

Estudo da Variabilidade Genética Associada à Persistência de Lactase em Portugal e em Diversas Populações Africanas

S. Pires¹, L. Manco¹ e A. Abade^{1,2}

1- Centro de Investigação em Antropologia e Saúde, Departamento de Ciências da Vida, FCTUC

2 - Centro de Investigação Transdisciplinar Cultura, Espaço e Memória

Introdução

A habilidade de digerir a lactose, o único hidrato de carbono presente no leite, começa a diminuir depois da fase de amamentação, na maioria dos humanos, devido ao decréscimo dos níveis da enzima lactase^[1-3]. Estes indivíduos, não persistentes de lactase, manifestam sintomatologia após o consumo de laticínios, que se caracteriza por dor, distensão e câibras abdominais, náuseas e vômitos, diarreia e produção de gases (dióxido de carbono, hidrogénio, metano, entre outros) pela acção de bactérias intestinais sobre a lactose, sendo estas responsáveis por todo o desconforto intestinal.^[2] No entanto, sobretudo em indivíduos descendentes de populações que tradicionalmente praticaram a domesticação de gado ou a pastorícia, a habilidade de digerir leite e derivados continua durante a vida adulta (persistência de lactase)^[1-3]. A persistência da enzima lactase tem vindo a ser associada a diversos polimorfismos localizados a cerca de 14 kb a montante do gene da lactase (*LCT*), nomeadamente o polimorfismo -13910C→T, nas populações do Norte da Europa onde a persistência da lactase tem uma elevada prevalência^[4] e os polimorfismos -13907C→G e -14010G→C em populações Africanas que tradicionalmente se dedicam à pastorícia^[1,2].

O presente trabalho teve como objectivo principal estimar frequências alélicas dos polimorfismos -13910C→T, -13907C→G e -14010G→C em amostras populacionais de Portugal e de 3 regiões Africanas (S. Tomé e Príncipe, Angola e República da Guiné), bem como investigar a associação do polimorfismo -13910C→T à persistência da lactase na população Portuguesa.

Metodologia

No presente trabalho foram estudados 286 indivíduos, não aparentados, de Portugal (regiões Norte e Centro) e de África (S. Tomé e Príncipe, Angola e República da Guiné), de modo a estimar as frequências alélicas dos polimorfismos -13910C→T,

-13907C→G e -14010G→C. Adicionalmente, investigou-se a associação do polimorfismo -13910C→T à persistência da lactase em Portugal, mediante o estudo de uma população de 9 indivíduos diagnosticados com intolerância à lactose.

O ADN genómico foi isolado por metodologias estandardizadas a partir de um esfregaço das células da mucosa bucal, nas amostras provenientes da região Norte de Portugal e dos indivíduos com intolerância à lactose, após consentimento informado. As restantes amostras de ADN foram seleccionadas no âmbito de diferentes estudos de investigação a decorrer no Centro de Investigação em Antropologia e Saúde – Departamento de Ciências da Vida – Universidade de Coimbra. O estudo foi realizado recorrendo a técnicas de Biologia Molecular nomeadamente, amplificação por *Polymerase Chain Reaction* (PCR), análise com enzimas de restrição (RFLP), *Single-Stranded Conformation Polymorphism* (SSCP) e sequenciação automática.

O tratamento estatístico dos dados foi efectuado com o recurso ao programa informático Arlequin 3.5^[6] para cálculo das frequências alélicas e os respectivos desvios padrão, equilíbrio de *Hardy-Weinberg* e valores de diversidade génica.

Resultados e Discussão

As frequências alélicas estimadas para o polimorfismo -13910C→T, encontram-se discriminadas na Tabela 1. As frequências obtidas para o alelo -13910T, associado à persistência de lactase na Europa, são mais elevadas nas populações Portuguesas (38% na região Centro e 24,6% na região Norte) que nas populações Africanas (2,2% em Angola, 3,8% em S. Tomé e Príncipe e 6,1% na Guiné,) (Tabela 1). Estes resultados estão de acordo com o padrão de distribuição genotípico geográfico descrito para este polimorfismo sendo o alelo -13910T mais frequente nas populações Europeias, com frequências inferiores a 14% nas populações pastorícias do Oeste Africano e nulas no resto de África^[1,4,7].

Relativamente à amostra populacional dos indivíduos intolerantes à lactose, verificou-se uma frequência alélica de 100% para o alelo -13910T.

Na Europa as frequências do alelo T do *locus* -13910 são muito variáveis, sendo mais altas a Norte: 95,4% na Irlanda^[8] e 81,5% na Escandinávia^[9]. Diminuem no Centro Europeu, 55,6% na Alemanha^[8] e 45,0% na Polónia^[10] e diminuem ainda mais no Sudoeste, 41,7% em Espanha^[11], 37,0%^[12] e 24,6% (este trabalho) na região Norte

de Portugal e 38,0% no Centro de Portugal (este trabalho). As frequências mais baixas foram registadas no Sudeste Europeu: 13,4% na Grécia^[8] e 5,0% no Sul da Itália^[13].

