

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**FACULDADE DE MEDICINA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA:**

**CIÊNCIAS EM GASTROENTEROLOGIA**

**ANÁLISE MOLECULAR DO GENE DA LACTASE-**

**FLORIZINA HIDROLASE EM INDIVÍDUOS**

**TOLERANTES E INTOLERANTES À LACTOSE**

**ANDRÉA CRISTINA DA SILVA BULHÕES**

Porto Alegre, março de 2006.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**FACULDADE DE MEDICINA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA:**

**CIÊNCIAS EM GASTROENTEROLOGIA**

**ANÁLISE MOLECULAR DO GENE DA LACTASE-FLORIZINA**

**HIDROLASE EM INDIVÍDUOS TOLERANTES E**

**INTOLERANTES À LACTOSE**

**ANDRÉA CRISTINA DA SILVA BULHÕES**

Orientadora: Profa. Dra. Themis Reverbel da Silveira

A apresentação desta dissertação é exigência do Programa de Pós-Graduação em Medicina: Gastroenterologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Porto Alegre, março de 2006.

*Para Eduardo e Rodrigo,*

*com todo o meu amor.*

## AGRADECIMENTOS

A todos os que, de alguma forma, colaboraram para a realização deste trabalho e em especial:

- À minha orientadora, **Profa. Dra. Themis Reverbel da Silveira**, pelo carinho, amizade e conhecimentos transmitidos durante a execução desta pesquisa.

- Às professoras colaboradoras: **Dra Helena Sueno Goldani e Dra Ursula Matte**, pelos ensinamentos e contribuição em todas as etapas desta pesquisa.

- Ao **CNPq** e ao **Fundo de Incentivo à Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre**, pelo apoio financeiro.

- À amiga bióloga **Fernanda Santos de Oliveira**, pelo afeto, disponibilidade e auxílio profissional no trabalho de laboratório.

- À **Profa Ceres de Oliveira**, pela assessoria na análise estatística.

- Ao acadêmico **Rafael Mazzuca**, pela ajuda na realização de todas as etapas deste trabalho.

- À amiga **Dra. Sandra Vieira**, pelo afeto e incentivo profissional.

- À amiga enfermeira **Bianca Vasconcellos Moura Bagnati**, pela ajuda e disponibilidade nas coletas de sangue.

- À colega e amiga **Alessandra Pizzato**, pelo carinho e incentivo inicial.

- Aos meus pais, **Otávio** (*in memoriam*) e **Vilma**, pelo amor e apoio constante.
- Ao meu marido, **Eduardo**, pelo amor, compreensão, apoio e inesgotável paciência.
- Ao meu filho, **Rodrigo**, a razão do meu viver.

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
1.1 – DIGESTÃO E ABSORÇÃO DE LACTOSE: ASPECTOS FISIOPATOLÓGICOS.....	16
1.2 – MÁ ABSORÇÃO DE LACTOSE, INTOLERÂNCIA À LACTOSE E HIPOLACTASIA .....	19
1.3 – CAUSAS DE HIPOLACTASIA .....	21
1.3.1 – <i>Deficiência Congênita de Lactase</i> .....	21
1.3.2 – <i>Deficiência Secundária de Lactose</i> .....	21
1.3.3 – <i>Hipolactasia Primária do Tipo Adulto</i> .....	23
1.4 – MÉTODOS DIAGNÓSTICOS .....	25
1.5 – INFLUÊNCIA DA ETNIA NA HIPOLACTASIA PRIMÁRIA DO TIPO ADULTO.....	34
1.6 – HIPÓTESES FORMULADAS PARA EXPLICAR A DIFERENÇA DA PREVALÊNCIA MUNDIAL DE HIPOLACTASIA .....	38
1.7 – POLIMORFISMOS ASSOCIADOS COM A HIPOLACTASIA DO TIPO ADULTO.....	39
<b>2 – JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>45</b>
<b>3 – OBJETIVOS .....</b>	<b>46</b>
3.1- OBJETIVO GERAL.....	46
3.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	46

<b>4- CASUÍSTICA E MÉTODOS .....</b>	<b>47</b>
4.1- DELINEAMENTO.....	47
4.2- POPULAÇÃO EM ESTUDO .....	47
4.3- AMOSTRA E AMOSTRAGEM .....	48
4.4- VARIÁVEIS ESTUDADAS .....	50
4.5- TÉCNICA DO TESTE DE HIDROGÊNIO EXPIRADO .....	52
4.6- TÉCNICA DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).....	55
4.7- LOGÍSTICA .....	56
4.8- ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	58
4.9- CONSIDERAÇÕES ÉTICAS .....	59
<b>5- RESULTADOS.....</b>	<b>61</b>
5.1 – CARACTERÍSTICAS DA AMOSTRA .....	61
5.2 – RESULTADOS DO TESTE DO HIDROGÊNIO EXPIRADO.....	64
5.3 – RESULTADOS DO TESTE MOLECULAR PARA AS MUTAÇÕES C/T E G/A.....	68
5.4 – CONCORDÂNCIA ENTRE TESTES MOLECULAR, H <sub>2</sub> EXPIRADO E SINTOMAS .....	71
<b>6 – DISCUSSÃO .....</b>	<b>74</b>
6.1 – CARACTERÍSTICAS GERAIS DO ESTUDO .....	74
6.2 – A PREVALÊNCIA DE HIPOLACTASIA PRIMÁRIA DO TIPO ADULTO AVALIADA ATRAVÉS DO TESTE DO HIDROGÊNIO EXPIRADO .....	75
6.3 – ANÁLISE MOLECULAR .....	80
<b>7 – CONCLUSÕES.....</b>	<b>84</b>
<b>8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>86</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>95</b>

ANEXO 1 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO .....	96
ANEXO 2 - RELAÇÃO DE GENÓTIPOS, FENÓTIPOS, RESULTADOS DO TESTE H2 E A PRESENÇA DE SINTOMAS DOS 20 INDIVÍDUOS DO ESTUDO .....	98
ANEXO 3 - NÍVEIS DE HIDROGÊNIO EXPIRADO NOS 9 INDIVÍDUOS COM TESTES POSITIVOS .....	100
ANEXO 4 - NÍVEIS DE HIDROGÊNIO EXPIRADO NOS 11 INDIVÍDUOS COM TESTES NEGATIVOS .....	101
ANEXO 5 - MOLECULAR ANALYSIS OF LACTASE-GLUCOSYLASE GENE IN BRAZILIAN SELF-REPORTED MILK TOLERANT AND INTOLERANT INDIVIDUALS .....	102



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Recipiente utilizado para coleta das amostras de ar expirado ..... 53
- Figura 2 - Comparação entre os níveis de H<sub>2</sub> expirado entre os grupos dos absorvedores e não absorvedores ..... 66
- Figura 3 - Nível de hidrogênio expirado (em ppm) na amostra ..... 67
- Figura 4 - Os produtos digeridos do PCR foram amplificados em gel de agarose a 2,5%.  
Linhas 1 e 9 mostram produtos de PCR não digeridos. Linhas 2 e 6 mostram indivíduos homozigotos para os genótipos de não-persistência de lactase CC<sub>13910</sub> e GG<sub>22018</sub>; 4 e 8 homozigotos para os genótipos de persistência de lactase TT<sub>13910</sub> e AA<sub>22018</sub>; 3 e 7 indivíduos heterozigotos para o genótipo de persistência de lactase CT<sub>13910</sub> e GA<sub>22018</sub>. O marcador de DNA com 50 pb está demonstrado na linha 5. .... 70
- Figura 5 - Representação esquemática dos resultados encontrados. .... 73

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1 - Características gerais dos indivíduos estudados.....	62
Tabela 2 - Sintomas apresentados pelos indivíduos auto-referidos intolerantes à lactose durante o teste do H <sub>2</sub> .....	63
Tabela 3 - Avaliação do teste de H <sub>2</sub> expirado.....	65
Tabela 4 - Distribuição dos genótipos na amostra.....	69
Tabela 5 - Concordância entre a análise molecular e os testes do hidrogênio e sintomas .....	72
Quadro 1 - Principais causas de deficiência secundária de lactase .....	22
Quadro 2 - Métodos para o diagnóstico de má absorção de lactose.....	26
Quadro 3 - Prevalência de má absorção de lactose do adulto no Brasil de acordo com as raças e as regiões estudadas.....	37

Quadro 4 - Frequência do fenótipo de hipolactasia em indivíduos finlandeses e não finlandeses .....	43
---	----

## RESUMO

**Objetivo:** Verificar a relação entre a presença das mutações C/T-13910 e G/A-22018 no gene da lactase-florizina hidrolase e a absorção de lactose em indivíduos residentes no município de Porto Alegre.

**Casística e Métodos:** Foi realizado um estudo transversal que incluiu 20 indivíduos adultos, sadios, com idade superior a 18 anos, procedentes do município de Porto Alegre. Os participantes foram classificados segundo o relato da quantidade de leite consumida, habitualmente, por dia e quanto à presença ou ausência de sintomas relacionados à ingestão de leite. A má absorção de lactose foi diagnosticada através do teste de hidrogênio expirado após a ingestão de 50 g de lactose diluída em solução aquosa a 20%. O teste teve duração de 3 horas e foi considerado positivo quando o aumento foi superior a 20 partes por milhão na concentração de H<sub>2</sub> em relação ao nível basal. Os voluntários também foram classificados como indivíduos com lactase persistente e lactase não persistente através da análise molecular dos dois polimorfismos (C/T-13910 e G/A-22018) responsáveis pela persistência ou não da Lactase Florizina Hidrolase no adulto pelo método da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

**Resultados:** Foram estudados 20 indivíduos com média de idade de  $32,7 \pm 7,3$  anos. 9/20 sujeitos apresentaram o genótipo CCGG – não persistência de lactase em concordância com o teste do hidrogênio expirado positivo. 11/20 indivíduos apresentaram o teste H<sub>2</sub> expirado negativo, sendo que 10/20 apresentaram genótipos de persistência de lactase (1/20 CTAA, 3/20 TTAA e 6/20 CTGA) e 1 sujeito com o genótipo de não persistência de lactase (CCGG). Obteve-se um coeficiente de concordância kappa = - 0,9 entre os testes, molecular e de H<sub>2</sub> expirado com  $p < 0,001$ .

**Conclusões:** Os resultados do trabalho permitem concluir que a análise dos polimorfismos C/T-13910 e G/A-22018 no gene da Lactase Florizina Hidrolase podem ser considerados um bom indicador para o diagnóstico de má absorção de lactose, visto que é um método bastante sensível e específico com ótima concordância com o teste de hidrogênio expirado.

## **ABSTRACT**

**Objective:** to verify the relation between the presence of mutations C/T–13910 and G/A–22018 in the gene of lactase-phlorizin hydrolase and the absorption of lactose in individuals who live in the city of Porto Alegre.

**Methods:** It consists of a transversal study which included 20 healthy adult individuals over eighteen years old, from the city of Porto Alegre. The participants were classified according to reports on the quantity of milk they habitually consumed per day and in regard to the presence or absence of symptoms related to lactose intolerance. Lactose malabsorption was diagnosed through the hydrogen breath test after the ingestion of 50g of lactose diluted in watery solution. The test lasted 3 hours and it was considered positive when the increase was higher than 20 parts per million on concentration of H<sub>2</sub> in relation to the basal level. The volunteers were also classified as individuals with persistent and non-persistent lactase through the analysis of the presence of both polyformisms (C/T–13910 and G/A–22018), which are responsible for the persistence or not of Lactase Phlorizin Hydrolase in adults. The analysis was made through the Polymerase Chain Reaction method (PCR).

**Results:** Twenty individuals were studied with mean age of  $32.7 \pm 7.3$  years. 9/20 subjects presented with the CCGG genotype – non-persistence of lactase accordingly to the positive hydrogen breath test (HBT). 11/20 individuals presented with negative HBT, whereas 10/20 presented with genotypes of lactase persistence (1/20 CTAA, 3/20 TTAA e 6/20 CTGA) and one subject with genotype of non-persistence of lactase (CCGG). An agreement coefficient kappa = - 0.9 was obtained between the molecular and the hydrogen breath test with  $p < 0,001$ .

**Conclusions:** This project results make it possible to conclude that the analysis of the polyformisms C/T–13910 and G/A–22018 in the gene of Lactase Phlorizin Hydrolase can be considered a good indicator for the diagnosis for lactose malabsorption, since it is a very sensible and specific method, as it was demonstrated in recent studies. It also has an excellent agreement with the expired hydrogen.

## INTRODUÇÃO

### 1.1 – Digestão e Absorção de Lactose: aspectos fisiopatológicos

A lactose (beta-galactosil-1-4-glicose) é um dissacarídeo que consiste em uma molécula de betagalactosidade aderida à glicose por uma ligação beta-1 → 4. É conhecida como o “açúcar do leite” e é produzida pela glândula mamária da maioria dos mamíferos (CHAMPE & HARLEY, 1997).

A lactose é sintetizada nas células epiteliais das glândulas mamárias mediante uma reação que depende de duas proteínas, a alfa-lactoalbumina e a enzima N-acetil-galactosil-transferase. Sua concentração no leite varia segundo a espécie, sendo de cerca de 7% no leite humano e de cerca de 5% no leite de vaca. O conteúdo de lactose do leite nas várias espécies é proporcional à atividade da alfa-lactoalbumina (NAIM *et al.*, 1987).

Durante o processo de digestão, a lactose é hidrolisada no intestino delgado em monossacarídeos: glicose e galactose. Esses produtos serão absorvidos através de transporte ativo dependente de sódio (ALLIET *et al.*, 1989). A hidrólise da lactose é feita por uma



betagalactosidase, conhecida como lactase; sua forma precursora é sintetizada pelo enterócito como uma proteína de alto peso molecular (215 kD) e após várias etapas de glicosilação e clivagem, a proteína precursora é transportada para a membrana microvilositária, na sua forma madura: lactase-florizina hidrolase, uma molécula com atividade hidrolítica e peso molecular de 130-160 kD (LEIS *et al.*, 1997; WALKER-SMITH, 1997). A lactase só se encontra na extremidade da vilosidade, sendo, portanto, muito vulnerável a lesões da mucosa (HEITLINGER & LEBENTHAL, 1988).

Nos seres humanos, a atividade da lactase é detectada por volta do terceiro mês de gestação, mas com valores muito baixos, só aumentando a partir da 26<sup>a</sup> semana. Na 34<sup>a</sup> semana atinge 30% dos valores do recém-nascido, aumenta rapidamente entre a 36<sup>a</sup> e 38<sup>a</sup> semanas, e ao termo os seus valores equivalem aos de uma criança de um ano de idade (MOBASSALECH *et al.*, 2003).

A lactase está presente em toda a extensão do intestino delgado, embora seus níveis sejam mais altos no jejuno proximal e mais baixos no duodeno e íleo distal. Mesmo em indivíduos aparentemente saudáveis, a atividade da lactase costuma ser a menor de todas as dissacaridases (AURICCHIO & TRONCONE, 2000).

A presença de lactose não hidrolisada no lúmen intestinal cria um gradiente osmótico em decorrência do qual há secreção de água e sódio no intestino delgado, com aceleração secundária do trânsito intestinal (CHRISTL *et al.*, 1992). No intestino grosso, o açúcar será fermentado pela ação de bactérias anaeróbias, produzindo ácidos orgânicos de cadeia curta, principalmente ácido acético, propiônico e butírico, além de liberar gases como hidrogênio, dióxido de carbono, nitrogênio e metano. A maior parte dos gases produzidos será eliminada como flatos, mas uma proporção será absorvida e eliminada pelos pulmões (KOETSE *et al.*,

2000). Os ácidos graxos de cadeia curta, em sua maioria, são absorvidos pelo cólon e metabolizados. O cólon tem capacidade para reabsorver água, eletrólitos e gases. Esse mecanismo de compensação colônica é, provavelmente, o fator mais importante na determinação dos sintomas e qualquer dano à mucosa pode limitar o mecanismo de compensação. Se a capacidade do cólon de absorver os ácidos de cadeia curta for excedida, há acidificação do meio, aumentando a carga osmolar e das contrações peristálticas do músculo circular do cólon. Os gases formados distendem as alças intestinais e conseqüentemente o abdômen, provocando desconforto, cólicas, meteorismo, flatulência e fezes espumantes. Neste caso, a diarréia é do tipo fermentativa com fezes aquosas, espumantes e ácidas (O'CONNOR *et al.*, 1999).

A hidrólise e a absorção de lactose são determinadas por vários fatores além da relação entre a atividade da lactase e a quantidade de lactose ingerida. O tipo de dieta deve ser considerado. Os produtos lácteos que possuem pouca lactose em sua composição são os que foram submetidos à fermentação por bactérias ou por fungos. No iogurte, 70% da lactose são fermentados em um dia e 90% em dois dias, sendo assim, quanto mais velho o iogurte, menos lactose ele possui e mais ácido é o sabor. No caso dos queijos, a fermentação da lactose por microorganismos produz ácidos, o que favorece a coagulação da proteína do leite, a caseína, e com o tempo há redução na quantidade de lactose (VESA *et al.*, 1996).

O papel do esvaziamento gástrico na absorção de lactose também pode ser evidenciado como um fator determinante, visto que mesmo indivíduos com níveis normais de lactase, mas que possuem um esvaziamento gástrico aumentado, podem apresentar sinais e sintomas decorrentes de má absorção por não haver tempo suficiente de contato entre o carboidrato e a lactase presente na mucosa intestinal (AROLA & TAMM, 1994).

Além do esvaziamento gástrico, o tempo de trânsito intestinal influencia as taxas de absorção. A aceleração do trânsito no intestino delgado pode dificultar a hidrólise e, conseqüentemente, diminuir a absorção de lactose.

A capacidade de fermentação pela microflora intestinal e os mecanismos de compensação colônica já comentados também devem ser considerados quando analisamos o metabolismo da lactose (AROLA & TAMM, 1994).

As diferenças na tolerância à lactose com a manifestação de sintomas mais graves ou mais amenos em relação à quantidade de leite ingerido por indivíduos com hipolactasia podem ser explicadas pelos fatores acima comentados.

## **1.2 – Má Absorção de Lactose, Intolerância à Lactose e Hipolactasia**

Os termos má absorção de lactose, intolerância à lactose e hipolactasia eram, muitas vezes, utilizados erroneamente como sinônimos. A sinonímia entre estas definições existia porque o diagnóstico da deficiência da enzima lactase era feito comumente por teste de sobrecarga com lactose, e não diretamente, por determinação da atividade enzimática na mucosa intestinal (AURICCHIO & TRONCONE, 2000).

A má absorção de lactose é a situação na qual ocorre uma falha nos mecanismos de digestão e absorção da lactose, podendo ser evidenciado através de exames laboratoriais, nem sempre estando associada com manifestações de sintomas clínicos. É a expressão clínica e

laboratorial da deficiência enzimática (WALKER-SMITH, 1997; AURICCHIO & TRONCONE, 2000).

Intolerância ao dissacarídeo é definida como a síndrome clínica provocada pela ingestão do mesmo. Assim, intolerância à lactose ou intolerância ao leite devem ser usados somente para indicar os sintomas e sinais gastrointestinais após a ingestão de, respectivamente, lactose e leite (WALKER-SMITH, 1997).

A deficiência de dissacaridase é caracterizada pela diminuição ou ausência da enzima na membrana microvilosa no enterócito. Essa denominação deve ser usada somente quando a atividade enzimática está diminuída. Geralmente causa a má absorção do dissacarídeo correspondente e conseqüentemente os sintomas de intolerância a este dissacarídeo. No caso da lactase, os termos hipolactasia e alactasia significam, respectivamente, deficiência e ausência de lactase. O diagnóstico da hipolactasia é feito através de biópsia no intestino delgado proximal com medida da atividade da lactase (SAHI, 1994a; WALKER-SMITH, 1997).

