.

As sequências dos oligonucleotídeos sintetizados, a posição de anelamento e o tamanho (em pares de bases - pb) do fragmento amplificado pelo par de "primers" são descritos no Quadro 1⁽⁷⁷⁾ (Acesso *OMIM* - Nº AY220757).

Quadro 1. Sequência dos "primers" para PCR do gene *MCM6*.⁽⁷⁷⁾

"Primer"	Sequência 5'→3'	Posição	Tamanho (pb)
<i>MCM6-LCT</i> (F)	AAG ACG TAA GTT ACC ATT TAA TAC	26533-26556	} 216
<i>MCM6-LCT</i> (R)	CGT TAA TAC CCA CTG ACC TAT CCT	26748-26725	

F ("Forward" - direto); R ("Reverse" - inverso), pb (pares de bases)

A reação da PCR, utilizando-se os "primers" *MCM6-LCT*(F) e *MCM6-LCT*(R), foi processada em termociclador (*Bioer Technology*[®], Modelo *TC-XPG*), em reações de 25 µL de volume final, contendo:

- 1) DNA (200-300 ng),
- 2) *primers* - 10 pmoles de cada [direto (F) e inverso (R)],
- 3) Conjunto de Reagentes *FideliTaq*TM *PCR MasterMix* (2X) (*GE HEALTHCARE*[®]) composto por: tampão de PCR 1X [Tris-HCl - 30 mM (pH 8.4), cloreto de potássio (KCl) - 50 mM], cloreto de magnésio (MgCl₂) - 1,5 mM, dNTPs - 0,2 mM de cada desoxinucleotídeo trifosfato adenina, timina, citosina, guanina (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) e Taq DNA polimerase - 1,25 U. Protocolo utilizado de acordo com as instruções do fabricante.

Descrição do Ciclo da PCR identificado como "*MCM6-LCT*": inicialmente, as amostras foram desnaturadas a 94°C por 3 minutos sendo, posteriormente, submetidas a 35 ciclos repetidos de 60 segundos a 94°C para desnaturação, 60 segundos a 60°C para anelamento dos primers e 2 minutos a 72°C para extensão das cadeias e, após os ciclos, 10 minutos a 72°C para extensão final das cadeias.

Os produtos da PCR foram adicionados ao azul de bromofenol e submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% em tampão Tris-Borato-EDTA

ou TBE 1X, por 2 horas a 105V. Após término da eletroforese o gel foi corado com brometo de etídio, na concentração de 0,5µg/mL, submetido à iluminação ultravioleta, para confirmar o sucesso da reação, e fotodocumentado.

2.1.2.2. Análise de Restrição (Técnica da RFLP) do Fragmento Amplificado do Gene *MCM6*

Pela PCR (Ciclo *MCM6-LCT*) foi amplificado, como produto da reação, um fragmento de 216 pb o qual, posteriormente, foi submetido à análise de restrição (RFLP) utilizando-se a enzima *BsmFI* - *Bacillus stearothermophilus FI* (New England Biolabs)[®], a 65°C, por 2h30min para detecção do polimorfismo -13910 C/T. Quando o polimorfismo está presente em ambos os alelos (amostra homocigota), o produto da PCR é digerido pela enzima *BsmFI*, devido ao reconhecimento do sítio de restrição enzimático, em fragmentos de 126 e 90 pb e, quando o polimorfismo está presente em apenas um alelo (amostra heterocigota), o produto da PCR do alelo mutante é digerido em dois fragmentos de 126 e 90 pb e o do alelo normal não é digerido, apresentando este um fragmento de 216 pb. Na ausência do polimorfismo, em ambos os alelos, o produto da PCR não é digerido, apresentando apenas o fragmento de 216 pb, pois não há o reconhecimento do sítio de restrição da enzima, devido à não substituição das bases nitrogenadas C/T, na posição -13910 do gene *MCM6*.

Os produtos da reação de restrição (RFLP) foram adicionados ao azul de bromofenol e submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% em tampão Tris-Borato-EDTA ou TBE 1X, por 3 horas a 105V. Após término da eletroforese o gel foi corado com brometo de etídio, na concentração de 0,5 µg/mL, submetido à iluminação ultravioleta, para confirmar o sucesso da reação, e fotodocumentado.

Para cada reação de RFLP realizada foram incluídas, como controles positivo e negativo, amostras de duas crianças respectivamente identificadas como:

Controle 1 (positivo - Genótipo CC: não-persistência da enzima lactase; Fenótipo: intolerante à lactose) - criança com aleitamento exclusivo materno e aos 2 anos de idade, após a introdução do leite de vaca, iniciou com quadro de dores abdominais, flatulência e diarreia esporádica, com melhora após a exclusão do leite da dieta. Os sintomas retornaram após a reintrodução do leite de vaca com melhora após uso de leite sem lactose. Não foram realizados testes laboratoriais, pela recusa materna e por serem de difícil interpretação e execução nesta faixa etária. O diagnóstico foi feito clinicamente pelo teste de exclusão de lactose da dieta.

Controle 2 (negativo - Genótipo CT/TT: persistência da enzima lactase; Fenótipo: tolerante à lactose) - criança com 5 anos de idade com quadro de diarreia fermentativa aguda. Teste de sobrecarga à glicose mostrou-se positivo, durante o quadro diarréico. Após melhora do quadro, o teste de sobrecarga à glicose foi negativo. A mãe nega alterações intestinais desde a introdução do leite de vaca. O diagnóstico foi de intolerância secundária à lactose.

2.2. Análise Estatística

Foram calculadas porcentagens sendo os resultados expressos em (%) e utilizado o Teste do Qui-Quadrado para comparação entre os gêneros.

3. RESULTADOS

3. RESULTADOS

No período de Julho a Outubro de 2009, de acordo com os critérios de inclusão e exclusão, foram selecionados 310 neonatos, sendo 160 (52%) do gênero masculino e 150 (48%) do gênero feminino.

Os resultados obtidos após realização das técnicas moleculares: extração de DNA genômico, PCR e RFLP com posterior eletroforese em gel de agarose, estão descritos a seguir:

3.1. Extração do DNA Genômico

Foi possível a extração do DNA genômico, a partir de leucócitos de sangue umbilical, de todas as amostras de recém-nascidos (n=310; 100%) (Figura 6).

