

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

PAULO ROBERTO LINS PONTE

**AVALIAÇÃO DO TESTE QUÍMICO NO DIAGNÓSTICO DE
INTOLERÂNCIA À LACTOSE E SUA ASSOCIAÇÃO COM
POLIMORFISMO GENÉTICO EM UMA POPULAÇÃO DE
FORTALEZA/CE**

FORTALEZA

2012

PAULO ROBERTO LINS PONTE

**AVALIAÇÃO DO TESTE QUÍMICO NO DIAGNÓSTICO DE
INTOLERÂNCIA À LACTOSE E SUA ASSOCIAÇÃO COM
POLIMORFISMO GENÉTICO EM UMA POPULAÇÃO DE
FORTALEZA/CE**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia. Área de Concentração: Farmacologia clínica

Orientador: Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima

FORTALEZA

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

-
- P857a Ponte, Paulo Roberto Lins.
Avaliação do teste químico no diagnóstico de intolerância à lactose e sua associação com polimorfismo genético em uma população de Fortaleza,CE / Paulo Roberto Lins Ponte. – 2012.
123 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Farmacologia, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2012.
Orientação: Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira.
1. Intolerância à Lactose. 2. Diagnóstico. 3. Polimorfismo Genético. 4. Alelos. I. Título.

PAULO ROBERTO LINS PONTE

**AVALIAÇÃO DO TESTE QUÍMICO NO DIAGNÓSTICO DE
INTOLERÂNCIA À LACTOSE E SUA ASSOCIAÇÃO COM
POLIMORFISMO GENÉTICO EM UMA POPULAÇÃO DE
FORTALEZA/CE**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia clínica

Aprovada em: 30/10/2012

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima (Orientador)
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dr. Alberto Melo Soares
Universidade Federal do Ceará - UFC

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder inúmeras graças. Obrigado pela vida.

Ao meu pai, José Ribamar, que é meu referencial de vida.

À minha mãe, Maria do Socorro, que estará sempre em meu coração.

A Joselany, minha companheira, que está comigo em todos os momentos. Obrigado por estar ao meu lado.

À minha família, sempre presente. Meus laços eternos.

Ao Dr. Aldo Ângelo, pelo conhecimento, pela paciência, disponibilidade e amizade. Obrigado por auxiliar o meu crescimento e pela oportunidade.

Ao Dr. Alexandre Havt, por sempre ter-se mostrado disponível em tirar minhas dúvidas e em colaborar na realização dos testes genéticos.

Aos pacientes que compreenderam a finalidade do estudo e concordaram em participar da pesquisa.

Aos profissionais que contribuíram com a pesquisa. Obrigado pela atenção.

Aos membros da banca examinadora, pelas importantes contribuições para o aprimoramento deste trabalho.

Ao laboratório Clementino Fraga, nas pessoas da Dra Maria Nazaré Amaral Tomé e do técnico Sr. Gustavo Carvalho, pelo apoio na realização dos testes químicos, pois sua contribuição foi imprescindível para o alcance dos meus objetivos.

A Diorlene Oliveira, pela análise estatística.

Ao Pedro Henrique e à equipe do LDI, pelo auxílio prestado durante o estudo de genotipagem.

À Secretária do Programa de Pós-Graduação, Aura, pelo trabalho prestativo, pelas orientações técnicas e pelas informações acadêmicas.

Enfim, a todos que contribuíram de forma direta ou indireta na realização deste trabalho.

RESUMO

Introdução. A intolerância à lactose é uma síndrome clínica composta por um ou mais cortejos sintomatológicos associados à ingestão de lácteos (fenótipo clínico intolerante) e tolerância à lactose na ausência desses sintomas (fenótipo clínico tolerante). Assim, na prática clínica, deve-se estar atento aos casos semelhantes a essa sintomatologia disabsortiva, pois as convergências e diferenças entre esses distúrbios são tênues e os diagnósticos muitas vezes são imprecisos, tornando o tratamento e a conduta insatisfatórios. Portanto, são necessários estudos que utilizem diferentes métodos diagnósticos, assim como comparar os diferentes métodos utilizados na prática clínica e averiguar o mais apropriado para dar o diagnóstico conclusivo, uma vez que nem sempre é fácil, haja vista que os sintomas sugerem outras doenças. **Objetivo.** Avaliar as características fenotípicas, a resposta ao teste químico de tolerância à lactose e genótipo de pacientes com hipótese diagnóstica de intolerância à lactose e a correlação entre eles. **Material e métodos.** Foi realizado um estudo transversal no Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC), com 173 pacientes que apresentavam fenótipo positivo e foram atendidos no serviço do ambulatório dos servidores do HUWC, no período de janeiro a agosto de 2010. A amostra final foi composta por 119 pacientes que realizaram o teste de tolerância à lactose e genotipagem do gene da florizina-lactase hidrolase (LPH). **Resultados.** Dentre os participantes, a maioria era: do sexo feminino, 54,6% (65 casos); da faixa etária de 46-55 anos, 26,5% (32 casos); casada, 65,6% (78 casos); de cor parda, 53,8% (65 casos); de nível superior, 42,9% (51 casos). A prevalência de intolerância à lactose foi de 45,4% e a de intolerância química foi de 73,9%. Os sintomas investigados que apresentaram maior prevalência no intolerante à lactose foram: flatulência, 81,4% (44 casos); empachamento, 68,5% (37 casos); borborigmo, 59,3% (32 casos); e diarreia, 46,3% (25 casos). A presença dos polimorfismos C>T-13910 e polimorfismos G>A-22018 no gene da LPH foi identificada nos indivíduos autorreferidos como intolerantes à lactose, sendo, portanto, um excelente exame para o diagnóstico. O diagnóstico de intolerância à lactose que mais se apresentou adequado foi a diferença basal <15 com a curva de ROC maior que 80,3%, com boa sensibilidade e especificidade. **Conclusões.** Observa-se uma correlação genotípica e química entre os indivíduos intolerantes, sugerindo que o teste

molecular poderia ser proposto para o diagnóstico laboratorial de intolerância à lactose, e, no teste químico, a diferença basal <15 foi a mais adequada.

Palavras-Chave: Intolerância à lactose. Diagnóstico. Polimorfismo genético. Alelos.

ABSTRACT

Introduction. Intolerance to lactose is a clinical syndrome comprising one or more corteges symptomatology associated with the ingestion of milk (clinical phenotype intolerant) and lactose tolerance in the absence of symptoms (clinical phenotype tolerant). Thus, in practice, must be attentive to cases similar to these badly absorptive symptoms because the convergences and differences between these disorders are tenuous and diagnoses are often inaccurate, making treatment and unsatisfactory conduct. Therefore, studies are needed using different diagnostic methods, and compare the different methods used in clinical practice and determine the most appropriate to give a conclusive diagnosis, since it is not always easy, given that the symptoms suggest other diseases. **Objective.** To evaluate the phenotypic characteristics, the response to chemical test for lactose tolerance and the genotype of patients with diagnostic hypothesis of intolerance to lactose and the correlation between them. **Material and methods.** We conducted a cross-sectional study at the University Hospital Walter Cantidio (HUWC), with 173 patients who had positive phenotype and were seen at the outpatient service of servers HUWC, from January to August 2010. The final sample consisted of 119 patients who underwent the lactose tolerance test and genotyping of the gene for lactase-phlorizin hydrolase (LPH). **Results.** Among the participants, most were: female, 54.6% (65 cases), the age group of 46-55 years old, 26.5% (32 cases); married, 65.6% (78 cases); dun-colored, 53.8% (65 cases); higher level, 42.9% (51 cases). The prevalence of intolerance to lactose was 45.4% and chemical intolerance was 73.9%. Symptoms investigated more prevalent in lactose intolerant were flatulence 81.4% (44 cases); bloating, 68.5% (37casos); borborygmus, 59.3% (32 cases) and diarrhea, 46, 3% (25 cases). The presence of the polymorphisms C> T polymorphisms and 13 910-G> A-22018 in LPH gene was identified in individuals selfreferred as lactose intolerant, and is therefore an excellent test for the diagnosis. The diagnosis of lactose intolerance that most had adequate baseline the difference was <15 with ROC curve greater than 80.3%, with good sensitivity and specificity. **Conclusions.** There is a correlation between genotype and chemical intolerant individuals, suggesting that the molecular test

could be proposed for the laboratory diagnosis of lactose intolerance, and the chemical test, the difference basal <15 was more appropriate.

Keywords: Intolerance to lactose. Diagnosis. Genetic polymorphism. Alleles.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Representação simplificada da molécula da lactose	20
Figura 2 –	Etapas de coleta de dados	45
Figura 3 –	Sequência da seleção da amostra do estudo	54
Figura 4 –	Síntese do resultado do estudo	98
Figura 5 –	Protocolo de investigação clínica de disabsorção	113

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Área sob a curva ROC da diferença (Δ máximo - basal) < 15 e o diagnóstico de intolerância	69
Gráfico 2 - Área sob a curva ROC da diferença (Δ máximo - basal) < 20 e o diagnóstico de intolerância	70
Gráfico 3 - Área sob a curva ROC da diferença (Δ máximo - basal) < 25 e o diagnóstico de intolerância	71
Gráfico 4 - Área sob a curva ROC da diferença (Δ máximo - basal) < 15 e nos genótipos tolerantes no polimorfismo C/T-13910	80
Gráfico 5 - Área sob a curva ROC da diferença (Δ máximo - basal) < 20 e nos genótipos tolerantes no polimorfismo C/T-13910	81
Gráfico 6 - Área sob a curva ROC da diferença (Δ máximo - basal) < 25 e nos genótipos tolerantes no polimorfismo C/T-13910	81
Gráfico 7 - Área sob a curva ROC da diferença (Δ máximo - basal) (Δ máximo - basal) < 15 e nos genótipos tolerantes no polimorfismo A/G-22018	85
Gráfico 8 - Área sob a curva ROC da diferença (Δ máximo - basal) < 20 e nos genótipos tolerantes no polimorfismo A/G alelo-22018	85
Gráfico 9 - Área sob a curva ROC da diferença (Δ máximo - basal) < 25 e nos genótipos tolerantes no polimorfismo A/G-22018	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sumário da digestão dos carboidratos	18
Tabela 2 - Sequência dos <i>primers</i> específicos utilizados neste estudo	51
Tabela 3 - Características sociodemográficas da população de estudo (n = 119). Hospital Universitário Walter Cantídio. Fortaleza/CE, janeiro a agosto de 2010	56
Tabela 4 - Distribuição das características clínicas identificadas e do fenótipo intolerante na população de estudo (n = 119). Hospital Universitário Walter Cantídio. Fortaleza/CE, janeiro a agosto de 2010	58
Tabela 5 - Associação entre as características clínicas identificadas e do fenótipo intolerante na população de estudo (n = 119). Hospital Universitário Walter Cantídio. Fortaleza/CE, janeiro a agosto de 2010	60
Tabela 6 - Distribuição proporcional das características clínicas e o relato de diarreia na população de estudo (n=119). Hospital Universitário Walter Cantídio. Fortaleza/CE, agosto a dezembro de 2010	62
Tabela 7– Associação bruta entre os sintomas relatados pelos pacientes e a presença de diarreia (n=119). Hospital Universitário Walter Cantídio. Fortaleza/CE, agosto a dezembro de 2010	64
Tabela 8–Distribuição proporcional da diferença Δ máximo - basal (15, 20, 25) e o fenótipo intolerante na população do estudo (n=119). Hospital Universitário Walter Cantídio. Fortaleza/CE, agosto a dezembro de 2010	66
Tabela 9 – Associação entre a diferença Δ máximo - basal (15, 20, 25) e o fenótipo intolerante na população de estudo (n=119). Hospital Universitário Walter Cantídio. Fortaleza/CE, agosto a dezembro de 2010	67
Tabela 10 - Sensibilidade, especificidade e valor preditivo positivo e negativo das diferenças Δ máximo - basal(15, 20, 25) na população de estudo (n = 119). Hospital Universitário Walter Cantídio. Fortaleza/CE, agosto a dezembro de 2010	68
Tabela 11 - Distribuição proporcional dos genótipos avaliados e o fenótipo intolerante na população de estudo (n = 119). Hospital Universitário Walter Cantídio. Fortaleza/CE, janeiro a agosto de 2010	72
Tabela 12 - Associação entre o genótipo intolerante e fenótipo intolerante na população de estudo (n = 119). Hospital Universitário Walter Cantídio. Fortaleza/CE, janeiro a agosto de 2010	75
Tabela 13 - Distribuição proporcional da diferença Δ máximo - basal(15,20,25) e o polimorfismo C/T-13910 na população de estudo (n = 119). Hospital Universitário Walter Cantídio. Fortaleza/CE, agosto a	76

dezembro de 2010

Tabela 14 - Associação entre a diferença Δ máximo - basal(15, 20, 25) e o polimorfismo C/T-13910 na população de estudo (n=119). Hospital 78
Universitário Walter Cantídio. Fortaleza/CE, agosto a dezembro de 2010

Tabela 15 - Sensibilidade, especificidade e valor preditivo positivo e negativo das diferenças Δ máximo - basal(15, 20, 25) na população de estudo (n = 119). Hospital 79
Universitário Walter Cantídio. Fortaleza/CE, agosto a dezembro de 2010

Tabela 16 - Distribuição proporcional da diferença Δ máximo - basal (15,20,25) e o polimorfismo A/G-22018 na população de estudo, Hospital 82
Universitário Walter Cantídio. Fortaleza/CE, agosto a dezembro de 2010

Tabela 17 - Associação entre a diferença Δ máximo - basal(15,20,25) e o polimorfismo A/G-22018 na população de estudo (n = 119). Hospital 83
Universitário Walter Cantídio. Fortaleza/CE, agosto a dezembro de 2010

Tabela 18 - Sensibilidade, especificidade e valor preditivo positivo e negativo da diferença Δ máximo - basal(15, 20, 25) na população de estudo (n = 119). Hospital 84
Universitário Walter Cantídio. Fortaleza/CE, agosto a dezembro de 2010

Tabela 19 - Associação bruta entre fenótipo e genótipo intolerante e o teste químico dos pacientes na presença de diarreia (n = 119). Hospital 87
Universitário Walter Cantídio. Fortaleza/CE, janeiro a agosto de 2010

Tabela 20 - Associação bruta entre fenótipo e genótipo intolerante, o teste químico dos pacientes e a presença de empachamento (n = 119). Hospital 89
Universitário Walter Cantídio. Fortaleza/CE, janeiro a agosto de 2010

Tabela 21 - Associação bruta entre fenótipo e genótipo intolerante e o teste químico dos pacientes e a presença de flatulência (n = 119). Hospital 91
Universitário Walter Cantídio. Fortaleza/CE, janeiro a agosto de 2010

Tabela 22 - Associação bruta entre fenótipo e genótipo intolerante e o teste químico dos pacientes e a presença de borborismos (n = 119). Hospital 93
Universitário Walter Cantídio. Fortaleza/CE, janeiro a agosto de 2010

Tabela 23 - Associação entre fenótipo e genótipo intolerante e o teste químico dos pacientes e a presença de constipação (n = 119). Hospital 95
Universitário Walter Cantídio. Fortaleza/CE, janeiro a agosto de 2010

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	Digestão, absorção e transporte dos carboidratos	17
1.2	Digestão e absorção de lactose	19
1.3	Definição de termos	22
1.4	Influência da etnia na deficiência primária de lactase do tipo adulto (hipolactasia primária)	24
1.5	Polimorfismos associados com a hipolactasia do tipo adulto	27
1.6	Revisão dos métodos de diagnósticos	29
1.6.1	Teste do pH fecal e pesquisa de substâncias redutoras nas fezes	30
1.6.2	Teste de tolerância à lactose	31
1.6.3	Teste de tolerância à lactose com etanol	31
1.6.4	Teste respiratório com ¹⁴ C – lactose	31
1.6.5	Teste respiratório com ¹³ C – lactose	32
1.6.6	Teste do hidrogênio expirado	32
1.6.7	Biopsia Intestinal e medida da atividade da lactase	34
1.6.8	Genotipagem do Polimorfismo Lactase-Florizina Hidrolase	34
2	JUSTIFICATIVA	37
3	OBJETIVOS	41
3.1	Objetivo geral	41
3.2	Objetivos específicos	41
4	CASUÍSTICA E MÉTODOS	42
4.1	Delineamento do estudo	42
4.2	Local	43
4.3	População-alvo e Amostra	43
4.3.1	Critérios de inclusão	43

4.3.2	Critérios de exclusão	43
4.4	Desenho do estudo	44
4.5	Descrição das variáveis e conceitos	46
4.6	Provas diagnósticas	47
4.6.1	O teste de tolerância à lactose	47
4.6.2	Genotipagem do polimorfismo Florizina-Lactase Hidrolase	47
4.6.3	Extração de DNA sanguíneo	47
4.6.4	Amplificação por reação de polimerase em cadeia (PCR)	48
4.6.4.1	Técnica do Reação em Cadeia da Polimerase	49
4.6.4.2	Purificação dos produtos de PCR	49
4.6.4.3	Sequenciamento	50
4.7	Processamento e análise dos dados	51
4.8	Aspectos Éticos	53
5	RESULTADOS	54
5.1	Características sociodemográficas da amostra do estudo	55
5.2	Características clínicas e fenótipo intolerante	57
5.3	Associação das características clínicas com o sintoma relatado de diarreia pelos pacientes (fenótipo intolerante)	61
5.4	Resultado do teste químico de intolerância à lactose	65
5.5	Genótipo intolerante	72
5.6	Associação bruta de cada um dos sintomas relatados pelos pacientes e os testes aplicados (fenótipo e genótipo intolerante e o teste químico)	88
6	DISCUSSÃO	99
7	CONCLUSÕES	111
	REFERÊNCIAS	114
	APÊNDICES	

1 INTRODUÇÃO

1.1 Digestão, absorção e transporte dos carboidratos

Os açúcares são importante fonte energética para o ser humano, constituindo atualmente cerca de 40% a 50% da ingestão calórica diária dos ocidentais (EVANS et al., 1998). E os carboidratos usados geralmente na dieta humana ocidental são: amido (grãos e cereais)– 50%, sacarose (cana de açúcar)–30%, lactose (leite e derivados)–10%, e maltose (malte)–2%. O restante está distribuído em quantidades variáveis nas formas de glicogênio, celulose, hemicelulose e pectina, que não são hidrolisadas no sistema gastrointestinal de humanos; esses carboidratos formam as chamadas fibras (TESTER; KARKALAS; QI, 2004).

A quantidade de carboidratos da dieta humana pode variar de acordo com a idade e a herança cultural do indivíduo, fatores geográficos e socioeconômicos. Além disso, o tipo de carboidrato consumido varia conforme a diversidade da dieta, entretanto a maioria dos alimentos contém carboidratos, tais como pão, batatas, massas, doces, arroz, frutas e vegetais.

Parece, então, por demais evidente a importância da digestão dos carboidratos na fisiologia do homem, onde a hidrólise do amido inicia-se na boca com a ação α -amilase (ptialina) de apenas 3 a 5%, e continua a nível do estômago, onde a α -amilase salivar pode hidrolisar até 75% do amido ingerido, resultando os dissacarídeos, maltose, maltotriose e α -limite dextrina. Depois, já no duodeno, com a ação da α -amilase pancreática, o amido está completamente hidrolisado. A hidrólise final dos di e trissacarídeos e da α -limite dextrina se dá pelas oligossacaridasas da borda em escova: maltase, lactase, sacarase e α -dextrinase (ou isomaltose) e trealase. Portanto, a digestão final dos polissacarídeos se faz por estas enzimas da membrana luminal (SANIOTO, 2012).

As enzimas da borda em escova têm especificidades para vários substratos. Assim, as α -dextrinases hidrolisam quase 95% das α -limites dextrinas. Estas também podem ser hidrolisadas (cerca de 5%) pela maltase,

embora apenas as α -dextrinas hidrolisem as ligações α [1-6]-glicosídicas. A maltotriose pode ser hidrolisada tanto pela α -dextrina (50%) como pela maltase (25%) e pela sacarase (25%). As mesmas enzimas hidrolisam a maltose em proporções similares. As únicas enzimas da borda em escova com especificidade para os seus substratos são a lactose, trealose e sacarose, que são 100% hidrolisadas pela lactase, trealase e sacarase, respectivamente (SANIOTO, 2012). Na Tabela 1, há a descrição da digestão dos carboidratos.

Tabela 1 - Sumário da digestão dos carboidratos

	α -dextrina		Maltotriose	Maltose	Lactose	Sacarose	Trealose
	α 1,6	α 1,4					
Glicoamilase	5%	60%	25%	25%	-	-	-
Sucrase	-	20%	25%	25%	-	100%	-
Isomaltase	95%	20%	50%	50%	-	-	-
Trealase	-	-	-	-	-	-	100%
Lactase	-	-	-	-	100%	-	-
PRODUTOS	GLI	GLI	GLI	GLI+GLI	GLI/GAL	GLI/FRU	GLI

Nota: GAL=galactoseFRU=Frutose GLI=glicose

Os produtos finais da digestão dos carboidratos pelas enzimas luminiais e da borda em escova são glicose (de 70 a 80%), frutose (cerca de 15%) e galactose (aproximadamente 5%) (SANIOTO, 2012), que são absorvidos em duas etapas, mediadas por carregadores presentes nas duas membranas dos enterócitos. Na membrana luminal a glicose e a galactose são absorvidas para dentro do enterócito por um sistema de transporte ativo, utilizando um carreador Na^+ dependente, SLGT-1; e para fora do enterócito suas absorções são realizadas por difusão facilitada utilizando um carreador Na^+ independente localizado na membrana basolateral, GLUT-2. Já a frutose é transportada através da membrana luminal por difusão facilitada, independente de acoplamento com o Na^+ e mediada pelo GLUT-5, porém em pequena porcentagem também é transportada pelo mediador GLUT-2 (JOHNSON, 2007).

A glicose pode ser absorvida para a corrente sanguínea através da mucosa do intestino, e, uma vez na corrente sanguínea, a glicose vai para o fígado, onde é armazenada ou utilizada para gerar energia para o funcionamento do corpo. E a frutose livre é pouco absorvida tanto por crianças quanto por adultos (BAUDON et al. 1996).

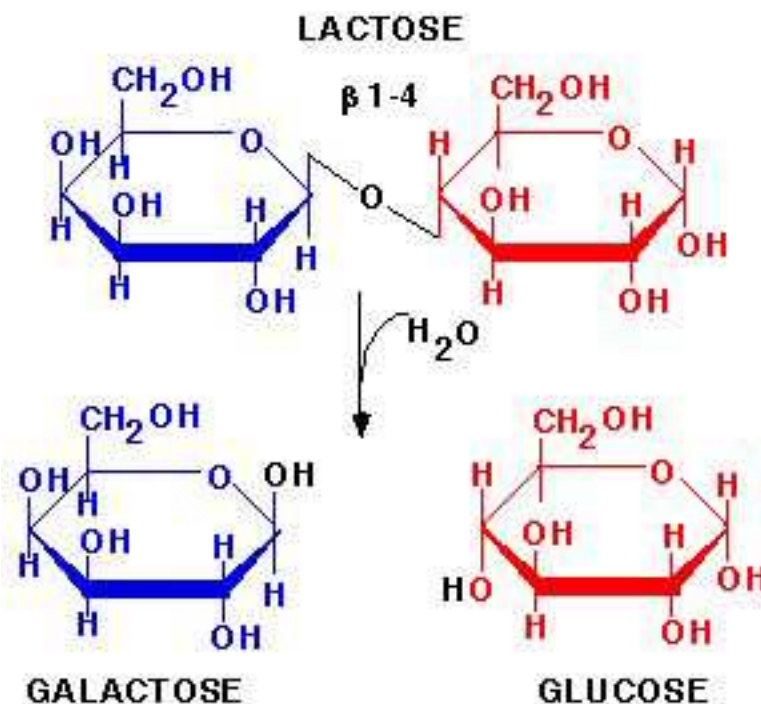
As atividades das enzimas da borda em escova são mais elevadas no duodeno e no jejuno proximal, decaindo ao longo do delgado no sentido cefalocaudal. Isso significa que a digestão dos carboidratos completa-se já no jejuno proximal (SANIOTO, 2012).

1.2 Digestão e absorção de lactose

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 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. O conteúdo de lactose do leite nas várias espécies é proporcional à atividade da alfa-lactoalbumina (BULHÕES, 2006).

Durante o processo de digestão, a lactose é hidrolisada no intestino delgado em monossacarídeos: glicose e galactose, que são unidas pela ligação do carbono-1 da galactose com o carbono-4 da glicose, requerendo, para sua absorção, hidrólise prévia no intestino delgado por uma β -galactosidase da borda em escova, comumente chamada lactase (INGRAM et al., 2009; VESA, MARTEAU, KORPELA, 2000). A Figura 1 demonstra a representação simplificada da molécula de lactose, e glicose e galactose.

Figura 1 - Representação simplificada da molécula da lactose e consequente hidrólise, resultando nos monossacarídeos glicose e galactose(.)



A lactase 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 luminal microvilositária, na sua forma madura: lactase-florizina hidrolase, uma molécula com atividade hidrolítica e peso molecular de 130-160 kD, a qual situa-se na extremidade da vilosidade, sendo, portanto, muito vulnerável a lesões de mucosa (LEIS et al., 1997; WALKER SMITH, 1997). Essa enzima apresenta alta atividade no jejuno proximal; baixa atividade no duodeno e no jejuno distal; e atividade muito baixa no íleo terminal (VESA, MARTEAU, KORPELA, 2000). Esses monossacarídeos serão absorvidos através de transporte ativo dependente de sódio (ALLIET, KRETCHMER, LEBENTHAL, 1989; SABRÁ, 1994).

A atividade da lactase é detectada a partir do terceiro mês de gestação. Essa enzima possui um comportamento variável em sua atividade,

apresentando o máximo de sua atividade logo após o nascimento. Com o avançar da idade, ela sofre tanto redução de atividade quanto de concentração (SALGADO, RESENDE, FERRARI, 2007). Essa redução de síntese e ação é irreversível e geneticamente programada, fato este observado na maioria dos grupos populacionais (SCRIMSHAW; MURRAY, 1988; MONTATLO et al., 2006; WANG et al., 1998). No sétimo mês, sua concentração equivale a 30% da encontrada em recém-nascidos a termo (ALLIET, KRETCHMER, LEBENTHAL, 1989). No entanto, a partir dos 5 anos, há uma redução da atividade e da concentração da lactase no intestino delgado, determinando a má absorção da lactose, que é a incapacidade da sua digestão. Quando inexistente lactase no intestino ou o seu nível é inadequado para quebrar tais ligações, o organismo tem reações que variam de sintomas digestivos diversos a alterações imunológicas.

Entretanto, essa atividade e concentração enzimáticas podem persistir durante toda a vida em uma minoria de humanos. Isso resulta no fenótipo de intolerância à lactose. Tanto a persistência da lactase como o seu desaparecimento ou redução de sua concentração e atividade são determinadas geneticamente e as frequências variam entre as populações de acordo com as diferenças geográficas e étnicas.

Mesmo em indivíduos aparentemente saudáveis, a atividade da lactase costuma ser a menor de todas as dissacaridases (AURICCHIO; TRONCONE, 2000). Assim, a intolerância à lactose é o tipo mais comum de intolerância a carboidratos e afeta uma grande proporção da população mundial. Sua prevalência difere em várias partes do mundo, desde 3% a 8% na população da Escandinávia e noroeste da Europa até 50 a 100% na população do Sudeste Asiático. Na Europa, a prevalência de intolerância chega a 70% no sul da Itália e Turquia (FARUP, MONSBAKKEN, VANDVIK, 2004; DENSUPSOONTORN et al., 2004; GUDMAND-HOYER, 1994).

Dado esse contexto, diversos estudos têm sido conduzidos sobre este tema, porém é necessário tecer alguns esclarecimentos conceituais sobre

os seguintes termos: a) deficiência de lactase; b) má absorção de lactose; e c) intolerância à lactose.

1.3 DEFINIÇÃO DE TERMOS

Os termos “deficiência de lactase”, “má-absorção de lactose” e “intolerância à lactose”, por vezes, são usados de forma incorreta e como sinônimos. A deficiência da lactase pode ser primária ou secundária, caracteriza-se pela redução (hipolactasia) ou ausência (alactasia) da produção dessa enzima pelo epitélio intestinal. A deficiência primária é determinada por alterações genéticas ligadas a genes autossômicos recessivos, podendo ser congênita ou adquirida. A deficiência congênita é rara, manifesta-se logo após o nascimento e é marcada pela ausência da lactase no trato gastrointestinal. A deficiência adquirida é mais comum, sendo observada na vida adulta (SEVÁ-PEREIRA, 2004).

