

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

STEFANIE EPP BOSCHMANN

ANÁLISE GENÉTICA DA PERSISTÊNCIA DA LACTASE NAS POPULAÇÕES
MENONITA E EURO-BRASILEIRA DO SUL DO BRASIL

CURITIBA
2012

STEFANIE EPP BOSCHMANN

ANÁLISE GENÉTICA DA PERSISTÊNCIA DA LACTASE NAS POPULAÇÕES
MENONITA E EURO-BRASILEIRA DO SUL DO BRASIL

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Medicina Interna e Ciências da Saúde, pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Iara José Taborda de Messias-Reason

Co-orientadora: Dra. Angelica Beate Winter Boldt

CURITIBA
2012

B742 Boschmann, Stefanie Epp.
Análise genética da persistência da lactase nas populações
menonita e euro-brasileira do sul do Brasil / Stefanie Epp Boschmann.
– Curitiba, 2012.
101 f.: il.; color.; 30 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Iara José Taborda de Messias-Reason.
Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em
Medicina Interna e Ciências da Saúde do Setor de Ciências da
Saúde. Universidade Federal do Paraná.

1. Lactase - polimorfismo genético. 2. Grupo com ancestrais do
continente europeu - consanguinidade. 3. Hábitos alimentares -
ingestão de líquidos - leite. 4. Intolerância à lactose - grupos étnicos -
marcadores genéticos. I. Título. II. Messias-Reason, Iara José
Taborda de.

NLM: WD 200.5.M2



Ministério da Educação
Universidade Federal do Paraná
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
= MESTRADO e DOUTORADO =

PARECER

Aos vinte e três dias do mês de agosto do ano de dois mil e doze, a banca examinadora constituída pelos Professores: Dr. Odery Ramos Junior (UFPR), Dra. Danielle Malheiros Ferreira (U. Positivo) e Dra. Iara José de Messias - Reason (UFPR) – orientadora, exarou o presente parecer sobre a dissertação elaborada por STEFANIE EPP BOSCHMANN, do Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna – Mestrado da Universidade Federal do Paraná, intitulada: “ANALISE GENÉTICA DA PERSISTÊNCIA DA LACTASE NAS POPULAÇÕES MENONITA E EURO-BRASILEIRA DO SUL DO BRASIL”. A Banca examinadora considerou que a aluna, apresentou trabalho adequado para dissertação e o defendeu com segurança e propriedade nas arguições que lhe foram feitas, de modo a merecer a sua **aprovação**, sendo recomendado à Universidade Federal do Paraná que lhe seja concedido o título de **Mestre em Medicina Interna**, e a publicação de artigo em revista técnico-científica com corpo editorial, depois de incorporadas as sugestões apresentadas no decurso das arguições, cumpridas outras exigências previstas em normativas da pós-graduação.

Curitiba, 23 de agosto de 2012.

Dr. Odery Ramos Junior

Dra. Danielle Malheiros Ferreira

Dra. Iara José de Messias - Reason

Dedico este trabalho ao meu marido Daniel, que com todo amor e carinho me apoiou e incentivou para a realização desse trabalho. Você faz parte dessa conquista.

Amo você!

Dedico este trabalho também a Dra. Angelica B. W. Boldt, que me incentivou a ingressar no mestrado e a realizar este estudo e me acompanhou nesta trajetória.

AGRADECIMENTOS

Ao Senhor Jesus, o autor da minha vida. A Ele dou toda honra por este trabalho.

Ao meu marido, Daniel, meu amor e companheiro, pelas inúmeras palavras de incentivo e encorajamento desde o início dessa trajetória. Muito obrigada pelo interesse em ouvir e fazer parte das minhas descobertas.

À minha orientadora, Profa. Dra. Iara J. T. Messias-Reason, que com coração de mãe me aceitou na grande família do Laboratório de Imunopatologia Molecular – HC, pelo exemplo, apoio, orientação e confiança em mim depositada.

À minha co-orientadora, Dra. Angélica B. W. Boldt, por não medir esforços para me ajudar, pela paciência para ensinar e pela amizade.

Aos meus pais, Manfred e Rosemarie Epp, pelo exemplo de vida, pelo incentivo, por se alegrarem comigo por cada passo dado. O apoio de vocês contribuiu muito para a realização desse trabalho.

Aos meus irmãos, pela amizade e companheirismo.

Às minhas amigas e colegas do Laboratório de Imunopatologia Molecular do Hospital de Clínicas, Grazi, Sandra, Paola, Carol, Isa, Priscilla, Angel, Karla, Denise, Vanessa, Aline, Camila, Hellen, Marina e Amanda, pela disposição em ajudar, pelos “coffee breaks” e pelas muitas conversas e risadas.

Ao Ery, pelo auxílio, de inestimável valor, na coleta de sangue realizada num sábado na Colônia Witmarsum.

À comunidade de Witmarsum, pela confiança e disposição em fazer parte desse estudo.

Aos funcionários da Hemepar, pelo auxílio na coleta de sangue.

RESUMO

A *lactase*, uma enzima ancorada na superfície dos enterócitos do intestino delgado, é responsável por clivar a lactose em componentes absorvíveis pelo intestino, a glicose e galactose. Esta enzima é essencial em recém-nascidos cuja fonte de nutrição exclusiva é o leite. A sua atividade diminui após o desmame na maioria das pessoas e, portanto, a lactase é expressa nestes indivíduos em pequena quantidade durante a vida adulta, condição chamada de hipolactasia primária ou lactase não-persistente. Entretanto, em algumas populações com uma longa história de pastoralismo e ordenha, polimorfismos foram identificados como responsáveis pela expressão elevada da lactase na vida adulta, o que caracteriza o fenótipo persistência da lactase. O polimorfismo $-13910 C>T$, localizado em um gene adjacente ao gene *lactase (LCT)*, o *MCM6*, foi identificado como a causa da persistência da lactase em populações europeias. Entretanto, outras mutações já foram observadas em populações africanas e do Oriente Médio, como o $-14010 G>C$, presente inclusive na Angola, país de origem de afro-brasileiros. O objetivo desse estudo foi investigar a frequência dos polimorfismos $LCT^*-13910C>T$ e $LCT^*-14010 G>C$ nas populações menonita e euro-brasileira do sul do Brasil, bem como analisar associação entre a persistência da lactase e o hábito de ingerir leite e entre hipolactasia primária, sintomas de má-digestão da lactose e doenças gastrointestinais na população menonita. Para análise dos polimorfismos foi otimizado um método utilizando a técnica PCR-SSP e, para levantamento de dados na população menonita, foi aplicado um questionário. Incluiu-se 443 indivíduos das populações euro-brasileira e menonita, um grupo religioso que por muitas décadas viveu em colônias e com uma longa história de endogamia. Da população euro-brasileira avaliou-se 292 indivíduos, 150 (51,4%) do sexo feminino e 142 (48,6%) do sexo masculino; já da população menonita, 151 indivíduos, 78 (51,7%) do sexo feminino e 73 (48,3%) do sexo masculino. A idade entre os euro-brasileiros variou de 18 a 64, sendo que a média de idade foi de 36, enquanto que entre os menonita, de 18 a 89 anos, sendo que a média de idade foi de 43 anos. A frequência alélica de $-13910T$ foi maior na população menonita (0,63) que na euro-brasileira (0,33), sendo que houve diferença significativa entre estes dois grupos ($p < 0.000001$). O hábito de ingerir leite entre os menonitas está associado à persistência da lactase, condição apresentada por 88,1% dos indivíduos de acordo com a presença do alelo $-13910T$. Já os sintomas de má-digestão da lactose referidos pelos menonitas poderiam estar associados a outras doenças gastrointestinais que diminuem a expressão da lactase. A frequência da persistência da lactase de 55% em euro-brasileiros está de acordo com outros estudos que investigaram este fenótipo ou o polimorfismo $-13910 C>T$ nesta população. A variante $-14010 G>C$ não foi observada nestes dois grupos, porém, sugere-se que seja investigada em futuros estudos com afro-brasileiros. O polimorfismo $-13910 C>T$ é indicado como marcador para testes genéticos para hipolactasia primária na população euro-brasileira, entretanto, mais estudos são necessários para validar este teste entre outros grupos étnicos do Brasil.

Palavras-chave: Persistência da lactase, hipolactasia primária, menonitas, euro-brasileiros, hábito de ingerir leite.

ABSTRACT

Lactase, an enzyme anchored in the surface of bowel enterocytes, is responsible for the cleavage of lactose in glucose and galactose, which are absorbed by the intestine. This enzyme is essential for newborns, whose exclusive nutrition is milk. Its activity declines after weaning in most humans, who, therefore, express just a small quantity of lactase during adulthood (lactase non-persistence or adult-type hypolactasia). But, in some populations with a long history of pastoralism and milking, polymorphisms were identified as responsible for the phenotype lactase persistence, which means high lactase expression during adulthood. A polymorphism, -13910 C>T, located in an adjacent gene (*MCM6*) to the *lactase* gene (*LCT*), was identified as causative for lactase persistence in Europeans. Other mutations were further identified in other populations, for example the *LCT**-14010 G>C within African groups, including groups in Angola, country from where many African-brazilians are from. The aim of this study was to investigate the frequency of the *LCT**-13910 C>T and *LCT**-14010 G>C polymorphisms in the Mennonite and the Euro-Brazilian populations in southern Brazil; to analyze the association between lactase persistence and the habit of milk drinking and between primary hypolactasia, symptoms of lactose intolerance and gastrointestinal diseases in the Mennonite population. A PCR-SSP based method was optimized for polymorphism analysis and data were collected from the Mennonites using a questionnaire. We included 443 individuals of the Euro-brazilian and the Mennonites populations. The Mennonites are a religious group, which lived for decades in colonies and with a long history of endogamy. We evaluated 292 individuals from the Euro-Brazilian group, including 150 (51.4%) females and 142 (48.6%) males, and 151 individuals from the Mennonite population, including 78 (51.7%) females and 73 (48.3%) males. The age between Euro-brazilians ranged between 18 to 64 years and the mean age was 36, while among the Mennonites the age ranged between 18 to 89 years and the mean age was 43. The -13910T allele frequency was much higher in the Mennonite population (0,63) than among the euro-Brazilians (0,33), and the difference between these two groups was significant ($p < 0.000001$). The milk drinking habit among Mennonites is associated with lactase persistence, which was present in 88.1% of the subjects, according to the presence of the -13910T allele. The symptoms reported by Mennonites after milk ingestion could be associated with other gastrointestinal diseases which decrease the lactase expression. The frequency of lactase persistence among Euro-brazilians (55%) is consistent with other studies that have investigated this phenotype or the -13910 C>T polymorphism in this population. The -14010 G>C variant was not observed in these two groups, we suggest, however, to consider this polymorphism in future studies with African-brazilians. The -13910 C>T polymorphism is indicated as a genetic test marker for adult-type hypolactasia in Euro-brazilians. More studies are needed though to validate this test among other ethnic groups in Brazil.

Key-words: Lactase Persistence, adult-type hypolactasia, Mennonites, Euro-brazilians, milk drinking habit.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1-	ENZIMA LACTASE ANCORADA NA MEMBRANA DA SUPERFÍCIE EM ESCOVA DOS ENTERÓCITOS DO INTESTINO DELGADO.....	20
FIGURA 2-	FERMENTAÇÃO DA LACTOSE PELAS BACTÉRIAS NO CÓLON E NO ÍLEO.....	21
FIGURA 3-	MAPA COM INTERPOLAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS FENOTÍPICAS DA PERSISTÊNCIA DA LACTASE NO VELHO MUNDO, DE ACORDO COM DADOS DA LITERATURA.....	24
FIGURA 4-	REPRESENTAÇÃO DIAGRAMÁTICA DOS GENES <i>MCM6</i> E <i>LCT</i>	27
FIGURA 5-	INTRON 13 DO GENE <i>MCM6</i> , COM AS POSIÇÕES DOS SNPS E AS SEQÜÊNCIAS RECONHECIDAS POR FATORES DE TRANSCRIÇÃO.....	27
FIGURA 6-	FREQUÊNCIA FENOTÍPICA DA PERSISTÊNCIA DA LACTASE PREVISTA NO VELHO MUNDO BASEADA NA FREQUÊNCIA DO ALELO -13910 C>T.....	33
FIGURA 7-	FREQUENCIA FENOTÍPICA DA PERSISTÊNCIA DA LACTASE PREVISTA NO VELHO MUNDO BASEADA NA FREQUENCIA DOS ALELOS ASSOCIADOS A ESTE FENÓTIPO.....	34
FIGURA 8-	IMAGENS DA CORRIDA ELETROFORÉTICA EM GEL DE AGAROSE DOS PRODUTOS DE PCR-SSP DE UM INDIVÍDUO COM GENÓTIPO-13910 C/C.....	56
FIGURA 9-	IMAGENS DA CORRIDA ELETROFORÉTICA EM GEL DE AGAROSE DOS PRODUTOS DE PCR-SSP DE UM INDIVÍDUO COM GENÓTIPO-13910 C/T.....	57
FIGURA 10-	IMAGENS DA CORRIDA ELETROFORÉTICA EM GELDE AGAROSE DOS PRODUTOS DE PCR-SSP DE UM INDIVÍDUO COM GENÓTIPO -13910 T/T.....	57

FIGURA 11-	IMAGENS DA CORRIDA ELETROFORÉTICA EM GEL DE AGAROSE DOS PRODUTOS DE PCR-SSP COM INICIADOR DIRETO -14010Cf DE UM INDIVÍDUO COM GENÓTIPO -13910 T/T.....	58
FIGURA 12-	HÁBITO DE INGERIR LEITE NA POPULAÇÃO MENONITA DA COLÔNIA WITMARSUM.....	62
FIGURA 13-	SINTOMAS REFERIDOS PELOS INDIVÍDUOS APÓS INGERIR LEITE.....	64
FIGURA 14-	DISTRIBUIÇÃO DE DOENÇAS GASTROINTESTINAIS/ANEMIA APRESENTADAS PELOS INDIVÍDUOS DA POPULAÇÃO MENONITA.....	65
FIGURA 15-	INFORMAÇÕES SOBRE O HÁBITO DE INGERIR LEITE DOS INDIVÍDUOS COM HIPOLACTASIA PRIMÁRIA DA POPULAÇÃO MENONITA.....	66
FIGURA 16-	CARACTERÍSTICAS DOS INDIVÍDUOS COM HIPOLACTASIA PRIMÁRIA DA POPULAÇÃO MENONITA.....	66
FIGURA 17-	DISTRIBUIÇÃO DA PERSISTÊNCIA DA LACTASE E HIPOLACTASIA PRIMÁRIA ASSOCIADOS A -13910 C>T ENTRE DIFERENTES GRUPOS DO BRASIL.....	70

LISTA DE TABELAS

TABELA 1-	CARACTERIZAÇÃO DOS SNPS ASSOCIADOS À PERSISTÊNCIA DA LACTASE.....	29
TABELA 2-	FREQUÊNCIA DO ALELO -14010C EM ALGUMAS POPULAÇÕES AFRICANAS.....	34
TABELA 3-	FREQUÊNCIA DO ALELO -13910T EM ALGUMAS POPULAÇÕES.....	35
TABELA 4-	DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS E DA HIPOLACTASIA/PERSISTÊNCIA DA LACTASE ENTRE DIFERENTES GRUPOS ÉTNICOS DO BRASIL.....	38
TABELA 5-	TÉCNICAS UTILIZADAS PARA ANÁLISE DE POLIMORFISMOS NO GENE <i>MCM6</i> ASSOCIADOS À PERSISTÊNCIA DA LACTASE.....	41
TABELA 6-	ESPECIFICIDADE E/OU SENSIBILIDADE DO POLIMORFISMO -13910 C>T COMO MARCADOR PARA TESTE GENÉTICO EM DIFERENTES POPULAÇÕES.....	42
TABELA 7-	SEQUÊNCIAS DOS INICIADORES PROJETADOS PARA AMPLIFICAÇÃO DOS SNPS NO INTRON 13 DO GENE <i>MCM6</i>	53
TABELA 8-	CONCENTRAÇÃO DOS REAGENTES PARA A REAÇÃO DE PCR-SSP COM OS INICIADORES -13910 C/T E -14010 G/C.....	54
TABELA 9-	FREQUÊNCIA DOS GENÓTIPOS MARCADORES DE HIPOLACTASIA PRIMÁRIA (-13910 C/C) E DA PERSISTÊNCIA DA LACTASE (-13910 C/T E -13910 T/T) NAS POPULAÇÕES MENONITA E EURO-BRASILEIRA.....	59
TABELA 10-	FREQUÊNCIA DOS ALELOS C E T NO LOCUS -13910 NAS POPULAÇÕES MENONITA E EURO-BRASILEIRA.....	59
TABELA 11-	TESTE EXATO PARA EQUILÍBRIO DE	

	HARDY-WEINBERG.....	60
TABELA 12-	TESTE EXATO DE DIFERENCIAÇÃO POPULACIONAL.....	61
TABELA 13-	SINTOMAS REFERIDOS PELOS PARTICIPANTES DA POPULAÇÃO MENONITA APÓS INGERIR LEITE.....	63

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	18
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1 INTRODUÇÃO À PERSISTÊNCIA DA LACTASE.....	19
3.2 INTOLERÂNCIA À LACTOSE.....	21
3.3 DISTRIBUIÇÃO MUNDIAL DA PERSISTÊNCIA DA LACTASE.....	23
3.4 BASES MOLECULARES DA PERSISTÊNCIA DA LACTASE.....	25
3.5 ORIGEM HISTÓRICA E EVOLUÇÃO DA PERSISTÊNCIA DA LACTASE.....	30
3.6 DISTRIBUIÇÃO MUNDIAL DOS POLIMORFISMOS ASSOCIADOS À PERSISTÊNCIA DA LACTASE.....	32
3.7 PERSISTÊNCIA DA LACTASE NO BRASIL.....	36
3.8 TESTE GENÉTICO PARA HIPOLACTASIA PRIMÁRIA.....	39
3.9 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO EURO-BRASILEIRA.....	43
3.10 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO MENONITA.....	45
4 MATERIAIS E MÉTODOS	49
4.1 DESCRIÇÃO DA PESQUISA.....	49
4.2 APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA.....	49
4.3 CASUÍSTICA.....	49
4.4 MÉTODOS.....	51
4.4.1 Coleta de Material.....	51
4.4.2 Extração de DNA.....	51
4.4.3 Técnica de PCR-SSP.....	52
4.4.4 Análise Estatística.....	55
5 RESULTADOS	56
5.1 OTIMIZAÇÃO DO TESTE GENÉTICO PARA HIPOLACTASIA PRIMÁRIA.....	56

5.2 FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DE <i>LCT</i> *-13910C E <i>T</i> E DOS GENÓTIPOS MARCADORES PARA PERSISTÊNCIA DA LACTASE E HIPOLACTASIA PRIMÁRIA NAS POPULAÇÕES MENONITA E EURO- BRASILEIRA.....	58
5.3 FREQUÊNCIA DA VARIAÇÃO ALÉLICA <i>LCT</i> *-14010C NAS POPULAÇÕES MENONITA E EURO-BRASILEIRA.....	60
5.4 ASSOCIAÇÃO ENTRE A PERSISTÊNCIA DA LACTASE E O HÁBITO DE INGERIR LEITE NA POPULAÇÃO MENONITA.....	62
5.5 ASSOCIAÇÃO ENTRE A HIPOLACTASIA PRIMÁRIA E SINTOMAS DE MÁ-DIGESTÃO DA LACTOSE NA POPULAÇÃO MENONITA.....	63
5.6 ASSOCIAÇÃO ENTRE DOENÇAS ASSOCIADAS À HIPOLACTASIA SECUNDÁRIA E SINTOMAS DE MÁ-DIGESTÃO DA LACTOSE NA POPULAÇÃO MENONITA.....	65
5.7 PERFILSINTOMÁTICO DOS INDIVÍDUOS COM HIPOLACTASIA PRIMÁRIA DA POPULAÇÃO MENONITA.....	65
6 DISCUSSÃO	67
6.1 PCR-SSP PARA ANÁLISE GENÉTICA DA PERSISTÊNCIA DA LACTASE.....	67
6.2 FREQUÊNCIA DO ALELO -13910T NAS POPULAÇÕES MENONITA E NOS EURO-BRASILEIRA.....	68
6.3 A VARIANTE AFRICANA -14010C NÃO FOI ENCONTRADA ENTRE OS MENONITAS E OUTROS EURO-BRASILEIROS.....	71
6.4 NA POPULAÇÃO MENONITA A PERSISTÊNCIA DA LACTASE ESTÁ ASSOCIADA AO HÁBITO DE CONSUMIR LEITE.....	74
6.5 HIPOLACTASIA PRIMÁRIA E MÁ-DIGESTÃO DO LEITE NA POPULAÇÃO MENONITA.....	75
6.6 TESTE GENÉTICO COMO FERRAMENTA PARA DIAGNÓSTICO DE HIPOLACTASIA PRIMÁRIA.....	77
7 CONCLUSÃO	79
REFERÊNCIAS	80
APÊNDICES	98

1 INTRODUÇÃO

Um componente importante na dieta de muitas pessoas é o leite. Este alimento rico em cálcio, vitaminas e proteínas, pode ser consumido na forma de bebida, fermentados, derivados ou utilizado no preparo de outros alimentos. Na infância, ele é indispensável para o bom desenvolvimento e crescimento e, mesmo na vida adulta, tem sido visto como benéfico.

Entretanto, sabe-se hoje que nem todos os indivíduos digerem bem o leite. Isto já foi observado pelos romanos há muitos anos (INGRAM *et al.*, 2009a). Uma das razões pode ser a má-digestão da lactose, um importante carboidrato do leite, que, quando não clivada e absorvida pelo intestino, passa para o colo, onde é fermentada por bactérias e resulta na formação de gases, entrada de líquido por osmose e, conseqüentemente, no surgimento de diversos sintomas, tais como diarreia, flatulência, distensão e dor abdominal, entre outros (revisão de MATTAR e MAZO, 2010).

Apesar do hábito de tomar leite na vida adulta já ser antigo em algumas populações, acredita-se que não fazia parte da dieta dos indivíduos no início da humanidade e, sim, que esta prática foi adotada há 5.000-10.000 anos por populações no Norte da Europa (TROELSEN, 2005) e por algumas populações da África e do Oriente Médio (TISHKOFF *et al.*, 2007).

A lactose é utilizada como fonte de energia pelo organismo após a hidrólise, que ocorre na porção inicial do intestino delgado. A lactase é a enzima que cliva a lactose em componentes menores e absorvíveis pelo intestino, a glicose e galactose, e encontra-se ancorada nas bordas em escova dos enterócitos no intestino delgado, sendo que a maior concentração é no jejuno-médio (SWALLOW, 2003).

Em recém-nascidos, que se alimentam exclusivamente do leite, esta enzima é expressa em níveis elevados no intestino. Entretanto, sabe-se atualmente, que a sua atividade diminui após o desmame ou infância em aproximadamente 65% da população mundial (ITAN *et al.*, 2010) e, portanto, muitos indivíduos apresentam baixa atividade da lactase na vida adulta, condição chamada de hipolactasia primária ou lactase não-persistente.

Até meio século atrás, europeus ainda acreditavam que a expressão de níveis elevados da lactase em adultos era uma condição normal (AURICCHIO *et al.* 1963; DAHLQVIST *et al.* 1963). Entretanto, nos anos subsequentes observou-se que esta condição é comum apenas em algumas populações. Variações genéticas na região intensificadora do gene *lactase* (*LCT*) levam a um aumento na transcrição desse gene, resultando na expressão elevada da lactase mesmo na vida adulta, caracterizando o fenótipo persistência da lactase.

Nos últimos 40 anos, estudos vêm sendo realizados para esclarecer este fenômeno. Foi observado que a persistência da lactase ocorre principalmente em algumas populações com longa história de pastoralismo e ordenha (SIMOONS, 1969, 1970; MCCRACKEN, 1971; HOLDEN e MACE, 1997; INGRAM *et al.*, 2009a), sendo comum no Norte da Europa e em algumas populações africanas e do Oriente Médio. Um grupo finlandês identificou pela primeira vez um polimorfismo, o -13910C>T, no gene *MCM6*, adjacente ao *LCT*, completamente associado ao fenótipo persistência da lactase em finlandeses (ENATTAH *et al.*, 2002). Este SNP (single nucleotide polymorphism), inserido num haplótipo comum na Europa, foi observado numa região intensificadora do gene *LCT* e aumenta a ligação de proteínas nucleares de transcrição (OLDS e SIBLEY, 2003; LEWINSKY *et al.*, 2005).

A partir desse estudo, várias populações fora da Europa foram genotipadas para este alelo. Em algumas delas, como os indianos, camaroneses e grupos da Ásia Central, foi possível encontrar uma associação entre este polimorfismo e a persistência da lactase (KUCHAY *et al.*, 2011; HEYER *et al.*, 2011; MULCARE *et al.*, 2004). Já em outras, como grupos da África subsaariana, essa associação não foi demonstrada, sugerindo-se a existência de outros polimorfismos responsáveis por esta condição (MULCARE *et al.*, 2004). Os dados são ainda insuficientes para explicar a frequência desse fenótipo no Leste e Oeste da África e diversas outras regiões do “Velho Mundo” (ITAN *et al.*, 2010).

O Brasil é um ótimo candidato para estudos de polimorfismos associados à persistência da lactase e para estudar a correlação entre os genótipos e fenótipos. Devido a sua multiétnica e diversidade cultural, é formado por grupos de características únicas. A ancestralidade de brasileiros aponta para um alto nível de miscigenação, que pode ser explicado pela história do país (PENA *et al.*, 2011).

Inicialmente habitado por grupos indígenas, também chamados de ameríndios, o Brasil foi invadido pelos portugueses, principalmente homens, no

século XVI. A partir da metade do século XVI, com o início do tráfico de escravos da África, diversos grupos de diferentes tribos africanas foram trazidos ao país. Neste período também houve a invasão de outros grupos europeus, como os holandeses. Após o fim da escravatura, em 1850, houve um incentivo por parte do governo para a imigração de europeus, como substituição de mão-de-obra, principalmente no Sul do país (SEYFERTH, 1985; 1986; SANTOS, 2002).

Pena *et al.* (2011) observaram que existe um componente africano de 18% em euro-brasileiros no Sul do Brasil, enquanto que no Norte este componente na população euro-brasileira é muito superior (54%). A ancestralidade indígena, em contraste, é menor. A partir desses dados, pode-se entender a heterogeneidade genética que existe no Brasil e a importância de estudos genéticos para caracterizar melhor esta população.

Apesar de existirem poucos estudos sobre a distribuição do polimorfismo -13910 C>T na população brasileira, foi observada uma diferença na frequência desse polimorfismo em diferentes grupos étnicos do país, sendo que é mais prevalente em brancos e pardos e ausente em japoneses (MATTAR *et al.*, 2008; FRIEDRICH *et al.*, 2012b). No Paraná, ainda não foi realizada nenhuma investigação dessa variante. Os estudos realizados até o momento concentram-se basicamente nos estados de São Paulo, Rio Grande do Sul, Recife e Belém (BULHÕES *et al.*, 2007; BERNARDES-SILVA *et al.*, 2007; MATTAR *et al.*, 2008; FRIEDRICH *et al.*, 2012b).

O polimorfismo -14010 G>C, também associado ao fenótipo persistência da lactase em populações africanas (TISHKOFF *et al.*, 2007), ainda não foi investigado até o momento no Brasil. Esta variante foi encontrada em dois grupos de língua banta na Angola, com frequência de 6% na tribo Kuvale (COELHO *et al.*, 2009). Considerando que no Brasil vários grupos negros são descendentes de grupos da língua banta (HÜNEMEIER *et al.*, 2007) e que o componente africano é de 18% em euro-brasileiros do sul do Brasil, este polimorfismo torna-se um importante marcador candidato para investigar a persistência da lactase na nossa população.

Outro grupo singular, onde estudos genéticos são de interesse, é a população menonita, que imigrou no início do século XX para o Brasil. Por ser um grupo que viveu durante muitas décadas isolado, com uma longa história de endogamia, torna-se favorável para estudos genéticos e de população (JAWORSKI *et al.*, 1988).

Os menonitas fazem parte de um grupo étnico e religioso que surgiu no século XVI, durante a Reforma Anabatista, na Holanda e Norte da Alemanha. No final do século XVIII, devido à perseguição e em busca de terras onde poderiam praticar livremente a sua fé e princípios religiosos, imigraram para a Rússia. Na Rússia, foram impostas condições a eles, como não pregar sua fé e nem se casar com russos. Após a revolução e imposição de serviço militar nesse país, partiram no início do século XX para as Américas do Norte, Central e do Sul. A principal atividade econômica desse grupo na Europa e na Rússia foi a agropecuária, que continua sendo praticada por alguns grupos no Brasil, como é o caso dos menonitas que residem na Colônia Witmarsum, no estado do Paraná.

