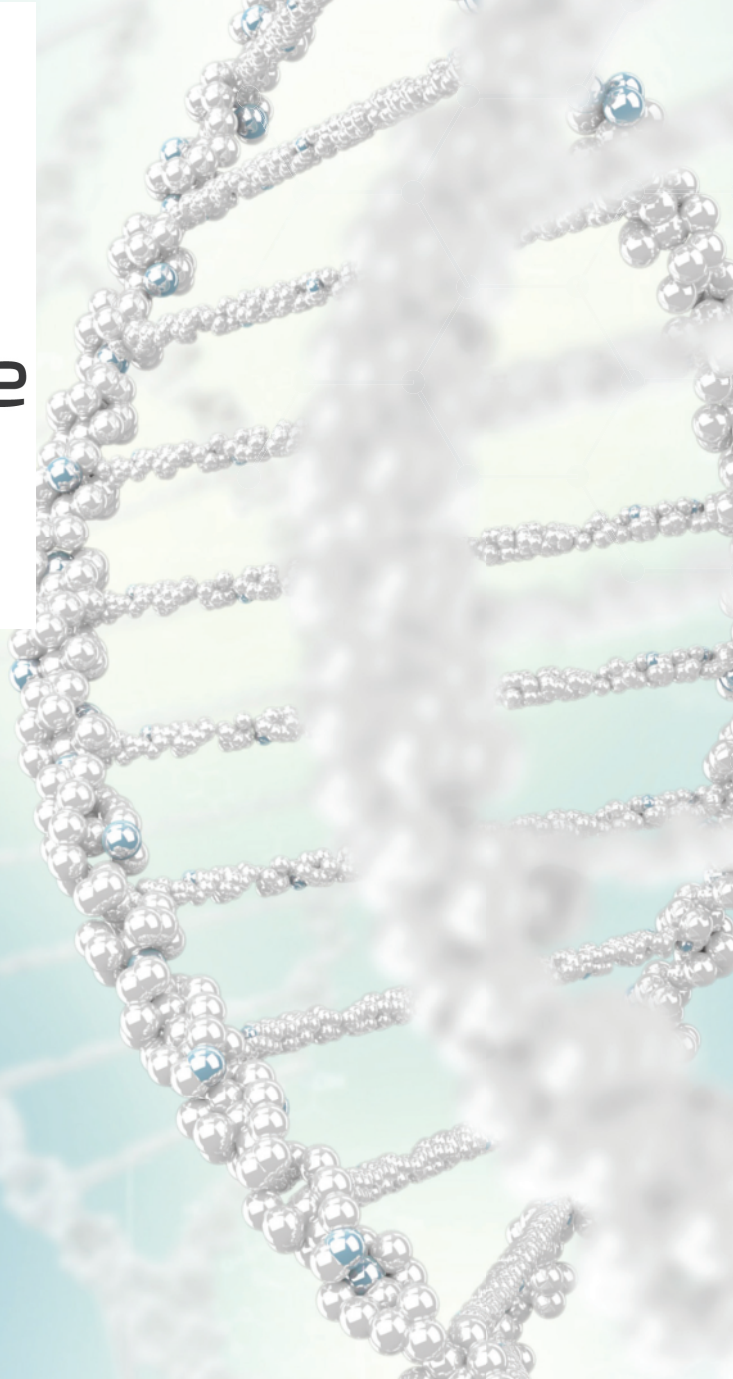




Intolerância à Lactose

Rastreamento de polimorfismos para diagnóstico

DO LABORATORIO PARA O CONSULTÓRIO

A Medicina Personalizada se utiliza dos novos métodos de análise molecular do genoma humano permitindo que tanto critérios diagnósticos quanto a terapia medicamentosa assumam um caráter individualizado, desta forma, a sequência genômica de cada paciente torna-se determinante para a tomada de decisões clínicas.¹

A partir de dados do sequenciamento do DNA humano, constatou-se que, apesar das profundas diferenças existentes entre os indivíduos quanto a seus fenótipos (cor da pele, peso, altura), seus genomas apresentam similaridade de cerca de 99,9%. A pequena variação interindividual de 0,1% se dá, principalmente, por meio de variações na sequência do DNA conhecidas como polimorfismos de nucleotídeo único (single nucleotide polymorphism; SNP), que existem aos milhões no genoma humano. Muitas vezes, os SNPs podem levar a mudanças na estrutura, função, quantidade ou localização das proteínas codificadas, alterando inúmeros processos fisiológicos. Além de interferirem em características físicas, os SNPs também podem influenciar o risco para doenças crônicas não-transmissíveis, necessidades de nutrientes e resposta aos alimentos.²