A deficiência de lactase secundária manifesta-se por redução dos níveis de mais de uma enzima, sobretudo a lactase, e possui diferentes causas, como doença celíaca, linfoma difuso primário do intestino delgado, enterite actínica, entre outras causas. Pode ainda acompanhar os quadros de desnutrição e as infecções por parasitos intestinais, como a estrogiloidíase e a giardíase. Surge como consequência da ingestão de álcool e de determinados medicamentos. Nas causas de deficiência secundária citada, a redução da atividade da lactase pode ser transitória e reversível (SEVÁ-PEREIRA, 2004; SWAGERTY JÚNIOR, WALLING, KLEIN, 2002).

“Deficiência de lactase” será usada apenas com a Genotipagem, em que a persistência do gen nativo, representada pelos alelos C -13910 ou G -22018, esteja presente (genótipos intolerantes). Não deficientes de lactase são todas as outras variações dos polimorfismos C>T -13910 e A>G -22018 (genótipos tolerantes).

A má absorção da lactose é a alteração laboratorial que traduz a deficiência da lactose e corresponde à incapacidade em digerir e absorver lactose, aspecto evidenciado no resultado do teste químico (curva glicêmica), cuja diferença entre o valor máximo encontrado e a glicemia basal (jejum) seja

inferior ao ponto de corte, por nós adotado, 15. Caracterizando os grupos como quimicamente tolerantes (absorvedores) – aqueles em que $\Delta \text{ max-basal} \geq 15$, e quimicamente intolerantes (não absorvedores) – $\Delta \text{ max-basal} \leq 15$.

Por outro lado, a intolerância à lactose é a expressão clínica caracterizada pelos sinais e sintomas decorrentes da presença da lactose não digerida, e, conseqüentemente, não absorvida, na luz do íleo terminal e do cólon (MONTALTO et al., 2006). Então, a intolerância à lactose é uma síndrome clínica composta por um ou mais sintomas como: dor abdominal, diarreia, náusea, flatulência e/ou distensão abdominal após a ingestão de lactose ou de produtos alimentícios contendo lactose. A quantidade de lactose ingerida que determina os sintomas é variável e circunstancial entre os indivíduos, dependendo do tempo de sua ingestão, da velocidade do esvaziamento gástrico e intestinal, do grau de deficiência de lactase, da flora intestinal do indivíduo e da composição alimentar com a qual a lactose foi ingerida (TUMAS; CARDOSO, 2008).

Os sintomas se justificam pela inatividade ou ineficiência da lactase, o que torna o organismo de um indivíduo incapaz de realizar a hidrólise da lactose que, ao passar pelo intestino grosso, é fermentada pela microflora intestinal existente, produzindo gases como hidrogênio (H_2), metano (CH_4), dióxido de carbono (CO_2) e ácidos graxos de cadeia curta. O intestino com deficiência de lactase, por ser incapaz de digerir a lactose, permite a multiplicação de micro-organismos, levando à produção excessiva dos gases e provocando sintomas característicos, como diarreia, dores e distensão abdominal ou flatulência excessiva (CUNHA et al., 2008; KOBLITZ, 2008; REIS et al., 1999).

No nosso estudo usaremos o termo “intolerância à lactose” quando referirmo-nos à presença de cortejo sintomatológico associado à ingestão de lácteos (fenótipo clínico intolerante), e “tolerância à lactose” para a ausência desses sintomas (fenótipo clínico tolerante).

Na prática clínica, deve-se estar atento a outros casos semelhantes a este com sintomatologia disarbsortiva, pois as convergências e diferenças entre esses distúrbios são tênues e os diagnósticos muitas vezes são imprecisos, tornando o tratamento e a conduta insatisfatórios. Deve-se também tentar identificar a relação da dor abdominal com a ingestão de leite através de um inquérito alimentar diário das queixas. Outro ponto que merece discussão é a hipolactasia primária do tipo adulto, já que é a forma mais comum de deficiência de dissacaridase determinada geneticamente.

1.4 Influência da etnia na deficiência primária de lactase do tipo adulto (Hipolactasia primária)

De acordo com Sahi (1994), 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 observada uma prevalência de hipolactasia do tipo adulto de 15%; e nos Estados Unidos da América, uma de 25%.

A hipolactasia primária do tipo adulto é o fenótipo predominante nas populações nativas da Austrália, Oceania, leste e sudeste da Ásia, África Tropical e Américas. Dois grupos populacionais mantêm atividades da lactase distintas na vida adulta: (1) habitantes do norte e do centro europeu e povos nômades do norte da África e Arábia: a má absorção da lactose; (2) por outro lado, é o fenótipo predominante nos grupos populacionais nativos da Oceania, leste e sudeste da Ásia, Américas e África Tropical. O primeiro grupo tem em comum a prática pastoril, o que não ocorreu no último (TISHKOFF et al., 2007, AURICCHO; TRONCONE, 2000).

As migrações populacionais e miscigenações determinaram prevalências diversas nos fenótipos quanto à absorção da lactose. Hipóteses para explicar as diferenças encontradas na prevalência de hipolactasia nos

diferentes grupos populacionais baseiam-se em dados históricos, ambientais e comportamentais (ALLIET, KRETCHMER, LEBENTHAL, 1989; SAHI, 1994).

A teoria histórico-cultural associa a domesticação do gado e a utilização do leite como fatores que pressionaram seletivamente a ocorrência de uma mutação dominante, responsável pela persistência da atividade da lactase na vida adulta. Assim esses indivíduos teriam fonte facilmente acessível de calorias e água durante períodos de escassez, como os que ocorrem na África, ou durante os invernos árticos (KRETCHMER et al., 1971).

Medeiros (2008) revisou a hipótese histórico-cultural que procura explicar o aparecimento de seres humanos que mantêm durante toda a vida níveis intestinais elevados de lactase. Esta característica é definida por genótipos com alelos dominantes homozigotos ou heterozigotos. Assim, há cerca de 7.000 a 9.000 anos, populações do norte e centro da Europa e de algumas áreas da África iniciaram atividades pastoris e o leite passou a constituir um alimento disponível para a alimentação. Acredita-se que tal mudança no padrão alimentar pode ter propiciado condições para o aparecimento e propagação dos genes dominantes, frutos de mutação, considerando que a persistência da produção de lactase constituiria uma característica vantajosa do ponto de vista evolutivo. As mutações identificadas em europeus são diferentes das encontradas em africanos

Outra hipótese baseia-se na influência da lactose na absorção intestinal de cálcio. No norte europeu, devido à baixa exposição solar, ocorreria nas populações dessa região uma elevada prevalência de doenças ósseas, como raquitismo e osteomalácia. Nessas populações a baixa exposição solar determinaria uma menor ativação da vitamina D, com prejuízo na absorção de cálcio.

Assim, acreditam os partidários desta corrente que esses indivíduos teriam se adaptado evolutivamente ao meio, através de uma tolerância maior à lactose, pela adaptação de sua flora intestinal. Esta flora modificada produziria mais ácido láctico e menos gases. Com menor produção de gases, haveria menos sintomas e os lácteos disponíveis seriam mais consumidos. A

disponibilidade de ácido láctico determinaria dois efeitos: o primeiro, de ser facilmente assimilado pelo enterócito; e, no segundo, o meio acidificado pelo ácido facilitaria a absorção do cálcio ingerido. Por esta teoria essas populações teriam se adaptado à ingestão láctea, aumentando sua absorção de cálcio. Essa hipótese, porém, não leva em conta que a facilitação da absorção de cálcio pelo ácido láctico não compensaria a deficiência de ativação da vitamina D, que depende da exposição aos raios solares (TÉO, 2002).

Finalmente, tem-se a hipótese reversa da indução da atividade enzimática determinada pela ingestão continuada e crescente de lácteos. De acordo com esta hipótese, a modulação da lactase ocorreria em indivíduos tolerantes ou com tolerância limítrofe, significando que a atividade enzimática teria um comportamento diretamente proporcional à maior ou menor ingestão de lácteos (BURGER et al., 2007).

Do ponto de vista clínico, nem todos os indivíduos com hipolactasia do tipo adulto apresentam intolerância a lactose. As razões pelas quais alguns indivíduos toleram e outros apresentam intolerância à lactose não são plenamente conhecidas. Provavelmente, podem estar relacionadas com diferenças no grau de atividade residual da lactase, na microbiota intestinal ou na eficiência do mecanismo de resgate colônico dos ácidos graxos de cadeia curta (MEDEIROS, 2008). Muito há ainda para compreender a influência da etnia na hipolactasia, mais uma coisa é certa, fatores genéticos e nutricionais influenciam na prevalência da doença.

1.5 Polimorfismos associados com a hipolactasia do tipo adulto

A enzima intestinal ou lactase florizina hidrolase (LPH) é codificada pelo gene LCT localizado no cromossomo 2. Sua persistência na vida adulta tem herança autossômica, enquanto que a hipolactasia é herdada de forma autossômica recessiva (WANG et al., 1998). 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, pela tolerância à lactose (HARVE et al., 1998). “Mutação” é 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 que 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, ela seria responsável pelos diferentes fenótipos: absorvedores e não absorvedores de lactose.

Em um estudo recente foram descritos dois polimorfismos (SNPs) fortemente associados com a hipolactasia primária do tipo adulto. Um nucleotídeo C na posição -13910 (C-13910) no gene da LCT foi associado 100% com a não persistência da lactase, e um nucleotídeo G na posição -22018 (G-22018) foi associado em mais de 95% com a não persistência da enzima em adultos finlandeses. As variantes T-13910 e A-2018 estão associadas com a persistência da enzima lactase em adultos (ENATTAH et al., 2002).

Os autores realizaram um estudo em nove famílias finlandesas (n=236) usando sete marcadores em uma região de 200 kb. O marcador D2S196 definiu uma região crítica de 47kb, localizada na região 5' do gene da lactase (LCT). O único gene nessa 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 cossegregação completa nas famílias: C/T-13910 e G/A-22018. Todos os indivíduos não persistentes de lactase eram homozigotos CC/GG. As alterações C/T-13910 e G/A-22018 estão localizadas nos íntrons 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 (ENATTAH et al., 2002).

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 seis com o genótipo CC/GA) e 137 indivíduos com atividade de LPH (74 sujeitos com 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, nove italianos e oito alemães. Todos foram homozigotos CC/GG, exceto um italiano que era CC/GA. Finalmente compararam as frequências dessas 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. Dessa forma, demonstraram a associação das mutações C/T-13910 e G/A-22018, especialmente a primeira, com persistência da atividade da lactase (LPH) na vida adulta.

KUOKKANEN et al. (2006) 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 em 92% dos RNAm correspondiam ao alelo T. Dessa forma, demonstraram que o polimorfismo está associado diretamente ao controle da expressão gênica da enzima.

Essa observação deu resultados semelhantes em outros grupos europeus, onde POULTER et al. (2003) 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 utilizada como método diagnóstico de intolerância à lactose, por métodos baseados em PCR (Reação em Cadeia da Polimerase).

1.6 Revisão dos métodos de diagnósticos

Os vários testes para o diagnóstico da intolerância à lactose apresentam suas limitações, quer por serem invasivos e demorados, quer por seu alto custo e pouca praticidade, ou ainda pela elevada ocorrência de falso-positivos ou falso-negativos. Essas peculiaridades fazem com que muitos autores considerem que não exista um padrão ouro para um diagnóstico de triagem populacional (ALLIET, KRETCHMER, LEBENTHAL, 1989; BRUMMER; KARIBE; STOCKBRUEGGER, 1993). Portanto, o teste a ser escolhido dependerá das facilidades técnicas de cada serviço, bem como das finalidades a que se propõe.

Os métodos diagnósticos de intolerância à lactose são: teste do pH fecal; pesquisa de substância redutoras nas fezes; teste de tolerância à

lactose; teste de tolerância à lactose com etanol; teste respiratório com C¹⁴; teste respiratório com C¹³; teste de hidrogênio expirado; biópsia intestinal e medida da atividade da lactase (BRUMMER, KARIBE, STOCKBRUEGGER, 1993; WALKER-SMITH, 1997).A seguir, cada método de diagnóstico será descrito separadamente.

1.6.1 Teste do pH fecal e pesquisa de substâncias redutoras nas fezes

Os testes fecais são exames não invasivos, relativamente sensíveis e utilizados para triagem, a fim de determinar a presença de substâncias redutoras nas fezes. As vantagens desses testes incluem sua sensibilidade, seu baixo custo e o fato de serem rápidos e não invasivos. Por outro lado, entre as suas desvantagens estão a baixa especificidade e a alta incidência de falso-positivos.

A pesquisa de substâncias redutoras é feita pelo Clinitest, desenvolvido por Kerry e Anderson (1964). Uma concentração maior que 0,5% de substâncias redutoras nas fezes indica má absorção de açúcares (CABALLERO; SOLOMONS; TORÚN, 1983; WALKER-SMITH, 1997). O pH fecal ácido, abaixo de 6, é comumente encontrado em indivíduos com má absorção de açúcares. Os dois testes são complementares e indicam situações diferentes. O pH fecal indica a presença de ácidos orgânicos, como ocorre na má absorção de carboidratos; e o teste de substâncias redutores indica a presença fecal de açúcares não absorvidos. Ambos os métodos são úteis em recém-nascidos e lactentes, mas não são confiáveis em crianças maiores e em adultos. Nestes casos, apenas pequenas quantidades de açúcar costumam ser detectadas nas fezes devido à maior eficiência do mecanismo de compensação colônica (GRACEY; VALERIE, 1973; WALKER-SMITH, 1997).

É ainda importante lembrar que o uso de algumas medicações via oral, como ácido nalidíxico e cefalosporinas, e certos componentes da dieta, como ácido ascórbico, podem ocasionar resultados falso-positivos na pesquisa de substâncias redutoras nas fezes (WALKER-SMITH, 1997). E ainda a técnica

da coleta é muito importante, pois as fezes devem ser analisadas frescas ou armazenadas no congelador até a análise (PRETTO, 2001).

1.6.2 Teste de tolerância à lactose

É o método mais utilizado para o diagnóstico de má absorção de lactose (ALLIET, KRETCHMER, LEBENTHAL, 1989). Após jejum de 8 horas, ingere-se lactose na dose de 2 g/Kg, até 50 g em cinco minutos. É realizada, inicialmente, uma coleta de sangue em jejum e outras coletas com intervalos de 30 minutos até 2 horas após a ingestão do açúcar. Considera-se normal o aumento da glicemia em 25 mg/dl acima do basal (ALLIET, KRETCHMER, LEBENTHAL, 1989; BRUMMER; KARIBE; STOCKBRUEGGER, 1993).

Este exame apresenta as limitações de ser invasivo, causar desconforto e possuir longa duração. Alguns autores também consideram que sua sensibilidade seria afetada pelo tempo de esvaziamento gástrico e pelo metabolismo da glicose (BULLER et al., 1991; BRUMMER; KARIBE; STOCKBRUEGGER, 1993). Alguns autores têm demonstrado que o teste de tolerância oral não apresenta uma boa correlação entre os níveis de lactase na mucosa jejunal e o resultado do teste (NEWCOMER; MCGILL, 1966).

1.6.3 Teste de tolerância à lactose com etanol

Para realização deste teste, a concentração de galactose no sangue é medida após a ingestão de lactose. A determinação da glicemia é feita em uma única tomada e a coleta é realizada após 40 minutos da ingestão da lactose. No entanto, deve-se administrar etanol (150mg/Kg) para inibir o rápido metabolismo hepático da galactose (AROLA, 1994). Vale ressaltar que o etanol é ingerido juntamente com a lactose.

1.6.4 Teste respiratório com C¹⁴ - lactose

O teste envolve a administração de lactose marcada por C¹⁴ e reflete a atividade da lactase, bem como a absorção e o metabolismo da glicose

(ARVANITAKIS et al., 1977). A lactase presente no intestino age sobre o substrato C^{14} - lactose, com liberação de $C^{14}O_2$. A porcentagem de $C^{14}O_2$ excretada na primeira hora após a administração da C^{14} -lactose então discrimina os absorvedores dos não absorvedores de lactose (NEWCOMER et al., 1975; AROLA, 1994).

São desvantagens do processo o uso de material radiativo e a ocorrência de falsos resultados positivos ou negativos. Além dessas, a depender do trânsito intestinal, podem ocorrer ação de bactérias presentes no cólon sobre o substrato não absorvido e alterações no metabolismo da glicose (AROLA, 1994; SASAKI et al., 1970).

1.6.5 Teste respiratório com C^{13} -Lactose

Este teste é semelhante ao anterior, tendo como vantagem a utilização de isótopo não radioativo do Carbono (C^{13}) (STELLAARD; GEYPENS, 1998). A excreção cumulativa de $C^{13}O_2$ quatro horas após a ingestão de C^{13} lactose é medida através de espectrometria. Vários fatores podem influenciar seus resultados. Além disso, há necessidade de utilização de equipamento de alto custo, apresentando razão custo/benefício muito elevada que justifica a sua não utilização (VONK et al., 1998; AROLA, 1994).

1.6.6 Teste do hidrogênio expirado

O exame é baseado na determinação da concentração de hidrogênio em amostra de ar expirado após a administração de lactose (AROLA, 1994). O hidrogênio é produzido no cólon a partir da fermentação de carboidratos não absorvidos. Levitt (1969) demonstrou que o cólon é responsável pela produção de quase 100% do hidrogênio do intestino humano, através da administração intraluminal de lactose. Quantidades pequenas de carboidratos, como 2 gramas, produzirão aumentos detectáveis na concentração de hidrogênio (SOLOMONS, 1984).

A maior parte desse gás é eliminada sob a forma de flatos e uma proporção de 21% é eliminada pelos pulmões, podendo ser detectada no ar expirado. Como não existem outras fontes endógenas de produção desse gás, o aumento de sua concentração no ar expirado é indicativo de má absorção e fermentação de carboidratos (KERZNER, 1993). Naturalmente, este teste também é afetado pela cinética colônica e de sua flora.

A primeira coleta de ar expirado deve ser feita em jejum de 4 horas para lactentes e de 8 horas para crianças maiores e adolescentes. Administra-se lactose na dose de 2 g/Kg e colhem-se outras amostras intervaladas de 30 a 60 minutos por 2 a 6 horas (BARRILAS-MURY; SOLOMONS, 1987; AROLA, 1994). O teste é considerado positivo quando existe um aumento de 20 partes por milhão (ppm) acima do valor basal (METZ et al., 1975; SOLOMONS; BARILLAS, 1986; BRUMER, KARIBE, STOCKBRUEGGER, 1993; WALKER-SMITH; MURCH, 1999).

Em uma revisão sistemática, as recomendações sugeridas foram: duração do teste de 4 horas (3 horas para uso pediátrico), intervalos de amostra de 30 minutos e um valor de cuff de 20 ppm acima da linha de base. É ainda recomendada uma dosagem mais fisiológica de 25g de lactose, uma vez que 50g de lactose (corresponde a um litro de leite) equivale a uma quantidade muito superior ao que normalmente se ingere de uma só vez. Além disso, pacientes com intolerância à lactose podem sentir desconforto considerável com essa dosagem (SZILAGYI et al., 2007; SCHIRRU et al., 2007).

Este é um teste simples, não invasivo, de boa sensibilidade (69 a 100%), e especificidade (89 a 100%). Entretanto, vale salientar que a fragilidade do teste consiste no nível basal do hidrogênio expirado, pois este sofre várias outras interferências, como: refeição da noite anterior; supercrescimento bacteriano ou êxtase intestinal; pH luminal ácido; jejum inadequado; e alterações pulmonares (DAVIDSON; BUTLER, 2000).

1.6.7 Biopsia Intestinal e medida da atividade da lactase

Este método determina uma medida direta da atividade da lactase no intestino delgado. No entanto, trata-se de método invasivo, no qual, geralmente, são obtidas biópsias da mucosa ao nível do ligamento de Treitz ou biópsias duodenais por endoscopia (GUPTA, CHONG, FITZGERALD, 1999; AURICCHIO; TRONCONE, 2000).

As atividades da lactase e da sucrase são determinadas pelo método de Dahlqvist e expressas em unidades por grama do tecido homogeneizado ou por grama de proteína. A maioria dos autores considera hipolactasia a atividade de lactase abaixo de 2U/g de mucosa ou 5U/g de proteína (NEWCOMER; MCGILL, 1966; BRUMER, KARIBE, STOCKBRUEGGER, 1993). Mais recentemente, um nível de 8-13U/g de proteína tem sido proposto como diagnóstico e a relação lactase/sucrase inferior a 0,3 também é indicativa de hipolactasia (BRUMMER, KARIBE, STOCKBRUEGGER, 1993).

Outra desvantagem deste método reside na não uniformidade da atividade da lactase nas diversas porções do delgado (SEVÁ-PEREIRA, MAGALHÃES, PEREIRA, 1982).

1.6.8 Genotipagem do Polimorfismo Lactase-Florizina Hidrolase

Estes testes baseiam-se em modelos existentes em bancos de dados genéticos de populações conhecidas. Utilizam-se iniciadores de DNA que margeiam a área do promotor do gene que sintetiza a lactase. Esses modelos foram resultados de trabalhos de vários pesquisadores que estudaram as variantes genéticas para tolerância à lactase em populações que majoritariamente toleravam a lactose, com fenótipo tolerante e teste químico tolerante (BODLAJ et al., 2006), ou de grupos populacionais tolerantes de áreas predominantemente intolerantes (TISCHKOFF et al., 2007).

O DNA sanguíneo ou salivar é extraído em sistema automatizado e

as amostras são processadas em cicladores pela técnica da Reação de Polimerase em Cadeia (PCR). Esse método tem como vantagem o fato de não ser influenciado por fatores externos, como: alimentação prévia, doenças concomitantes, utilização de medicamentos, motilidade colônica, tempo de esvaziamento gástrico e flora intestinal.

Os polimorfismos nucleotídicos, C/T-13910 e G/A-22018, são determinantes na expressão da enzima. Estudos demonstram que o polimorfismo C/T-13910 é o dominante, com o alelo C associado ao declínio da expressão do RNAm (RASINPERÄ et al., 2006).

No trabalho de um grupo europeu, foram analisados 220 indivíduos para a determinação genotípica. Nos 220 analisados, o genótipo C/C foi de 21,4%; o C/T, de 41,8%; e o T/T, de 36,8%. Foi encontrado o alelo LPH→T(-13910) em 54 indivíduos, com teste do hidrogênio expirado positivo e sintomas de intolerância à lactose. Nestes indivíduos com teste do hidrogênio expirado positivo, apenas 50% apresentaram genótipo C/C, que é sugestivo de hipolactasia primária do adulto. Os indivíduos com genótipo C/C tiveram uma média maior do hidrogênio expirado (108 ppm), bem superior à daqueles com genótipo C/T (65 ppm) e T/T (44 ppm). Esses estudiosos concluíram que o teste permite a diferenciação da hipolactasia primária e secundária em pessoas com sintomas de intolerância à lactose (BODLAJ et al., 2006). A desvantagem deste teste reside apenas no fato de haver uma necessidade prévia de conhecimento do padrão genotípico predominante da população estudada.

Pesquisadores conduziram um estudo da associação genótipo/fenótipo em 470 indivíduos da Tanzânia, Kenia e Sudão, objetivando avaliar a base genética da mutação para tolerância à lactose dentro desses grupos populacionais, comparando-os a um modelo já conhecido dos norteeuropeus. Foi avaliada uma região de três Megabases antes e depois da região do promotor da lactase C/T -13910 e foram identificados três SNPS (G/C-14010, T/G-13915 e C/G-13907), que estariam associados ao padrão de tolerância à lactose entre os africanos (TISHKOFF et al., 2007).

Embora estes padrões genotípicos difiram do modelo predominante entre os europeus (C/T-13910), eles se encontram em uma região bastante

próxima deles. Estes resultados permitiram concluir que se tratou de uma forte convergência genética entre os dois grupos (TISHKOFF et al., 2007).

Hoje em dia, a genotipagem pode ser utilizada como teste para investigação da hipolactasia com uma especificidade de 100% no caso de queixas abdominais inespecíficas. Vários estudos sobre indivíduos adultos demonstraram uma excelente correlação entre o teste de hidrogênio expirado e o teste genético, com base no polimorfismo C/T-13910 (SZILAGYI et al., 2007; SCHIRRU et al., 2007).

Alguns exames que foram utilizados no passado para diagnosticar a intolerância à lactose, como a pesquisa de substâncias redutoras nas fezes, a determinação do pH fecal e a pesquisa de glicose nas fezes, hoje não são mais usados. Outros exames, como os testes respiratórios com lactose marcada com ^{14}C ou com ^{13}C , são inacessíveis à maioria dos pacientes.

É interessante salientar que, por vezes, o diagnóstico é feito simplesmente por uma anamnese cuidadosa, seguida por teste dietético de prova, que consiste na retirada da lactose da dieta por algumas semanas, porém este procedimento deve ser acompanhado por observação criteriosa das manifestações clínicas (SEVÁ-PEREIRA, 2004).

2 JUSTIFICATIVA

Estima-se que 80% da população mundial sofra de intolerância à lactose, com uma distribuição variável entre as diferentes raças e áreas geográficas. Em geral, entre os europeus brancos e seus descendentes (norte-americanos e australianos), a prevalência de má absorção é inferior a 30% e somente em alguns casos supera 60%; já entre as populações asiáticas e africanas as cifras superam os 70%, podendo chegar a 100% da população (GIL et al.,2010)

Na população brasileira, foi caracterizada elevada prevalência de hipolactasia do tipo adulto, utilizando a técnica de curva glicêmica após sobrecarga de lactose em adultos jovens (NÓBREGA; YIN, 1984). Estudo recente, usando dose de lactose mais próxima da utilizada na alimentação habitual, mostrou menor frequência de má absorção de lactose em um grupo de escolares do interior do Estado de São Paulo, com o emprego do teste de hidrogênio de ar expirado (REIS; MORAIS; FAGUNDES-NETO, 1999). O conhecimento da prevalência da deficiência ontogenética de lactase e da intolerância à lactase constitui um dos subsídios a serem considerados na avaliação clínica.

Atualmente, observa-se dificuldade no diagnóstico da intolerância à lactose, com incidência reduzida ou elevada, resultando em prejuízo para a nutrição do indivíduo e sua qualidade de vida, especialmente nos diagnósticos errôneos. Portanto, são necessários estudos que utilizem diferentes métodos diagnósticos, assim como comparar os diferentes métodos empregados na prática clínica e averiguar o mais apropriado para dar o diagnóstico conclusivo, uma vez que nem sempre é fácil, haja vista que os sintomas sugerem outras doenças.

Em alguns centros, a avaliação diagnóstica vem sendo realizada por meio do teste de hidrogênio expirado. Entretanto, a partir da revisão da literatura sobre os métodos diagnósticos de intolerância à lactose, ainda persistem aspectos controversos e dificuldades do diagnóstico diferencial. Na

prática clínica, as queixas dos pacientes são inespecíficas ou já relatam intolerância aos produtos lácteos, o que pode indicar a necessidade de realização de um teste ou vários testes, ou até mesmo a restrição na dieta.

Matthews et al. (2005) referem cinco problemas para o diagnóstico da intolerância à lactose: o teste padrão (teste de hidrogênio expirado) carece de sensibilidade, além de não existir recomendação de acompanhamento durante e após a realização do exame, a fim de averiguar os sintomas após o teste; o teste pode causar sintomas graves, por vezes com a duração de diversos dias; a intolerância a alguns alimentos pode causar síndrome do intestino irritável, com uma vasta gama de sintomas sistêmicos, além dos sintomas intestinais, o que impossibilita relacioná-los com a intolerância à lactose; o desconhecimento de que a lactose é adicionada a um grande número de alimentos e de bebidas, sem estar nos rótulos dos produtos, resultando em falhas no diagnóstico, inclusive quando os sintomas acontecem mesmo após a remoção de produtos lácteos da dieta; e a falta de realização de testes genéticos na rotina dos serviços de saúde.

Baseado nos estudos de prevalência da intolerância à lactose em cidades brasileiras, verifica-se a importância do estudo contínuo com o objetivo de encontrar métodos diagnósticos de maior sensibilidade, baixo custo e de fácil execução.