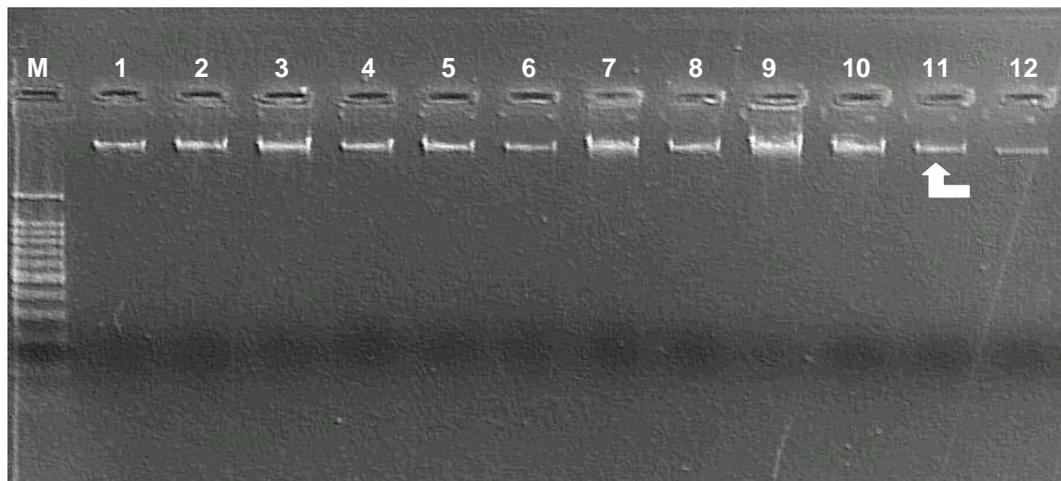


Figura 6. Fotografia do DNA genômico das amostras identificadas de 1 a 12 em gel de agarose 1%. A seta indica as bandas correspondentes ao DNA de cada amostra. M- marcador 100 pb (Ladder®).

3.2. Técnica da PCR para Amplificação do Gene *MCM6*

A reação da PCR permitiu a amplificação do fragmento de 216 pb do gene *MCM6*, que abrange a região do polimorfismo, em todas as amostras analisadas (n=310; 100%) (Figura 7).

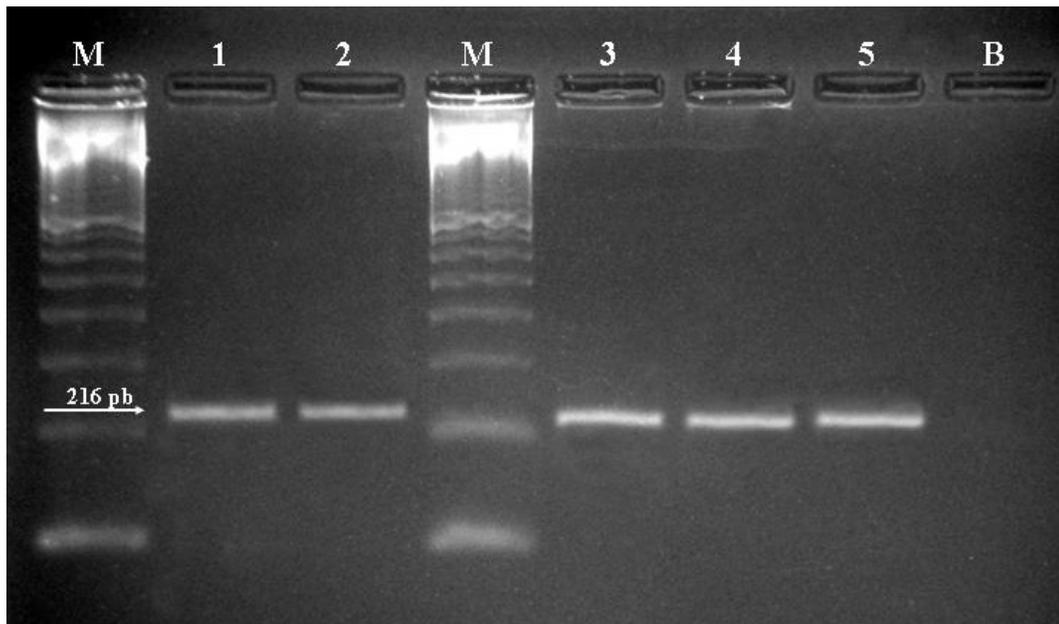


Figura 7. Fotografia do produto da PCR - fragmento de 216 pb amplificado do gene *MCM6*, em gel de agarose 2%. Coluna 1 - controle 1. Coluna 2 - controle 2. Colunas 3 a 5 - amostras do estudo. B - reação "Branca" (sem DNA). M- marcador 100 pb (Ladder®).

3.3. Técnica da RFLP (Digestão Enzimática) do Fragmento Amplificado do Gene *MCM6*

Após a digestão enzimática para identificação do polimorfismo -13910 C/T (Figura 8), os resultados obtidos expressam os seguintes genótipos:

- CC - relacionado ao fenótipo de não-persistência da atividade da enzima lactase → intolerância à lactose.
- CT e TT - relacionados ao fenótipo de persistência da atividade da enzima lactase → tolerância à lactose.