### **1.3 – Causas de Hipolactasia**

#### ***1.3.1 – Deficiência Congênita de Lactase***

A deficiência congênita de lactase é extremamente rara. Cerca de 40 casos foram relatados na literatura (AURICCHIO & TRONCONE, 2000). A doença foi descrita detalhadamente por SALVILAHTI *et al.* (1983) em estudo que incluiu 16 pacientes na Finlândia, que foram submetidos à biópsia jejunal para determinação da atividade da lactase.

O quadro clínico se caracteriza por uma diarreia grave, que começa nas primeiras horas ou dias de vida, assim que o recém-nascido recebe leite materno ou alguma fórmula contendo lactose. As fezes são ácidas, com grande quantidade de lactose. Vômitos não são comuns e o apetite inicialmente é mantido. A maior gravidade da diarreia determina uma perda significativa de nutrientes, levando a retardo de crescimento, desidratação e acidose.

#### ***1.3.2 – Deficiência Secundária de Lactose***

Esta situação ocorre devido a lesões na mucosa do intestino delgado. Várias doenças podem causar deficiência secundária de lactose (quadro 1). A localização das dissacaridases na membrana microvilosa das células epiteliais do intestino delgado faz com que essas

enzimas sejam afetadas por qualquer doença que danifique a membrana ou interfira com o metabolismo dos enterócitos. Por ser a mais superficial das dissacaridases, a lactase é a que mais precoce e frequentemente se altera (LÓPEZ *et al.*, 1996; MATTHEWS *et al.*, 2005).

**Quadro 1 - Principais causas de deficiência secundária de lactase**

<b>Causas de deficiência secundária de lactase</b>
Gastroenterite aguda e síndrome pós-enterite
Alergia à proteína do leite de vaca
Doença Celíaca
Giardíase
Desnutrição protéico-calórica
Síndromes de imunodeficiência
Ressecção extensa do intestino delgado
Fibrose cística
Doença inflamatória intestinal
Enteropatia associada à infecção pelo HIV

Fonte: VILLAKO & MAROOS, 1994; AURICCHIO & PITCHUMONI, 1994.

### ***1.3.3 – Hipolactasia Primária do Tipo Adulto***

Na grande maioria da população mundial, durante a infância e adolescência, o nível de lactase cai para 5% a 10% em relação ao nível encontrado ao nascimento. Este fenômeno, denominado hipolactasia primária do tipo adulto, é a forma mais comum de deficiência de dissacaridase determinada geneticamente.

O declínio nos níveis de lactase não é influenciado pela presença ou ausência de lactose na dieta. A atividade da lactase não é, portanto, induzida pela lactose ou por qualquer outro substrato presente na dieta (SAHI, 1994b). No entanto, nos indivíduos hipolactásicos que consomem lactose regularmente, pode haver uma diminuição da sintomatologia relacionada à má absorção desse dissacarídeo (JONHSON *et al.*, 1993b). Alguns autores argumentam que a melhora ocorre devido ao aumento nos mecanismos de compensação colônica e adaptação da flora intestinal (HERTZLER & SAVAIANO, 1996; WALKER-SMITH & MURCH, 1999). GILAT *et al.* (1972) demonstraram esse fato estudando 10 indivíduos adultos com teste de tolerância à lactose positivo e hipolactasia confirmada por biópsia jejunal. Esses indivíduos foram orientados a ingerir leite em quantidades crescentes até alcançarem, pelo menos, 1 litro por dia. No término do período de observação, que foi de 6 a 14 meses, os exames foram repetidos. Não houve modificação nos resultados da medida da lactase na biópsia, e somente um teste de tolerância foi negativo. Apesar de não ter havido indução enzimática, os participantes do estudo apresentaram uma melhora gradual dos sintomas de diarreia, flatulência e dor abdominal. Por outro lado, BRIET *et al.* (1997), em ensaio clínico duplo-cego, demonstraram que a melhora da sintomatologia, com uso continuado de lactose por determinado período, em indivíduos com intolerância a esse

carboidrato, pode ser devido a um efeito placebo. Os indivíduos que participaram do estudo, todos com má absorção e intolerância à lactose, foram randomizados para receber lactose ou sacarose por um período de duas semanas, juntamente com dieta isenta de lactose. No início e término do estudo, foram realizados o teste do hidrogênio expirado e a avaliação da sintomatologia após 50 g de lactose diluída em 250 ml de água. Além disso, foram coletadas amostras de fezes para medida de pH e atividade da betagalactosidase fecal. No início do estudo não houve diferença entre os grupos em relação aos parâmetros descritos. Em duas semanas, quando a avaliação foi repetida após a sobrecarga de lactose, o grupo que recebeu esse carboidrato apresentou aumento na betagalactosidase fecal e redução no pH e na excreção de hidrogênio. Houve também melhora significativa de todos os sinais e sintomas considerados. A melhora desse parâmetro, no entanto, foi semelhante nos dois grupos, o que demonstra que o efeito ocorreu independentemente da adaptação metabólica da flora colônica, que só foi observada no grupo que recebeu lactose.

A betagalactosidase, presente em indivíduos com hipolactasia primária do tipo adulto parece ser idêntica à enzima presente em adultos com níveis altos de atividade da lactase. Este fato é compatível com a hipótese de que a persistência de lactose na vida adulta se deve à síntese continuada da enzima do recém-nascido, a qual geralmente diminui nos primeiros anos de vida (AURICCHIO & TRONCONE, 2000).

A idade do início do declínio da atividade da lactase tem variações significativas em diferentes grupos étnicos. Como o declínio é progressivo durante a infância e adolescência, a prevalência de má absorção de lactose vai aumentando de acordo com a faixa etária considerada (LEIS *et al.*, 1997). O diagnóstico de má absorção de lactose também é



influenciado pela variação nas doses e formas de administração da lactose (GALVÃO *et al.*, 1995).

O quadro clínico associado com a hipolactasia primária do tipo adulto pode variar desde uma simples sensação de desconforto abdominal até sua forma máxima de expressão, como náuseas, vômitos, flatulência, distensão abdominal, cólicas e diarreia. Vale a pena ressaltar que a intensidade dos sintomas nem sempre está correlacionada com o grau de deficiência enzimática, nem mesmo com a quantidade do carboidrato ingerido (FAGUNDES NETO, 1991). Muitos indivíduos com hipolactasia primária do tipo adulto toleram a ingestão de leite e derivados em quantidades moderadas sem o desenvolvimento de sintomatologia significativa (JONHSON *et al.*, 1993a; SUAREZ *et al.*, 1995; VESA *et al.*, 1996).

#### **1.4 – Métodos Diagnósticos**

Existem vários métodos para o diagnóstico de má absorção de lactose (quadro 2), cada um com suas particularidades, havendo autores que consideram não existir um padrão-ouro, o que dificulta a avaliação da validade dos testes (BRUMMER *et al.*, 1993).

**Quadro 2 - Métodos para o diagnóstico de má absorção de lactose**

<b>Métodos de Diagnóstico</b>
Teste do pH fecal
Pesquisa de substâncias redutoras nas fezes
Teste de tolerância à lactose
Teste de tolerância à lactose com etanol
Teste respiratório com <sup>14</sup> C-lactose
Teste respiratório com <sup>13</sup> C-lactose
Teste do hidrogênio expirado
Biópsia intestinal e medida da atividade da lactase

Fonte: BRUMMER *et al.*, 1993.

- **Teste do pH fecal e pesquisa de substâncias redutoras nas fezes**

Os testes fecais são exames não invasivos, relativamente sensíveis e utilizados para triagem. O emprego do clinitest para pesquisa de substâncias redutoras nas fezes foi desenvolvido por KERRY & ANDERSON (1964) e tem sido muito utilizado desde então. A presença de excesso de substâncias redutoras (mais de 0,5%) é a maneira mais simples de se diagnosticar má absorção de açúcares. A técnica da coleta é muito importante, pois as fezes devem ser analisadas frescas ou armazenadas no congelador até análise (HEITLINGER & LEBENTHAL, 1998). Este exame é considerado muito bom para crianças pequenas, mas para

adultos podem ocorrer resultados falso-negativos se a flora do cólon consumir o açúcar (TARLOW & THOM, 1974).

Em condições normais, o pH fecal mostra valores em torno de 7. Para que haja redução do mesmo é necessário que a flora do cólon seja capaz de fermentar um substrato transformando-o em ácidos. O pH menor ou igual a 5, 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, 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 a antibioticoterapia anterior, ou se a pesquisa não foi feita com fezes frescas, pois os ácidos podem volatilizar-se (TARLOW & THOM, 1974).

- **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 em comparação com os testes citados anteriormente e, é amplamente utilizado para o diagnóstico de má absorção de lactose em adultos (BULLER *et al.*, 1991). A glicemia é dosada no sangue venoso em jejum e a cada 30 minutos, até duas horas, após a sobrecarga de 50g de lactose diluída em solução aquosa (NEWCOMER & Mc GILL., 1966a).

A interpretação da curva glicêmica é baseada na diferença entre a glicemia do jejum e seu pico máximo. Se for menor que 20 mg/dl, a curva glicêmica é chamada plana e significa

má absorção de lactose (PEREIRA *et al.*, 1982); aumento da glicemia igual ou superior a 20 mg/dl em relação ao jejum é considerado um resultado normal pela maioria dos autores (ALLIET *et al.*, 1989; BULLER *et al.*, 1991; BRUMER *et al.*, 1993). Sintomas como diarreia e dor abdominal após a administração da sobrecarga de lactose indicam intolerância a esse carboidrato. O exame é simples, mas sua sensibilidade e especificidade são questionáveis devido a variações nas taxas de esvaziamento gástrico e ao metabolismo da glicose (BRUMMER *et al.*, 1993). Resultados discutíveis podem acontecer em várias situações, tais como má absorção primária ou secundária de monossacarídeos, esvaziamento gástrico demorado, síndrome da alça cega e diarreia (PEREIRA *et al.*, 1982).

- **Teste de tolerância à lactose com etanol**

Este teste consiste na concentração de galactose no sangue após uma sobrecarga de lactose. É realizada apenas uma coleta de sangue após 40 minutos da ingestão de lactose. A galactose também pode ser medida na urina. No entanto, deve-se administrar etanol (150 mg/kg) para inibir o rápido metabolismo hepático da galactose, o que limita a utilização deste teste (AROLA *et al.*, 1988).

- **Teste respiratório com  $^{14}\text{C}$ -lactose**

O teste envolve a administração de lactose marcada com  $^{14}\text{C}$  e reflete a atividade da lactase e a subsequente absorção e metabolismo da glicose. A lactase presente no intestino age sobre o substrato  $^{14}\text{C}$ -lactose, com a liberação de  $^{14}\text{CO}_2$ . A porcentagem de  $^{14}\text{CO}_2$  excretada na primeira hora após a administração de  $^{14}\text{C}$ -lactose discrimina os absorvedores dos não-absorvedores de lactose (HIELE *et al.*, 1988). Porém, enzimas bacterianas podem converter  $^{14}\text{C}$ -lactose em  $^{14}\text{CO}_2$ . Neste caso, quando a lactose não absorvida chegar ao cólon, haverá produção de  $^{14}\text{CO}_2$ , ocasionando falsos resultados. Além disso, distúrbios do metabolismo da glicose também podem interferir no resultado do exame (AROLA, 1994).

Esta técnica envolve exposição a uma substância radioativa e não é mais recomendada, uma vez que existem outros métodos diagnósticos mais seguros (AROLA, 1994).

- **Teste respiratório com  $^{13}\text{C}$ -lactose**

O exame é semelhante ao teste com  $^{14}\text{C}$ -lactose, tendo como vantagem a utilização de um isótopo não radioativo do carbono ( $^{13}\text{C}$ ). A excreção cumulativa do  $^{13}\text{CO}_2$  quatro horas após a ingestão de  $^{13}\text{C}$ -lactose é medida através de espectrometria e é utilizada para o diagnóstico da má absorção de lactose (STELLAARD & GEYPENS, 1998).

KOETSE *et al.* (2000) em um estudo comparativo entre os testes respiratórios com este marcador ( $^{13}\text{C}$ -lactose) e o hidrogênio expirado, usando a medida de atividade da lactase como padrão áureo para diagnosticar má absorção deste dissacarídeo, verificaram resultados

discrepantes em 36% dos casos entre os testes respiratórios. A variação na produção colônica de CO<sub>2</sub> com o uso do marcador <sup>13</sup>C-lactose pode ter sido uma das causas de diagnósticos inadequados de má absorção de lactose. Outros fatores, além da digestão e absorção dos nutrientes, podem influenciar este exame, devendo-se ter cautela na interpretação dos resultados. Além disso, a necessidade de equipamentos de alto custo torna sua aplicação clínica limitada (VONK *et al.*, 1998).

- **Teste do hidrogênio expirado**

Atualmente, na clínica, o teste do hidrogênio expirado tem sido considerado como padrão áureo para diagnóstico de má absorção de lactose. O exame é baseado na determinação da concentração de hidrogênio em amostras de ar expirado após a administração de lactose (CASELLAS & MALAGELADA, 2003).

O teste do hidrogênio expirado é considerado um teste de fácil aplicabilidade e não invasivo. Baseia-se na fermentação bacteriana do açúcar não absorvido pelo intestino delgado, levando ao aparecimento de ácidos orgânicos e gases, como o hidrogênio. A elevação deste último no ar expirado indica a má absorção do carboidrato (BALLABRIGA *et al.*, 1998).

As células dos mamíferos não produzem hidrogênio no seu metabolismo, logo 100% da produção deste gás são devidos à utilização de substratos fermentáveis por bactérias intestinais, sendo em torno de 10% a 21% do H<sub>2</sub> produzido excretado pelos pulmões. Para essa produção é necessária a presença de grande quantidade de bactérias, e normalmente isso

ocorre no cólon ou, excepcionalmente no intestino delgado, quando ocorre supercrescimento bacteriano (AROLA *et al.*, 1988).

Há relação direta entre a produção intestinal de H<sub>2</sub> e sua excreção pulmonar, podendo a medida de concentração do H<sub>2</sub> expirado ser realizada como indicadora da produção de H<sub>2</sub> no intestino. Em adultos, o pico da concentração de H<sub>2</sub> expirado ocorre em 120 minutos após a ingestão do carboidrato. Valores altos de H<sub>2</sub> expirado, duas horas após a ingestão de lactose são compatíveis com o diagnóstico de má absorção de lactose (DAVIDSON & BUTLER, 2000).

A primeira coleta de ar expirado, em adultos, deve ser em jejum de 8 a 12 horas. Após a administração de lactose, são feitas coletas em intervalos de 30 a 60 minutos por 2 a 6 horas. A má absorção de lactose é diagnosticada quando ocorre um aumento igual ou superior a 20 partes por milhão (ppm) acima do nível basal (ROMAGNUOLO *et al.*, 2002).

A quantidade de carboidrato utilizada em adultos não é padronizada (ROMAGNUOLO *et al.*, 2002). Em estudos recentes a dose de lactose utilizada é de 50g de lactose, quantidade de carboidrato equivalente a 1 litro de leite, diluída em água (BÜNING *et al.*, 2005; HÖGENAUER *et al.*, 2005). Estudos anteriores, comparando o teste do hidrogênio expirado com biópsia intestinal, considerado o padrão áureo para diagnóstico de má absorção de lactose, utilizaram uma sobrecarga de 50g de lactose diluída em solução aquosa e verificaram uma variação na sensibilidade de 69% a 100% e especificidade de 96% a 100% no teste de hidrogênio expirado (AROLA *et al.*, 1988; NEWCOMER *et al.*, 1975). O teste de hidrogênio expirado pode detectar até 2g de lactose não absorvida (LEIS *et al.*, 1997).

As amostras de ar expirado devem ser armazenadas em locais apropriados até que sejam analisadas para que não haja alterações na concentração de hidrogênio. Para um período maior de armazenamento ou mesmo, a necessidade de transportar as amostras de ar alveolar, devem ser utilizados recipientes de plástico laminado específicos, nos quais as amostras podem permanecer por até três semanas (AROLA, 1994).

A determinação da concentração de hidrogênio nas amostras de ar expirado é realizada por cromatografia gasosa (HAMMER *et al.*, 1996). Os critérios para interpretação do teste do hidrogênio expirado no diagnóstico de má absorção de lactose podem variar segundo os diferentes autores. O exame, porém, está sempre baseado na comparação do valor basal de hidrogênio expirado, geralmente obtido da amostra em jejum, com os valores subseqüentes à administração de lactose (PERMAN *et al.*, 1984). Em alguns casos, os níveis de hidrogênio em jejum estão aumentados, o que pode significar supercrescimento bacteriano, estase intestinal, refeição muito rica em carboidrato na noite anterior ou jejum inadequado (STROCCHI *et al.*, 1988; RIORDAN *et al.*, 2000).

Resultados falsamente negativos ocorrem quando a flora bacteriana do cólon não é produtora de hidrogênio, quando a microbiota intestinal está reduzida por uso de alguns antibióticos, ou por limpeza do cólon com o uso de enemas e laxativos ou por pH ácido do cólon, quando a flora bacteriana intestinal consome o hidrogênio, esvaziamento gástrico diminuído por refeição rica em gorduras, trânsito intestinal aumentado por diarreia e alterações no padrão ventilatório por taquipnéia (SEVÁ-PEREIRA *et al.*, 1999).

Resultados falsamente positivos ocorrem quando há um aumento na população bacteriana produtora de hidrogênio do cólon podendo causar pico precoce 20 a 30 minutos após a ingestão do carboidrato, alteração na motilidade do tubo digestivo com aumento do



trânsito intestinal no intestino delgado e maior o tempo de estase dos conteúdos alimentares no cólon (pacientes com gastrectomias ou uso de medicações procinéticas), alteração no padrão ventilatório (pacientes com hipoventilação) e fumantes, visto que a fumaça do cigarro contém hidrogênio (SEVÁ-PEREIRA *et al.*, 1999; FLATZ *et al.*, 1984).

- **Biópsia intestinal e medida da atividade da lactase**

A biópsia intestinal propicia a dosagem bioquímica da atividade da enzima ou a dosagem semiquantitativa através da histoquímica na mucosa intestinal. Os dois métodos foram padronizados por Dahlqvist em 1970 (SEVÁ-PEREIRA, 1982). Este método proporciona uma medida direta da atividade da lactase no intestino delgado. É, no entanto, um exame invasivo e necessita exposição à radiação (NEWCOMER & MC GILL, 1966a).

Geralmente são obtidas biópsias da mucosa, no ligamento de Treitz, por instrumentos posicionados com controle fluoroscópico. Nos últimos anos, a biópsia jejunal tem sido substituída pela duodenal, obtida por endoscopia (GUPTA *et al.*, 1999; AURICCHIO & TRONCONE, 2000).

As atividades da lactase e da sucrase são determinadas de acordo com o método de Dahlqvist e expressas em unidades por grama de tecido homogeneizado ou por grama de proteína. Embora não exista consenso sobre a definição de hipolactasia, atividade da lactase abaixo de 2 U/g de mucosa ou de 5 U/g de proteína é considerada hipolactasia pela maioria dos autores (NEWCOMER & MC GILL, 1966b; BRUMMER *et al.*, 1993). Mais recentemente, um nível de 8-13 U/g de proteína tem sido proposto como diagnóstico

(WELSH *et al.*, 1978; HIELE *et al.*, 1988). A relação lactase/sucrase inferior a 0,3 também é indicativa de hipolactasia (BRUMMER *et al.*, 1993).