A mudança na prevalência de intolerância lactose suscitou novos desafios, já que o grupo de adultos, cada vez mais numeroso, tende a apresentar sinais e sintomas sugestivos. Assim, o levantamento de informações sobre a doença nesse grupo pode trazer melhor segurança no diagnóstico e acompanhamento desses pacientes. O avanço das pesquisas para identificação do diagnóstico se deu com o teste de genotipagem. A caracterização genética de pacientes adultos pode levar, por exemplo, ao diagnóstico molecular mais direcionado, começando pela pesquisa de mutações que se apresentem mais frequentes, ou associadas a determinado quadro clínico.

Então, durante minha prática profissional como médico, tenho observado uma demanda por atendimento a clientes com queixas de dor

abdominal, diarreia, desconforto como fisiose, que se acentuam com a utilização de alimentos comuns do cotidiano. Assim, na avaliação diagnóstica, com muita frequência, encontra-se positivo o teste de intolerância à lactose. Essa observação se tornou comum durante a prática clínica do pesquisador, que então decidiu incluir o teste genético na avaliação rotineira de adultos com essas queixas digestivas.

O levantamento de informações clínicas e moleculares pode ajudar a entender a grande variabilidade de expressão na intolerância à lactose (IL) e diminuir a dificuldade de diagnóstico, principalmente de casos atípicos.

A avaliação clínica, o teste químico, molecular, e outros exames de diagnóstico de IL são, portanto, de grande relevância, uma vez que podem trazer informações valiosas tanto para os pacientes, como para os profissionais que atuam em sua assistência.

Inexistem estudos que demonstrem a incidência da intolerância à lactose/deficiência de lactase no Ceará, sendo de interesse quantificar sua ocorrência em nossa população. Da mesma forma, a partir da curiosidade em descobrir qual o padrão genótipo para tolerância do Brasil, considerando os modelos já conhecidos e catalogados (Europeu e Africano), busca-se estabelecer se a população brasileira segue um desses modelos ou se há um padrão genotípico próprio.

A motivação para este trabalho veio após a leitura do trabalho de Tishkoff et al. (2007) e, posteriormente, do trabalho de Bodlaj et al. (2006). O trabalho dirigido por Tishkoff et al. (2007) demonstrou haver um novo perfil genotípico para tolerância à lactose entre africanos, diferente daquele conhecido até então em estudos europeus. Sua obra se reveste de valor biológico, antropológico, arqueológico, tendo sido conduzida com rigor científico em um projeto bem desenhado. Já Bodlaj et al. (2006) criaram e validaram um método rápido de genotipagem para tolerância à lactose.

Com base nesses instrumentos, foram formuladas as seguintes questões: Existe associação do teste químico no diagnóstico de intolerância à lactose com o polimorfismo genético? Qual a prevalência da intolerância à

lactose a partir do teste químico, do fenótipo clínico e da genotipagem? Quais os principais sintomas apresentados pelos pacientes com o fenótipo intolerante? Qual o padrão genético presente nos intolerantes à lactose na população cearense?

No presente estudo procurou-se testar duas hipóteses: 1) indivíduos com teste químico intolerante, possivelmente, tem fenótipo intolerante e genótipo não persistente de lactose; 2) o teste químico se mostra seguro para o diagnóstico de intolerância à lactose quando a diferença do delta basal for ≤ 15 .

A proposta deste experimento permitirá definir o padrão genotípico do grupo em estudo e relacioná-lo com os outros testes diagnósticos utilizados na prática clínica, além de identificar o valor preditivo dos sinais e sintomas indicativos da IL, bem como o melhor entre os três delta max-basal (15, 20, 25) do teste químico, e assim poderá assegurar a melhor forma de diagnóstico e, conseqüentemente, a conduta no tratamento.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar as características fenotípicas, a resposta ao teste químico de tolerância à lactose e o genótipo de pacientes com hipótese diagnóstica de intolerância à lactose, e a correlação entre eles.

3.2 Objetivos específicos

- Descrever as características sociodemográficas da população de estudo.
- Identificar a prevalência fenotípica clínica de intolerância.
- Determinar a prevalência química da intolerância.
- Estabelecer a prevalência genotípica de intolerância.
- Descrever as características clínicas associadas ao fenótipo intolerante.
- Verificar a prevalência dos sintomas de empachamento, borborigmos, diarreia, flatulência e sua associação com o fenótipo intolerante.
- Identificar entre as três concentrações utilizadas no teste com Delta max-basal (15,20,25 mg/dl de glicose) aquela que apresenta maior sensibilidade e especificidade ao diagnóstico de intolerância, comparando as associações fenótipo intolerante e genótipo intolerante.
- Avaliar a precisão da genotipagem para o diagnóstico de intolerância ou de tolerância.
- Identificar as relações entre fenótipo, teste químico e genótipo.

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 Delineamento do estudo

Trata-se de um estudo transversal, exploratório, realizado no ambulatório dos servidores do Hospital Universitário Walter Cantídio – Fortaleza/Ceará, durante o período de janeiro a agosto de 2010. Este tipo de estudo é indicado para detectar frequência de doenças e de fatores de risco desconhecidos, assim como grupos populacionais afetados ou não por determinadas doenças, pois possibilita levantar hipóteses de associações entre exposição e efeito (fenótipo, teste químico e genotipagem associados à intolerância à lactose).

Nas pesquisas transversais todas as medições são feitas em um único momento, sem período de seguimento, e fornecem informações sobre a prevalência do desfecho em determinado instante (Hulley et al., 2008). Assim, a avaliação fenotípica do paciente e a hipótese diagnóstica ocorreram no desenvolvimento do estudo, na avaliação clínica, em um período pré-determinado, e a exposição e efeito foram identificados simultaneamente durante o teste químico. Na coleta dos dados, definiu-se a confirmação do diagnóstico e, no processo de análise dos dados, os grupos expostos (maus absorvedores de lactose) e não expostos (absorvedores de lactose), doentes e não doentes foram definidos. Estas ações caracterizam o desenho de estudo do tipo transversal.

Na avaliação inicialmente foram investigadas a fenotipagem e a solicitação do teste químico, a fim de definir os grupos em: grupo exposto (maus absorvedores de lactose) e não exposto (absorvedores de lactose), isto é doentes e não doentes.

4.2 Local

O ambulatório dos servidores do Hospital Universitário Walter Cantídio realiza em média 16.800 consultas/ano, através da assistência aos funcionários e docentes da UFC, bem como aos seus dependentes diretos. O serviço foi criado em 1990 para atender à forte demanda dos servidores da universidade por assistência em seu hospital e à necessidade da avaliação de saúde, acompanhamento, prevenção de doenças e realização de exames admissionais de seus funcionários, bem como para a assistência aos aposentados e a identificação de problemas emergentes, como: alcoolismo, hipertensão, doenças psiquiátricas e absenteísmo.

4.3 População-Alvo e Amostra

A população-alvo do estudo envolveu indivíduos de ambos os sexos, residentes na região metropolitana de Fortaleza/Ceará, atendidos no ambulatório dos servidores do Hospital Universitário Walter Cantídio, no período de janeiro a agosto de 2010.

4.3.1 Critérios de inclusão

Foram incluídos no estudo todos os indivíduos de ambos os sexos, com idade acima de 18 anos, que na avaliação médica autorelatavam serem intolerantes aos produtos lácteos, e até o momento sem diagnóstico definido.

4.3.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo indivíduos de ambos os sexos, com outras condições clínicas de má absorção intestinal, como: insuficiência pancreática, doença celíaca (glúten induzida), linfomas ou linfangiectasia intestinal, gastroenterites agudas ou crônicas, enteropatia perdedora de proteínas, enteroparasitoses de delgado (giardíase e estrogiloidíase), uso

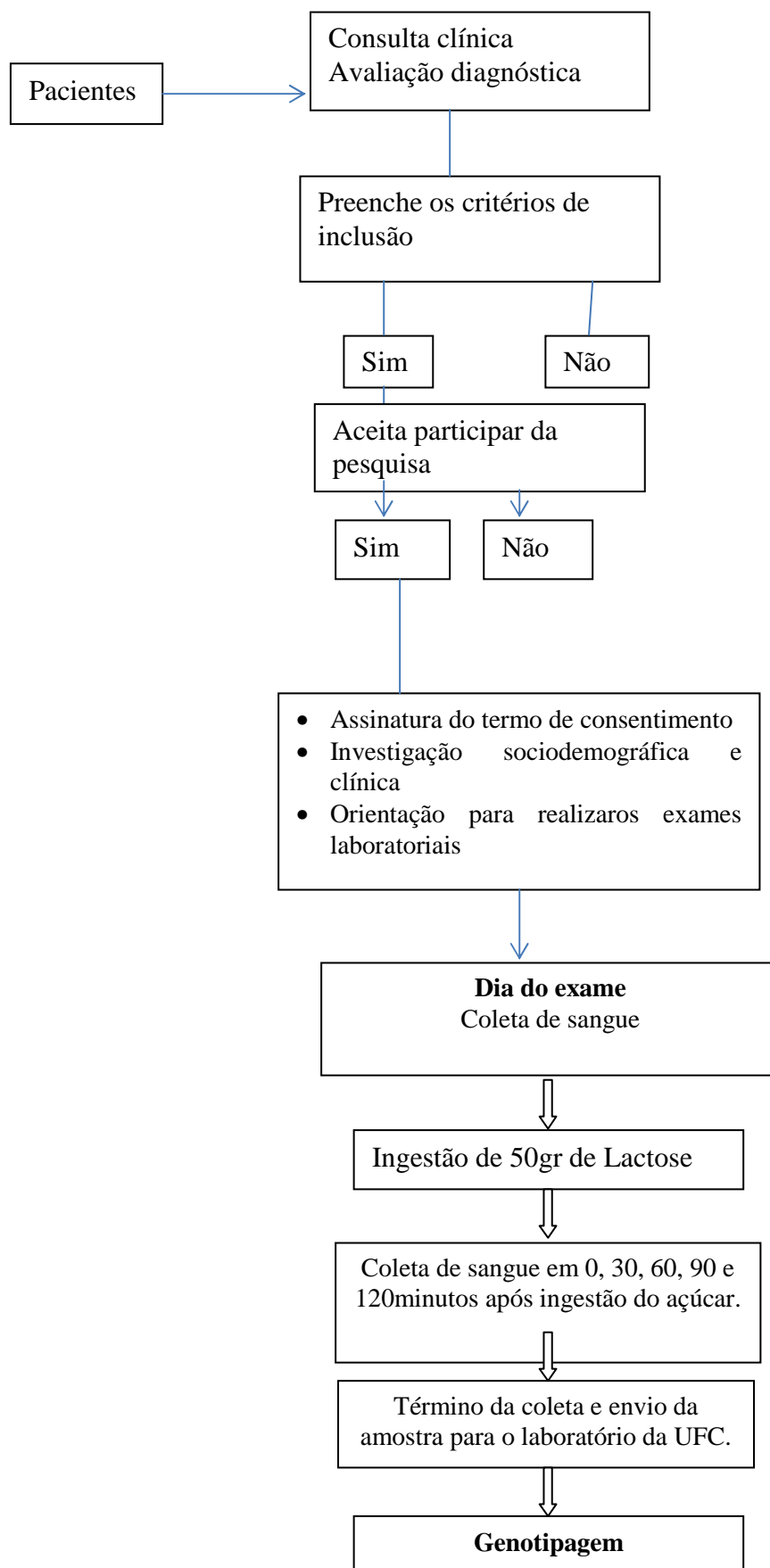
recente de drogas, antibióticos, antiarrítmicos, hormônios tireoideanos, corticoesteróide, quimioterápicos, anticonvulsivantes e drogas psicoativas. Ou quando o paciente ou seu responsável decidiram livremente não participar do protocolo.

4.4 Desenho do estudo

Na consulta médica inicial, os pacientes que autorelatavam serem intolerantes aos produtos lácteos eram convidados a participar do estudo. Assim, na ocasião, os participantes assinavam um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e recebiam as orientações sobre como proceder durante as etapas da coleta. Em seguida, realizou-se o preenchimento de um questionário com dados sociodemográficos, e levantamento das queixas e o encaminhamento dos pacientes selecionados ao laboratório Clementino Fraga para a realização da coleta de sangue para o teste químico e genotipagem.

No dia do exame, a primeira amostra de sangue era coletada em jejum, e o participante recebia 50 g de lactose diluída a 20% em um volume final de 250 ml de água. As coletas subsequentes eram realizadas 30, 60, 90 e 120 minutos após a administração da lactose. Na ocasião também foi coletada amostra de sangue para análise molecular dos polimorfismos. Após a quarta coleta, os indivíduos recebiam um lanche e eram liberados. Posteriormente, os resultados dos exames eram avaliados pelo pesquisador.

Vale ressaltar que a permanência do paciente no laboratório foi de aproximadamente 3 horas consecutivas e que uma amostra de sangue era armazenada em tubos de ensaio e congelada até o momento da análise molecular dos polimorfismos. As etapas da coleta de dados estão esquematizadas na Figura 2.

Figura 2 - Etapas da coleta dos dados

4.5 Descrição das Variáveis e conceitos

As variáveis sociodemográficas utilizadas neste estudo foram: sexo, faixa etária, estado civil, cor, religião, nível de escolaridade e naturalidade. Os sinais clínicos e sintomas sugestivos de fenótipo intolerante foram: borborigmo, empachamento, diarreia, flatulência, constipação, perda de peso (Anexo I)

O fenótipo intolerante ou tolerante referem-se à presença ou não de pelo menos dois dos seguintes sintomas associados à ingestão de leite ou derivados: desconforto abdominal, dor abdominal, distensão, flatulência, diarreia (MULCARE et al., 2004).

O teste de tolerância à lactose (TTL ou Teste de sobrecarga à lactose) serve para avaliar a capacidade de absorção intestinal da lactose. A má absorção da lactose é confirmada com um aumento da glicemia em relação ao valor basal menor que 25 mg/dl; o que resultará em dois grupos: os quimicamente intolerantes e os quimicamente tolerantes (≥ 25 mg/dl).

A presença dos polimorfismos C/T-13910 e A/G-22018 foi identificada a partir de amostras de sangue periférico através da análise molecular pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase, e posterior RFLP com validação por sequenciamento de DNA. De acordo com o resultado obtido na análise molecular, os indivíduos foram classificados como: homocigoto intolerante, homocigoto tolerante ou heterocigoto.

Nesta pesquisa foi considerada como determinante do genótipo intolerante a presença do alelo C -13910 do polimorfismo C/T -13910 e do alelo A -22018 do A/G -22018.

O desfecho de interesse foi a inter-relação de fenótipo, teste químico e genótipo.

4.6 Provas diagnósticas

4.6.1 O teste de tolerância à lactose

Após jejum de 8 horas (pacientes eutróficos) e de 4 horas (pacientes desnutridos), foi coletada uma amostra de sangue (tempo zero). A seguir, administrou-se, por via oral, o açúcar (ou dissacarídeo) a ser testado em solução a 20%, na dose de 2 g/kg de peso corporal, na dose máxima de 50g (HEITLINGER; LEBETHA,1988). E colheram-se novas amostras de sangue nos tempos de 30, 60, 90 e 120 minutos, para determinação da glicemia. Um aumento de 25 mg/dl em relação à glicemia de jejum, em qualquer amostra, é considerado normal; entre 20 e 25, é duvidoso; e menor que 20 mg/dl é considerado anormal (BRUMMER, KARIBE, STOCKBRUEGGER, 1993).

4.6.2 Genotipagem do gene da Lactase-Florizina Hidrolase (LPH)

Para genotipar os indivíduos que poderiam apresentar tolerância ou intolerância à lactose devido à baixa expressão da enzima florizina-lactase hidrolase (LPH), o DNA sanguíneo foi isolado e amplificado por reação de polimerase em cadeia (PCR), utilizando *primers* específicos, que flanqueavam região promotora do gene LPH, onde localizam-se os polimorfismos de um único nucleotídeo (SNP) analisados neste estudo. Em seguida, foi realizada reação com enzima de restrição para identificação dos genótipos (RFLP) e confirmação dos resultados por sequenciamento.

4.6.3 Extração de DNA sanguíneo

O método empregado neste estudo seguiu os procedimentos descritos pelo fabricante do *kit* QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA).

Após pleno consentimento livre e esclarecido dos pacientes, foi coletado o volume de 2ml do sangue, com anticoagulante. Uma alíquota de 200µL de sangue foi adicionada a um tubo Eppendorf de 2ml e a este foram

acrescentados 200 µL de tampão AL e 20µL de proteinase K, fornecidos pelo *kit* acima mencionado. Essa mistura era homogeneizada em vórtex rapidamente e aquecida em banho-maria por 10 minutos a 56°C.

Após o aquecimento, foi realizada centrifugação rápida e, em seguida, adicionados 200µL de etanol 100%, e novamente se procedeu à homogeneização em vórtex por 15 segundos. Após outra centrifugação rápida, todo o volume era colocado em um tubo com filtro fornecido pelo *kit* e centrifugado a 8000 rpm por 1 minuto. O filtrado foi descartado e a coluna de filtro recolocada no tubo para a adição de uma solução de lavagem denominada AW1, na quantidade de 500µL. O tubo foi novamente centrifugado a 8000 rpm por 1 minuto. O filtro foi novamente removido e acoplado a novo tubo, com adição de 500µL de uma segunda solução de lavagem denominada AW2. A amostra então foi centrifugada novamente por 3 minutos à velocidade máxima de 14000 rpm. Para que nenhum excesso de etanol permanecesse na amostra antes da eluição final, o filtro coletor foi colocado em um novo tubo Eppendorf de 2ml, fornecido pelo fabricante, e centrifugado na mesma velocidade anterior por 1 minuto. Após esse procedimento, o filtro foi acoplado a um tubo Eppendorf de 1,5 ml e adicionado 200 µL do tampão AE à coluna, que foi incubada por 1 minuto à temperatura ambiente e em seguida centrifugada a 8000 rpm por 1 minuto.

4.6.4 Amplificação por reação de polimerase em cadeia (PCR)

Neste estudo foram analisados dois polimorfismos de um único nucleotídeo (SNP), localizados nos íntrons 9 e 13 do gene MCM6 situado no cromossomo 2 humano. Dois pares de *primers* (Tabela 3) descritos por BODJAL et al. (2006) e BÜNNING et al. (2005) foram sintetizados para avaliar os polimorfismos (C/T₋₁₃₉₁₀, e G/A₋₂₂₀₁₈) descritos por Tishkoff et al. (2007), relacionados aos fenótipos intolerantes ou tolerantes à lactose.

Foi utilizado como enzima polimerase GoTaq Green Master Mix (Promega, Madison, WI). Aos 20 µL do mastermix contendo a enzima, tampão

salino, cloreto de magnésio e deoxinucleotídeos, foram adicionados 4 µL de uma solução de cada *primer* (2 µM); 4 µL de DNA extraído; e um volume de água miliQ autoclavada que completava o volume final de 40 µL. Os parâmetros usados na reação de PCR incluíam uma desnaturação inicial de 95°C durante 5 minutos, seguida de 40 ciclos de 95°C por 30 segundos; 54°C (*primers* para o C>T₋₁₃₉₁₀) ou 65°C (*primers* para G>A₋₂₂₀₁₈) por 30 segundos; e 72°C por 1 minuto. Uma extensão final será feita a 72°C durante 10 minutos.

4.6.4.1 Técnica do RFLP (Polimorfismo baseado no tamanho do fragmento de restrição)

Seguida da PCR, a técnica RFLP foi realizada para a identificação de cada polimorfismo. Os genótipos de cada polimorfismo foram associados ao perfil dos fragmentos proporcionados pela clivagem enzimática (enzima *CviJI* para o C>T₋₁₃₉₁₀ (CHAO, 2004) e enzima *HhaI* para o G>A₋₂₂₀₁₈ (Bunning C et. al., 2003)). Os produtos de PCR ficaram incubados com cada enzima por 1 hora a 37°C. Os fragmentos obtidos foram visualizados em gel de agarose 5% corados por brometo de etídeo, sendo fotodocumentados pelo equipamento Chemidoc XRS (Biorad).

4.6.4.2 Purificação dos produtos de PCR

Em 20% das amostras, procedeu-se ao sequenciamento genético, a fim de se comprovar a metodologia PCR-RFLP empregada. Para que os produtos de PCR pudessem ser sequenciados, foi necessária a sua purificação, removendo os excessos de deoxinucleotídeos, *primers* e outros componentes que prejudicariam um melhor desempenho do sequenciador. Para tanto, foi utilizado o método descrito pelo fabricante do QIAquick*purification kit* (Qiagen, Valencia CA-USA).

Resumidamente, uma alíquota de 25 µL do produto da reação de PCR foi misturado a 125 µL de um tampão PBI fornecido pelo *kit*. Essa mistura foi aplicada em um tubo coletor contendo uma coluna filtrante e cada amostra foi centrifugada a 14000 rpm por 1 minuto. O filtrado foi descartado e a coluna

filtrante recolocada no tubo coletor. Foram adicionados 750 μL do tampão PE contendo etanol 100% e centrifugados novamente por 14000 rpm no tempo de 1 minuto. O filtrado foi descartado e novamente centrifugado na mesma velocidade e tempo, para que todo o excesso de etanol fosse liberado do filtro. O tubo coletor, não fornecido pelo *kit*, foi substituído e depois aplicado um volume de 30 μL do tampão de ebulição EB e centrifugado por 1 minuto à velocidade de 14000 rpm. A seguir, foi realizada a análise espectrofotométrica para quantificar o DNA purificado, que foi então sequenciado.

4.6.4.3 Sequenciamento

Após a purificação dos produtos de PCR, reações de sequenciamento foram preparadas. Essas reações, para cada 1 μL (aproximadamente 3 a 10 ng de DNA para produtos de até 500 pb) de produto de PCR purificado, continham: 0,5 μL de master mix (Bigdye v.3 – Applied Biosystems) contendo enzima específica, tampão salino e deoxinucleotídeos marcados ou não com fluorescência; 2 μL de *primers* (2 μM) senso ou antisenso; 2,5 μL de tampão salino fornecido pelo *kit* (Bigdye v.3 – Applied Biosystems); e água miliQ autoclavada para completar o volume das reações para 10 μL .

Cada amostra foi aplicada em poço individual de placa com 96 poços. No termociclador (MyCycler – Bio-Rad), as reações continham as seguintes programações: desnaturação inicial a 96°C por 1 minuto, seguida de 40 ciclos a 96°C por 30 segundos; 54°C (*primers* para o C>T-13910) ou 65°C (*primers* para G>A-22018) por 30 segundos; e 60°C por 4 minutos. Com o término dessa reação, foram adicionados a cada poço 40 μL de isopropanol (65%). Após descanso de 20 minutos em temperatura ambiente, as amostras em placa foram centrifugadas por 35 minutos em velocidade de 3000 rpm para precipitação. O sobrenadante foi descartado por inversão das placas, seguido de centrifugação invertida rápida por 1 minuto a 3000 rpm. Ao precipitado, foram acrescentados 200 μL de etanol (60 %), para assim centrifugar por 5 minutos em velocidade de 3000 rpm. O etanol deve ser completamente retirado por inversão das placas, seguido novamente de centrifugação invertida por 1

minutos na velocidade de 3000 rpm. Em seguida, a cada poço foram aplicados 20 µL de formamida deionizada e ultrapura (Hi-Di – Applied Biosystems).

Ao término da rediluição das amostras em formamida, as placas foram levadas novamente ao termociclador para aquecimento a 96°C por 2 minutos. Em seguida, elas foram rapidamente resfriadas em gelo por mais 2 minutos. Aplicadas ao sequenciador, as amostras tiveram tempo de injeção de 30 segundos a 2 kV e a eletroforese procedeu com uma voltagem de 12,2 kV por 1,5 hora. Ao término de cada reação, os resultados foram analisados a partir do *software Sequencer Scanner* versão 1.0 (Applied Biosystems). E, as sequências dos primers específicos utilizados no estudo (tabela 2).

Tabela 2– Sequência dos primers específicos utilizados neste estudo

Nome do primer	Primers senso (5'-3')	Primer antissenso (5'-3')
LPH1	TGAGTGTAGTTGTTAGACGG	CAACCTAAGGAGGAGAGT
LPH2	AAAAGGCACGTGGAGGAG	CCCACCTCAGCCTCTTGAGT

Vale ressaltar que a extração de DNA e a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase foram realizadas no laboratório de Doenças Infecciosas, Unidade de Pesquisas Clínicas, Instituto de Biomedicina da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, com o auxílio e a supervisão de colaboradores deste estudo.

4.7 Processamento e análise dos dados

Após a coleta, os dados foram digitados em uma planilha Excel e, após a digitação, exportados para o *software* estatístico STATA versão 8.0 para tratamento e análise dos resultados, que foram apresentados em figuras e tabelas.

A análise dos dados consistiu no estudo descritivo e exploratório das características sociodemográficas e das manifestações clínicas identificadas, do fenótipo intolerante, químico (TTL) e genotípico na população de estudo, mediante uso de distribuições de frequências uni e bivariadas para as variáveis qualitativas e de medidas descritivas para as variáveis quantitativas (média e desvio padrão).

As diferenças proporcionais entre os testes e a ausência ou presença do sintoma foram verificadas através dos testes Qui-quadrado de Pearson e o Exato de Fischer. Para estimar a magnitude das associações, foi utilizada como medida de frequência a prevalência, e como medida de associação, a razão de prevalência (RP), e seus respectivos intervalos de confiança a 95%, estimados em função do risco relativo (RR) pelo teste de homogeneidade de Mantel-Haenszel.

Neste estudo, o uso da *odds ratio* foi contraindicado, pois superestimaria as medidas de associação, dada a elevada prevalência do fenótipo intolerante, químico e genotípico, na população de estudo (> 10%). Em todas as análises, adotou-se o nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

Foi utilizada a “*receiving operating characteristic curve*” (curva ROC) para determinação da diferença (Δ máximo - basal) de 15, 20 e 25, com o diagnóstico de intolerante químico à lactose que conferisse adequados valores de sensibilidade e especificidade. A curva ROC foi considerada adequada quando a área sob a curva, que representa a acurácia do método, foi maior que 0,8. Foram selecionados os pontos que atenderam aos seguintes critérios: especificidade ≥ 95 %; sensibilidade adequada; e razão de verossimilhança positiva ≥ 10 . A razão de verossimilhança é definida como o quociente obtido da razão entre pacientes intolerantes que apresentam teste positivo (sensibilidade) e pessoas não intolerantes que também apresentam testes positivos (falso-positivos).

4.8 Aspectos Éticos

A pesquisa proposta foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Complexo Hospitalar Walter Cantídio (CEP 294/2009) (ANEXO).

A participação neste estudo foi absolutamente voluntária. Todos os participantes receberam duas vias do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, com informações sobre as justificativas, objetivos, procedimentos, riscos e benefícios da pesquisa. Foram aceitos, no estudo, somente aqueles voluntários que assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Assegurou-se aos sujeitos total liberdade de recusa ou de retirada do seu consentimento, em qualquer momento no transcorrer da pesquisa, sem qualquer prejuízo ou constrangimento. A todos foi garantido o direito de receber esclarecimentos de dúvidas pertinentes à pesquisa e de obter informações atualizadas sobre o estudo.

Da mesma forma, foram assegurados o sigilo das informações e a não identificação dos participantes, conforme os princípios da Resolução n.º 196, de 10 de outubro de 1996, do Conselho Nacional de Saúde (BRASIL, 1996). As amostras de sangue foram identificadas por códigos e serão mantidas por um período de cinco anos para eventual revalidação dos dados, se solicitada por ocasião da publicação dos resultados da pesquisa.

É importante ressaltar que os dados utilizados neste projeto relacionam-se a procedimentos de rotina diagnóstica no atendimento a pessoas com suspeita de intolerância alimentar, exceto o teste de genotipagem.