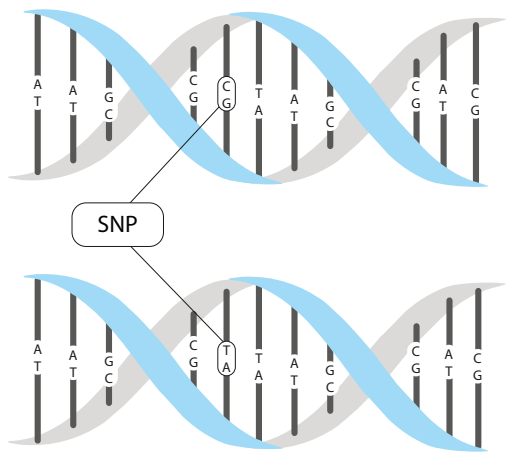


Figura 1. Polimorfismo de nucleotídeo único (single nucleotide polymorphism; SNP).⁴

Com relação à terminologia, SNP descreve uma variação genética que existe na população humana em frequência $\geq 1\%$, enquanto que o termo MUTAÇÕES corresponde às variações genéticas existentes em $< 1\%$ da população humana.²

Duas sequências de fragmentos do DNA de diferentes indivíduos demonstrando uma variação na localização de um nucleotídeo único (polimorfismo C-T).⁴

TESTES GENÉTICOS EM AMOSTRA DE SALIVA POSSUEM SENSIBILIDADE E PRECISÃO SEMELHANTES AO TESTE PADRÃO COM AMOSTRA DE SANGUE

Os testes genéticos são realizados em uma variedade de amostras biológicas, incluindo sangue, saliva, fezes, tecidos corpóreos, ossos ou cabelos.³

Estudos epidemiológicos para desenvolvimento de biobancos de DNA tem utilizado métodos de coleta menos invasivos, como as células epiteliais bucais coletadas da saliva.³⁻⁷

O DNA isolado de amostras da saliva em comparação ao DNA isolado do sangue não apresenta quantidade e pureza significativamente diferentes. Entretanto, o rendimento do DNA extraído da saliva é significativamente menor quando comparado ao extraído do sangue. Isto ocorre por conta do maior volume de sangue coletado (8.5 ml) em comparação com o volume de saliva (0.5 ml).⁵

DNA	Pureza (A260/A280)	Rendimento (µg)
Sangue (n = 45)	1.85 ± 0.004	253.63 ± 26.6
Saliva (n= 42)	1.85 ± 0.02	21.09 ± 3.64
T-test P-value	0.709	1.32142 x 10 ⁻¹¹

Tabela 1. Pureza e rendimento do DNA coletado de amostras de sangue em comparação com amostras de saliva.⁵

Apesar do menor rendimento do DNA extraído da saliva, a concordância genotípica para todos os marcadores analisados por Microarray é alta, com concordância de 98,7% em ambos os tecidos.⁵ No estudo de comparação do desempenho genotípico entre DNA extraído da saliva e o extraído do sangue, a maioria das amostras de saliva (90%), contendo 31,3% de DNA humano amplificável, tiveram uma porcentagem de genótipos válidos (genotyping call rate) superior a 96%.⁵

Um outro estudo comparativo demonstrou que a porcentagem de genótipos válidos (genotyping call rate) para o DNA extraído do sangue foi de 99%, comparável com a porcentagem de genótipos válidos para o DNA extraído da saliva, de 97%.⁶

FIGURA 2. Associação entre a porcentagem de DNA humano na saliva e a porcentagem de genótipos válidos.⁵