Tabela 1.1 Frequências alélicas obtidas para os polimorfismos -13910C→T, -13907C→G e -14010G→C, respectivamente

Região ou População	Frequências			Frequências			Frequências		
	N	Alélicas (%)		N	Alélicas (%)		N	Alélicas (%)	
		C	T		C	G		G	C
Portugal, Centro	73	62,0	38,0	63	100	0	63	100	0
Portugal, Norte	57	75,4	24,6	55	100	0	55	100	0
Angola	46	97,8	2,2	46	100	0	—	—	—
S. Tomé e Príncipe	53	96,2	3,8	49	100	0	49	100	0
República da Guiné	57	93,9	6,1	54	100	0	54	100	0

Para todas as amostras populacionais estudadas (quer Africanas, quer Portuguesas) não se verificou um desvio significativo ao equilíbrio de Hardy-Weinberg (valores de $P > 0,05$).

Esta ampla distribuição de frequências alélicas levanta dúvidas quanto à hipótese do alelo -13910T ser a verdadeira causa da persistência de lactase nas populações Europeias ou de se encontrar sequer associado a outro elemento causal próximo, que se poderá localizar no gene da lactase *LCT*^[4]. Neste estudo verificaram-se dois factos que ainda aumentam mais as dúvidas acerca do papel do alelo T como causa da persistência de lactase. Por um lado, na totalidade dos 9 indivíduos que integram a amostra populacional com intolerância à lactose apenas foi encontrado o polimorfismo -13910 na sua forma homozigótica T/T, ou seja, o que significaria persistência da enzima lactase nestes indivíduos. No entanto, em todos eles se verificam sintomas de intolerância à lactose após a ingestão de leite ou seus derivados. É de notar que um destes indivíduos não foi amamentado, nem ingere laticínios desde tenra idade (a partir de 1 ano de idade). Por outro lado, também foi possível observar a situação inversa à descrita anteriormente em indivíduos naturais do Norte de Portugal. Vinte e seis indivíduos (num total de 57) apresentam o polimorfismo -13910 na sua forma homozigótica C/C. Estando o alelo C, ao contrário do T, associado à não persistência de lactase, seriam de esperar situações de intolerância ao consumo de leite. No entanto, todos os indivíduos com genótipo -13910C/C foram amamentados e consomem habitualmente laticínios. Deste modo, a relação deste polimorfismo com a persistência da lactase na população Portuguesa permanece por esclarecer, havendo necessidade de desenvolver estudos populacionais mais completos, envolvendo uma amostragem maior

e uma distribuição geográfica mais alargada de indivíduos com intolerância à lactose, diagnosticados com testes bioquímicos de tolerância à lactose.

A presença do alelo -13910T nas populações Africanas em frequências significativamente inferiores às encontradas nas populações Europeias poderá ser explicada por fluxos génicos dos povos Europeus que colonizaram estas regiões Africanas.

Para os polimorfismos -13907C→G e -14010G→C verificou-se uma frequência de 100% para o alelo -13907C e para o alelo -14010G, em todas as amostras populacionais estudadas neste trabalho, quer nas Portuguesas (incluindo os intolerantes à lactose) quer nas Africanas de Angola, S. Tomé e Príncipe e República da Guiné. Estudos recentes mostraram a associação dos alelos -13907G e -14010C à persistência da lactase em grupos populacionais do Leste Africano dedicados à pastorícia, nomeadamente em populações do Sudão, Quénia e Tanzânia^[4]. O alelo -14010C é muito comum nesta região tendo sido encontrado com frequências que variam entre os 13% e 46%; por outro lado, o alelo -13907G é menos comum tendo sido encontrado com frequências >5% apenas em 2 populações Afro-Asiáticas do Sudão e do Quénia^[1]. A ausência dos alelos -13907G e -14010C nas populações Africanas por nós estudadas, poderá reflectir a ausência de fluxos migratórios significativos da região Leste Africana para as regiões Oeste onde se localizam as populações estudadas neste trabalho (Angola, S. Tomé e Príncipe e República da Guiné).

A ausência dos alelos -13907C ou do -14010G na população Portuguesa está em conformidade com os restantes estudos que foram realizados com populações de origem Europeia, onde ainda não foi registada a presença de qualquer destes alelos^[1,3,15].

Em conclusão, no polimorfismo -13910C→T verificaram-se frequências elevadas do alelo T nas populações Portuguesas e baixas nas Africanas (Tabela 1), corroborando os dados anteriormente publicados por diversos autores. No entanto, serão necessários mais estudos populacionais que envolvam uma correlação genótipo/fenótipo de forma a consolidar ou esclarecer se este polimorfismo se encontra associado à persistência de lactase em Portugal.