Apesar da vantagem de ser um método direto, este exame pode apresentar falhas no diagnóstico de má absorção de lactose, uma vez que a atividade da lactase pode ser variável nas diferentes porções do intestino delgado (SEVÁ-PEREIRA *et al.*, 1999). Além disso, a má absorção de lactose pode ocorrer por outros fatores que não a deficiência enzimática, como é o caso de uma aceleração do trânsito no intestino delgado. Outro fator a ser considerado é que na biópsia intestinal não podemos identificar a presença de sintomas após a ingestão de lactose durante o procedimento, dificultando assim, o diagnóstico de intolerância à lactose (HÖGENAUER *et al.*, 2005).

### **1.5 – Influência da Etnia na Hipolactasia Primária do Tipo Adulto**

Os indivíduos podem ser divididos em três grupos quanto à prevalência de má absorção de lactose no adulto: o grupo de alta prevalência (60 a 100%), que corresponde aos maus absorvedores; o grupo de baixa prevalência (0 a 30%), que corresponde aos absorvedores; e o grupo de prevalência intermediária (30 a 60%). Esta distribuição foi realizada através de uma revisão da prevalência de má absorção de lactose do adulto em muitas populações e somente foram reunidos os dados a respeito de indivíduos saudáveis, sem doenças, sem desnutrição e com mucosa intestinal normal à histologia, portanto, sem causas

de deficiência secundária de lactase (SEVÁ-PEREIRA *et al.*, 1982; FLATZ, 1987; FLATZ *et al.*, 2000).

De acordo com SAHI. (1994b) a hipolactasia primária do tipo adulto afeta 75% da população mundial com grandes diferenças regionais em um mesmo país e prevalências epidemiológicas discrepantes em diferentes países e continentes. Em alguns países asiáticos a prevalência de hipolactasia chega a 100% na população, enquanto que no norte da Europa a prevalência é de apenas 2%. Na Alemanha foi observado uma prevalência de hipolactasia do tipo adulto de 15% e de 25% nos Estados Unidos da América (SAHI, 1994b).

A má absorção de lactose é o fenótipo predominante nas populações nativas da Austrália, Oceania, leste e sudeste da Ásia, África tropical e Américas. Existem dois grupos populacionais distintos nos quais os indivíduos mantêm a atividade da lactase na vida adulta: habitantes dos países do norte e região central da Europa e povos nômades das zonas áridas do norte da África e Arábia (AURICCHIO & TRONCONE, 2000). A miscigenação entre populações com alta e baixa frequência de má absorção de lactose, faz com que haja locais com frequências intermediárias dos dois fenótipos.

Em geral, os povos com alta prevalência de má absorção de lactose do adulto são os que têm tradição agrícola e caçadora, que nunca beberam leite, ou que passaram a ingeri-lo há poucos milhares de anos. São os esquimós, índios das Américas, a maioria dos africanos, dos povos do Oriente Médio e da Ásia e, seus descendentes. Neste grupo também estão incluídos grande parte dos judeus e dos árabes que ingerem leite desde a antiguidade, mas em forma de produtos lácteos fermentados, e, portanto, pobres em lactose. A baixa prevalência ocorre naqueles que têm tradição pastoril, e têm consumido leite e produtos ricos em lactose por longo período, que viveram este tempo sob pressões dietéticas, e também seus descendentes.

São alguns africanos de origem hamita, europeus do Norte e Centro e alguns indianos e árabes. Os grupos com prevalência intermediária são aqueles mestiços dos anteriores: africanos mestiços de bantos e hamitas, mestiços de europeus com orientais e com índios (BEIGUELMAN, SEVÁ-PEREIRA & SPARVOLI, 1992; HOLDEN & MACE, 1997; FLATZ *at al.*, 2000; HOLLOX *et al.*, 2001).

Existem poucos estudos realizados no Brasil para identificar a prevalência de hipolactasia do tipo adulto e os métodos de diagnóstico de má absorção de lactose utilizados foram diferentes, o que torna difícil chegar a um consenso sobre a real prevalência. Estima-se que na população brasileira, a frequência de hipolactasia primária do tipo adulto é aproximadamente 50% nos caucasóides, 85% nos negróides e 100% nos orientais. Estes dados variam de acordo com a região estudada e com o grau de miscigenação. Estudos realizados em brasileiros adultos saudáveis e sem deficiência secundária de lactase, nascidos em três regiões do Brasil (Sudeste, Sul e Nordeste) demonstraram os resultados descritos no quadro 3. No Nordeste, onde a miscigenação é muito intensa, os indivíduos são considerados triíbridos (negróides x portugueses x índios), no Sul há pequena mistura racial (influência italiana, portuguesa, germânica) e no Sudeste, a mistura racial é média. (SEVÁ-PEREIRA & BEIGUELMAN, 1982; SPARVOLI, 1990).

**Quadro 3** - Prevalência de má absorção de lactose do adulto no Brasil de acordo com as raças e as regiões estudadas

<b>Região</b>	<b>Sudeste</b>	<b>Sul</b>	<b>Nordeste</b>
<b>Raça</b>	<b>(%)</b>	<b>(%)</b>	<b>(%)</b>
Caucasóides	45	46	
Negróides	85	73	
Mongolóides	100		
Triíbridos			76

Fonte: SEVÁ-PEREIRA & BEIGUELMAN, 1982; SPARVOLI, 1990.

Estudo recente realizado em São Paulo, com 115 indivíduos adultos com suspeita de má absorção de lactose foram submetidos à endoscopia e, a análise inunohistoquímica demonstrou uma prevalência de 60,8% de hipolactasia do tipo adulto, sendo 53,2% nos indivíduos brancos e 91,3% nos sujeitos não-brancos (ESCOBOZA *et al.*, 2004).

GARRIDO *et al.* (1976) em estudo envolvendo 30 pacientes submetidos à cirurgia por úlcera duodenal em São Paulo, verificou a atividade de dissacaridases (maltase, sacarase e lactase), obtendo uma prevalência de má absorção de lactase de 73,3% no grupo estudado. Outros estudos realizados no Brasil, em populações pediátricas, utilizando método indireto para diagnosticar má absorção de lactose (teste do hidrogênio expirado), obtiveram prevalências diferentes entre os estados. REIS *et al.* (1999) em estudo feito em São Paulo com 83 crianças e adolescentes com idade entre 7 a 15 anos, obteve uma prevalência de 22,9% de má absorção de lactose. FIGUEIREDO *et al.* (2000) em Minas Gerais estudou 435 crianças e

adolescentes na mesma faixa etária do estudo anterior, obteve uma prevalência de 49,2% de má absorção. PRETTO *et al.* (2002) em Porto Alegre, estudou 225 escolares entre 8 e 18 anos de idade e verificou uma prevalência de 8,4% de má absorção de lactose, sendo 15,5% em indivíduos de cor não-branca e 5,2% em crianças e adolescentes de cor branca.

### **1.6 – Hipóteses Formuladas para Explicar a Diferença da Prevalência Mundial de Hipolactasia**

A teoria denominada histórico-cultural postula que a domesticação de animais leiteiros no período neolítico, há cerca de 9000 anos atrás, resultou em uma vantagem seletiva dos indivíduos que podiam satisfazer uma proporção maior de suas necessidades nutricionais, principalmente protéicas, pela disponibilidade de leite como fonte alimentar. Para estas comunidades pastoris, principalmente do Norte e Nordeste da Europa, onde havia escassez de alimentos diversificados e temperaturas extremamente baixas, a inclusão do leite na ração alimentar, propiciaria a estes povos primitivos uma maior resistência. A conseqüente modificação no contexto alimentar destas populações, teria exercido uma pressão seletiva para aquisição e propagação de uma mutação dominante, responsável pela persistência da atividade da lactase na vida adulta. Os indivíduos com essa mutação seriam beneficiados nutricionalmente pelo consumo de leite, sem apresentar sintomatologia relacionada com a má absorção de lactose. Se tal fato conferisse vantagens para a sobrevivência desses indivíduos, a proporção dos genótipos relacionados com a persistência de lactase tenderia a aumentar nessas populações (FLATZ *at al.*, 2000). De fato, estudos demonstraram que áreas com

tradição na criação de gado e consumo de leite apresentam taxas menores de hipolactasia (KRETCHMER *et al.*, 1971). Para explicar a baixa prevalência de hipolactasia no norte da Europa, surgiu outra hipótese, baseada no efeito da lactose sobre a absorção intestinal de cálcio. Nessa região, a prevalência de deformidades ósseas, raquitismo e osteomalácia era bastante alta em razão da pouca irradiação solar. Considerando que a lactose aumenta a absorção de cálcio, os indivíduos com persistência da lactase apresentariam menor incidência de complicações ósseas e maior sobrevivência, havendo assim, uma seleção natural favorecendo esse fenótipo (FLATZ *et al.*, 2000).

### **1.7 – Polimorfismos associados com a Hipolactasia do tipo Adulto**

A enzima intestinal lactase ou lactase florizina hidrolase (LPH) é codificada pelo gene LCT localizado no cromossomo 2 (AROLA & TAMM, 1994). Sua persistência na vida adulta tem herança autossômica dominante, enquanto que a hipolactasia é herdada de forma autossômica recessiva (SAHI, 1974; SAHI & LAUNIALA, 1977; LISKER, 1996). Os indivíduos homo ou heterozigotos para o alelo dominante são os absorvedores de lactose, e os não-absorvedores são homozigotos para o alelo autossômico recessivo.

Por muitos anos, foi sugerido que um polimorfismo genético no gene LCT fosse responsável pela determinação dos níveis altos da enzima na vida adulta e, conseqüentemente, tolerância à lactose (HARVEY *et al.*, 1998). Mutações são qualquer alteração do DNA, independente do seu efeito no fenótipo, enquanto que polimorfismo é o nome dado a

variações que apresentam uma frequência de pelo menos 95% na população. Polimorfismos em nucleotídeos únicos (SNPs), são mutações de pontos na sequência do genoma onde uma fração da população possui um nucleotídeo, enquanto outra grande fração possui outro nucleotídeo (STONEKING *et al.*, 2004). No caso da lactose, uma mutação com alta frequência em algumas populações, portanto um polimorfismo, seria responsável pelos diferentes fenótipos: absorvedores e não absorvedores de lactose.

MAIURI *et al.* (1991) demonstraram, através da utilização de anticorpos monoclonais que em indivíduos com persistência de níveis altos de atividade de lactase na vida adulta, a enzima se distribuiu uniformemente em todos os enterócitos das vilosidades. Por outro lado, em indivíduos com hipolactasia primária do tipo adulto, ocorrem duas situações: em alguns indivíduos a lactase não foi detectada, enquanto em outros se demonstrou um padrão tipo mosaico, com alguns enterócitos expressando lactase, circundados por áreas em que não havia evidências da presença da enzima.

Em estudo posterior, MAIURI *et al.* (1994) compararam a distribuição do RNA mensageiro (RNAm), da lactase e da atividade dessa enzima em tecidos obtidos de indivíduos com persistência da atividade da lactase e com hipolactasia. Nos indivíduos com persistência da atividade enzimática, o RNAm foi detectado uniformemente no citoplasma de todos os enterócitos dos vilos estudados. A presença da enzima e sua atividade também foram demonstradas na membrana da borda em escova desses indivíduos. Nos com hipolactasia, foram encontrados vários tipos de enterócitos em um mesmo vilos: enterócitos sem RNAm; com RNAm e sem lactase; com RNAm e lactase mas sem atividade hidrolítica e com RNAm, lactase e atividade hidrolítica. Como os diferentes fenótipos podem ser encontrados na mesma vilosidade, os autores concluíram que o controle da expressão da lactase nos enterócitos é



complexo e ocorre através de vários mecanismos. A existência de diferenças entre as células de um mesmo vilão de um indivíduo sugere que a expressão da lactase pode estar comprometida em vários estágios. A mutação dominante que leva à persistência da lactase em adultos, por algum mecanismo altera essa heterogeneidade. Muitos polimorfismos de nucleotídeos (SNPs) tem sido descritos no gene da LCT em diferentes regiões (HOLLOX *et al.*, 2001; SWALLOW, 2003).

Em um estudo recente foram descritos 2 polimorfismos (SNPs) fortemente associados com a hipolactasia primária do tipo adulto. Um nucleotídeo C na posição -13910 (C<sub>-13910</sub>) no gene da LCT é 100% associado com a não persistência da lactase e um nucleotídeo G na posição - 22018 (G<sub>-22018</sub>) é associada em mais de 95% com a não persistência da enzima em adultos finlandeses. As variantes T-13910 e A-22018 estão associadas com a persistência da enzima lactase em adultos (ENATTAH *et al.*, 2002). Os autores realizaram um estudo em 9 famílias finlandesas (n = 236) usando 7 marcadores em uma região de 200 kb. O marcador D2S2196 definiu uma região crítica de 47 kb, localizada na região 5' do gene da lactase (LCT). O único gene nesta região é o MCM6, um fator de replicação celular. Não foram observadas variações na região codificante deste gene. Utilizando 43 SNPs os autores identificaram duas mutações com co-segregação completa nas famílias: C/T-13910 e G/A-22018. Todos os indivíduos não persistentes de lactase eram homocigotos CC/GG. As alterações C/T-13910 e G/A-22018 estão localizadas nos introns 13 e 9 do gene MCM6, respectivamente, e os números correspondem à distância do códon de iniciação do gene da lactase. Portanto, estas alterações estão na região promotora do gene LCT, ou seja, a região que controla a expressão enzimática.

Em estudo posterior, ENATTAH *et al.* (2002) analisaram a presença dessas alterações em 196 DNAs de biópsias de intestino, assim distribuídas com os respectivos resultados: 59 indivíduos sem atividade de LPH (53 sujeitos com genótipo CC/GG e 6 com o genótipo CC/GA) e 137 indivíduos com atividade de LPH (74 sujeitos com o genótipo TT/AA e 63 CT/GA). Analisaram ainda a frequência dos genótipos em 40 indivíduos não finlandeses sem atividade de LPH, sendo 23 coreanos, 9 italianos e 8 alemães. Todos foram homozigotos CC/GG, exceto um italiano que era CC/GA. Finalmente, compararam as frequências destas mutações em 938 finlandeses e 205 não finlandeses, sendo que os valores encontrados eram todos compatíveis com os dados epidemiológicos de persistência e não persistência de LPH nas populações estudadas. Os resultados obtidos no estudo estão descritos no quadro 4. Desta forma, demonstraram a associação das mutações C/T-13910 e G/A-22018, especialmente a primeira, com a persistência da atividade da lactase (LPH) na vida adulta.

**Quadro 4** - Frequência do fenótipo de hipolactasia em indivíduos finlandeses e não finlandeses

<b>Nacionalidade</b>	<b>Genótipo</b>	<b>Fenótipo</b>	<b>n (%)</b>
Finlandesa	CC	não persistência de lactase	169 (18)
Francesa	CC	não persistência de lactase	17 (41,2)
Norte-americanos	CC	não persistência de lactase	92 (7,6)
Afro-americanos	CC	não persistência de lactase	96 (79,2)

Fonte: ENATTAH *et al.* (2002)

KUOKKANEN *et al.* (2003) analisaram 52 pacientes com sintomas gastrointestinais associados à má absorção de lactose. Os pacientes foram submetidos a duas biópsias duodenais por endoscopia, evidenciando vilosidades normais, logo descartando deficiência secundária de lactase. Mediram os níveis de atividade de lactase e sucrase e, também analisaram o DNA de sangue periférico para a determinação das mutações. Os resultados obtidos demonstraram que os indivíduos com o genótipo CC/GG não apresentaram atividade de LPH e os indivíduos com os genótipos CT/GA e TT/AA apresentaram atividade

enzimática normal. Nos indivíduos heterozigotos C/T, os autores utilizaram outros marcadores na região codificante do gene, que 92% dos RNAm correspondiam ao alelo T. Dessa forma, demonstraram que o polimorfismo está associado diretamente ao controle da expressão gênica da enzima.

OLDS & SIBLEY. (2004) investigaram o mecanismo pelo qual ocorre o controle da expressão gênica em uma linhagem de enterócitos (células Caco-2) e verificaram que o promotor T é mais expresso que o promotor C, mas que não há diferença entre as variantes G e A. Observaram maior interação do promotor T com fatores de transcrição, mas não com o elemento AP2 que havia sido anteriormente sugerido como responsável por esta regulação (TROELSEN, 2005).

POULTER *et al.* (2003) em estudo recente, analisaram 47 indivíduos, sendo 36 sujeitos com persistência de LPH e todos eles apresentaram o alelo T, o qual estava ausente nos 11 indivíduos sem a persistência da lactase. Entretanto, argumentaram que o genótipo CT não explica toda a variação na expressão da enzima LPH, especialmente porque os sujeitos heterozigotos não apresentam níveis intermediários na atividade enzimática, como seria o esperado. Estes estudos sugerem que a detecção direta das mutações C/T-13910 e G/A-22018 poderia ser usada como método diagnóstico de intolerância à lactose, por métodos baseados em PCR (Reação em Cadeia da Polimerase).

## **2 – JUSTIFICATIVA**

Os métodos convencionais de avaliação de má absorção e intolerância à lactose disponíveis (teste de tolerância à lactose e teste de hidrogênio expirado) são eficazes, no entanto, podem causar desconforto para os pacientes, tais como: vômitos, distensão abdominal, cólica e diarreia grave. Neste sentido, o estudo da determinação do mecanismo molecular associado à má absorção de lactose pode auxiliar na ampliação de um método diagnóstico preciso e que ocasiona menor desconforto para os pacientes.

Este estudo pretende avaliar as mutações no gene da lactase-florizina hidrolase (LPH) em indivíduos adultos procedentes de Porto Alegre que se auto-referem como tolerantes ou intolerantes à lactose através do teste de hidrogênio expirado e técnica de PCR. Este estudo não é um estudo de base populacional, mas sim, uma análise entre a presença de mutações no gene da LPH e o teste de hidrogênio expirado.

### **3 – OBJETIVOS**

#### **3.1- Objetivo Geral**

Verificar a relação entre a presença das mutações C/T-13910 e G/A-22018 no gene da lactase-florizina hidrolase e a absorção de lactose em uma amostra de indivíduos residentes no município de Porto Alegre auto-referidos como tolerantes ou intolerantes à lactose.

#### **3.2- Objetivos Específicos**

- ✓ avaliar a absorção de lactose através do teste do hidrogênio expirado;
- ✓ padronizar a técnica de PCR para verificação das mutações do gene da lactase;
- ✓ estudar a concordância entre os dois métodos.

## **4- CASUÍSTICA E MÉTODOS**

### **4.1- Delineamento**

Trata-se de um estudo diagnóstico quase experimental que tem como desfecho a presença das mutações C/T-13910 e G/A-22018 no gene da Lactase-Florizina Hidrolase e como fatores a presença ou a ausência de sintomas relacionados à absorção da lactose.

### **4.2- População em Estudo**

A população em estudo foi constituída por indivíduos adultos, sadios, maiores de 18 anos de idade, procedentes do município de Porto Alegre.

### 4.3- Amostra e Amostragem

- Seleção da Amostra

A amostra foi constituída de indivíduos convidados a participarem do estudo mediante dois critérios estabelecidos previamente: a quantidade diária de leite de vaca ingerido habitualmente e a presença ou não de sintomas clínicos após a ingestão de leite.

A amostra foi dividida em 2 grupos:

- o grupo de indivíduos que se auto-referiam tolerantes à lactose (consumo igual ou superior a 3 copos de leite ao dia) sem a presença de sintomas.

- o grupo de indivíduos que se auto-referiam intolerantes à lactose (consumo de até 1 copo de leite ao dia) com a presença de sintomas clínicos.

Os candidatos compareceram ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre em 8 horas de jejum e permaneceram no local pelo menos 3 horas consecutivas.