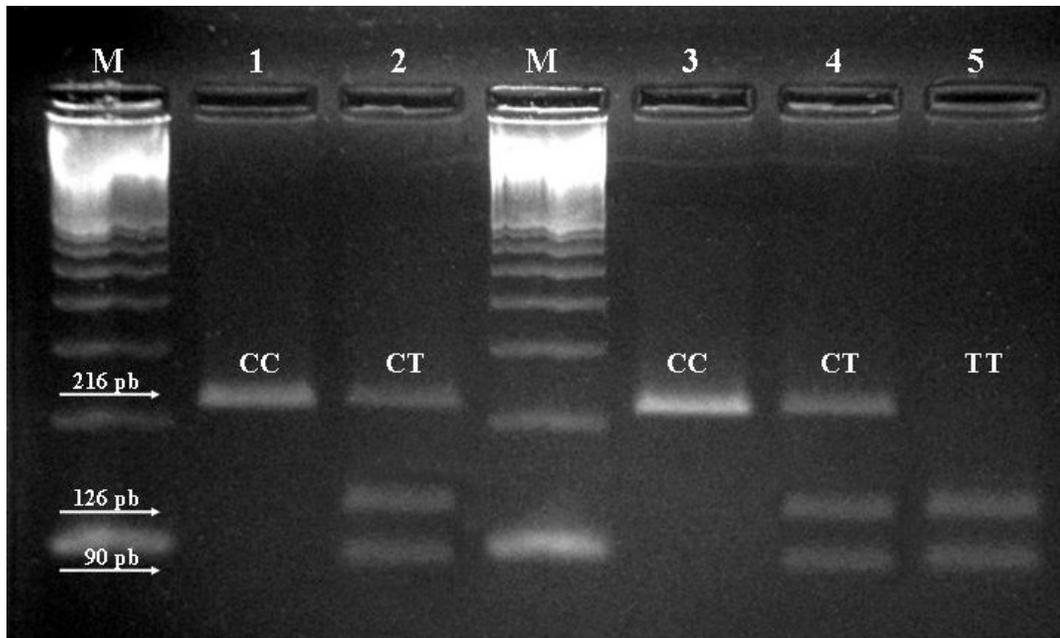


Figura 8. Fotografia do produto da RFLP (digestão enzimática) - fragmentos de 216, 126 e 90 pb do gene *MCM6*, em gel de agarose 2%. Coluna 1 - controle 1 positivo (CC - não-persistência da lactase). Coluna 2 - controle 2 negativo (CT - persistência da lactase). Colunas 3 a 5 - amostras do estudo: Coluna 3: CC (não-persistência da lactase); Coluna 4: CT (persistência da lactase); Coluna 5: TT (persistência da lactase). As setas indicam os fragmentos correspondentes às amostras nas Colunas 1 a 5. M- marcador 100 pb (Ladder®).

A avaliação dos géis de agarose, após a reação RFLP, permitiu identificar 191 recém-nascidos (62%) com genótipo CC e, portanto, intolerantes

à lactose e determinar a frequência do alelo C em 77% dos alelos avaliados. Os resultados em relação as frequências genotípica, alélica e fenotípica estão demonstrados respectivamente nas Tabelas 3, 4 e 5.

Tabela 3. Distribuição do número de recém-nascidos (n=310) em relação ao genótipo e a frequência genotípica, em porcentagens.

Genótipo	Recém-nascidos (n)	Frequência genotípica (%)
CC	191	62
CT	95	31
TT	24	07
Total	310	100

Tabela 4. Distribuição do total de alelos avaliados (n=620) em relação a frequência alélica de C e T, em porcentagens.

Alelos	(n)	Frequência alélica (%)
C	477	77
T	143	23
Total	620	100

Tabela 5. Distribuição do número de recém-nascidos (n=310) em relação ao fenótipo e a frequência fenotípica, em porcentagens.

Fenótipo	Recém-nascidos (n)	Frequência fenotípica (%)
Intolerante à lactose (CC)	191	62
Tolerante à lactose (CT/TT)	119	38
Total	310	100

A diferença entre os gêneros e os fenótipos encontrados não foi estatisticamente significativa, conforme resultados apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Distribuição do gênero dos recém-nascidos (n=310) em relação ao fenótipo, em porcentagens.

Fenótipo	Gênero		Total (%)	p*
	Masculino (%)	Feminino (%)		
Intolerante à lactose (CC)	97 (32)	94 (30)	191 (62)	0,801
Tolerante à lactose (CT/TT)	63 (20)	56 (18)	119 (38)	
Total	160 (52)	150 (48)	310 (100)	

Teste do Qui-Quadrado.

4. DISCUSSÃO

4. DISCUSSÃO

A intolerância à lactose tem sido reconhecida, por muitos anos, como um problema mundial em muitas crianças e adultos. Embora raramente ameacem a vida, os sintomas da intolerância à lactose podem levar à significativa desconforto, piora da qualidade de vida, dificuldade escolar, interrupção das atividades de lazer ou de esportes, perda de jornada de trabalho, todos com um custo individual, familiar e social.⁽⁸⁾

A ingestão de lactose em certos indivíduos suscetíveis pode causar sintomas abdominais dos mais variáveis podendo ser tratados com restrição láctea ou reposição enzimática, dependendo da quantidade de lactose consumida ou do grau de deficiência de lactase. Crianças com suspeita de intolerância à lactose podem ser diagnosticadas clinicamente apenas pela eliminação da lactose da dieta ou por exames complementares que incluem o teste de hidrogênio expirado ou a invasiva biópsia intestinal para determinação da concentração da lactase (e outras dissacarídeos, quando necessárias), os quais são de difícil concordância pelos pais. Atualmente, testes genéticos estão sendo realizados para investigação da intolerância à lactose, não apenas por serem considerados não invasivos, mas também pela alta sensibilidade e especificidade para estudo molecular, conforme realizado no presente estudo.^(48-52,74)

Sendo assim, este estudo, visando realizar a análise molecular do gene *MCM6*, a fim de rastreamento precoce da intolerância à lactose, em recém-nascidos em São José do Rio Preto, SP, tem caráter inédito por ser o primeiro

estudo realizado em no Brasil. Foram utilizados, como testes moleculares, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e o Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição (RFLP), com a enzima *BsmFI*.

Foi encontrada a prevalência de 62% (1:1,62) de recém-nascidos com genótipo CC, portanto, intolerantes à lactose, estando estes dados de acordo com os da literatura^(1,2,27,48-51), inclusive com os dados nacionais.^(52,76,77) Destes recém-nascidos intolerantes à lactose, 32% (1:1,96) são do gênero masculino e 30% (1:2,03) do gênero feminino, não sendo esta relação estatisticamente significativa. Em função do caráter de herança ser autossômico o que determina a intolerância à lactose, os resultados do presente estudo não mostraram diferença entre os gêneros.^(57,78)

Em relação à etnia brasileira, a prevalência de 53% de hipolactasia foi identificada em indivíduos brancos e 91% em não-brancos pela medida da atividade da lactase na mucosa duodenal por imunohistoquímica.⁽⁵⁵⁾ Mas, recentemente, o teste genético foi correlacionado com a etnia brasileira sendo encontrada a prevalência de cerca de 57% de hipolactasia para o grupo de cor branca, 80% para o grupo de cor negra e 100% de intolerância à lactose para os descendentes de japoneses,⁽⁷⁹⁾ corroborando dados anteriores sobre a prevalência étnica da intolerância à lactose diagnosticada pelos métodos convencionais.⁽³¹⁻³⁵⁾

Até o momento, não há dados na literatura de rastreamento neonatal de intolerância à lactose, conforme realizado no presente estudo. Isto, provavelmente, se deve ao fato da recente descoberta das bases moleculares da intolerância à lactose e de que os estudos se basearam, primeiramente, em

comparar se o diagnóstico obtido por meio de exames complementares convencionais, como o teste do H₂ expirado, corroborava com o diagnóstico molecular.