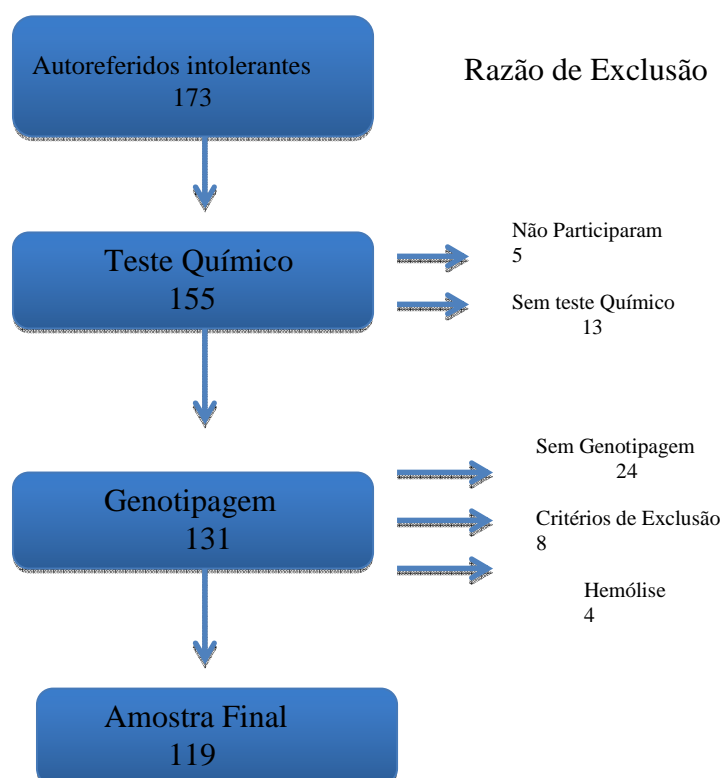
As informações serão utilizadas com a finalidade de atender aos objetivos da pesquisa, sem causar prejuízos à instituição ou aos seres humanos nela envolvidos.

5 RESULTADOS

De acordo com os critérios estabelecidos na metodologia, o total de indivíduos aleatoriamente convidados para participar do estudo foi de 173. Destes, cinco não aceitaram participar do estudo e 13 não realizaram o teste químico. 155 indivíduos realizaram o teste químico, porém 24 sem genotipagem, oito fizeram o teste genético e foram excluídos por problemas técnicos na amostra (hemólise) e quatro não participaram devido aos critérios de exclusão do estudo, totalizando uma amostra final de 119 indivíduos (Figura 3).

Dos indivíduos, 54 eram fenótipos intolerantes, coincidindo com a presença de manifestações clínicas de intolerância referidas na avaliação inicial.

Figura 3-Sequência da seleção da amostra do estudo



Assim, visando facilitar a apresentação e a análise, os dados serão apresentados na seguinte ordem: 5.1) Características Sociodemográficas da amostra do estudo; 5.2) Características Clínicas e o Fenótipo Intolerante; 5.3) Associação das características clínicas com os sintomas de diarreia (fenótipo intolerante); 5.4) Descrição do resultado do Teste de Tolerância à Lactose; 5.5) Caracterização do Genótipo Intolerante; 5.6) Associação Bruta de cada um dos sintomas relatados pelos indivíduos e os testes aplicados (fenótipo e genótipo intolerante e o químico).

5.1 Características sociodemográficas da amostra do estudo

Na amostra estudada, 54,6% (65) dos casos eram do sexo feminino. Quanto à faixa etária, o maior número de indivíduos estava entre 45 e 54 anos (26,9%), seguido da faixa etária de 25 a 34 anos (18,5%) e de 55 a 64 anos (17,6%). (Tabela 3).

Em relação ao estado civil, 65,6% (78) eram casados ou em união estável; seguidos pelos solteiros, 21% (25). Os divorciados e viúvos, juntos, representaram 13,4% (16) do total, demonstrado na Tabela 3.

A relação de intolerância à lactose com a cor tem sido investigada em alguns estudos, daí a importância dessa variável. E, neste estudo, predominou a cor parda com 54,6% (65) do total de casos pesquisados, seguida pela cor branca, 45,6 % (54).

Quanto aos níveis de escolaridade, observou-se um predomínio de indivíduos de nível superior, inclusive com pós-graduação. Esse subgrupo representou 42,9% (51) do total de casos, seguido pelos indivíduos com ensino médio, com 37,8% (45). Quase a totalidade dos indivíduos atendidos, 91,6 % (109), nasceu em Fortaleza (Tabela 3).

A prevalência de intolerância à lactose encontrada na população de estudo foi de 45,4%, representando os 54 indivíduos que, após avaliação clínica, se caracterizaram com fenótipo intolerante. A prevalência de intolerância química encontrada foi de 73,9%.

Tabela 3 – Características sociodemográficas da população de estudo (n=119). Hospital Universitário Walter Cantídio. Fortaleza/CE, janeiro-agosto de 2010

Característica	n (%)
Sexo	
Masculino	54 (45,4)
Feminino	65 (54,6)
Total	119(100)
Grupo etário (em anos)	
<15	2 (1,7)
15 – 24	9 (7,5)
25 – 34	22 (18,5)
35 – 44	19 (16,0)
45 – 54	32 (26,9)
55 – 64	21 (17,6)
65 ou mais	14 (11,8)
Total	119 (100)
Estado Civil	
Casada(o)/Unida(o)	78 (65,6)
Divorciada(o)	11 (9,2)
Solteira(o)	25 (21,0)
Viúva(o)	5 (4,2)
Total	119 (100)
Cor autorreferida	
Parda	65 (54,6)
Branca	54 (45,4)
Total	119 (100)
Religião	
Católica	101 (84,9)
Protestante	17 (14,3)
Outras	1 (0,8)
Total	119 (100)

Nível de Escolaridade

Ensino Básico	4 (3,3)
Ensino Fundamental	2 (1,7)
Ensino Médio	45 (37,8)
Nível superior	51 (42,9)
Pós-Graduação	17 (14,3)
Total	119 (100)

Naturalidade

Fortaleza	109 (91,6)
Sobral	6 (5,0)
Caucaia	3 (2,5)
Iguatu	1 (0,9)
Total	119 (100)

Fonte: Banco de dados do Ambulatório dos Servidores HUWC.

5.2 Características clínicas e fenótipo intolerante

Foram investigadas durante a consulta médica, após o paciente se autoreferir intolerante aos lácteos, as manifestações clínicas suspeitas de intolerância à lactose mais comumente referenciadas na literatura (Mulcare et al., 2004): empachamento, borborigmo, diarreia, flatulência, constipação e perda de peso, o que caracteriza o indivíduo como fenótipo intolerante. Os sintomas que apresentaram maior prevalência no grupo com fenótipo intolerante foram principalmente: flatulência com, 81,5% (44); empachamento, com 68,5% (37); borborigmo, com 59,3% (32); e diarreia, com 46,3% (25). O sintoma que apresentou menor prevalência foi a perda de peso, 24,1% (13) (Tabela 4).

Na **Tabela 4**, podem ser verificadas diferenças proporcionais estatisticamente significantes entre o fenótipo intolerante e os sintomas empachamento, borborigmos, diarreia e flatulência, ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$). Entretanto, os grupos não diferiram quanto à perda de peso ($p = 0,454$) e constipação ($p = 0,188$). Contudo, é importante ressaltar a importância de investigar esses sintomas durante a avaliação clínica.

Tabela 4 – Distribuição das características clínicas identificadas e do fenótipo intolerante na população de estudo (n=119), Hospital Universitário Walter Cantídio. Fortaleza/CE, janeiro a agosto de 2010

Sintomas	Fenótipo Intolerante		valor de p ^a
	Sim n (%)	Não n (%)	
Flatulência			0,000
Não	10 (18,5)	35 (53,8)	
Sim	44 (81,5)	30 (46,2)	
Total	54 (100)	65 (100)	
Empachamento			0,022
Não	17 (31,5)	34 (52,3)	
Sim	37 (68,5)	31 (47,7)	
Total	54 (100)	65 (100)	
Borborigmo			0,009
Não	22 (40,7)	42 (64,6)	
Sim	32 (59,3)	23 (35,4)	
Total	54 (100)	65 (100)	
Diarreia			0,013
Não	29 (53,7)	49 (75,4)	
Sim	25 (46,3)	16 (24,6)	
Total	54 (100)	65(100)	
Constipação			0,188
Não	32 (59,3)	46 (70,8)	
Sim	22 (40,7)	19 (29,2)	
Total	54 (100)	65 (100)	
Perda de peso			0,454
Não	41 (75,9)	53 (81,5)	
Sim	13 (24,1)	12 (18,5)	
Total	54 (100)	65 (100)	

Nota:^a Teste Chi-quadrado de Pearson.

Na **Tabela 5**, foi avaliada a magnitude das associações encontradas entre o fenótipo intolerante e as manifestações clínicas identificadas na população do estudo. A prevalência de fenótipo intolerante entre os indivíduos com diarreia foi de 61% e entre os fenótipos tolerantes foi de 37,2%. A razão de prevalência foi de 1,64 (IC95 %: 1,12; 2,39), assim a chance de um indivíduo com diarreia ter o fenótipo intolerante é 1,64 vezes superior (há um aumento do risco em 64%), quando comparado aos fenótipos tolerantes, sendo esta uma associação estatisticamente significativa (Tabela 5).

A prevalência de fenótipo intolerante entre os indivíduos com flatulência foi de 59,5% e entre os fenótipos tolerantes foi de 22,2%. A razão de prevalência foi de 2,67 (IC95%: 1,50; 4,77), assim o risco de um indivíduo com flatulência ter o fenótipo intolerante é 2,67 vezes superior (há um aumento do risco em 167%), quando comparado aos fenótipos tolerantes, sendo esta uma associação estatisticamente significativa.

A prevalência de fenótipo intolerante entre os indivíduos com borboríngos foi de 58,2% e entre os fenótipos tolerantes foi de 34,4%. A razão de prevalência (obtida em função da razão de risco) foi de 1,69 (IC95%: 1,13; 2,54), assim o risco de um indivíduo com borboríngos ter o fenótipo intolerante é 1,69 vezes superior (há um aumento do risco em 69%), quando comparado aos fenótipos tolerantes, sendo esta uma associação estatisticamente significativa. Borboríngos é, portanto, o sintoma mais comum, seguido do empachamento (Tabela 5).

A prevalência de fenótipo intolerante entre os indivíduos com empachamento foi de 54,4% e entre os de fenótipos tolerantes foi de 33,3%. A razão de prevalência (obtida em função da razão de riscos) foi de 1,63 (IC95%: 1,04; 2,55), ou seja, o risco de um indivíduo com empachamento ter o fenótipo intolerante é 1,63 vezes superior (ou um aumento do risco em 63%), quando comparado ao fenótipo tolerante, sendo esta uma associação estatisticamente significativa. Posteriormente, foi feita uma análise de correlação por meio de teste químico e genotipagem com a diarreia, a fim de avaliar se esse sintoma é um bom marcador diagnóstico (Tabela 5).

Tabela 5– Associação entre as características clínicas identificadas e o fenótipo intolerante na população de estudo (n=119). Hospital Universitário Walter Cantídio. Fortaleza/CE, janeiro a agosto de 2010

Sintomas	Prevalência n (%)	RP ^a	IC 95% ^a
Diarreia			
Não	29 (37,2)	1,00	--
SIM	25 (61,0)	1,64	1,12 - 2,39
Flatulência			
Não	10 (22,2)	1,00	--
Sim	44 (59,5)	2,67	1,50 - 4,77
Borborigmo			
Não	22 (34,4)	1,00	--
Sim	32 (58,2)	1,69	1,13 - 2,54
Empachamento			
Não	17 (33,3)	1,00	--
Sim	37 (54,4)	1,63	1,05 - 2,55

Fonte: Primária

Nota:^aRazão de prevalência estimada em função do Risco Relativo pelo Teste de Homogeneidade de Mantel-Haenszel.

5.3 Associação das características clínicas com o sintoma relatado de diarreia pelos indivíduos (fenótipo intolerante)

Na caracterização clínica dos indivíduos diagnosticados com e sem diarreia na população de estudo (n=119), observou-se que os grupos mostraram-se proporcionalmente semelhantes (homogêneos) com relação ao sexo ($p=0,878$). Do total de indivíduos com diarreia, 53,7% corresponderam ao sexo feminino, e 46,3%, ao masculino. Não houve diferença estatisticamente significativa na frequência do sintoma diarreia entre os dois (Tabela 6).

Com relação à cor e à presença de diarreia, verificou-se que, apesar dos grupos mostrarem-se proporcionalmente semelhantes ($p=0,254$), houve um predomínio de indivíduos de cor parda entre os casos com diarreia (61%), quase o dobro da branca (39%). Já, entre os casos sem diarreia, os grupos de brancos (50%) e pardos (50%) foram semelhantes (Tabela 6).

Quanto à distribuição etária não se verificou um padrão definido dos indivíduos com e sem diarreia. Entretanto, verificou-se que houve predomínio de indivíduos sem diarreia na faixa etária de 45 a 54 anos (30,8%), e com diarreia na faixa etária mais avançada, correspondendo a 19,5% dos casos (Tabela 6). O sintoma diarreia não apresenta correlação estatisticamente significativa com as características sociodemográficas avaliadas na Tabela 6.

A avaliação do IMC mostrou que os grupos com e sem diarreia foram semelhantes, tendo a mesma distribuição entre os de peso normal e com excesso de peso (41,5%), e que a ocorrência de diarreia foi idêntica nos grupos pertencentes à faixa aceitável (41,5%) e entre aqueles com excesso de peso (41,5%). (Tabela 6).

Tabela 6 – Distribuição proporcional das características clínicas e o relato de diarreia na população de estudo (n = 119). Hospital Universitário Walter Cantídio. Fortaleza/CE, janeiro - agosto de 2010

Características Clínicas	Presença de Diarreia		valor de p ^a
	Sim n (%)	Não n (%)	
Sexo			
Masculino	19 (46,3)	35 (44,9)	0,878
Feminino	22 (53,7)	43 (55,1)	
Total	41 (100,0)	78 (100,0)	
Grupo Etário (em anos)			
<15	1 (2,4)	1 (1,3)	
15 – 24	2 (4,9)	7 (9,0)	
25 – 34	8 (19,5)	14 (17,9)	
35 – 44	7 (17,1)	12 (15,4)	
45 – 54	8 (19,5)	24 (30,8)	
55 – 64	7 (17,1)	14 (17,9)	
65 ou mais	8 (19,5)	6 (7,7)	
Total	41 (100,0)	78 (100,0)	
Cor			
Parda	25 (61,0)	39 (50,0)	0,254
Branca	16 (39,0)	39 (50,0)	
Total	41 (100,0)	78 (100,0)	
IMC			
Faixa aceitável	17 (41,5)	31 (39,8)	
Obesidade	5 (12,2)	10 (12,8)	
Excesso de peso	17 (41,5)	32 (41,0)	
Desnutrição leve	2 (4,8)	5 (6,4)	
Total	41 (100,0)	78 (100,0)	

Fonte: Banco de dados do Ambulatório dos Servidores HUWC.

Nota: ^a valor de p obtido pelo Teste Chi-quadrado de Pearson.

A prevalência de diarreia entre os indivíduos identificados com flatulência foi de 47,3% e entre os sem flatulência foi de 13,3%. Na população do estudo, a prevalência de diarreia foi de 61% e a de flatulência foi de 59,5% (Tabela 5). Houve diferença entre a presença de diarreia e flatulência ($p=0,000$), ou seja, os grupos com e sem flatulência diferem com relação à presença de diarreia (Tabela 7).

Foi identificada associação positiva e estatisticamente significativa entre os indivíduos com relato de diarreia (desfecho) e a presença de flatulência (fator de exposição ou de risco). A chance de indivíduos com flatulência terem diarreia foi 3,55 vezes superior (IC95%: 1,62-7,76), quando comparados aos indivíduos sem flatulência. A flatulência é um possível fator associado à presença de diarreia na população de estudo (Tabela 7).

A prevalência de diarreia entre os indivíduos identificados com empachamento (expostos) foi de 42,6% e entre os sem empachamento foi de 23,5%. Na população de estudo, a prevalência de diarreia foi de 61% e a de empachamento foi de 54,4% (Tabela 5). Foi identificada associação positiva e estatisticamente significativa entre os indivíduos com relato de diarreia (desfecho) e a presença de empachamento (fator de exposição ou de risco). A chance de indivíduos com empachamento terem diarreia foi 1,81 vezes superior (IC95%: 1,03-3,19), quando comparados aos indivíduos sem empachamento. O empachamento é um possível fator associado à presença de diarreia na população de estudo (Tabela 7). Os demais sintomas não tiveram associação à presença de diarreia.

Embora na intolerância à lactose a diarreia possa se tornar crônica, os indivíduos afetados geralmente não perderam peso. No entanto, alguns indivíduos apresentaram constipação devido à diminuição da motilidade intestinal, possivelmente determinada pelas características individuais.

Tabela 7 – Associação bruta entre os sintomas relatados pelos indivíduos e a presença de diarreia (n = 119). Hospital Universitário Walter Cantídio. Fortaleza/CE, janeiro a agosto de 2010

Sintomas e Presença de diarreia	Prevalência n (%)	RP ^a	IC 95% ^a	p
Flatulência				
Não	6 (13,3)	1,00	1,62-7,76	0,000 ^a
Sim	35 (47,3)	3,55		
Empachamento				
Não	12 (23,5)	1,00	--	0,030 ^a
Sim	29 (42,6)	1,81	1,03 - 3,19	
Borborigmo				
Não	19 (29,7)	1,00	--	0,238 ^a
Sim	22 (40,0)	1,35	0,82 - 2,21	
Constipação				
Não	27 (34,6)	1,00	--	0,959 ^a
Sim	14 (34,2)	0,99	0,58 - 1,66	
Perda de peso				
Não	6 (13,3)	1,00	--	0,258 ^a
Sim	35 (47,3)	1,38	0,81 - 2,35	

Nota:^a Razão de prevalência estimada em função do Risco Relativo pelo Teste de Homogeneidade de Mantel-Haenszel; ^b valor de p obtido pelo Teste Chi-quadrado de Pearson.

5.4 Resultado do teste químico de intolerância à lactose

Existem diversas formas de fazer o diagnóstico de intolerância à lactose, desde o método clínico associando sintomas com a ingestão de leite, à prova do hidrogênio expirado, à biópsia do jejuno e ao teste químico de tolerância à lactose, que se baseia no resultado da curva glicêmica após ingestão de 50g de lactose. Este último é o mais comum e o mais disponível nos laboratórios.

Os resultados do teste químico tendo como ponto de corte a diferença Δ (máximo - basal) de 15, 20 e 25 (g/dl) quanto à presença do fenótipo intolerante estão demonstrados na Tabela 6. Vale ressaltar que os indivíduos quimicamente tolerantes são aqueles cujas diferenças entre a maior glicemia da curva e seu valor basal (jejum) sejam maiores ou iguais ao valor do ponto de corte da curva estudada. Os quimicamente intolerantes são aqueles cujas diferenças entre a maior glicemia da curva e seu valor basal (jejum) sejam menores que o valor do ponto de corte da curva glicêmica estudada (15,20 ou 25).

Foi encontrada associação entre os testes químicos com o fenótipo intolerante. Na Δ (máximo - basal) <15, 46 (85,2%) dos indivíduos se apresentaram quimicamente intolerantes e tinham o fenótipo intolerante. E também na Δ (máximo - basal) <20, 49 (90,7%) dos indivíduos se apresentaram quimicamente intolerantes, com o fenótipo intolerante; e com a Δ (máximo - basal) <25, houve 50 (92,6%) casos (Tabela 8).

Tabela 8 – Distribuição proporcional da diferença Δ máximo - basal (15, 20, 25) e o fenótipo intolerante na população de estudo (n=119). Hospital Universitário Walter Cantídio. Fortaleza/CE, agosto a dezembro de 2010

Diferença Δ (máximo - basal)	Fenótipo Intolerante		valor de p
	Sim n (%)	Não n (%)	
<15			
Tolerante	8 (14,8)	49 (75,4)	0,000^a
Quimicamente intolerante	46 (85,2)	16 (24,6)	
Total	54 (100)	65 (100)	
<20			
Tolerante	5 (9,3)	36 (55,4)	0,000^a
Quimicamente intolerante	49 (90,7)	29 (44,6)	
Total	54 (100)	65 (100)	
<25			
Tolerante	4 (7,4)	27 (41,5)	0,000^b
Quimicamente intolerante	50 (92,6)	38 (58,5)	
Total	54 (100)	65 (100)	

Nota: ^a Teste Chi-quadrado de Pearson; ^b Teste Chi-quadrado Exato de Fischer.

A associação da diferença Δ (máximo - basal) de 15, 20 e 25 com a presença do fenótipo intolerante está demonstrada na Tabela 9. Na Δ (máximo - basal) <15, 46 (74,2%) indivíduos se apresentaram quimicamente intolerantes e com o fenótipo intolerante. E na Δ (máximo - basal) <20, 49 (62,8%) se apresentaram quimicamente intolerantes e com fenótipo intolerante; e com Δ (máximo - basal) <25, foram 50 (56,8%) indivíduos.

A chance na Δ (máximo - basal) < 15 de indivíduos quimicamente intolerantes foi 5,29 vezes superior (IC95%: 2,73-10,22), quando comparados aos indivíduos tolerantes. Já, a chance na Δ (máximo - basal) < 20 de indivíduos quimicamente intolerantes foi 5,15 (IC95%: 2,23-11,92), quando comparados ao intolerante, e na Δ (máximo - basal) < 25 de indivíduos

quimicamente intolerantes foi de 4,40 (IC95%: 1,73-11,19), quando comparados ao intolerante (Tabela 9).

Tabela 9– Associação entre a diferença Δ máximo - basal (15, 20, 25) e o fenótipo intolerante na população de estudo (n=119). Hospital Universitário Walter Cantídio. Fortaleza/CE, agosto a dezembro de 2010

Diferença Δ (máximo – basal)	Prevalência n (%)	RP ^a	IC 95% ^a
<15			
Tolerante	8 (14,0)	1,00	--
Quimicamente intolerante	46 (74,2)	5,29	2,73 - 10,22
<20			
Tolerante	5 (12,2)	1,00	--
Quimicamente intolerante	49 (62,8)	5,15	2,23 - 11,92
<25			
Tolerante	4 (12,9)	1,00	--
Quimicamente intolerante	50 (56,8)	4,40	1,73 - 11,19

Nota: ^aRazão de prevalência estimada em função do Risco Relativo pelo Teste de Homogeneidade de Mantel-Haenszel.

Com base nos resultados abaixo, foi possível definir entre os Delta max-basal encontrados (15, 20, 25) aquele que apresentou maior sensibilidade e especificidade no diagnóstico de intolerância – qual o valor do delta que tem maior força diagnóstica de especificidade e sensibilidade – em relação ao padrão atualmente usado, que é 25.

Na Tabela 10, podem ser encontrados os dados referentes à sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) de acordo com as diferenças basal 15, 20 e 25.

Tabela 10– Sensibilidade, especificidade e valor preditivo positivo e negativo das diferenças Δ máximo - basal (15, 20, 25) na população de estudo (n=119). Hospital Universitário Walter Cantídio. Fortaleza/CE, agosto a dezembro de 2010

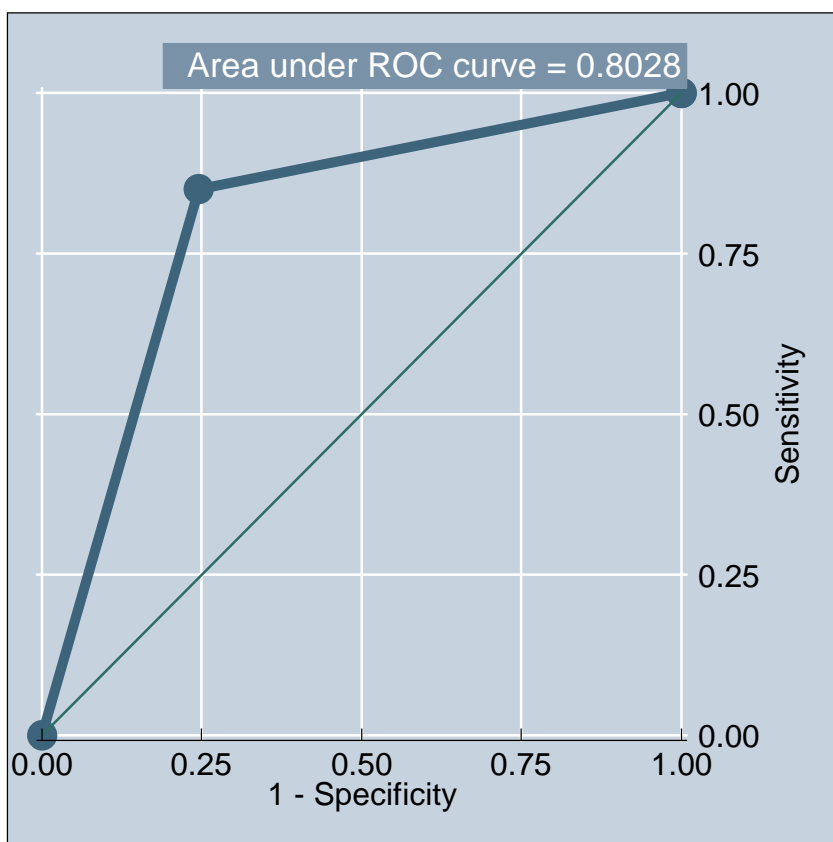
Δ (máximo – basal)	Sensibilidade	Especificidade	VPP	VPN
<15	85,2	75,4	74,2	86,0
<20	90,7	55,4	62,8	87,8
<25	92,6	41,5	56,8	87,1

Notas:VPP : Valor preditivo positivo; VPN: Valor preditivo negativo.

A medida que apresentou a melhor combinação de sensibilidade e especificidade foi a Δ (máximo – basal) 15;nesse ponto de corte, pode-se classificar o indivíduo como intolerante à lactose. Com a Δ (máximo – basal) <15, a sensibilidade é de 85,2%, enquanto que o poder para classificar como tolerante à lactose é de 75,4%. Na Δ (máximo – basal) <20, a sensibilidade foi de 90,7% e a especificidade foi de 55,4%; e para a Δ (máximo – basal) <25, os resultados foram de 92,6% para sensibilidade e de 41,5% para especificidade.

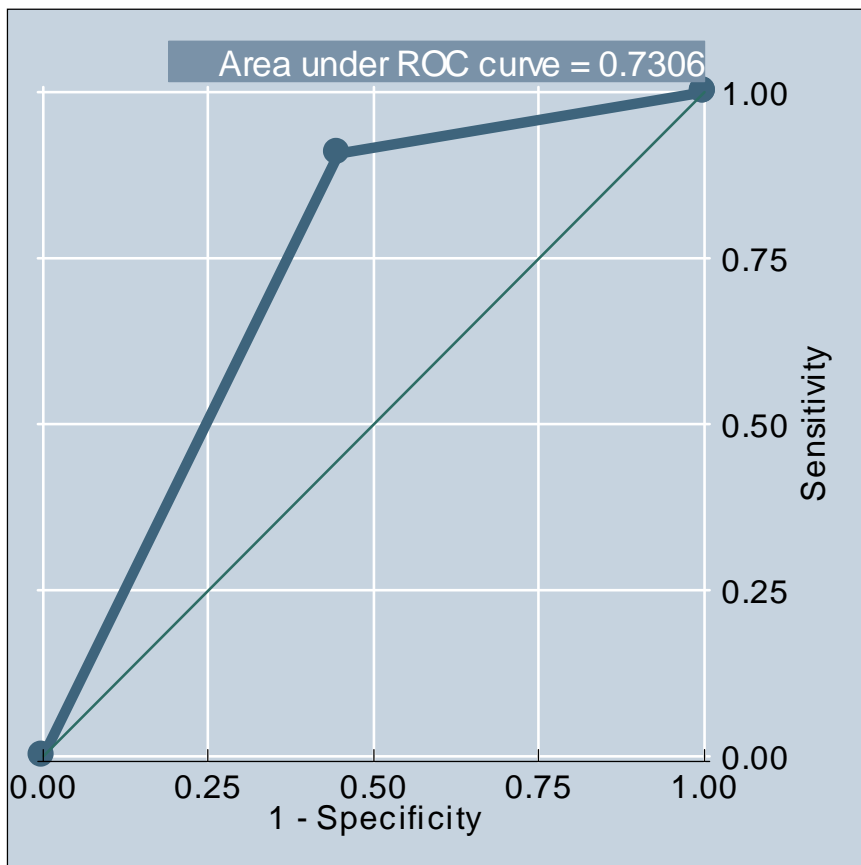
Dentre as curvas ROC para Δ máximo - basal de <15, <20 e <25 e o diagnóstico de intolerante à lactose, a que mais se apresentou adequada foi a Δ (máximo – basal) <15 com a curva maior que 80,2%, pois as outras foram, respectivamente, 73% e 67%, sendo estabelecidos os pontos de corte que conferiram elevada sensibilidade (≥ 95 %) e melhor VPP sem grande prejuízo para sensibilidade e especificidade (Gráfico1).