- Critérios de Inclusão

Foram considerados elegíveis para a pesquisa os indivíduos sadios, voluntários, maiores de 18 anos de idade, com o consumo de leite de vaca igual ou superior a 3 copos (750ml) de leite ao dia sem a presença de sintomas e também indivíduos com consumo de leite de até 250ml (1 copo) e relato de algum desconforto após sua ingestão.

- Critérios de Exclusão

Foram excluídos do estudo os indivíduos com as seguintes condições:

- diagnóstico prévio de doença com contra-indicação ao uso de lactose;
- tempo de jejum inferior a 8 horas;
- uso de antibióticos, enemas ou laxativos nos 15 dias precedentes ao exame;
- diarreia no dia da realização do exame ou nos 7 dias precedentes;
- fumo nas 6 horas precedentes ao exame ou durante a realização do mesmo;
- uso de medicações antiparasitárias nos 30 dias precedentes ao exame ou em tratamento;
- inabilidade para a realização adequada do exame;

- não assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido.

- Cálculo do Tamanho da Amostra

Partindo-se da inexistência de dados sobre as mutações T-13910 e A-22018 na população brasileira, a frequência do alelo C nos indivíduos mau-absorvedores de lactose é de 100% (ENATTAH *et al.*, 2002). Estimou-se um tamanho amostral total de 20 indivíduos para um intervalo de confiança de 95% e um poder de 90% com margem de erro para 10%.

#### **4.4- Variáveis Estudadas**

- Absorção de Lactose

A má absorção de lactose foi diagnosticada quando o aumento máximo da concentração de hidrogênio foi  $\geq 20$  ppm em relação ao nível basal. De acordo com o resultado do teste de hidrogênio expirado, os indivíduos foram classificados em: absorvedores e não-absorvedores de lactose.

- Sinais Clínicos

Foram verificados os sinais e sintomas apresentados durante a aplicação do exame de sobrecarga de lactose e também um acompanhamento por 12hs após o término do exame em ambos os grupos para identificar os sintomas mais frequentes apresentados pelo grupo dos não-absorvedores e averiguar se o grupo dos absorvedores não apresentou nenhum sintoma tardio.

- Desfecho de Interesse: presença das mutações C/T-13910 e G/A-22018

A presença das mutações T-13910 e A-22018 foi identificada a partir de uma amostra de sangue periférico, através de análise molecular pela técnica da PCR – Reação em Cadeia da Polimerase e digestão com enzima de restrição específica. Pela análise do padrão migratório do produto de digestão após eletroforese em gel de agarose a 1,5% foi possível constatar a presença ou não das mutações em estudo.

De acordo com o resultado da análise molecular, os indivíduos foram classificados como: lactase persistentes e lactase não persistentes.

#### 4.5- Técnica do Teste de Hidrogênio Expirado

O teste do hidrogênio expirado foi realizado em duas etapas: coleta e armazenamento do material biológico e análise dos níveis de hidrogênio através de cromatografia gasosa no Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Para a coleta das amostras de ar expirado foi utilizado um sistema coletor (Quintron<sup>R</sup>), que consta de dois recipientes, interligados por uma válvula em T, com fluxo unidirecional (figura 1). A válvula é conectada a um bucal. Após a inspiração normal, o indivíduo expira através do bucal, preenchendo o primeiro recipiente plástico com ar do espaço morto. Com a pressão, haverá abertura da válvula, e o restante do ar expirado será coletado no segundo recipiente, o qual é impermeável, não permitindo escape ou contaminação da amostra. Após o preenchimento do segundo recipiente, a coleta é finalizada e o mesmo é destacado e vedado. A amostra pode ficar aí armazenada ou ser transferida para seringas ou recipientes específicos para armazenamento. Com esta técnica, obtém-se uma amostra significativa do ar alveolar.

Neste estudo foram utilizados recipientes específicos para armazenamento com capacidade para 750ml, nos quais as amostras permaneceram até serem analisadas. Eram armazenadas amostras de 300 a 500ml de cada indivíduo. Os recipientes conforme demonstrado na figura 1 eram esvaziados e reutilizados.



**Figura 1** - Recipiente utilizado para coleta das amostras de ar expirado

O aparelho de cromatografia gasosa empregada para medida da concentração do hidrogênio no ar expirado foi um cromatógrafo de gás (*Quintron Microlizer*, modelo 12i) com sensibilidade de 1 ppm de hidrogênio e acurácia de  $\pm 2$  ppm de hidrogênio.

Para a análise da concentração de hidrogênio nas amostras de ar expirado, inicialmente o aparelho era calibrado com um gás de referência que continha uma concentração conhecida de hidrogênio. Foi utilizado gás com uma concentração de hidrogênio de 96 ppm. Após este processo, assegurando-se a exatidão do aparelho, iniciava-se a medida das amostras. Uma quantidade de 20ml de ar era aspirada com uma seringa do recipiente onde estava armazenada e injetada no cromatógrafo. A seguir, a amostra era conduzida através de uma coluna de cromatografia por gás carreador. O gás carreador utilizado é o ar atmosférico filtrado por uma coluna preenchida com material que retém impurezas, tais como álcool, acetona ou gases orgânicos. Os componentes da amostra são separados de acordo com sua velocidade de deslocamento até a extremidade distal da coluna. Nesse local, há um sensor que detecta hidrogênio e emite um sinal proporcional à concentração do gás. Esse sinal analógico é convertido para a forma digital (em ppm, de acordo com as unidades utilizadas para calibragem) e exibido no visor do aparelho, alguns minutos depois de iniciada a análise.

Foi considerado como critério de positividade o aumento nas concentrações de hidrogênio igual ou superior a 20 ppm acima do nível basal.

#### 4.6- Técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Os testes de biologia molecular foram feitos no Centro de Terapia Gênica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

A presença das mutações foi analisada por técnica da PCR usando os *primers* descritos abaixo, desenhados para este trabalho (USM).

Para a realização da PCR foram coletados 10ml de sangue periférico em EDTA no momento da realização do teste de hidrogênio expirado. O DNA foi extraído através de kit comercial de extração (*Easy-DNA<sup>TM</sup>*, Invitrogen). O DNA foi utilizado exclusivamente para este estudo, sendo posteriormente descartado. Medidas adicionais de preservação do anonimato dos participantes foram tomadas pela codificação das amostras de DNA e resultados de teste de hidrogênio expirado.

Os *primers* utilizados para a amplificação do polimorfismo C/T-13910 foram os seguintes: *primer forward* **5'-AAGACGTAAGTTACCATTTAATAC-3'** e o *primer reverse* **5'-CGTTAATACCCACTGACCTATCCT-3'**. Os *primers* utilizados para a amplificação do polimorfismo G/A-22018 foram os seguintes: *primer forward* **5'-TAAGAACATTTTACTCTTC-3'** e o *primer reverse* **5'-AGAAAATGGGTTTTTCGCATG-3'**.

Para cada reação de PCR foram utilizados: 1x Tampão KCl, 0,2 nM de dNTP, 1,5 nM de MgCl<sub>2</sub>, 20 pmol de *primer forward*, 20 pmol de *primer reverse* e 1 μ de Taq DNA Polimerase e 100 ng de DNA, totalizando um volume final de 50 μL em água destilada.

Todos os reagentes foram adquiridos da Invitrogen. As reações de amplificação foram realizadas em aparelho termociclador do tipo Eppendorf Personal Cyclor e cada reação era composta de 30 ciclos de 90 segundos e temperatura de anelamento de 56° C.

Após a reação de PCR, o produto da mesma era verificado em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio. Uma vez que houvesse a confirmação da amplificação da seqüência pretendida, era realizada a digestão enzimática.

A digestão foi realizada através das enzimas de restrição BsmFI (New England Biolabs) para a mutação C/T-13910 e HhaI (Invitrogen) para a mutação G/A-22018 nas seguintes condições: 16 µL de água, 3 µL de tampão, 1 µL de enzima de restrição e 10 µL de produto de PCR por 4 horas a 65° C e 37° C respectivamente.

O resultado foi verificado por eletroforese em gel de agarose a 2% e classificados em CC, CT, TT e GG, GA, AA.

#### **4.7- Logística**

Foram incluídos no estudo 20 indivíduos residentes no município de Porto Alegre, sendo 18 sujeitos caucasóides e 1 voluntário com descendência asiática que demonstraram interesse em participar da pesquisa após o esclarecimento sobre a mesma.



As coletas das amostras de hidrogênio expirado ocorreram durante o período compreendido entre os meses de outubro a dezembro de 2004.

Ao chegar ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre, no turno da manhã, o indivíduo voluntário que estivesse em jejum e com o termo de consentimento livre e esclarecido preenchido e assinado era encaminhado ao Centro de Pesquisas e recebia as orientações sobre como deveria proceder durante as coletas para permanecer no estudo. Previamente, no momento da seleção dos voluntários era verificado se os mesmos apresentavam alguma condição listada nos critérios de exclusão e também eram submetidos a um questionamento sobre a quantidade de leite ingerida diariamente, bem como se apresentava algum sintoma após o consumo de leite ou derivados. Àqueles que consumiam leite no mínimo três vezes ao dia habitualmente era solicitado que antes do dia marcado para o exame, ingerisse 1 litro de leite em um dia e observasse qualquer manifestação de desconforto abdominal, bem como outros sintomas.

No dia do exame, inicialmente era coletada a primeira amostra de ar expirado (em jejum), e o voluntário recebia 50g de lactose diluída a 20% em um volume final de 250ml de água. A ingestão da lactose era efetuada em até 2 minutos sob supervisão. Após esse momento, só era permitida a ingestão de água até o término das coletas. As coletas subsequentes eram realizadas 60, 120 e 180 minutos após a administração da lactose. No intervalo, os indivíduos permaneciam na sala de exame e era coletada a amostra de sangue para análise molecular. Após a quarta coleta, os indivíduos recebiam um lanche, eram liberados e eram contatados pela autora por 12hs após o término do experimento para o acompanhamento da melhora ou piora dos sintomas apresentados durante o exame ou o aparecimento de algum sintoma tardio.

As amostras de ar eram armazenadas em recipientes específicos e analisadas entre as coletas através de cromatografia gasosa.

Todas as coletas foram realizadas pela autora com auxílio de uma médica colaboradora do estudo para coleta de sangue e um acadêmico de medicina. A análise das amostras e a medida de hidrogênio expirado foram realizadas pela autora.

O sangue coletado durante o teste do hidrogênio expirado foi congelado até o momento da análise molecular das mutações que ocorreram a partir de julho de 2005.

A extração de DNA e a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase foram realizadas no Centro de Terapia Gênica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pela autora com o auxílio e a supervisão de 2 biólogas colaboradoras deste estudo.

#### **4.8- Análise Estatística**

A análise estatística descritiva foi utilizada para caracterização da amostra com uso de gráficos e tabelas. As variáveis quantitativas foram descritas através de média e desvio padrão ou mediana e percentis 25–75. As variáveis qualitativas foram descritas através de frequências absoluta e relativa. Para avaliar a normalidade dos dados foi aplicado o teste de Shapiro-Wilks, resultando nos níveis de H<sub>2</sub> expirado como uma distribuição assimétrica.

A comparação dos níveis de hidrogênio expirado dentro dos grupos dos tolerantes e intolerantes à lactose foi realizada através do teste de Friedman e para complementar este teste na presença de significância estatística foi aplicado o teste de Wilcoxon.

A comparação dos valores da excreção de H<sub>2</sub> nos quatro momentos do teste (basal, 60, 120 e 180 minutos) entre os grupos dos absorvedores e não absorvedores foi obtida através do teste de Mann-Whitney.

A avaliação da concordância entre os testes de hidrogênio expirado e análise molecular foi obtida através do Coeficiente de Kappa. O nível de significância adotado foi de 5%.

Os dados foram processados e analisados por meio do programa SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) versão 10.0.

#### **4.9- Considerações Éticas**

O protocolo do presente estudo e seu termo de consentimento livre e esclarecido foi aprovado pela Comissão Científica do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e Comissão de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (projeto nº 04123).

As amostras de sangue foram identificadas por códigos e descartadas ao término do estudo.

A inclusão no estudo dos indivíduos voluntários só ocorreu após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXO 1).

## **5- RESULTADOS**

### **5.1 – Características da Amostra**

Vinte indivíduos foram convidados a participarem do estudo. Dezoito voluntários eram caucasóides e 1 pessoa era de descendência asiática, com idade superior a 18 anos. Dos 20 indivíduos incluídos no estudo, dois eram do sexo masculino e dezoito (90%) eram do sexo feminino. A média de idade da amostra foi de  $32,7 \pm 7,3$  anos (tabela 1).

**Tabela 1** - Características gerais dos indivíduos estudados

<b>Variável</b>	<b>n = 20</b>
Idade (anos)	32,7 ± 7,3
Sexo feminino, n (%)	18 (90)
Sexo masculino, n (%)	2 (10)
Caucasóides, n (%)	19 (95)
Asiático, n (%)	1 (5)

Os sintomas apresentados pelos 10 voluntários que se auto-referiam como intolerantes à lactose durante a aplicação do teste de hidrogênio expirado e até 12hs após o término do exame, estão descritos na tabela 2. Seis dos 10 indivíduos que se auto-referiam como tolerantes à lactose informaram ter uma necessidade de ingestão alimentar imperiosa durante os primeiros 60 minutos do exame e 4 indivíduos deste grupo não apresentaram queixa alguma.

**Tabela 2** - Sintomas apresentados pelos indivíduos auto-referidos intolerantes à lactose durante o teste do H<sub>2</sub>

<b>Relato de Sintomas</b>	<b>n= 10</b>
Distensão abdominal, n (%)	5 (50)
Náuseas, n (%)	5 (50)
Flatulência, n (%)	6 (60)
Diarréia, n (%)	5 (50)
Urgência evacuatória, n (%)	3 (30)
Cefaléia, n (%)	3 (30)
Erução, n (%)	1 (10)
Plenitude gástrica, n (%)	1 (10)

## 5.2 – Resultados do Teste do Hidrogênio Expirado

O teste do hidrogênio expirado foi positivo (nível de hidrogênio maior que 20 ppm em relação ao nível basal) em 9 (45,0%) dos 20 indivíduos e negativo em 11 (55,0%). Entre os 10 indivíduos que se auto-referiam como intolerantes à lactose, 09 apresentaram os resultados do teste de H<sub>2</sub> expirado positivo e um indivíduo apresentou o teste H<sub>2</sub> negativo. Entre os 10 voluntários que se auto-referiam como tolerantes à lactose, todos participantes apresentaram o teste H<sub>2</sub> expirado negativo.

Os resultados dos valores das medianas do teste do hidrogênio expirado, encontrados nos quatro momentos das coletas (basal, 60, 120 e 180 minutos), tanto nos 10 indivíduos com os testes positivos quanto nos 10 com os testes negativos, estão demonstrados na tabela 3.



**Tabela 3** - Avaliação do teste de H<sub>2</sub> expirado

Avaliação	Teste de H <sub>2</sub>		P
	positivo *	negativo **	
	Mediana (P25 – P75)	Mediana (P25 – P75)	
Basal	7,0 <sup>a</sup> (2,0 – 13,0)	8,0 (1,0 – 18,0)	0,822
60 min.	61,0 (37,5 – 94,5)	8,0 (3,0 – 12,0)	< 0,001
120 min.	80,0 (60,0 – 101,5)	7,0 (1,0 – 12,0)	< 0,001
180 min.	73,0 (62,0 – 102,5)	2,0 (1,0 – 7,0)	< 0,001

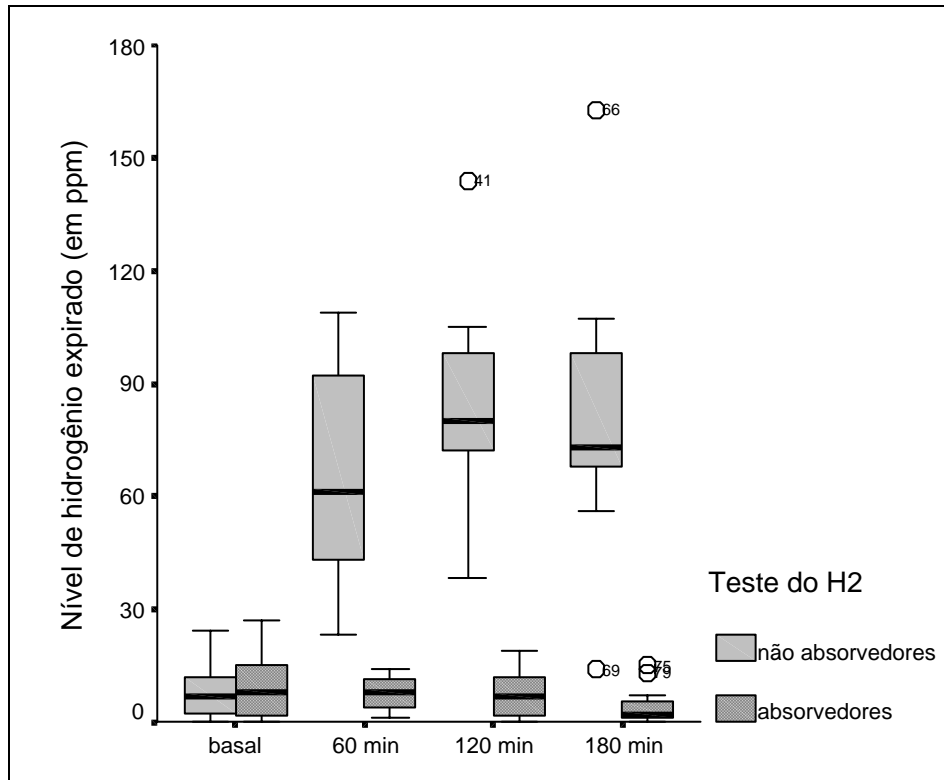
\* Houve diferença estatisticamente significativa pelo teste de Friedman ( $p = 0,001$ ) entre os 4 momentos das avaliações do H<sub>2</sub> expirado no grupo positivo (não absorvedores);

\*\* Não houve diferença estatisticamente significativa pelo teste de Friedman ( $p = 0,172$ ) entre os 4 momentos das avaliações do H<sub>2</sub> expirado no grupo negativo (absorvedores);

<sup>a</sup> Pelo teste de Wilcoxon, existe diferença estatisticamente significativa no grupo positivo (não absorvedores) entre o basal e as avaliações em 60 min ( $p = 0,008$ ), 120 min ( $p = 0,008$ ) e 180 min ( $p = 0,008$ ).

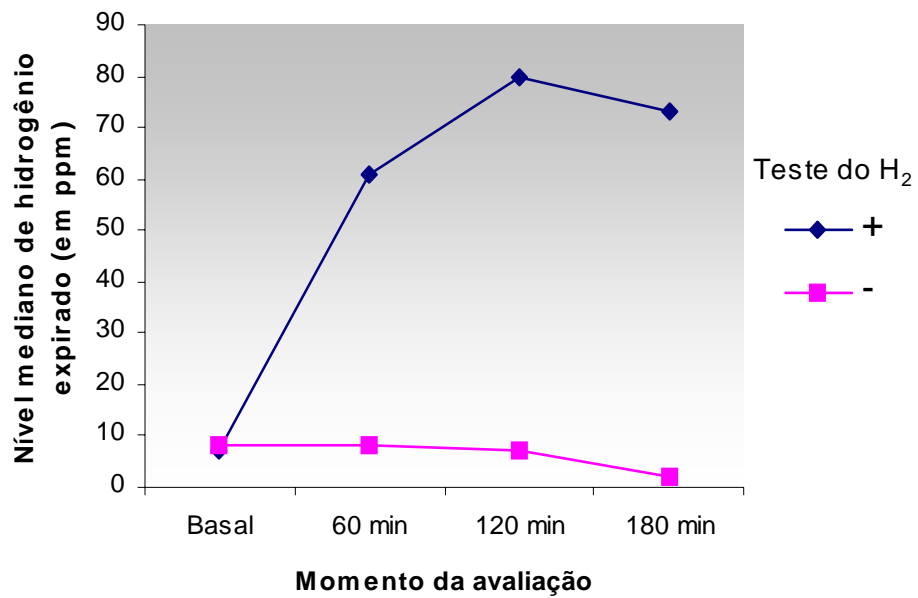
Houve diferença estatisticamente significativa pelo teste de Mann-Whitney nos níveis de hidrogênio entre os absorvedores (teste H<sub>2</sub> negativo) e não absorvedores (teste H<sub>2</sub> positivo) nas avaliações em 60 min ( $p < 0,001$ ), 120 min ( $p < 0,001$ ) e 180 min ( $p < 0,001$ ), sendo que o grupo dos não absorvedores demonstrou um nível mais elevado de hidrogênio em cada uma dessas avaliações conforme demonstrado na Figura 2. No grupo dos não absorvedores (teste

H<sub>2</sub> positivo), houve uma diferença estatisticamente significativa da avaliação do nível basal para as demais (p=0,008) coletas (Tabela 3).