Recentes estudos, conduzidos em países europeus, têm demonstrado concordância de 91% a 97% do genótipo CC com resultados positivos do teste do H₂ expirado e 86% a 95% de concordância entre os genótipos CT e TT e resultados negativos do teste do H₂ expirado, além de terem apresentado valores preditivos positivo de 97% e negativo de 86% para o teste molecular.^(1,80-83)

A análise de expressão da enzima lactase também foi realizada em pacientes com diagnóstico de intolerância à lactose em estudo no qual foi determinado que a correlação da expressão da enzima lactase é muito mais alta em pacientes com alelo T do que naqueles com alelos C, sugerindo que esse polimorfismo está relacionado à regulação da transcrição do gene da lactase e, portanto, a não-persistência da enzima lactase na mucosa intestinal.⁽⁷²⁾

Outra correlação positiva foi realizada em estudo em crianças, nas quais o material genético era obtido por biópsia intestinal. Apesar da correlação positiva, a maneira como foi obtido o material criou certa rejeição dos pais, por ser a biópsia um teste invasivo. Os autores concluem que a biópsia não é a conduta diagnóstica de primeira escolha, principalmente em crianças, caso não se tenha acesso aos testes moleculares.⁽⁵⁰⁾

No Brasil, há poucos estudos comparando a presença do polimorfismo e o teste do H₂ expirado, obtendo-se uma correlação em pacientes adultos com

suspeita de má absorção da lactose ou com síndrome do cólon irritável em cerca de 96% dos casos. Nesses, considerando o polimorfismo -13910C/T como um teste diagnóstico para a intolerância à lactose, a presença do genótipo CC foi estimada ter uma sensibilidade de 100%, especificidade de 83%, valor preditivo positivo de 76% e valor preditivo negativo de 100%.^(52,76,77) Outro estudo conduzido no Brasil, especificamente em crianças com suspeita de intolerância à lactose, foi feito por meio do teste do H₂ expirado sem o teste genético, sendo encontrada a prevalência de 8,4% de má absorção de lactose nessa população pediátrica brasileira.⁽⁶⁰⁾

Os resultados desses estudos também demonstraram que, nos indivíduos com o teste do H₂ expirado positivo e com o teste genético negativo, há boas razões para se suspeitar de causas secundárias de deficiência de lactase. A alta prevalência da não-persistência da lactase na população geral deve convencer os médicos a serem cautelosos quando o diagnóstico de intolerância primária à lactose é baseado somente no teste de hidrogênio expirado.^(2,49,50,52,81,83)

Assim, os testes genéticos PCR/RFLP, para analisar o polimorfismo de nucleotídeo único -13910C/T localizado acima do gene da lactase, podem ser considerados uma análise ótima em prever a hipolactasia em uma população com suspeita de má absorção, diferenciando pacientes com intolerância primária à lactose daqueles com intolerância secundária. É um exame de técnica simples, não invasivo e confortável; além disso, é mais rápido do que o teste de tolerância à lactose e não induz aos sintomas de intolerância a esse açúcar, tais como diarreia e dor abdominal. Vantagens adicionais da

PCR/RFLP quando comparadas ao teste do hidrogênio expirado são que o teste molecular é menos dispendioso, causa menor incômodo, uma vez que a amostra de sangue venoso pode ser facilmente enviada ao laboratório, não requer jejum, preparo dietético, estímulo com lactose e consome menos tempo do paciente.

O teste genético da hipolactasia é um auxílio adicional ao diagnóstico de queixas abdominais em populações como aquelas no norte europeu onde a prevalência da hipolactasia do tipo adulto é relativamente alta e o consumo de produtos lácteos é comum. Em tais populações o teste genético é o de maior valor quando o declínio dos níveis de lactase é completo - conforme comprovado em estudo em crianças finlandesas com idade acima dos doze anos.^(49,50,52,81,83) Em crianças mais jovens, a genotipagem pode auxiliar na exclusão da hipolactasia como a causa de sintomas abdominais. Esses resultados reforçam a aplicabilidade do teste genético para o polimorfismo - 13910C/T no diagnóstico da não-persistência da lactase, tornando-o disponível não apenas para propósitos diagnósticos individuais, mas também, como método de rastreamento para estudo populacional ou neonatal, conforme realizado no presente estudo.

O diagnóstico incorreto de hipolactasia em indivíduos CC-negativos pode resultar em uma longa e duradoura restrição de produtos lácteos. Nesses casos, isso não aliviaria os sintomas e contribuiria, ainda, para a osteoporose e outras complicações relacionadas. Assim, cada paciente com queixa relacionada ao consumo de lactose deve ser investigado primeiro pelo teste genético e, subsequentemente, pelos procedimentos adicionais a fim de

esclarecer se os sintomas estão relacionados a outras doenças do trato gastrointestinal. Uma vez que os custos do teste genético não excedem os do teste do hidrogênio expirado, essa estratégia pode ser também custo-efetiva. Nos casos de deficiência secundária de lactase, acurados métodos de diagnóstico e terapia levarão à diminuição das queixas lactose-relacionadas podendo restaurar a atividade da lactase.⁽⁸¹⁾

O tratamento da intolerância à lactose consiste basicamente na retirada ou diminuição desse açúcar da dieta, o que leva ao desaparecimento progressivo dos sintomas. Uma das grandes preocupações com a redução da lactose na alimentação é a garantia do fornecimento de quantidade apropriada de proteínas, cálcio, riboflavina e vitamina D. É de fundamental importância um planejamento dietético apropriado em crianças, que assegure um crescimento e desenvolvimento satisfatórios.⁽⁸⁴⁾

Recomendações dietéticas adequadas são necessárias para indivíduos intolerantes à lactose, uma vez que eles são propensos a apresentar diminuição dos níveis de cálcio devido à baixa ingestão de leite e ao prejuízo na sua absorção. Médicos pediatras e outros profissionais da saúde, como fonoaudiólogos e nutricionistas, especializados em alimentação infantil, devem ter em mente os benefícios e controvérsias relacionadas ao consumo de leite e seus derivados e de fórmulas infantis que contenham lactose.⁽⁸⁵⁾ Deve ser notado que, se os pais recebem o diagnóstico de que seu filho tem o genótipo CC, ainda na fase em que a atividade da lactase é alta ou quando nenhum sintoma de intolerância da lactose se manifestou, esse fato pode ter um efeito

indesejado em relação ao aspecto dietético e, portanto, nutricional da criança.^(50,81,85)