Desde o século XVII houve pouca adição ao “pool” genético dos menonitas, o que os tornou um grupo geneticamente homogêneo (JAWORSKI *et al.*, 1988). Estudos com grupos como este, possibilitam uma melhor compreensão do processo chamado de deriva genética ou, mais especificamente, do efeito fundador. Este fenômeno ocorre com grupos que passam por um gargalo de garrafa, isto é, pelo processo em que poucos indivíduos sobrevivem a alguma tragédia ou se isolam devido a situações conferidas a eles, e voltam a crescer em condições favoráveis, casando-se entre si (RIDLEY, 2006). Dessa forma adquirem características genéticas diferentes a de seus ancestrais e outros grupos.

Devido à história dos menonitas ter favorecido a ação da deriva genética, esta população apresenta diferenças importantes na distribuição de frequências alélicas, quando comparada a outros grupos de ascendência europeia (BOLDT *et al.*, 2009). O fato de que os mesmos tem uma longa tradição pastoril também nos levou a sugerir que a persistência da lactase seja mais frequente nesta população que nos euro-brasileiros, em geral.

Para investigar esta hipótese, analisamos a distribuição dos polimorfismos $LCT^*-13910 C>T$, comum em europeus, e $LCT^*-14010 G>C$, encontrado em africanos de origem banta, nas populações menonita e euro-brasileira do Sul do Brasil.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a frequência dos polimorfismos *LCT**-13910 C>T e *LCT**-14010 G>C, associados à persistência da lactase, nas populações menonita e euro-brasileira do Sul do Brasil.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Otimizar o teste genético de triagem para hipolactasia primária;
2. Comparar as frequências dos polimorfismos e alelos comuns dos locos *LCT**-13910 e *LCT**-14010 entre as populações menonita e euro-brasileira;
3. Estimar as frequências dos fenótipos persistência da lactase e hipolactasia primária nestas duas populações;
4. Analisar associação entre o hábito de ingerir leite e a persistência da lactase na população menonita;
5. Analisar associação entre hipolactasia primária e sintomas de má-digestão da lactose na população menonita;
6. Analisar associação entre doenças associadas à hipolactasia secundária e sintomas de má-digestão da lactose na população menonita.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 INTRODUÇÃO À PERSISTÊNCIA DA LACTASE

O leite é a fonte exclusiva de nutrição dos mamíferos recém-nascidos até o momento do desmame que, nos seres humanos, ocorre nos primeiros anos de vida. Nesta fase da vida, a enzima lactase (uma β -galactosidase também chamada de lactase-phlorizin hidrolase) é fundamental para clivar a lactose, o principal carboidrato do leite, em componentes menores, a glicose e galactose, que, então, são absorvidos pelo intestino e utilizados como importante fonte de energia para o organismo. Dessa forma, a atividade da lactase é alta e vital durante a infância na maioria dos mamíferos, incluindo os humanos (SWALLOW, 2003).

A lactase é uma grande glicoproteína, ancorada com a sua extremidade C-terminal na membrana da superfície em escova dos enterócitos no intestino delgado e com uma parte voltada para o lúmen do intestino (FIGURA 1). É expressa no intestino delgado, sendo que os níveis são mais elevados no jejuno-médio (SWALLOW, 2003). Possui dois lados ativos, que podem catalisar a hidrólise de uma variedade de glucosídeos, incluindo a florizina e glucosídeos flavonoides (NÉMETH *et al.*, 2003), além da lactose. O gene que codifica a lactase é o *LCT* (ou gene *lactase*) e está localizado no cromossomo 2q21 (HARVEY *et al.*, 1993). É de aproximadamente 50 kb e contém 17 exons (BOLL, WAGNER e MANTEI, 1991).

A atividade e expressão da lactase diminuem após o desmame na maioria dos humanos. A idade em que ocorre o declínio dessa enzima pode variar de acordo com a população (SIMOONS, 1980; THOMAS *et al.*, 1990; WANG *et al.*, 1998; WITTENBERG e MOOSA, 1990). Na Finlândia observaram que o declínio é completo na adolescência (RASINPERA *et al.*, 2004), enquanto que na Índia já aos 8 anos (KUCHAY *et al.*, 2011). O declínio da atividade e expressão da lactase é geneticamente programado e resulta em baixos níveis dessa enzima na idade adulta, sendo chamado de hipolactasia primária do tipo adulto, ou lactase não persistente. Devido à baixa expressão da lactase no intestino delgado, indivíduos apresentam uma capacidade diminuída de hidrolisar o leite e a lactose não é bem

absorvida pelo intestino, levando a má-digestão ou má-absorção da lactose (FIGURA 2).

A hipolactasia pode ocorrer também devido a doenças que diminuem a expressão da lactase, como enterites infecciosas, doença inflamatória intestinal (especialmente doença de Crohn), enterites induzidas por drogas ou radiação (MATTAR e MAZO, 2010), giardíase (RANA *et al.*, 2005), doença celíaca (OJETTI *et al.*, 2005), doença diverticular do cólon (TURSI *et al.*, 2006) e anemia (WEST e OATES, 2005). Quando não é geneticamente programada, é chamada de hipolactasia secundária.

A persistência da lactase, ao contrário da hipolactasia primária, caracteriza-se por altos níveis de lactase no intestino delgado na vida adulta. É o fenótipo mais frequente em populações onde leite fresco é um elemento importante na dieta dos adultos, como no Norte da Europa e algumas tribos nômades pastoris da África e do Oriente Médio (SWALLOW, 2003). Este fenótipo pode ser determinado diretamente pela análise da lactase em biopsias do intestino delgado ou indiretamente pelo teste de tolerância à lactose.

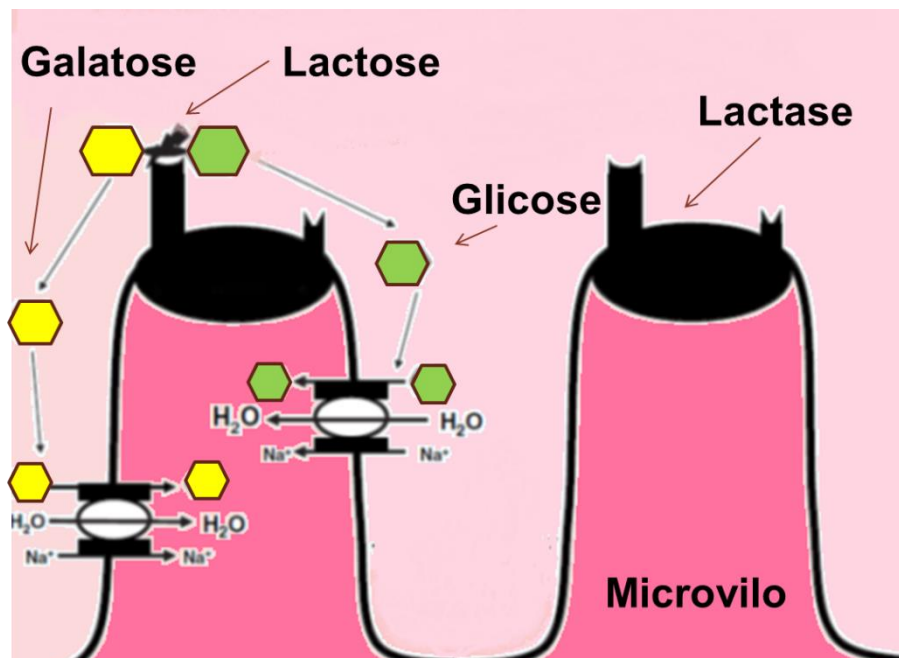


FIGURA 1 – ENZIMA LACTASE ANCORADA NA MEMBRANA DA SUPERFÍCIE EM ESCOVA DOS ENTERÓCITOS DO INTESTINO DELGADO.

(Em indivíduos lactase persistentes, a enzima lactase-phlorizin hidrolase hidrolisa eficientemente a lactose em galactose (Gal) e glicose (Glu), que são rapidamente absorvidos para dentro da circulação sanguínea levando água do lúmen consigo. A hidrólise ocorre tipicamente no jejuno, onde tem baixa concentração de bactérias e pouca lactose é fermentada).

FONTE: LOMER *et al.*, (2008).

3.2 INTOLERÂNCIA À LACTOSE

Quando a lactose não é absorvida pelo intestino delgado, passa para o cólon (FIGURA 2). No cólon é convertida pelas bactérias da microbiota em ácidos graxos, gás carbônico e gás hidrogênio, produzindo acetato, butirato e propionato. Os ácidos graxos são absorvidos pela mucosa colônica e os gases, expirados pelo pulmão (MATTAR e MAZO, 2010). A fermentação da lactose aumenta o trânsito intestinal e a pressão intracolônica, podendo ocasionar dor e distensão abdominal (HE *et al.*, 2006). A acidificação do conteúdo colônico e aumento da carga osmótica no íleo e cólon causa grande secreção de eletrólitos e fluidos, resultando em fezes amolecidas e diarreia (CHRISTOPHER e BAYLESS, 1971; revisão de LOMER *et al.*, 2008; revisão de MATTAR e MAZO, 2010).

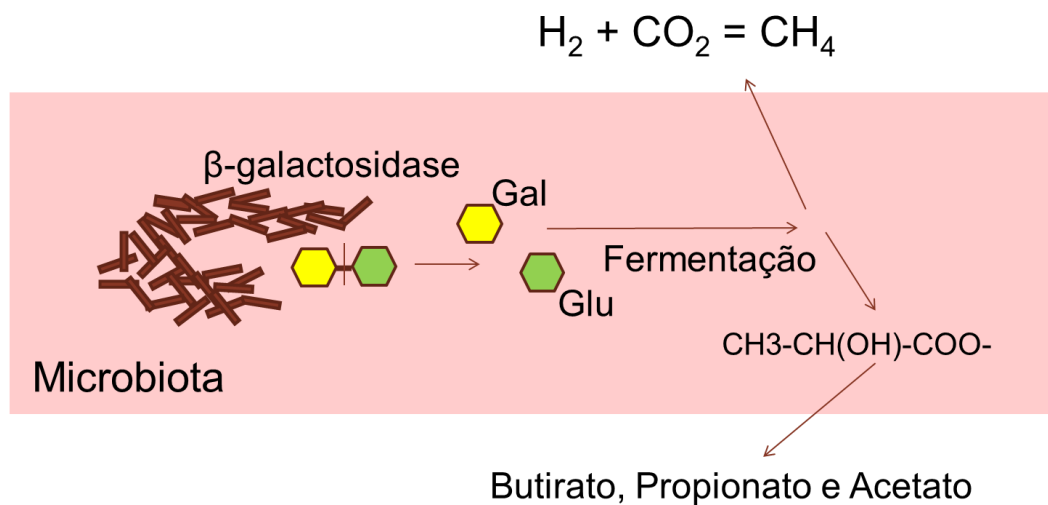


FIGURA 2 - FERMENTAÇÃO DA LACTOSE PELAS BACTÉRIAS NO CÓLON E NO ÍLEO.

(Em indivíduos com hipolactasia primária, a lactose não absorvida passa pelo cólon e tem alta capacidade osmótica para aumentar a concentração de água e eletrólitos no lúmen. A lactose é hidrolisada em galactose (Gal) e glicose (Glu) pela β-galactosidase bacteriana presente em bactérias ácido lácticas. Estes monossacarídeos estão, então, disponíveis para fermentação bacteriana pela microbiota do íleo e cólon, resultando em ácidos graxos e nos subprodutos hidrogênio e dióxido de carbono).

FONTE: LOMER *et al.*, (2008).

Devido à hipolactasia primária ou secundária, indivíduos podem desenvolver a intolerância à lactose. Esta doença se caracteriza pelo surgimento de sintomas abdominais (causados pela má-absorção da lactose), como dor abdominal,

distensão, flatulência, diarreia, borboríngos e, particularmente nos jovens, vômitos. Apesar da diarreia crônica, estes indivíduos geralmente não perdem peso. Podem apresentar constipação, devido à motilidade gastrointestinal diminuída (revisão de LOMER *et al.*, 2008; revisão de MATTAR e MAZO, 2010).

Alguns autores sugerem que sintomas sistêmicos também podem ocorrer, como dores de cabeça e vertigens, perda de concentração, dificuldade de memória em curto prazo, dores musculares e articulares, cansaço intenso, alergias diversas, arritmia cardíaca, úlceras orais, dor de garganta e aumento da frequência de micção (TREUDLER *et al.*, 2002; MATTHEWS e CAMPBELL, 2000a, 2000b; MATTHEWS *et al.*, 2005).

Geralmente a intolerância à lactose se manifesta após a infância, à medida que ocorre a diminuição da atividade da lactase. Entretanto, uma doença rara é a intolerância à lactose congênita. Esta é uma condição extremamente grave, que ocorre quando a enzima lactase está ausente ou é truncada. É uma doença hereditária, autossômica recessiva, associada a mutações no gene *LCT*. Quando descoberta precocemente é tratada com uma dieta restritiva de lactose (revisão de MATTAR e MAZO, 2010).

Um método de diagnóstico muito usado para intolerância à lactose é o teste para tolerância à lactose, que pode ser realizado de três formas: curva glicêmica, teste respiratório do hidrogênio expirado (FLATZ, KÜNAUH e NAFTALI, 1984) ou concentração urinária de galactose. Normalmente é feito da seguinte forma: ingere-se uma quantidade de lactose (50 g) após uma noite em jejum e, então, a glicose do sangue (WEIJERS *et al.*, 1961) ou o hidrogênio expirado (FERNADES *et al.* 1978; ROBB e DAVIDSON, 1981) são avaliados. A linha de base é obtida a partir da avaliação da concentração de glicose no sangue e/ou do hidrogênio expirado antes da ingestão da lactose e, então, é avaliada em intervalos após a ingestão. A digestão da lactose é determinada pelo aumento da glicose sanguínea, devido à absorção da glicose pelos vasos após a hidrólise da lactose, ou quando não há aumento significativo do hidrogênio expirado. Já a má-digestão da lactose pode ser determinada quando não há um aumento da glicose sanguínea, porém, do hidrogênio respiratório, que ocorre devido à fermentação da lactose pelas bactérias da flora intestinal.

Estes métodos informam mais a respeito da habilidade de digerir a lactose e não da expressão da lactase *per se* e precisam ser usados pontos de corte, de

forma arbitrária, para distinguir os dois fenótipos. Por isso, podem ocorrer falsos negativos ou falsos positivos (INGRAM *et al.*, 2009a). Outro método que pode ser usado para distinguir má-absorvedores de absorvedores é a análise da atividade da lactase em biópsias coletadas da segunda porção do duodeno. Apesar de ser um método confiável, é invasivo e não prático para estudos populacionais (MULCARE, 2006; INGRAM *et al.*, 2009a). Um método que está sendo incorporado por alguns laboratórios e que será abordado mais adiante é o teste genético baseado na análise do marcador *LCT*⁻¹³⁹¹⁰ C>T*.

O tratamento da intolerância à lactose pode ser feito com dieta restritiva de lactose. Estudos mostram que a dose máxima tolerável de lactose sem outros nutrientes por indivíduos intolerantes é 12 g (sem ou poucos sintomas), ou 15 a 18g com outros nutrientes; acima de 18 g, sintomas de intolerância aparecem (SHAUKAT *et al.* 2010).

Outra forma eficaz de tratar esta doença é com suplemento de lactase (terapia de reposição com lactase exógena - + β -galactosidase). Além disso, é aconselhável o consumo de leite com baixo teor de lactose (pré-incubado com lactose já hidrolisada). Outros meios já estudados, porém pouco eficazes, é a ingestão de pró-bióticos ou tratamento com antibiótico (Rifaximin), que apresenta evidências ainda insuficientes (SHAUKAT *et al.* 2010).

3.3 DISTRIBUIÇÃO MUNDIAL DA PERSISTÊNCIA DA LACTASE

Diversos estudos populacionais relataram diferenças entre grupos em relação à digestão da lactose. A distribuição da persistência da lactase nos continentes europeu, africano e asiático é altamente variável (FIGURA 3) e os dados genéticos são insuficientes para entendê-la (ITAN *et al.*, 2010). A maior frequência desse fenótipo é observada no Noroeste da Europa, especialmente na Suécia e Dinamarca, com declínio que vai aumentando para o sul e leste da Europa (SWALLOW, 2003; INGRAM *et al.*, 2009a). Na Índia, a distribuição desse fenótipo é semelhante, sendo que a sua frequência é mais elevada no Noroeste que no restante do país, e, geralmente, mais baixa ao Leste (SWALLOW e HOLLOX, 2000; INGRAM *et al.*, 2009a).

Já na África, a persistência da lactase não varia necessariamente de acordo com a região, pois é elevada em algumas tribos pastoris nômades e baixa em grupos vizinhos sem tradição pastoril (BAYOUMI *et al.*, 1981, 1982). Entre o grupo Tuaregue, um grupo pastoril nômade tradicional que vive na região central do Saara, 87,2% dos indivíduos foram digestores e 12,7% má-digestores da lactose, num total de 118 sujeitos (FLATZ *et al.*, 1986). De forma semelhante num estudo com 43 grupos étnicos da Tanzânia, do Quênia e Sudão, que falam línguas pertencentes às quatro maiores famílias de línguas da África (Afro-asiáticos, Nilo-saariana, Níger-kordofania e Khoisana), a frequência mais elevada da persistência da lactase foi encontrada na população pastoril afro-asiática Beja do Sudão (88%) e a mais baixa no grupo caçador-coletor Sandawe de língua khoisana da Tanzânia (26%) (TISHKOFF *et al.*, 2007). Assim como na África, a distribuição da persistência da lactase também varia entre grupos pastoris e não pastoris no Oriente Médio, sendo que é elevada entre os beduínos e baixa entre as populações vizinhas (COOK e AL-TORKI, 1975; DISSANYAKE *et al.* 1990; SNOOK *et al.* 1976).

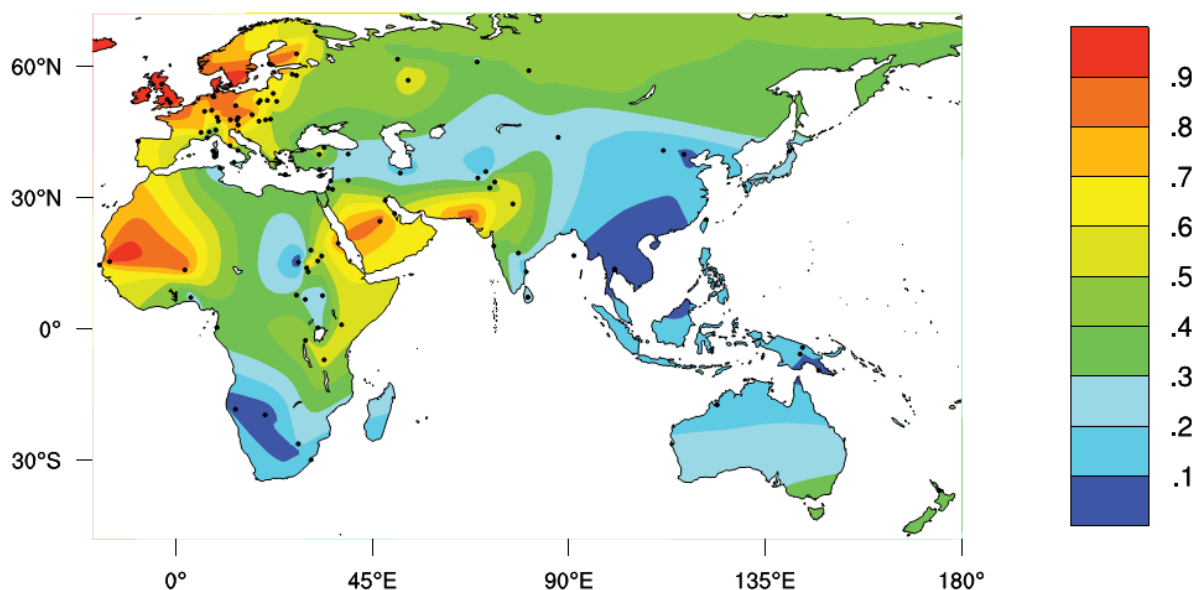


FIGURA 3 – MAPA COM INTERPOLAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS FENOTÍPICAS DA PERSISTÊNCIA DA LACTASE NO VELHO MUNDO, DE ACORDO COM DADOS DA LITERATURA. (Os pontos representam os locais de coleta. As cores e os números mostram as frequências do fenótipo persistência da lactase, estimados por interpolação de superfície).
 FONTE: ITAN *et al.*, 2010.

Heyer *et al.* (2011), utilizando o teste de tolerância à lactose, perceberam pouca diferença na frequência do fenótipo persistência da lactase entre populações de tradição nômade pastoril e agricultores da Ásia Central. Este traço atinge uma frequência entre 25% a 32% na população Kasakh de tradição pastoril, consistente com um estudo realizado por Wang *et al.* (1984), que encontrou 23,6% de indivíduos com persistência da lactase entre os Kasakh do Noroeste da China e 12,1% entre os mongóis no interior da Mongólia, baseado no teste respiratório.

A hipolactasia primária, por outro lado, é predominante em populações nativas da Austrália, Américas e do Pacífico, Leste e Sudeste da Ásia e na África tropical e, até mesmo em alguns grupos que tem o leite como parte da sua dieta, como os Mongóis, os Hereros, Nuer e os Dinka (revisado por SWALLOW e HOLLOX, 2000; SWALLOW, 2003).

3.4 BASES MOLECULARES DA PERSISTÊNCIA DA LACTASE

Em 1973, Sahi *et al.* relataram fortes evidências de que a má-absorção da lactose é controlada por um gene autossomo recessivo. Os autores observaram em algumas famílias que pais poderiam apresentar uma absorção normal da lactose e ter, pelo menos, um filho com má-absorção. Anos mais tarde, através de um estudo enzimático com autópsias do intestino de britânicos adultos, foi possível distinguir heterozigotos de homozigotos em relação à expressão da enzima lactase e sugeriu-se três genótipos: homozigotos para a persistência da lactase (PP) com atividade mais alta da lactase, heterozigotos (Pp) com nível intermediário de lactase e homozigotos para lactase não-persistente (pp) com baixa atividade da lactase (HO *et al.*, 1982; FLATZ, 1984). A atividade intermediária da lactase em heterozigotos indica que apenas uma cópia do gene da lactase está sendo totalmente expressa (INGRAM *et al.*, 2009a).

Logo, a persistência da lactase é um traço genético hereditário semi-dominante. Ho *et al.* (1982) sugeriu que este fenótipo seria controlado por um elemento polimórfico atuando em *cis* no gene *LCT*, o que foi confirmado posteriormente em outros estudos (WANG *et al.*, 1995, 1998; OLDS e SIBLEY, 2003).

Através do sequenciamento do gene *LCT* e de sua região promotora, diversos polimorfismos foram descritos. Entretanto, nenhum mostrou associação completa com a persistência da lactase em europeus (BOLL *et al.*, 1991; LLOYD *et al.*, 1992). Ainda assim, acreditava-se que um polimorfismo nesta região bem conservada afetava a ligação de proteínas ao DNA (HOLLOX *et al.*, 1999). A análise de polimorfismos no gene *LCT* e estudos de associação revelaram quatro haplótipos, designados de A, B, C e U, comuns na maioria das populações testadas (HARVEY *et al.*, 1998; HOLLOX *et al.*, 1999, 2001; POULTER *et al.*, 2003). Entre europeus, apenas estes quatro haplótipos foram observados, já em populações africanas e ameríndias do Brasil, há uma diversidade haplotípica muito maior (HOLLOX *et al.*, 2001; FRIEDRICH *et al.*, 2012a).

O haplótipo designado de 'A', associado à persistência da lactase (HARVEY *et al.*, 1998), tem uma frequência muito mais elevada no Norte da Europa comparado a outras regiões. Foi sugerido que isto poderia ser resultado da ação combinada da deriva genética e uma forte seleção positiva para a persistência da lactase em norte-europeus após a introdução do pastoralismo há aproximadamente 9000 anos nesta região (HOLLOX *et al.*, 2001).

Foi apenas em 2002, que Enattah *et al.* identificaram a primeira variante com associação completa ao fenótipo persistência da lactase, a *LCT**-13910 C>T, em finlandeses. Este polimorfismo está localizado 13.9 kb acima do sítio de início de transcrição do gene *LCT*, no intron 13 de um gene adjacente, o *MCM6* (FIGURAS 4 e 5). No mesmo estudo identificaram também outra variante associada a este fenótipo, embora não completamente, a *LCT**-22018 G>A.

Olds e Sibley (2003) observaram, *in vitro*, que a variante -13910T resulta em uma ativação aumentada do promotor, comparada à variante -13910C, o que é consistente com o mecanismo funcional da persistência da lactase. Percebeu-se uma interação diferenciada da região ao redor de -13910 C>T com proteínas nucleares. Ainda Lewinsky *et al.* (2005) relataram que um fator nuclear, o Oct-1, reconhece a variante -13910T mais fortemente do que a variante -13910C, estimulando a atividade do promotor da lactase *in vitro* (FIGURA 5). Já a variante -22018 G>A resultou em um aumento mínimo da expressão do gene *LCT* e, portanto, acredita-se que esta não é a causadora da persistência da lactase (OLDS e SIBLEY, 2003).

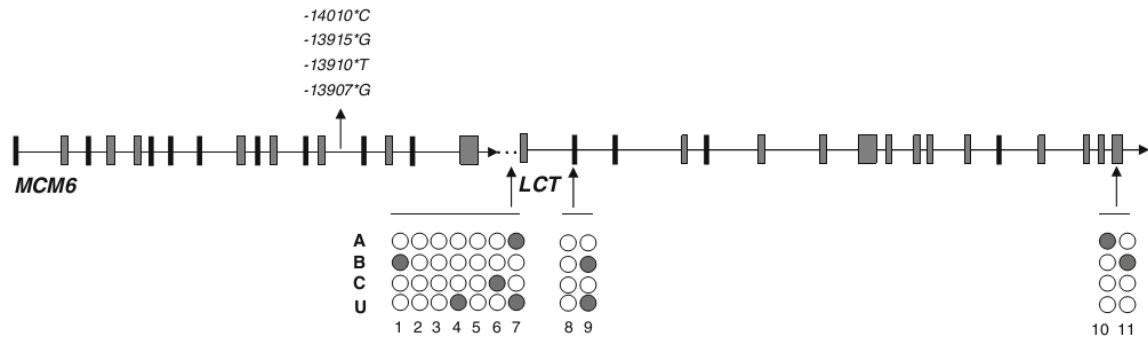


FIGURA 4 – REPRESENTAÇÃO DIAGRAMÁTICA DOS GENES *MCM6* E *LCT*.

(Localização dos SNPs associados à persistência da lactase no intron 13 do gene *MCM6* (flecha). Localização dos SNPs no gene *LCT* e os 4 principais haplótipos descritos por Hollox *et al.* (2001). Os exons dos genes *MCM6* e *LCT* estão representados por retângulos. Os círculos abertos indicam alelos ancestrais e os preenchidos, alelos derivados).

FONTE: INGRAM *et al.*, 2009a

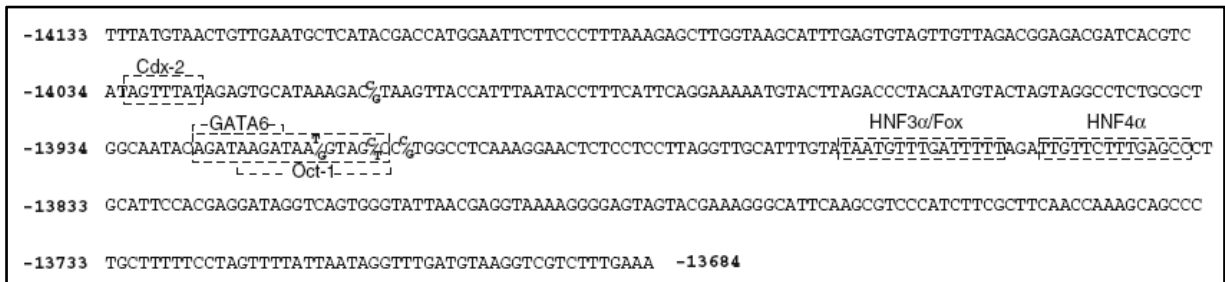


FIGURA 5 - INTRON 13 DO GENE *MCM6*, COM AS POSIÇÕES DOS SNPs E AS SEQÜÊNCIAS RECONHECIDAS POR FATORES DE TRANSCRIÇÃO (retângulos tracejados).

FONTE: INGRAM *et al.*, 2009a

Estudos posteriores indicaram o polimorfismo $-13910 C>T$ como um bom marcador para testes genéticos da hipolactasia primária (RASINPERA *et al.*, 2004; POHL *et al.*, 2010; MATTAR *et al.*, 2008; BERNARDES-SILVA *et al.*, 2007; SCHIRRU *et al.*, 2007). Porém, a hipótese de que este seria o polimorfismo causal da persistência da lactase, foi contestada por Mulcare *et al.* (2004) em um estudo com populações africanas. Apesar dessa variante de ter sido encontrada com baixa frequência (<14%) em algumas populações do oeste da África, como nas tribos Fulani e Hausa dos Camarões, observaram que a frequência de $-13910T$ não explica o fenótipo persistência da lactase em populações subsaarianas da África (MULCARE *et al.*, 2004; COELHO *et al.*, 2005). Outro estudo também demonstrou

que a baixa frequência de *-13910T* e do haplótipo A não esclarece a frequência elevada desse fenótipo em grupos que ingerem leite no Leste da África e no Oriente Médio (INGRAM *et al.*, 2007).