**Figura 2** - Comparação entre os níveis de H<sub>2</sub> expirado entre os grupos dos absorvedores e não absorvedores

O maior aumento do hidrogênio expirado no grupo dos não absorvedores (teste H<sub>2</sub> positivo) ocorreu aos 120 minutos. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os níveis de hidrogênio nas avaliações em 60 min, 120 min e 180 min conforme demonstrado na Figura 3.



**Figura 3** - Nível de hidrogênio expirado (em ppm) na amostra

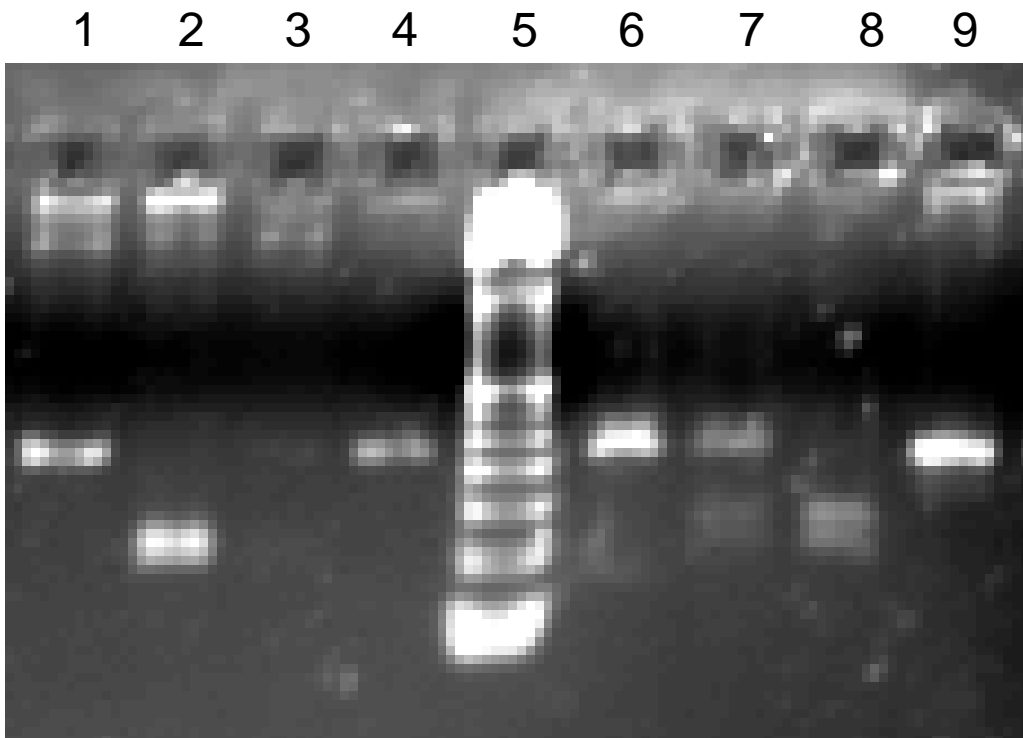
### 5.3 – Resultados do Teste Molecular para as Mutações C/T e G/A

A distribuição dos genótipos possíveis para a mutação G/A (AA, GA e GG) entre os vinte indivíduos estudados está demonstrada na tabela 4 e figura 4. A presença da mutação A-22018 em ambos os alelos (AA) esteve presente em 4 (20,0%) indivíduos estudados e em 6 (30,0%) indivíduos esteve presente em somente um dos alelos (GA). Desta forma, 10 (50,0%) dos 20 voluntários da amostra estudada apresentaram resultados positivos para a mutação citada, considerados mutantes e 10 (50,0%) dos sujeitos apresentaram o genótipo (GG), considerados não mutantes.

Entre os três genótipos possíveis para a mutação C/T (TT, CT e CC) foi obtido o seguinte resultado entre os 20 voluntários que participaram do estudo conforme demonstrado na tabela 4 e figura 4. A presença da mutação T-13910 em ambos os alelos (TT) esteve presente em 3 (15,0%) sujeitos e em 7 (35,0%) indivíduos esteve presente em somente um dos alelos (CT). Desta forma, 10 (50,0%) em 20 sujeitos da amostra estudada apresentaram resultados positivos para a mutação citada, portanto, considerados mutantes e 10 (50,0%) dos voluntários apresentaram o genótipo (CC), considerados não mutantes.

**Tabela 4** - Distribuição dos genótipos na amostra.

<b>Genótipos</b>	<b>CC</b>	<b>C/T</b>	<b>T/T</b>
	(n = 10)	(n = 7)	(n = 3)
<b>GG</b> (n = 10)	10 (100,0 %)	–	–
<b>GA</b> (n = 6)	–	06 (100,0 %)	–
<b>AA</b> (n = 4)	–	01 (25,0 %)	3 (75,0%)



**Figura 4** - Os produtos digeridos do PCR foram amplificados em gel de agarose a 2,5%. Linhas 1 e 9 mostram produtos de PCR não digeridos. Linhas 2 e 6 mostram indivíduos homocigotos para os genótipos de não-persistência de lactase  $CC_{13910}$  e  $GG_{22018}$ ; 4 e 8 homocigotos para os genótipos de persistência de lactase  $TT_{13910}$  e  $AA_{22018}$ ; 3 e 7 indivíduos heterocigotos para o genótipo de persistência de lactase  $CT_{13910}$  e  $GA_{22018}$ . O marcador de DNA com 50 pb está demonstrado na linha 5.

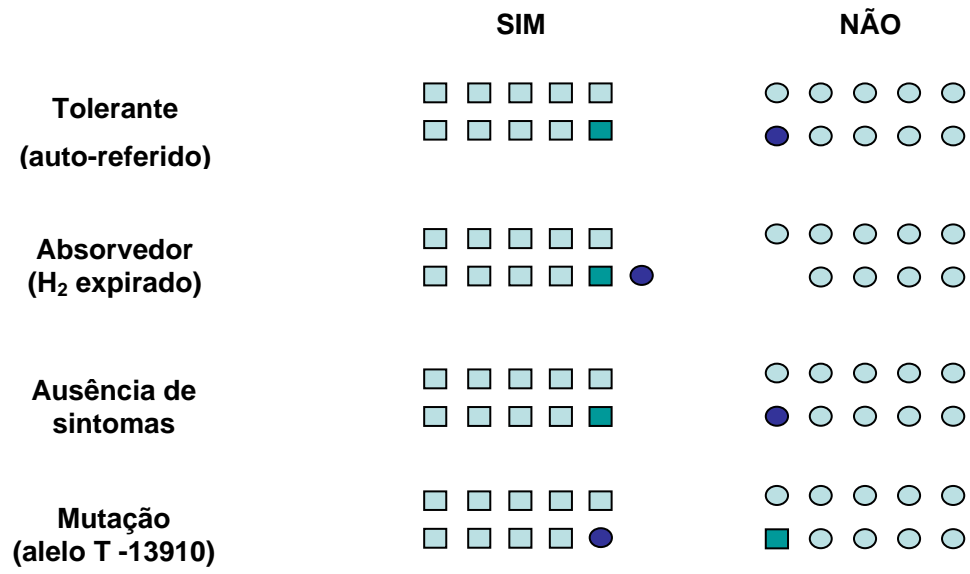
#### 5.4 – Concordância entre Testes Molecular, H<sub>2</sub> Expirado e Sintomas

Relacionando os resultados verificados quanto à presença das mutações A-22018 e T-13910, os resultados do teste de hidrogênio expirado e a manifestação de sintomas dos 20 indivíduos analisados obtiveram-se os resultados demonstrados na tabela 5. Foi encontrado um Coeficiente de Concordância Kappa entre o teste delta H<sub>2</sub> e as mutações G/A-22018 e C/T-13910 igual a  $-0,9$  ( $p < 0,001$ ). Entre os 11 indivíduos absorvedores, 10 (90,9%) apresentaram as duas mutações (C/T e G/A), o que explica a relação inversa que existe entre esses dois testes. Entre os sintomas apresentados e as mutações foi identificado um Coeficiente de Concordância Kappa =  $-0,8$  ( $p < 0,001$ ). Dos 10 indivíduos que não apresentaram sintomas, 9 (90,0%) apresentaram as duas mutações (C/T e G/A). Por fim, obteve-se um Coeficiente de Concordância Kappa =  $0,9$  ( $p < 0,001$ ) entre os resultados do delta H<sub>2</sub> e os sintomas relatados pelos indivíduos durante o teste. A relação entre esses dois testes, diferentemente dos demais, é diretamente proporcional, ou seja, entre os 9 não absorvedores, 9 (100,0%) apresentaram algum tipo de sintoma durante o teste de hidrogênio expirado. O resultado final entre os testes de sobrecarga de lactose e molecular entre os dois grupos participantes do estudo que se auto-referiam como tolerantes ou intolerantes à lactose está demonstrado de forma esquematizada na Figura 5.

**Tabela 5** - Concordância entre a análise molecular e os testes do hidrogênio e sintomas

<b>Genótipo</b>	<b>Fenótipo Auto-referido</b>	<b>H<sub>2</sub> Expirado</b>	<b>Sintomas Gastrointestinais</b>	<b>N = 20</b>
CCGG	intolerância	Positivo	presente	n = 9
CCGG	tolerância	Negativo	ausente	n = 1
CTGA	tolerância	Negativo	ausente	n = 5
CTGA	intolerância	Negativo	presente	n = 1
CTAA	tolerância	Negativo	ausente	n = 1
TTAA	tolerância	Negativo	ausente	n = 3





**Figura 5** - Representação esquemática dos resultados encontrados.

## **6 – DISCUSSÃO**

### **6.1 – Características gerais do estudo**

Este trabalho caracteriza-se como sendo um estudo transversal que objetivou verificar a relação entre a presença das mutações C/T-13910 e G/A-22018 no gene da lactase-florizina hidrolase e a absorção de lactose em indivíduos procedentes do município de Porto Alegre. A amostra foi constituída de 20 indivíduos com idade superior a 18 anos. Os participantes foram selecionados segundo o relato da quantidade de leite consumida, habitualmente, por dia e quanto à presença ou ausência de sintomas relacionados à ingestão de leite. Os voluntários que se auto-referiam como tolerantes à lactose relataram um consumo habitual entre 3 copos de leite (750ml) a 1 litro de leite ao dia sem a manifestação de sintomatologia associada à intolerância à lactose e os participantes que se auto-referiam como intolerantes ao leite relataram um consumo de no máximo 1 copo (250ml) de leite ao dia com a presença de algum desconforto abdominal até mesmo sintomas mais severos. A má absorção de lactose foi diagnosticada através do teste de hidrogênio expirado após a ingestão de 50 g de lactose diluída em solução aquosa a 20%. O teste teve duração de 3 horas e foi considerado positivo

quando o aumento foi superior a 20 partes por milhão na concentração de H<sub>2</sub> em relação ao nível basal. Os voluntários também foram classificados como indivíduos com lactase persistente e lactase não persistente através da análise molecular dos dois polimorfismos (C/T-13910 e G/A-22018) responsáveis pela persistência da Lactase Florigina Hidrolase no adulto pelo método da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

## **6.2 – A Prevalência de Hipolactasia Primária do Tipo Adulto Avaliada através do Teste do Hidrogênio Expirado**

O teste do hidrogênio expirado, que teve seu uso difundido a partir da década de 70, hoje é uma das técnicas mais utilizadas para o diagnóstico da má absorção de lactose (LEIS *et al.*, 1997). A simplicidade e a natureza não-invasiva do método tornam-no ideal para aplicação em estudos epidemiológicos e também em estudos científicos devido sua alta sensibilidade e especificidade.

AROLA *et al.* (1988) compararam o teste do hidrogênio expirado (método indireto) com a medida da atividade da lactase por biópsia jejunal (método direto) em 63 indivíduos adultos e obtiveram no exame, uma especificidade de 96% e uma sensibilidade de 69%. Os valores preditivos positivo e negativo foram de 85% e 90% respectivamente.

O teste de tolerância à lactose também é bastante utilizado em estudos de prevalência e comumente usado na clínica para diagnóstico de má absorção, mas conforme citado anteriormente neste trabalho, apesar de ser um exame simples, sua sensibilidade e

especificidade são questionáveis devido a variações nas taxas de esvaziamento gástrico e ao metabolismo da glicose (BRUMMER *et al.*, 1993).

Existem protocolos diferentes para a aplicação do teste de hidrogênio expirado quanto à quantidade de lactose a ser administrada, volume de água para a diluição, tempo total do exame e tempo de intervalo entre as coletas. Neste estudo foi utilizado o teste clínico convencional aplicado para indivíduos adultos com suspeita de intolerância à lactose. Administração oral de 50 g de lactose (equivalente a quantidade de lactose em 1 litro de leite) diluída em 250ml de água, conforme estudo realizado por BRIET *et al.* (1997). As coletas de hidrogênio expirado foram realizadas com intervalos de 60 minutos, conforme demonstrado por SOLOMONS *et al.* (1980), esse intervalo não diminui a sensibilidade do exame e o teste teve duração de 3 horas, com coletas aos 60, 120 e 180 minutos após a ingestão de lactose.

Consideramos como critério de positividade o aumento igual ou superior a 20 ppm de hidrogênio acima do nível basal, critério mais adotado na literatura. Estudo brasileiro, realizado por REIS *et al.* (1999) também preconiza um aumento na concentração de hidrogênio acima de 20 ppm para o diagnóstico de má absorção de lactose, pois este critério apresentou melhor correlação com a ocorrência de intolerância à lactose utilizando o teste do hidrogênio expirado.

Dentre os trabalhos brasileiros publicados nas bases pesquisadas, Capes e Pubmed, sobre má absorção de lactose, não foi encontrado na literatura, nenhum realizado em indivíduos adultos procedentes do município de Porto Alegre, somente estudo em crianças. Estudo realizado no município de Porto Alegre por PRETTO *et al.* 2002 identificou uma prevalência de má absorção de lactose de 8,4%, visto que o referido estudo utilizou doses fisiológicas de lactose em crianças e adolescentes para o diagnóstico (1 copo de 250ml de

leite – 12,5 g de lactose). A prevalência observada neste estudo foi considerada elevada para as características étnicas do Sul do Brasil, considerando a faixa etária estudada, a dose de lactose e o veículo de administração.

SPARVOLI (1990), estudando 70 indivíduos de 19 a 59 anos nascidos na Região Sul do Brasil, demonstrou má absorção de lactose em 37,5% dos caucasóides e em 68,18% dos negróides. O teste utilizado para diagnóstico foi o teste de tolerância à lactose com dose de 50 g de lactose em solução aquosa a 10%. Em São Paulo, TRONCON *et al.*, (1981) também encontraram taxas mais elevadas de má absorção de lactose em pacientes de cor não-branca em relação aos de cor branca (94,45% x 68,75%). Tais resultados foram obtidos em pacientes adultos e com a utilização do teste de tolerância à lactose (dose de 50 g dissolvida em 300ml de água). Outro estudo efetuado em São Paulo por SEVÁ-PEREIRA *et al.*, (1982) com adultos demonstrou taxas de 85% de má absorção em indivíduos negróides e de 50% em caucasóides. A dose de lactose empregada foi de 50 g em solução aquosa a 10%, e o método diagnóstico foi o teste de tolerância.

Estudo recente realizado em São Paulo, ESCOBOZA *et al.*, (2004), identificaram uma prevalência de hipolactasia primária do tipo adulto de 60,8%. Entre os 115 pacientes estudados (idade entre 5 a 60 anos) verificou-se uma maior prevalência de hipolactasia em indivíduos não-brancos (91,3%) que em indivíduos de cor branca (53,2%). Os pacientes foram selecionados, pois seriam submetidos à endoscopia por causas diversas: dor epigástrica, dispepsia, esofagite, refluxo gastroesofágico e úlcera péptica. Durante a endoscopia foram coletadas 3 amostras da segunda porção do duodeno para análise histológica, medida de atividade de sucrase e lactase e para análise imunohistoquímica. A quantidade de leite ingerido, habitualmente, referido pelos pacientes foi similar tanto no grupo dos pacientes com

normolactasia quanto no grupo dos indivíduos com hipolactasia. Os pacientes que relataram o consumo de até 2 copos de leite ao dia (1 copo = 250ml), 24,2% eram normolactásicos e 8,6% apresentavam hipolactasia. Os pacientes com hipolactasia relataram a presença de sintomas tais como: diarreia (15,7%), dor abdominal (8,7%), flatulência (4,4%) e 71,4% não referiram sintomas gastrointestinais. No grupo dos pacientes com normolactasia, os autores, também observaram: diarreia (11,1%) e dor abdominal (6,7%), sendo que a maioria (82,2%) destes pacientes não apresentou queixas gastrointestinais.

Em nosso estudo, os sintomas mais relatados pelos voluntários foram: flatulência (30%), dor abdominal (25%), diarreia (25%) e náuseas (25%). Dos 10 indivíduos que relataram sintomas durante o teste de sobrecarga com 50 g de lactose, 9 tiveram o teste de hidrogênio expirado positivo e apenas 1 sujeito apresentou o teste de hidrogênio expirado negativo. Este resultado negativo talvez possa ser explicado pela possibilidade do indivíduo apresentar no cólon flora bacteriana não produtora de hidrogênio ou então, presença de parasitose não tratada. Apesar da medida da concentração de H<sub>2</sub> expirado ser um método de diagnóstico sensível e específico, pode sofrer 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 de produzirem H<sub>2</sub>. Cerca de 90% dos adultos possuem bactérias capazes de produzir H<sub>2</sub>, o que pode resultar em 10% de resultados falsamente negativos (SEVÁ-PEREIRA *et al.*, 1999). Modificações na qualidade, na quantidade e na distribuição da flora bacteriana podem alterar o resultado de exame (GARDINER *et al.*, 1981).

No presente estudo a amostra foi de conveniência e selecionada conforme a queixa auto-referida de desconforto abdominal após a ingestão de leite em quantidade mínima de 1

copo. Por outro lado os critérios de exclusão foram observados em indivíduos assintomáticos e assim, a possibilidade de descartar a maioria das causas secundárias de má absorção de lactose. É provável que a elevada concordância (90%) observada entre os sintomas e o teste do hidrogênio expirado deva-se a estes fatos.