O teste de DNA permite agora um auxílio vital para o diagnóstico. A intolerância a certos alimentos pode causar uma variedade de sintomas intestinais e sistêmicos. A possibilidade de que esses sintomas são causados pela lactose tem sido esquecida, por causa da "lactose escondida" adicionada a muitos alimentos e bebidas sem constar no rótulo, gerando confusão no diagnóstico que foi baseado apenas na remoção dos alimentos lácteos. Uma importante mudança na abordagem clínica da intolerância à lactose é necessária, devendo os profissionais seguir as seguintes recomendações ou diretrizes:⁽¹⁾

- 1) Paciente com suspeita de intolerância à lactose. Antes de ser encaminhado para teste de tolerância à lactose, solicitar teste genético.
- 2) Coletar amostra para análise molecular. Pacientes com sintomas inexplicáveis intestinais ou sistêmicos devem, primeiramente, serem testados para o polimorfismo associado à intolerância à lactose: - 13910C/T:
 - a) Se genótipo CC - remoção imediata de toda lactose da dieta. Se os sintomas melhorarem após um mês, o diagnóstico de intolerância à lactose é confirmado.
 - b) Se genótipos CT/TT - realizar o teste de tolerância à lactose, a fim de se investigar causas secundárias de intolerância.

- 3) Fornecer orientações para as refeições isentas de lactose e para o perigo da "lactose escondida".
- 4) Acompanhamento por um ano.
- 5) Cálcio e Vitamina D devem ser administrados e monitorados, além de orientações quanto ao uso de probióticos.

Há ainda muitos mitos em relação à intolerância à lactose. O Quadro 2 apresenta alguns deles e suas realidades.⁽²⁾

Quadro 2. Mitos comuns e realidades práticas.⁽²⁾

Mitos	Realidades Práticas
<p>Adultos com intolerância à lactose não aceitam qualquer leite e derivados.</p>	<p>Pessoas com não-persistência da lactase não são totalmente intolerantes. Elas podem tolerar cerca de 12g de lactose se administradas ao longo do dia, por exemplo, no cereal matinal, no chá, no café.</p>
<p>A persistência da lactase é rara.</p>	<p>Cerca de 70% da população mundial é não persistente à lactase.</p>
<p>Leite de cabra é livre de lactose.</p>	<p>O leite de cabra contém 4% de lactose. Os leites de soja e de arroz são isentos de lactose. Nesses casos é recomendada a suplementação de Cálcio.</p>
<p>Um teste de H₂ expirado negativo significa que o paciente pode ingerir e tolerar todos os produtos lácteos.</p>	<p>O teste negativo não confirma, necessariamente, tolerância à lactose, pois em cerca de 20% dos casos não ocorre a eliminação do H₂ pelo ar expirado.</p>

Os resultados da literatura e os do presente estudo suportam a convergente evolução da persistência/não-persistência da lactase nas diversas populações, mais provavelmente refletindo as diferentes histórias de adaptação à cultura do leite. Um exemplo típico desse fato é o que está descrito no artigo intitulado *"Darwin' illness revealed"* ("A doença de Darwin revelada"): ⁽⁸⁶⁾

"I have had a bad spell, vomiting every day for eleven days and some days after every meal" ("Eu tenho tido uma fase ruim, vomitando todos os dias, por onze dias, e em alguns deles após toda a refeição"). Assim Charles Darwin (1809-1882) escreveu em uma carta para o seu amigo Joseph Hooker em dezembro de 1863. Mais tarde escreveu para seu pai, que era seu próprio médico: "A náusea geralmente começa duas horas após a refeição". Na verdade, Darwin já tinha sofrido de dor no peito e palpitações cardíacas em dezembro de 1831 enquanto permanecia em Plymouth aguardando melhores condições meteorológicas para partir no navio *Beagle*. Por 40 anos, Charles Darwin esteve frequentemente doente, morando em Kent como um semi-recluso, deixando até de ir ao famoso debate em 1860 porque estava apresentando mais uma de suas crises. Consultou cerca de vinte médicos, incluindo seu pai, e tomou dezenas de remédios; nenhum dos quais realmente teve qualquer efeito, embora Darwin tivesse tido uma certa melhora quando ele se submeteu à terapia das águas de Gully, em Malvern. A única vez que ele se sentiu melhor foi por acaso, quando ele parou de ingerir leite.

Os sintomas de Darwin se enquadram exatamente naqueles de intolerância sistêmica à lactose. Darwin sofria de dor estomacal, flatulência, cefaleias, vômitos, fadiga crônica, dores articulares, lesões de pele, furúnculos,

úlceras orais e palpitações cardíacas, além de estar frequentemente depressivo. Muitas hipóteses têm sido postuladas para explicar sua doença, incluindo envenenamento por arsênico, doença de Chagas e desordens psicossomáticas, devido à morte de sua mãe quando ele tinha oito anos de idade. Nenhuma destas hipóteses se enquadrava aos sintomas. Seis evidências sustentam as hipóteses aventadas de que Charles Darwin sofria de intolerância à lactose:

- 1. Os sintomas de Darwin se encaixam exatamente com aqueles identificados na intolerância sistêmica de lactose.*
- 2. O início dos vômitos e dores intestinais ocorria 2-3 horas após a refeição, justamente o tempo de a lactose poder alcançar o intestino grosso.*
- 3. Sua esposa Emma usava leite e nata constantemente em suas receitas.*
- 4. Há uma clara história de doença na família de Darwin e em seus filhos.*
- 5. Darwin não apresentou sintomas quando esteve no navio Beagle (1831-1836), onde não havia leite. Ele teve apenas enjoos devido ao movimento do navio e uma febre na América do Sul, provavelmente febre tifóide.*
- 6. Darwin somente se sentia melhor quando, por exclusão, não ingeria leite".⁽⁸⁶⁾*

A exclusão da lactose na dieta, após a elucidação diagnóstica, tem transformado a vida das pessoas e de seus familiares assim como a de várias

centenas de pacientes. Eles agora se sentem bem, com uma importante redução no uso de medicamentos e consultas médicas. É surpreendente que Darwin não tenha identificado sua própria intolerância à lactose, apesar de essa condição não ser reconhecida no século XIX. Mas, como ele não identificou essa mais óbvia característica de sua própria teoria da evolução? A ciência da intolerância à lactose pode revelar a resposta para o problema que Darwin nunca realmente abordou, a verdadeira "origem" mais do que o "desenvolvimento" da espécie humana.⁽⁸⁷⁾

5. CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

As técnicas da Reação em Cadeia da Polimerase/Polimorfismo do Comprimento de Fragmentos de Restrição (*Polimerase Chain Reaction/Restriction Fragment Length Polymorphism* - PCR/RFLP), com o protocolo utilizado no estudo, propiciam um rápido e não invasivo método de detecção da presença ou ausência da variante persistência da lactase.