Gráfico 1– Área sob a curva ROC da diferença (Δ máximo – basal) <15 e o diagnóstico de intolerância



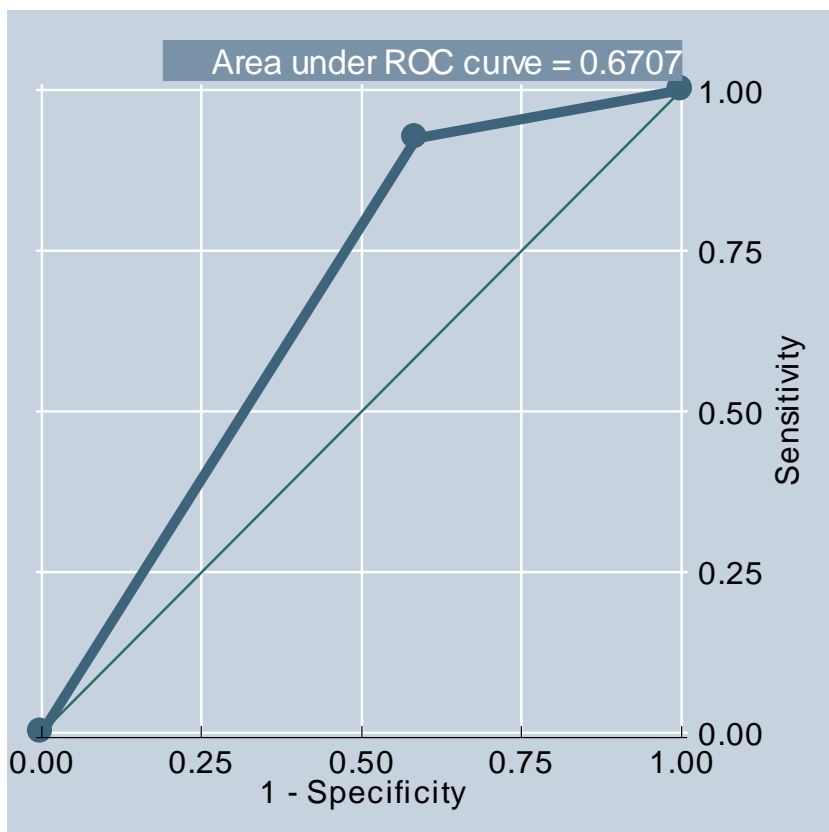
A curva ROC da curva basal <15 e o diagnóstico de intolerante à lactose foi 0,80.

Gráfico 2– Área sob a curva ROC da diferença (Δ máximo - basal) <20 e o diagnóstico de intolerância



A curva ROC da diferença (Δ máximo - basal) <25 e o diagnóstico de intolerância à lactose foi 0,67.

Gráfico 3– Área sob a curva ROC da Δ (máximo – basal) <25 e o diagnóstico de intolerância



5.5 Genótipo intolerante

Os três genótipos possíveis para a mutação (homozigoto tolerante, homozigoto intolerante e heterozigoto) foram determinados para os 119 participantes do estudo, conforme o fenótipo intolerante (Tabela 11).

Tabela 11– Distribuição proporcional dos genótipos avaliados e o fenótipo intolerante na população de estudo (n=119). Hospital Universitário Walter Cantídio. Fortaleza/CE, janeiro a agosto de 2010

Genótipo	Fenótipo Intolerante		valor de p ^a
	Sim n (%)	Não n (%)	
Polimorfismo C/T -13910			
Homozigoto tolerante (TT)	1 (1,8)	4 (6,2)	0,000
Homozigoto intolerante (CC)	41 (76)	26 (40,0)	
Heterozigotos (CT)	12 (22,2)	35 (53,8)	
Total	54 (100)	65 (100)	
Polimorfismo A/G – 22018			
Homozigoto tolerante (AA)	1 (1,8)	4 (6,1)	0,005
Homozigoto intolerante (GG)	36 (66,7)	25 (38,5)	
Heterozigotos (AG)	17 (31,5)	36 (55,4)	
Total	54 (100)	65 (100)	

Nota:^a Teste Chi-quadrado Exato de Fischer.

A presença do polimorfismo C/T-13910 no homozigoto intolerante esteve presente em 76% (41 casos) e em 22,2% (12 casos) no heterozigoto com fenótipo intolerante. Enquanto que 60% (39 casos, sendo quatro homozigotos tolerantes e 35 heterozigotos) apresentaram genótipo tolerante. Dessa forma, somente um (1,8%) apresentou resultado positivo para homozigoto tolerante, sendo fenotipicamente intolerantes. Portanto 76% (41 casos) dos participantes coincidiram genótipo e fenótipo intolerantes. Foram identificadas diferenças estatisticamente significantes entre o fenótipo intolerante e o polimorfismo C/T-13910 ($p = 0,000$) (Tabela 11). A presença

do homozigoto tolerante e heterozigoto é um forte indicativo da presença de tolerância à lactose.

Já, naqueles que não apresentaram fenótipo intolerante, a presença do polimorfismo C/T-13910 nos heterozigotos esteve presente em 53,8% (35 casos); 40% (26 casos) nos homozigotos intolerantes; e 6,2% (quatro casos) nos homozigotos tolerantes. O que implica numa coincidência de 60% (39 casos) também apresentarem genótipo tolerante, ou seja, a soma dos homozigotos tolerantes e dos heterozigotos que são também tolerantes (mutação autossômica dominante) (Tabela 11).

A presença do polimorfismo A/G-22018 teve a seguinte distribuição: quanto ao fenótipo intolerante, 66,7% (36 casos) dos indivíduos homozigotos intolerantes; e 33,3% (18 casos) de heterozigotos e homozigotos tolerantes. Dessa forma, a maior incidência, 66,7% (36 indivíduos), da amostra estudada apresentou o genótipo considerado intolerante (Tabela 11).

Ao compararmos o polimorfismo G/T-13910 e o polimorfismo A/G-22018, observamos uma correlação de genótipo e fenótipo intolerante de 76% para o C/T-13910 e 66,7% para o A/G-22018. No genótipo tolerante e fenótipo tolerante a correlação foi de 60% para o C/T-13910 e 61,5% para o A/G-22018. A associação genótipo tolerante e fenótipo intolerantes nos dois polimorfismos tolerantes foi a que demonstrou maior aproximação. Pode-se, portanto, utilizar diferentemente os dois polimorfismos na correlação com fenótipo tolerante na nossa amostra.

A razão de prevalência determinou, neste caso, a correlação entre os fenótipos intolerantes e genótipos intolerantes, levando-se em conta os falso-positivos e falso-negativos. Ao analisamos no polimorfismo C/T-13910 o genótipo intolerante e fenótipo intolerante, a prevalência de fenótipo intolerante entre os indivíduos com homozigoto intolerante foi de 61,2% (41 casos); a razão de prevalência foi de 3,06 (IC95 %: 0,52-17,98), o que significa dizer que

o fenótipo intolerante ocorre 3,06 vezes mais entre os indivíduos com homocigoto intolerante do que entre os outros genótipos (Tabela 12).

Da mesma forma, o fenótipo tolerante ocorreu 2,28 vezes mais entre os indivíduos com genótipo tolerante (homocigoto tolerante e heterocigoto) do que entre aqueles genotipicamente intolerantes (Tabela 12).

No polimorfismo A/G-22018, entre os indivíduos com o genótipo intolerante, a prevalência foi de 59% (36 casos) entre aqueles com fenótipo intolerante; a razão de prevalência foi de 2,95 (IC95 %: 0,50-17,37), o que significa que indivíduos com genótipo intolerante ocorreram 2,95 vezes a mais entre os indivíduos de fenótipo intolerante do que naqueles de fenótipo tolerante. Indivíduos genotipicamente tolerantes e fenotipicamente tolerantes apresentaram uma razão de prevalência de 2,6 vezes a mais do que no outro genótipo (Tabela 12).

Quando comparamos a razão de prevalência para os dois polimorfismos, temos: polimorfismos C/T-13910 com 3,06 de RP para o genótipo intolerante e 2,28 para os genótipos tolerantes; e polimorfismo A/G-22018 de 2,95 de RP para o homocigoto intolerante e 2,60 para as formas combinadas dos polimorfismos tolerantes. Somando as associações das RPs do polimorfismo C/T-13910 temos 5,34, e para o polimorfismo A/G-22018 foi 5,55 (RP); o que demonstra uma identidade estatisticamente relevante entre as RPs dos dois polimorfismos (C/T e A/G) e os fenótipos clínicos (Tabela 12).

Tabela 12– Associação entre o genótipo intolerante e fenótipo intolerante na população do estudo (n=119). Hospital Universitário Walter Cantídio. Fortaleza/CE, janeiro a agosto de 2010

Genótipo Intolerante	Prevalência n (%)	RP^a	IC 95%^a
Polimorfismo C/T-13910			
Homozigoto tolerante (TT)	1 (20,0)	1,00	--
Homozigoto intolerante (CC)	41 (61,2)	3,06	0,52 - 17,98
Heterozigotos (CT)	12 (25,5)	1,28	0,20 - 7,94
Polimorfismo A/G-22018			
Homozigoto tolerante (AA)	1 (20,0)	1,00	--
Homozigoto intolerante (GG)	36 (59,0)	2,95	0,50 - 17,37
Heterozigotos (AG)	17 (32,1)	1,60	0,26 - 9,74

Nota:^a Razão de prevalência estimada em função do Risco Relativo utilizando regressão de Poisson robusta.

Para o polimorfismo C/T-13910 tanto o homozigoto tolerante e heterozigoto, quando associados ao fenótipo tolerante, indicam a presença de tolerância à lactose. O homozigoto intolerante associado ao fenótipo intolerante sugere intolerância à lactose.

Os homozigotos tolerantes nos dois polimorfismos demonstraram excelente nível de tolerância estatística. Entre as três variações possíveis para o polimorfismo A/C-13910 e para o polimorfismo A/G-22018, decidimos agrupar como genotipicamente tolerantes os heterozigotos e homozigotos tolerantes; e como genotipicamente intolerantes os homozigotos intolerantes. E, assim, correlacionamos com a diferença (Δ máximo - basal) de 15, 20 e 25.

Na Tabela 13 visualizam-se os resultados da associação do polimorfismo C/T-13910 entre os indivíduos genotipicamente tolerantes (homozigoto tolerante e heterozigoto) e os três deltas químicos, onde observamos que o delta <15, 76,9% (40 casos) apresentou genótipo tolerante, e para o delta <20, 63,5% (33 casos) tiveram genótipo tolerante contra apenas 48,1% (25 casos)

na curva delta <25. Na associação entre os deltas químicos e genótipos intolerantes os resultados foram: delta <15, 74,6% (50 casos); delta <20, 88,1% (59 casos) e delta <25, 91% (61 casos). Por este dado, observou-se estreita concordância no comportamento da curva química notadamente no delta <15 e o genótipo tolerante; da mesma forma, quando se avaliou o genótipo intolerante, a associação entre o delta máximo – basal foi tanto maior quanto foi o valor do delta, o que parece indicar a forte influência que a não mutação exerceria no comportamento da curva (sensibilidade alta e baixa especificidade). Frente ao exposto, o teste químico <15 apresentou boa correlação apenas com a presença de tolerância à lactose.

Tabela 13 – Distribuição proporcional da diferença Δ máximo - basal (15,20,25) e o polimorfismo C/T-13910 na população de estudo (n=119). Hospital Universitário Walter Cantídio. Fortaleza/CE, agosto a dezembro de 2010

Diferença (Δ máximo - basal)	Polimorfismo C/T-13910		valor de p ^a
	Genótipo tolerante n (%)	Genótipo intolerante n (%)	
<15			
Tolerante	40 (76,9)	17 (25,4)	0,000
Quimicamente intolerante	12 (23,1)	50 (74,6)	
Total	52 (100)	67 (100)	
<20			
Tolerante	33 (63,5)	8 (11,9)	0,000
Quimicamente intolerante	19 (36,5)	59 (88,1)	
Total	52 (100)	67 (100)	
<25			
Tolerante	25 (48,1)	6 (9,0)	0,000
Quimicamente intolerante	27 (51,9)	61 (91,0)	
Total	52 (100)	67 (100)	

Nota:^a Teste Chi-quadrado Exato de Fisher.

Para cada teste foram obtidas medidas de ocorrência da prevalência e a associação para o genótipo intolerante. A diferença (Δ máximo - basal) no subgrupo tolerante foi a nossa categoria referente em todos os testes, por isso aparece o valor 1 ao lado e, para cada indivíduo identificado como quimicamente intolerante, o risco de encontrar um genótipo intolerante neste grupo foi de 2,7 vezes (IC95%: 1,78 - 4,10), quando comparados com aqueles definidos como genótipos intolerantes. Já na Δ (máximo - basal) <20, a prevalência de genótipo intolerante foi 75,6% (59 indivíduos), assim, o risco foi 3,88 vezes maior nesse grupo (IC95%: 2,05-7,31) e na Δ (máximo - basal) <25, a prevalência foi de 69,3% (61 indivíduos), com risco 3,58 vezes maior (IC95%: 1,72-7,44) (Tabela 14).

Com base neste resultado, a mais forte correlação observada foi de delta <25 quanto ao genótipo intolerante, porém, quando observamos o IC 95%, a dispersão neste grupo foi também a maior, 1,72-7,44, e isso deveu-se à elevada sensibilidade e ao alto índice de valor preditivo negativo. Porém, na avaliação do índice de confiança dos outros grupos encontramos: no delta <15 o IC95%: 1,78-4,10; já, no delta <20, o IC foi 2,05-7,31; o que evidenciou coesão significativa no delta <15 (Tabela 14).

Tabela 14– Associação entre a diferença Δ máximo - basal (15, 20, 25) e o polimorfismo C/T-13910 na população de estudo (n=119). Hospital Universitário Walter Cantídio. Fortaleza/CE, agosto a dezembro de 2010

Diferença Δ (máximo - basal)	Prevalência Genótipo intolerante n (%)	RP ^a	IC 95% ^a
<15			
Tolerante	17 (29,8)	1,00	--
Quimicamente intolerante	50 (80,6)	2,70	1,78 -4,10
<20			
Tolerante	8 (19,5)	1,00	--
Quimicamente intolerante	59 (75,6)	3,88	2,05 - 7,31
<25			
Tolerante	6 (19,4)	1,00	--
Quimicamente intolerante	61 (69,3)	3,58	1,72 - 7,44

Nota:^aRazão de prevalência estimada em função do Risco Relativo pelo Teste de Homogeneidade de Mantel-Haenszel.

Com base nos resultados abaixo foi possível definir entre os Delta max-basal encontrados (15, 20, 25) aquele que apresentou maior sensibilidade e especificidade no diagnóstico de intolerância – qual o valor do delta que tem maior força diagnóstica especificidade e sensibilidade – em relação ao padrão atualmente usado, que é ≥ 25 . A Tabela 15 apresenta os dados referentes à sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) das diferenças basais 15, 20 e 25.

Tabela 15– Sensibilidade, especificidade e valor preditivo positivo e negativo das diferenças Δ máximo - basal 15, 20 e 25 na população de estudo (n=119). Hospital Universitário Walter Cantídio. Fortaleza/CE, agosto a dezembro de 2010

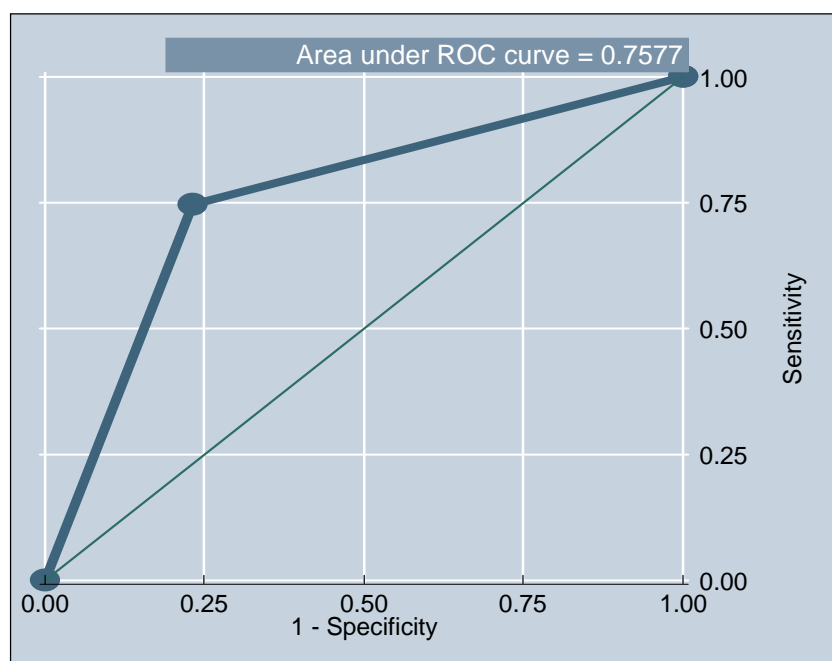
Δ (máximo – basal)	Sensibilidade	Especificidade	VPP	VPN
<15	74,6	76,9	80,6	70,1
<20	88,1	63,4	75,6	80,5
<25	91,0	48,1	69,3	80,6

Notas:VPP : Valor preditivo positivo; VPN: Valor preditivo negativo.

A medida que apresentou a melhor medida combinada de sensibilidade e especificidade foi a Δ (máximo – basal) 15, determinada pela área sob a curva ROC (76,9%). Neste ponto de corte, pode-se classificar o indivíduo como intolerante à lactose com a Δ (máximo – basal) <15 com 74,6% de sensibilidade, enquanto que o poder para classificar o indivíduo que se apresente como tolerante à lactose para o Δ máximo – basal ≥ 15 teve uma especificidade de 76,9%. Na Δ (máximo – basal) <20, a sensibilidade foi 88,1% e a especificidade foi de 63,4%, e na Δ (máximo – basal) <25 obteve-se 91% de sensibilidade e de especificidade apenas 48,1% (Tabela 15).

Nas curvas ROC para Δ (máximo - basal) <15, <20 e <25 e no diagnóstico de intolerante à lactose as que apresentaram maior precisão foram as de diferenças Δ (máximo - basal) <15 e <20 com áreas sob a curva maior que 75,7%, sendo estabelecidos os pontos de corte que conferiram elevada sensibilidade ($\geq 95\%$) e melhor VPP sem grande prejuízo da sensibilidade e especificidade (Gráfico 4).

Gráfico 4 – Área sob a curva ROC da diferença Δ (máximo – basal) <15 e nos genótipos tolerantes no polimorfismo C/T-13910



Entre as variáveis Δ (máximo – basal) <15, 20 e 25 *versus* polimorfismo C/T-13910 apresentaram pontos de corte com poder de predição da intolerância à lactose, apresentando valores de sensibilidade e especificidade maior do que 60% (Gráficos 5 e 6).

Gráfico 5—Área sob a curva ROC da diferença Δ (máximo – basal) <20 e nos genótipos tolerantes no polimorfismo C/T 13910

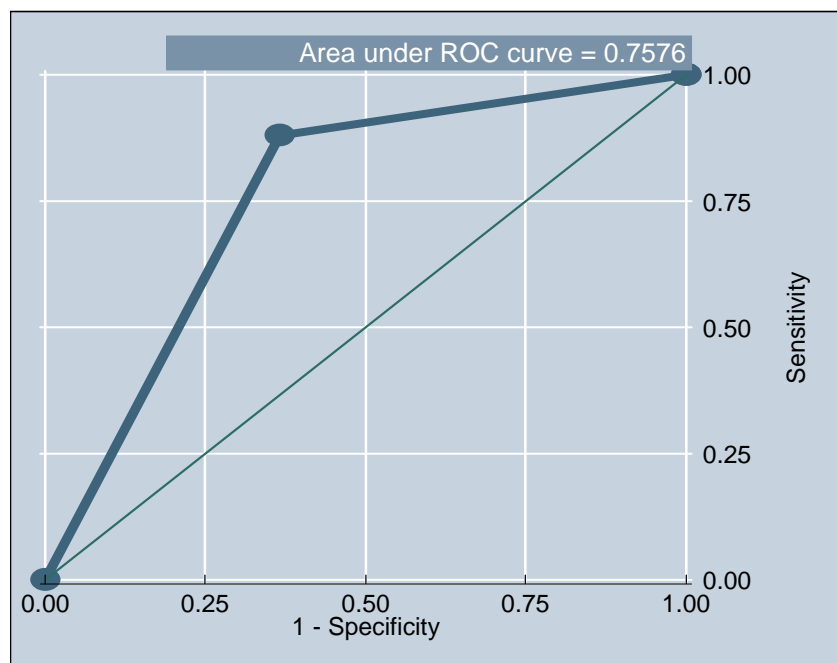
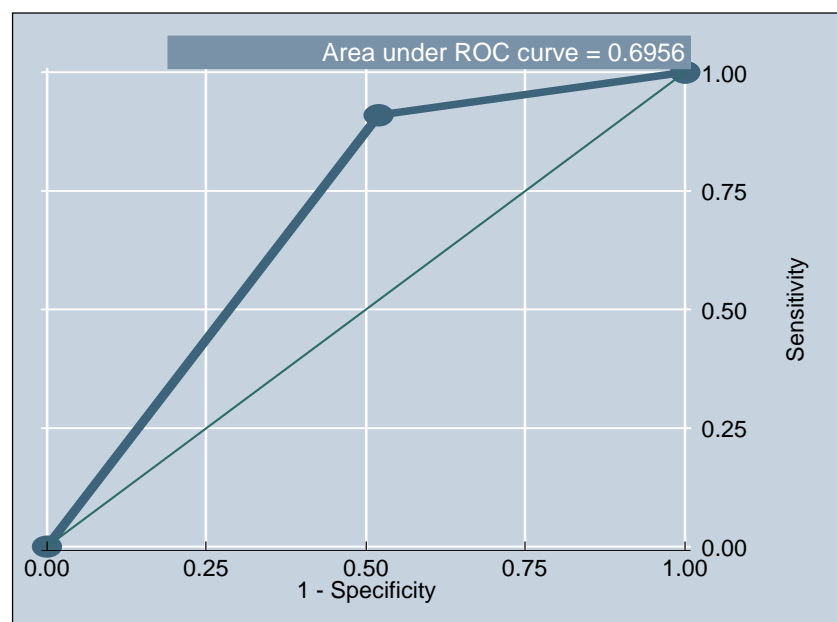


Gráfico 6— Área sob a curva ROC da diferença Δ (máximo – basal) <25 e nos genótipos tolerantes no polimorfismo C/T-13910



As curvas ROC nas áreas sob a curva dos deltas <15 e <20 e o polimorfismo tolerante demonstram áreas muito próximas; isso deveu-se

provavelmente à equidistância desses intervalos e o ponto ideal da diferença Δ (máximo – basal), em curva linear que foi estudada (não apresentada no presente trabalho). Nessa curva encontrou-se o ponto 18 como o que apresentou melhor correlação entre os parâmetros especificidade e sensibilidade, VPN e VPP.

Tabela 16 – Distribuição proporcional da diferença Δ máximo – basal (15, 20, 25) e o polimorfismo A/G-22018 na população de estudo (n=119). Hospital Universitário Walter Cantídio. Fortaleza/CE, agosto a dezembro de 2010

Diferença Δ (máximo – basal)	Polimorfismo A/G-22018		valor de p ^a
	Genótipo tolerante n (%)	Genótipo intolerante n (%)	
<15			
Tolerante	41 (70,7)	16 (26,2)	0,000
Quimicamente intolerante	17 (29,3)	45 (73,8)	
Total	58 (100)	61 (100)	
<20			
Tolerante	33 (56,9)	8 (13,1)	0,000
Quimicamente intolerante	25 (43,1)	53 (86,9)	
Total	58 (100)	61 (100)	
<25			
Tolerante	25 (43,1)	6 (9,8)	0,000
Quimicamente intolerante	33 (56,9)	55 (90,2)	
Total	58 (100)	61 (100)	

Nota:^a Teste Chi-quadrado Exato de Fisher.

Relacionando os resultados da diferença Δ (máximo - basal) de 15, 20 e 25 quanto à presença do polimorfismo A/G-22018, obtiveram-se os resultados demonstrados na Tabela 16. Foi encontrado um nível de significância entre os testes. Na Δ (máximo – basal) <15, 73,8% (45) dos indivíduos se apresentaram quimicamente intolerantes e genótipo intolerantes, e a coincidência genótipo e teste químico tolerante ocorreu em 70,7% (41) dos

pacientes. A não coincidência entre teste químico intolerante e genótipo tolerante ocorreu em 29,3% (17) dos indivíduos. Enquanto que os indivíduos quimicamente tolerantes e genótipos intolerantes foram 26,2% (16) dos indivíduos. Já na Δ (máximo – basal) <20 , 86,9% (53) dos indivíduos eram quimicamente intolerantes e genótipo intolerante, e a coincidência entre teste químico tolerante e genótipo tolerante ocorreu em 56,9% (33) dos indivíduos. Para o Δ (máximo - basal) <25 teve-se 90,2% (55) dos indivíduos quimicamente intolerantes e genótipo intolerante e 43,1%(25) dos indivíduos tiveram teste químico e genótipos tolerantes. Observou-se ainda que para o delta <15 existiu uma convergência entre testes químicos e genótipos, demonstrando ser o mais fidedigno. (Tabela 16)

Tabela 17– Associação entre a diferença Δ máximo – basal (15, 20, 25) e o polimorfismo A/G-22018 na população de estudo (n=119). Hospital Universitário Walter Cantídio. Fortaleza/CE, agosto a dezembro de 2010

Diferença Δ (máximo – basal)	Prevalência Homozigoto n (%)	RP ^a	IC 95% ^a
<15			
Tolerante	16 (28,1)	1,00	--
Quimicamente intolerante	45 (72,6)	2,58	1,66 - 4,03
<20			
Tolerante	8 (19,5)	1,00	--
Quimicamente intolerante	53 (68,0)	3,48	1,84 - 6,60
<25			
Tolerante	6 (19,6)	1,00	--
Quimicamente intolerante	55 (62,5)	3,23	1,54 - 6,74

Nota: ^aRazão de prevalência estimada em função do Risco Relativo pelo Teste de Homogeneidade de Mantel-Haenszel.

A prevalência do polimorfismo A/G-22018 e a Δ (máximo – basal) <15 estão demonstrados na Tabela 17, indicando a prevalência de 72,6%, assim, a razão de Prevalência (RP) de o indivíduo ser quimicamente intolerante e genotipicamente intolerante foi de 2,58 (IC95%: 1,66-4,03) entre os indivíduos

deste polimorfismo. Já a associação de quimicamente intolerantes e genotipicamente intolerantes neste polimorfismo para Δ (máximo – basal) <20 foi de 3,48 (68%) (IC95%: 1,84-6,60) e finalmente para Δ (máximo – basal) <25 foi de 3,23 a RP(62,5%)(IC 95%: 1,54 a 6,74).

Tabela 18– Sensibilidade, especificidade e valor preditivo positivo e negativo da diferença Δ máximo – basal (15, 20, 25) na população de estudo (n=119). Hospital Universitário Walter Cantídio. Fortaleza/CE, agosto a dezembro de 2010

Δ (máximo – basal)	Sensibilidade	Especificidade	VPP	VPN
<15	73,8	70,7	72,6	71,9
<20	86,9	56,9	67,9	80,5
<25	90,2	43,1	62,5	80,6

Notas: VPP : Valor preditivo positivo; VPN: Valor preditivo negativo.

Para Δ (máximo – basal) <15 pode-se classificar o indivíduo como intolerante à lactose com 73,8% de sensibilidade e com 70,7% de especificidade. Na Δ (máximo – basal) <20, a sensibilidade foi de 86,9% e a especificidade de 56,9%, e na Δ (máximo – basal) <25 os resultados foram de 90,2% de sensibilidade e 43,1% de especificidade (Tabela 18).

A medida que apresentou a melhor combinação de sensibilidade e especificidade foi a Δ (máximo – basal) <15, com maior VPP e menor VPN. A significância desta associação pode ser observada nas áreas sob as curvas ROC. (Gráficos 7,8 e 9).