Em relação aos bons absorvedores de lactose em nossa pesquisa, conforme já referido, eles relataram um consumo habitual de no mínimo 3 copos de leite *in natura* por dia e foram incluídos no estudo mediante um teste prévio de consumo de 1 litro de leite em 1 dia. Entre os indivíduos que se auto-referiam maus absorvedores de lactose, relataram não tolerar nenhuma quantidade de leite ou no máximo 1 copo (250ml) de leite por dia, sem ser *in natura*. Estes dados estão de acordo com a literatura que sugere que as pessoas com hipolactasia do tipo adulto podem tolerar até 2 copos de leite (25 g lactose) ao dia desde que em horários diferentes e não sendo *in natura*, visto que a presença de outros alimentos ingeridos junto com o leite reduz os sintomas de má absorção de lactose (SUAREZ *et al.*, 1997). CARROCCIO *et al.* (1998) em estudo cego em indivíduos da população Italiana, demonstraram que apenas 63% das pessoas que se auto-referiam intolerantes à lactose, submetidos ao teste do hidrogênio expirado, eram realmente mau-absorvedores de lactose, e apenas 5 pacientes destes mal-absorvedores apresentaram algum sintoma com 25g de lactose, equivalente a aproximadamente 2 copos de leite. Outro estudo, na Galicia, demonstrou que 32,5% da população apresentaram alteração no teste do hidrogênio após o consumo de 50 g de lactose em solução aquosa a 20%. Este percentual diminuiu significativamente após a diminuição da quantidade de lactose ingerida (25 g e 12,5g de lactose) e do veículo utilizado para a administração da mesma. Apenas 13,7% dos indivíduos apresentaram má-absorção de lactose após o consumo de 250ml de leite e 3,8% depois do consumo de 250ml de iogurte (LEIS *et al.*, 1997).

### 6.3 – Análise Molecular

Existem 9 genótipos possíveis para o gene da LPH. KUOKKANEN *et al* (2003) compararam o genótipo dos pacientes com a atividade da enzima através de material de biópsia intestinal e identificaram 4 genótipos: CCGG e CCGA (não persistência de lactase) e, CTGA e TTAA (persistência de lactase). Em nosso estudo foram identificados 4 genótipos na amostra estudada: 10 indivíduos CCGG (não persistência de lactase), 6 CTGA, 1 CTAA e 3 sujeitos TTAA todos associados à persistência de lactase. Identificamos 1 genótipo CTAA – persistência de lactase, até então ainda não descrito na literatura.

Nossos resultados demonstraram que a análise do polimorfismo C/T-13910 e G/A-22018 no gene da Lactase Florizina Hidrolase (LPH) apresentou uma forte concordância ( $k = 0,9$ ) com o teste de hidrogênio expirado para diagnosticarmos má-absorção de lactose e, também uma forte concordância entre o teste molecular e a presença de sintomas relacionados com a má absorção de lactose ( $k = 0,8$ ). O indivíduo auto-referido intolerante à lactose com o teste H<sub>2</sub> negativo (absorvedor) e presença de sintomas apresentou genótipo CTGA, compatível com persistência de lactase. Por outro lado, um indivíduo auto-referido tolerante à lactose com o teste H<sub>2</sub> negativo (absorvedor) e ausência de sintomas ao exame apresentou genótipo CCGG, associado à não persistência de lactase.

No presente estudo, os voluntários que apresentaram o genótipo CCGG (não persistência de lactase), 9/10 tiveram o teste de H<sub>2</sub> positivo e apresentaram sintomas após o exame. Apenas 1/10 apresentou o teste de H<sub>2</sub> negativo, sendo que os sintomas não estavam presentes. Dentre as possíveis explicações para esta discrepância, pode-se citar um declínio



mais lento nos níveis de lactase que levariam a uma hipolactasia tardia neste indivíduo. Isto, apesar de ser um fator a ser considerado na explicação do observado é discutível, pois o indivíduo tinha apenas 40 anos de idade. Outras possibilidades para a discordância entre a mutação e o teste do hidrogênio expirado seriam: flora intestinal bacteriana não produtora de hidrogênio, jejum incorreto ou uma refeição rica em carboidrato na noite anterior ao exame. Salienta-se que o H<sub>2</sub> excretado no nível basal (28 ppm) foi superior ao valor de ponto de corte estabelecido neste estudo de 20 ppm. TADESSE *et al* (1992) e VELIGATI *et al* (1994) já demonstraram que o nível de hidrogênio excretado no basal superior ao valor de ponto de corte pode significar supercrescimento bacteriano, jejum inadequado ou uma refeição muito rica em carboidrato antes do início do jejum. Conforme demonstrado em estudos anteriores, pode ocorrer uma adaptação da flora intestinal reduzindo os sintomas relacionados à má absorção de lactose quando há um consumo regular de lactose em quantidades reduzidas (HERTZLER & SAVAIANO, 1996), ou uma alteração na microbiota do cólon, propiciando o consumo de hidrogênio pela própria população de bactérias (HILL, 1983; TOMLIN *et al.*, 1991).

Os voluntários que apresentaram genótipos de persistência de lactase obtiveram resultados negativos no teste do hidrogênio expirado, mas 1 sujeito CTGA apresentou sintomas de má absorção de lactose durante o teste. O mesmo foi observado por HÖGENAUER e colaboradores, recentemente, em excelente análise na Áustria. Os resultados do referido estudo mostraram que a correlação do genótipo CC (lactase não persistente) foi excelente com os resultados positivos do hidrogênio expirado (36/37 sujeitos, 97%), enquanto que a correlação dos genótipos CT e TT (lactase persistente) com os resultados negativos do hidrogênio expirado foi menor (74/86 sujeitos, 86%). Os 123 pacientes que participaram do estudo apresentavam sintomas relacionados com a má absorção de lactose e todos eram

caucasianos (HÖGENAUER *et al.* (2005). Neste estudo foi analisado somente o polimorfismo da variante C/T-13910, ao passo que nós avaliamos também o polimorfismo da variante G/A-22018).

Outro estudo recente realizado na Alemanha por BÜNING *et al.* (2005) analisou os dois polimorfismos do gene da LPH. Foram 166 pacientes com sintomas de hipolactasia submetidos tanto aos testes de hidrogênio expirado quanto a análise do DNA. Os resultados observados mostraram: 116 pacientes apresentaram o teste do hidrogênio positivo, desses 106 (91,4%) com a variante C na posição 13910 e 103 com a variante G na posição 22018. Este resultado evidencia o genótipo relacionado com a não persistência de lactase. Entre os 50 pacientes com o teste do hidrogênio expirado negativo, 2 apresentaram a variante C na posição 13910, genótipo de não persistência da lactase. Ambos os pacientes repetiram o teste do hidrogênio expirado, um paciente obteve H<sub>2</sub> expirado positivo e o outro novamente apresentou o teste do H<sub>2</sub> negativo. A explicação pelos autores foi de que o paciente apresentou hipolactasia e flora bacteriana não excretora de hidrogênio.

Os resultados do presente trabalho permitem concluir que a análise dos polimorfismos C/T-13910 e G/A-22018 no gene da Lactase Florizina Hidrolase podem ser considerados um bom indicador para o diagnóstico de má absorção de lactose. É um método bastante sensível (75%) e específico (99%) conforme demonstrado em estudo feito por HÖGENAUER *et al* (2005) e tem ótima concordância com o teste de hidrogênio expirado. As vantagens do teste molecular em relação aos outros métodos de diagnóstico de hipolactasia primária do tipo adulto são: menor exigência de tempo disponível do paciente para realização do teste e menor desconforto por parte do paciente, visto que é necessária apenas uma coleta de sangue periférico. Outras vantagens são: não requer preparação para realização do exame (por

exemplo: jejum), não submete o indivíduo que apresenta sintomas relacionados à intolerância à lactose ao componente que lhe é agressor e também devemos considerar que é um método direto de analisar a persistência ou não da enzima lactase. Realçamos também, alguns inconvenientes para a realização do teste do H<sub>2</sub> expirado, tais como: tempo de duração do teste (3hs), jejum prolongado (12hs), método de diagnóstico indireto e a possibilidade de desconforto gastrointestinal nos indivíduos intolerantes à lactose. A única dificuldade para a execução do teste molecular é a reduzida disponibilidade de laboratórios capacitados a realizar o teste molecular. Por este motivo, a padronização de um teste molecular, menos invasivo, e com ótima concordância com o teste do H<sub>2</sub> expirado é de grande interesse.

A limitação do nosso estudo é o número que pode ser considerado reduzido em indivíduos analisados. No entanto, é o primeiro realizado no Brasil. O fato de termos identificado os dois polimorfismos do gene da LPH e encontrado uma forte concordância entre o teste do hidrogênio expirado e a análise molecular nos estimula a propor a ampliação da amostra para calcularmos a sensibilidade e especificidade do novo teste. Desta forma, identificar a prevalência dos fenótipos de persistência ou não persistência da enzima em nossa população.

Apesar da concordância entre as mutações C/T-13910 e G/A-22018 e a intolerância à lactose (medida através de presença de sintomas ou do teste de H<sub>2</sub> expirado) não ser absoluta em diferentes estudos, os níveis altos de concordância encontrados neste e em outros trabalhos, indicam que o teste molecular possa ser implantado na rotina de diagnóstico de hipolactasia primária do tipo adulto.

## 7 – CONCLUSÕES

- ✓ A presença das mutações C/T-13910 e G/A-22018 no gene da LPH foram identificadas nos indivíduos auto-referidos como tolerantes à lactose.
  
- ✓ A técnica de PCR para a detecção das mutações C/T-13910 e G/A-22018 foi padronizada no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.
  
- ✓ O resultado do teste do hidrogênio expirado foi concordante em 100% nos indivíduos auto-referidos como tolerantes e em 90% nos intolerantes à lactose.
  
- ✓ Houve concordância entre a presença das mutações C/T-13910 e G/A-22018 e a absorção de lactose em indivíduos auto-referidos como tolerantes e intolerantes à lactose.

- ✓ Houve concordância estatisticamente significativa entre a análise molecular e o teste de hidrogênio expirado ( $k = -0,9$ ).
  
- ✓ Houve concordância estatisticamente significativa entre a análise molecular e a ocorrência de sintomas ( $k = -0,8$ ).

## 8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLIET P, KRETCHMER N, LEBENTHAL E. Lactase deficiency, lactose malabsorption and lactose intolerance. In: LEBENTHAL E. ed. **Textbook of Gastroenterology and Nutrition in Infancy**. New York: Raven Press, 1989. p. 459-472.

AROLA H, KOIVULA T, JOKELA H, JAUHAINEN M, KEYRILÄINEN O, AROLA T, et al. Comparison of indirect diagnostic methods for hypolactasia. **Scand J Gastroenterol** 1988; 23: 351-357.

AROLA H, TAMM A. Metabolism of lactose in the human body. **Scand J Gastroenterol** 1994; 29 suppl 202: 21-25.

AROLA H. Diagnosis of hypolactasia and lactose malabsorption. **Scand J Gastroenterol** 1994; 29 suppl 202: 26-35.

AURICCHIO LN, PITCHUMONI CS. Lactose intolerance. **Postgraduate Medicine** 1994; 95: 113-120.

AURICCHIO S, TRONCONE R. Genetically determined disaccharidase deficiencies. In: WALKER WA, DURIE P, HAMILTON JR, WALKER-SMITH JÁ, WATKINS JB, eds. **Pediatric Gastrointestinal Disease**. Ontario: BC Decker Inc, 2000. p. 677-700.

BALLABRIGA A, MOYA M, BUENO M, CORNELLA J, DALMAU J, DOMÉNECH E, et al. Recomendaciones a propósito de la intolerancia a la lactosa. **An Esp Pediatr** 1998; 49: 448-50.

BEIGUELMAN B, SEVÁ-PEREIRA A, SPARVOLI AC. Possible discrimination between genotypes of lactase persistence phenotype. **Rev Bras Genet** 1992; 15: 191-197.

BRIET F, POCHART P, MARTEAU P. Improved clinical tolerance to chronic lactose ingestion in subjects with lactose intolerance: a placebo effect? **Gut** 1997; 41: 632-635.

BRUMMER RJM, KARIBE M, STOCKBRÜGGER RW. Lactose malabsorption. **Scand J Gastroenterol** 1993; 28 suppl 200: 65-69.

BULLER HA, RINGS E, MONTGOMERY RK, GRAND RJ. Clinical aspects of lactose intolerance in children and adults. **Scand J Gastroenterol** 1991; 26 suppl 188: 73-80.

BÜNING C, GENSCHEL J, JURGA J, FIEDLER T, VODERHOLZER W, FIEDLER EM, et al. Introducing genetic testing for adult-type hypolactasia. **Digestion** 2005; 71(4): 245-250.

CARROCCIO A, Montalto G, Cavera G, Notarbatolo A. Lactose intolerance and self-reported milk intolerance: Relationship with lactose maldigestion and nutrient intake. **J Am Coll Nutr** 1998; 17:631-6.

CASELLAS F, MALAGELADA JR. Applicability of short hydrogen breath test for screening of lactose malabsorption. **Dig Dis Sci** 2003; 48(7): 1333-8.

CHAMPE P.; HARLEY R. Metabolismo das Monossacarídeos e Dissacarídeos. *In.*: CHAMPE P, HARVEY R. **Bioquímica Ilustrada**. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997. p. 139.

CHRISTIL SU, MURGATROYD PR, GIBSON GR, CUMMINGS JH. Production, metabolism and excretion of hydrogen in the large intestine. **Gastroenterology** 1992; 102: 1269-1277.

DAVIDSON GP, BUTLER RN. Breath analysis. *In.*: WALKER WA, DURIE P, HAMILTON JR, WALKER-SMITH JÁ, WATKINS JB, eds. **Pediatric Gastrointestinal Disease**. Ontario: BC Decker Inc, 2000. p.1529-1537.

ENATTAH NS, SAHI T, SAVILAHTI E, TERWILLIGER JD, PELTRONEN L, JÄVELÄ I. Identification of a variant associated with adult-type hypolactasia. **Nature Genetics** 2002; 30: 233-237.

ESCOBOZA PM, FERNANDES MI, PERES LC, EINERHAND AW, GALVAO LC. Adult-type hypolactasia: clinical, morphologic and functional characteristics in Brazilian patients at a University Hospital. **J Ped Gastroenterol Nutr** 2004; 39(4): 361-365.

FAGUNDES NETO, Ulisses. Intolerância aos Carboidratos. *In.*: FIGUEIREDO RCP. **Absorção e tolerância à lactose na população de escolares do município de Rio Acima-MG**. 2000. 200f. (Tese de Doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais Belo Horizonte.

FAGUNDES NETO, Ulisses. Intolerância aos Carboidratos. *In.*: WEHBA J.; PENNA F.; FAGUNDES NETO U. (org) **Gastroenterologia Pediátrica**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Medsi, 1991. p. 219.

FLATZ G, Genetics of lactose digestion in humans. **Adv Hum Genet** 1987; 16: 1-77.

FLATZ G, KUHNAU W, NAFTALI D. Breath hydrogen test for lactose absorption capacity: importance of timing of hydrogen excretion and of high fasting hydrogen concentration. **Am J Clin Nutr** 1984; 39: 752-755.

FLATZ G. Lactase deficiency: biological and medical aspects of the adult human lactase polymorphism. *In.*: VOGEL F, MOTULSKY AG. **Genética Humana**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 506-512.

GALVÃO LC, TRONCON LEA, FERNANDES MIM, CARRER JC, HYPPOLITO L. Absorção de lactose e tolerância a diferentes tipos de iogurtes em adultos com hipolactasia. **Arq Gastroenterol** 1995; 33: 10-16.

GARDINER AJ, TARLOW MJ, SYMONDS J, HUTCHISON JGP, SUTHERLAND IT. Failure of the hydrogen breath test to detect primary sugar malabsorption. **Arch Dis Child** 1981; 56: 368-372.

GARRIDO JA, MELLO JB, MOREIRA AA, et al. Dissacaridases jejunais em 30 adultos brancos com úlcera duodenal. **Arq Gastroenterol** 1976; 13: 5-12.

GILAT T, RUSSO S, GILMAN-MALACHI E, ALDOR TAM. Lactase in man: a nonadaptable enzyme. **Gastroenterology** 1972; 62: 1125-1127.

GUPTA SK, CHONG SKF, FITZGERALD JF. Disaccharidase activities in children: normal values and comparison based on symptoms and histologic changes. **J Ped Gastroenterol Nutr** 1999; 28: 246-251.

HAMMER HF, PETRITSCH W, PRISTAUTZ H, KREJS GJ. Assessment of the influence of hydrogen nonexcretion on the usefulness of the hydrogen breath test and lactose tolerance test. **Wien Klin Wochenschr** 1996; 108: 137-141.



HARVEY CB, HOLLOX EJ, POULTER M, WANG Y, ROSSI M, AURICCHIO S, et al. Lactase haplotype frequencies in Caucasians: association with the lactase persistence/non persistence polymorphism. **Ann Hum Genet** 1998; 62: 215-23.

HEITLINGER LA, LEBENTHAL E. Distúrbios da digestão e da absorção dos carboidratos. **Clin Ped** 1988; 2: 249-266.

HERZLER SR, SAVAIANO DA. Colonic adaptation to daily lactose feeding in lactose maldigesters reduces lactose intolerance. **Am J Clin Nutr** 1996; 64: 232-236.

HIELE M, GHOOS Y, RUTGEERTS P, VANTRAPPEN G, CARCHON H, EGGERMONT E. <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> breath test using naturally <sup>13</sup>C-enriched lactose for detection of lactase deficiency in patients with gastrointestinal symptoms. **J Lab Clin Med** 1988; 112: 193-200.

HILL MJ. Bacterial adaptation to lactase deficiency. In: **Delmont J, ed. Milk tolerance and rejection**. Basel, Switzerland: Karger. 1983: 22-6.

HÖGENAUER C, HAMMER HF, MELITZER 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(3): 371-6.

HOLDEN C, MACE R. Phylogenetic analysis of the evolution of lactose digestion in adults. **Hum Biol** 1997; 69: 605- 28.

HOLLOX EJ, POULTER M, ZVARIK M, FERAČ V, KRAUSE A, JENKINS T, et al. Lactase haplotype diversity in the world. **Am J Hum Genet** 2001; 68: 160-72.

JOHNSON AO, SEMEYA JG, BUCHOWSKI MS, ENWONWU CO, SCRIMSHAW NS. Adaptation of lactose maldigesters to continued milk intakes. **Am J Clin Nutr** 1993b; 58: 879-881.

JOHNSON AO, SEMEYA JG, BUCHOWSKI MS, ENWONWU CO, SCRIMSHAW NS. Correlation of lactose maldigestion, lactose intolerance and milk intolerance. **Am J Clin Nutr** 1993a; 57: 399-401.

KERRY KR, ANDERSON C. A ward test for sugar in feces (letter). **Lancet** 1964; 1: 981-982.

KOETSE HA, VONK RJ, PASTERKAMP S, PAL J, BRUIJN S de, STELLAARD F. Variations in colonic H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> production as a cause of inadequate diagnosis of carbohydrate maldigestion in breath tests. **Scand J Gastroenterol** 2000; 35(6): 607-11.

KRETCHMER N, HURWITZ R, RANSOME-KUTI O, DUNGY C. Intestinal absorption of lactose in Nigerian ethnic groups. **Lancet** 1971; 2: 392-395.

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: 647-652.

LEIS R, TOJO R, PAVÓN P, DOUWES A. Prevalence of lactose malabsorption in Galicia. **J Ped Gastroenterol Nutr** 1997; 25: 296-300.

LISKER R. Herencia de mala digestión de lactosa. **Rev Invest Clin** 1996; 48: 23-24.

LÓPEZ P, ROSADO J, PALMA M, GONZÁLES C, VALENCIA ME. Mala digestión de lactosa. **Rev. Invest Clin** 1996; 48: 15-22.

MAIURI L, RAIA V, POTTER J, SWALLOW D, HO MW, FIOCCA R, et al. Mosaic pattern of lactase expression by villus enterocytes in human adult-type hypolactasia. **Gastroenterology** 1991; 100: 359-369.