O diagnóstico molecular neonatal pode otimizar o seguimento de resultados positivos obtidos no rastreamento, além de propiciar orientações específicas aos pais quanto ao aspecto nutricional das crianças intolerantes à lactose.

Os testes moleculares podem ser um valioso complemento de diagnóstico não apenas individual, mas também como método de rastreamento para estudo populacional ou neonatal.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Matthews SB, Waud JP, Roberts AG, Campbell AK. Systemic lactose intolerance: a new perspective on a old problem. *Postgrad Med J* 2005;81:167-73.
2. Lomer MCE, Parkes GC, Sanderson JD. Review article: lactose intolerance in clinical practice – myths and realities. *Aliment Pharmacol Ther* 2008;27:93-103.
3. Jacobi A. Milk-sugar in infant feeding. *Trans Am Pediat Soc* 1901;13:150-60.
4. Kretchmer N. Lactose and lactase – a historical perspective. *Gastroenterology* 1971;61:805-13.
5. Holzel A, Schwarz V, Sutcliffe KW. Defective lactose absorption causing malnutrition in infancy. *Lancet* 1959;1(7083):1126-8.
6. Host A, Jacobsen HP, Halken S, Holmenlund D. The natural history of cow's milk protein allergy/intolerance. *Eur J Clin Nutr* 1995;49(Supl 1):13-8.
7. Crittenden RG, Bennett LE. Cow's milk allergy: a complex disorder. *J Am Coll Nutr* 2005;24(6 Supl):582-91.

8. Heyman MB. Lactose intolerance in infants, children, and adolescents. *Pediatrics* 2006;118:1279-86.
9. Simoons FJ. The antiquity of dairying in Asia and Africa. *Geogr Rev* 1971;61:431-9.
10. Sevá-Pereira A. Deficiência de dissacaridases. In: Cordeiro FTM, Moraes Filho JP, Magalhães AFN, Guarita DR, Dantas W, Kotze LM da S, *et al.*, editores. *Conduas em Gastroenterologia (Federação Brasileira de Gastroenterologia)*. Rio de Janeiro: Revinter; 2004. Cap 18. p.198-215.
11. Wikimedia Commons. Lactose. 2009; <http://commons.wikimedia.org/wiki/Lactose>. Acessado em agosto de 2009.
12. Campbell AK, Waud JP, Matthews SB. The molecular basis of lactose intolerance. *Science Progr* 2005;88(3):157-202.
13. Mantei N, Villa M, Enzler T, Wacker H, Boll W, James P, *et al.* Complete primary structure of human and rabbit lactase-phlorizin hydrolase: implications for biosynthesis, membrane anchoring and evolution of the enzyme. *EMBO J* 1988;7:2705-13.

14. Boll W, Wagner P, Mantei N. Structure of the chromosomal gene and cDNAs coding for lactase-phlorizin hydrolase in humans with adult-type hypolactasia or persistence of lactase. *Am J Hum Genet* 1991;48:889-902.
15. Montgomery RK, Büller HA, Rings EH, Grand RJ. Lactose intolerance and the genetic regulation of intestinal lactase-phlorizin hydrolase. *FASEB J* 1991;5:2824-32.
16. Hauri HP, Sterchi EE, Bienz D, Fransen JA, Marxer A. Expression and intracellular transport of microvillus membrane hydrolases in human intestinal epithelial cells. *J Cell Biol* 1985;101:838-51.
17. Robayo-Torres CC, Nichols BL. Molecular differentiation of congenital lactase deficiency from adult-type hypolactasia. *Nutr Rev* 2007;95-8.
18. Vesa TH, Marteau P, Korpela R. Lactose intolerance. *J Am Coll Nutr* 2000;19(2 Supl 2):165-75.
19. Antonowicz I, Lebenthal E. Developmental patterns of small intestinal enterokinase and disaccharidase activities in the human fetus. *Gastroenterology* 1977;72:1299-303.
20. Durand P. Idiopathic lactosuria in a patient of chronic diarrhea and acidosis. *Minerva Pediat* 1958;10:706-11.

21. Lifshitz F. Congenital lactase deficiency. *J Pediatr* 1966;69:229-37.
22. Savilahti E, Launiala K, Kuitunen P. Congenital lactase deficiency. A clinical study on 16 patients. *Arch Dis Child* 1983;58:246-52.
23. Asp NG, Dahlqvist A, Kuitunen P, Launiala K, Visakorpi JK. Complete deficiency of brush-border lactase in congenital lactose malabsorption. *Lancet* 1973;2(7824):329-30.
24. Freiburghaus AU, Schmitz J, Schindler M, Rotthauwe HW, Kuitunen P, Lauaniala K, Hadorn B. Protein patterns of brush border fragments in congenital lactose malabsorption and in specific hypolactasia of the adult. *N Engl J Med* 1976;294:1030-2.
25. Järvelä I, Enattah NS, Kokkonen J, Varilo T, Savilahti E, Peltonen L. Assignment of the locus for congenital lactase deficiency to 2q21, in the vicinity of but separate from the lactase-phlorizin hydrolase gene. *Am J Hum Genet* 1998;63:1078-85.
26. Dahlqvist A. Specificity of the human intestinal disaccharidases and implication for hereditary disaccharide intolerance. *J Clin Invest* 1962;41:463-70.

27. Tishkoff SA, Reed FA, Ranciaro A, Voight BF, Babbitt CC, Silverman JS, *et al.* Convergent adaptation of human lactase persistence in Africa and Europe. *Nature Genet* 2007;39:31-40.
28. Woteki CE, Weser E, Young EA. Lactose malabsorption in Mexican-American children. *Am J Clin Nutr* 1976;29:19-24.
29. Paige DM, Bayless TM, Mellitis ED, Davis L. Lactose malabsorption in preschool black children. *Am J Clin Nutr* 1977;30:1018-22.
30. Sahi T. Genetics and epidemiology of adult-type hypolactasia. *Scand J Gastroenterol Supl* 1994;202:7-20.
31. Sevá-Pereira A. Malabsorção de lactose do adulto em população brasileira. [Tese de Doutorado]. Campinas (São Paulo): Faculdade de Ciências Médicas de Campinas (UNICAMP); 1981.
32. Sevá-Pereira A, Beiguelman B. Primary lactose malabsorption in healthy Brazilian adult caucasoid, negroid and mongoloid subjects. *Arq Gastroenterol* 1982;19:133-38.
33. Sevá-Pereira A, Magalhães AFN, Pereira Filho RA, Beiguelman B. Primary adult lactose malabsorption, a common genetic trait among Southeast Brazilians. *Rev Bras Genet* 1983;6:747-59.