Gráfico 7 – Área sob a curva ROC da diferença Δ (máximo – basal) <15 e nos genótipos tolerantes no polimorfismo A/G-22018

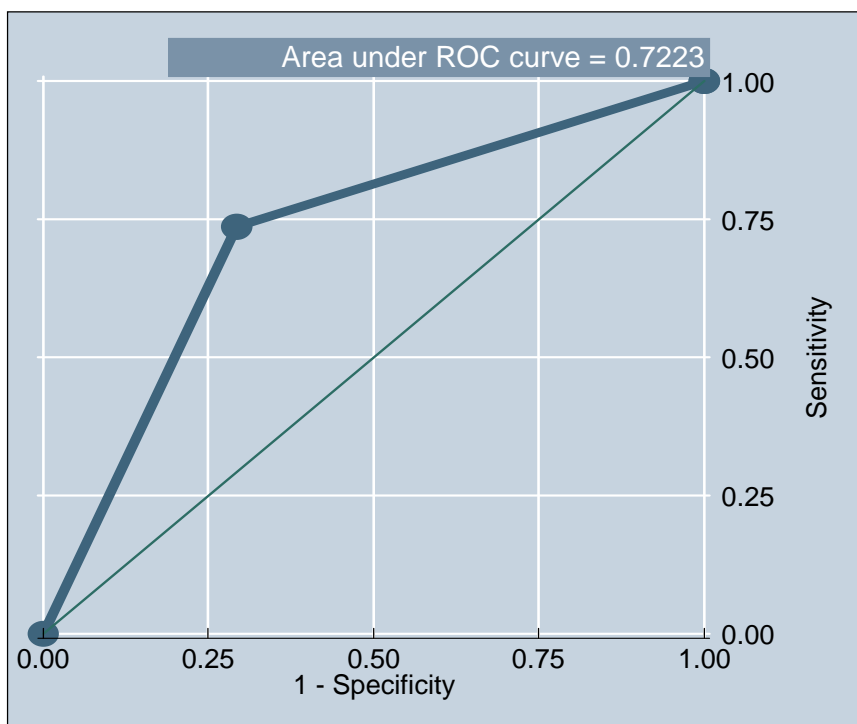
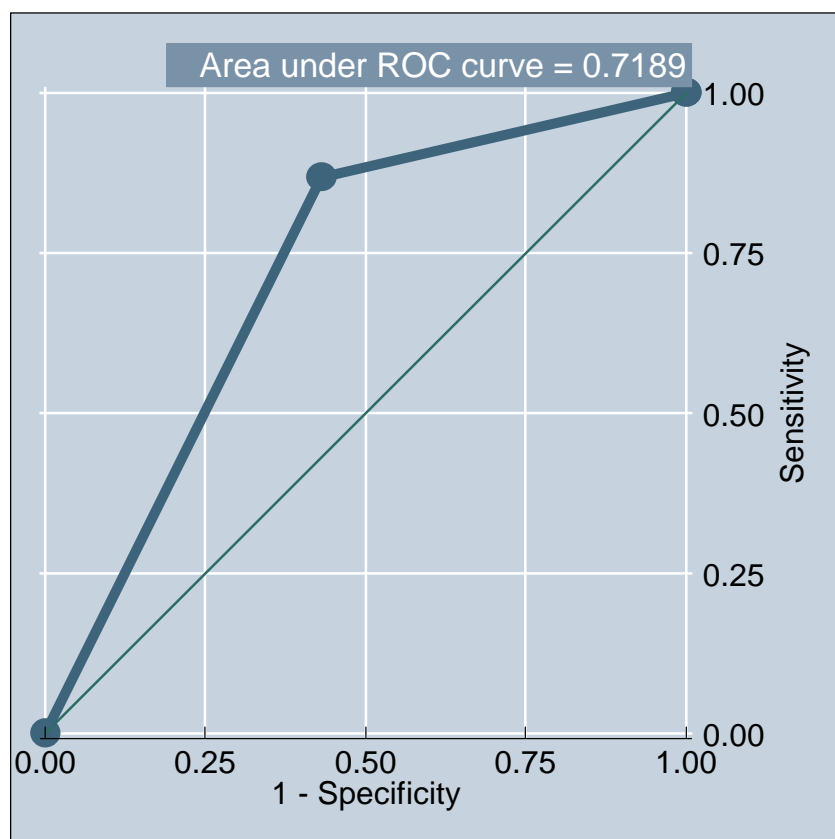
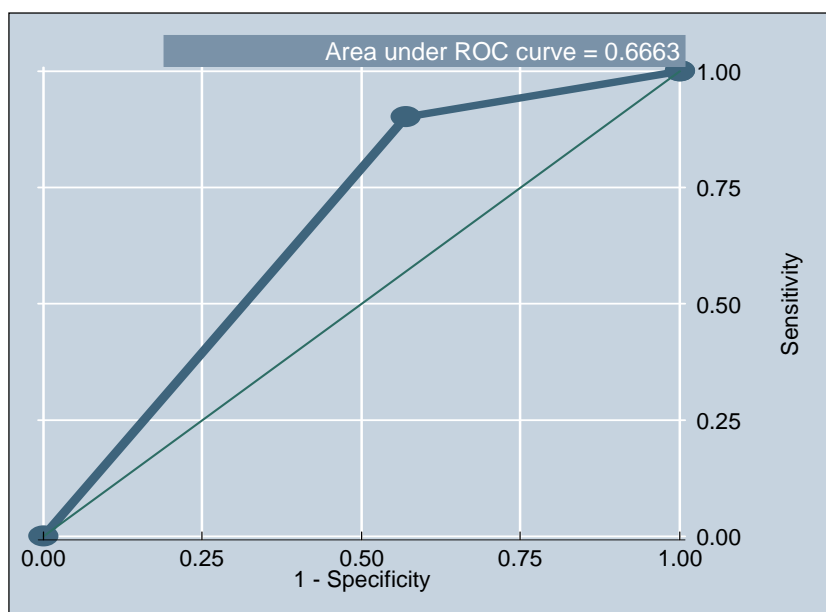


Gráfico 8 – Área sob a curva ROC da diferença Δ (máximo – basal) <20 e nos genótipos tolerantes no polimorfismo A/G-22018



Nas Figuras 7,8 e 9, se podem observar a diferença Δ (máximo – basal) <15, 20 e 25 e o polimorfismo A/G-22018 como fatores preditores para o diagnóstico de intolerância à lactose, sabe-se, que na curva de ROC (Receiver Operating Characteristic) os valores acima de 60% de excreção da lactose demonstra maior chance de positividade. Assim, obteve-se uma área da curva de 0,7223; 0,7189 e 0,6663 respectivamente. Portanto, o melhor preditor para o diagnóstico de intolerância a lactose foi demonstrado com a Δ (máximo – basal) <15.

Gráfico 9 – Área sob a curva ROC da diferença Δ (máximo – basal) <25 e nos genótipos tolerantes no polimorfismo A/G-22018



A prevalência de diarreia no grupo identificado com o fenótipo intolerante (expostos) foi de 46,3% e entre o fenótipo tolerante foi de 24,6%. Na população do estudo, a prevalência de diarreia foi de 61%. Foram identificadas diferenças proporcionais estatisticamente significantes entre a presença de diarreia e o fenótipo intolerante ($p=0,013$), ou seja, os grupos com e sem diarreia diferem com relação ao fenótipo. Nos demais testes, não se verificaram diferenças proporcionais estatisticamente significantes (Tabela 19).

Foi identificada associação positiva e estatisticamente significante entre os indivíduos com relato de diarreia (desfecho) e o fenótipo intolerante (fator de exposição ou de risco). A chance de indivíduos com fenótipo intolerante terem diarreia foi 1,8 vezes superior (IC95%: 1,12 - 3,14), quando comparados aos indivíduos sem o fenótipo intolerante. A presença de diarreia na amostra é um possível fator de risco para o fenótipo intolerante. Os demais fatores de risco (ou de exposição) não mostraram associação estatisticamente significante (Tabela 19).

Tabela 19– Associação bruta entre fenótipo e genótipo intolerante e o teste químico dos indivíduos e a presença de diarreia (n = 119). Hospital Universitário Walter Cantídio. Fortaleza/CE, janeiro a agosto de 2010

Fenótipo e Genótipo	Prevalência n (%)	RP^a	IC 95%^a	p
Fenótipo Intolerante				0,013 ^b
Não	16 (24,6)	1,00	--	
Sim	25 (46,3)	1,88	1,12 - 3,14	
Polimorfismo C/T-13910				0,769 ^c
Homozigoto tolerante	1 (20,0)	1,00	--	
Homozigoto intolerante	23 (34,3)	1,72	0,28- 10,30	
Heterozigotos	17 (36,2)	1,81	0,30- 10,96	
Polimorfismo A/G-22018				0,500 ^c
Homozigoto tolerante	1 (20,0)	1,00	--	
Homozigoto intolerante	19 (31,2)	1,56	0,26- 9,42	
Heterozigotos	21 (39,6)	1,98	0,33- 11,89	
Diferença (Δmáximo – basal)				0,599 ^b
<15				
Tolerante	21 (36,8)	1,00	--	
Quimicamente intolerante	20 (32,3)	0,88	0,53 - 1,44	
<20				0,204 ^b
Tolerante	11 (26,8)	1,00	--	
Quimicamente intolerante	30 (38,5)	1,43	0,80 - 2,56	

<25				0,239 ^b
Tolerante	8 (25,8)	1,00	--	
Quimicamente intolerante	33 (37,5)	1,45	0,75 - 2,80	

Nota:^a Razão de prevalência estimada em função do Risco Relativo pelo Teste de Homogeneidade de Mantel-Haenszel ou Regressão de Poisson Robusta nas variáveis com três categorias; ^b valor de p obtido pelo Teste Chi-quadrado de Pearson; ^c valor de p obtido pelo Teste Exato de Fischer.

5.6 Associação bruta de cada um dos sintomas relatados pelos indivíduos e os testes aplicados (fenótipo e genótipo intolerante e o químico)

A prevalência de empachamento no grupo identificado com o fenótipo intolerante (expostos) foi de 68,5% e entre o fenótipo tolerante foi de 47,7%. Na população do estudo, a prevalência de empachamento foi de 54,4% (Tabela 20). Foram identificadas diferenças proporcionais estatisticamente significantes entre a presença de empachamento e fenótipo intolerante ($p=0,022$), ou seja, os grupos com e sem empachamento diferem no que diz respeito ao fenótipo. Em relação aos demais testes, não se verificaram diferenças proporcionais estatisticamente significantes (Tabela 20).

Foi identificada associação positiva e estatisticamente significativa entre os indivíduos com relato de empachamento (desfecho) e o fenótipo intolerante (fator de exposição ou de risco). A chance de indivíduos com fenótipo intolerante terem empachamento foi de 1,44 vezes mais (IC95%:1,05 - 1,96), quando comparados aos indivíduos sem o fenótipo intolerante. O empachamento é um possível fator de risco para o fenótipo intolerante na amostra de estudo. Os demais fatores de risco (ou de exposição) não tiveram associação com empachamento estatisticamente significativa (Tabela 20).

Tabela 20 – Associação bruta entre fenótipo e genótipo intolerante, o teste químico dos indivíduos e a presença de empachamento (n = 119). Hospital Universitário Walter Cantídio. Fortaleza/CE, janeiro a agosto de 2010.

Fenótipo e Genótipo Intolerante e o Teste Químico	Prevalência n (%)	RP^a	IC 95%^a	p
Fenótipo Intolerante				0,022 ^b
Não	31 (47,7)	1,00	--	
Sim	37 (68,5)	1,44	1,05 - 1,96	
Polimorfismo C/T-13910				0,348 ^c
Homozigoto tolerante	3 (60,0)	1,00	--	
Homozigoto intolerante	42 (62,7)	1,04	0,50- 2,19	
Heterozigotos	23 (48,9)	0,52	0,38- 1,77	
Polimorfismo A/G- 22018				0,897 ^c
Homozigoto tolerante	3 (60,0)	1,00	--	
Homozigoto intolerante	36 (59,0)	0,98	0,46- 2,08	
Heterozigotos	29 (54,7)	0,91	0,42- 1,95	
Diferença Δ (máximo – basal)				0,340 ^b
<15				
Tolerante	30 (52,6)	1,00	--	
Quimicamente intolerante	38 (61,3)	1,16	0,85 - 1,60	
<20				0,344 ^b
Tolerante	21 (51,2)	1,00	--	
Quimicamente intolerante	47 (60,3)	1,18	0,83 - 1,67	
<25				
Tolerante	17 (54,8)	1,00	--	0,763 ^b
Quimicamente intolerante	51 (58,0)	1,06	0,73 - 1,52	

Nota:^a Razão de prevalência estimada em função do Risco Relativo pelo Teste de Homogeneidade de Mantel-Haenszel ou Regressão de Poisson Robusta nas variáveis com três categorias; ^b valor de p obtido pelo Teste Chi-quadrado de Pearson; ^c valor de p obtido pelo Teste Exato de Fischer.

A prevalência de flatulência no grupo identificado com o fenótipo intolerante (expostos) foi de 81,5% e entre o fenótipo tolerante foi de 46,2% (Tabela 21). Na amostra do estudo, a prevalência foi de 59,5% (Tabela 5). Foram identificadas diferenças proporcionais estatisticamente significantes entre a presença de flatulência e o fenótipo intolerante ($p=0,000$), ou seja, os grupos com e sem flatulência diferem com relação ao fenótipo. O teste químico Δ (máximo – basal) <20 mostrou-se proporcionalmente associado à presença de flatulência ($p=0,010$). Com relação aos demais testes, não se verificaram diferenças proporcionais estatisticamente significantes (Tabela 21).

Foi identificada associação positiva e estatisticamente significativa entre os indivíduos com relato de flatulência (desfecho) e o fenótipo intolerante (fator de exposição ou de risco). A chance de indivíduos com fenótipo intolerante terem flatulência foi 1,76 vezes superior (IC95%: 1,32 - 2,36), quando comparados aos indivíduos sem o fenótipo intolerante. O fenótipo intolerante é um possível fator de risco para a presença de flatulência na população do estudo (Tabela 21).

A associação entre o teste químico Δ (máximo – basal) <20 e a presença de flatulência foi positiva e estatisticamente significativa. A chance de indivíduos com fenótipo intolerante terem flatulência foi 1,52 vezes superior (IC95%: 1,06 - 2,18), quando comparados aos indivíduos sem o fenótipo intolerante (Tabela 21).

Tabela 21 – Associação bruta entre fenótipo e genótipo intolerante e o teste químico dos indivíduos e a presença de flatulência (n = 119). Hospital Universitário Walter Cantídio. Fortaleza/CE, janeiro a agosto de 2010.

Fenótipo e Genótipo Intolerante e o Teste Químico	Prevalência n (%)	RP^a	IC 95%^a	P
Fenótipo Intolerante				0,000 ^a
Não	30 (46,2)	1,00	--	
Sim	44 (81,5)	1,76	1,32 - 2,36	
Polimorfismo C/T-13910				0,202 ^b
Homozigoto tolerante	2 (40,0)	1,00	--	
Homozigoto intolerante	46 (68,7)	1,72	0,58 - 5,11	
Heterozigotos	26 (55,3)	1,38	0,46 - 4,19	
Polimorfismo A/G-22018				0,460 ^b
Homozigoto tolerante	2 (40,0)	1,00	--	
Homozigoto intolerante	40 (65,6)	1,64	0,55 - 4,89	
Heterozigotos	32 (60,4)	1,51	0,50 - 4,53	
Diferença Δ (máximo – basal)				0,039 ^a
<15				
Tolerante	30 (52,6)	1,00	--	
Quimicamente intolerante	44 (71,0)	1,35	1,00 - 1,81	
<20				0,010 ^a
Tolerante	19 (46,3)	1,00	--	
Quimicamente intolerante	55 (70,5)	1,52	1,06 - 2,18	
<25				0,065
Tolerante	15 (48,4)	1,00	--	
Quimicamente intolerante	59 (67,1)	1,38	0,94 - 2,05	

Nota:^a Razão de prevalência estimada em função do Risco Relativo pelo Teste de Homogeneidade de Mantel-Haenszel ou Regressão de Poisson Robusta nas variáveis com três categorias; ^b valor de p obtido pelo Teste Chi-quadrado de Pearson; ^c valor de p obtido pelo Teste Exato de Fischer.

A prevalência de borborismos no grupo identificado com o fenótipo intolerante (expostos) foi de 59,3% e entre o fenótipo intolerante foi de 35,4% (Tabela 22). Na população do estudo, a prevalência foi de 58,2% (Tabela 5). Foram identificadas diferenças proporcionais estatisticamente significantes entre a presença de borborismos e o fenótipo intolerante ($p=0,000$), ou seja, os grupos com e sem borborismos diferem com relação ao fenótipo. Os testes químicos com Δ (máximo – basal) <15 ($p=0,020$), <20 ($p=0,007$), <25 ($p=0,026$) mostraram-se proporcionalmente associados à presença de borborismos. Com relação aos genótipos intolerantes (alelo 13910 e 22018), não se verificaram diferenças proporcionais estatisticamente significantes (Tabela 22).

Foi identificada associação positiva e estatisticamente significativa entre os indivíduos com relato de borborismos (desfecho) e o fenótipo intolerante (fator de exposição ou de risco). A chance de indivíduos com fenótipo intolerante terem borborismos foi 1,67 vezes superior (IC95%: 1,13 - 2,49), quando comparados aos indivíduos sem o fenótipo intolerante. O borborismo é um possível fator de risco para a presença de fenótipo intolerante na amostra de estudo (Tabela 22).

A associação entre o teste químico Δ (máximo – basal) <15 e a presença de borborismos foi positiva e estatisticamente significativa. A chance de indivíduos com Δ (máximo – basal) <15 terem borborismos foi 1,61 vezes superior (IC95%: 1,06 - 2,44), quando comparados aos indivíduos sem o fenótipo intolerante (Tabela 22).

A associação entre o teste químico Δ (máximo – basal) <20 e a presença de borborismos foi positiva e estatisticamente significativa. A chance de indivíduos com Δ (máximo – basal) <20 terem borborismos foi 1,88 vezes superior (IC95%: 1,12 - 3,16), quando comparados aos indivíduos sem o fenótipo intolerante (Tabela 22).

A associação entre o teste químico Δ (máximo – basal) <25 e a presença de borborismos foi positiva e estatisticamente significativa. A chance de indivíduos com Δ (máximo – basal) <25 terem borborismos foi 1,80 vezes superior (IC95%: 1,00 - 3,23), quando comparados aos indivíduos sem o fenótipo intolerante (Tabela 22).

Tabela 22 – Associação bruta entre fenótipo e genótipo intolerante e o teste químico dos indivíduos e a presença de borborigmos (n = 119). Hospital Universitário Walter Cantídio. Fortaleza/CE, janeiro a agosto de 2010.

Fenótipo e Genótipo Intolerante e o Teste Químico	Prevalência n (%)	RP^a	IC 95%^a	p
Fenótipo Intolerante				0,009 ^b
Não	23 (35,4)	1,00	--	
Sim	32 (59,3)	1,67	1,13 - 2,49	
Polimorfismo C/T-13910				0,401 ^c
Homozigoto tolerante	1 (20,0)	1,00	--	
Homozigoto intolerante	34 (50,8)	2,54	0,43 - 14,99	
Heterozigotos	20 (42,6)	2,13	0,35 - 12,77	
Polimorfismo A/G-22018				0,387 ^c
Homozigoto tolerante	1 (20,0)	1,00	--	
Homozigoto intolerante	31 (50,8)	2,54	0,43 - 15,03	
Heterozigotos	23 (43,4)	2,17	0,36 - 12,96	
Diferença Δ (máximo – basal)				
<15				0,020 ^b
Tolerante	20 (35,1)	1,00	--	
Quimicamente intolerante	35 (56,4)	1,61	1,06 - 2,44	
<20				0,007 ^b
Tolerante	12 (29,3)	1,00	--	
Quimicamente intolerante	43 (55,1)	1,88	1,12 - 3,16	
<25				0,026 ^b
Tolerante	9 (29,0)	1,00	--	
Quimicamente intolerante	46 (52,3)	1,80	1,00 - 3,23	

Nota:^a Razão de prevalência estimada em função do Risco Relativo pelo Teste de Homogeneidade de Mantel-Haenszel ou Regressão de Poisson Robusta nas variáveis com três categorias; ^b valor de p obtido pelo Teste Chi-quadrado de Pearson; ^c valor de p obtido pelo Teste Exato de Fischer.

A prevalência de constipação no grupo identificado com o fenótipo intolerante (expostos) foi de 40,7% e entre o fenótipo tolerante foi de 29,2% (Tabela 23). Foram identificadas diferenças proporcionais estatisticamente significantes entre a presença de constipação e a Δ (máximo – basal) <25 ($p=0,013$), ou seja, os grupos com e sem constipação diferem com relação à Δ (máximo – basal) ≤ 25 . No que concerne aos demais testes, não se verificaram diferenças proporcionais estatisticamente significantes (Tabela 23).

Foi identificada associação positiva e estatisticamente significativa entre os indivíduos com relato de constipação (desfecho) e a Δ (máximo – basal) <25 (fator de exposição ou de risco). A chance de indivíduos com Δ (máximo – basal) <25 terem constipação foi de 2,54 vezes mais (IC95%:1,09 - 5,88), quando comparados aos indivíduos sem Δ (máximo – basal) ≥ 25 . A Δ (máximo – basal) <25 é um possível fator de risco para a presença de constipação na população de estudo. Os demais fatores de risco (ou de exposição) não se mostraram estatisticamente associados à presença de constipação (Tabela 23).

Ao avaliarmos os diferentes sintomas, como: diarreia, borborismo, perda de peso, constipação, empachamento, flatulência com os fenótipos clínicos, genótipos, e o teste químico, só observamos correlação com o fenótipo intolerante. Em todos os outros exames observados sua prevalência não foi significativamente. Na investigação da diarreia com a gravidade de intolerância não foi observada correlação entre os indivíduos com este sintoma e o teste químico ou com o genótipo intolerante, portanto diarreia não se mostrou como marcador diagnóstico no presente estudo.

Tabela 23 - Associação entre fenótipo e genótipo intolerante e o teste químico dos indivíduos e a presença de constipação (n = 119). Hospital Universitário Walter Cantídio. Fortaleza/CE, janeiro a agosto de 2010.

Fenótipo e Genótipo Intolerante e o Teste Químico	Prevalência n (%)	RP ^a	IC 95% ^a	p
Fenótipo Intolerante				0,188 ^b
Não	19 (29,2)	1,00	--	
Sim	22 (40,7)	1,39	0,85 - 2,29	
Polimorfismo C/T-13910				0,241 ^c
Homozigoto tolerante	3 (60,0)	1,00	--	
Homozigoto intolerante	25 (37,3)	0,62	0,28 - 1,36	
Heterozigotos	13 (27,7)	0,46	0,20 - 1,08	
Polimorfismo A/G-22018				
Homozigoto tolerante	3 (60,0)	1,00	--	0,156 ^c
Homozigoto intolerante	24 (39,3)	0,66	0,30 - 1,44	
Heterozigotos	14 (26,4)	0,44	0,19 - 1,03	
Diferença Δ (máximo – basal)				
<15				0,308 ^b
Tolerante	17 (29,8)	1,00	--	
Quimicamente intolerante	24 (38,7)	1,30	0,78 - 2,15	
<20				0,094 ^b
Tolerante	10 (24,4)	1,00	--	
Quimicamente intolerante	31 (39,7)	1,63	0,89- 2,98	
< 25				0,013 ^b
Tolerante	5 (16,1)	1,00	--	
Quimicamente intolerante	36 (40,9)	2,54	1,09 - 5,88	

Nota:^aRazão de prevalência estimada em função do Risco Relativo pelo Teste de Homogeneidade de Mantel-Haenszel ou Regressão de Poisson Robusta nas variáveis com três categorias; ^bvalor de p obtido pelo Teste Chi-quadrado de Pearson; ^cvalor de p obtido pelo Teste Exato de Fischer.

Em síntese, os indivíduos de nossa amostra (119) eram autoreferidos intolerantes, sendo assim submetidos a um questionário clínico sintomatológico, ao teste químico de tolerância à lactose e a genotipagem. Na primeira etapa visou-se estabelecer uma correlação entre o considerar-se intolerante e a sintomatologia que apresentavam ao ingerir leite ou derivados, utilizando-se uma dose fixa de lactose, que foi a do teste químico. Os sintomas avaliados foram o que é descrito na literatura como manifestação de má absorção a leite e sugestivo de intolerância á lactose, tais como: flatulência, empachamento, borborigmos, diarreia, constipação e perda de peso, propositalmente excluímos o sintoma mal estar abdominal ou cólicas pela redundância e por dar maior margem a subjetividade.

Para a determinação do fenótipo clínico, foi dado 50gr de lactose em 250 ml de suco artificial de limão, ingeridos em até 5 minutos e aplicados o questionário no tempo observacional de 2 horas, sobre a ocorrência de pelo menos dois dos quatro sintomas e sinal. Os indivíduos que não referiram os sintomas e o sinal ficaram com uma cópia do questionário para relatar se apresentaram alguns dos achados posteriormente a este período até o horário do almoço. Caso continuassem assintomáticos seria desnecessária a investigação alimentar posterior.

Dos 119 indivíduos avaliados 54 preencheram os critérios para fenótipo clínico intolerante (concordância do autoreferido com sintomatologia clínica). Nesta avaliação ao serem submetidos a ingestão de lactose, dos 119 indivíduos autoreferidos como intolerantes, 65 deles não apresentaram ou referiram pelo menos dois dos sintomas elencados, sendo considerados como fenótipo clínico tolerantes (Figura 4).

Aplicou-se igualmente o teste químico, considerando-se como ponto de corte a caracterizar má absorção de lactose, portanto a presunção de intolerância naquele momento era o valor de delta menor ou igual a 15. Dos 119 indivíduos autoreferidos como intolerantes, 54 mostraram-se quimicamente intolerantes e 65 quimicamente tolerantes (Figura 4).

Na última fase da primeira etapa da análise dos resultados, procedeu-se a Genotipagem dos 119 indivíduos autoreferidos como intolerantes, resultou

que 67 deles apresentaram genótipo também intolerante e 52 foram genotipicamente tolerantes (Figura 4).

Ao analisarmos os números da primeira etapa desta amostra observamos que, existe uma autopercepção de intolerância bem maior que a observada objetivamente e uma boa correlação entre os parâmetros avaliados, fenótipo clínico, teste químico e genótipo.

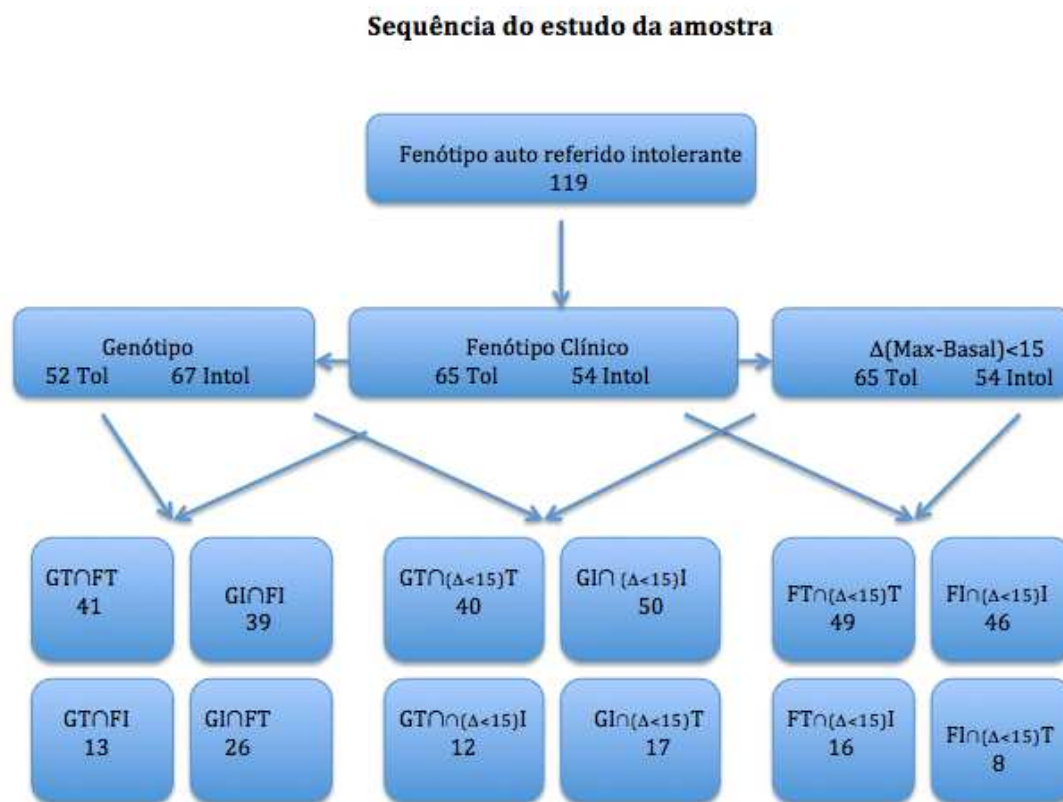
Na segunda etapa da análise cruzamos os resultados da primeira fase, utilizando-se uma combinação dos três testes tomados 2 a 2. Assim, no cruzamento de fenótipo clínico e genótipo, encontramos para genótipo tolerante(52) e fenótipo tolerante(65) 41 indivíduos tolerantes. E, no cruzamento de fenótipo intolerante (54) e genótipo intolerante (67)teve-se 39 indivíduos intolerantes. Encontramos nesta primeira combinação a ocorrência de 13 indivíduos que apresentaram genótipo tolerante e fenótipo intolerante, assim como 26 que tinham genótipo intolerante e fenótipo tolerante (Figura 4).

