UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FACULDADE DE MEDICINA

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

RICARDO AIRES CORREIA

TESTE DE PERMEABILIDADE INTESTINAL DE AÇÚCARES COMO MARCADORES NÃO INVASIVOS DE INTOLERÂNCIA A LACTOSE

FORTALEZA

2007

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

RICARDO AIRES CORREIA

TESTE DE PERMEABILIDADE INTESTINAL DE AÇÚCARES COMO MARCADORES NÃO INVASIVOS DE INTOLERÂNCIA A LACTOSE

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima

Co-orientadora: Profª. Drª. Lúcia Libanez Bessa Campelo Braga

FORTALEZA

2007

FICHA CATALOGRÁFICA
Preparada pela Biblioteca de Ciências da Saúde da
Universidade Federal do Ceará
©reprodução autorizada pelo autor

C849i Correia, Ricardo Aires
Teste de permeabildade intestinal de açúcares como marcadores não invasivos de intolerância a lactose/ Ricardo Aires Correia. 2007
131 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina, Fortaleza, 2007.

1. Intolerância a Lactose. 2. Teste de Tolerância a Lactose. 3. Permeabilidade. 4. Intestinos. I. Lima, Aldo Ângelo Moreira (Orient.). II. Título.

CDD 616.34

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

ATA DA SESSÃO DE DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE **RICARDO AIRES CORREIA**, REALIZADA NO DIA **DEZENOVE DE OUTUBRO DE DOIS MIL E SETE**.

Às **quatorze horas** e **quinze minutos** do dia **dezenove de outubro de dois mil e sete**, no Anfiteatro do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Ceará, realizou-se a sessão de defesa da tese de doutorado do aluno **RICARDO AIRES CORREIA**. O trabalho tinha como título: **"Intolerância a lactose e barreira funcional intestinal: Novo teste molecular não invasivo e diferencial de avaliação"**. Compunham a banca examinadora os professores doutores **Aldo Ângelo Moreira Lima**, orientador, **Lúcia Libanez Bessa Campelo e Braga, Lusmar Veras Rodrigues, Armênio Aguiar dos Santos** e **Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos**. A sessão foi aberta pelo orientador, que apresentou a banca examinadora e passou a palavra ao candidato, a fim de que apresentasse o trabalho. Após a exposição, seguiu-se o processo de argüição do doutorando. O primeiro examinador foi o professor doutor **Lusmar Veras Rodrigues**. Logo após procederam à argüição os professores doutores **Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos**, **Lúcia Libanez Bessa Campelo e Braga**, **Armênio Aguiar dos Santos** e **Aldo Ângelo Moreira Lima**. Em seguida a banca examinadora se reuniu reservadamente a fim de avaliar o desempenho do candidato. Por unanimidade a banca examinadora considerou **APROVADO** o trabalho do doutorando. Nada mais havendo a relatar a sessão foi encerrada às **seis horas e dez minutos**. E eu, Aura Rhanes Farias Nogueira Yida, secretária do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, lavrei a presente ata, que depois de lida e aprovada, será assinada por mim e pelos membros da banca examinadora. Fortaleza, **dezenove de outubro de dois mil e sete**.

Aura Rhanes Farias Nogueira Yida (Secretária)

Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima (Orientador)

Profa. Dra. Lúcia Libanez Bessa Campelo e Braga

Prof Dr. Lusmar Veras Rodrigues

Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos

Prof. Dr. Armênio Aguiar dos Santos

AGRADECIMENTOS

Em primeira mão, agradeço ao Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima, pela oportunidade dada, aceitando orientar-me nesta empreitada, tanto pelo incentivo como pelo uso dos laboratórios, técnicos, bem como em reconhecimento pelo apoio científico.

Ao Departamento de Medicina Clínica, na pessoa do Professor Doutor Marciano Lima Sampaio, então seu chefe, que acedeu o precioso horário para desenvolvimento deste trabalho.

Aos Drs. Manuel Sales Barbosa Júnior e Domingos Oliveira, que se esmeraram em proceder às amostras coletadas, corrigir, revisar, reprocessar e, por fim, nos entregar resultados fidedignos.

À Professora Rosa Salani Mota (MSC), que processou a análise estatística de forma metódica, minuciosa, reavaliando dados e concluindo análise perfeccionista.

De forma especial, quero deixar agradecimentos pessoais aos pacientes-voluntários, que se prontificaram a participar deste estudo; sempre há uma temeridade quando se é convocado a participar de estudo de pesquisa em humanos; contudo, todos confiaram na não-maleficência do estudo e nos benefícios que possa trazer para o aprimoramento médico.