34. Sparvoli AC. Malabsorção de lactose do adulto em uma população nordestina. [Tese de Mestrado]. Campinas (São Paulo): Faculdade de Ciências Médicas de Campinas (UNICAMP);1989.
35. Sparvoli AC. Malabsorção de lactose do adulto. Prevalência na população sulina. Aspectos genéticos e evolutivos de atividade da lactase. [Tese de Doutorado]. Campinas (São Paulo): Faculdade de Ciências Médicas de Campinas (UNICAMP); 1990.
36. Nichols BL, Dudley MA, Nichols VN, Putman M, Avery SE, Fraley JK, *et al.* Effects of malnutrition on expression and activity of lactase in children. *Gastroenterology* 1997;112:742-51.
37. Sandhu BK, Isolauri E, Walker-Smith JA, Banchini G, Van Caillie-Bertrand M, Dias JA, *et al.* A multicentre study on behalf of the European Society of Paediatric Gastroenterology and Nutrition Working Group and Acute Diarrhoea. Early feeding in childhood gastroenteritis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1997;24:522-7.
38. Sperotto G, Barison EM, Baldacci ER, Okay Y. Use of undiluted whole cow's milk is effective for the routine treatment of children with acute diarrhea and severe dehydration. *Arq Gastroenterol* 1998;35:132-7.

39. Farup PG, Monsbakken KW, Vandvik PO. Lactose malabsorption in a population with irritable bowel syndrome: prevalence and symptoms. A case-control study. *Scand J Gastroenterol* 2004;39:645-9.
40. Lima HS, Sevá-Pereira A. Aids, diarréia e malabsorção de lactose. *Rev Bras Med* 1992;49:411-22.
41. Tamm A. Management of lactose intolerance. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1994;202:55-63.
42. World Health Organization, International Working Group on Persistent Diarrhoea. Evaluation of an algorithm for the treatment of persistent diarrhea: a multicenter study. *Bull World Health Organ* 1996;74:479-89.
43. Jackson KA, Saviano DA. Lactose maldigestion, calcium intake and osteoporosis in African-, Asia-, and Hispanic-Americans. *J Am Coll Nutr* 2001;20(2 Supl):198-207.
44. Gremse DA, Greer AS, Vacik J, DiPalma JA. Abdominal pain associated with lactose ingestion in children with lactose intolerance. *Clin Pediatr (Phila)* 2003;42:341-5.
45. He T, Priebe MG, Harmsen HJ, Stellaard F, Sun X, Welling GW, *et al.* Colonic fermentation may play a role in lactose intolerance in humans. *J Nutr* 2006;136:58-63.

46. Pimentel M, Lin HC, Enayati P, van den Burg B, Lee HR, Chen JH, *et al.* Methane, a gas produced by enteric bacteria, slows intestinal transit and augments small intestinal contractile activity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;290:G1089-95.
47. Sibley E. Carbohydrate intolerance. *Curr Opin Gastroenterol* 2004;20:162-7.
48. Enattah NS, Sahi T, Savilahti E, Terwilliger JD, Peltonen L, Järvelä I. Identification of a variant associated with adult-type hypolactasia. *Nature Genet* 2002;30:233-7.
49. Chao CK, Sibley E. PCR-RFLP genotyping assay for a lactase persistence polymorphism upstream of the lactase-phlorizin hydrolase gene. *Genet Test* 2004;8(2):190-3.
50. Rasinperä H, Savilahti E, Enattah NS, Kuokkanen M, Tötterman N, Lindahl H, *et al.* A genetic test which can be used to diagnose adult-type hypolactasia in children. *Gut* 2004;53:1571-6.
51. Ridefelt P, Håkansson LD. Lactose intolerance: lactose tolerance test versus genotyping. *Scand J Gastroenterol* 2005;40(7):822-6.

52. Mattar R, Monteiro MS, Villares CA, dos Santos AF, Carrilho FJ. Single nucleotide polymorphism C/T₋₁₃₉₁₀, located upstream of the lactase gene, associated with adult-type hypolactasia: Validation for clinical practice. *Clin Biochem* 2008;41:628-30.
53. Kokkonen J, Haapalahti M, Tikkanen S, Karttunen R, Savilahti E. Gastrointestinal complaints and diagnosis in children: a population-based study. *Acta Paediatr* 2004;93:880-6.
54. Gupta SK, Chong SK, Fitzgerald JF. Disaccharidase activities in children: normal values and comparison based on symptoms and histologic changes. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1999;28:246-51.
55. Escoboza PM, Fernandes MI, Peres LC, Einerhand AW, Galvão LC. Adult-type hypolactasia: clinical, morphologic and functional characteristics in Brazilian patients at a university hospital. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2004;39:361-5.
56. Pereira AS, Magalhães AFN de, Pereira Filho RA. Teste de sobrecarga com lactose (TSL), no diagnóstico de malabsorção primária de lactose de adulto (MLA). *Rev Bras Patol Clin* 1982;18:1-6.
57. Pereira Filho D, Furlan SA. Prevalência de intolerância à lactose em função da faixa etária e do sexo: experiência do Laboratório Dona Francisca, Joinville (SC). *Health Env J* 2004;5:24-30.

58. Tarlow MJ, Thom H. A comparasion of stool fluid and stool dialysate obtained *in vivo*. Gut 1974;15:608-13.
59. Judd RH. Chronic nonspecific diarrhea. Pediatrics Rev 1996;17:379-84.
60. Pretto FM, Silveira TR, Menegaz V, de Oliveira J. Lactose malabsorption in children and adolescents: diagnosis through breath hydrogen test using cow milk. J Pediatr 2002;78:213-8.
61. Bernardes-Silva CF, Laudanna AA. Evidence of high breath H₂ gas excretion in IBS patients submitted to lactose tolerance test. Gastroenterology 2004;126(Supl 2):A-373.
62. Casellas F, Malagelada JR. Applicability of short hydrogen breath test for screening of lactose malabsorption. Dig Dis Sci 2003;48:1333-8.
63. Vernia P, Camillo MD, Marinaro V, Caprilli R. Effect of predominant methanogenic flora on the outcome of lactose breath test in irritable bowel syndrome patients. Eur J Clin Nutr 2003;57:1116-9.
64. Pimentel M, Kong Y, Park S. Breath testing to evaluate lactose intolerance in irritable bowel syndrome correlates with lactulose testing and may not reflect true lactose malabsorption. Am J Gastroenterol 2003;98:2700-4.