Posteriormente, alguns pesquisadores (TISHKOFF *et al.*, 2007; INGRAM *et al.*, 2007; IMTIAZ *et al.*, 2007; ENATTAH *et al.*, 2008) identificaram novas variantes alélicas associadas a persistência da lactase (FIGURA 4 e TABELA 1) em africanos e no Oriente Médio, sendo que as principais são *-14010 G>C*, *-13915 T>G* e *-13907 C>G*. Acredita-se que devido a diferentes eventos mutacionais, a persistência da lactase evoluiu independentemente na maioria das populações africanas (MYLES *et al.*, 2005; MULCARE *et al.*, 2004; COELHO *et al.*, 2005). Da mesma forma como o polimorfismo *-13910T* se liga mais fortemente ao fator nuclear Oct-1, observou-se que as variantes *-13915G* e *-13907G* também interagem com esta proteína, aumentando a atividade do promotor da lactase (OLDS, AHN e SIBLEY, 2011), fato não observado num estudo anterior (INGRAM *et al.*, 2007).

Os polimorfismos identificados até o momento aparecem em diferentes haplótipos. A variante *-13910T*, como já mencionado, foi encontrada no haplótipo A e também no B, enquanto que a variante comum *-13910C* está presente em todos os haplótipos. O alelo *-13915G* foi encontrado no haplótipo C na tribo Jaali e, em alguns indivíduos (10/131), em haplótipos não-C (E, K e outros raros). Já os alelos *-13907G* e *-13913C*, apesar de raros nas populações genotipadas, aparentemente estão associados aos haplótipos A e B, respectivamente (TABELA 1).

TABELA 1 - CARACTERIZAÇÃO DOS SNPS ASSOCIADOS À PERSISTÊNCIA DA LACTASE

Posição do SNP (<i>LCT</i>)	Substituição dos nucleotídeos	Código do Banco de Dados SNP	Evidência de associação com PL	Evidência de função	Haplótipo no gene <i>LCT</i>	Localização geográfica da frequência mais elevada
-14010	G>C	Não incluso	Tishkoff <i>et al.</i> (2007)	Tishkoff <i>et al.</i> (2007)	B	Quênia / Tanzânia
-13915	T>G	rs41380347	Ingram <i>et al.</i> (2007) Tishkoff <i>et al.</i> (2007), Imtiaz <i>et al.</i> (2007)	Tishkoff <i>et al.</i> (2007) Enattah <i>et al.</i> (2008)	C	Arábia Saudita
-13910	C>T	rs4988235	Enattah <i>et al.</i> (2002)	Troelsen <i>et al.</i> (2003) Olds e Sibley (2003) Lewinsky <i>et al.</i> (2005)	A	Europa
-13907	C>G	rs41525747	Tishkoff <i>et al.</i> (2007) Ingram <i>et al.</i> (2008)	Tishkoff <i>et al.</i> (2007) Enattah <i>et al.</i> (2008)	A	Etiópia / Sudão

FONTE: INGRAM *et al.*, 2009a.

3.5 ORIGEM HISTÓRICA E EVOLUÇÃO DA PERSISTÊNCIA DA LACTASE

Populações com tradição de ordenha e hábito de beber leite possuem maior capacidade de digerir o leite em relação aos grupos não-pastoris, onde a intolerância à lactose é mais frequente (SIMOONS, 1970; MCCRACKEN, 1971).

A hipolactasia primária é uma condição normal, apresentada por aproximadamente 65% da população mundial (ITAN *et al.*, 2009). Vários autores sugerem que este era de fato o estado ancestral e normal dos seres humanos (SWALLOW, 2003). Porém, quando a atividade da ordenha foi inserida num grupo no Norte da Europa e adultos passaram a tomar leite, houve uma adaptação do ser humano a esta condição. Os poucos que eram digestores de leite, ao contrário da maioria que não era, e, portanto, capazes de aproveitar melhor todos os componentes do leite, provavelmente apresentavam menor risco de morte em relação aos má-digestores. Isto se tornou um fator de seleção e aumentou a frequência do gene da persistência da lactase durante milhares de anos entre as populações que consumiam leite (MCCRACKEN, 1971; SAHI *et al.*, 1973).

Segundo Holden e Mace (1998), três teorias foram propostas para esclarecer a origem da persistência da lactase. A primeira, proposta independentemente por Simoons (1969, 1970) e McCracken (1971), é a cultural-histórica, que explica a coevolução desse fenótipo com o pastoralismo. A segunda hipótese, defendida por Flatz e Rotthauwe (1973), sugere que em lugares de maior latitude e menos radiação solar, as pessoas apresentam maior risco de deficiência de vitamina D, o que diminui a absorção do cálcio, enfraquecendo os ossos e aumentando o risco para raquitismo. A lactose poderia promover, assim como a vitamina D, a absorção de cálcio e, portanto, indivíduos lactase persistentes teriam uma vantagem seletiva maior. A terceira indica que em populações de regiões áridas da África, onde a frequência da persistência da lactase é elevada, o leite dos camelos poderia ter sido uma fonte de água para as pessoas, favorecendo os digestores de leite. Além disso, a diarreia e depleção de água em indivíduos lactose intolerantes poderia ter sido um fator de seleção desfavorável para estes. Esta hipótese foi proposta por Cook e Al-Torki (1975).

Estas duas últimas hipóteses, entretanto, foram contestadas por Holden e Mace (1997), que não encontraram evidências de que a persistência da lactase teria sido favorecida pela latitude. Por meio de um estudo etnográfico, encontraram, entretanto, evidências que suportam a primeira hipótese, confirmando que a capacidade de digerir o leite e o pastoralismo coevoluíram ao longo da história (HOLDEN e MACE, 1997). Pelo fato de a seleção ter favorecido aqueles que ingeriam leite, este é um bom exemplo de coevolução gene-cultura (FELDMAN e CAVALLI-SFORZA, 1989; DURHAM, 1991).

Já nos tempos romanos foi notado que existiam diferenças individuais na habilidade de digerir leite por pessoas adultas (INGRAM *et al.*, 2009a). Entretanto, até a segunda metade do século XX, a variação na expressão da lactase ainda não havia sido fundamentada como um traço geneticamente determinado. Ao contrário, descendentes europeus acreditavam que a expressão de níveis elevados de lactase em adultos era um estado incidente 'normal' (AURICCHIO *et al.*, 1963; DAHLQVIST *et al.*, 1963).

Entretanto, acredita-se hoje que a persistência da lactase é um traço genético que surgiu aproximadamente 5.000-10.000 anos atrás com a domesticação de vacas na Europa (HARVEY *et al.*, 1995; TROELSEN, 2005). De acordo com um modelo de simulação sobre a origem, inferiu-se que a coevolução persistência da lactase/ordenha iniciou há ~7.500 anos numa região entre a Europa Central e o Norte dos Balcãs, provavelmente em associação com a cultura Linearbandkeramik. É plausível conectar a origem geográfica e a distribuição da persistência da lactase ao aumento da necessidade da economia baseada na ordenha de gado durante o VI Milênio a.C. (ITAN *et al.*, 2009).

Na África, evidências arqueológicas sugerem que a domesticação de gado no Egito surgiu há ~7.700-9.000 anos e, no Oriente Médio, há ~7.000-8.000 anos (GIFFORD-GONZALEZ, 2005), sendo que a época mais recente para o surgimento do alelo *-14010C* em populações africanas foi de ~2.700-6.800 anos atrás (95%. IC ~1.200-23.000) (TISHKOFF *et al.*, 2007).

A frequência elevada dos alelos *-13910T*, *-22018A* e *-14010C* e seus haplótipos extensos e altamente conservados, indicam uma seleção positiva recente (BERSAGLIERI *et al.*, 2004; INGRAM *et al.*, 2007; TISHKOFF *et al.*, 2007), onde os alelos ao redor de uma variante juntamente com esta, aumentam rapidamente suas frequências. Observou-se que as variantes *-13910C* e *-22018G* representam alelos

ancestrais e que, pelo fato de estarem inseridos num haplótipo extenso e muito comum em norte-europeus, o gene *LCT* está localizado numa região com elevado desequilíbrio de ligação, já que não houve dissociação alélica na região por recombinação (POULTER *et al.*, 2003; INGRAM *et al.*, 2009a; revisão de SABETI *et al.*, 2006). A variação de microssatélites ligados ao polimorfismo *-13910 C>T* e análise do DNA de antigos agricultores europeus (BURGER *et al.*, 2007), além de uma simulação posterior do modelo de origem e evolução da persistência da lactase, confirmaram a hipótese da evolução e origem recente desse alelo (ITAN *et al.*, 2010).

Enattah *et al.* (2007) sugerem que a distribuição global de *-13910T* sustenta a ideia de que este alelo se originou em caucasianos. Após analisar 37 populações da Eurásia, identificaram esta variante em diferentes haplótipos, havendo dois altamente divergentes. Também notaram que a origem do alelo *-13910T* no haplótipo mais comum (há ~5.000-12.000 anos) é mais antiga que outros alelos encontrados em regiões geograficamente restritas (~1.400-3.000 anos). Dessa forma, estes pesquisadores acreditam que o alelo *-13910T* foi introduzido independentemente mais de uma vez e que os alelos da persistência da lactase em seres humanos resultam de evolução convergente (ENATTAH *et al.*, 2007). Na Índia a origem do alelo *-13910T* parece ser a mesma deste alelo na Europa, devido à sua associação com o mesmo haplótipo, com extensão >1 Mb (GALLEGO ROMERO *et al.*, 2012).

3.6 DISTRIBUIÇÃO MUNDIAL DOS POLIMORFISMOS ASSOCIADOS À PERSISTÊNCIA DA LACTASE

Na Europa, a distribuição da frequência do primeiro polimorfismo encontrado fortemente associado à persistência da lactase, o *-13910T*, está de acordo com a distribuição do fenótipo (INGRAM *et al.*, 2009a). Na Índia, onde a distribuição da persistência da lactase é similar ao observado na Europa, este polimorfismo corresponde a praticamente toda a variação genética encontrada na região que regula o gene *LCT*, sendo que além deste, sete outros SNPs foram encontrados

(alguns já descritos), entretanto, com frequências bem menores (GALLEGO ROMERO *et al.*, 2012).

Em países fora da Europa, estudos confirmaram uma forte associação entre o alelo *-13910T* e a persistência da lactase, avaliada através do teste de tolerância à lactose, em populações descendentes de norte-europeus (BERNARDES-SILVA *et al.*, 2007; HOGENAUER *et al.*, 2005; KERBER *et al.*, 2007; POULTER *et al.*, 2003). Na Ásia Central, o *-13910T* também foi encontrado como o responsável pela persistência da lactase nas populações Tajiko-Uzbek e Kazakh. O sequenciamento da região *-14133* a *-139556* revelou nenhum outro polimorfismo em associação com este fenótipo, exceto um indivíduo com o alelo *-14010C*. Neste estudo com indivíduos da Ásia, houve apenas uma pequena diferença na frequência da persistência da lactase entre populações pastoris e agricultores, ao contrário do observado em populações africanas e do Oriente Médio. Fatores responsáveis por este fenômeno poderiam ser o cruzamento de rotas e transmissão cultural e a provável tradição da ingestão de produtos fermentados, ao invés de leite fresco, reduzindo dessa forma a pressão seletiva (HEYER *et al.*, 2001).

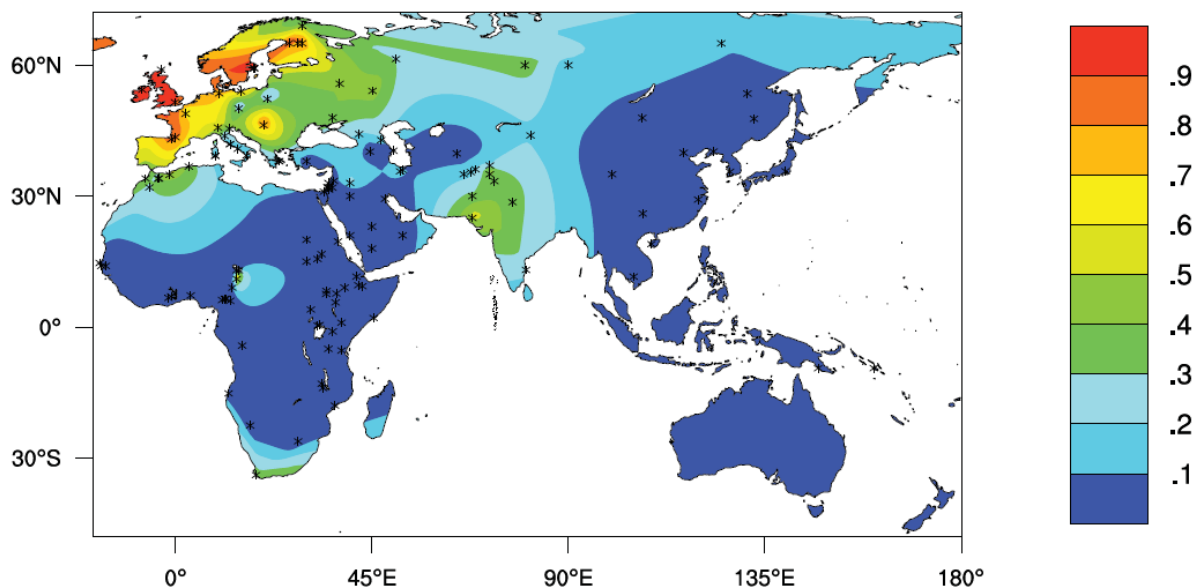


FIGURA 6 – FREQUÊNCIA FENOTÍPICA DA PERSISTÊNCIA DA LACTASE PREVISTA NO VELHO MUNDO BASEADA NA FREQUÊNCIA DO ALELO *-13910 C>T*.

(A previsão da frequência da PL assume o equilíbrio e domínio de Hardy-Weinberg. As estrelas representam os locais de coleta. As cores mostram a frequência da persistência da lactase prevista por interpolação de superfície).

FONTE: ITAN *et al.*, 2010.

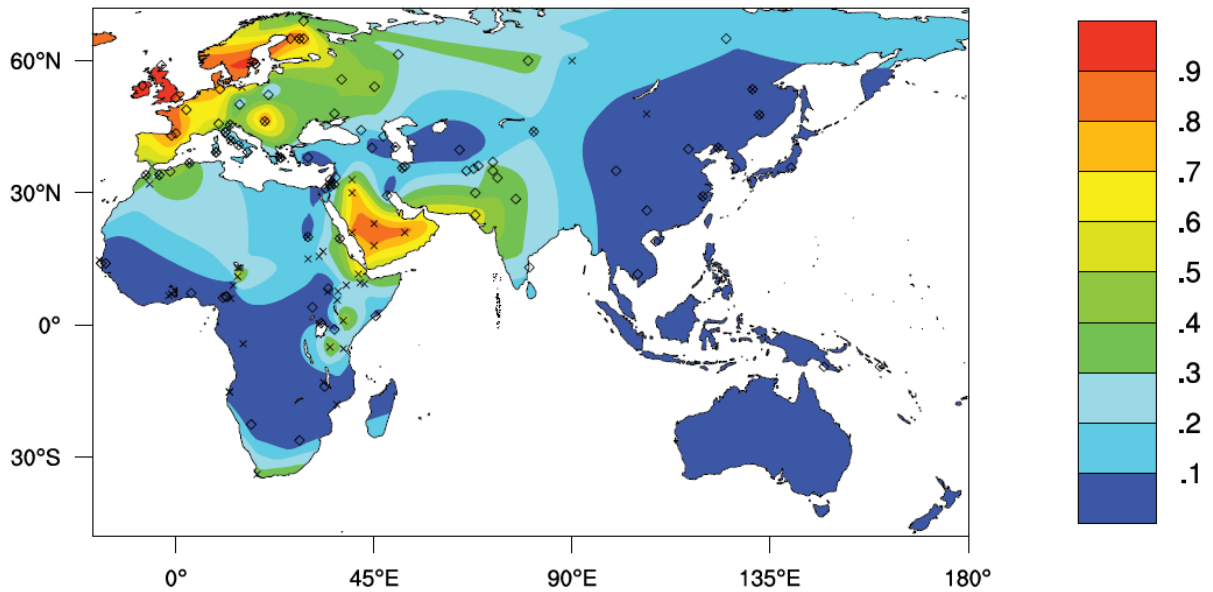


FIGURA 7 – FREQUENCIA FENOTÍPICA DA PERSISTÊNCIA DA LACTASE PREVISTA NO VELHO MUNDO BASEADA NA FREQUENCIA DOS ALELOS -13910 C>T, -14010 G>C, -13915 T>G E -13907 C>G, ASSOCIADOS A ESTE FENÓTIPO.

(A previsão da frequência da PL assume o equilíbrio e domínio de Hardy-Weinberg. As cruzes representam os locais de coleta onde os 4 alelos conhecidos associados à persistência da lactase foram genotipados e os diamantes representam os locais de coleta onde apenas dados do alelo -13910 C>T são disponíveis. As cores mostram a frequência da persistência da lactase prevista por interpolação de superfície).

FONTE: ITAN *et al.*, 2010.

TABELA 2 – FREQUÊNCIA DO ALELO -14010C EM ALGUMAS POPULAÇÕES AFRICANAS.

População	País	-14010C (%)	Referência
Afro-asiático	Tanzânia	46%	Tishkoff <i>et al.</i> (2007)
Afro-asiático	Quênia	18%	Tishkoff <i>et al.</i> (2007)
Nilo-saariana	Tanzânia	39%	Tishkoff <i>et al.</i> (2007)
Nilo-saariana	Quênia	32%	Tishkoff <i>et al.</i> (2007)
Sandawe	Tanzânia	13%	Tishkoff <i>et al.</i> (2007)
Kuvale	Angola	6%	Coelho <i>et al.</i> (2009)
Nyaneka-Nkhumbi	Angola	3%	Coelho <i>et al.</i> (2009)
Ovimbundu	Angola	1%	Coelho <i>et al.</i> (2009)
Somali	Etiópia	3%	Ingram <i>et al.</i> (2009b)

FONTE: O autor (2012).

Na África, apesar desse alelo também ter sido identificado em algumas populações com frequência elevada na tribo Fulani (0,39 no Camarão e 0,48 no Sudão), a variabilidade de polimorfismos é maior, bem como a distribuição dos alelos (INGRAM *et al.*, 2007). O alelo -14010C foi encontrado em diferentes grupos com frequências variadas (TABELA 2).

TABELA 3 - FREQUÊNCIA DO ALELO -13910T EM ALGUMAS POPULAÇÕES.

País	População	N	-13910T	Freq. PL	Referência
Alemanha	Alemães	60	0,56	0,80	Mulcare (2006)
Finlândia	Finlandeses	1876	0,58	0,82	Enattah <i>et al.</i> (2008)
França	Bascos	170	0,66	0,88	Enattah <i>et al.</i> (2008)
França	Franceses	58	0,43	0,68	Bersaglieri <i>et al.</i> (2004)
Grécia	Gregos	100	0,09	0,17	Anagnostou <i>et al.</i> (2009)
Hungria	Húngaros	110	0,62	0,86	Nagy <i>et al.</i> (2009)
Itália	Centro-norte	206	0,13	0,24	Bersaglieri <i>et al.</i> (2004)
Itália	Nordeste	219	0,24	0,42	Anagnostou <i>et al.</i> (2009)
Itália	Sul	200	0,05	0,10	Enattah <i>et al.</i> (2008)
Itália	Sardenhos	56	0,07	0,14	Bersaglieri <i>et al.</i> (2004)
Reino Unido	Ingleses	64	0,73	0,93	Mulcare (2006)
Reino Unido	Irlanda do Norte	65	0,95	1,00	Mulcare (2006)
Rússia	Diversas	46	0,13	0,24	Enattah <i>et al.</i> (2008)
Suécia	Suecos	784	0,74	0,93	Almon <i>et al.</i> (2007)
Ucrânia	Ucranianos	92	0,22	0,39	Mulcare (2006)

FONTE: ITAN *et al.*, 2010
 PL - Persistência da lactase

Já o alelo -13915G foi encontrado com frequência elevada no grupo beduíno do Oriente Médio (48%) (INGRAM *et al.*, 2009b), assim como em diferentes regiões da Arábia Saudita, com frequências que variam entre 52 e 65% (IMTIAZ *et al.*, 2007), concordando com resultados encontrados por Enattah *et al.* (2008), que estimaram a frequência em 57% nos árabes. Sugere-se, portanto, que este alelo, também frequente no Leste africano e raro no Oeste, originou no Oriente Médio e foi introduzido em outras regiões nos últimos 1.400 anos devido à expansão árabe (INGRAM *et al.*, 2007). Na África, Tiskoff *et al.* (2007) observou a frequência dos alelos -13907G e -13915G nas populações afro-asiáticas de Beja, 21% e 12%, respectivamente, e nas populações afro-asiáticas do Quênia, 5% e 9%, respectivamente.

A variante -13907G não foi detectada no Oriente Médio, porém sua frequência é ampla no Sudão e Etiópia, com frequência mais elevada no grupo Afar da Etiópia, o que indica que a origem desse alelo é diferente de -13915G (INGRAM *et al.*, 2007). Outro alelo identificado, o -13913C, é raro e foi encontrado com frequência mais elevada no grupo Fulani (INGRAM *et al.*, 2007).

A frequência do polimorfismo -13910 C>T em alguns países europeus pode ser visualizada na (TABELA 3). Já a distribuição desse polimorfismo e das variantes -14010 G>C, -13915 T>G e -13907 C>G estão representadas nas (FIGURAS 6 e 7).

3.7 PERSISTÊNCIA DA LACTASE NO BRASIL

A população brasileira é multiétnica, isto é, formada por descendentes europeus, ameríndios e africanos. A hipolactasia primária é comum no Brasil (TRONCON *et al.*, 1981; SEVÁ-PEREIRA e BEIGUELMAN, 1982) e ocorre em 60,8% da população (ESCOBOZA *et al.*, 2004), o que pode ser consequência da miscigenação que ocorreu entre estas três raças (TRONCON *et al.*, 1981; SIMOONS, 1978).

Escoboza *et al.* (2004) analisaram a atividade da lactase em biopsias do duodeno por meio de imunistoquímica e observaram alta frequência da hipolactasia primária em afrodescendentes (91%), similar ao encontrado na costa Leste da África de onde a maioria dos africanos-americanos originaram (KRETCHMER, 1971; citado

por ESCOBOZA *et al.*, 2004). Já em euro-brasileiros, a frequência da hipolactasia primária foi menor (53,2%) (ESCOBOZA *et al.*, 2004), o que corresponde ao encontrado em outros euro-descendentes com alto nível de miscigenação (SIMOONS, 1978).

Estudos mais antigos já procuraram descrever a absorção da lactose nos principais grupos étnicos do Brasil, baseando-se no teste de tolerância à lactose de hidrogênio expirado. Apesar dos pequenos tamanhos amostrais, os resultados para não-brancos foram semelhantes em dois estudos. Em um estudo, a frequência da má-absorção da lactose foi de 85% em afro- e 100% em japoneses-brasileiros (SEVÁ-PEREIRA e BEIGUELMAN, 1982) e no outro, de 97,45% em não brancos, considerando àqueles de descendência não europeia (TRONCON *et al.*, 1981). Já em euro-brasileiros, os resultados variaram entre 45% a 68,75% (SEVA-PEREIRA e BEIQUELMEN, 1982; TRONCON *et al.*, 1981).

Resultados semelhantes foram encontrados por Mattar *et al.* (2009), que analisaram a frequência do polimorfismo $-13910 C>T$ em diferentes grupos étnicos brasileiros. Os autores observaram que 57% dos euro-brasileiros apresentam o genótipo $-13910 C/C$ (hipolactasia primária), sendo que a frequência desse genótipo é mais elevada em afro-brasileiros (80%) e japoneses-brasileiros (100%) (TABELA 4).

O polimorfismo $-13910 C>T$ também foi investigado por Friedrich *et al.* (2012b) em diferentes grupos do Brasil. Os genótipos marcadores para persistência da lactase ($-13910 C/T$ e $-13910 T/T$) foram mais frequentes entre os euro-brasileiros do Sul do país (51,4%) e menos frequentes entre os afro-brasileiros da mesma região (32%) e entre os grupos miscigenados do Nordeste (36,6%) e Norte (31%) do Brasil.

Testes genéticos para hipolactasia primária com os marcadores $-13910 C>T$ e $-22018 G>A$ já vem sendo realizados em países europeus e, em estudos realizados com brasileiros, percebeu-se que devido à alta concordância entre estes polimorfismos e o teste para tolerância à lactose, também podem ser indicados para diagnóstico da hipolactasia primária no Brasil (MATTAR *et al.*, 2008; BULHÕES *et al.*, 2007; BERNARDES-SILVA *et al.*, 2007). Deve-se, porém, considerar que pode haver diferenças na associação dessas variantes com a expressão da lactase em diferentes grupos raciais. Em japoneses-brasileiros, por exemplo, o $-22018 G>A$ é

um melhor indicador para a hipolactasia primária que o *-13910 C>T* (MATTAR *et al.*, 2010).

Friedrich *et al.* (2012a) realizaram o primeiro estudo para investigar a diversidade de polimorfismos no gene *LCT* em ameríndios do Brasil, incluindo quatro populações: Guarani-Kaiowa, Guarani-Nãndeva, Kaingang e Xavante. Observaram que este gene é altamente polimórfico neste grupo étnico, mostrando 15 haplótipos diferentes com distribuição heterogênea entre os quatro grupos investigados, provavelmente devido à deriva genética. A única mutação que encontraram associada à persistência da lactase na região intensificadora de 214kb foi a *-13910 C>T*, que variou entre 0,5% em Xavantes para 7,6% em Guarani-Nãndeva. Os autores acreditam que estas frequências podem, provavelmente, derivar de europeus e estar relacionadas com proporções de miscigenação com não-nativos. Entretanto, pode se tratar também de uma mutação de novo na tribo Xavante por, virtualmente, não haver miscigenação nesta população (FRIEDRICH *et al.*, 2012a).

TABELA 4 – DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS E DA HIPOLACTASIA/PERSISTÊNCIA DA LACTASE ENTRE DIFERENTES GRUPOS ÉTNICOS DO BRASIL (N / %).

Genótipo	Euro-brasileiros	Pardos	Afro- descendentes	Japoneses- brasileiros	Total
<i>-13910 C/C</i>	226 (56,6)	37 (56,9)	40 (80)	53 (100)	356 (62,8)
<i>-13910 C/T</i>	149 (37,3)	26 (40,0)	8 (16)		183 (32,3)
<i>-13910 T/T</i>	24 (6,0)	2 (3,1)	2 (4)		28 (4,9)
Persistência da lactase (<i>C/T</i> ou <i>T/T</i>)	173 (43,4)	28 (43,1)	10 (20)	Nenhum	211 (37,2)
Total	399 (100)	65 (100)	50 (100)	53 (100)	567 (100)

FONTE: Mattar *et al.*, (2009)

Ainda não existem estudos com o polimorfismo *-14010 G>C* em brasileiros, sendo este o primeiro. Pode tratar-se de um marcador genético importante para

persistência da lactase em afro-brasileiro, uma vez que foi observado em grupos que residem nas regiões de origem de muitos deles.

Os estudos mencionados até o momento foram realizados no Sudeste e Sul do Brasil. Ainda outros seriam necessários para avaliar a frequência fenotípica e genotípica da persistência da lactase em outras regiões para, dessa forma, entendermos melhor a sua distribuição em todo o país.

3.8 TESTE GENÉTICO PARA HIPOLACTASIA PRIMÁRIA

Para o diagnóstico da intolerância à lactose, um método amplamente utilizado é o teste para tolerância à lactose, através da curva glicêmica ou do teste respiratório do hidrogênio expirado, por não ser invasivo e informar a respeito da absorção da lactose pelo intestino. Desvantagens desses métodos são os erros do tipo 1 e 2 que podem ocorrer devido à variabilidade na quantidade de lactose tolerada de indivíduo para indivíduo e à produção de hidrogênio pelas bactérias da flora que pode ser menor em alguns indivíduos, além de não informar a respeito da expressão da lactase. Outra desvantagem é o desconforto que o paciente pode sentir por causa da ingestão de alta quantidade de lactose (50 g). A avaliação da atividade e expressão da lactase em biópsias da segunda porção do duodeno é outro método que pode auxiliar no diagnóstico.

Já o teste genético é um método mais recente que pode informar a respeito da expressão da enzima lactase. Diversas técnicas têm sido utilizadas e descritas para analisar os diversos polimorfismos associados à persistência da lactase (TABELA 5). O primeiro polimorfismo encontrado em associação a este traço genético, o $-13910 C>T$, já foi testado em vários países como marcador para hipolactasia primária.

Os resultados dos testes genéticos são comparados por muitos pesquisadores com o teste tradicional de tolerância à lactose, principalmente o teste respiratório do hidrogênio expirado. Em uma população mediterrânea da Sardenha, observou-se que todos os indivíduos com fenótipo de mal absorvedores, tiveram o genótipo $-13910 C/C$ (SCHIRRU *et al.*, 2007). É possível visualizar ainda outros resultados encontrados em diferentes populações na (TABELA 6).