MAIURI L, ROSSI M, RAIA V, GARIPOLI V, HUGHES LA, SWALLOW D, et al. Mosaic regulation of lactase in human adult-type hypolactasia. **Gastroenterology** 1994; 107: 54-60.

MATTHEWS SB, WAUD JP, ROBERTS AG, CAMPBELL AK. Systemic lactose intolerance: a new perspective on an old problem. **Postgrad Med J** 2005; 81: 167-173.

MOBASSALH M.; MONTGOMERY RH.; BILLER JA.; GRAND JR. Deselopment of Carbohydrate dosorption in the fetus and neonate. *In.*: FEBERBAUM R, FALCÃO M. **Nutrição do Recém Nascido**. São Paulo. Ed. Atheneu, 2003.p. 42.

NAIM HY, STERCHI EE, LENTZE MJ. Biosynthesis and maturation of lactase-phlorizin hydrolase in the humans small intestinal epithelial cells. **Biochem J** 1987; 241: 427-34.

NEWCOMER AD, MCGILL D. Distribution of disaccharidase activity in the small bowel of normal and lactase deficient subjects. **Gastroenterology** 1966b; 51: 481-488.

NEWCOMER AD, MCGILL D. Lactose tolerance tests in adults with normal lactase activity. **Gastroenterology** 1966a; 50: 340-346.

NEWCOMER AD, MCGILL DB, THOMAS P, HOFMANN AF. Prospective comparison of indirect methods for detecting lactase deficiency. **N Engl J Med** 1975; 293: 1232-1236.

O'CONNOR TP, DIAMOND J. Ontogeny of intestinal safety factors: lactase capacities and lactose loads. **Am J Physiol** 1999; 276: R753-65.

OLDS LC, SIBLEY E. PCR-RFLP genotyping assay for a lactase persistence polymorphism upstream of the lactase-phlorizin hydrolase gene. **Genet Test** 2004; 8: 190-193.

PEREIRA AS, MAGALHÃES AFN de, PEREIRA FILHO RA. Teste de sobrecarga com lactose (TSL), no diagnóstico de malabsorção primária de lactose do adulto (MLA). **Rev Bras Patol Clin** 1982: 1-6.

PERMAN SA, MODLER S, BARR RG, et al. Fasting breath hydrogen concentration: Normal values and clinical applications. **Gastroenterology** 1984; 87: 1358.

POULTER M, HOLLOX EJ, HARVEY CB, MULCARE C, PEUHKURI K, KAJANDER K, et al. The causal element for the lactase persistence/non-persistence polymorphism is located in a 1 Mb region of linkage disequilibrium in Europeans. **Ann Hum Genet** 2003; 67: 298-311.

PRETTO FM, SILVEIRA TR, MENEGAZ V, OLIVEIRA J. Má absorção de lactose em crianças e adolescentes: diagnóstico através do teste do hidrogênio expirado com o leite de vaca como substrato. **J Ped** 2002; 78(3): 213-218.

REIS JC, MORAIS MB, FAGUNDES-NETO U. Teste do hidrogênio no ar expirado na avaliação de absorção de lactose e sobrecrescimento bacteriano no intestino delgado de escolares. **Arq Gastroenterol** 1999; 36: 169-176.

RIORDAN SM, McIVER CJ, DUNCOMBE VM, et al. Evaluation of the rice breath hydrogen test for small intestinal bacterial overgrowth. **Am J Gastroenterol** 2000; 95: 2858-64.

ROMAGNUOLO J, SCHILLER D, BAILEY RJ. Using breath tests wisely in a gastroenterology practice: an evidence-based review of indications and pitfalls in interpretation. **Am J Gastroenterol** 2002; 97: 1113-26.

SAHI T, LAUNIALA K. Genetics and epidemiology of adult-type hypolactasia. **Scand J Gastroenterol** 1994b; 29 suppl 202: 7-20.

SAHI T, LAUNIALA K. Hypolactasia and lactase persistence. Historical review and the terminology. **Scand J Gastroenterol** 1994a; 29 suppl 202: 1-6.

SAHI T, LAUNIALA K. More evidence for the recessive inheritance of selective adult type lactose malabsorption. **Gastroenterology** 1977; 73: 231-232.

SAHI T. The inheritance of selective adult-type lactose malabsorption. **Scand J Gastroenterol** 1974; 9(30): 1-73.

SAVILAHTI E, LAUNIALA K, KIUTUNEN P. Congenital lactase deficiency. **Arch Dis Child** 1983; 58: 246-256.

SEVÁ-PEREIRA A, BEIGUELMAN B. Primary lactose malabsorption in healthy Brazilian adult caucasoid, negroid and mongoloid subjects. **Arq Gastroenterol** 1982; 19(3): 133-8.

SEVÁ-PEREIRA A, MAGALHÃES AF, PEREIRA-FILHO RA. Teste de sobrecarga com lactose no diagnóstico de malabsorção primária de lactose do adulto. **Rev Bras Pat Clin** 1982; 18: 1-6.

SEVÁ-PEREIRA A, SILVA RCMA, PEREIRA-FILHO RA. Medida do H<sub>2</sub> expirado no diagnóstico da má absorção de lactose. **Arq Gastroenterol** 1999; 36: 18-26.

SOLOMONS NW, GARCÍA-IBANÑEZ R, VITERI FE. Hydrogen breath test of lactose absorption in adults: the application of physiological doses and whole cow's milk sources. **Am J Clin Nutr** 1980; 33: 545-554.

SPARVOLI AC. **Malabsorção de lactose do adulto. Prevalência na população sulina. Aspectos genéticos e evolutivos do polimorfismo da atividade da lactase.** 1990. 134f. (Tese de Doutorado) – Campinas: Universidade Estadual de Campinas.

STELLAARD F, GEYPENS B. European interlaboratory comparison of breath CO<sub>2</sub> analysis. **Gut** 1998; 43 suppl 3: 2-6.

STONEKING M. Single nucleotide polymorphisms from the evolutionary past. *In.*: ALBERTS B.; JOHNSON A.; LEWIS J.; RAFF M.; ROBERTS K.; WALTER P. VEIGA, Ana beatriz Gorini de, *et al.* (trad.) **Biologia Molecular da Célula**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 464-508.

STROCCHI A, SORGE M, PRANZO L, et al. Intraindividual variability in H<sub>2</sub> production capacity. **Gastroenterol Int** 1988; 1: 593.

SUAREZ FL, SAVAIANO DA, ARBISI P, LEVITT MD. Tolerance to the daily ingestion of two cups of milk by individuals claiming lactose intolerance. **Am J Clin Nutr** 1997; 65: 1502-6.

SUAREZ FL, SAVAIANO DA, LEVITT MD. A comparison of symptoms after the consumption of milk or lactose-hydrolysed milk by people with self-reported severe lactose intolerance. **N Engl J Med** 1995; 333: 1-4.

SWALLOW DM. Genetics of lactase persistence and lactose intolerance. **Annu Rev Genet** 2003; 37: 197-219.

TADESSE K, LEUNG DTY, YUEN RCF. The status of lactose absorption in Hong Kong Chinese children. **Acta Paediatr** 1992; 81: 598-600.

TARLOW MJ, THOM H. A comparison of stool fluid and stool dialysate obtained *in vivo*. **Gut** 1974; 15: 608-13.

TOMLIN J, LOWIS C, READ NW. Investigation of normal flatus production in healthy volunteers. **Gut** 1991; 32: 665-9.

TROELSEN JT. Adult-type hypolactasia and regulation of lactase expression. **Biochimica et Biophysica Acta** 2005; 1723: 19-32.

TRONCON LEA, COLLARES EF, OLIVEIRA RB, PADOVAN W, MENEGHELLI UG. Mal-absorção de lactose em pacientes adultos do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto. **Arq Gastroenterol** 1981; 18: 106-112.

VELIGATI N, TREEM W, SULLIVAN B, BURKE G, HYAMS JS. 10 ppm versus 20 ppm: a reappraisal of diagnostic criteria for breath hydrogen testing in children. **Am J Gastroenterol** 1994; 89: 758-761.

VESA TH, KORPELA RA, SAHI T. Tolerance to small amounts of lactose in lactose maldigesters. **Am J Clin Nutr** 1996; 64: 197-201.

VILLAKO K, MAROOS H. Clinical picture of hypolactasia and lactose intolerance. **Scand J Gastroenterol** 1994; 29 suppl 202: 36-54.

VONK RJ, STELLAARD F, HOEKSTRA H, KOETSE HA. <sup>13</sup>C carbohydrate breath tests. **Gut** 1998; 43 suppl 3: 20-22.

WALKER-SMITH J, MURCH S. Mechanisms of malabsorption and secretion. In: **Diseases of the Small Intestine in Childhood**. 3<sup>a</sup> ed. Oxford: Isis Medical Media Ltd, 1999.p.63-86.

WALKER-SMITH JA. Lactose intolerance. In: GRACEY M, WALKER-SMITH JA. eds. **Diarrheal disease**. Philadelphia: Vevey/Lippincott-Raven, 1997. P. 171-189.

WEHBA J.; FAGUNDES NETO U.. Intolerância aos carboidratos. *In.*: PENNA F. **Gastroenterologia Pediátrica**. 2<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Medsi, 1991. p. 219.

WELSH JD, POLEY JR, BHATIA M, STEVENSON DE. Intestinal disaccharidase activities in relation to age, race and mucosal damage. **Gastroenterology** 1978; 75: 847-855.

# **ANEXOS**

## **ANEXO 1 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

Muitas pessoas, apesar de beberem leite de vaca, não conseguem digerir totalmente o açúcar do leite, chamado lactose. Com isso, podem apresentar algum desconforto como vômitos, cólicas, distensão abdominal e diarreia. O diagnóstico de má absorção de lactose é geralmente feito pelo teste de hidrogênio expirado, que pode causar os mesmos desconfortos mencionados acima.

A finalidade deste estudo é verificar se é possível substituir o teste de hidrogênio expirado pela análise molecular direta das mutações que causam a intolerância, diminuindo assim os possíveis fatores de desconforto dos pacientes que precisam ser submetidos a este exame.

A pesquisa consiste de um exame simples, no qual o indivíduo deve comparecer no 1ª andar do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em jejum de 8hs e irá permanecer no local do exame durante 3hs. Primeiramente a pessoa irá assoprar em uma seringa para coletar o ar expirado basal (jejum), ingerir 50g de lactose diluída em água e após 60 min, 120 min e 180 min da ingestão do açúcar, serão realizadas novas coletas de ar expirado. Neste intervalo o indivíduo irá permanecer em jejum, podendo beber somente água. Também será coletada uma pequena amostra de sangue que será usada para pesquisar as mutações T-13910 e A-22018 no gene da lactase, que é a enzima responsável pela digestão da lactose. Esta coleta é semelhante a que é feita para exames laboratoriais como hemograma e glicemia.



Durante a realização do estudo, as amostras serão identificadas com um código, ao qual somente um dos pesquisadores terá acesso, de modo a poder disponibilizar os resultados a quem os desejar. Após o fim do estudo, todo o material coletado será descartado.

Pelo presente termo de consentimento livre e esclarecido, declaro que autorizo a minha participação neste projeto, pois fui informado dos objetivos e dos procedimentos que serei submetido, como também dos desconfortos e benefícios deste estudo.

Nome: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Pesquisadora: Andréa Cristina da Silva Bulhões - fone: (51) 9954-1998

Pesquisadora responsável: Dr<sup>a</sup> Themis Reverbel da Silveira

**ANEXO 2 - Relação de Genótipos, Fenótipos, resultados do teste H<sub>2</sub> e a presença de sintomas dos 20 indivíduos do Estudo**

<b>Caso n°</b>	<b>Genótipo</b>	<b>Fenótipo referido</b>	<b>Teste H<sub>2</sub></b>	<b>Sintomas</b>
<b>1</b>	CCGG	<b>intolerante</b>	positivo	<b>presente</b>
<b>2</b>	CCGG	<b>intolerante</b>	positivo	<b>presente</b>
<b>3</b>	CCGG	<b>intolerante</b>	positivo	<b>presente</b>
<b>4</b>	CCGG	<b>intolerante</b>	positivo	<b>presente</b>
<b>5</b>	CCGG	<b>intolerante</b>	positivo	<b>presente</b>
<b>6</b>	CCGG	<b>intolerante</b>	positivo	<b>presente</b>
<b>7</b>	CCGG	<b>intolerante</b>	positivo	<b>presente</b>
<b>8</b>	CCGG	<b>intolerante</b>	positivo	<b>presente</b>
<b>9</b>	CCGG	<b>intolerante</b>	positivo	<b>presente</b>
<b>10</b>	CCGG	<b>tolerante</b>	negativo	<b>ausente</b>
<b>11</b>	CTGA	<b>intolerante</b>	negativo	<b>presente</b>
<b>12</b>	CTGA	<b>tolerante</b>	negativo	<b>ausente</b>
<b>13</b>	CTGA	<b>tolerante</b>	negativo	<b>ausente</b>
<b>14</b>	CTGA	<b>tolerante</b>	negativo	<b>ausente</b>
<b>15</b>	CTGA	<b>tolerante</b>	negativo	<b>ausente</b>
<b>16</b>	CTGA	<b>tolerante</b>	negativo	<b>ausente</b>
<b>17</b>	CTAA	<b>tolerante</b>	negativo	<b>ausente</b>
<b>18</b>	TTAA	<b>tolerante</b>	negativo	<b>ausente</b>
<b>19</b>	TTAA	<b>tolerante</b>	negativo	<b>ausente</b>

<b>20</b>	TTAA	<b>tolerante</b>	negativo	<b>ausente</b>
-----------	------	------------------	----------	----------------

**ANEXO 3 - Níveis de hidrogênio expirado nos 9 indivíduos com testes positivos**

<b>Caso nº</b>	<b>Basal</b>	<b>1 hora</b>	<b>2 horas</b>	<b>3 horas</b>
<b>1</b>	7	43	144	93
<b>2</b>	2	86	98	56
<b>3</b>	16	108	82	66
<b>4</b>	5	97	72	83
<b>5</b>	0	44	48	70
<b>6</b>	20	92	95	165
<b>7</b>	14	61	75	100
<b>8</b>	12	32	105	107
<b>9</b>	2	23	38	14

**ANEXO 4 - Níveis de hidrogênio expirado nos 11 indivíduos com testes**

**negativos**

<b>Caso nº</b>	<b>Basal</b>	<b>1 hora</b>	<b>2 horas</b>	<b>3 horas</b>
<b>1</b>	9	8	7	4
<b>2</b>	1	1	0	1
<b>3</b>	2	3	1	1
<b>4</b>	18	8	14	4
<b>5</b>	13	10	11	7
<b>6</b>	9	13	13	18
<b>7</b>	28	14	19	1
<b>8</b>	3	14	3	0
<b>9</b>	0	1	0	0
<b>10</b>	19	12	12	13
<b>11</b>	0	5	2	2

**Anexo 5 - Molecular analysis of lactase-hlorizin hydrolase gene in Brazilian self-reported milk tolerant and intolerant individuals<sup>1</sup>**

Andréa C.S. Bulhões<sup>1,3</sup>, Fernanda S. de Oliveira<sup>2,3</sup>, Ursula S. Matte<sup>2,3</sup>, Helena A.S. Goldani<sup>1,3</sup>  
Rafael Mazzuca<sup>3</sup>, Themis R. Silveira<sup>1,3</sup>.

<sup>1</sup>Post-Graduation Program in Gastroenterology; <sup>2</sup>Gene Therapy Center and <sup>3</sup>Gastroenterology and Hepatology Laboratory – Research Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Corresponding author:

Andréa C.S. Bulhões

Centro de Pesquisas - HCPA

Rua Ramiro Barcelos 2350

90035-903 Porto Alegre – RS

Brazil

Fax: +55 51 2101-8760

E-mail: andreabulhoes@yahoo.com.br

---

<sup>1</sup> Artigo enviado para Revista Clinical Nutrition, em fase de revisão para publicação.

## Summary

*Background & aims:* Persistence of lactase in adults was related to two mutations in lactase phlorizin hydrolase (LPH) gene. This study aimed to compare the hydrogen breath test (HBT) with the presence of these mutations in Brazilian self-reported milk tolerant and intolerant individuals.

*Methods:* Self-reported milk tolerant and intolerant adults underwent HBT after oral ingestion of 50g lactose (equivalent to 1 litre of milk). Molecular analysis for C/T-13910 and G/A-22018 mutations was performed using a PCR-based method.

*Results:* There was significant agreement between the self-reported history of lactose tolerance and the results of HBT. The genotypes CT/GA, CT/AA e TT/AA (lactase persistence) were found in 10 individuals, all of them with negative HBT. The genotype CC/GG (lactase non-persistence) was found in 10 individuals, 9 of them with positive HBT results. There was significant agreement between the presence of mutations in the LPH gene promoter and HBT results. Genotype CT/AA has not been described previously.

*Conclusions:* The present study showed a strong agreement between mutations G/A-22018 e C/T-13910 and HBT. This study corroborates the high levels of agreement between molecular analysis and HBT, suggesting that the molecular test could be used for the diagnosis for adult type primary hypolactasia.

**Keywords:** lactase-phlorizin hydrolase, milk intolerance, lactose intolerance, hydrogen breath test.

## Introduction

Lactose is hydrolyzed in the small intestine into glucose and galactose by the lactase-phlorizin hydrolase (LPH) found in the intestinal villi. Lactose malabsorption consists of a failure on the mechanisms of digestion and absorption of lactose that can be shown by laboratorial tests whereas lactose intolerance is defined as a clinical syndrome caused by lactose ingestion.<sup>1,2</sup>

Adult type hypolactasia is characterized by the fall of lactase activity levels to 5% to 10% of birth levels that occurs during childhood and adolescence. It affects more than 75% of the population worldwide with regional frequencies varying from nearly 5% in northern Europe to more than 90% in some Asian and African countries.<sup>3</sup>

Deficiency of lactase activity measured in enterocytes is the gold-standard diagnosis for lactose malabsorption, however it is an invasive test.<sup>4,5</sup> Amongst non-invasive laboratorial exams for lactose malabsorption diagnosis, the hydrogen breath test (HBT) is widely used. Yet, due to the lactose overload test, it may cause symptoms such as bloating, vomit, abdominal distension, colic, and diarrhea. Sensitivity ranges from 69% to 100% and specificity from 96% to 100% when compared to lactase activity in the intestinal biopsy material.<sup>4,6,7</sup>

Lactase activity is determined by a gene (LPH) found at chromosome 2<sup>8</sup> and its persistence in adult life has dominant autosomal inheritance.<sup>3,9,10</sup> Recently, it has been found that this persistence is due to two mutations (C/T-13910 and G/A-22018) in the LPH gene



promoter region.<sup>11,12</sup> The presence of mutant alleles T-13910 and A-22018 have been related to persistent levels of lactase activity in duodenal biopsy material.<sup>13</sup>

This study aimed to compare the hydrogen breath test (HBT) with the presence of the mutations C/T-13910 and G/A-22018 in the LPH gene in 2 groups of individual self-reported as tolerant and intolerant to milk and lactose-containing milk derivatives.

### **Subjects and Methods**

This study was approved by the Ethical Research Committee of Hospital de Clinicas de Porto Alegre. Informed and written consent was obtained from all subjects.

Adult individuals from Porto Alegre-RS, south of Brazil, were selected, 10 self-reported lactose tolerant and 10 intolerant ones. Sample size was calculated based on the frequency of C allele in individuals with lactose malabsorption of 97%.<sup>11</sup> As there is no data regarding the prevalence of LPH gene mutations in Brazilian population, we calculated 10 subjects for each group, considering confidence interval 95%, power 0.9, and standard error 0.1.