Relativamente aos polimorfismos -13907C→G e -14010G→C verificou-se uma frequência de 100% para os alelos -13907C e -14010G em todas as amostras populacionais estudadas. Estes resultados encontram-se em conformidade com as frequências obtidas noutros estudos já publicados, sendo, no entanto, necessários mais

estudos de genética populacional, de modo a poder confirmar-se a associação destes polimorfismos com a persistência de lactase.

Bibliografia

- [1] Tishkoff S, Reed F, Ranciaro A, Voight B, Babbitt C, Silverman J, Powell K, Mortensen H, Hirbo J, Osman M, Ibrahim M, Omar S, Lema G, Nyambo T, Ghorri J, Bumpstead S, Pritchard J, Wray G, Deloukas P. Convergent adaptation of human lactase persistence in Africa and Europe. *Nat Genet* 2007; **39(1)**: 31-40.
- [2] Ingram C, Mulcare C, Itan Y, Thomas M, Swallow D. Lactose digestion and the evolutionary genetics of lactase persistence. *Hum Genet* 2009; **124(6)**: 579-591.
- [3] Tornaiainen S, Parker M, Holmberg V, Lahtela E, Dandara C, Jarvela I. Screening of variants for lactase persistence/non-persistence in populations from South Africa and Ghana. *BMC Genet* 2009; **10**: 31.
- [4] Enattah N, Sahi T, Savilahti E, Terwilliger J, Peltonen L, Järvelä I. Identification of a variant associated with adult-type hypolactasia. *Nat Genet* 2002; **30(2)**: 233-7.
- [5] Mulcare C, Weale M, Jones A, Connell B, Zeitlyn D, Tarekegn A, Swallow D, Bradman N, Thomas M. The T Allele of a Single-Nucleotide Polymorphism 13.9 kb Upstream of the Lactase Gene (*LCT*) (*C-13.9kbT*) Does Not Predict or Cause the Lactase-Persistence Phenotype in Africans. *Am J Hum Genet* 2004; **74(6)**: 1102-1110.
- [6] Excoffier L, Lischer H. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol* 2010; *In Press [Acedido em 21.05.2010]*.
- [7] Ingram C, Raga T, Tarekegn A, Browning S, Elamin M, Bekele E, Thomas M, Weale M, Bradman N, Swallow D. Multiple rare variants as a cause of a common phenotype: several different lactase persistence associated alleles in a single ethnic group. *J Mol Evol* 2009; **69(6)**: 579-588.
- [8] Itan Y, Powell A, Beaumont M, Burger J, Thomas M. The Origins of Lactase Persistence in Europe. *PLoS Comput Biol* 2009; **5(8)**: e1000491.
- [9] Bersaglieri T, Sabeti P, Patterson N, Vanderploeg T, Schaffner S, Drake J, Rhodes M, Reich D, Hirschhorn J. Genetic Signatures of Strong Recent Positive Selection at the Lactase Gene. *Am J Hum Genet* 2004; **74(6)**: 1111-1120.
- [10] Fojcik H, Moczulski D, Gawlik B, Grzeszczak W. The frequency of primary lactose intolerance in Polish population based on genetic testing. *Gastroenterologia Polska* 2006; **13(2)**: 81-83.
- [11] Gerbault P, Moret C, Currat M, Sanchez-Mazas A. Impact of selection and demography on the diffusion of lactase persistence. *PLoS One* 2009; **4(7)**: e6369.
- [12] Coelho M, Luiselli D, Bertorelle G, Lopes A, Seixas S, Destro-Bisol G, Rocha J. Microsatellite variation and evolution of human lactase persistence. *Hum Genet* 2005; **117(4)**: 329-339.
- [13] Enattah N, Trudeau A, Pimenoff V, Maiuri L, Auricchio S, Greco L, Rossi M, Lentze M, Seo J, Rahgozar S, Khalil I, Alifrangis M, Natah S, Groop L, Shaat N, Kozlov A, Verschubskaya G, Comas D, Bulayeva K, Mehdi S, Terwilliger J, Sahi T, Savilahti E, Perola M, Sajantila A, Järvelä I, Peltonen L. Evidence of Still-Ongoing Convergence Evolution of the Lactase Persistence T₋₁₃₉₁₀ Alleles in Humans. *Am J Hum Genet* 2007; **81(3)**: 615-625.
- [14] Enattah N, Jensen T, Nielsen M, Lewinski R, Kuokkanen M, Rasinpera H, El-Shanti H, Seo J, Alifrangis M, Khalil I, Natah A, Ali A, Natah S, Comas D, Mehdi S, Groop L, Vestergaard E, Imtiaz F, Rashed M, Meyer B, Troelsen J, Peltonen L. Independent introduction of two lactase-persistence alleles into human populations reflects different history of adaptation to milk culture. *Am J Hum Genet* 2008; **82(1)**: 57-72.
- [15] 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* 2009; **9**: 80.