Com a validação do marcador *-13910 C>T*, o teste genético já vem sendo incorporado como exame de rotina em laboratórios (MATTAR e MAZO, 2010). Na Finlândia, a tipagem desse marcador já é oferecida para diagnóstico da hipolactasia primária, cuja especificidade é de 100% em finlandeses com idade superior a 12 anos. É facilmente realizado e adequado tanto para propósitos diagnósticos a nível individual como para triagem em estudos populacionais (RASINPERA *et al.*, 2004). No Brasil, este teste já foi implementado na rotina laboratorial do Hospital das Clínicas da FMUSP (MATTAR e MAZO, 2010).

Além disso, o teste genético pode complementar o teste respiratório do hidrogênio expirado, aperfeiçoando o diagnóstico de hipolactasia primária, além de identificar indivíduos que produzem pouco hidrogênio e, dessa forma, diminuir resultados falso-negativos. Este teste também pode auxiliar no diagnóstico de indivíduos que apresentam valores incertos no teste respiratório e para diagnóstico de causas secundárias em indivíduos portadores da variante *-13910T* que apresentam um resultado positivo para o teste respiratório (SCHIRRU *et al.* 2007).

Pelo fato da idade na qual o declínio da lactase se torna completo variar em diferentes populações, e, dessa forma, nem todas as crianças com hipolactasia primária expressarem baixos níveis de lactase, o teste genético deve ser utilizado com cautela nesta faixa etária. Apesar de ajudar a excluir a hipolactasia primária como causa de sintomas abdominais em crianças, pode, por outro lado, ter um efeito indesejável na orientação dietética quando não há sintomas de intolerância à lactose e/ou quando a atividade da lactase ainda é alta (RASINPERA *et al.*, 2004). De acordo com Di Stefano *et al.* (2009), quando ainda não ocorreu o declínio da lactase, o genótipo *-13910 C/C* pode levar a um diagnóstico errôneo.

Como já mencionado anteriormente, no Brasil, as variantes alélicas *-13910 C>T* e *-22018 G>A* foram sugeridas como marcadores para o teste genético da hipolactasia primária. Bulhões *et al.* (2007) realizaram um estudo em Porto Alegre, incluindo indivíduos que toleram bem o leite e outros que apresentam sintomas de intolerância após sua ingestão. Todos os participantes fizeram o teste respiratório e o teste genético para estes dois polimorfismos. Houve uma concordância significativa entre a presença dessas variantes e o teste respiratório negativo, sem má-absorção da lactose ($\kappa=0,9$; $P<0,001$). Entretanto, o grupo amostral dessa pesquisa foi pequeno ($n=20$) e, portanto, os resultados devem ser corroborados com outros estudos com maior número de indivíduos.

TABELA 5 – TÉCNICAS UTILIZADAS PARA ANÁLISE DE POLIMORFISMOS NO GENE *MCM6* ASSOCIADOS À PERSISTÊNCIA DA LACTASE

Método	Referências
PCR-RFLP	POULTER <i>et al.</i> , 2003; MULCARE <i>et al.</i> , 2004; BABU <i>et al.</i> , 2010; BERNARDES-SILVA <i>et al.</i> , 2007; BULHÕES <i>et al.</i> , 2007; MATTAR <i>et al.</i> , 2007, 2008, 2010; CHAO e SIBLEY, 2004; FRIEDRICH <i>et al.</i> , 2012; HEYER <i>et al.</i> , 2011; KUCHAY <i>et al.</i> , 2011
PCR em tempo real	BODLAJ <i>et al.</i> , 2006
PCR em tempo real com hibridização por fluorescência	POHL <i>et al.</i> , 2010; HABERKORN <i>et al.</i> , 2011; SZILAGYI <i>et al.</i> , 2007
Sequenciamento	INGRAM <i>et al.</i> , 2007, 2009; FRIEDRICH <i>et al.</i> , 2012; GALLEGRO ROMERO <i>et al.</i> , 2012; TISHKOFF <i>et al.</i> , 2007
Sequenciamento direto de produtos de PCR	POULTER <i>et al.</i> , 2003
PCR-SSO	KERBER <i>et al.</i> , 2007; TAG <i>et al.</i> , 2008
RT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction)	KUCHAY <i>et al.</i> , 2011
Tetra ARMS PCR	POULTER <i>et al.</i> , 2003
Minisequencing PCR	RASINPERA <i>et al.</i> , 2004
Mass-spectrometry-based Array (Sequenom)	Mass BERSAGLIERI <i>et al.</i> , 2004; TISHKOFF <i>et al.</i> , 2007

FONTE: O autor (2012)

O estudo de Bernardes-Silva *et al.* (2007) foi direcionado para pacientes com síndrome do intestino irritável, onde houve uma forte relação entre as variantes -13910 C>T e -22018 G>A com maior excreção de hidrogênio expirado e presença de sintomas intestinais mais intensos após ingestão de lactose. Portanto, os autores

concluíram que o teste genético em pacientes com esta síndrome tem alta sensibilidade e especificidade.

Além do Brasil, este polimorfismo também é indicado em outros países fora da Europa, como na Índia (GALLEGO ROMERO *et al.*, 2011; KUCHAY *et al.*, 2011), em populações da Ásia Central (HEYER *et al.*, 2011) e em camaroneses (MULCARE *et al.*, 2004).

TABELA 6 – ESPECIFICIDADE E/OU SENSIBILIDADE DO POLIMORFISMO -13910 C>T COMO MARCADOR PARA TESTE GENÉTICO EM DIFERENTES POPULAÇÕES.

População	Método*	Idade	Especifici- dade	Sensibili- dade	Referência
Alemães	Respiratório		96%	91,4%	Büning <i>et al.</i> (2005)
Austríacos	Respiratório		99%	95%	Hogenauer <i>et al.</i> (2005)
Brasil	Respiratório	>18	83%	100%	Bernardes-Silva <i>et al.</i> (2007)
Finlandeses	Biópsia	= ou >12	100%	93,3%	Rasinpera <i>et al.</i> (2004)
Índia	Biópsia	= ou >8	100%	97,2%	Kuchay <i>et al.</i> (2011)
Sardenha	Respiratório		95,8%	100%	Schirru <i>et al.</i> (2007)
Suíça	Respiratório		95%	97%	Pohl <i>et al.</i> (2007)

FONTE: O autor (2012)

* Método usado para comparar com o teste genético

Apesar de -13910 C>T ser um bom marcador para testes genéticos, foi sugerido que ainda é prematuro aplicar este teste de maneira sistemática em todas as populações (SWALLOW, 2006; MULCARE *et al.*, 2004), uma vez que este polimorfismo não é o causador da persistência da lactase em algumas populações africanas e do Oriente Médio com alta frequência desse fenótipo (MULCARE *et al.*, 2004), onde este papel é desempenhado por outros polimorfismos, como o -13915 T/G, -13907 C/G e -14010 G>C (TISHKOFF *et al.*, 2007; INGRAM *et al.*, 2007; ENATTAH *et al.*, 2008). Portanto, o marcador -13910C>T deve ser usado com cautela para diagnóstico da hipolactasia primária fora da Europa (MULCARE *et al.* 2004).

Para o diagnóstico da intolerância à lactose, deve-se considerar que a expressão insuficiente da lactase para a digestão da lactose pode ser causada também por doenças gastrointestinais pré-existentes, estado que caracteriza a hipolactasia secundária. Portanto, outros testes devem ser ponderados para elucidar a causa dos sintomas e complementar o teste genético.

Uma das vantagens do teste genético é que pode auxiliar na decisão de um tratamento mais adequado para o paciente. Quando é excluída a possibilidade da hipolactasia primária, pode tratar-se de uma condição reversível e após o tratamento da doença associada, a expressão da lactase poderá voltar ao normal. Quando o teste genético indica que a causa da intolerância à lactose é a hipolactasia primária, recomenda-se que o paciente evite a ingestão de leite e seus derivados temporariamente até remissão dos sintomas (MATTAR e MAZO, 2010) e, então, uma reintrodução gradual de acordo com o limiar tolerado por cada paciente (SHAUKAT *et al.*, 2010).

3.9 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO EURO-BRASILEIRA

A população brasileira é um reflexo dos acontecimentos históricos que ocorreram desde o descobrimento do Brasil. Uma característica importante desse povo é o grau de miscigenação, que difere de região para região. Entre os principais grupos étnicos do Brasil estão os: (1) ameríndios de diferentes troncos linguísticos e tribos; os (2) europeus, em especial os portugueses que chegaram no início do

século XVI; e os (3) africanos de diferentes tribos das ex-colônias portuguesas na África, que chegaram desde a metade do século XVI através do tráfico escravo.

Quando os primeiros portugueses chegaram ao Brasil, se depararam com um povo que já habitava o extenso território brasileiro: os índios. Com o início do tráfico escravo até a sua abolição, em 1850, houve uma relocação forçada de aproximadamente 4 milhões de africanos ao Brasil (IBGE, 2000).

A princípio, a população brasileira foi formada por homens portugueses e mulheres ameríndias nativas e escravas africanas (PENA *et al.* 2011). A razão para isso é a vinda de poucas mulheres portuguesas ao Brasil durante o período de 1500 até 1808, ano em que a coroa portuguesa fugiu da invasão napoleônica e foi relocada no Rio de Janeiro (PRADO, 1981).

No mesmo período em que ocorreu a abolição da escravatura, o governo iniciou uma campanha para estimular a imigração de europeus para o Brasil, fenômeno chamado de “branqueamento do Brasil” (SEYFERTH, 1985; 1986; SANTOS, 2002). No período de aproximadamente 100 anos (1872-1975), o Brasil recebeu 5.435.735 de imigrantes da Europa e Oriente Médio, que, em percentagens foram 34% italianos, 29% portugueses, 14% espanhóis, 5% japoneses, 4% alemães, 2% libaneses e sírios e 12% outros (IBGE, 2000).

Com base nesses dados históricos, é possível entender a diversidade na ancestralidade dos brasileiros. Pena *et al.* (2011), ao analisarem a ancestralidade genética de indivíduos de diferentes regiões do Brasil, observaram que a proporção africana em brancos (ou euro-brasileiros) foi de 12,7% no Sul, 30,3% no Nordeste, 18,9% no Sudeste e 10,9% no Norte do país. Já a ancestralidade europeia neste mesmo grupo variou de 85,5% no Rio Grande do Sul, 86,1% no Rio de Janeiro e 66,8% na Bahia.

Entre os euro-paranaenses, o grau de miscigenação com indivíduos de ascendência africana (da região subsaariana) está em torno de 2,5 a 14% e é menor com ameríndios, de 3,1 a 7% (BRAUN-PRADO *et al.* 2000, PROBST *et al.* 2000). Frequências haplotípicas dos antígenos leucocitários humanos (HLA) neste grupo evidenciaram semelhanças com as encontradas em populações ibéricas e mediterrâneas, confirmando a importância da ancestralidade europeia nessa região. A contribuição ameríndia é menor, o que reflete a elevada taxa de mortalidade ameríndia pós-colombiana em conjunto com a lenta ocupação europeia no Paraná (PROBST *et al.* 2000).

Da mesma forma, os afro-brasileiros receberam contribuição europeia e ameríndia à sua diversidade genômica. A ancestralidade europeia variou de 29,3% em Santa Catarina para 53,9% na Bahia neste grupo étnico (PENA *et al.* 2011). No Paraná, o componente europeu está em torno de 15,5 a 24,8% e o ameríndio de 6 a 1,2% nos afrodescendentes. Já nos miscigenados, o componente europeu é de 44,3 a 57,2% e o ameríndio é de 13,7 a 4,1% (PROBST *et al.*, 2000; BRAUN-PRADO *et al.*, 2000). Valores semelhantes foram encontrados em outras populações no Sul do Brasil, porém, no Norte e Nordeste brasileiro, esses valores são menores (SCHNEIDER e SALZANO, 1979; FRANCO, WEIMER e SALZANO, 1982).

Considerando que o componente africano é presente em euro-brasileiros no Sul do Brasil, torna-se importante analisar polimorfismos encontrados em povos africanos também neste grupo e ponderar os locais de origem dos afrodescendentes do Brasil.

Inicialmente, os escravos eram provindos do Golfo da Guiné, incluindo Guiné Bissau e Ilhas Cabo Verde, e, por volta de 1730, passaram a ser trazidos do Congo, Zaire e Angola, de onde originou a maior parte dos escravos trazidos ao Brasil (KLEIN, 2002). Grande parte dessas regiões é habitada por pessoas do ramo bantu, do subfilo linguístico Niger-Congo, além de outras pessoas de culturas bem distintas (GREENBERG, 1963; RUHLEN, 1987, citados por HÜNEMEIER *et al.*, 2007). A partir do século XIX, escravos foram também trazidos da costa oriental africana, região que atualmente engloba Moçambique e países vizinhos (SCHNEIDER *et al.* 1979).

3.10 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO MENONITA

Menonitas é o nome dado a pessoas que fazem parte de um grupo religioso pacifista, que surgiu no século XVI, durante o Movimento Anabatista na Europa. Foram assim chamados pelo nome do padre holandês, Menno Simons, que fundou a Igreja Menonita. Nesta época também outros grupos anabatistas surgiram e foram chamados segundo seu líder, como os huteritas (Jacob Huter) e os amish (Jacob Amman). Estes três grupos diferem entre si, o que é justificado pelas perseguições,

migrações e a fissão dos grupos (CRAWFORD, 2000; citado por MELTON *et al.*, 2006).

O movimento anabatista, que começou em 1525 na Suíça, teve a sua origem na convicção, de um grupo de estudiosos, da necessidade do batismo adulto pela fé, do pacifismo e da disposição de viver segundo a Bíblia, a palavra de Deus (GEISER *et al.* 1931, PENNER *et al.* 1984).

Os menonitas se dividem em dois grupos ancestrais: os holandeses alemães e os suíços alemães. Atualmente, com algumas exceções, os holandeses alemães encontram-se no Oeste do Canadá, na América Latina e ao longo da América do Sul. Já os suíços alemães habitam a região de Kitchener-Waterloo em Ontário, Canadá, e no estado da Pensilvânia, EUA. As pessoas desses dois grupos dificilmente casam-se entre si, devido à separação geográfica e diferenças religiosas (CHARAMES *et al.*, 2008).

Em busca por terras onde poderiam seguir e praticar sua fé, os menonitas, como também os huteritas e amish, passaram por migrações em massa e isolaram-se em colônias rurais. Inicialmente encontraram refúgio na Europa, como na Alemanha (após a fundação da Igreja Menonita, o grupo holandês migrou para o Oeste da Prússia, região que hoje faz parte do Norte da Alemanha e da Polônia), França e Galícia (parte polonesa do antigo Império Austro-Húngaro). A partir de 1683, alguns imigraram para os Estados Unidos e, nos anos 1788 e 1803, outros imigraram para a Ucrânia, onde fundaram comunidades agrícolas (ORTON *et al.*, 2008; PENNER *et al.* 1984). Na Ucrânia, foi garantido a eles o asilo religioso e exclusão de serviço militar com a condição de que não pregassem sua fé e se casassem apenas entre si. Um grupo de 400 famílias iniciou a Colônia de Chortizta, e outras 750 famílias fundaram uma colônia junto ao Rio Molotchna (JAWORSKI *et al.*, 1988).

Entre 1874 e 1880, houve uma primeira onda de imigração para a América do Norte, por causa da introdução do serviço militar universal na Rússia (JAWORSKI *et al.*, 1988; PENNER *et al.* 1984). Porém, foi concedido a eles a opção de serviço florestal ao invés do militar, e, conseqüentemente, as colônias-mãe Chortitzta e Molotschna persistiram e se multiplicaram em colônias-filhas por outras regiões da Ucrânia, Criméia, Cáucaso, Montes Urais, Sibéria e Turquistão. No início do século XX, a revolução russa, a primeira Guerra Mundial seguida da Guerra Civil, anarquia, fome, perseguição religiosa e peste, obrigaram os menonitas a deixar

definitivamente o seu segundo lar, imigrando para o Canadá (1922-1925), Brasil (1929) e Paraguai (1930-1937) (PENNER *et al.* 1984).

A imigração em massa era motivada por situações políticas, econômicas e sociais, pois os menonitas sempre emigravam em busca de lugares onde pudessem seguir sua doutrina religiosa em liberdade. Além da necessidade de viver em comunidades por princípios religiosos, eram motivados por um forte sentimento de fraternidade e pela importância que davam à língua e cultura alemã e à vida social em geral (KLASSEN, 1998).

Na América do Sul, especialmente no Paraguai, os menonitas de descendência holandesa-alemã fundaram numerosas colônias (RATZLAFF, 1989). No Brasil, um grupo formado por 200 famílias (1200 pessoas) imigrou primeiramente para Santa Catarina (PAULS JUNIOR, 1976). Em seguida se espalharam por diversos lugares, como Curitiba, Lapa, Clevelândia e Colônia Witmarsum no Paraná, Colônia Nova no Rio Grande do Sul, São Paulo, Bahia, Mato Grosso e Amazonas (KLASSEN, 1998). A Colônia Witmarsum, situada no município de Palmeira, foi fundada em 1959 com 74 famílias, num total de 455 pessoas (PAULS JUNIOR 1976). As colônias mães em Santa Catarina foram extintas (KLASSEN, 1998).

A principal atividade econômica dos menonitas é a agropecuária, praticada com sucesso desde o século XVI e o sustentáculo do sistema cooperativista colonial, ao lado da igreja e escola (QUIRING, 1964; HARD, 1975; NICKEL e KLIEWER, 1991). Quando se tratava de ideais cooperativistas e anabatistas, nem sempre foi fácil manter a harmonia entre os menonitas, e, por esta razão, muitas vezes ocorriam divisões na sociedade e o surgimento de novas colônias (KLASSEN, 1995).

Com poucas exceções, os menonitas holandeses alemães, desde a formação do grupo, seguiram rigorosamente a sua fé e praticaram a endogamia, que se intensificou enquanto estavam na Rússia e eram separados do restante da população (EPP, 1974; citado por ORTON *et al.*, 2008). As genealogias dessas famílias são extensas e a maioria deles consegue traçar a linha dos ancestrais até os imigrantes da Europa (ORTON *et al.*, 2008).

Os menonitas constituem-se num interessante grupo populacional devido à sua homogeneidade genética. Jaworski *et al.* (1988) sugerem que este grupo é especialmente adequada para estudos genéticos e epidemiológicos por ser bem definido, com agregação de doenças e genealogias extensas e exatas, limitações

para se mobilizarem para outros lugares (por terem grandes famílias) e numerosos casos de consanguinidade e descendentes homozigotos, reforçados pelo efeito fundador observado nesta população (JAWORSKI *et al.*, 1988).

Um estudo realizado por Boldt *et al.* (2009) mostrou um efeito fundador na população menonita do Brasil. Os autores pesquisaram a frequência do alelo *D32* no gene *CCR5* (receptor 5 de β quimiocinas) em diferentes populações do Brasil, e observaram uma frequência mais alta desse alelo entre euro-brasileiros menonitas (14.2%) que entre euro-brasileiros não-menonitas (9,3%).

Os menonitas representam um importante foco de estudos para a identificação de genes e doenças associadas, fato que pode ser de grande relevância para a população em geral. O desenvolvimento de futuras pesquisas deve construir o fundamento para um serviço de genética clínica para esta comunidade única (ORTON *et al.* 2008).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 DESCRIÇÃO DA PESQUISA

Esta é uma pesquisa quantitativa, descritiva, observacional e transversal. Observamos a frequência dos polimorfismos *LCT**-13910 C>T e *LCT**-14010 G>C em duas populações: menonita e euro-brasileira. Além disso, coletamos e analisamos dados relacionados ao hábito de ingerir leite, sintomas após ingestão de leite e outras doenças gastrointestinais na população menonita.

4.2 APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA

O projeto desse estudo foi analisado pelo Comitê de Ética do Hospital de Clínicas – UFPR e aprovado no dia 14 de outubro de 2010. CAAE: 0127.0.208.000-10. Registro CEP: 2224.118/2010-05.

4.3 CASUÍSTICA

Neste estudo incluímos 443 indivíduos, dos quais 151 são da população menonita e 292 da euro-brasileira do Sul do Brasil. Foi coletado sangue periférico para análise molecular das variantes genéticas *LCT**-13910C>T e *LCT**-14010G>C e distribuído um questionário (APÊNDICE) para 110 participantes da população menonita.

4.3.1 Menonitas

A inclusão dos participantes menonitas ocorreu principalmente na Colônia Witmarsum, onde residem aproximadamente 1.500 menonitas. Os moradores proprietários de Witmarsum foram convidados por meio de uma carta, enviada a todos pelo correio, para a coleta de sangue realizada na própria colônia, sendo que foi explicado a eles o motivo da coleta. Incluímos neste estudo todos que compareceram no dia e que corresponderam aos critérios de inclusão.

A coleta foi realizada após preenchimento de um questionário e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE (APÊNDICE). Entre os 151 menonitas, 78 (51,7%) foram do sexo feminino e 73 (48,3%) do sexo masculino. A idade variou de 18 a 89 anos, sendo que a média de idade foi de 43 anos.

Apesar da mesma origem de todos os participantes, atualmente, 126 (83,5%) residem na Colônia Witmarsum, 18 em Curitiba, 2 no Canadá (a mãe ainda nasceu no Sul do Brasil) e 5 em outras cidades (Blumenau, São Paulo, Salvador e Anápolis). A principal atividade econômica da Colônia Witmarsum é a agropecuária. As famílias são extensas e os moradores valorizam a vida em comunidade.

4.3.2 Euro-brasileiros

Os indivíduos desse grupo foram, em sua grande maioria, doadores de sangue do Hospital de Clínicas – HC/UFPR e do banco de sangue Hemepar, ambos localizados na cidade de Curitiba. A classificação étnica foi feita de acordo com a cor da pele e/ou autoclassificação dos participantes.

No HC/UFPR, foi realizada uma coleta de sangue entre funcionários e pesquisadores. Na Hemepar, doadores de sangue foram convidados a participar do estudo. Após assinarem o TCLE e doarem sangue, os funcionários da instituição separaram amostras de sangue para a nossa equipe.

Entre os 292 euro-brasileiros, 150 (51,4%) foram do sexo feminino e 142 (48,6%) do sexo masculino. A idade dos indivíduos variou de 18 a 64, sendo que a média de idade foi de 36.

4.4 MÉTODOS

4.4.1 Coleta de Material

4.4.1.1 Coleta de Sangue

Foram coletados 10 ml de sangue periférico: 5 ml em tubos contendo EDTA e 5 ml em tubos sem anticoagulante. As amostras foram levadas ao Laboratório de Imunopatologia Molecular do Hospital de Clínicas - UFPR para posterior separação do anel de leucócitos, do soro e do plasma. O anel de leucócitos foi utilizado para extração de DNA, enquanto que o soro e plasma formam armazenados num congelador com temperatura de -70°C .

4.4.1.2 Coleta de Dados

Um total de 110 indivíduos responderam a um questionário distribuído aos participantes da população menonita (APÊNDICE). Foram realizadas perguntas referentes à ingestão de leite, sintomas característicos da intolerância à lactose, tais como diarreia, flatulência, vômito, distensão e dor abdominal após ingestão de leite; e se o indivíduo apresenta intolerância à lactose ou outras doenças gastrointestinais que podem diminuir a expressão da lactase. Os resultados desse questionário foram analisados e comparados aos resultados do teste genético, com base em cálculos estatísticos.

4.4.2 Extração de DNA

O DNA foi extraído utilizando-se DNAzol (Invitrogen) ou o kit Wizard Genomic da Promega (Madison, WI - USA), seguindo as instruções de uso, com adaptações para aumentar a concentração e qualidade do DNA. Foi utilizada a proteinase K para aumentar a eficiência da extração.

A extração de DNA compreendeu o processo de lise celular, precipitação de proteínas, lise nuclear e ressuspensão do DNA. Após a extração, o DNA foi hidratado e armazenado em congelador a temperatura de -20°C, pronto para uso. Foi realizada a quantificação e análise da pureza do DNA utilizando o NanoDrop (Thermo Scientific).

Todas as determinações laboratoriais ocorreram no Laboratório de Imunopatologia do Hospital de Clínicas, UFPR.

4.4.3 Técnica de PCR-SSP

Após a extração do DNA, foi realizada a PCR-SSP (Reação em Cadeia da Polimerase com iniciadores de sequência específica) para amplificar fragmentos específicos de 140 pb para as variantes *LCT**-13910 C>T e *LCT**-14010 G>C, visualizáveis após eletroforese em gel de agarose 1,2% corado com Sybrsafe (Invitrogen), sob luz azul. Os fragmentos amplificados foram fotografados e analisados com auxílio de um computador.

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma técnica utilizada para amplificar curtos segmentos do genoma. Para isso, é necessário conhecer a sequência franqueadora da região que se deseja amplificar. A técnica oferece uma aproximação poderosa para distinguir alelos individuais no genoma e isso pode ser usado para diagnosticar doenças ou características que são definidas pela sequência estudada. Quando uma doença está associada a uma alteração de uma sequência particular, a PCR pode ser usada para examinar a sequência no genoma de um indivíduo para determinar quais são os alelos em um dado loco (LEWIN, 1997).

Na PCR-SSP, os iniciadores (ou primers) de 18 a 22 nucleotídeos são projetados para finalizar no nucleotídeo variante da fita-molde. A tipagem SSP baseia-se na premissa de que, se não houver complementaridade perfeita entre o

último nucleotídeo (a 5') do iniciador e a fita-molde, não há amplificação da sequência desejada. Os iniciadores SSP também devem ser compatíveis com um par de iniciadores genéricos que amplificam o controle endógeno da reação.

Os iniciadores diretos foram projetados para terminarem na posição -14010 (-14010Gf e -14010Cf), e os iniciadores reversos na posição -13910 (-13910Cr e -13910Tr) (TABELA 7).

TABELA 7 - SEQUÊNCIAS DOS INICIADORES PROJETADOS PARA AMPLIFICAÇÃO DOS SNPS NO INTRON 13 DO GENE *MCM6*.

Iniciadores Diretos		Iniciadores Reversos	
-14010Gf	5' - GTT TAT AGA GTG CAT AAA GAC G* - 3'	-13910Cr	5' - GTT CCT TTG AGG CCA GGG G* - 3'
-14010Cf	5' - GTT TAT AGA GTG CAT AAA GAC C* - 3'	-13910Tr	5' - GTT CCT TTG AGG CCA GGG A* - 3'

FONTE: O autor (2012)

*: variante alélica

f: direto (forward)

r: reverso

“-13910” e “-14010” referem-se ao número de nucleotídeos antes do sítio de início da transcrição do gene *LCT*.

As concentrações dos reagentes foram testadas e adaptadas para este teste (TABELA 8). Para controle endógeno, adicionou-se um par de iniciadores em todas as misturas, para amplificar uma região bem conservada do DNA. Dessa forma é possível avaliar a qualidade da reação e do DNA. Cada PCR foi acompanhada por controles negativos que são soluções de reação completas, sem o DNA.

Após o preparo das amostras, estas foram colocadas em um termociclador onde passaram pelos processos de desnaturação das cadeias de DNA, acoplamento dos iniciadores e amplificação (alongamento da cadeia pela Taq polimerase). A PCR foi realizada em 30 ciclos; cada ciclo iniciou com 94°C por 20 segundos, seguido pelo acoplamento dos iniciadores por 30 segundos e terminou com 72°C por 30 segundos. Para diminuir amplificações de sequências não específicas, testamos um método “touchdown” de PCR, um programa do termociclador que permite diminuir a temperatura de acoplamento ao longo da PCR.

Nos 10 primeiros ciclos, utilizamos a temperatura de acoplamento de 64°C, nos 10 ciclos seguintes 62°C e nos últimos 10 ciclos, 60°C. Esta estratégia permite a obtenção de melhores resultados.

TABELA 8 – CONCENTRAÇÃO DOS REAGENTES PARA A REAÇÃO DE PCR-SSP COM OS INICIADORES -13910 C/T E -14010 G/C.

Reagentes	Inicial	Final	Volume (µl)
Tampão (c/ 15 mM de MgCl ₂)	10	1	1,5
MgCl ₂ (µM)	25	0,25	0,15
dNTP (µM)	25	0,2	0,12
Iniciador direto (µM)	10	0,4	0,6
Iniciador reverso (µM)	10	0,4	0,6
Iniciador direto (µM)	10	0,09	0,12
Controle endógeno Iniciador reverso (µM)	10	0,09	0,12
Controle endógeno Taq Bras (U/µL)	5	0,02	0,06
DNA			1
H ₂ O			10,73
Total			15

FONTE: O autor (2012)

A melhor temperatura de acoplamento foi testada adicionando-se uma mistura com os iniciadores direto -14010Gf e reverso -13910Cr a um µl de DNA (0,1µg/ml), em 12 tubos diferentes. O mesmo foi feito em outra reação com o mesmo iniciador direto e o iniciador reverso e -13910Tr . Para verificar a melhor temperatura de acoplamento dos iniciadores às cadeias de DNA, utilizou-se a função gradiente do termociclador, programada para 12 temperaturas de acoplamento diferentes: 43°C; 44,3°C; 45,2°C; 47,9°C; 50,8°C; 53,7°C; 55°C; 57,6°C; 59,9°C; 61,8°C; 62,4°C e 63°C. Cada um dos 12 tubos recebeu, dessa forma, uma temperatura de acoplamento diferenciada. O mesmo teste foi realizado com o iniciador direto -

14010Cf, que é complementar à variante alélica encontrada em populações africanas.