Em continuidade ao cruzarmos fenótipo clínico e teste químico com Δ (máximo – basal) <15 , a coincidência fenótipo tolerante(65) e teste químico tolerante(65), encontramos coincidência em 49 indivíduos como tolerantes. A coincidência fenótipo intolerante com teste químico intolerante (54 e 54 respectivamente) 46 destes indivíduos eram intolerantes.

Finalmente ao cruzarmos os resultados de genótipo e teste químico encontramos coincidência genótipo tolerante(52) e teste químico tolerante(65), 40 indivíduos como tolerantes e coincidiram genótipo intolerante(67) e teste químico intolerante (54) 50 indivíduos foram intolerantes.

Ao avaliarmos este resultado observamos uma correlação mais estreita entre as combinações de fenótipo e teste químico, o que já era de esperar pela metodologia aplicada, uma vez que o fenótipo e o teste químico ficaram intimamente relacionados.

Figura 4 - Síntese do resultado do estudo



6 DISCUSSÃO

Frye (2002) afirma que, em função do caráter autossômico e recessivo genético, ou seja, por não ser um dos cromossomos sexuais o que determina a intolerância à lactose, os resultados não devem mostrar diferença significativa entre pessoas do sexo masculino e do sexo feminino. Ao diferenciar os indivíduos caracterizados como intolerantes à lactose nesta pesquisa, os dados são confirmados, pois 54,6% são do sexo feminino e 45,4% são do sexo masculino, não havendo diferença significativa entre eles. Entretanto, os resultados permitiram inferir que as mulheres procuraram, em maior número, resolver os desconfortos e as perturbações decorrentes da má absorção e intolerância à lactose.

Outro ponto que merece discussão diz respeito à faixa etária, pois nos estudos observa-se uma prevalência na faixa etária <15 anos, talvez devido à predominância de leite e derivados na alimentação, entretanto, tem-se observado também a incidência em adultos. Acredita-se que aos primeiros sintomas de distúrbios gastrintestinais as pessoas procuram assistência médica e que, com o avanço da idade, esses cuidados se intensificam possivelmente pela busca de melhor qualidade de vida.

A elevada prevalência na faixa etária de 25-34 anos chama a atenção, uma vez que doenças autossômicas recessivas apresentam menor incidência nas gerações futuras. Em 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 e 60 anos), verificou-se maior prevalência de hipolactasia em indivíduos não brancos (91,3%) do que em indivíduos de cor branca (53,2%).

Entre julho de 1999 e dezembro de 2005, 1127 pacientes foram submetidos a um teste de hidrogênio expirado, em que a idade média foi de 39,8 anos (variação: 7-87); 72% eram mulheres (n=807), e os homens, 28% (n=320). Trezentos e setenta e seis (33%) pacientes tiveram um teste positivo, indicativo de hipolactasia. As idades médias dos pacientes com o teste positivo

(média \pm dp: 39,6 \pm 15,6 anos) e com o teste negativo (40,2 \pm 15,3 anos) não diferiram significativamente ($P = 0,51$). Da mesma forma, não houve nenhuma associação estatisticamente significativa entre o sexo e o resultado do teste ($P = 0,086$) (BEYERLEIN et al., 2008).

Na Europa, a incidência da hipolactasia pode chegar a 70%, segundo Carrocio et al. (1998). De acordo com Sevá-Pereira, Magalhães, Pereira (1982), a deficiência de lactase ocorre em 58 milhões de brasileiros maiores de 15 anos. Em decorrência disso, 37 milhões de pessoas apresentariam intolerância ao leite e estariam sujeitas a sintomas desagradáveis ao tomar um copo de leite.

Em relação à cor da pele dos voluntários, este estudo demonstrou taxa maior nos pacientes de cor parda (53,8%). Em São Paulo, Tronconet 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 dados foram obtidos em pacientes adultos e com a utilização do teste de tolerância à lactose. Outro estudo efetuado em São Paulo por Sevá-Pereira, Magalhães, Pereira (1982), em adultos, demonstrou taxas de 85% de má absorção em indivíduos negroides e de 50% em caucasoides. O estudo de Figueiredo (2000), realizado em Minas Gerais, com 435 crianças, também demonstrou taxas maiores de má absorção em crianças de cor preta (60,3%) e parda (50,7%) em relação às crianças de cor branca (37,5%).

A intolerância à lactose caracteriza-se por ser um conjunto de sinais e sintomas que as pessoas apresentam após a ingestão de leite, variando a intensidade da intolerância e a resposta à ingesta alimentar rica em lactose, em virtude da singularidade de cada ser humano. Além da diarreia, a pessoa pode apresentar dor e distensão abdominal, flatulência, náuseas e vômitos. Cabe esclarecer, porém, que, em muitos casos, podem ocorrer dor e distensão abdominal sem diarreia (STELLA, 2006).

No presente estudo, a amostra foi de conveniência e selecionada conforme a queixa autoreferida, sendo então considerado fenótipo intolerante.

Os sintomas mais relatados foram: flatulência (81,4%), empachamento (68,5%), borborigmo (59,3%) e diarreia (46,3%). Os sintomas sem significância estatística foram: constipação (40,7%) e perda de peso (24,1%). Na diferença (Δ máximo – basal) <15 , os quimicamente intolerantes e com o fenótipo intolerante foram 46 (85,2%).

Entretanto, existem estudos que referem pouca correlação entre o autorrelato de intolerância à lactose e má absorção de lactose, pois, dependendo do teste utilizado, 11-32% de maus absorvedores não relatam sintomas no consumo de produtos lácteos, enquanto que até 57% de indivíduos que sofrem de sintomas de intolerância à lactose podem ter atividade da lactase normal (Carroccio et al., 1998; De Vrese et al., 2001). Outro estudo comparou os pacientes que apresentaram genotipagem CC-13910 e fenótipo, o que evidenciou que muitos relatam sintomas de intolerância ao leite, mas não necessariamente os sintomas são causados pela intolerância à lactose (Enattah et al., 2005). Daí a importância de realizar uma melhor investigação clínica.

Os médicos, muitas vezes, tratam e cuidam do sintoma momentâneo, por não reunirem todos os sinais e sintomas apresentados ou porque tal sintomatologia pode ficar mascarada, em virtude de serem evidências frequentes de outras patologias e que são determinadas por vários agentes causadores, levando à dificuldade de identificação da intolerância à lactose (PORTO et al., 2005).

Os sintomas típicos incluem dor abdominal, distensão abdominal, flatulência, diarreia, borborigmos e, particularmente nos jovens, vômitos. A dor abdominal pode ser em cólica e frequentemente é localizada na região periumbilical ou quadrante inferior. O borborigmo pode ser audível no exame físico e pelo paciente. As fezes usualmente são volumosas, espumosas e aquosas. Uma característica importante é que esses indivíduos, mesmo com quadro de diarreia crônica, geralmente não perdem peso. Em alguns casos, a motilidade gastrointestinal está diminuída e os indivíduos podem se apresentar com constipação, possivelmente como consequência da produção de metano

(LOMER; PARKES; SANDERSON, 2008). A presença de diarreia deve ser usada clinicamente como um marcador de gravidade da intolerância e do esvaziamento rápido do cólon.

Existe uma grande variabilidade de sintomas entre os pacientes com intolerância à lactose. Os fatores responsáveis por essa variabilidade incluem a osmolalidade e o conteúdo de gordura do alimento do qual o açúcar é ingerido; o esvaziamento gástrico; a sensibilidade à distensão abdominal produzida pela carga osmótica da lactose não hidrolizada no intestino delgado superior; o trânsito intestinal; e a resposta do cólon à carga de carboidrato. De uma maneira geral, os alimentos com alta osmolalidade e conteúdo de gordura diminuem o esvaziamento gástrico e reduzem a gravidade dos sintomas induzidos pela lactose.

Quando a distensão abdominal e a flatulência são os sintomas predominantes, é aconselhável excluir a possível contribuição de outras fontes alimentares de gases intestinais, tais como feijão (SUCHY et al., 2010; SUAREZ, LEVITT, 2000).

Vários relatórios indicam que há sintomas normalmente considerados secundários à ingestão de lactose, assim uma escala de sintomas foi desenvolvida e validada. Ela é autoaplicável e contempla os seguintes sintomas: diarreia, cólicas abdominais, vômitos, ruídos intestinais audíveis e flatulência (CASELLAS et al., 2009). Os resultados da aplicação do instrumento mostraram que diarreia, cólicas abdominais e flatulência foram significativamente mais presentes entre os intolerantes. Entretanto, outros estudos devem ser realizados para testar sua viabilidade, pois o diagnóstico errôneo de intolerância à lactose e posterior uso de uma dieta com restrição de lácteos têm impacto negativo na saúde, por exemplo, no metabolismo ósseo.

Houve uma correlação positiva entre os resultados e os sintomas digestivos durante o teste de hidrogênio expirado, com 82% dos pacientes com teste positivo apresentando sintomas associados à carga de lactose, tais como distensão abdominal, dor abdominal e diarreia (79%, 58% e 20%,

respectivamente). Em contraste, apenas 27% dos pacientes com teste de hidrogênio expirado negativo apresentaram sintomas após a ingestão de lactose ($p < 0,001$) (MORALES et al., 2011).

Este estudo demonstra claramente o acordo satisfatório nos testes utilizados para o diagnóstico de intolerância à lactose (fenótipo intolerante, teste químico e genotipagem). O fenótipo intolerante demonstrou os sinais e sintomas mais prevalentes, aspecto já evidenciado em outros estudos. Entretanto, não é uma investigação que deva ser utilizada isoladamente, mas pode direcionar o diagnóstico.

O teste químico, realizado após a ingestão de lactose, foi considerado positivo quando o aumento da glicemia foi superior a 15 em relação ao nível basal. Este teste, a nosso ver foi julgado o melhor, com sensibilidade e especificidade 73,8% e 70,7%, respectivamente. Entretanto, alguns autores referem que este teste deve ser usado com restrições, uma vez que ele apresenta um índice elevado de falso-positivos, já que depende muito do tempo de esvaziamento gástrico, que por sua vez sofre influências externas (repleção gástrica e tempo de ingestão da última refeição) e internas (flora intestinal e doenças preexistentes), o que o torna um teste a ser realizado sob severas condições observacionais, além de ser sofrível para o objetivo para o qual foi criado, ou seja, como teste de triagem para intolerância – não se aplicando o valor preditivo diagnóstico que lhe é dado hoje em dia, que é o de diagnosticar intolerância à lactose.

A análise das curvas ROC mostrou que a diferença basal < 15 possui poder discriminativo significativo para detecção de intolerância à lactose. Entretanto, com o auxílio das mesmas curvas ROC, foi selecionado o ponto de corte que apresentou a melhor combinação de sensibilidade e especificidade, para cada variável das diferenças basais 15, 20 e 25. Foram também calculados o VPP e o VPN.

Os voluntários foram classificados como genotipicamente intolerante e genotipicamente tolerante, através da análise molecular dos dois

polimorfismos C/T-13910 e A/G-22018, responsáveis pela persistência da Lactase-Florizina Hidrolase no adulto, pelo método da técnica do Polimorfismo baseada no tamanho do fragmento de restrição (RFLP). Embora os testes de genotipagem apresentem alta especificidade, não se encontram disponíveis nos serviços de saúde, o que inviabiliza sua utilização na prática clínica, e também outro agravante é que não detectam todas as desordens genéticas.

Recentemente, o teste de genético tem sido proposto como uma nova ferramenta no diagnóstico de intolerância à lactose. E vários estudos (SZILAGYI et al., 2007; SCHIRRU et al., 2007) demonstraram uma excelente correlação entre o teste de hidrogênio expirado e o teste genético com base no polimorfismo C/T-13910. Entretanto, nenhum estudo foi evidenciado correlacionando o resultado do teste químico com o teste genético.

A escolha do critério para definir pontos de corte de variáveis contínuas para classificação de normal e anormal pode variar conforme a natureza do que se está estudando e o estágio do conhecimento sobre resultados de tratamentos e de medidas preventivas. No contexto do reconhecimento da intolerância à lactose, considera-se que o melhor critério para a escolha do ponto de corte seria o equilíbrio entre sensibilidade e especificidade. Se, por um lado, a sensibilidade é importante para o reconhecimento do maior número possível de indivíduos em risco, por outro, uma boa especificidade ajudará na racionalização de recursos diagnósticos e terapêuticos. Além disso, indivíduos falso-positivos poderiam ter diagnósticos facilmente excluídos em reexames de baixo custo.

Em busca de uma forma mais sensível, eficiente e menos invasiva de diagnóstico, Enattah et al. (2002) estudaram uma coorte de 196 indivíduos não relacionados de origem finlandesa, relatando uma correlação de 100% da persistência da lactase no fenótipo tolerante com a presença do alelo T-13910 um SNP 13910pb (bases de pares) localizada a montante do gene da lactase. Esse C/T polimorfismo-13.910 está localizado no intron 13 do MCM6 gene (C/T-13910). Além disso, esses autores descobriram uma alta correlação (96%) entre a persistência de lactose e a presença do alelo A em SNP G/A, localizado

no intron 9 do gene MCM6 de 22018 pb (bases de pares) a montante do gene da lactase (G/A-22.018).

Existem nove genótipos possíveis para o gene da LPH. Kuokkanen et al. (2006) compararam o genótipo dos pacientes com a atividade da enzima, através de material de biópsia intestinal, e identificaram quatro genótipos: CCGG e CCGA (não persistência de lactase); e CTGA e TTAA (persistência de lactase). Neste estudo, foram identificados homocigotos tolerantes e intolerantes, em que a prevalência do alelo 13910 entre os indivíduos com homocigose intolerante foi de 61,2%; e no alelo 22018 entre os indivíduos com o homocigoto intolerante, de 59%.

Enattah et al. (2002) identificaram o polimorfismo C/T-13910 do gene da lactase com base na presença de uma citosina e uma timina na posição 13910. Em homocigoto C/C seria não persistência de lactase (fenótipo intolerante), e mostra a variante C/T ou T/T que estaria ligada à atividade lactásica. Outro polimorfismo descrito seria o G/A-22018: o homocigoto G/G (guanina/guanina) se associa à não persistência, mostra as variantes G/A e A/A (adenina/adenina) na presença dos fenótipos lactase-persistente.

A análise do polimorfismo C/T-13910 e do polimorfismo A/G-22018 no gene da Lactase-Florizina Hidrolase apresentou nível de significância com o fenótipo intolerante para diagnóstico de intolerância à lactose. O indivíduo autorreferido como intolerante à lactose e com presença de sintomas apresentou genótipo compatível com persistência de lactase.

Um estudo com 518 estudantes do noroeste da Rússia evidenciou uma prevalência do polimorfismo C/T-13910 no homocigoto tolerante em 35% (n=180), enquanto que a do heterocigoto foi de 46%, e a do homocigoto intolerante, de 19%. Todos os estudantes recrutados para esse estudo foram considerados saudáveis. No entanto, 40% não relataram sintomas gastrointestinais e 50% relataram dor abdominal (KHABAROVA et al., 2011).

Um estudo 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 à análise do DNA. Os resultados observados mostraram 116 pacientes que apresentaram o teste do hidrogênio positivo; destes, 106 (91,4 %) com a variante C na posição 13910, e 103 com a variante G na posição 22018. Esse resultado evidencia o genótipo relacionado com a não persistência de lactase. Dentre os 50 pacientes com o teste do hidrogênio expirado negativo, dois 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 H₂ expirado positivo e o outro novamente apresentou o teste do H₂ negativo. A explicação dada pelos autores foi de que o paciente apresentou hipolactasia e flora bacteriana não excretora de hidrogênio. Na nossa amostra a equivalência dos dois polimorfismos foi igualmente semelhante, tanto é, que sugerimos usar um ou outro dos polimorfismos indiferentemente, quer seja para o genótipo tolerante ou intolerante.

Um estudo genótipo-fenótipo foi realizado na Ásia Central com 183 indivíduos, o qual evidenciou uma correlação genética e fenotípica notável. O alelo 13910 (heterozigoto) entre 25% e 32% na população Kazakh (agricultores) e entre 11% e 30% na população Tajiko-Uzbek (agricultores). A diferença da intolerância à lactose entre as populações é significativa usando os testes de hidrogênio expirado e o fenótipo ($p=0,018$, 25% para o Kazakh vs. 11% para Tajiko-Uzbeks) e a diferença do alelo-13910 é significativa ($p=0,06$, 30% para Kazakhs vs 19% para Tajiko-Uzbeks) (HEYER et al., 2011).

Os resultados do presente trabalho permitem concluir que a análise dos polimorfismos C/T-13910 e A/G-22018 no gene da Lactase-Florizina Hidrolase podem ser considerados bons indicadores para o diagnóstico de intolerância à lactose. É um método bastante sensível (75%) e específico (99%), conforme demonstrado em um estudo feito por Högenauer et al. (2005), e tem ótima concordância com o teste químico. As vantagens do teste molecular em relação aos outros métodos de diagnóstico são: menor exigência de tempo para o paciente na realização do teste e menor desconforto; não

requer preparação para realização do exame (por exemplo, jejum); e não submete o indivíduo que apresenta sintomas relacionados à intolerância à lactose ao componente que lhe é agressor. No nosso estudo estabelecemos a correlação do teste químico com o genótipo.

Também se deve considerar que é um método direto de analisar a persistência ou não da enzima lactase. Outros inconvenientes dizem respeito ao teste químico: tempo de duração do exame, jejum prolongado 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 para realizar o teste (BULHÕES, 2006).

Apesar da concordância entre as mutações polimorfismo C/T-13910 e polimorfismo A/G22018 e a intolerância à lactose (fenotípico intolerante e teste químico) não ser absoluta em diferentes estudos, os níveis de concordância encontrados neste e em outros trabalhos indicam que o teste molecular pode ser implantado na rotina de diagnóstico de intolerância à lactose. O nível de exame genético apresenta como vantagens a dispensa de preparo, baixo custo e coleta rápida; entretanto, embora o paciente tenha genótipo homozigoto tolerante, poderá apresentar sintomas apenas na idade adulta. O gen nativo é intolerante, ele apresenta poucas variações dentro das populações. A mutação para tolerante é autossômica dominante, e sofreu nas diversas populações no decorrer do tempo vários polimorfismos, portanto a busca pela mutação e seus polimorfismos parece ser específica para cada grupo populacional, e demanda estudos, não podendo ser universalmente aplicada. Porém, se realizarmos a busca do gen ativo, isto é, do genótipo intolerante, a margem de erro fica bastante reduzida e o modelo poderá, muito provavelmente, ser ampliado para outras populações.

Existem poucos estudos comparando a presença de mutações e intolerância à lactose, a maioria foi realizada em países europeus. A prevalência de tipo adulto hipolactasia primária, avaliada pelo teste de tolerância à lactose, varia de 38% em caucasianos e 95% em negros, com

altas diferenças regionais, devido à heterogeneidade étnica da população brasileira (Troncon et al., 1981). Uma prevalência de 8,4% de má absorção de lactose tem sido demonstrada na população pediátrica brasileira (Pretto et al., 2002). Recentemente, uma prevalência de 53% de hipolactasia foi identificada em indivíduos brancos e uma prevalência de 91% foi identificada em indivíduos não brancos, e este estudo foi realizado a partir da biópsia duodenal (Escoboza et al., 2004). No que diz respeito à frequência de C/T-13910 e G/A-22018 mutações em comparação com a tolerância ao leite na população em geral, a frequência do alelo T variando 0-0,112 tem sido demonstrada em populações africanas subsaarianas e uma frequência de 0,872 foi mostrado na Irlanda (MULCARE et al., 2004).

Estudos recentes têm apontado uma concordância de 91-97% do genótipo CC com resultados positivos de intolerância à lactose, e entre 86-95% genótipo CT e TT e os resultados negativos de intolerância à lactose. A análise de mutação para o diagnóstico de má absorção de lactose relacionado com HBT apresentou-se positiva, de 97%, e com um valor preditivo negativo de 86%. Além disso, este processo tem uma vantagem sobre o HBT, causando menos desconforto para o paciente. O presente estudo mostrou um alto nível de concordância entre *LCT* análise de mutação e de absorção de lactose em brasileiros. Sugerimos que este teste genético pode ser usado para o diagnóstico de tipo adulto de hipolactasia primário (BUNING et al., 2005; HOGENAUER et al., 2005; MATTHEWS et al., 2005).

Em um estudo retrospectivo onde aleatoriamente foram selecionados 54 pacientes ambulatoriais no Hospital Geral de Linz, Áustria, (18 homens e 36 mulheres), com uma média de idade de 55,8 anos (faixa etária de 18-87 anos), foram realizados genotipagem e o teste de hidrogênio expirado. Os resultados evidenciaram que, dos 54 pacientes com teste de hidrogênio expirado positivo, 50% apresentaram genótipo intolerante, C/C; 29,6%, genótipo C/T; e 20,4%, genótipo T/T. Os pacientes com o genótipo intolerante (C/C) apresentaram pico de H₂ no teste de hidrogênio expirado significativamente menor do que os obtidos nos grupos tolerante C/T e T/T (BODLAJ et al., 2006).

Enfim, diferentes métodos têm sido utilizados para o diagnóstico de intolerância à lactose. A biópsia jejunal já foi considerada o “padrão ouro”, no entanto, é um método invasivo e seus resultados podem ser influenciados pela distribuição irregular da lactase no intestino delgado. O teste do hidrogênio expirado é um teste indireto, que é comumente considerado como a técnica mais confiável, não invasiva e de baixo custo.

Porém é possível encontrar resultados falso-negativos devido à incapacidade do cólon para produzir H_2 após a ingestão de hidratos de carbono não absorvíveis, ou após a administração de antibióticos recente. Resultados falso-positivos são menos frequentes e são produzidos principalmente por causa do crescimento excessivo de bactérias no intestino delgado. Estudos evidenciam que o teste de hidrogênio expirado apresenta boa sensibilidade (valor médio de 77,5%) e excelente especificidade (valor médio de 97,6%) (NEWCOMER et al., 1975; USAI-SATTA et al., 2012).

O teste de genotipagem fornece um resultado mais direto, ao passo que a interpretação do teste de hidrogênio expirado depende do nível de corte, da dose de lactose dada, da duração do teste e da idade do indivíduo (MATTAR, MAZO e CARRILHO, 2012).

O estudo de Hovde e Farup (2009) teve por objetivo comparar os testes de H_2 expirado e curva glicêmica, com 62 indivíduos, construindo uma escala linear com os valores de pico dos gases expirados, e os autores propuseram o valor $<18\text{ppm}$ como de maior sensibilidade para o teste, embora com prejuízo na especificidade. Para a escolha deste ponto, os autores estabeleceram correlação entre o teste do gás expirado e o genótipo intolerante. A área da curva ROC neste ponto foi de 0,967. Os autores concluíram que o teste $H_2+CH_4 \times 2$ era superior ao da curva glicêmica. Questionamos este resultado por não terem realizado semelhante desenho metodológico no ponto de corte da curva glicêmica. Consideramos que os dois testes são equivalentes quer em limitações quer nos vieses de resultados.

Para a escolha do delta químico em nosso estudo, uma escala linear foi confeccionada e encontramos o valor <18ppm para o delta máximo – basal. Neste caso, nosso critério comparativo foi o fenótipo clínico, e o ponto escolhido não se baseou apenas em sensibilidade, pois teríamos pequena especificidade. Consideramos então um ponto com correlações ótimas de sensibilidade, especificidade, VPP e VPN. Realizamos uma curva ROC no ponto 18, com área de 0,789, sensibilidade 89,3% e especificidade 66%. Utilizamos a curva glicêmica pela universalidade de sua disponibilidade e por não necessitar de equipamentos especiais e poder ser realizada em pequenos centros.

7 CONCLUSÕES

Os resultados desta pesquisa, realizada com indivíduos que apresentavam distúrbios gastrintestinais ou manifestações clínicas suspeitas de intolerância à lactose e que fizeram o teste de sobrecarga de lactose e teste de genotipagem, permitiram concluir que: a maior proporção foi do sexo feminino, com 54,6% (65) dos casos; na faixa etária de 46-55 anos (32 casos); eram casados 78 (65,6%); de cor parda, 65 (53,8%); e de nível superior, 51 (42,9%).

A prevalência de intolerância à lactose encontrada na população de estudo foi de 45,4%. Cinquenta e quatro pacientes autoreferiram intolerância à lactose, sendo então considerados como fenótipo intolerante, quando durante a avaliação clínica referiram manifestações clínicas de intolerância. A prevalência de intolerância química encontrada foi de 73,9%.

Os sintomas que apresentaram maior incidência no fenótipo intolerante foram principalmente: flatulência, 81,4% (44 casos); empachamento, 68,5% (37 casos); borborigmo, 59,3% (32 casos); e diarreia, 46,3% (25 casos). O sintoma que apresentou menor incidência foi perda de peso. Já os sintomas dos pacientes que não apresentaram fenótipo intolerante foram: empachamento, 47,7% (31 casos); e flatulência, 46,2 % (30 casos). Deve-se considerar diarreia como um fator preditivo da gravidade da intolerância.

A presença dos polimorfismos C>T-13910 e G>A-22018 no gene da LPH foi identificada nos indivíduos autoreferidos como intolerantes à lactose, sendo, portanto, um excelente exame para o diagnóstico.

Dentre as curvas ROC para Δ (máximo - basal) <15, <20 e <25 e o diagnóstico de intolerante à lactose, a que mais se apresentou adequada foi a diferença basal <15 com a curva maior que 80,3%, pois as outras foram 73% e 67%, respectivamente, sendo estabelecidos os pontos de corte que conferiram

elevada sensibilidade ($\geq 95\%$) e melhor VPP sem grande prejuízo para sensibilidade e especificidade.