Individuals who were intolerant to lactose were defined as not been able to drink any quantity of milk due to presence of symptoms (nausea, abdominal pain, flatulence) or those able to drink up to 2 glasses of milk (approximately 500ml) during the day.<sup>14</sup> Tolerant

individuals were those reporting being able to drink more than 3 glasses of milk per day without symptoms.

None of the subjects reported history of gastrointestinal disorders associated with secondary lactose intolerance e.g. Crohn's disease, ulcerative colitis, celiac disease, irritable bowel syndrome, diarrhea or use of antibiotics, enemas, laxatives in the 15 days before the exam. All subjects underwent HBT and were classified as with or without lactose malabsorption.

### ***H<sub>2</sub> Breath Test***

Subjects were instructed to fast and avoid smoking for at least 8 hours before HBT. It was performed after oral ingestion of 50g lactose (equivalent to 1 litre of milk) diluted in 250ml of tap water.

Breath H<sub>2</sub> excretion was measured in parts per million (ppm) using a gas chromatographer (*Model 12i Quintron*<sup>®</sup>, Quintron Instrument Company Inc, Milwaukee, USA) at baseline and every 60 min after ingestion of lactose over a period of 180 min. HBT was considered positive (lactose malabsorption) when excretion was higher than 20 ppm compared to baseline. Gastrointestinal symptoms e.g. diarrhea, bloating, abdominal pain, flatulence, and cramping were observed after the test.

### *DNA testing*

For DNA analysis, genomic DNA was isolated from venous blood (*Easy-DNA<sup>TM</sup>*, Invitrogen, USA). For testing the variant C/T-13910, the fragment containing the polymorphic site was amplified by polymerase chain reaction using the following primers: *C/T-for* **5'-AAGACGTAAGTTACCATTTAATAC-3'** and *C/T-rev* **5'-CGTTAATACCCACTGACCTATCCT-3'** and digested with endonuclease *BsmFI* (New England Biolabs, USA). For the detection of G/A-22018 polymorphism, primers used were *G/A-for* **5'-TAAGAACATTTTACACTCTTC-3'** and *G/A-rev* **5'-AGAAAATGGGTTTTTCGCCATG-3'** and the PCR product was digested with *HhaI* (Invitrogen, USA). PCR was performed in Eppendorf Personal ThermoCycler (Eppendorf, Germany), with a final volume of 25 µL using 100 ng of genomic DNA, 1x 500 mM KCl buffer (pH 8.4), 5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM of dNTPset, 20 pmol of each primer and 1 U Taq DNA polymerase – all reagents were purchased from Invitrogen (USA). Annealing temperature was 56<sup>0</sup>C for both polymorphisms. PCR products and digestion fragments were analyzed on 1.5% agarose gel stained with ethidium bromide. A DNA test suggestive for lactase non-persistence was interpreted as CC/GG genotype, while CT or TT and GA or AA genotypes were indicative for lactase persistence.

### *Statistical analysis*

All data were analyzed by SPSS version 10.0 software. HBT values at baseline, 60, 120, and 180 min from subjects with and without lactose malabsorption were compared by Mann-Whitney test. The agreement assessment between HBT and molecular analysis was obtained by the Kappa coefficient, with significant level of 5%.

### **Results**

Out of the 20 individuals enrolled in this study, 18 (90%) were female. All were caucasians, except for one Asian descendent. Overall mean age was  $32.7 \pm 7.3$  years. Mean age of self-reported tolerant subjects was  $32.2 \pm 6.2$  years and  $33.2 \pm 8.6$  years for intolerant ones.

Out of 10 self-reported tolerant subjects, all (100%) had negative HBT and no evidence of gastrointestinal symptoms of lactose intolerance. From the 10 self-reported lactose intolerant subjects, 9 had positive HBT and 1 had a negative result. However, all of these subjects had any of the following symptoms: abdominal distention (n=5), nausea (n=5), flatulence (n=6), diarrhea (n=5). There was high agreement between the self-reported history of tolerance to lactose and the results of HBT ( $\kappa=0.9$ ,  $p<0.001$ ).

HBT levels at baseline, 60, 120, and 180 min from subjects with and without lactose malabsorption are shown in figure 1. Hydrogen breath excretion levels in subjects with lactose malabsorption were significantly higher than in subjects without lactose malabsorption at 60, 120, and 180 min. ( $p < 0.001$ ). The maximum H<sub>2</sub> breath excretion in subjects with lactose malabsorption occurred at 120 min.

Figure 1. Results of Hydrogen Breath Test in self-reported lactose tolerant and intolerant individuals.

Genotype distribution for the mutations G/A (AA, GA e GG) and C/T (TT, CT, CC) among the 20 individuals studied is presented on table 1. Photograph of 1.5% agarose gel with different genotype patterns is shown on figure 2. The genotypes CT/GA, CT/AA e TT/AA, related to the lactase persistence phenotype, were found in 10 individuals (CTGA in 6 of them, CTAA in 1 and TTAA in 3 individuals). All of them showed negative HBT results. The genotype CC/GG, related to lactase non-persistence was found in 10 individuals, 9 of them showed positive HBT results. There was high agreement between the presence of mutations in the LPH gene promoter and HBT results ( $\text{Kappa} = -0.9$  ( $p < 0.001$ )). Genotype CT/AA has not been described previously, and is related to lactase persistence, as it would be expected.

Table 1. Lactase Phlorizin Hydrolase genotype-phenotype correlation and HBT results.

Figure 2. Digested PCR amplification products were analysed on 2.5% agarose gel.

## Discussion

This study assessed the relationship between the presence of mutations C/T-13910 and G/A-22018 in the LPH gene and HBT results on individuals self-reported as milk tolerant and intolerant. There was strong agreement between the presence of these mutations and negative HBT (without lactose malabsorption). Likewise, absence of mutations strongly agreed with positive HBT (lactose malabsorption).

We also found a high degree of agreement between self-reported milk tolerance or intolerance and HBT results. The inclusion criteria used in this study in order to classify individuals as lactose tolerant was the ability to drink at least 3 glasses of milk per day. This criteria was established due to prior studies showing that people with adult type hypolactasia were able to tolerate up to 2 glasses of milk (500ml, 25 g lactose) a day.<sup>14,15</sup> In this study, 50g of lactose orally were used (equivalent to lactose quantity in 1 litre of milk) diluted in 250 ml of water.<sup>16</sup> Self reported lactose intolerance to amounts smaller than two cups of milk a day may not be sufficient to identify lactose malabsorbers as it has been demonstrated in patients with irritable bowel syndrome.<sup>17</sup>

Enattah *et al* studied 9 Finn families and identified two mutations related to lactase persistence (C/T-13910 and G/A-22018)<sup>11</sup>. All non-persistent lactase individuals were homozygous CC/GG. Afterwards, Kuokkanen *et al* described 4 genotypes compared to the

measurement of lactase enzymatic activity: CCGG and CCGA (non persistence of lactase), CTGA and TTAA (persistence of lactase)<sup>13</sup>. In the present study we identified 1 genotype CTAA, not described in the literature yet. This individual, as it would be expected, had negative HBT and no symptoms of lactose intolerance, suggestive of lactase persistence.

In the present study, one out of the 10 subjects with CCGG genotype (lactase non persistence) showed negative H<sub>2</sub> test without symptoms. This could be explained by a slow decrease of lactase levels and hypolactasia could develop later in life. Another explanation could be the possible presence of an intestinal flora that does not produce H<sub>2</sub>.<sup>18,19</sup>

Tolerance to small amounts of lactose by individuals with hypolactasia can be explained by several factors: adaptation of the intestinal flora, colon microbial alteration<sup>20</sup> and ingestion of milk in small amounts throughout a period of time along with other foods.<sup>15</sup> These mechanisms of tolerance could explain the disagreement between symptoms of lactose intolerance and HBT results as high as 47%.<sup>21</sup>

Among all subjects who presented with genotypes of lactase persistence (CTGA, TTAA and CTAA), one CTGA subject presented nausea and abdominal distension during the test, despite negative HBT. The presence of symptoms may suggest a possible secondary cause for lactose intolerance; however, it has not done any further investigation such as gastrointestinal endoscopy.

There are few studies comparing the presence of mutations and HBT, and all of them were made in European countries. In Brazil, prevalence of adult type primary hypolactasia, assessed by lactose tolerance test, varies from 38% in caucasians and 95% in negroids,<sup>19,22</sup> with high regional differences due to Brazilian population ethnic heterogeneity. Regarding the

Brazilian pediatric population, it has been shown a prevalence of 8.4% of lactose malabsorption assessed by HBT.<sup>23</sup> Recently, hypolactasia prevalence of 53% in white individuals and 91% in nonwhite ones was identified by measuring lactase activity by immunohistochemistry in duodenal mucosa.<sup>14</sup>

Recent studies demonstrated that CC genotype agreement with positive HBT results was of 91% to 97%, whereas the correlation between CT and TT genotypes and negative HBT results was from 86% to 89%.<sup>5,7</sup> Molecular analysis for the diagnosis of lactose malabsorption presented positive predictive value of 97% and negative of 86%<sup>7</sup> related to HBT. It also has advantage over HBT as it causes less discomfort to the patient.<sup>24</sup>

The present study showed a strong agreement between mutations G/A-22018 and C/T-13910 and HBT. This study corroborates the high levels of agreement between molecular analysis and HBT in a heterogeneous ethnic background. It can be suggested that the molecular test could be used for the diagnosis for adult type primary hypolactasia for both clinical and populational settings.

### **Acknowledgements**

This study has been supported by grant from Fundo de Incentivo a Pesquisa (FIPE) and Grupo de Pesquisa e Pós-graduação (GPPG) – Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil.



## References

1. Walker-Smith JA. Lactose intolerance. In: Gracey M, Walker-Smith JA. eds. *Diarrheal disease*. Philadelphia: Vevey/Lippincott-Raven, 1997: 171-189.
2. Auricchio S, Troncone R. Genetically determined disaccharidase deficiencies. In: Walker WA, Durie P, Hamilton JR, Walker-Smith JA, Watkins JB, eds. *Pediatric Gastrointestinal Disease*. Ontario: BC Decker Inc, 2000: 677-700.
3. Sahi T, Launiala K. Hypolactasia and lactase persistence. Historical review and the terminology. *Scand J Gastroenterol (Suppl)* 1994; **202**: 1-6.
4. Newcomer AD, McGill DB, Thomas P, et al. Prospective comparison of indirect methods for detecting lactase deficiency. *N Engl J Med* 1975; **293**: 1232-1236.
5. Büning C, Genschel J, Jurga J, et al. Introducing genetic testing for adult-type hypolactasia. *Digestion* 2005; **71**: 245-250.
6. Arola H, Koivula T, Jokela H, et al. Comparison of indirect diagnostic methods for hypolactasia. *Scand J Gastroenterol* 1988; **23**: 351-357.
7. Högenauer C, Hammer HF, Melitzer K, et al. 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**: 371-376.

8. Arola H, Tamm A. Metabolism of lactose in the human body. *Scand J Gastroenterol (Suppl)* 1994; **202**: 21-25.
9. Sahi T, Launiala K. Genetics and epidemiology of adult-type hypolactasia. *Scand J Gastroenterol (Suppl)* 1994; **202**: 7-20.
10. Lisker R. Herencia de mala digestión de lactosa. *Rev Invest Clin* 1996; **48**: 23-24.
11. Enattah NS, Sahi T, Savilahti E, et al. Identification of a variant associated with adult-type hypolactasia. *Nat Genet* 2002; **30**: 233-237.
12. Olds LC, Sibley E. Lactase persistence DNA variant enhances lactase promoter activity in vitro: functional role as a cis regulatory element. *Hum Mol Genet* 2003; **12**: 2333-2340.
13. Kuokkanen M, Enattah NS, Oksanen A, et al. Transcriptional regulation of the lactase-phlorizin hydrolase gene by polymorphisms associated with adult-type hypolactasia. *Gut* 2003; **52**: 647-652.
14. Escoboza PM, Fernandes MI, Peres LC, et al. Adult-type hypolactasia: clinical, morphologic and functional characteristics in Brazilian patients at a University Hospital. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2004; **39**: 361-365.
15. Suarez FL, Savaiano DA, Arbisi P, et al. Tolerance to the daily ingestion of two cups of milk by individuals claiming lactose intolerance. *Am J Clin Nutr* 1997; **65**: 1502-1506.
16. Briet F, Pochart P, Marteau P. Improved clinical tolerance to chronic lactose ingestion in subjects with lactose intolerance: a placebo effect? *Gut* 1997; **41**: 632-635.

17. Vernia P, Marinaro V, Argnani F, et al. Self-reported milk intolerance in irritable bowel syndrome: what should we believe? *Clin Nutr* 2004; **23**: 996-1000.
18. Tomilin J, Lowis C, Read NW. Investigation of normal flatus production in healthy volunteers. *Gut* 1991; **32**: 665-669.
19. Sevá-Pereira A, Silva RCMA, Pereira-Filho RA. Lactose malabsorption diagnosis with H<sub>2</sub> breath test. *Arq Gastroenterol* 1999; **36**: 18-26.
20. Herzler SR, Savaiano DA. Colonic adaptation to daily lactose feeding in lactose maldigesters reduces lactose intolerance. *Am J Clin Nutr* 1996; **64**: 232-236.
21. Carroccio A, Montalto G, Cavera G, et al. Lactose intolerance and self-reported milk intolerance: Relationship with lactose maldigestion and nutrient intake. *J Am Coll Nutr* 1998; **17**:631-6.
22. Troncon LEA, Collares EF, Oliveira RB, et al. Lactose malabsorption in adult patients at the Hospital das Clinicas de Ribeirao Preto. *Arq Gastroenterol* 1981; **18**: 106-112.
23. Pretto FM, Silveira TR, Menegaz V, et al. Lactose malabsorption in children and adolescents: diagnosis through breath hydrogen test using cow milk. *J Pediatr (Rio J)* 2002; **78**: 213-218.
24. Matthews SB, Waud JP, Roberts AG, et al. Systemic lactose intolerance: a new perspective on an old problem. *Postgrad Med J* 2005; **81**: 167-173.

Table 1. Lactase Phlorizin Hydrolase genotype-phenotype correlation and HBT results.

<b>Genotype</b>	<b>n = 20</b>	<b>Self-reported phenotype</b>	<b>H<sub>2</sub> excretion</b>
CCGG	n = 9	lactose intolerant	Positive
	n = 1	lactose tolerant	Negative
CTGA	n = 1	lactose intolerant	Negative
	n = 5	lactose tolerant	Negative
CTAA	n = 1	lactose tolerant	Negative
TTAA	n = 3	lactose tolerant	Negative

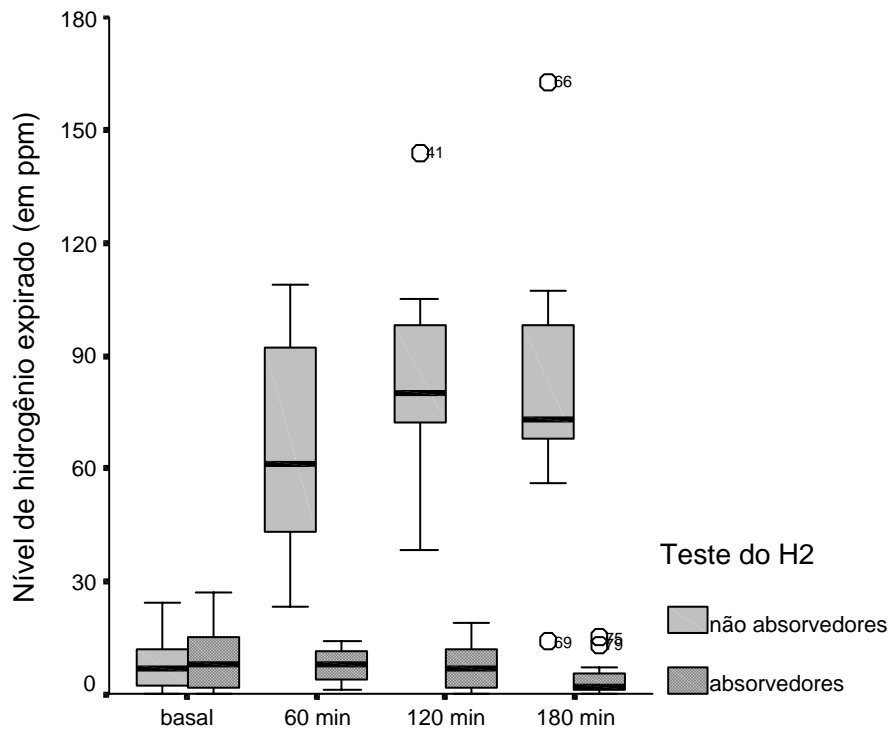


Figure 1. Results of Hydrogen Breath Test in self-reported lactose tolerant and intolerant individuals.

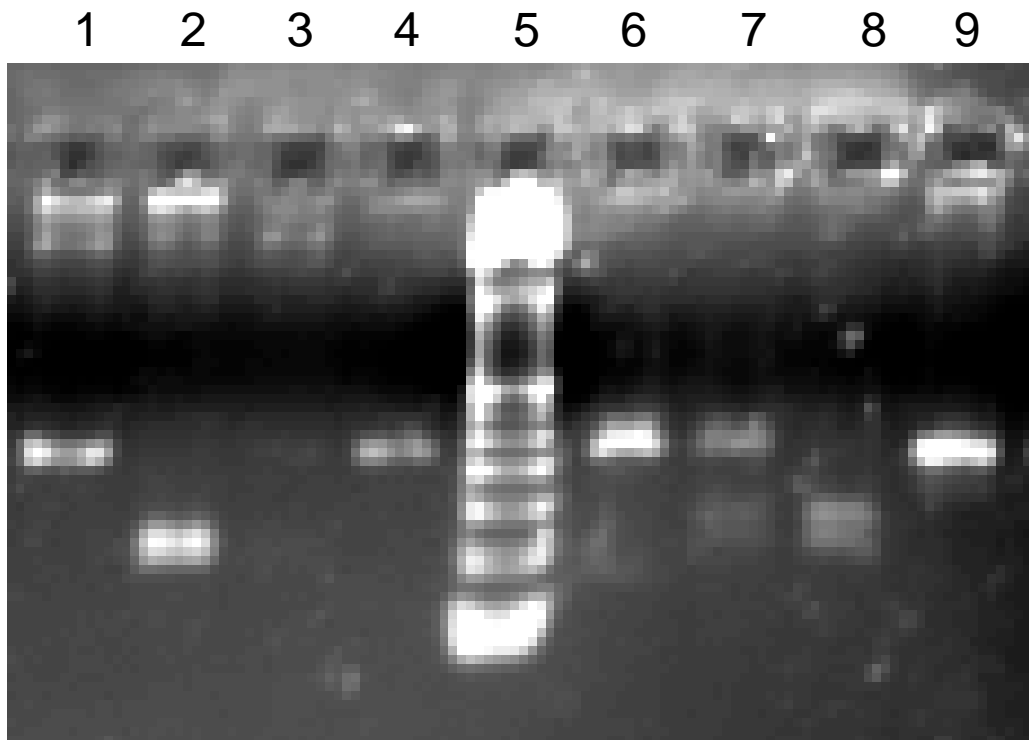


Figure 2. Digested PCR amplification products were analysed on 2.5% agarose gel. Lanes 1 and 9 show no digested PCR product. Lanes 2 and 6 show  $CC_{13910}$  e  $GG_{22018}$  homozygous lactase non-persistent genotypes; 4 and 8 show  $TT_{13910}$  and  $AA_{22018}$  homozygous lactase persistent genotypes; 3 and 7 show  $CT_{13910}$  and  $GA_{22018}$  heterozygous lactase persistent genotypes. The 50 bp DNA ladder is on lane 5.