Este teste foi aplicado em todos os indivíduos do estudo.

4.4.4 Análise Estatística

As frequências genotípicas e alélicas foram obtidas por contagem direta. Para a análise populacional, verificou-se o equilíbrio de Hardy-Weinberg, segundo Guo e Thompson (1992) e realizou-se o teste exato de diferenciação populacional, de acordo com Raymond e Rousset (1995), utilizando o software Arlequin 3.5 (EXCOFFIER, 2010).

Análises de associação entre os genótipos e informações obtidas de indivíduos da população menonita, foram feitas com o teste exato de Fisher (2 por 2) e razão de chances (Odds Ratio), utilizando a ferramenta Sisa Tables.

5 RESULTADOS

5.1 OTIMIZAÇÃO DO TESTE GENÉTICO PARA HIPOLACTASIA PRIMÁRIA

Neste estudo, otimizamos um método para identificar as variantes *LCT**-13910 C>T e -14010 G>C associadas à persistência da lactase, utilizando a técnica PCR-SSP. A genotipagem foi rápida e baseada no padrão eletroforético dos fragmentos amplificados. Esta estratégia ofereceu algumas vantagens, como a rápida resolução haplotípica, a especificidade e o baixo custo.

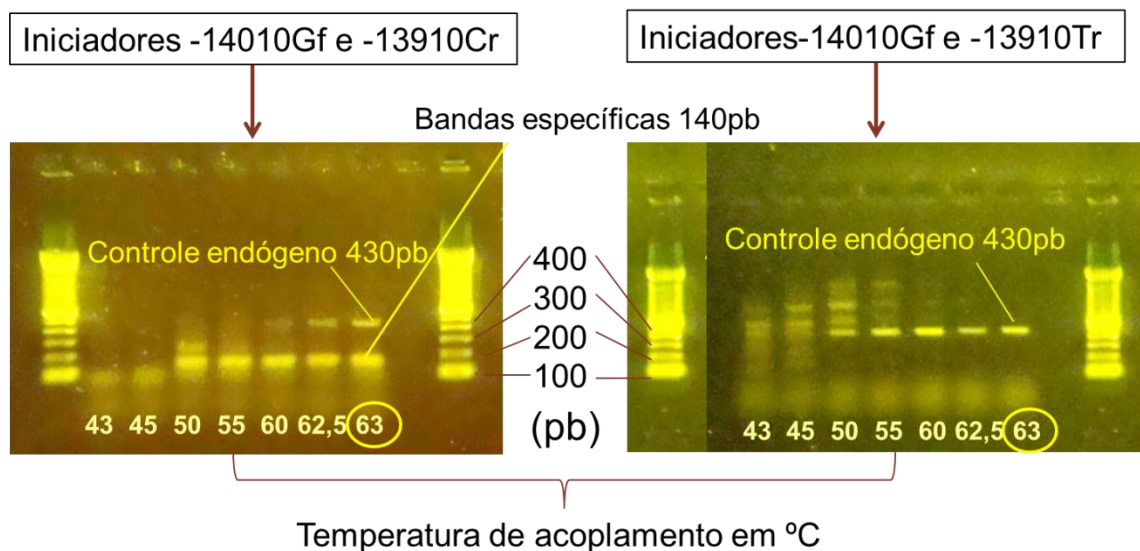


FIGURA 8 – IMAGENS DA CORRIDA ELETROFORÉTICA EM GEL DE AGAROSE DOS PRODUTOS DE PCR-SSP DE UM INDIVÍDUO COM GENÓTIPO -13910 C/C.

(A imagem da esquerda mostra os resultados da PCR-SSP com os iniciadores -14010Gf e -13910Cr e a imagem da direita, com os iniciadores -14010Gf e -13910Tr. Foram aplicados 7 produtos de PCR, cada um com uma temperatura de acoplamento diferente, indicadas abaixo das bandas em graus Celsius (°C). Em cada gel foram aplicados 5µl de marcador de peso molecular antes e depois dos produtos de PCR, valores indicados com setas).

FONTE: O autor (2012)

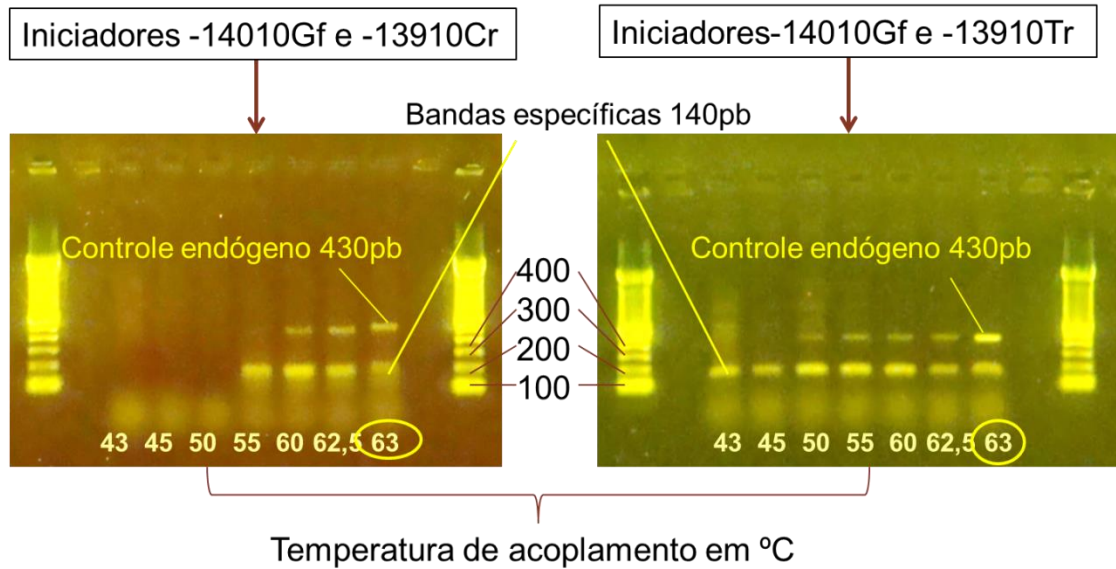


FIGURA 9 – IMAGENS DA CORRIDA ELETROFORÉTICA EM GEL DE AGAROSE DOS PRODUTOS DE PCR-SSP, DE UM INDIVÍDUO COM GENÓTIPO *-13910 C/T*.

(A imagem da esquerda mostra os resultados da PCR-SSP com os iniciadores *-14010Gf* e *-13910Cr* e a imagem da direita, com os iniciadores *-14010Gf* e *-13910Tr*. Foram aplicados 7 produtos de PCR, cada um com uma temperatura de acoplamento diferente, indicadas abaixo das bandas em graus Celsius (°C). Em cada gel foram aplicados 5µl de marcador de peso molecular antes e depois dos produtos de PCR, valores indicados com setas).

FONTE: O autor (2012)

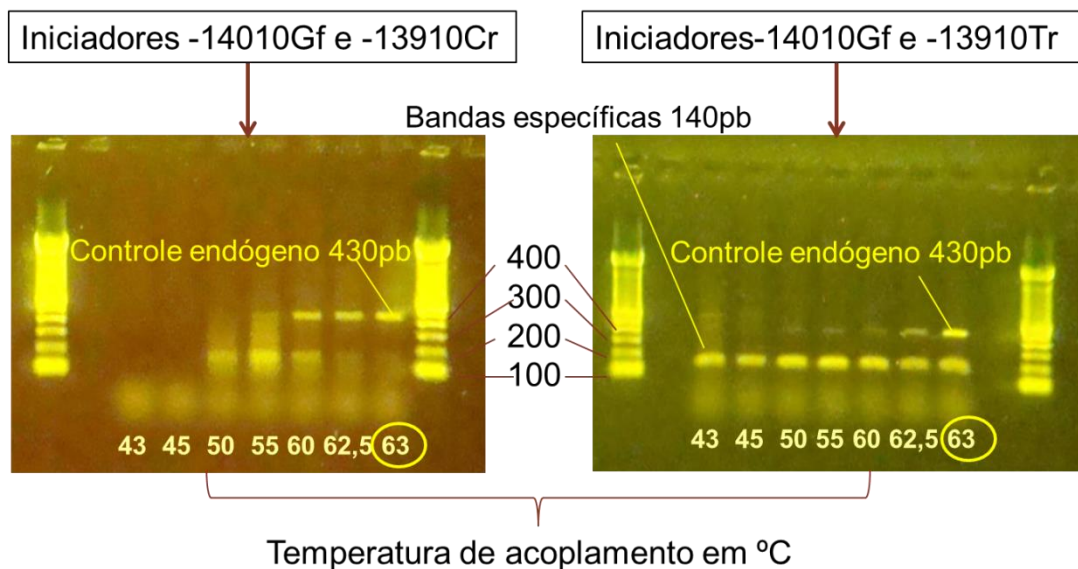


FIGURA 10 – IMAGENS DA CORRIDA ELETROFORÉTICA EM GEL DE AGAROSE DOS PRODUTOS DE PCR-SSP DE UM INDIVÍDUO COM GENÓTIPO *-13910 T/T*.

FONTE: O autor (2012)

(A imagem da esquerda mostra os resultados da PCR-SSP com os iniciadores *-14010Gf* e *-13910Cr* e a imagem da direita, com os iniciadores *-14010Gf* e *-13910Tr*. Foram aplicados 7 produtos de PCR, cada um com uma temperatura de acoplamento diferente, indicadas abaixo das bandas em graus Celsius (°C). Em cada gel foram aplicados 5µl de marcador de peso molecular antes e depois dos produtos de PCR, valores indicados com setas).

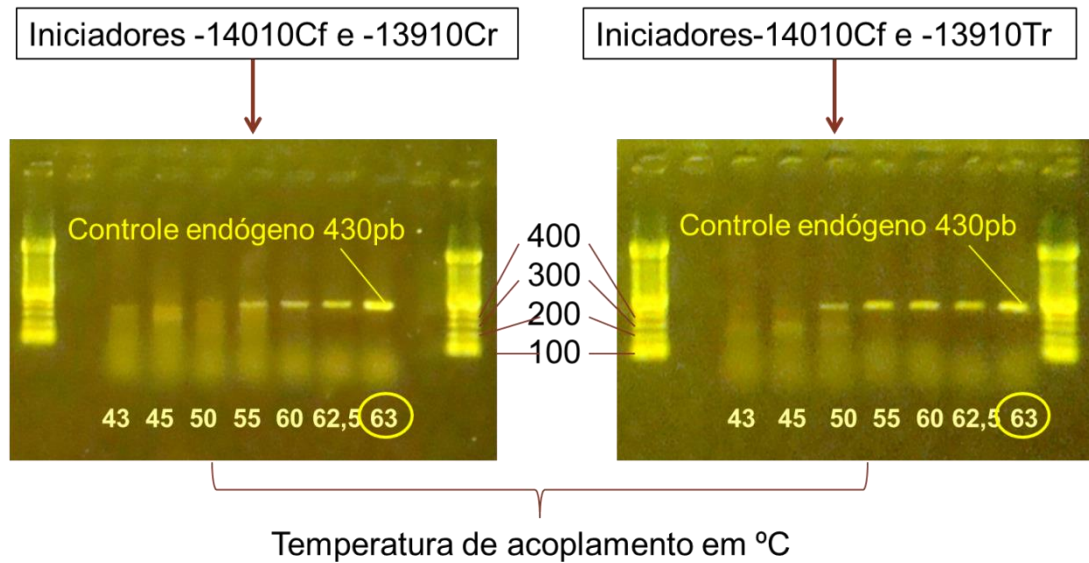


FIGURA 11 – IMAGENS DA CORRIDA ELETROFORÉTICA EM GEL DE AGAROSE DOS PRODUTOS DE PCR-SSP COM INICIADOR DIRETO -14010CF DE UM INDIVÍDUO COM GENÓTIPO -13910 T/T.

FONTE: O autor (2012)

(A imagem da esquerda mostra os resultados da PCR-SSP com os iniciadores -14010Cf e -13910Cr e a imagem da direita, com os iniciadores -14010Cf e -13910Tr. Foram aplicados 7 produtos de PCR, cada um com uma temperatura de acoplamento diferente, indicadas abaixo das bandas em graus Celsius (°C). Em cada gel foram aplicados 5µl de marcador de peso molecular antes e depois dos produtos de PCR, valores indicados com setas).

Percebemos que o glicerol foi desnecessário para este teste e a concentração de 20 ng/ml de DNA suficiente. A temperatura de acoplamento, que gerou o fragmento esperado com menos amplificações inespecíficas, foi de 63°C. Os fragmentos amplificados de 431 pb (controle endógeno) e de 140 pb (para as variantes *LCT**-13910 C>T e *LCT**-14010 G>C) que resultaram de quatro reações com os iniciadores -14010 C/T e -13910 C/T, utilizando o programa “gradiente” do termociclador, podem ser visualizados nas (FIGURAS 8, 9, 10 e 11). Pelo fato do alelo -14010C não ser comum, não houve amplificação em nenhuma reação com o iniciador -14010Cf.

5.2 FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DE *LCT**-13910C E T E DOS GENÓTIPOS MARCADORES PARA PERSISTÊNCIA DA LACTASE E HIPOLACTASIA PRIMÁRIA NAS POPULAÇÕES MENONITA E EURO-BRASILEIRA

As frequências dos genótipos *LCT**-13910 *C/C*, *C/T* e *T/T* variaram muito entre as populações menonita e euro-brasileira, sendo que aproximadamente 45% dos euro-brasileiros tem o genótipo marcador para hipolactasia primária (-13910 *C/C*), enquanto que apenas 12% dos menonitas tem este genótipo ($P < 0.000001$). Já em relação à frequência dos genótipos marcadores para persistência da lactase (-13910 *C/T* e -13910 *T/T*), observou-se que esta foi mais elevada na população menonita que na euro-brasileira (88.1% vs. 55.5%, $P < 0.000001$) (TABELA 9).

TABELA 9 – FREQUÊNCIA DOS GENÓTIPOS MARCADORES DE HIPOLACTASIA PRIMÁRIA (-13910 *C/C*) E DA PERSISTÊNCIA DA LACTASE (-13910 *C/T* E -13910 *T/T*) NAS POPULAÇÕES MENONITA E EURO-BRASILEIRA.

Genótipo	Menonitas n (%)	Euro-brasileiros n (%)
-13910 <i>C/C</i> (Hipolactasia primária)	18 (11,92%)	130 (44,52%)
-13910 <i>C/T</i>	70 (46,36%)	130 (44,52%)
-13910 <i>T/T</i>	63 (41,72%)	32 (10,96%)
-13910 <i>C/T</i> e -13910 <i>T/T</i> (Persistência da lactase)	133 (88,08%)	162 (55,48%)
Total	151 (100%)	292 (100%)

FONTE: O autor (2012)

TABELA 10 – FREQUÊNCIA ALÉLICA DE C E T NO LOCUS -13910 NAS POPULAÇÕES MENONITA E EURO-BRASILEIRA.

Alelo	Menonitas		Euro-brasileiros	
	Frequência	D.P.	Frequência	D.P.
C	0,35	0.028	0,67	0.02
T	0,65	0.028	0,33	0.02

FONTE: O autor (2012)
D.P. – Desvio Padrão

A frequência alélica de *-13910T* variou significativamente entre os menonitas e euro-brasileiros ($P < 0,000001$), sendo que foi quase duas vezes mais alta na população menonita que na euro-brasileira, na qual o alelo *-13910C* foi o mais comum (TABELA 10).

As populações menonita e euro-brasileira estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg e não há diferença entre a heteroziguidade observada da esperada nos dois grupos (TABELA 11).

TABELA 11 - TESTE EXATO PARA EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG

População	Loci	Genótipo	Het. Obs.	Het. Esp.	Valor de P	D.P.	Passos feitos
Menonita	-13910	151	0.46	0.45	1.00	0.00	1001000
Euro-brasileiros	-13910	292	0,44	0,44	1.00	0,00	1001000

FONTE: O autor (2012).

O teste exato de diferenciação populacional foi aplicado para verificar se existem diferenças na distribuição da frequência alélica de *-13910T* entre as populações menonita e euro-brasileira e outras europeias (TABELA 12), considerando as frequências alélicas de grupos europeus listados anteriormente (TABELA 3).

Não houve diferenças significativas entre a população menonita e as populações basca (França), alemã, inglesa e húngara. Já a população euro-brasileira difere significativamente de todas as outras populações europeias analisadas.

5.3 FREQUÊNCIA DA VARIAÇÃO ALÉLICA *LCT* -14010C* NAS POPULAÇÕES MENONITA E EURO-BRASILEIRA

O polimorfismo *-14010C* foi encontrado associado à persistência da lactase em populações africanas, conforme abordado anteriormente neste estudo.

Considerando que foi observado um componente africano em caucasianos no Sul do Brasil (PENA *et al.*, 2011), foi investigado o polimorfismo *-14010 G>C* entre os menonitas (n=147) e euro-brasileiros (n=279). Esta variante alélica não foi encontrada em nenhum dos dois grupos.

TABELA 12 – TESTE EXATO DE DIFERENCIAÇÃO POPULACIONAL

População	Freq. alélica de <i>-13910T</i>	Menonita	Euro-brasileira
Menonita	0,65	-	+ (P<0,0001)
Euro-brasileira	0,33	+ (P<0,0001)	-
Finlandeses	0,58	+ (P=0,017)	+ (P<0,0001)
Bascos (França)	0,66	- (P=0,81)	+ (P<0,0001)
Franceses	0,43	+ (P<0,0001)	+ (P=0,042)
Alemães	0,56	- (P=0,092)	+ (P<0,0001)
Gregos	0,09	+ (P<0,0001)	+ (P<0,0001)
Suecos	0,74	+ (P=0,003)	+ (P<0,0001)
Ingleses	0,73	- (P=0,146)	+ (P<0,0001)
Irlandeses (do Norte)	0,95	+ (P<0,0001)	+ (P<0,0001)
Russos	0,13	+ (P<0,0001)	+ (P<0,0001)
Húngaros	0,62	- (P=0,513)	+ (P<0,0001)
Italianos (Nordeste)	0,24	+ (P<0,0001)	+ (P=0,0007)
Italianos (Centro-norte)	0,13	+ (P<0,0001)	+ (P<0,0001)
Italianos (Sul)	0,05	+ (P<0,0001)	+ (P<0,0001)
Sardenhos	0,07	+ (P<0,0001)	+ (P<0,0001)

FONTE: O autor (2012)

(Os sinais '+' e '-' indicam se houve ou não houve diferença entre as populações, respectivamente).

5.4 ASSOCIAÇÃO ENTRE A PERSISTÊNCIA DA LACTASE E O HÁBITO DE INGERIR LEITE NA POPULAÇÃO MENONITA

Na população menonita, em especial entre aqueles que residem na Colônia Witmarsum, a principal atividade econômica é a agropecuária e, portanto, o leite é um alimento importante em sua dieta. Entre 108 participantes, 80 (74,1%) responderam que tem o hábito de ingerir leite, 8 (7,4%) não tem esse hábito, 8 (7,4%) ingerem-no em pequena quantidade, 10 (9,2%) raramente ou bem pouco, um (0,9%) às vezes e um (0,9%) apenas derivados do leite (FIGURA 12).

O teste exato de Fisher foi utilizado para avaliar se o hábito de ingerir leite está associado à persistência da lactase, segundo os genótipos marcadores. Para que não houvesse um viés de interpretação de resposta, considerou-se que não ingerem leite todos que responderam que ingerem pouco leite, raramente, muito pouco, às vezes, apenas derivados ou não ingerem leite (n=20). Entre os 92 indivíduos com genótipo marcador para persistência da lactase, 72 ingerem leite enquanto que 20 não ingerem. Já entre os 16 que apresentaram o genótipo marcador para hipolactasia primária, 8 ingerem leite e 8 não. A partir desses dados, observou-se que houve associação entre o hábito de ingerir leite e a persistência da lactase na população menonita ($P = 0,023$ e $OR = 3,6$; 95%; $CI = 1,20 < O.R. < 10,79$).

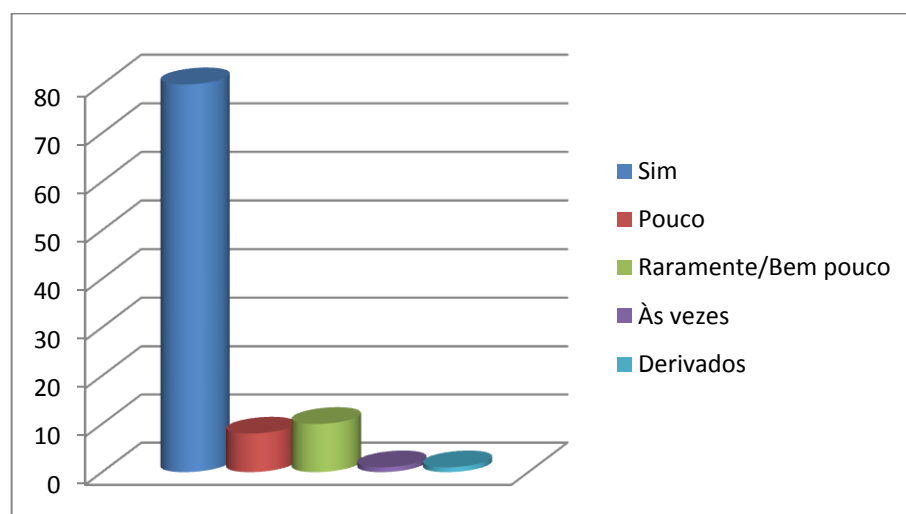


FIGURA 12 – HÁBITO DE INGERIR LEITE NA POPULAÇÃO MENONITA DA COLÔNIA WITMARSUM.

FONTE: O autor (2012)

(No eixo vertical, os valores indicam o número de indivíduos).

5.5 ASSOCIAÇÃO ENTRE A HIPOLACTASIA PRIMÁRIA E SINTOMAS DE MÁ-DIGESTÃO DA LACTOSE NA POPULAÇÃO MENONITA

Estudos anteriores demonstraram que indivíduos com hipolactasia primária podem desenvolver sintomas após ingestão de leite, característicos de intolerância à lactose, como dor e distensão abdominal, flatulência, diarreia, náusea ou vômito, entre outros.

Um total de 107 indivíduos responderam à questão se apresentam sintomas característicos de intolerância à lactose após ingestão do leite. Entre estes, 79 (73,1%) disseram que não apresentam sintomas após ingerir leite e 28 (25,9%) que apresentam pelo menos um dos sintomas listados abaixo (TABELA 13).

Entre os sintomas mencionados, o mais frequente foi a flatulência (82,1%), seguido de distensão abdominal (50%), dor abdominal (32,1%) e diarreia (17,8%) (FIGURA 13).

TABELA 13 – SINTOMAS REFERIDOS PELOS PARTICIPANTES DA POPULAÇÃO MENONITA APÓS INGERIR LEITE

Sintomas	N / %
Apenas Flatulência	8 / 28,6%
Apenas Distensão Abdominal	3 / 10,7%
Flatulência + Distensão Abdominal	6 / 21,4%
Flatulência + Distensão e Dor Abdominal	4 / 14,3%
Diarreia + Dor Abdominal	1 / 3,6%
Diarreia + Flatulência	1 / 3,6%
Diarreia + Flatulência + Distensão e Dor Abdominal	3 / 10,7%
Flatulência + Distensão e Dor Abdominal + Vômito	1 / 3,6%
Náusea	1 / 3,6%
TOTAL	28 / 100%

FONTE: O autor (2012).

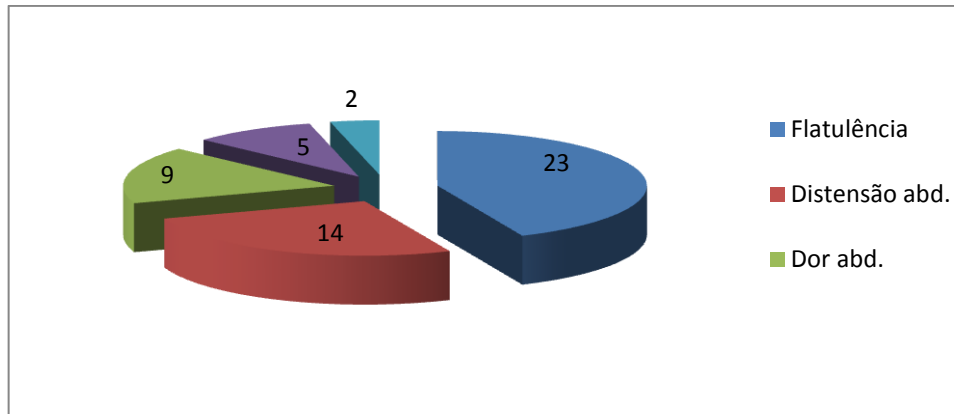


FIGURA 13 – SINTOMAS REFERIDOS PELOS INDIVÍDUOS APÓS INGERIR LEITE.
 FONTE: O autor (2012)

Entre os 15 indivíduos com o genótipo marcador para hipolactasia primária, 4 relataram pelo menos um sintoma, enquanto que 11 não. Já entre os 92 indivíduos com genótipo marcador para persistência da lactase, 24 mencionaram pelo menos um sintoma e 68 não. Por meio do teste de Fisher observou-se que não houve associação significativa entre os sintomas citados e o genótipo marcador da hipolactasia primária -13910 C/C ($P = 0,65$; $OR = 1,03$; $95\% CI = 0,3 < O.R. < 3,54$).

5.6 ASSOCIAÇÃO ENTRE DOENÇAS ASSOCIADAS À HIPOLACTASIA SECUNDÁRIA E SINTOMAS DE MÁ-DIGESTÃO DA LACTOSE NA POPULAÇÃO MENONITA

Entre os entrevistados, 13/110 (11,8%) mencionaram que apresentam alguma doença gastrointestinal e/ou anemia que poderia ser considerada causa primária dos sintomas citados anteriormente, como enterite infecciosa (EI), giardíase, doença celíaca, doença inflamatória intestinal (DII), doença de Chron, enterite induzida por drogas ou radiação (EIDR), doença diverticular do cólon (DDC) e anemia (FIGURA 14).

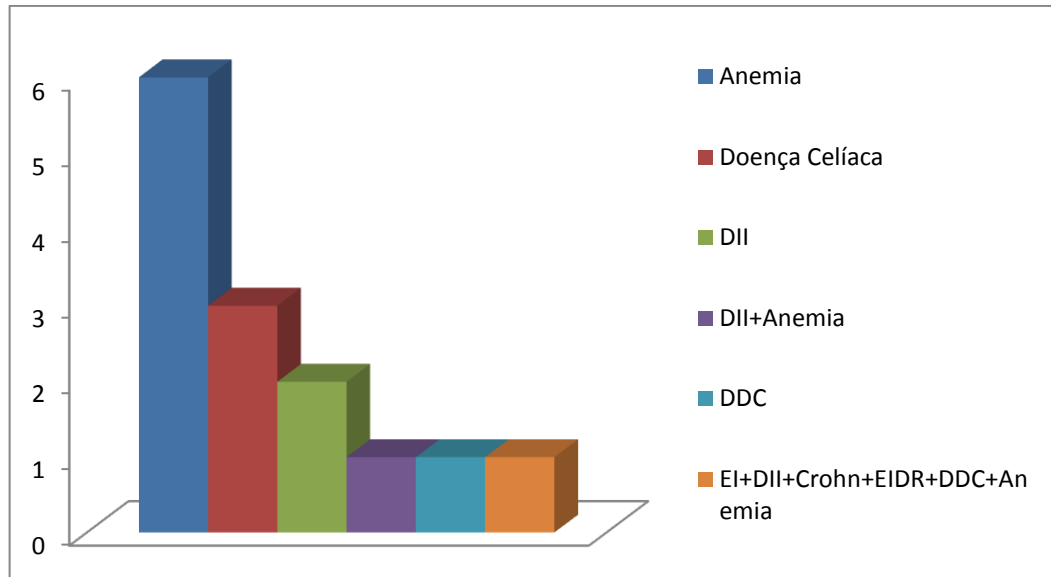


FIGURA 14 – DISTRIBUIÇÃO DE DOENÇAS GASTROINTESTINAIS/ANEMIA APRESENTADAS PELOS INDIVÍDUOS DA POPULAÇÃO MENONITA. (Números no eixo vertical indicam o total de indivíduos que apresentam a doença).
 FONTE: O autor (2012)

Entre os 13 indivíduos que relataram alguma das doenças citadas acima, 7 mencionaram sintomas após ingestão de leite, enquanto que entre os 97 que não as apresentam, 21 referiram pelo menos um dos sintomas. Assim, observou-se uma associação entre estas doenças e os sintomas citados após ingestão de leite ($p = 0,023$ e $OR = 4,05$, $95\% CI = 1,23 < O.R. < 13,38$). Sugere-se que estas doenças gastrointestinais poderiam diminuir a expressão da lactase no intestino dos participantes e, portanto, ser a causa primária dos sintomas de má-digestão da lactose.