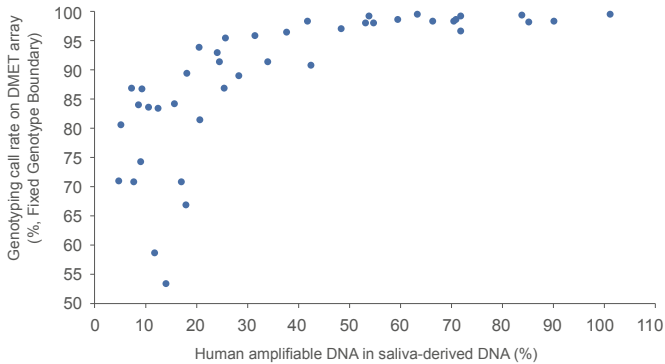
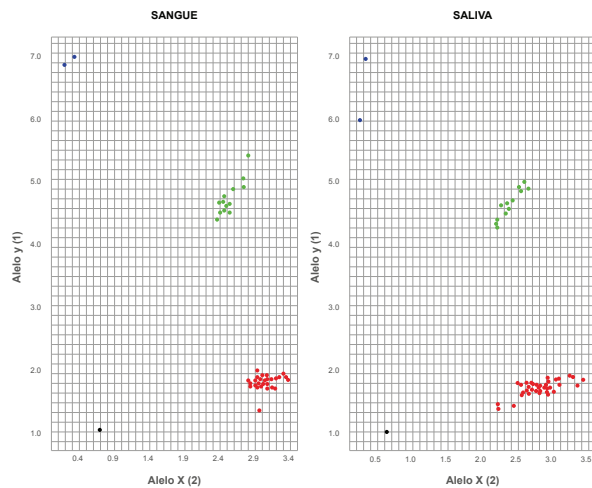


FIGURA 3. Plot Taqman da amplificação representativa para SNP (polimorfismos de nucleotídeo único) ilustrando a correspondência da força do sinal e da definição dos clusters para o DNA de ambas as fontes, sangue e saliva.⁶



A análise do DNA extraído da saliva possui várias vantagens em relação ao padrão ouro de coleta em sangue, dentre elas: menor custo, facilidade da coleta, facilidade de manuseio das amostras, estabilidade das amostras coletadas em temperatura ambiente, procedimento não invasivo.³⁻⁷

ASPECTOS GENÉTICOS DA HIPOLACTASIA PRIMÁRIA DO TIPO ADULTO

O gene da lactase humana, denominado gene LCT, está localizado no braço longo do cromossomo 2, mais especificamente no locus 2q21.⁸⁻¹⁰

A persistência ou não da atividade da lactase na vida adulta é determinada geneticamente. O estado “lactase persistente” é determinado por padrão de transmissão autossômico dominante, enquanto que a “não persistência” (ou intolerância à lactose primária do adulto) tem herança autossômica recessiva.⁸⁻¹⁰

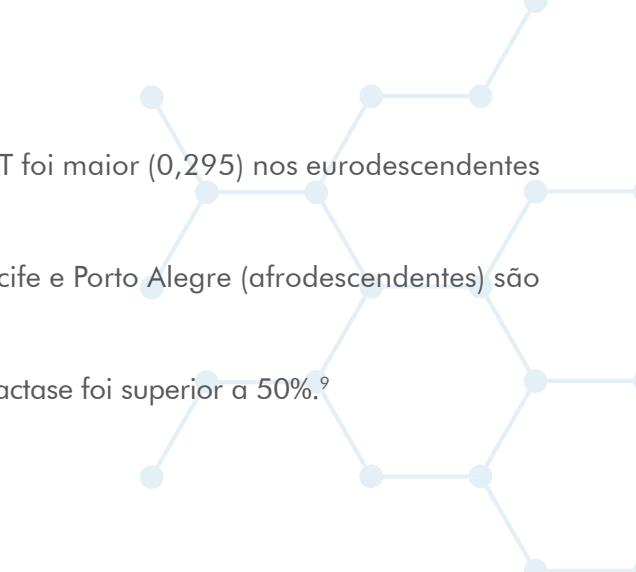
A persistência da lactase (PL) é o fenótipo no qual a expressão da lactase se mantém elevada durante toda a vida. Na Europa, na população caucasiana, a PL foi relacionada a um polimorfismo de base única (SNP) localizado no LCT (gene da lactase), dentro de um íntron do gene MCM6, sendo este SNP uma troca de C para T na posição -13910.⁸⁻¹⁰

TABELA 2. Polimorfismo 13910 - Correlação entre os genótipos e os fenótipos da persistência ou não da atividade da lactase.⁸

Genótipo	Níveis de lactase	Fenótipo
Homozigoto CC e GG	Baixos (não persistente)	Indivíduos intolerantes
Homozigoto TT e AA	Altos (persistência da lactase)	Indivíduos tolerantes
Heterozigoto CT e GA	Intermediários (persistência da lactase)	Indivíduos tolerantes
Portanto, o alelo T está presente em todos os indivíduos com persistência da lactase (tolerantes) e ausente naqueles não persistentes (intolerantes).		