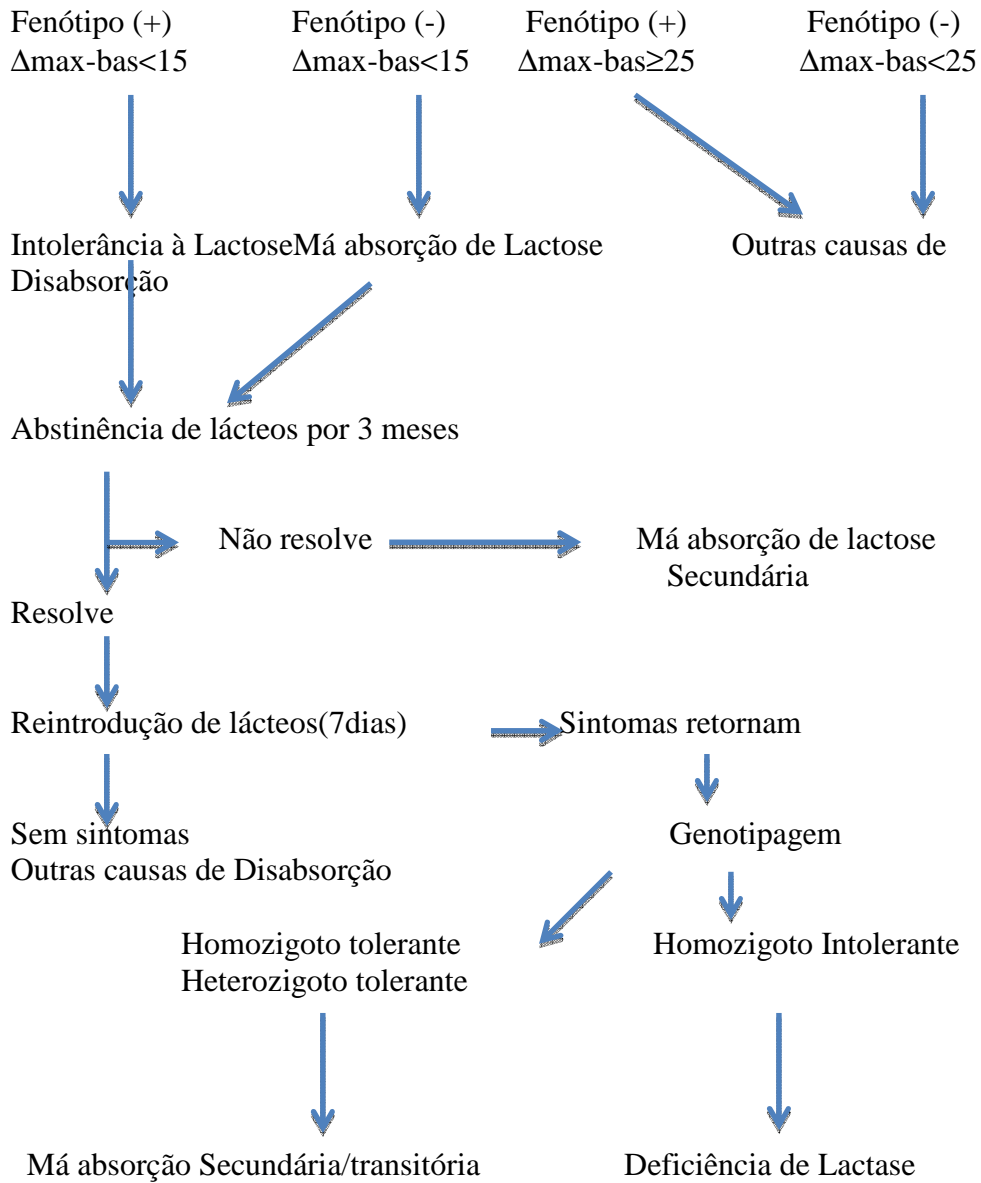
Atualmente muitos profissionais da área da saúde apresentam confusões no momento do fechamento do diagnóstico, gerando graves complicações nutricionais e psicológicas nos pacientes.

Limitações do estudo - A perda de 54 pacientes da amostra inicial, dos indivíduos que não compareceram para a coleta de sangue em jejum, pode ter introduzido um viés de seleção. Perdas maiores ou pouco menores têm sido amplamente observadas na literatura, representando um dos obstáculos à pesquisa epidemiológica.

A experiência profissional do pesquisador sugere que a maioria dos casos de intolerância à lactose deve ser detectada e tratada adequadamente, e, se na investigação clínica, o paciente referir problemas com derivados lácteos, deve-se avaliar o fenótipo intolerante, e só depois realizar a genotipagem. Assim, pode-se usar este fluxograma como uma avaliação de rotina para o diagnóstico, pois o que se vê na prática é a realização de diferentes testes que são feitos quando os profissionais os julgarem essenciais, o que aponta a importância de um protocolo.

Para finalizar, deve-se levar sempre em consideração que o paciente que sofre de intolerância à lactose é uma pessoa que procura por ajuda, geralmente com ansiedade e suspeitando de outros problemas de saúde, e que, algumas vezes, já vem com experiências prévias de diagnósticos e tratamentos mal sucedidos. Além, disso, há gastos importantes em consultas ambulatoriais, avaliações de especialistas, exames subsidiários, inclusive invasivos e desconfortáveis. Tais gastos poderiam ser minimizados, adotando-se um fluxograma de investigação clínica, conforme sugerido, como protocolo.

Figura 5 - Protocolo de investigação Clínica de Disabsorção



REFERÊNCIAS

- 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. Diagnosis of hypolactasia and lactose malabsorption. **Scand. J. Gastroenterol.**, v. 29, Suppl. 202, p. 26-35, 1994.
- AROLA, H.; TAMM, A. metabolism of lactose in the human body. **Scand. J. Gastroenterol.**, v.29, p. 21-25, 1994.
- ARVANITAKIS, C.; CHEN, G.; FOLSCROFT, J.; KLOTZ, A.P. Lactase deficiency: a comparative study of diagnostic methods. **Am. J. Clin. Nutri.**, v. 30, p. 1597-1602, 1977.
- AURICCHIO, S.; TRONCONE, R. Genetically determined disaccharidase deficiencies. In: WALKER, W. A.; DURIE, P.; HAMILTON, J. R.; WALKER-SMITH, J.Á.; WATKINS, J. B. (Ed.). **Pediatricgastrointestinal disease**. Ontario: BC Decker, 2000. p. 677-700.
- BARILLAS-MURY, C.; SOLOMONS, N.W. Test-retest reproducibility of hydrogen breath test for lactose maldigestion in preschool children. **J. Pediatr. Gastroenterol.Nutr.**, v. 6, p. 281-285, 1987.
- BAUDON, J. J.; VEINBERG, F.; THIOULOUSE, E.; MORGANT, G.; AYMARD, P.; CHARRITAT, J.L. Sucrase-isomaltase deficiency: changing pattern over two decades. **J. Pediatr.Gastroenterol.Nutr.**,v. 22, n. 3, p. 284-288, 1996.
- BEYERLEIN, L.; POHL, D.; DELCO, F.; STUTZ, B.; FRIED, M.; TUTUIAN, R. Correlation between symptoms developed after the oral ingestion of 50 g lactose and results of hydrogen breath testing for lactose intolerance. **Aliment.Pharmacol.,Ther.**, v.27, n.8, p.659-665, 2008.
- BODLAJ, G.; STÖCHER, M.; HUFNAGL, P.; HUBMANN, R.; BIESENBACH, G.; STEKEL, H.; BERG, J. Genotyping of the lactase-phlorizin hydrolase – 13910 polymorphism by LightCycler PCR and implications for the diagnosis of lactose intolerance. **Clin. Chem.**,v. 52, n. 1, p.148-151, 2006.
- BRASIL. Conselho Nacional de Saúde. Comissão Nacional de Ética em Pesquisa. **CONEP.Resolução 196/96**. Sobre pesquisa envolvendo seres humanos. *Bioética*, v.4, 2 supl., p. 15-25, 1996.
- BRUMMER, R. J. M.; KARIBE, M.; STOCKBRUEGGER, R. W. Lactose malabsorption: optimalization of investigational methods. **Scand. J. Gastroenterol. Suppl.**, v. 200, p. 65-69, 1993.

BULHÕES, A. C. S. **Análise molecular do gene da lactase-florizina hidrolase em indivíduos tolerantes e intolerantes à lactose.** Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

BULLER, H. Á.; RINGS, E. H. H. M.; MONTGMERY, R. K.; GRAND, R. J. Clinical aspects of lactose intolerance in children and adults. **Scand. J. Gastroenterol. Suppl.**, v. 188, p. 73-80, 1991.

BÜNING, C.; GENSCHEL, J.; JURGA, J.; FIEDLER, T.; VODERHOLZER, W.; FIEDLER, E. M.; WORM, M.; WELTRICH, R.; LOCHS, H.; SCHMIDT, H.; OCKENGA, J. introducing genetic testing for adult-type hypolactasia, digestion. **Digestion**, v. 71, n. 4, p. 245-250, 2005.

BURGER, J.; KIRCHNER, M.; BRAMANTI, B.; HAAK, W.; THOMAS, M.G. Absence of the lactase-persistence-associated allele in early Neolithic Europeans. **Proc. Nati. Acad. Sci. USA**, v.104, p. 3736-3741, 2007.

CABALLERO, B.; SOLOMONS, N. W.; TORÚN, B. Fecal reducing substance and breath hydrogen excretion as indicators of carbohydrate malabsorption. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, v. 2, p. 487-490, 1983.

CHAO, C. K.; SIBLEY, E. PCR-RFLP Genotyping Assay for a Lactase Persistence Polymorphism Upstream of the Lactase-Phlorizin Hydrolase Gene. **Genetic Testing**, v. 8 (2), p. 190-193, 2004.

CARROCCIO, A.; MONTALTO, G.; CAVERA, G.; NOTARBATOLO, A. lactose intolerance and self-reported milk intolerance: relationship with lactose maldigestion and nutriente intake. **J. Am. Coll. Nutr.**, v. 17, p. 631-636, 1998.

CASELLAS, F., VARELA, E., APARICI, A., CASAUS, M., RODRÍGUEZ, P. Development, validation, and applicability of a symptoms questionnaire for lactose malabsorption screening. **Dig Dis Sci**, v. 54, n. 5, p. 1059-65, 2009.

CUNHA, M. E.T.; SUGUIMOTO, H. H.; OLIVEIRA, A. N.; SIVIERI, K.; COSTA, M. R. Intolerância à lactose e alternativas tecnológicas. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**. v.10, n. 2, p. 83-88, 2008. Disponível em: <<http://revista.unopar.br/biologicaesaude/revistaBiologicas/list>>. Acesso em: 10 jan. 2011.

DAVIDSON, G.P.; BUTLER, R.N. Breath analysis. In: WALKER, W.A.; DURIE, P.; HAMILTON JR; WALKER-SMITH, J.A.; WALKINS, J.B. **Pediatric gastrointestinal disease**. Ontario: BC Decker, 2000. p. 1529-1537.

DE VRESE, M.; STEGELMANN, A.; RICHTER, B.; FENSELAU, S.; LAUE, C.; SCHREZENMEIR, J. Probiotics-compensation for lactase insufficiency. **Am. J. Clin. Nutr.** v. 73, n. 2, p. 421, 2001.

DENSUPSOONTORN, N.; JIRAPINYO, P.; THAMONSIRI, N.; CHANTARATIN, S.; WONGARN, R. Lactose intolerance in Thai adults. **J. Med. Assoc. Thai.**, v. 87, p. 1501–1505, 2004.

ENATTAH, E.; PEKKARINEN, T.; VÄLIMÄKI, M.J.; LÖYTTYNIEMI, E.; JÄRVELÄ, I. Genetically defined adult-type hypolactasia and self-reported lactose intolerance as risk factors of osteoporosis in Finnish postmenopausal women. **Eur. J. Clin. Nutr.**, v.59,n. 1, p. 1105-1111, 2005.

ENATTAH, N. S.; SAHI, T.; SAVILAHTI, E.; TERWILLIGER, J. D.; PELTONEN, L.; JÄRVELÄ, I. Identification of a variant associated with adult-type hypolactasia. **Nat. Gen.**, v. 30, p. 233-237, 2002.

ESCOBOZA, P.M.L.; FERNANDES, M.I.M; PERES, L.C.; EINERBAND, A.W.C.; GALVÃO, L.C. Adult-type hypolactasia: clinical, morphologic and functional characteristic in Brazilian patients at a University hospital. **J. Pediatr.Gastroenterol.Nutr.**, v. 39, n. 4, p. 361-365, 2004.

EVANS, P. R.; PIESSE, C.; BAK, Y.-T.; KELLOW, J. E. Fructose-sorbitol malabsorption and symptom provocation in irritable Bowel Syndrome: relationship to enteric hypersensitivity and dysmotility. **Scand. J. Gastroenterol.**, v. 33, p. 1158-1163, 1998.

FARUP, P. G.; MONSBAKKEN, K. W.; VANDVIK, P. O. Lactose malabsorption in a population with irritable bowel syndrome: prevalence and symptoms. A case-control study. **Scand. J. Gastroenterol.**, v. 39, p. 645–649, 2004.

FIGUEIREDO, R. C. P. **Absorção e tolerância à lactose na população de escolares do município de Rio Acima- MG.** Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2000.

FRYE, R.E. **Lactose intolerance.** Clínica Fellow, Departamento de Neurologia. Hospital de Crianças de Boston, Escola Médica Harvard. 2002.

GIL, N. C. I. L.; SCROMEDA, M. C. P.; TORRES, E. E.; ROTT, C. M. Intolerância a la lactosa en pediatría. **Rev. Posgrado Via Cátedra Med.**, v. 16, p. 16-20, 2010.

GRACEY, M.; VALERIE, B. sugar induced diarrhea in children. **Arch. Dis. Child**, v. 48, p. 331-336, 1973.

GUDMAND-HOYER, E. The clinical significance of disaccharide maldigestion. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 59, p. 735S–741S, 1994.

GUPTA, S.K.; CHONG, S.K.F.; FITZGERALD, J.F. Disaccharidase activities in children: normal values and comparison based on symptoms and histologic changes. **J Ped Gastroenterol Nutr**, v. 28, p. 246-251, 1999.

HARVEY, C.B.; HOLLOX, E.J.; 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**, v.62, p. 215-23, 1998.

HEITLINGER, L. A.; LEBENTHAL, E. Disorders of carbohydrate digestion and absorption. **Pediatr.Clin. North Am.**, v. 35, n. 2, p. 239-255, 1988.

HEYER, E.; BRAZIER, L.; SÉGUREL, L.; HEGAY, T.; AUSTERLITZ, F.; QUINTANA-MURCI, L.; GEORGES, M.; PASQUET, P.; VEUILLE, M. Lactase persistence in Central Asia: phenotype, genotype and evolution. **Hum. Biol.**, v. 83, n. 3, p. 379-392, 2011.

HÖGENAUER, C.; HAMMER, H. F.; MELLITZER, K., RENNER W., KREJS, G.T., TOPLAK, H. evaluation of a new DNA test compared with the lactose hydrogen breath test for the diagnosis of lactase non-persistente. **Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 17, p. 371-376, 2005.

HOVDE, Ø.; FARUP, P.G. **A comparison of diagnostic test for lactose malabsorption – which one is the best?** **BMC Gastroenterology**, v.9, no. 82, p.1-7, 2009.

HULLEY, S.B.; CUMMINGS, S.R.; BROWNER, W.S.; GRADY, D.G.; NEWMAN, T.B. **Delineando a pesquisa clínica: uma abordagem epidemiológica**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.

INGRAM, C. J.; MULCARE, C. A.; ITAN, Y.; THOMAS, M. G.; SWALLOW, D. M. Lactose digestion and the evolutionary genetics of lactase persistence. **Hum.Genet.**,v. 124, n. 6, p. 579-591, 2009.

JOHNSON, L. R. Gastrointestinal physiology. In: JOHNSON, L. R. (Ed.). **Digestion and absorption**. 7thed. Philadelphia: Mosby Elsevier, 2007. p. 107-126.

KERRY, K. R.; ANDERSON, C.A ward test for sugar in feces (letter). **Lancet**, v. 283, n.7340, p. 981-982, 1964.

KHABAROVA, Y.; TORNIANEN, S.; TUOMISTO, S.; JÄRVELÄ, I.; KARHUNEN, P.; ISOKOSKI, M.; MATTILA, K. Lactase non-persistent genotype influences milk consumption and gastrointestinal symptoms in Northern Russians. **BMC Gastroenterol.**, v. 11, p.3-6. 2011.

KERZNER, B. Breath testing. In: WYLIE, R.; HYAMS, J.S. (Eds.). **Pediatric gastrointestinal disease**. Philadelphia: WB Saunders, 1993. p. 1027-1038.

KOBLITZ, M. G. B. (Coord.). **Bioquímica de alimentos: teoria e aplicações práticas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008, p.55-56.

KRETCHMER, N.; HURWITZ, R.; RANSOME-KUTI, O.; DUNGY, C. Intestinal absorption of lactose in Nigerian ethnic groups. **Lancet**, v. 298, n. 7721, p. 392-

395, 1971.

KUOKKANEN, M.; ENATTAH, N.S.; OKSANEN, A.; SAVILAHTI, E.; ORPANA, A.; JÄRVELÄ, I. Transcriptional regulation of the lactase-phlorizin hydrolase gene by polymorphisms associated with adult-type hypolactasia. *Gut*, v. 52, p. 647-652, 2003.

KUOKKANEN, M.; KOKKONEN, J.; ENATTAH, N. S.; YLISAUKKO-OJA, T.; KOMU, H.; VARILO, T.; PELTONEN, L.; SAVILAHTI, E.; JÄRVELÄ, I. Mutations in the translated region of the lactase gene (LCT) underlie congenital lactase deficiency. *Am. J. Hum. Genet.*, v. 78, n. 2, p. 339-344, 2006.

LEIS, R.; TOJO, R.; PAVON, P.; DOUWES, A. prevalence of lactose malabsorption in Galicia. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, v. 25, p. 296-300, 1997.

LEVITT, M. D. Production and excretion of hydrogen gas in man. *N Engl J Med*, v. 281, p. 122-127, 1969.

LOMER, M. C. E.; PARKES, G. C.; SANDERSON, J. D. Review article: lactose intolerance in clinical practice - myths and realities. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, v. 27, p. 93-103, 2008.

MATTHEWS, S. B.; WAUD, J. P.; ROBERTS, A. G.; CAMPBELL, A. K. Systemic lactose intolerance: a new perspectiva on an old problema. *Postgrad. Med. J.*, v. 81, n. 1, p. 167-173, 2005.

MATTAR, R.; MAZO, D.F.C.; CARRILHO, F.J. Lactose intolerance: diagnosis, and clinical factors. *Clin. Exp. Gastroenterol.*, v. 12, n. 5, p. 113-121, 2012.

METZ, G.; PETERS, T.J.; JENKINS, D.J.A.; NEWMANN, A.; BLENDIS, L.M. Breath hydrogen as a diagnostic method for hypolactasia. *Lancet*, v. 305, n. 7917, p. 1155-1157, 1975.

MONTALTO, M.; CURIGLIANO, V.; SANTORO, L.; VASTOLA, M.; CAMMAROTA, G.; MANNA, R.; GASBARRINI, A.; GASBARRINI, G. Management and treatment of lactose malabsorption. *World J. Gastroenterol.*, v. 12, p. 187-191, 2006.

MORALES, E.; AZOCAR, L.; MAUL, X.; PEREZ, C.; CHIANALE, J; MIGUEL, F.J. The European lactase persistence genotype determines the lactase persistence state and correlates with gastrointestinal symptoms in the Hispanic and Amerindian Chilean population: a case-control and population-based study. *BMJ Open*, v. 1, n.1, p. 1-7, 2011.

MULCARE, C. A.; WEALE, M. E.; JONES, A. L.; CONNELL, B.; ZEITLYN, D.; TAREKEGN, A.; SWALLOW, D. M.; BRADMAN, N.; THOMAS, M. G. The T Allele of a Single-Nucleotide Polymorphism 13.9 kb Upstream of the Lactase Gene (*LCT*)(C-13.9kbT) Does Not Predict or Cause the Lactase-Persistence

Phenotype in Africans. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 74, n. 6, p. 1102-1110, 2004.

NEWCOMER, A. D.; MCGILL, D. B.; THOMAS, P. J.; HOFMANN, A. F. Prospective comparison of indirect methods for detecting lactase deficiency. **N. Engl. J. Med.**, v. 293, p. 1232–1236, 1975.

NEWCOMER, A. D.; MCGILL, D. distribution of disaccharidase activity in the small bowel of normal and lactase deficient subjects. **Gastroenterology**, v. 51, p. 481-488, 1966.

NÓBREGA, F.J.; YIN, L. Estudo de absorção e tolerância a lactose em população adulta de bom nível sócio-econômico realizado na cidade de São Paulo. **Rev. Bras.Clín.Ter.**, v.13,n. 8, p. 327-330, 1984.

PORTO, C .P. C.; THOFEHRN, M. B.; SOUSA, A. S.; CECAGNO, D. Experiência vivenciada por mães de crianças com intolerância á lactose. **Fam. Saúde Desenv.**, v.7, v.3. p. 250-256, 2005.

POULTER, M.; HOLLOX, E.; HARVEY, C. B.; MULCARE, C.; PEUHKURI, K.; KAJANDER, K.; SARNER, M.; KORPELA, R.; SWALLOW, D. M. 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.**, v. 67, p. 298–311, 2003.

PRETTO, F.M. **O teste do hidrogênio expirado no diagnóstico da má absorção de doses fisiológicas de lactose em alunos de escolas públicas de Porto Alegre**. 104p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina. Porto Alegre, 2001.

PRETTO, F.M.; SILVEIRA, T.R.; MENEGAZ, V.; OLIVEIRA, J. Lactose malabsorption in children and adolescents: diagnosis through breath hydrogen test using cow milk. **J Pediatr** 2002; 78: 213-218.

RASINPERÄ, H.; SAARINEN, K.; PELKONEN, A. JÄRVELÄ, I.; SAVILAHTI, E.; KOLHO, K.L. Molecularly defined adult-type hypolactasia in school-aged children with a previous history of cow's milk allergy. **World J Gastroenterol**, v. 12, no. 14, p. 2264-2268, 2006.

REIS, J. C.; MORAIS, M. B.; FAGUNDES-NETO, U. Teste do H₂ no ar expirado na avaliação de absorção de lactose e sobrecrecimento bacteriano no intestino delgado de escolares. **Arq.Gastroenterol.**, v. 36, n. 4, p. 169-176, 1999.

SABRÁ, A. Intolerância à lactose. **Temas de Pediatria Nestlé**, n. 57, p. 3-15, 1994.

SAHI, T. Hypolactasia and lactase persistence. Historical review and the terminology. **Scand. J. Gastroenterol.Suppl.**, v.202, p. 1-6, 1994.

SAHI, T. The inheritance of selective adult-type lactose malabsorption. **Scand.J. Gastroenterol. Suppl.**, v. 30, p. 1-73, 1974.

SALGADO, C.J.; RESENDE, C.C.; FERRARI, M.L.A. Intolerância à lactose e supercrescimento bacteriano intestinal. In: SAVASSI-ROCHA, P.R.; COELHO, L.G.V.; MORETZSOHN, L.D.; PASSOS, M.C.F. **Tópicos em gastroenterologia 16 afecções menos frequentes em gastroenterologia** Rio de Janeiro: Medbook Editora Científica Ltda, 2007. Cap. 15, p. 203-217.

SANIOTO, S.M.L.; Digestão e absorção de nutrientes orgânicos. Cap. 62. P.946-969. IN: AIRES, M.M. **Fisiologia**. 4ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 2012.

SASAKI, Y.; ILO, M.; KAMEDA, H.; UEDA, H.; AOYAGI, T. Measurement of ¹⁴C-lactose absorption in the diagnosis of lactase deficiency. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 76, n. 5, p. 824-835, 1970.

SCHIRRU, E.; CORONA, V.; USAI-SATTA, P.; SCARPA, M.; OPPIA, F.; LORIGA, F.; CUCCA, F.; DE VIRGILIIS, S.; ROSSINO, R.; MACIS, M. D.; JORES, R. D.; CONGIA, M, Genetic testing improves the diagnosis of adult type hypolactasia in the Mediterranean population of Sardinia. **Eur. J. Clin. Nutr.**, v. 61, n. 10, p. 1220–1225, 2007.

SCRIMSHAW, N.S.; MURRAY, E.B. The acceptability of milk and milk products in populations with a high prevalence of lactose. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.48, n. 4, p. 1079-1159, p. 1988.

SEVÁ-PEREIRA, A. Deficiência de dissacaridases. In: Federação Brasileira de Gastroenterologia Ed. **Condutas em gastroenterologia**. Rio de Janeiro: Revinter, 2004: 198-215.

SEVÁ-PEREIRA, A.; MAGALHÃES, A. F.; PEREIRA, R. A. Teste de sobrecarga com lactose no diagnóstico de malabsorção primária de lactose do adulto. **Rev. Bras. Patol. Clin.**, v. 18, p. 1-6, 1982.

SOLOMONS, N.W. Evaluation of carbohydrate absorption: the hydrogen breath test in clinical practice. **Clin.Nutr.**, v. 3, p. 71-78, 1984.

SOLOMONS, N.W.; BARILLAS, C. The cut-off criterion for a positive hydrogen breath test in children: a reappraisal. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr**, v. 5, p.920-925, 1986.

STELLA, R. **Intolerância à lactose: nutrição**. 2006. Disponível em: <<http://www1.uol.com.br/cyberdiet/colunas>>. Acesso em: 22 de setembro de 2012.

STELLAARD, F.; GEYPENS, B. European interlaboratory comparison of breath CO₂ analysis. **Gut**, v. 43 n. 3 suppl. p. 2-6, 1998.

STONEKING, M. Single nucleotide polymorphisms from the evolutionary past. In: ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P.V.; GORINI, A.B. et al. **Biologia molecular da célula**. Porto Alegre: Artmed, p. 464-508, 2004.

SUAREZ, F. L.; SAVAIANO, D. A.; LEVITT, M. D. 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.**, v. 333, p. 1-4, 1995.

SUAREZ, F.L.; LEVITT, M.D. An understanding of excessive intestinal gas. **Current Gastroenterology Reports**, v.2, n. 5, p. 413-419, 2000.

SWAGERTY JUNIOR, D. L.; WALLING, A. D.; KLEIN, R. M. Lactose intolerance. **Am. Fam. Physician**, v. 65, n. 9, p. 1845-1850, 2002.

SZILAGYI, A.; MALOLEPSZY, P.; HAMARD, E.; XUE, X.; HILZENRAT, N.; PONNIAH, M.; MACNAMARA, E.; CHONG, G. Comparison of a real-time polymerase chain reaction assay for lactase genetic polymorphism with standard indirect tests for lactose maldigestion. **Clin. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 5, p. 192-196, 2007.

TÉO, C.R.P.A. intolerância à lactose: uma breve revisão para o cuidado nutricional. **Arq. Saúde Unipar**, v. 6, n. 3, p. 135-140, 2002.

TESTER, R. F.; KARKALAS, J.; QI, X. Starch – composition, fine structure and architecture. **J. Cereal Sci.**, v. 39, n. 1, p. 151-165, 2004.

TISHKOFF, S.A.; REED, F.A.; RANCIARO, A.; VOIGHT, B.F.; BABBITT, C.C.; SILVERMAN, J.S.; POWELL, K.; MORTENSEN, J.M.; HIRBO, J.B.; OSMAN, M.; IBRAHIM, M.; OMAR, S.A.; LEMA, G.; NYAMBO, T.B.; GHORI, J.; BUMPSTEAD, S.; PRITCHARD, J.K.; WRAY, G.A.; DELOUKAS, P. Convergent adaptation of human lactase persistence in Africa and Europe. **Nature Genetics**, v. 39, n.1, p. 31-40, 2007.

TRONCON, L. E.; COLLARES, E. F.; OLIVEIRA, R. B., PADOVAN, W.; MENEGHELLI, U.E. Mal-absorção de lactose em pacientes adultos do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto. **Arq. Gastroenterol.**, v.18, n. 3, p. 106-112, 1981.

TUMAS, R.; CARDOSO, A. L. Como conceituar, diagnosticar e tratar a intolerância à lactose. **Revista Clínica e terapêutica**, v. 34, n. 1, p. 13-20, 2008.

USAI-SATTA, P.; SCARPA, M.; OPPIA, F.; CABRAS, F. Lactose malabsorption and intolerance: what should be the best clinical management? **World J. Gastrointest. Pharmacol. Ther.**, v. 3, n. 3, p. 29-33, 2012.

VESA, T. H.; MARTEAU, P.; KORPELA, R. lactose intolerance. **J. Am. Coll. Nutr.**,v.19, n. 9, p. 165s-175s, 2000.

VONK, R. J.; STELLAARD, F.; HOEKSTRA, H.; KOETSE, H. A. 13 C carbohydrate breath test.**Gut**, v. 43, suppl 3, p. 20-22, 1998.

WALKER-SMITH, J. Á. Lactose intolerance. In: GRACEY, M.; WALKER-SMITH, J. Á. (Ed.).**Diarrheal disease**.Philadelphia: Vevey/Lippincott-Raven, 1997. p. 171-189.

WALKER-SMITH, J.; MURCH, S. Mechanisms of malabsorption and secretion. In: _____. **Diseases of the small intestine in childhood**.Oxford: Isis Medical Media, 1999. p. 63-86.

WANG, Y.; HARVEY, C. B.; HOLLOX, E. J.; PHILLIPS, A. D.; POULTER, M.; CLAY, P.; WALKER-SMITH, J. A.; SWALLOW, D. M. The genetically programmed down-regulation of lactase in children.**Gastroenterology**,v. 114, p.1230–1236,1998.

APÊNDICES OU ANEXOS