5.7 PERFIL SINTOMÁTICO DOS INDIVÍDUOS COM HIPOLACTASIA PRIMÁRIA DA POPULAÇÃO MENONITA

Entre os 151 menonitas que participaram neste estudo, apenas 18 (11,9%) apresentaram o genótipo marcador da hipolactasia primária (-13910 C/C), dos quais 16 responderam ao questionário. Entre estes indivíduos, 10/16 (62,5%) não ingerem

leite, pouco e/ou relataram sintomas após a ingestão. Os demais (6/16, 37,5%) ingerem leite, sem manifestação de sintomas (FIGURA 15).

É interessante observar que entre estes últimos seis, a idade entre cinco variou de 23 e 28 anos e um tinha a idade de 45 anos (FIGURA 16). Foi sugerido que o declínio da lactase é gradativo e mais acentuado após os 30 anos (DI STEFANO *et al.*, 2009). Portanto, sugere-se que estes cinco indivíduos poderiam ainda desenvolver sintomas devido à má-absorção da lactose numa idade mais avançada.

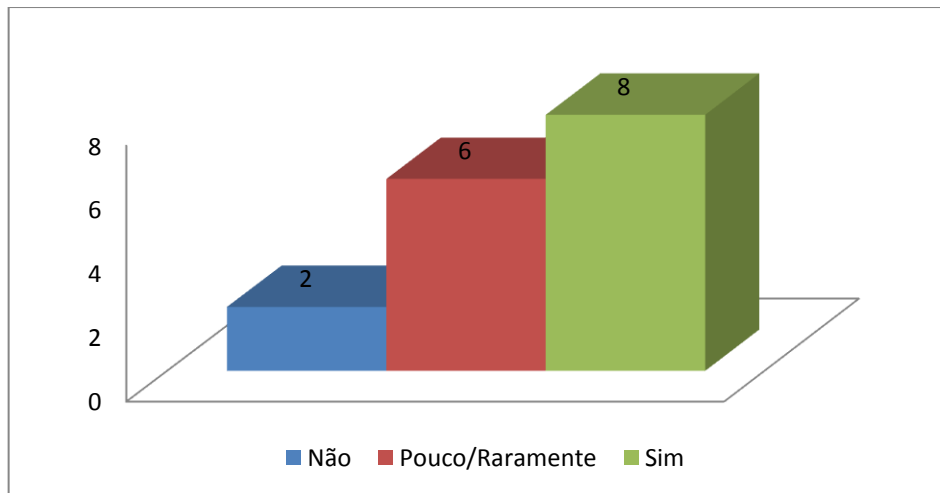


FIGURA 15 – INFORMAÇÕES SOBRE O HÁBITO DE INGERIR LEITE DOS INDIVÍDUOS COM HIPOLACTASIA PRIMÁRIA DA POPULAÇÃO MENONITA.
FONTE: O autor (2012).

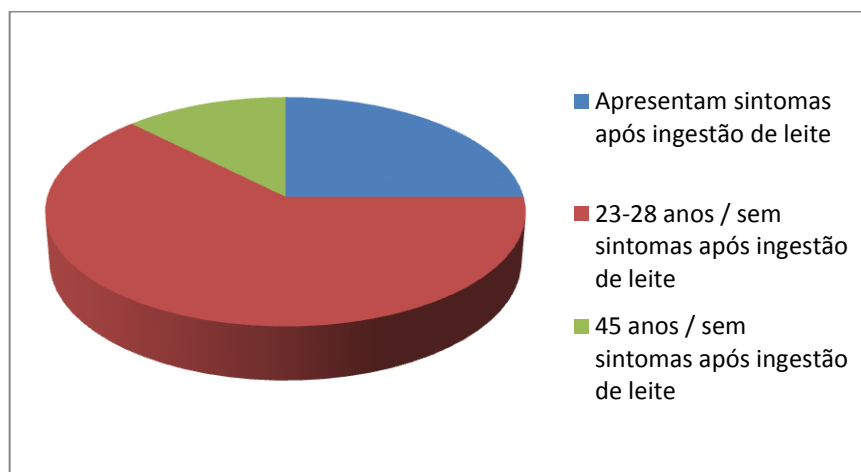


FIGURA 16 – CARACTERÍSTICAS DOS INDIVÍDUOS COM HIPOLACTASIA PRIMÁRIA DA POPULAÇÃO MENONITA.
FONTE: O autor (2012).

6 DISCUSSÃO

6.1 PCR-SSP PARA ANÁLISE GENÉTICA DA PERSISTÊNCIA DA LACTASE

O método PCR-SSP é amplamente utilizado para análise de polimorfismos no DNA. Este método tem sido visto como vantajoso por ser mais rápido comparado à PCR-RFLP e PCR-SSO (Sequence-specific oligonucleotides) (GUTTRIDGE *et al.*, 1998; BUNCE, TAYLOR E WELSH, 1993) e de baixo custo (RIVERS, BARTON e ACTON, 2001). Outras vantagens incluem a acurácia, pois além de ser simples, é conveniente e rentável (NATHALANG *et al.*, 2006; CAVANAGH *et al.*, 1997; TAN, XIE e XU, 1997) e adequado para estudos com populações maiores (RIVERS, BARTON e ACTON, 2001).

Devido às suas vantagens, a PCR-SSP é um método adequado para investigações de rotina, como por exemplo, para genotipagem de antígenos plaquetários humanos para o diagnóstico laboratorial de trombocitopenia aloimune e provisão de produtos sanguíneos pareados com estes antígenos (CAVANAGH *et al.*, 1997), tipagem de HLA-DR para prática clínica de transplante de órgãos (TAN, XIE e XU, 1997), HLA-B27 (NATHALANG *et al.*, 2006), detecções rápidas de mutações ligadas à hemocromatose (GUTTRIDGE *et al.*, 1998) e tipagem rápida de HLA-DQB (BUNCE, TAYLOR e WELSH, 1993).

Dentre as diversas técnicas que já foram otimizadas para análise molecular da hipolactasia primária, a PCR-RFLP é uma das mais utilizada (TABELA 5). Esse método, entretanto, apresenta algumas desvantagens, como a ocorrência de digestão enzimática de fragmentos de tamanho similar (JORDAN *et al.*, 1995), ocorrência de digestão incompleta, falta de acurácia na tipagem de alelos precisos (THONNARD *et al.*, 1995), tempo de trabalho (mínimo de dois dias), manuseio extensivo de amostras e o custo elevado de enzimas de restrição.

Outro método utilizado para análise molecular da persistência da lactase é a PCR-SSO, baseada na hibridização de oligonucleotídeos a sequências ou alelos específicos do DNA após amplificação por PCR. É uma técnica específica, com alta resolução, eficiente e simples para aplicar em grandes quantidades de amostras. Entretanto, a temperatura de hibridização é crítica e o custo das sondas é elevado

(LU *et al.*, 1996). O método PCR-SSP foi comparado ao SSO e observou-se que houve concordância entre eles, sendo que o SSP apresentou vantagens, pois pode ser realizado num único passo, é rápido, preciso, de custo inferior e não necessita de radioisótopos (LU *et al.*, 1996).

Portanto, acreditamos que, quando a intenção é investigar SNPs já conhecidos, a PCR-SSP é um método adequado para análise genética da persistência da lactase. Neste estudo, otimizou-se esta técnica para análise molecular dos polimorfismos *-13910 C>T* e *-14010 G>C*. Trata-se de um teste rápido que pode ser realizado em até cinco horas e adequado para estudos de populações grandes. Em cada teste incluiu-se até 47 amostras numa placa, considerando que são necessárias duas misturas para analisar as variantes *-13910C* e *-13910T*, e, em indivíduos homocigotos para estas variantes, realizou-se um segundo teste para investigar a variante *-14010C*, também com 47 amostras por placa.

6.2 FREQUÊNCIA DO ALELO *-13910T* NAS POPULAÇÕES MENONITA E EURO-BRASILEIRA

A distribuição da persistência da lactase é bem conhecida na Europa e em algumas regiões da África, Oriente Médio e Índia. A sua frequência é alta no Norte e Oeste do continente europeu e diminui para o Sul e Leste (SWALLOW, 2003; INGRAM *et al.*, 2009a). O mesmo pode ser observado na Índia, onde este fenótipo é mais frequente no Norte e Oeste e baixo no Leste do país (SWALLOW e HOLLOX, 2000; INGRAM *et al.*, 2009a). Na África e entre os beduínos do Oriente Médio, este traço é observado com maior frequência em populações nômades pastoris (BAYOUMI *et al.* 1981, 1982; COOK e AL-TORKI; DISSANYAKE *et al.* 1990; SNOOK *et al.* 1976).

A causa genética da persistência da lactase ainda precisa ser mais investigada. O marcador *-13910T* foi a primeira variante genética a ser associada completamente com o fenótipo persistência da lactase em finlandeses (ENATTAH *et al.*, 2002). Outros estudos que seguiram a este comprovaram que *-13910T* é um bom marcador também em outros países da Europa e fora da Europa (INGRAM *et al.*, 2009a; GALLEGO ROMERO *et al.*, 2011; KUCHAY *et al.*, 2011; HEYER *et al.*,

2011; MULCARE *et al.*, 2004), inclusive no Brasil (BERNARDES-SILVA *et al.*, 2007; BULHÕES *et al.*, 2007; MATTAR *et al.*, 2008). Entretanto, este alelo é raro em populações subsaarianas, em beduínos e indivíduos de origem sudanesa, e, portanto, não pode ser abordado como a causa da persistência da lactase nesses grupos (MULCARE *et al.*, 2004; INGRAM *et al.*, 2007).

Pelo fato das frequências do alelo *-13910T* e do haplótipo A serem conhecidas na Europa e por se tratar de uma região cromossômica bem conservada, aplicamos o teste genético para esta variante em euro-brasileiros. Optamos incluir o grupo menonita por ser um grupo étnico com características genéticas únicas, que reside no Brasil e que pode contribuir para estudos com genética de populações. A variante alélica *-13910T* foi encontrada em 55,5% dos indivíduos euro-brasileiros, indicando que a persistência da lactase é mais frequente comparado à hipolactasia primária nesta população (44,5%). A frequência alélica de *-13910T* neste grupo (0,33), entretanto, foi inferior à observada na população menonita (0,63). Os euro-brasileiros diferem significativamente de outras populações europeias em relação à frequência desse alelo, o que poderia ser resultado da miscigenação com outros grupos étnicos ou entre os diferentes grupos europeus que migraram para o Brasil.

Até o momento, poucos estudos foram realizados no Brasil para determinar a frequência da persistência da lactase. A diversidade étnica e dimensão territorial dificultam estudos populacionais. Entretanto, observou-se que entre os polimorfismos associados a esse fenótipo, o *-13910 C>T* é o mais comum (FRIEDRICH *et al.*, 2012b). Os resultados desse estudo e de anteriores que analisaram a frequência da persistência da lactase associada à *-13910T* podem ser visualizados na (FIGURA 17). Com exceção da população menonita, que foi significativamente diferente de todos os outros grupos brasileiros ($P < 0,0001$), observa-se que a frequência é mais elevada entre os euro-brasileiros do Sul do Brasil. A frequência alélica de *-13910T* entre os euro-brasileiros desse estudo foi semelhante à encontrada em Porto Alegre ($P=0,2$), porém diferente à observada pelo grupo de pesquisa de São Paulo nesta população ($P=0.0003$).

Em relação às frequências alélicas de *-13910T*, não houve diferença significativa entre os menonitas e algumas populações da Europa Central, como os húngaros, ingleses, bascos e alemães, o que poderia ser explicado pela origem desse grupo na Holanda e Alemanha. Por outro lado, percebeu-se que a frequência

do alelo *-13910T* foi mais elevada na população menonita (0,63) que na alemã (0,56) e que há uma tendência para diferenciação entre estes dois grupos ($P=0,092$). Já entre os menonitas e euro-brasileiros, a diferença das frequências alélicas foi muito significativa ($P<0,0001$). Ao contrário dos euro-brasileiros, os menonitas tiveram pouca miscigenação com outros grupos devido aos casamentos consanguíneos e ao estilo de vida em comunidades fechadas que levaram durante muitas décadas.

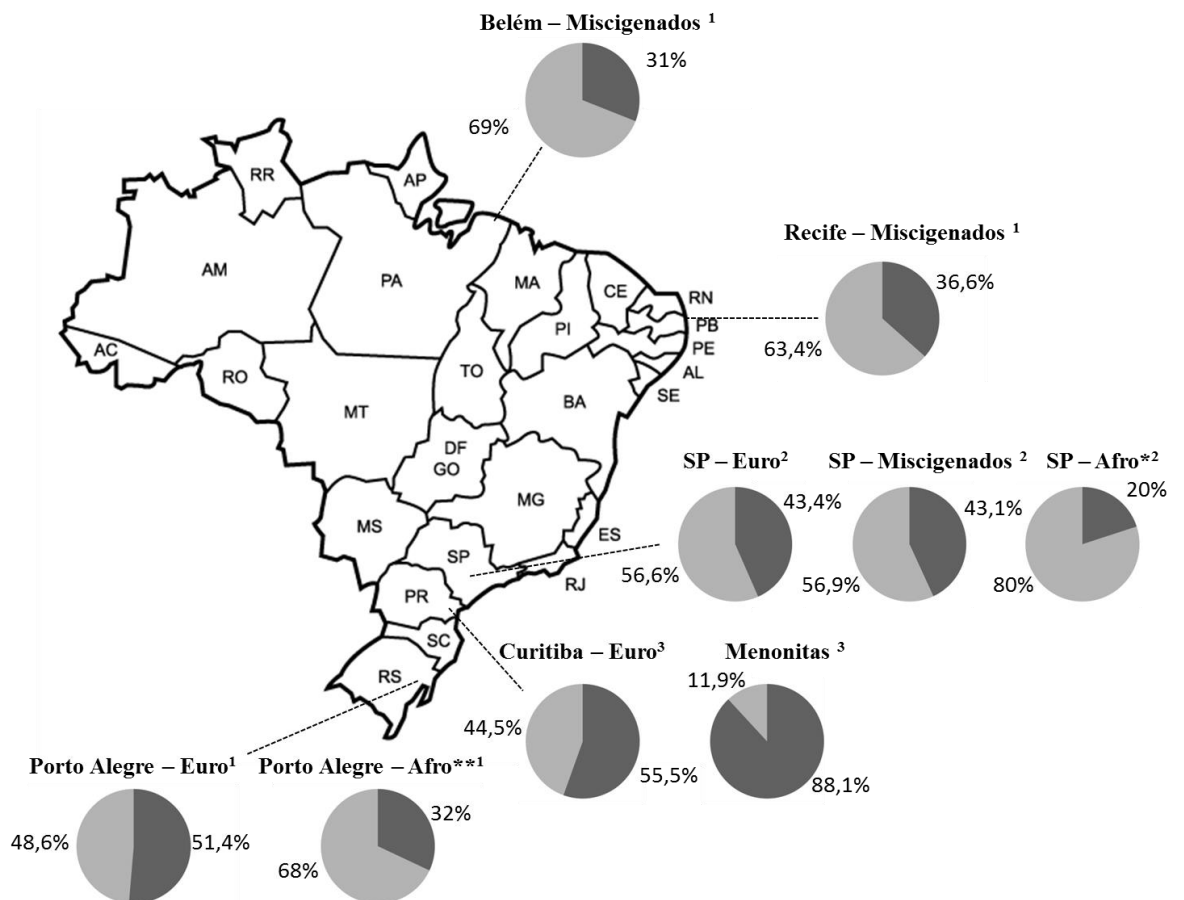


FIGURA 17 – DISTRIBUIÇÃO DA PERSISTÊNCIA DA LACTASE (CINZA ESCURO) E HIPOLACTASIA PRIMÁRIA (CINZA CLARO) ASSOCIADOS A *-13910 C>T* ENTRE DIFERENTES GRUPOS DO BRASIL.

1 FRIEDRICH *et al.*, 2012b

2 MATTAR *et al.*, 2009

3 O autor (2012)

* Não foram incluídos afro-brasileiros miscigenados com euro-brasileiros.

** Autores não mencionaram se incluíram miscigenados ou não.

O período que os menonitas viveram em comunidade na Europa, na Rússia e após a migração, nas Américas, foi fortemente influenciado pelo efeito “gargalo de

garrafa”, processo que ocorre quando apenas alguns indivíduos de um grupo sobrevivem a alguma tragédia e voltam a se multiplicar quando a situação se torna mais favorável (RIDLEY, 2006). A tragédia, neste caso, foram as perseguições religiosas que sofreram na Europa e no início do século XX, pelos comunistas russos. O “gargalo de garrafa” é uma das causas que levam a um efeito fundador, um exemplo de deriva genética que ocorre principalmente em populações pequenas, onde a frequência de alelos muda aleatoriamente ao longo dos anos, fazendo com que os descendentes desse grupo apresentem características genéticas diferentes dos seus ascendentes (RIDLEY, 2006).

Além de situações de tragédia, outra razão pela qual um grupo pode sofrer um efeito fundador é quando poucos colonizam um local anteriormente desabitado, como uma ilha (RIDLEY, 2006). Durante a formação de colônias na Rússia, as famílias se estabeleceram em terras ainda não habitadas para contribuir com a expansão agrícola no país, e foram obrigados a assinar um tratado, onde um dos itens era não se casar com os russos. Estas colônias foram crescendo e as famílias menonitas se expandindo para outros lugares da Rússia.

O mesmo processo ocorreu também na América do Sul, após a revolução russa. No Paraguai, os menonitas colonizaram o Chaco, terra seca e árida, habitada por certas tribos indígenas. No Brasil, migraram para regiões pouco habitadas em Santa Catarina. Porém, devido às dificuldades geológicas para praticar a agropecuária, procuraram outras terras, primeiro no Rio Grande do Sul e mais tarde no Paraná, fundando novas colônias. Neste período, entretanto, várias famílias migraram também para cidades, como Curitiba e São Paulo e algumas famílias do Paraguai para o Paraná.

Com base nessa história e nos resultados desse estudo, sugere-se um provável efeito fundador na população menonita, concordando com outros estudos que foram realizados com este grupo no Brasil (BOLDT *et al.*, 2009a), e também fora do Brasil (JAWORSKI *et al.*, 1988).

6.3 A VARIANTE AFRICANA *LCT*-14010C* NÃO FOI ENCONTRADA ENTRE OS MENONITAS E OUTROS EURO-BRASILEIROS

Apesar da forte associação do polimorfismo *-13910 C>T* com a persistência da lactase, esta variante alélica não pode ser considerada a causa desse traço genético em todas as regiões do mundo. Em populações do Leste africano, com prevalência elevada desse fenótipo, esta variante é ausente (MULCARE *et al.*, 2004). Como sugerido para a Europa, o aumento da frequência da persistência da lactase na África deve-se a uma seleção positiva que ocorreu em povos pastoris africanos, desde o início da domesticação de gado há aproximadamente 7.500-9000 anos (TISHKOFF *et al.* 2007).

Em estudo realizado por Tishkoff *et al.* (2007), três novas variantes foram encontradas associadas à persistência da lactase nesta população: *-13907C*, *-13915G* e *-14010C*. O polimorfismo *-14010 G>C*, que foi analisado neste estudo e ausente nas populações euro-brasileira e menonita, foi encontrado numa frequência de 39% na Tanzânia, 32% no Quênia e em 46% afro-asiáticos da Tanzânia (TISHKOFF *et al.*, 2007). Este polimorfismo foi encontrado também em frequências menores em povos que fazem parte do ramo Bantu (de língua banta), na Angola: Kuvale (6%), Nyaneka-Nkhumbi (3%) e Ovimbundu (1%) (COELHO *et al.*, 2009).

A tribo dos Kuvales é uma das mais representativas do grupo de língua herero na Angola (ESTERMANN, 1961) e assim como outros grupos hereros, são seminômades e pastores de gado que vivem nas áreas planas na província de Nanib, na Angola (ESTERMANN, 1961; COELHO *et al.* 2009). O grupo Herero pertence às populações das línguas bantas (também chamados de Bantu), que tiveram sua origem nas pradarias entre Camarões e Nigéria e se propagaram há aproximadamente 4000 anos (segundo evidências linguísticas e arqueológicas) através de deslocamentos de massas (CURTIN, *et al.* 1995; NEWMAN, 1995). O grupo Bantu é do subfilo Niger-Congo e inclui em torno de 500 línguas faladas em praticamente todo Centro-Oeste da África, exceto a área ocupada pelo grupo de língua Khoisan (CAVALLI-SFORZA *et al.*, 1994).

Apesar de levarem consigo a tradição agrícola, alguns grupos Bantu, entre eles os Hereros, Ovambo e Nyaneka-Nkhumbi, colonizaram vales junto a rios nas regiões costeiras e mais ao sul, mudando crescentemente a sua atividade para criação de gado, em diferentes graus, sendo que os Hereros formam o grupo mais exclusivamente pastoril. Estes grupos residem no Sudoeste da Angola (ESTERMANN, 1983; REDINHA, 1971).

Estudos genéticos sugerem que muitos dos afrodescendentes no Brasil são de origem banta. Pena e Bortolini (2004), estimaram que pelo menos 89 milhões no Brasil, independentemente de sua aparência física, mostram mtDNA de origem africana subsaariana. Hünemeier *et al.* (2007) realizaram um estudo de ancestralidade com indivíduos de cor negra do Rio de Janeiro (RJ) e Porto Alegre (RG) e investigaram variações genéticas no cromossomo Y e mtDNA comuns em populações africanas. Segundo os resultados, o mtDNA tem origem principalmente do Centro-Oeste e Sudeste da África. Foi observado também que 61% dos haplótipos Hb β^S encontrados no Brasil como um todo são do tipo chamado de Bantu (SALZANO e BORTOLINI, 2002).

No Paraná, o componente africano também se constitui de descendentes cuja língua predominante era o Bantu (ZAGO *et al.* 1992). Descendentes de escravos vieram de outros estados para o Paraná no início do século XX até 1960. Apesar de já existirem escravos na metade do século XVIII em Curitiba, o número era inferior aos outros estados devido a pouca demanda de mão de obra na época (MARTINS, 1940; MICHAELE, 1969).

A miscigenação de europeus com africanos e o forte componente banto no Brasil, são fatores que nos estimularam a estudar o polimorfismo $-14010 G>C$. Considerando que a variante $-13910T$ não foi encontrada como o único marcador para a persistência da lactase no mundo e que é prematuro realizar testes genéticos a partir dessa variante em populações não-europeias (SWALLOW, 2006), estudos de associação com outros polimorfismos são importantes no Brasil. O -22010^*A , por exemplo, é um melhor marcador para a persistência da lactase em japoneses-brasileiros comparado ao $-13910T$ (MATTAR *et al.*, 2010).

Portanto, otimizou-se e aplicou-se o teste genético com a variante $-14010T$ tanto em euro-brasileiros como também nos menonitas. No primeiro grupo, ponderou-se a existência do componente africano em euro-brasileiros (PENA *et al.*, 2011). Já no segundo, partiu-se da hipótese de que esta variante não seria encontrada neste grupo devido à sua descendência predominantemente europeia, casamentos endógamos e pouca miscigenação.

Entretanto, o $-14010C$ não foi encontrado em nenhum dos dois grupos. A frequência desse alelo foi baixa nos três grupos de língua banta (COELHO *et al.*, 2009), conforme os dados já abordados anteriormente, e, portanto, acreditamos que amostras maiores de euro-brasileiros ou, até mesmo, de afrodescendentes em

estudos futuros seriam necessários para avaliar a existência e/ou frequência desse polimorfismo em brasileiros. Portanto, este marcador deve ser considerado em futuras análises genéticas da persistência da lactase no Brasil. Já na população menonita, - 13910T é o marcador mais indicado para analisar a persistência da lactase.

6.4 NA POPULAÇÃO MENONITA A PERSISTÊNCIA DA LACTASE ESTÁ ASSOCIADA AO HÁBITO DE CONSUMIR LEITE

Tem-se sugerido que pessoas ajustam a ingestão de leite e seus derivados aos seus limites de tolerância à lactose, o que pode ocorrer de forma consciente ou inconsciente, e que adaptações podem ocorrer também devido a mudanças na flora colônica (SWALLOW, 2003). Os resultados deste estudo estão de acordo com Carrochio *et al.* (1998), que relataram que o consumo de leite foi significativamente menor em pacientes classificados como má-digestores ou intolerantes. O mesmo foi observado por Rasinpera *et al.* (2004) em crianças com genótipo -13910 C/C.

O modelo de seleção positiva em populações pastoris na história recente da Europa e, provavelmente, em outras regiões do mundo, sugere que isto ocorreu devido a uma maior sobrevivência das pessoas lactase persistentes com a adição do leite à dieta (BERSAGLIERI *et al.*, 2004). Dessa forma entende-se que a frequência do alelo -13910T aumentou após a ingestão do leite se tornar um hábito nas diferentes populações. Segundo Holden e Mace (1997), a persistência da lactase é uma adaptação ao pastoralismo e, portanto, este último se desenvolveu antes do primeiro. De Vrese *et al.* (2001) relataram que a atividade da lactase em seres humanos não pode ser induzida e, portanto, não aumenta com o consumo de leite.

Sabe-se que a atividade pastoril e a persistência da lactase coevoluíram ao longo da história (HOLDEN e MACE, 1997; BERSAGLIERI *et al.*, 2004). Interessantemente, o polimorfismo -13910 C>T apresenta alta frequência na população menonita, a qual tem a agropecuária como principal atividade econômica desde a sua formação na metade do século XVI. É possível que aqueles que são homozigotos para -13910C diminuam ou excluam de forma consciente, ou não, o

leite de sua dieta devido à má-digestão da lactose. O mesmo pode ser sugerido em relação àqueles que apresentam a variante *-13910T* e, em razão da boa absorção da lactose, optam por ingerir o leite em maior quantidade.

6.5 HIPOLACTASIA PRIMÁRIA E MÁ-DIGESTÃO DO LEITE NA POPULAÇÃO MENONITA

Na população menonita, a hipolactasia primária não está relacionada aos sintomas de má-digestão do leite. Isto pode ser um resultado de vieses do próprio questionário. Contudo, entre os 16 indivíduos lactase não persistente, quatro informaram algum sintoma, o que de fato pode ser justificado pela expressão diminuída da enzima lactase. Dentre estes quatro, dois ingerem leite raramente, o que pode indicar que os sintomas influenciam o hábito de tomar leite. Seis que não indicaram algum sintoma, não ingerem leite ou em menor quantidade. Já foi mencionado anteriormente que a maioria dos indivíduos com intolerância à lactose pode ingerir até 12 g de lactose por dia, o que equivale a um copo de leite, e de 15 a 18 g por dia quando ingerida com outros nutrientes (revisão de SHAUKAT *et al.*, 2010). Portanto, é possível que devido a pouca quantidade de leite ingerida por alguns, os sintomas não são induzidos.

No grupo com hipolactasia primária, seis pessoas afirmaram que tomam leite e não apresentam sintomas. Dentre estes, cinco tem idade entre 23 a 27 anos. Estes resultados concordam com Di Stefano *et al.* (2009), que ao compararem o teste genético com o teste respiratório para tolerância à lactose, perceberam que a concordância foi perfeita apenas em indivíduos com mais de 30 anos. Dessa forma é possível que o declínio da expressão da lactase continue após a adolescência e se acentue numa idade mais avançada e que, portanto, sintomas de má-digestão da lactase tendem a surgir após os 30 anos. Logo, a frequência de casos de má-digestão aumenta com a idade (CARROCCIO *et al.*, 1998; DI STEFANO *et al.*, 2009). Num estudo, a prevalência da má-digestão foi de 23% entre 5 e 16 anos, de 38% entre 17 e 64 anos e de 42% no grupo com idade mais avançada, entre 65 e 85 anos (CARROCCIO *et al.*, 1998).

Apenas uma pessoa deste estudo, com idade acima dos 30 (45 anos), ingeria leite e não informou nenhum sintoma relativo ao seu consumo. O mesmo já foi relatado anteriormente e sugerido que isso pode ocorrer devido a presença de flora bacteriana favorável com menos produção de H₂ (AROLA e TAMM, 1994) ou pela adaptação da flora ao aumento constante da lactose na dieta, diminuindo, dessa forma, a intensidade dos sintomas (HERTZLER e SAVAIANO, 1996).

Por outro lado, ao analisar os indivíduos que declararam apresentar pelo menos um dos sintomas após ingestão do leite (n=28), a maioria (n=24) é lactase persistente. Entre estes, apenas sete informaram alguma outra doença que pode ser considerada como a causa para a hipolactasia. Já foi relatado em estudo anterior que não houve diferença em crianças com ou sem o polimorfismo *-13910 C>T* em relação aos sintomas após consumo de leite, mas houve diferença em relação ao hábito de ingerir leite (RASINPERA *et al.*, 2004), o que também se concluiu neste estudo e foi abordado no tópico anterior. Em um grupo de indivíduos que apresentavam sintomas de intolerância à lactose após ingestão de leite, observou-se que apenas 43% eram mal digestores com base no teste respiratório de hidrogênio (DE VRESE *et al.*, 2001). Em outro estudo foram comparados os valores de hidrogênio expirado para classificar os indivíduos em digestores e mal digestores e sintomas relatados pelos participantes após o teste de tolerância à lactose, para classificá-los em tolerantes ou intolerantes à lactose. Observou-se que 50% eram intolerantes e mal digestores, enquanto que 15% eram intolerantes e digestores e 8% tolerantes e mal digestores. Concluindo, 15% dos indivíduos apresentaram sintomas apesar de serem digestores de lactose (JOHNSON *et al.*, 1993).