Na África e no Oriente Médio, este polimorfismo (SNP 13910) é raro, mas os seguintes SNPs foram relacionados a PL: -13907C>G, -13915T>G, -14010G>C.⁸⁻¹⁰

Um estudo realizado na população brasileira demonstrou que o alelo -13910 foi a variante mais frequentemente observada.



Na população brasileira em geral, a frequência do alelo -13910*T foi maior (0,295) nos eurodescendentes de Porto Alegre e menor (0,175) na população de Belém.⁹

Este estudo evidenciou que a maioria da população de Belém, Recife e Porto Alegre (afrodescendentes) são intolerantes à lactose (genótipo CC com frequência de 70%).

Em indivíduos eurodescendentes de Porto Alegre, a persistência de lactase foi superior a 50%.⁹

TABELA 3. Frequência do alelo e genótipo do polimorfismo -13910C>T em quatro populações brasileiras.⁹

	ALELO 13910*T	GENÓTIPO -13910 C>T						FREQUÊNCIA DA PL
POPULAÇÃO		TT		CT		CC		
		N	%	N	%	N	%	
PORTO ALEGRE								
EURODESCENDENTES (N = 337)	0.295	26	7,7	147	43,6	164	48,6	0.513
AFRODESCENDENTES (N = 182)	0.184	9	4,9	49	26,9	124	68,1	0.320
BELÉM (N = 200)	0.175	8	4,0	54	27,0	138	69,0	0.310
RECIFE (N = 262)	0.204	11	4,2	85	32,4	166	63,4	0.366

VANTAGENS DO DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA INTOLERÂNCIA À LACTOSE EM COMPARACAO AOS OUTROS MÉTODOS DIAGNÓSTICOS

O diagnóstico molecular da intolerância à lactose possui elevadas sensibilidade e especificidade ao predizer com alta probabilidade se um indivíduo é intolerante à lactose ou não. Além disso, não requer jejum, não causa desconfortos ao paciente e possui menor ocorrência de resultados falso-positivos. ^{10,11}

Método diagnóstico	Sensibilidade	Especificidade
Análise molecular	93%	100%
Teste do hidrogênio expirado	75%	96%
Curva glicêmica	80%	96%

TABELA 4. Comparação da especificidade e sensibilidade dos métodos de diagnóstico da Intolerância à Lactose.^{10,11}

ANÁLISE DE MUTAÇÃO DO DNA POR PCR E SEQUENCIAMENTO DE NUCLEOTÍDEOS

O teste consiste do isolamento do DNA genômico de células da mucosa bucal, amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR) de regiões específicas do gene MCM6, seguida de análise da sequência, realizada em sequenciador automático de DNA para a detecção das variantes genéticas associada à persistência da lactase (PL).

As variantes genéticas associadas à PL (ie, tolerância à lactose) são diferentes dependendo da etnia. O GENOTEST® analisa as seguintes variantes:

- Maior incidência em caucasianos: SNP -13910
- Maior incidência em negros e pardos: SNP -13907, SNP 13915 e SNP 14010.

REEMBOLSO PLANOS DE SAÚDE

A tabela TUSS (Terminologia Unificada da Saúde Suplementar) foi instituída pela Agência Nacional de Saúde Suplementar (ANS), através de sua Instrução Normativa nº 38, de 13 de novembro de 2009 e tem por objetivo padronizar os códigos e nomenclaturas dos procedimentos médicos.¹³

A tabela TUSS inclui o procedimento de testes genéticos, como os EXAMES DNALIFE, e os classifica pela doença que se pretende diagnosticar ou pela tecnologia de análise genética utilizada.

Assim, é possível orientar o paciente para que ele solicite o reembolso dos EXAMES DNALIFE facilitando assim o acesso a esta nova tecnologia.