65. Nucera G, Gabrielli M, Lupascu A, Lauritano EC, Santoliquido A, Cremonini F, *et al.* Abnormal breath tests to lactose, fructose and sorbitol in irritable bowel syndrome may be explained by small intestinal bacterial overgrowth. *Aliment Pharmacol Ther* 2005;21:1391-5.
66. Vonk RJ, Lin Y, Koetse HA, Huang C, Zeng G, Elzinga H, *et al.* Lactose (mal) digestion evaluated by the ^{13}C -lactose digestion test. *Eur J Clin Invest* 2000;30:140-6.
67. Vonk RJ, Stellaard F, Priebe MG, Koetse HA, Hagedoorn RE, De Bruijn S, *et al.* The $^{13}\text{C}/\text{H}_2$ -glucose test for determination of small intestinal lactase activity. *Eur J Clin Invest* 2001;31:226-33.
68. Olds LC, Sibley E. Lactase persistence DNA variant enhances lactase promoter activity in vitro: functional role as a cis regulatory element. *Hum Molec Genet* 2003;12:2333-40.
69. Wang Y, Harvey CB, Hollox EJ, Phillips AD, Poulter M, Clay P, *et al.* The genetically programmed down-regulation of lactase in children. *Gastroenterology* 1998;114:1230-6.
70. Beja-Pereira A, Luikart G, England PR, Bradley DG, Jann OC, Bertorelle G, *et al.* Gene-culture coevolution between cattle milk protein genes and human lactase genes. *Nature Genet* 2003;35:311-3.

71. Swallow DM. Genetics of lactase persistence and lactose intolerance. *Annu Rev Genet* 2003;37:197-219.
72. Kuokkanen M, Enattah NS, Oksanen A, Savilahti E, Orpana A, Järvelä I. Transcriptional regulation of the lactase-phlorizin hydrolase gene by polymorphisms associated with adult-type hypolactasia. *Gut* 2003;52:647-52.
73. Troelsen JT, Olsen J, Moller J, Sjöström H. An upstream polymorphism associated with lactase persistence has increased enhancer activity. *Gastroenterology* 2003;125:1686-94.
74. Enattah NS, Trudeau A, Pimenoff V, Maiuri L, Auricchio S, Greco L, *et al.* Evidence of still-ongoing convergence evolution of the lactase persistence T(-13910) alleles in humans. *Am J Hum Genet* 2007;81:615-25.
75. Harvey CB, Wang Y, Darmoul D, Phillips AD, Mantei N, Swallow DM. Characterisation of a human homologue of a yeast cell division cycle gene, MCM6, located adjacent to the 5-prime end of the lactase gene on chromosome 2q21. *FEBS Lett* 1996;398:135-40.
76. Bernardes-Silva CF, Pereira AC, Mota GFA, Krieger JE, Laudanna AA. Lactase persistence/non-persistence variants, C/T-13910 and G/A-22018, as a diagnostic tool for lactose intolerance in IBS patients. *Clin Chim Acta* 2007;386:7-11.

77. Bulhões AC, Coldani HAS, Oliveira FS, Matte US, Mazzuca RB, Silveira TR. Correlation between lactose absorption and the C/T -13910 and G/A -22018 mutations of the lactase-phlorizin hydrolase (LCT) gene in adult-type hypolactasia. *Braz J Med Biol Res* 2007;40(11):1441-6.
78. Frye RE, Rivera-Hernandez DM, Borowitz S. Lactose intolerance. 2002; <http://www.emedicine.com>.
79. Mattar R, Monteiro MS, Villares CA, Santos AF, Silva JMK, Carrilho FJ. Frequency of LCT -13910 C<T single nucleotide polymorphism associated with adult-type hypolactasia/lactase persistence among Brazilians of different ethnic groups. *Nutrition J* 2009;8:46 doi: 10.1186/1475-2891-8-46.
80. Büning C, Genschel J, Jurga J, Fielder T, Voderholzer W, Fiedler EM, *et al*. Introducing genetic testing for adult-hypolactasia. *Digestion* 2005;71:245-50.
81. Krawczyk M, Wolska M, Schwartz S, Gruenhage F, Terjung B, Portincasa P, *et al*. Concordance of genetic and breath test for lactose intolerance in tertiary referral centre. *J Gastrointest Liver Dis* 2008;17:135-9.

82. Nagy D, Bogácsi-Szabó E, Várkonyi A, Csányi B, Czibula A, Bede O, *et al.* Prevalence of adult-type hypolactasia as diagnosed with genetic and lactose hydrogen breath tests in Hungarians. *Eur J Clin Nutr* 2009;63(7):909-12.
83. Högenauer C, Hammer HF, Mellitzer K, Renner W, Krejs GJ, Toplak H. Evaluation of a new DNA test compared with the lactose hydrogen breath test for the diagnosis of lactase non-persistence. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2005;17:371-6.
84. Uggioni PL, Fagundes RLM. Tratamento dietético da intolerância à lactose infantil: teor de lactose em alimentos. *Hig Aliment* 2006;21:24-9.
85. Black RE, Williams SM, Jones IE, Goulding A. Children who avoid drinking cow milk have low dietary calcium intakes and poor bone health. *Am J Clin Nutr* 2002;76:675-80.
86. Campbell AK, Matthews SB. Darwin's illness revealed. *Postgrad Med J* 2005;81:248-51.
87. Campbell AK. What Darwin missed. *Astrophys Space Sci* 2003;285:571-85.

7. ANEXOS

Anexo 1. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.



FACULDADE DE MEDICINA DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

Autarquia Estadual - Lei n.º 8899 de 27/09/94
(Reconhecida pelo Decreto Federal n.º 74.179 de 14/06/74)

Parecer n.º 061/2009

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O Protocolo n.º 2539/2009 sob a responsabilidade de Marta Alves da Silva Arroyo com o título "Perspectivas para triagem genética da intolerância à lactose: rastreamento do polimorfismo - 13910 C/T em neonatos" está de acordo com a resolução CNS 196/96 e foi aprovado por esse CEP.

Lembramos ao senhor(a) pesquisador(a) que, no cumprimento da Resolução 251/97, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) deverá receber relatórios semestrais sobre o andamento do Estudo, bem como a qualquer tempo e a critério do pesquisador nos casos de relevância, além do envio dos relatos de eventos adversos, com certeza para conhecimento deste Comitê. Salientamos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do Estudo.

São José do Rio Preto, 13 de abril de 2009.


Prof. Dr. Antonio Carlos Pires
Coordenador do CEP/FAMERP