Embora não haja uma explicação razoável para os resultados obtidos neste estudo, existem outras causas que podem levar aos sintomas da intolerância à lactose, o que pode dificultar o diagnóstico da hipolactasia, daí a maior necessidade de testes mais precisos para hipolactasia e intolerância à lactose, como também para outras doenças.

Escoboza *et al.* (2004) também relataram que sintomas relacionados à ingestão de leite foram similares nos sujeitos com e sem hipolactasia primária. Isso poderia ser consequência da ingestão reduzida de leite por indivíduos com hipolactasia, o que é comumente observado. Os nossos resultados concordam com esta hipótese, pois se observou que a ingestão de leite entre os menonitas está relacionada à persistência à lactase.

6.6 TESTE GENÉTICO COMO FERRAMENTA PARA DIAGNÓSTICO DE HIPOLACTASIA PRIMÁRIA

Muitos estudos têm proposto o teste genético para diagnóstico de hipolactasia primária (ou do tipo adulto) baseado no polimorfismo $-13910 C>T$ (RASINPERA *et al.*, 2004; CHAO e SIBLEY, 2004; BÜNING *et al.*, 2005; BODLAJ *et al.*, 2006; SCHIRRU *et al.*, 2007; USAI SATTA *et al.*, 2008; MATTAR *et al.*, 2008; KERBER *et al.*, 2007). Apesar da forte associação encontrada entre este polimorfismo e a hipolactasia primária, Swallow (2006) acredita que este teste não deveria ser usado em todas as populações, pois esta variante não explica este traço genético em populações subsaarianas na África, no Oriente Médio e em chineses (MULCARE *et al.*, 2004; TISHKOFF *et al.*, 2007; INGRAM *et al.*, 2007; ENATTAH *et al.*, 2008; SUN *et al.*, 2007). Em japoneses-brasileiros e chineses, a variante $-22018 G>A$ é um melhor marcador para a persistência da lactase (MATTAR *et al.*, 2010; XU *et al.*, 2010).

Para validar o teste genético para a hipolactasia primária, estudos genéticos têm sido comparados a outros métodos que avaliam o fenótipo, isto é, informam sobre a resposta dos indivíduos à ingestão de leite, como o teste respiratório e a curva glicêmica, ou a expressão da lactase no intestino delgado em biópsias da segunda porção do duodeno. A otimização de uma técnica simples e de baixo custo (PCR-SSP), abordada neste estudo, pode ser vista como um primeiro passo para futuros estudos de associação dessa técnica com outros métodos de diagnóstico e, dessa forma, predizer se o $-13910T$ é um bom marcador para a persistência da lactase em brasileiros. Alguns estudos para tal já foram realizados utilizando outras técnicas de PCR (ESCOBOZA *et al.*, 2004; MATTAR *et al.*, 2007, 2008, 2010; BERNARDES-SILVA *et al.*, 2007; BULHÕES *et al.*, 2007; FRIEDRICH *et al.*, 2012a).

Um fator importante que deve ser considerado em testes genéticos é a idade do paciente. Segundo Di Stefano *et al.* (2009), o declínio da atividade da lactase é um processo que ocorre progressivamente ao longo do tempo. É possível que em indivíduos com idade inferior a 30 anos, os sintomas de má-absorção da lactose se manifestem numa idade mais avançada.

O teste genético para a persistência da lactase informa a respeito do declínio da expressão da enzima lactase geneticamente programado e não sobre causas

secundárias da má-absorção da lactose. Nestes casos, entretanto, pode excluir a hipolactasia primária como causa e outros exames podem ser indicados para avaliar outras doenças gastrointestinais associadas.

Considerando os resultados deste estudo e outros já realizados até o momento para validação desse teste como ferramenta clínica para a persistência da lactase, o polimorfismo *-13910 C>T* mostrou-se um importante marcador genético e a PCR-SSP, um teste aplicável, simples, rápido e adequado para exames de rotina e testes populacionais. Futuros estudos genéticos para avaliar a hipolactasia primária na população brasileira, considerando os diferentes grupos étnicos, bem como investigações de outros polimorfismos também associados à persistência da lactase, devem ser realizados.

7 CONCLUSÕES

- A frequência do alelo *-13910T* é mais elevada na população menonita comparada a euro-brasileira.
- A variante alélica africana *-14010C* não foi encontrada entre os menonitas e euro-brasileiros do sul do Brasil.
- Na população menonita, a persistência da lactase está associada ao hábito de ingerir leite.
- Na população menonita, a hipolactasia primária não está associada aos sintomas de má-digestão do leite.
- O teste genético, com base no marcador *-13910 C>T*, é indicado para o diagnóstico de hipolactasia primária nas populações de descendência europeia do Brasil. Entretanto, devido à diversidade racial neste país e o relato de outros polimorfismos encontrados na África e no Oriente Médio, associados à persistência da lactase, mais estudos são necessários para validar este teste entre outros grupos étnicos brasileiros.

REFERÊNCIAS

ALMON, R.; ENGFELDT, P.; TYSK, C.; SJÖSTRÖM, M.; NILSSON, T. K. Prevalence and trends in adult-type hypolactasia in different age cohorts in Central Sweden diagnosed by genotyping for the adult-type hypolactasia-linked LCT - 13910C > T mutation. **Scand J Gastroenterol**, v. 42, n. 2, p. 165-70, 2007.

ANAGNOSTOU, P.; BATTAGGIA, C.; COIA, V.; CAPELLI, C.; FABBRI, C.; PETTENER, D.; DESTRO-BISOL, G.; LUISELLI, D. Tracing the distribution and evolution of lactase persistence in Southern Europe through the study of the T(-13910) variant. **Am J Hum Biol**, v. 21, n. 2, p. 217-9, 2009.

AROLA, H.; TAMM, A. Metabolism of lactose in the human body. **Scand J Gastroenterol Suppl**, v. 202, p. 21-5, 1994.

AURICCHIO, S.; RUBINO, A.; TOSI, R.; SEMENZA, G.; LANDOLT, M.; KISTLER, H. J.; PRADER, A. The quantitative disaccharidase activity of the human small intestine and acquired lactase deficiency in adults. **Helv Med Acta**, v. 30, n. 4, p. 690-692, 1963.

BABU, J.; KUMAR, S.; BABU, P.; PRASAD, J. H.; GHOSHAL, U. C. Frequency of lactose malabsorption among healthy southern and northern Indian populations by genetic analysis and lactose hydrogen breath and tolerance tests. **Am J Clin Nutr**, v. 91, n. 1, p. 140-146, 2010.

BAYOUMI, R. A.; SAHA, N.; SALIH, A. S.; BAKKAR, A. E.; FLATZ, G. Distribution of the lactase phenotypes in the population of the Democratic Republic of the Sudan. **Hum Genet**, v. 57, n. 3, p. 279-281, 1981.

BAYOUMI, R. A.; FLATZ, S. D.; KÜHNNAU, W.; FLATZ, G. Beja and Nilotes: nomadic pastoralist groups in the Sudan with opposite distributions of the adult lactase phenotypes. **Am J Phys Anthropol**, v. 58, n. 2, p. 173-178, 1982.

BERNARDES-SILVA, C. F.; PEREIRA, A. C.; DA MOTA, G. F. A.; KRIEGER, J. E.; LAUDANNA, A. A. Lactase persistence/non-persistence variants, C/T_13910 and G/A_22018, as a diagnostic tool for lactose intolerance in IBS patients. **Clin Chim Acta**, v. 386, n. 1-2, p. 7-11, 2007.

BERSAGLIERI, T.; SABETI, P. C.; PATTERSON, N.; VANDERPLOEG, T.; SCHAFFNER, S. F.; DRAKE, J. A.; RHODES, M.; REICH, D. E.; HIRSCHHORN, J. N. Genetic signatures of strong recent positive selection at the lactase gene. **Am J Hum Genet**, v. 74, n. 6, p. 1111-1120, 2004.

BODLAJ, G.; STOCHER, M.; HUFNLAGL, 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.

BOLDT, A. B. W.; CULPI, L.; TSUNETO, L. T.; SOUZA, I. R.; KUN, J. F. J. Analysis of the CCR5 gene coding region diversity in Five South American populations reveals two new non-synonymous alleles in Amerindians and high CCR5*D32 frequency in Euro-Brazilians. **Genet Mol Biol**, v. 32, n. 1, p. 12-19, 2009.

BOLDT, A. B.; MESSIAS-REASON, I. J.; LELL, B.; ISSIFOU, S.; PEDROSO, M. L.; KREMSNER, P. G.; KUN, J. F. Haplotype specific-sequencing reveals MBL2 association with asymptomatic Plasmodium falciparum infection. **Malar J**, v. 8, p. 97, 2009.

BOLL, W.; WAGNER, P.; MANTEI N. Structure of the chromosomal gene and cDNAs coding for lactase-phlorizin hydrolase in humans with adult-type hypolactasia or persistence of lactase. **Am J Hum Genet**, v. 48, n. 5, p. 889-902, 1991.

BRAUN-PRADO, K.; VIEIRA MION, A. L.; FARAH PEREIRA, N.; CULPI, L.; PETZLER, M. L. HLA class I polymorphism, as characterised by PCR-SSOP, in a Brazilian exogamic population. **Tissue Antigens**, v. 56, n. 5, p. 417-27, 2000.

BULHÕES, A. C.; GOLDANI, H. A. S.; OLIVEIRA, F. S., MATTE, U. S.; MAZZUCA, R. B.; SILVEIRA, T. R. Correlation between lactose absorption and the C/T-13910 and G/A-22018 mutations of the lactase-phlorizin hydrolase (*LCT*) gene in adult-type hypolactasia. **Braz J Med Biol Res**, v. 40, n. 11, p. 1441-1446, 2007.

BUNCE, M.; TAYLOR, C. J.; WELSH, K. I. Rapid HLA-DQB typing by eight polymerase chain reaction amplifications with sequence-specific primers (PCR-SSP). **Hum Immunol**, v. 37, n. 4, p. 201-206, 1993.

BÜNING, C.; GENSCHEL, J.; JURGA, J.; VODERHOLZER, W.; FIEDLER, E. M.; WORM, M.; WELTRICH, R.; LOCHS, H.; SCHMIDT, H.; OCKENGA, J. Introducing genetic testing for adult-type hypolactasia. **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 Natl Acad Sci**, v. 104, n. 10, p. 3736-3741, 2007.

CARROCCIO, A.; MONTALTO, G.; CAVERA, G.; NOTARBATOLO, A. Lactose intolerance and self-reported milk intolerance: relationship with lactose maldigestion and nutrient intake. Lactase Deficiency Study Group. **J Am Coll Nutr**, v. 17, n. 6, p. 631-636, 1998.

CAVALLI-SFORZA, L. L.; MENOZZI, P.; PIAZZA, A. **The History and Geography of Human Genes**. Princeton: Princeton University Press, 1994.

CAVANAGH, G.; DUNN, A. N.; CHAPMAN, C. E.; METCALFE, P. HPA genotyping by PCR sequence-specific priming (PCR-SSP): a streamlined method for rapid routine investigations. **Transfus Med**, v. 7, n. 1, p. 41-45, 1997.

CHAO, C. K.; SIBLEY, E. PCR-RFLP genotyping assay for a lactase persistence polymorphism upstream of the lactase-phlorizin hydrolase gene. **Genet Test**, v. 8, n. 2, p. 190-193, 2004.

CHARAMES, G. S.; RAMYAR, L.; MITRI, A.; BERK, T.; CHENG, H.; JUNG, J.; BOCANGEL, P.; CHODIRKER, B.; GREENBERG, C.; SPRIGGS, E.; BAPAT, B. A large novel deletion in the APC promoter region causes gene silencing and leads to classical familial adenomatous polyposis in a Manitoba Mennonite kindred. **Hum Genet**, v. 124, n. 5, p. 535-541, 2008.

CHRISTOPHER, N. L.; BAYLESS, T. M. Role of the small bowel and colon in lactose-induced diarrhea. **Gastroenterology**, v. 60, n. 5, p. 845-852, 1971.

COCHET, B.; JUNG, A.; GRIESSEN, M.; BARTHOLDI, P.; SCHALLER, P.; DONATH, A. Effects of lactose on intestinal calcium absorption in normal and lactase-deficient subjects. **Gastroenterology**, v. 84, p. 935-940, 1983.

COELHO, M.; LUISELLI, D.; BERTORELLE, G.; LOPES, A. I.; SEIXAS, S.; DESTRO-BISOL, G.; ROCHA, J. Microsatellite variation and evolution of human lactase persistence. **Hum Genet**, v. 117, n. 4, p. 329-339, 2005.

COELHO, M.; SEQUEIRA, F.; LUISELLI, D.; BELEZA, S.; ROCHA, J. On the edge of Bantu expansions: mtDNA, Y chromosome and lactase persistence genetic variation in southwestern Angola. **BMC Evol Biol**, v. 9, p. 80, 2009.

COOK, G. C.; AL-TORKI, M. T. High intestinal lactase concentrations in adult Arabs in Saudi Arabia. **Br Med J**, v. 3, n. 5976, p. 135-136, 1975.

CURTIN, P.; FEIERMAN, S.; THOMPSON, L.; VANSINA, J. **African History: From Earliest Times to Independence**. London: Longman, 1995.

DAHLQVIST, A.; HAMMOND, J. B.; CRANE, R. K.; DUNPHY, J. V.; LITTMAN, A. Intestinal lactase deficiency and lactose intolerance in adults. Preliminary report. **Gastroenterology**, v. 45, p. 488-491, 1963.

DEMARCHI, D. A.; MOSHER, M. J.; CRAWFORD, M. H. Apolipoproteins (Apoproteins) and LPL Variation in Mennonite Populations of Kansas and Nebraska. **Am J Hum Biol**, 17, p. 593–600, 2005.

DE VRESE, M.; STEGELMANN, A.; RICHTER, B.; FENSELAU, S.; LAUE, C.; SCHREZENMEIR, J. Probiotics—compensation for lactase insufficiency. **Am J Clin Nutr**, v. 73, p. 421–429, 2001.

DISSANAYAKE, A. S.; AL-QUORAIN, A. A.; AL-BREIKI, H.; EL-MUNSHID, H. A.; WOSORNU, L. Prevalence of primary adult lactose malabsorption in the Eastern Region of Saudi Arabia. **Annals of Saudi Med**, v. 10, p. 598-601, 1990.

DI STEFANO, M.; TERULLA, V.; TANA, P.; MAZZOCCHI, S.; ROMERO, E.; CORAZZA, G. R. Genetic test for lactase non-persistence and hydrogen breath test: Is genotype better than phenotype to diagnose lactose malabsorption? **Dig Liver Dis**, v. 41, n. 7, p. 474-479, 2009.

DURHAM, W. **Coevolution: genes, culture, and human diversity**. Stanford University Press, Stanford, CA, 1991.

ENATTAH, N. S.; SAHI, T.; SAVILAHTI, E.; TERWILLIGER, J. D.; PELTONEN, L.; JÄRVELÄ, I. Identification of a variant associated with adult-type hypolactasia. **Nat Genet**, v. 30, n. 2, p. 233-237, 2002.

ENATTAH, N. S.; TRUDEAU, A.; PIMENOFF, V.; MAIURI, L.; AURICCHIO, S.; GRECO L.; et al. Evidence of still-ongoing convergence evolution of the lactase persistence T-13910 alleles in humans. **Am J Hum Genet**, v. 81, n. 3, p. 615-25, 2007.

ENATTAH, N. S.; JENSEN, T. G.; NIELSEN, M.; LEWINSKI, R.; KUOKKANEN, M.; RASINPERA, H.; ET AL. Independent introduction of two lactase persistence alleles into human populations reflects different history of adaptation to milk culture. **Am J Hum Genet**, v. 82, n. 1, p. 57–72, 2008.

ESCOBOZA, P. M.; FERNANDES, M. I.; PERES, L. C.; EINERHAND, A. W.; GALVÃO, L. C. Adult-type hypolactasia: clinical, morphologic and functional characteristics in Brazilian patients at a university hospital. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 39, n. 4, p. 361-5, 2004.

ESTERMANN, C. **Etnografia do Sudoeste de Angola: O Grupo Étnico Herero**. Vol. 3. Lisbon: Junta de Investigações do Ultramar, 1961.

ESTERMANN, C. **Etnografia de Angola (Sudoeste e Centro): Colectânea de Artigos Dispersos**. Vol. 2. Lisbon: Instituto de Investigação Científica Tropical, 1983.

EXCOFFIER, L. G.; LAVAL; SCHNEIDER, S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. **Evol Bioinform Online**, v. 1, p. 47-50, 2005.

FELDMAN, M. W.; CAVALLI-SFORZA, L. L. On the theory of evolution under genetic and cultural transmission with application to the lactose absorption problem. In: FELDMAN, M. W. **Mathematical evolutionary theory**. Princeton: Princeton University Press, 1989. p. 145–173.

FERNANDES, J.; VOS, C. E.; DOUWES, A. C.; SLOTEMA, E.; DEGENHART, H. J. Respiratory hydrogen excretion as a parameter for lactose malabsorption in children. **Am J Clin Nutr**, v. 31, n. 4, p. 597-602, 1978.

FLATZ, G.; ROTTHAUWE, H. W. Lactose nutrition and natural selection. **Lancet**, v. 2, n. 7820, p. 76-7, 1973.

FLATZ, G. Gene dosage effect on intestinal lactase activity demonstrated in vivo. **Am J Hum Genet**, v. 36, n. 2, p. 306–310, 1984.

FLATZ, G.; KÜHNAU, W.; NAFTALI, D. Breath hydrogen test for lactose absorption capacity: importance of timing of hydrogen excretion and of high fasting hydrogen concentration. **Am J Clin Nutr**, v. 39, n. 5, p. 752-755, 1984.

FLATZ, G.; SCHILDGE, C.; SEKOU, H. Distribution of adult lactase phenotypes in the Tuareg of Niger. **Am J Hum Genet**, v. 38, n. 4, p. 515-9, 1986.

FRANCO, M. H.; WEIMER, T. A.; SALZANO, F. M. Blood polymorphisms and racial admixture in two Brazilian populations. **Am J Phys Anthropol**, v. 58, n. 2, p. 127-32, 1982.

FRIEDRICH, D. C.; CALLEGARI-JACQUES, S. M.; PETZL-ERLER, M. L.; TSUNETO, L.; SALZANO, F. M.; HUTZ, M. H. Stability or variation? Patterns of lactase gene and its enhancer region distributions in Brazilian Amerindians. **Am J Phys Anthropol**, v. 147, n. 3, p. 427-32, 2012.

FRIEDRICH, D. C.; SANTOS, S. E.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, Â. K.; HUTZ, M. H. Several different lactase persistence associated alleles and high diversity of the lactase gene in the admixed Brazilian population. **PLoS One**, v. 7, n. 9, p. e46520, 2012.

GALLEGO ROMERO, I.; BASU MALLICK, C.; LIEBERT, A.; CRIVELLARO, F.; CHAUBEY, G.; ITAN, Y.; METSPALU, M.; EAASWARKHANTH, M.; PITCHAPPAN, R.; VILLEMS, R.; REICH, D.; SINGH, L.; THANGARAJ, K.; THOMAS, M. G.; SWALLOW, D. M.; MIRAZÓN LAHR, M.; KIVISILD, T. Herders of Indian and European cattle share their predominant allele for lactase persistence. **Mol Biol Evol**, v. 29, n. 1, p. 249-260, 2012.

GEISER, S.; LERCH, D.; GEISER, S. **Die taufgesinnten Gemeinden**. Karlsruhe: Heinrich Schneider, 1931.

GIFFORD-GONZALEZ, D. In: STAHL, A. B. **African Archeology**. London: Blackwell, p. 187-224, 2005.

GUO, S. W.; THOMPSON, E. A. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. **Biometrics**, v. 48, n. 2, p. 361-372, 1992.

GUTTRIDGE, M. G.; THOMPSON, J.; WORWOOD, M.; DARKE, C. Rapid detection of genetic mutations associated with haemochromatosis. **Vox Sang**, v. 75, n. 3, p. 253-6, 1998.

HABERKORN, B. C.; ERMENS, A. A.; KOEKEN, A.; COBBAERT, C. M.; VAN GULDENER, C. Improving diagnosis of adult-type hypolactasia in patients with abdominal complaints. **Clin Chem Lab Med**, v. 50, n. 1, p. 119-123, 2011.

HARD, G. Die Mennoniten und die Agrarrevolution: Die Rolle der Täufer in der Agrargeschichte des Westrichs. **Mennonitische Geschichtsblätter**, Weierhof, v. 32, n. 27, p. 80-100, 1975.

HARVEY, C. B.; FOX, M. F.; JEGGO, P. A.; MANTEI, N.; POVEY, S.; SWALLOW, D. M. Regional localization of the lactase-phlorizin hydrolase gene, LCT, to chromosome 2q21. **Ann Hum Genet**, v. 57, p. 179-185, 1993.

HARVEY, C. B.; PRATT, W. S.; ISLAM, I.; WHITEHOUSE, D. B.; SWALLOW, D. M. DNA polymorphisms in the lactase gene. Linkage disequilibrium across the 70-kb region. **Eur J Hum Genet**, v. 3, n. 1, p. 27-41, 1995.

HARVEY, C. B.; HOLLOX, E. J.; POULTER, M.; WANG, Y.; ROSSI, M.; AURICCHIO, S.; IQBAL, T. H.; COOPER, B. T.; BARTON, R.; SARNER, M.; KORPELA, R.; SWALLOW, D. M. Lactase haplotype frequencies in caucasians: association with the lactase persistence/non-persistence polymorphism. **Ann Hum Genet**, v. 62, p. 215-223, 1998.

HE, T.; PRIEBE, M. G.; HARMSSEN, H. J.; STELLAARD, F.; SUN, X.; WELLING, G. W.; VONK, R. J. Colonic fermentation may play a role in lactose intolerance in humans. **J Nutr**, v. 136, n. 1, p. 58-63, 2006.

HERTZLER, S. R.; SAVAIANO, D. A. Colonic adaptation to daily lactose feeding in lactose maldigesters reduces lactose intolerance. **Am J Clin Nutr**, v. 64, n. 2, p. 232-6, 1996.

HEYER, E.; BRAZIER, L.; SEGUREL, 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.

HIGUCHI, R.; VON BEROLDINGEN, C.H.; SENSABAUGH, G. F.; ERLICH, H. A. DNA typing from single hairs. **Nature**, v. 332, n. 6164, p. 543-546, 1988.

HO, M. W.; POVEY, S.; SWALLOW, D. Lactase polymorphism in adult british natives : estimating allele frequencies by enzyme assays in autopsy samples. **Am J Hum Genet**, v. 34, p. 650-657, 1982.

HOGENAUER, C.; HAMMER, H. F.; MELLITZER, K.; RENNER, W.; KREJS, G. J.; TOPLAK, H. Evaluation of a new DNA test compared with the lactose hydrogen breath test for the diagnosis of lactase non-persistence. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, v. 17, n. 3, p. 371–376, 2005.

HOLDEN, C.; MACE, R. Phylogenetic analysis of the evolution of lactose digestion in adults. **Hum Biol**, v. 69, n. 5, p. 605–628, 1997.

HOLLOX, E. J.; POULTER, M.; WANG, Y.; KRAUSE, A.; SWALLOW, D. M. Common polymorphism in a highly variable region upstream of the human lactase gene affects DNA-protein interactions. **Eur J Hum Genet**, v. 7, n. 7, p. 791-800, 1999.

HOLLOX, E. J.; POULTER, M.; ZVARIK, M.; FERAK, V.; KRAUSE, A.; JENKINS, T.; SAHA, N.; OZLOV, A. I.; SWALLOW, D. M. Lactase Haplotype Diversity in the Old World. **Am J Hum Genet**, v. 68, n. 1, p. 160–172, 2001.

HÜNEMEIER, T.; CARVALHO, C.; MARRERO, A. R.; SALZANO, F. M.; PENA S. D. J.; BORTOLINI M. C. Niger-Congo Speaking Populations and the formation of the Brazilian gene pool: mtDNA and Y-chromosome data. **Am J Phys Anthropol**, v. 133, n. 2, p. 854-867, 2007.

IBGE. **Brasil: 500 anos de povoamento**. Rio de Janeiro: IBGE, 2000.

IMTIAZ, F.; SAVILAHTI, E.; SARNESTO, A.; TRABZUNI, D.; AL-KAHTANI, K.; KAGEVI, I.; RASHED, M. S.; MEYER, B. F.; JÄRVELÄ, I. The T/G 13915 variant upstream of the lactase gene (LCT) is the founder allele of lactase persistence in an urban Saudi population. **J Med Genet**, v. 44, n. 10, p. e89, 2007.

INNES, A. M.; CHUDLEY, A. E.; REED, M. H.; SHUCKETT, E. P.; HILDES-RIPSTEIN, G. E.; GREENBERG, C. R. Third Case of Cerebral, Ocular, Dental, Auricular, Skeletal Anomalies (CODAS) Syndrome, Further Delineating a New Malformation Syndrome: First Report of an Affected Male and Review of Literature. **Am J Med Genet**, v. 102, n. 1, p. 44-47, 2001

INGRAM, C. J. E.; ELAMIN, M. F.; MULCARE, C. A.; WEALE, M. E.; TAREKEGN, A.; RAGA, T. O.; BEKELE, E.; ELAMIN, F. M.; THOMAS, M. G.; BRADMAN, N.; SWALLOW, D. M. A novel polymorphism associated with lactose tolerance in Africa: multiple causes for lactase persistence? **Hum Genet**, v. 120, n. 6, p. 779–788, 2007.

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

INGRAM, C. J. E.; RAGA, T. O.; TAREKEGN, A.; BROWNING, S. L.; ELAMIN, M. F.; BEKELE, E.; THOMAS, M. G.; WEALE, M. E.; BRADMAN, N.; SWALLOW, D. M. Multiple rare variants as a cause of a common phenotype: several different lactase persistence associated alleles in a single ethnic group. **J Mol Evol**, v. 69, n. 6, p. 579-588, 2009.

ITAN, Y.; POWELL, A.; BEAUMONT, M. A.; BURGER, J.; THOMAS, M. G. The origins of lactase persistence in Europe. **PLoS Comput Biol**, v. 5, n. 8, p. e1000491, 2009.

ITAN, Y.; JONES, B.; INGRAM, C.; SWALLOW, D.; THOMAS, M. G. A worldwide correlation of lactase persistence phenotype and genotypes. **BMC Evol Biol**, v. 10, p. 36, 2010.

JAWORSKI, M. A.; SLATER, J. D.; SEVERINI, A.; HENNIG, K. R.; MANSOUR, G.; MEHTA, J. G.; JESKE, R.; SCHLAUT, J.; PAK, C. Y.; YOON, J. W. Unusual clustering of diseases in a Canadian Old Colony (Chortitza) Mennonite kindred and community. **CMAJ**, v. 138, n. 11, p. 1017-1025, 1988.

JOHNSON, A. O.; SEMENYA, J. G.; BUCHOWSKI, M. S.; ENWONWU, C. O.; SCRIMSHAW, N. S. Correlation of lactose maldigestion, lactose intolerance, and milk intolerance. **Am J Clin Nutr**, v. 57, n. 3, p. 399-401, 1993.

JORDAN, F.; MCWHINNIE, A. J.; TURNER, S.; GAVIRA, N.; CALVERT, A. A.; CLEAVER, S. A.; HOLMAN, R. H.; GOLDMAN, J. M.; MADRIGAL, J. A. Comparison of HLA-DRB1 typing by DNA-RFLP, PCR-SSO and PCR-SSP methods and their application in providing matched unrelated donors for bone marrow transplantation. **Tissue Antigens**, v. 45, n. 2, p. 103-110, 1995.

KERBER, M.; OBERKANINS, C.; KRIEGSHÄUSER, G.; KOLLERITS, B.; DOSSENBACH-GLANINGER, A.; FUCHS, D.; LEDOCHOWSKI, M. Hydrogen breath testing versus LCT genotyping for the diagnosis of lactose intolerance: a matter of age? **Clin Chim Acta**, v. 383, n. 1-2, p. 91-96, 2007.

KETTUNEN, J.; SILANDER, K.; SAARELA, O.; AMIN, N.; MÜLLER, M.; TIMPSON, N.; SURAKKA, I.; RIPATTI, S.; LAITINEN, J.; HARTIKAINEN, A. L.; POUTA, A.; LAHERMO, P.; ANTTILA, V.; MÄNNISTÖ, S.; JULA, A.; VIRTAMO, J.; SALOMAA, V.; LEHTIMÄKI, T.; RAITAKARI, O.; GIEGER, C.; WICHMANN, E.

H.; VAN DUIJN, C. M.; SMITH, G. D.; MCCARTHY, M. I.; JÄRVELIN, M. R.; PEROLA, M.; PELTONEN, L. European lactase persistence genotype shows evidence of association with increase in body mass index. **Hum Mol Genet**, v. 19, n. 6, p. 1129-1136, 2010.