Orientações para solicitar reembolso

Colocar no pedido de exames:

- Os dados necessários do paciente;
- Especificação do EXAME solicitado;
- O código e a descrição da Tabela TUSS.

Solicite que o paciente entre em contato com o seu plano de saúde e confirme a cobertura destes códigos e o valor do reembolso, podendo estas informações facilitar o pedido de reembolso por parte do paciente. Informe que o reembolso, contudo, continuará seguindo as mesmas normas (de acordo com a modalidade e regulamento do plano), **não significando que o usuário terá as despesas reembolsadas integralmente.**

TABELA 5. Tabela de codificação dos Exames DNALIFE.

Nome Comercial DNALIFE [®]	Cód TUSS	Variante Analisada	Descrição TUSS
Intolerância Genética à Lactose por Multiplex 4 locus diferentes*	40503054	-13910 (C/T)	Análise de DNA pela técnica multiplex por locus, por amostra
	40503046	-13907 (G/C)	Análise de DNA pela técnica multiplex por locus EXTRA, por amostra.
	40503046	-13915 (G/T)	Análise de DNA pela técnica multiplex por locus EXTRA, por amostra.
	40503046	-14910 (C/T)	Análise de DNA pela técnica multiplex por locus EXTRA, por amostra.

Referências:

1. B S Shastry. Pharmacogenetics and the concept of individualized medicine. *The Pharmacogenomics Journal* (2006) 6, 16–21.
2. Miae Doo and Yangha Kim. Obesity: Interactions of Genome and Nutrients Intake. *Prev. Nutr. Food Sci.* 2015;20(1):1-7.
3. Fanyue Sun, Ernst J Reichenberger. Saliva as a Source of Genomic DNA for Genetic Studies: Review of Current Methods and Applications. *Oral Health Dent Manag* 2014 Jun;13(2):217-22.
4. Ana P Nunes, et al. Quality of DNA extracted from saliva samples collected with the Oragene™ DNA self-collection kit. *BMC Medical Research Methodology* 2012, 12:65.
5. Hu Y, Ehli EA, Nelson K, Bohlen K, Lynch C, et al. (2012) Genotyping Performance between Saliva and Blood-Derived Genomic DNAs on the DMET Array: A Comparison. *PLoS ONE* 7(3): e33968. doi:10.1371/journal.pone.0033968.
6. Jean E Abraham, et al. Saliva samples are a viable alternative to blood samples as a source of DNA for high throughput genotyping. *BMC Medical Genomics* 2012, 5:19.
7. K  chler EC, et al. Buccal cells DNA extraction to obtain high quality human genomic DNA suitable for polymorphism genotyping by PCR-RFLP and Real-Time PCR. *J Appl Oral Sci.* 2012 Jul-Aug;20(4):467-71.
8. Mattar R, et al. Lactose intolerance: diagnosis, genetic, and clinical factors. *Clinical and Experimental Gastroenterology* 2012;5 113–121.
9. Friedrich DC, et al. Several Different Lactase Persistence Associated Alleles and High Diversity of the Lactase Gene in the Admixed Brazilian Population. *PLoS One* 2012;7(9):e46520.
10. Moreira de S   PT, et al. Aspectos Etiol  gicos da Hipolactasia. *Revista Uning  *, v. 20, n. 2, p. 123-128, 2014.
11. Newcomer AD, et al. Prospective comparison of indirect methods for detecting lactase deficiency. *New Engl J Med* 1975 Dec 11;293(24):1232-6.
12. Single nucleotide polymorphism C/T-13910, located upstream of the lactase gene, associated with adult-type hypolactasia: Validation for clinical practice. *Clin Biochem* 2008 May;41(7-8):628-30.
13. Instru     Normativa 38 de 13 de novembro de 2009 da Ag  ncia Nacional de Sa  de.

Caso tenha interesse em receber algum dos artigos listados acima, solicite ao representante que o visita ou entre em contato atrav  s do email contato@dnalife.com.br



DNA life

Rua Lauro Vicuna, 489 - Alto de Pinheiros
CEP 05454-090 - São Paulo/SP - Brasil

www.dnalife.com.br
Tel.: 11 3021-3704
contato@dnalife.com.br