KLASSEN, P.P. **Die rußlanddeutschen Mennoniten in Brasilien**. Vol. 1. Castro: Kugler, 1995.

KLEIN, H. S. As origens africanas dos escravos brasileiros. In: PENA, S. D. J. ed. **Homo brasiliis. Aspectos genéticos, linguísticos, históricos e socioantropológicos da formação do povo brasileiro**. Ribeirão Preto: FUNPEC Editora, 2000. p. 93–112.

KUCHAY, R. A.; THAPA, B. R.; MAHMOOD, A.; MAHMOOD, S. Effect of C/T -13910 cis-acting regulatory variant on expression and activity of lactase in Indian children and its implication for early genetic screening of adult-type hypolactasia. **Clin Chim Acta**, v. 412, n. 21-22, p. 1924-1930, 2011.

LEWIN, B. **Genes**. Oxford: Oxford University Press, 1997.

LEWINSKI, R. H. T-13910 DNA variant associated with lactase persistence interacts with Oct-1 and stimulates lactase promoter activity in vitro. **Hum Mol Genet**, v. 14, n. 24, p. 3945-3953, 2005.

LLOYD, M.; MEVISSSEN, G.; FISCHER, M.; OLSEN, W.; GOODSPEED, D.; GENINI, M.; BOLL, W.; SEMENZA, G.; MANTEI, N. Regulation of intestinal lactase in adult hypolactasia. **J Clin Invest**, v. 89, n. 2, p. 524-529, 1992.

LOMER, M. C.; PARKES, G. C.; SANDERSON, J. D. Review article: lactose intolerance in clinical practice--myths and realities. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 27, n. 2, p. 93-103, 2008.

LU, M.; THOMPSON, W. A.; LAWLOR, D. A.; REVEILLE, J. D.; LEE, J. E. Rapid direct determination of HLA-DQB1 * 0301 in the whole blood of normal individuals and cancer patients by specific polymerase chain reaction amplification. **J Immunol Methods**, v. 199, n. 1, p. 61-8, 1996.

MALSTRÖMT, H.; LINDERHOLM, A.; LIDEN, K.; STORÅ, J.; MOLNAR, P.; HOLMLUND, G.; JAKOBSSON, M.; GÖTHERSTRÖM, A. High frequency of lactose intolerance in a prehistoric-gatherer population in northern Europe. **BMC Evol Biol**, v. 10, p. 89-97, 2010.

MARTINS, R. **História do Paraná**. 3. ed. Curitiba: Guaíra, 1940.

MATTAR, R.; MONTEIRO, M. S.; VILLARES, C. A.; DOS SANTOS, A. F.; CARRILHO, F. J. Single nucleotide polymorphism C/T-13910, located upstream of the lactase gene, associated with adult-type hypolactasia: Validation for clinical practice. **Clin Biochem**, v. 41, n. 7-8, p. 628–630, 2008.

MATTAR, R.; MONTEIRO, M. S.; VILLARES, C. A.; SANTOS, A. F.; SILVA, J. M. K.; CARRILHO, F. J. Frequency of LCT-13910C>T single nucleotide polymorphism associated with adult-type hypolactasia/lactase persistence among Brazilians of different ethnic groups. **Nutr J**, v. 8, p. 46-49, 2009.

MATTAR, R.; MONTEIRO, M. S.; DA SILVA, J. M. K.; CARRILHO, F. J. LCT-22018G>A single nucleotide polymorphism is a better predictor of adult-type hypolactasia/lactase persistence in Japanese-Brazilians than LCT-13910C>T. **Clinics**, v. 65, n. 12, p. 1399-1400, 2010.

MATTAR, R.; MAZO, D. F. C. Intolerância à lactose: mudança de paradigmas com a biologia molecular. **Rev Assoc Med Bras**, v. 56, n.2, p. 230-236, 2010.

MATTHEWS, S. B.; CAMPBELL, A. K. When sugar is not so sweet. **Lancet**, v. 355, p. 1309, 2000.

MATTHEWS, S. B.; CAMPBELL, A. K. Neuromuscular symptoms associated with lactose intolerance. **Lancet**, v. 356, p. 511, 2000.

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

MCCRACKEN, R. D. Lactase deficiency: An example of dietary evolution. **Curr Anthropol**, v. 12, p. 479–500, 1971.

MELTON, P. E.; ZLOJUTRO, M.; KIMMINAU, K.; CRAWFORD, M. H. Biological Aging and Cox Hazard Analysis of Mortality Trends in a Mennonite Community From South-Central Kansas. **Am J Hum Biol**, n. 18, n. 3, p. 387-401, 2006.

MICHAELE, F. A. S. Formação étnica do Paraná. In: EL-KHATIB, F. **História do Paraná**. Vol .3. Curitiba: Grafipar, 1969. p.71-142.

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*) (*C513.9kbT*) does not predict or cause the lactase-persistence phenotype in africans. **Am J Hum Genet**, v. 74, n. 6, p. 1102–1110, 2004.

MULCARE, C. A. **The evolution of the lactase persistence phenotype**. London: University of London, 2006.

MYLES, S.; BOUZEKRI, N.; HAVERFIELD, E.; CHERKAOUI, M.; DUGOUJON, J. M.; WARD, R. Genetic evidence in support of a shared Eurasian-North African dairying origin. **Hum Genet**, v. 117, n. 1, p. 34-42, 2005.

NAGY, D.; BOGÁCSI-SZABÓ, E.; VÁRKONYI, A.; CSÁNYI, B.; CZIBULA, A.; BEDE, O.; TARI, B.; RASKÓ, I. Prevalence of adult-type hypolactasia as diagnosed with genetic and lactose hydrogen breath tests in Hungarians. **Eur J Clin Nutr**, v. 63, n. 7, p. 909-12, 2009.

NATHALANG, O.; TANTIMAVANICH, S.; NILLAKUPT, K.; ARNUTTI, P.; JARUCHAIMONTREE, C. HLA-B27 testing in Thai patients using the PCR-SSP technique. **Tissue Antigens**, v. 67, n. 3, p. 233-236, 2006.

NÉMETH, K.; PLUMB, G. W.; BERRIN, J. G.; JUGE, N.; JACOB, R.; NAIM, H. Y.; WILLIAMSON, G.; SWALLOW, D. M.; KROON, P. A. Deglycosylation by small intestinal epithelial cell betaglucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans. **Eur J Nutr**, v. 42, p. 29–42, 2003.

NEWMAN, J. L. **The peopling of Africa: A Geographical Interpretation**. New Haven: Yale University Press, 1995.

NICKEL, M.; KLIEWER, H. G. **Witmarsum em quatro décadas 1951-1991**. Castro: Kugler, 1991.

NILSSON, T. K.; OLSSON, L. A. Simultaneous genotyping of three lactose tolerance-linked polymorphisms *LCT* -13907CNG, *LCT* -13910CNT and *LCT* -13915TNG with Pyrosequencing technology. **Clin Chem Lab Med**, v. 46, p. 80–84, 2008.

OJETTI, V.; NUCERA, G.; MIGNECO, A.; GABRIELLI, M.; LAURITANO, C.; DANESE, S.; ZOCCO, M. A.; NISTA, E. C.; CAMMAROTA, G.; DE LORENZO, A.; GASBARRINI, G.; GASBARRINI, A. High prevalence of Celiac disease in patients with lactose intolerance. **Digestion**, v. 71, n. 2, p. 106-110, 2005.

OLDS, L. C.; SIBLEY, E. Lactase persistence DNA variant enhances lactase promoter activity in vitro: functional role as a *cis* regulatory element. **Hum Mol Genet**, v. 12, n. 18, p. 2333–2340, 2003.

OLDS, L. C.; AHN, J. K.; SIBLEY, E. 13915*G DNA polymorphism associated with lactase persistence in Africa interacts with Oct-1. **Hum Genet**, v. 129, n. 1, p. 111–113, 2011.

ORTON, N. C.; INNES, A. M.; CHUDLEY, A. E.; BECH-HANSEN, N. T. Unique Disease Heritage of the Dutch-German Mennonite Population. **Am J Med Genet**, v. 146A, n. 8, p. 1072-1087, 2008.

PAULS JUNIOR, P. **Witmarsum in Paraná**. Curitiba : Imprimax, 1976.

PENA, S. D.; DI PIETRO, G.; FUCHSHUBER-MORAES, M.; GENRO, J. P.; HUTZ, M. H.; KEHDY, F. DE S.; KOHLRAUSCH, F.; MAGNO, L. A.; MONTENEGRO, R. C.; MORAES, M. O.; DE MORAES, M. E.; DE MORAES, M. R.; OJOPI, E. B.; PERINI, J. A.; RACCIUPI, C.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, A. K.; RIOS-SANTOS, F.; ROMANO-SILVA, M. A.; SORTICA, V. A.; SUAREZ-KURTZ, G. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. **PLoS One**, v. 6, n. 2, p. e17063, 2011.

PENNER, H.; GERLACH, H.; QUIRING, H. **Weltweite Bruderschaft**. Weierhof: Mennonitischer Geschichtsverein, 1984.

POHL, D.; SAVARINO, E.; HERSBERGER, M.; BEHLIS, Z.; STUTZ, B.; GOETZE, O.; ECKARDSTEIN, A. V.; FRIED, M.; TUTUIAN, R. Excellent agreement between genetic and hydrogen breath tests for lactase deficiency and the role of extended symptom assessment. **Br J Nutr**, v. 104, n. 6, p. 900–907, 2010.

POLONI, E. S.; SEMINO, O.; PASSARINO, G.; SANTACHIARA-BENERECETTI, A. S.; DUPANLOUP, I.; LANGANEY, A.; EXCOFFIER, L. Human genetic affinities for Y-chromosome P49a,f/TaqI haplotypes show strong correspondence with linguistics. **Am J Hum Genet**, v. 61, p. 1015–1035, 1997.

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.

PRADO, P. **Retrato do Brasil: ensaio sobre a tristeza brasileira**. São Paulo: Instituição Brasileira de Difusão Cultural, 1981.

PROBST, C. M.; BOMPEIXE, E. P.; PEREIRA, N. F.; DE O DALALIO, M. M.; VISENTAINER, J. E.; TSUNETO, L. T.; PETZL-ERLER, M. L. HLA polymorphism and evaluation of European, African, and Amerindian contribution to the white and mulatto populations from Paraná, Brazil. **Hum Biol**, v. 72, n. 4, p. 597-617, 2000.

QUIRING, W.; BARTEL, H. **Als ihre Zeit erfüllt war: 150 Jahre Bewährung in Russland**. 2.ed. Saskatoon: Modern, 1964.

RANA, S. V.; BHASIN, D. K.; VINAYAK, V. K. Lactose hydrogen breath test in Giardia lamblia-positive patients. **Dig Dis Sci**, v. 50, n. 2, p. 259-261, 2005.

RASINPERÄ, H.; SAVILAHTI, E.; ENATTAH, N. S.; KUOKKANEN, M.; TÖTTERMAN, N.; LINDAHL, H.; JÄRVELÄ, I.; KOLHO, K-L. A genetic test which can be used to diagnose adult-type hypolactasia in children. **Gut**, v. 53, n. 11, p. 1571–1576, 2004.

RATZLAFF, G. Die deutschen Volksgruppen in Paraguay - ein kurzer Überblick. In:__. **Deutsches Jahrbuch für Paraguay**. Asunción: Makrografic, 1989.

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. An exact test for population differentiation. **Evolution**, v. 49, n. 6, p. 1280-1283, 1995.

REDINHA, J. **Distribuição Étnica de Angola**. Luanda: Cita, 1971.

RIDLEY, M. **Evolução**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

RIVERS, C. A.; BARTON, J. C.; ACTON, R. T. A rapid PCR-SSP assay for the hemochromatosis-associated Tyr250Stop mutation in the TFR2 gene. **Genet Test**, v. 5, n. 2, p. 131-4, 2001.

ROBB, T. A.; DAVIDSON, G. P. Advances in breath hydrogen quantitation in paediatrics: sample collection and normalization to constant oxygen and nitrogen levels. **Clin Chim Acta**, v. 111, n. 2-3, p. 281-285, 1981.

SABETI, P. C.; SCHAFFNER, S. F.; FRY, B.; LOHMUELLER, J.; VARILLY, P.; SHAMOVSKY, O.; PALMA, A.; MIKKELSEN, T. S.; ALTSHULER, D.; LANDER, E. S. Positive natural selection in the human lineage. **Science**, v. 312, n. 5780, p. 1614-1620, 2006.

SANTOS, A. S. Historical roots of the “Whitening” of Brazil. **Latin Am Persp**, v. 29, p. 61–82, 2002.

SAHI, T.; ISOKOSKI, M.; JUSSILA, J.; LAUNIALA, K.; PYÖRÄLÄ, K. Recessive inheritance of adult-type lactose malabsorption. **Lancet**, v. 2, n. 7833, 1973.

SALZANO, F. M.; BORTOLINI, M. C. **Evolution and genetics of Latin American populations**. Cambridge: Cambridge University Press, 2002.

SCHAUKAT, A.; LEVITT, M. D.; TAYLOR, B. C.; MACDONALD, R.; SHAMLIYAN, T. A.; KANE, R. L.; WILT, T. J. Systematic review : effective management strategies for lactose intolerance. **Ann Intern Med**, v. 152, n. 12, p. 797-803, 2010.

SCHIRRU, E.; CORONA, V.; USAI SATTA, P.; et al. 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.

SCHNEIDER, H.; SALZANO, F. M. Gm allotypes and racial admixture in two Brazilian populations. **Hum Genet**, v. 53, n. 1, p. 101-105, 1979.

SEVÁ-PEREIRA, A.; BEIGUELMAN, B. Primary lactose malabsorption in healthy Brazilian adult caucasoid, negroid and mongoloid subjects. **Arq Gastroenterol**, v. 19, n. 3, p. 133-138, 1982.

SEYFERTH, G. A antropologia e a teoria do branqueamento de raça no Brasil: a tese de João Batista de Lacerda. **Rev Museu Paulista**, v. 30, p. 81–98, 1985.

SEYFERTH, G. A estratégia do branqueamento. **Ciência Hoje**, v. 5, p. 54–56, 1986.

SIMOONS, F. J. Primary adult lactose intolerance and the milking habit: A problem in biological and cultural interrelations. I. Review of the medical research. **Am J Dig Dis**, v. 14, n. 12, p. 819–836, 1969.

SIMOONS, F. J. Primary adult lactose intolerance and the milking habit: A problem in biological and cultural interrelations. II. A culture historical hypothesis. **Am J Dig Dis**, v. 15, n. 8, p. 695–710, 1970.

SIMOONS, F. J. The geographic hypothesis and lactose malabsorption. A weighing of the evidence. **Am J Dig Dis**, v. 23, n. 11, p. 963-80, 1978.

SIMOONS, F. J. Age of onset of lactose malabsorption. **Pediatrics**, v. 66, n. 4, p. 646-648, 1980.

SNOOK, C. R.; MAHMOUD, J. N.; CHANG, W. P. Lactose tolerance in adult Jordanian Arabs. **Trop Geogr Med**, v. 28, n. 4, p. 333-335, 1976.

STRAUSS, K. A.; WARDLEY, B.; ROBINSON, D.; HENDRICKSON, C.; RIDER, N. L.; PUFFENBERGER, E. G.; SHELMER, D.; MOSER, A. B.; MORTON, D. H. Classical maple syrup urine disease and brain development: Principles of management and formula design. **Mol Genet Metab**, v. 99, n. 4, p. 333-345, 2010.

SUN, H. M.; QIAO, Y. D.; CHEN, F.; XU, L. D.; BAI, J.; FU, S. B. The lactase gene - 13910T allele an not predict the lactase-persistence phenotype in north China. **Asia Pac J Clin Nutr**, v. 16, n. 4, p. 598–601, 2007.

SWALLOW, D. M.; HOLLOX, E. J. The genetic polymorphism of intestinal lactase activity in adult humans. In: SCRIVER, C. R.; BEAUDET, A. L.; SLY, W. S.; VALLE, D. **The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease**. New York: McGraw-Hill, 2000. p. 1651–1662.

SWALLOW, D. M. Genetics of Lactase Persistence and Lactose Intolerance. **Annu Rev Genet**, v. 37, p. 197-219, 2003.

SWALLOW, D. M. DNA test for hypolactasia premature. **Gut**, v. 55, p. 131–132, 2006.

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 test for lactose maldigestion. **Clin Gastroenterol Hepatol**, v. 5, p. 192–196, 2007.

TAG, C. G.; OBERKANINS, C.; KRIEGSHÄUSER, G.; INGRAM, C. J. E.; SWALLOW, D. M.; GRESSNER, A. M.; LEDOCHOWSKI, M.; WEISKIRCHEN, R. Evaluation of a novel reversehybridization StripAssay for typing DNA variants useful in diagnosis of adult-type hypolactasia. **Clin Chim Acta**, v. 392, p. 58–62, 2008.

TAN, J.; XIE, T.; XU, Q. HLA-DR typing by standard serology and PCR-amplification with sequence-specific primers: a comparative study. **Zhonghua Yi Xue Za Zhi**, v. 77, n. 1, p. 28-30, 1997.

TISHKOFF, S. A.; REED, F. A.; RANCIARO, A.; VOIGHT, B. F.; BARBBITT, C. C.; SILVERMAN, J. S.; POWELL, K.; MORTENSEN, H. 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. **Nat Genet**, v. 39, n. 1, p. 31-40, 2007.

THOMAS, S.; WALKER-SMITH, J. A.; SENEWIRATNE, B.; HJELM, M. Age dependency of the lactase persistence and lactase restriction phenotypes among children in Sri Lanka and Britain. **J Trop Pediatr**, v. 36, n. 2, p. 80-85, 1990.

THONNARD, J.; DELDIME, F.; HEUSTERSPREUTE, M.; DELEPAUT, B.; HANON, F. HLA Class II Genotyping: Two Assay Systems Compared. **Clin Chem**, v. 41, n. 4, p. 553-556, 1995.

TREUDLER, R.; TEBBE, B.; STEINHOFF, M.; ORFANOS, C. E. Familial aquagenic urticaria associated with familial lactose intolerance. **J Am Acad Dermatol**, v. 47, n. 4, p. 611-613, 2002.

TROELSEN, J. T. Adult-type hypolactasia and regulation of lactase expression. **Biochim Biophys Acta**, v. 1723, n. 1-3, p. 19-32, 2005.

TRONCON, L. E.; COLLARES, E.F.; OLIVEIRA, R. B.; PADOVAN, W.; MENEGHELLI, U. G. Lactose malabsorption in adult patients at the Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto. **Arq Gastroenterol**, v. 18, n. 3, p. 106-112, 1981.

TURSI, A.; BRANDIMARTE, G.; GIORGETTI, G. M.; ELISEI, W. Transient Lactose malabsorption in patients affected by symptomatic uncomplicated diverticular disease of the colon. **Dig Dis Sci**, v. 51, n. 3, p. 461-465, 2006.

USAI SATTA, P.; CONGIA, M.; SCHIRRU, E.; SCARPA, M.; MURA, G. Genetic testing is ready to change the diagnostic scenario of lactose malabsorption. **Gut**, v. 57, n. 1, p. 137-138, 2008.

WANG, Y.; HARVEY, C. B.; PRATT, W. S.; SAMS, V. R.; SARNER, M.; ROSSI, M.; AURICCHIO, S.; SWALLOW, D. M. The lactase persistence/non-persistence polymorphism is controlled by a cis-acting element. **Hum Mol Genet**, v. 4, n. 4, p. 657-662, 1995.

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, n. 6, p. 1230-1236, 1998.

WEIJERS, H. A.; VA DE KAMER, J. H.; DICKE, W. K.; IJSSELING, J. Diarrhoea caused by deficiency of sugar splitting enzymes. I. **Acta Paediatr**, v. 50, p. 55-71, 1961.

WEST A R, OATES PS. Decreased sucrase and lactase activity in iron deficiency is accompanied by reduced gene expression and upregulation of the transcriptional repressor PDX-1. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 289, n. 6, p. 1108-1114, 2005.

WITTENBERG, D. F.; MOOSA, A. Lactose maldigestion--age-specific prevalence in black and Indian children. **S Afr Med J**, v. 78, n. 8, p. 470-472, 1990.

XU, L.; SUN, H.; ZHANG, X.; WANG, J.; SUN, D.; CHEN, F.; BAI, J.; FU, S. The -22018A allele matches the lactase persistence phenotype in northern Chinese populations. **Scand J Gastroenterol**, v. 45, n. 2, p. 168-174, 2010.

ZAGO, M.A.; FIGUEIREDO, M.S.; OGO, S.H. Bantu beta s cluster haplotype predominates among Brazilian Blacks. **Am J Phys Anthropol**, v. 88, p. 295-298, 1992.

APÊNDICE

APÊNDICE 1 – QUESTIONÁRIO PARA LEVANTAMENTO DE DADOS.....98

APÊNDICE 2 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....99

PROTOCOLO DE INCLUSÃO DE INDIVÍDUOS

“PREVALÊNCIA DA PERSISTÊNCIA DA LACTASE NA POPULAÇÃO MENONITA DO
BRASIL”

DADOS PESSOAIS

Nome: _____

Telefones: _____

Cidade: _____

Data de nascimento: ____/____/____ Sexo: () Masculino () Feminino

QUESTIONÁRIO

1. Com que frequência você toma leite?

2. Você apresenta algum dos seguintes sintomas de má-digestão do leite?

Diarréia: () Sim () Não

Flatulência (eliminação de gases intestinais): () Sim () Não

Distensão abdominal (aumento de volume do abdómen): () Sim () Não

Dor abdominal: () Sim () Não

Vômito: () Sim () Não

Com que frequência? () Sempre () Frequentemente () Às vezes () Raramente

OBS: _____

3. Você apresenta alguma(s) das seguintes doenças?

() Intolerância à lactose

() Doença de Crohn

() Enterite Infecciosa

() Enterite induzida por drogas ou radiação

() Giardíase

() Doença diverticular do cólon

() Doença Celíaca

() Anemia

() Doença inflamatória intestinal

4. Alguém da tua família tem intolerância à lactose?

() Sim () Não

Caso sim, quantos e quem da família? _____

TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Projeto: “Prevalência da Persistência da Lactase na População Menonita do Brasil”

Investigador: Stefanie Epp Boschmann

Local da Pesquisa: Laboratório de Imunopatologia Molecular – Serviço de Anatomia Patológica – HC/UFPR

Endereço e telefone (celular): Rua Padre Camargo, 280, Alto da Glória, Curitiba (Setor Ciências da Saúde),
Tel. celular: (41) 9167-1363 (Stefanie)

PROPÓSITO DA INFORMAÇÃO AO PACIENTE E DOCUMENTO DE CONSENTIMENTO

Você está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa, coordenada por um profissional de saúde agora denominado pesquisador. Para poder participar, é necessário que você leia este documento com atenção. Ele pode conter palavras que você não entende. Por favor, peça aos responsáveis pelo estudo para explicar qualquer palavra ou procedimento que você não entenda claramente.

O propósito deste documento é dar a você as informações sobre a pesquisa e, se assinado, dará a sua permissão para participar no estudo. O documento descreve o objetivo, procedimentos, benefícios e eventuais riscos ou desconfortos caso queira participar. Você só deve participar do estudo se você quiser. Você pode se recusar a participar ou se retirar deste estudo a qualquer momento.

INTRODUÇÃO

Os menonitas fazem parte de um grupo étnico que tem uma longa história, desde o século XVI, caracterizada pelo isolamento em colônias e pelos casamentos endogâmicos. Devido a este fato, diversas doenças são comuns entre eles, como câncer e diabetes. Acreditamos que a causa para isso são mudanças em células do organismo que podem passar de pais para filhos (mutações hereditárias).

A *lactase*, uma substância encontrada em células do nosso intestino, é essencial em recém-nascidos cuja fonte de nutrição exclusiva é o leite. Esta substância transforma a lactose (principal componente de carboidrato do leite) em componentes (glicose e galactose) que são absorvidos pelo intestino. A sua atividade diminui após o desmame na maioria das pessoas. A “persistência da lactase” caracteriza-se pela presença da enzima *lactase* em grande ou média quantidade em pessoas adultas e é causada por alterações em uma parte específica das nossas células. Pessoas com “lactase não persistente”, também chamada de “hipolactasia” (apresentam *lactase* em pequena quantidade após a infância), podem desenvolver a intolerância à lactose, caracterizada pela presença de sintomas de má-digestão do leite, como dor abdominal, flatulência e diarreia. Uma alteração nas células (mutação hereditária) relacionada com a “persistência da lactase” é encontrada, especialmente, em europeus. Os menonitas são descendentes europeus e, portanto, existe a possibilidade de que eles apresentem a “persistência da lactase”.

Da mesma forma, outras doenças encontradas entre os menonitas podem ter alguma relação com mudanças celulares transmitidas de pais para filhos. Através de futuras pesquisas poderíamos entender a causa dessas doenças e ajudar por meio de orientações e aconselhamento genético.

PROPÓSITO DO ESTUDO

Pretendo, através desse estudo, investigar mudanças nas células, responsáveis pela “persistência da lactase”, que predominam entre os menonitas. Indivíduos que não apresentam estas alterações podem desenvolver a intolerância à lactose após a infância. Nosso propósito é investigar esta condição na população Menonita do Brasil.

Pretendemos também usar o material biológico, adquirido por meio da coleta de sangue, para formar um “banco de material biológico” para futuros projetos de pesquisa. Entretanto, este material será apenas utilizado em outros projetos de pesquisa, caso estes sejam aprovados pelo Comitê de Ética. Este banco será mantido por 05 anos, sob a responsabilidade da Professora Iara Jose de Messias-Reason, sendo que, se necessário, serão solicitados mais 05 anos para o Comitê de Ética. Após este período, o material será descartado conforme as normas da Vigilância Sanitária.

SELEÇÃO

Nesta pesquisa incluímos pessoas que fazem parte da população menonita do Brasil, apenas adultos, maiores de 18 anos, de ambos os sexos e que assinarem o termo de consentimento livre e esclarecido.

Não farão parte da pesquisa pessoas com idade abaixo de 18 anos e que não concordarem em assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

PROCEDIMENTOS

Este estudo envolve duas etapas: aplicação de um questionário e coleta de sangue. Haverá baixo risco relacionado à coleta de sangue. Você poderá apresentar uma leve dor, ardência e a formação de manchas roxas. Em caso de alguma complicação maior, nos responsabilizamos para que seja atendido por algum profissional de saúde ou, quando necessário, por uma equipe multiprofissional de saúde, sendo o atendimento gratuito. Caso

você apresente tendência para desenvolver a intolerância à lactose, você será beneficiado por meio de orientações dadas por um profissional de saúde.

PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA:

Sua decisão em participar deste estudo é voluntária. Você pode decidir não participar no estudo. Uma vez que você decidiu participar do estudo, você pode retirar seu consentimento e participação a qualquer momento. Se você decidir não continuar no estudo e retirar sua participação, você não perderá qualquer benefício ao qual você tem direito.

CUSTOS

Não haverá nenhum custo a você relacionado aos procedimentos previstos no estudo.

PAGAMENTO PELA PARTICIPAÇÃO

Sua participação é voluntária, portanto você não será pago por sua participação neste estudo.

PERMISSÃO PARA REVISÃO DE REGISTROS, CONFIDENCIALIDADE E ACESSO AOS REGISTROS:

O Investigador responsável pelo estudo e equipe irá coletar informações sobre você. Em todos esses registros um código substituirá seu nome. Todos os dados coletados serão mantidos de forma confidencial. Os dados coletados serão usados para a avaliação do estudo, membros das Autoridades de Saúde ou do Comitê de Ética podem revisar os dados fornecidos. Os dados também podem ser usados em publicações científicas sobre o assunto pesquisado. Porém, sua identidade não será revelada em qualquer circunstância.

Você tem direito de acesso aos seus dados. Você pode discutir esta questão mais adiante com a pessoa responsável pelo estudo.

CONTATO PARA PERGUNTAS

Se você ou seus parentes tiver (em) alguma dúvida com relação ao estudo, direitos do indivíduo, ou no caso de danos relacionados ao estudo, você deve contatar Stefanie Epp Boschmann, pelo telefone (41) 3022-0168 (residencial) ou pelo celular (41) 9167-1363. Se você tiver dúvidas sobre seus direitos como participante da pesquisa, você pode contatar Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, pelo telefone: 3360-1896. O CEP trata-se de um grupo de indivíduos com conhecimento científicos e não científicos que realizam a revisão ética inicial e continuada do estudo de pesquisa para mantê-lo seguro e proteger seus direitos.

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO DO PACIENTE:

Eu li e discuti com o investigador responsável pelo presente estudo os detalhes descritos neste documento. Entendo que eu sou livre para aceitar ou recusar, e que eu posso interromper minha participação a qualquer momento sem dar uma razão. Eu concordo que os dados coletados para o estudo sejam usados para o propósito acima descrito. Eu entendi a informação apresentada neste termo de consentimento. Eu tive a oportunidade para fazer perguntas e todas as minhas perguntas foram respondidas. Eu receberei uma cópia assinada e datada deste Documento de Consentimento Informado.

NOME DO PACIENTE

ASSINATURA

DATA

NOME DO INVESTIGADOR

ASSINATURA

DATA