DEDICATÓRIA

"The action is where the maney is"

Himes Whast
(Cirurgião cardiovascular novaiorquino)
1910-1998

RESUMO

Introdução. A intolerância a carboidratos, particularmente a lactose, decorre de vários fatores, primordialmente da deficiência de lactase. Fatores genéticos ou ambientais influenciam o desenvolvimento desta intolerância O diagnóstico da hipolactasemia do tipo adulto é habitualmente baseado no teste invasivo de tolerância a lactose, cuja sensibilidade varia de 74-94% e especificidade de 77-96%. **Objetivo**. Foi utilizado, neste estudo, um teste não invasivo para determinar simultaneamente a integridade da mucosa (presença ou não de lesão), área comprometida (extensão da lesão), permeabilidade da mucosa e integridade enzimática (dissacaridases) da borda em escova do enterócito e a influência da ingestão etílica habitual neste teste. **Material e Método**. A técnica de cromatografia líquida de alta precisão (*HPLC*) foi utilizada na determinação da excreção urinária dos açúcares lactose, lactulose, manitol e sacarose. O estudo foi de caso/controle, onde casos eram pacientes com teste de tolerância a lactose com curva plana e controles com teste de tolerância a lactose com curva normal. Foram selecionados 65 pacientes, sendo 31 com teste de tolerância a lactose negativo e 34 com teste positivo. Todos eram adultos, com idade variando de 21 a 68 anos. **Resultados**. As curvas de excreção da lactulose e do manitol (p=0,3511) não foram, per si, um parâmetro diferencial no diagnóstico de intolerância a lactose. A taxa de excreção lactulose/manitol, contudo, com p=0,0741, apesar do valor marginal, demonstra que este parâmetro é indicativo de alterações na permeabilidade da mucosa induzido pela intolerância a lactose. A análise da curva de ROC (*Receiver Operating Characteristic*) mostrou para a relação da taxa de excreção lactulose/manitol uma sensibilidade de 61,76% e uma especificidade de 60,00% em um ponto de corte de 0,0015. A curva de excreção da lactose com valor de p=0,1317, não se demonstrou um parâmetro significativo para o diagnóstico de intolerância a lactose. Realizou-se a estratificação da correlação da taxa de excreção lactulose/manitol e da excreção da lactulose para ingestão etílica habitual ou não-ingestão. Quando não há ingestão etílica habitual, a taxa de excreção lactulose/manitol não se mostrou um valor preditivo positivo para intolerância a lactose com valor de p=0,0876. Quando há ingestão etílica habitual, não se mostrou valor preditivo (p=0,2676). **Conclusões**. Os resultados sugerem que o teste de determinação da excreção urinária de açúcares (manitol, lactose, lactulose e sacarose), *in vivo*, se mostrou adequado e válido como parâmetro de avaliação funcional da mucosa intestinal. Contudo o teste não é suficientemente sensível e específico para diagnóstico de deficiência de lactose. A ingestão etílica habitual não induz a modificações da barreira funcional intestinal e é incapaz de interferir no resultado do teste diferencial de excreção de açúcares.

Palavras-chave: Intolerância à Lactose. Teste de Tolerância a Lactose. Permeabilidade Intestinal.

ABSTRACT

Introduction. The intolerance to carbohydrates, especially to lactose, is due to a number of factors, particularly the deficiency of lactase. The development of such intolerance is influenced by genetic and environmental issues. The diagnosis of the adult type hipolactasemia is usually based on the lactose intolerance invasive test, which varies in sensibility from 74% to 94%, and in specificity from 77% to 96%. **Objective.** The study used a non-invasive test to establish simultaneously the integrity of the mucosa (presence or absence of injury), the extension of compromised area, the mucosal permeability and the enzymatic integrity (disaccharidases) of the enterocyte brush border. **Material and Method**. The HPLC (High Performance Liquid Chromatography) technique was applied towards determining the urinary excretion of lactose, lactulose, mannitol and sucrose. It was a case-control study, in which cases were pacients with flat-curved lactose tolerance test, meanwhile controls were individuals with normal-curved lactose tolerance test. 65 adults varying from 21 to 68 years old were selected, being the lactose tolerance test negative for 31 and positive for 34 of them. **Results**. The excretion curves of lactulose (p=0.103) and mannitol (p=0.3511) were not, by themselves, a defining parameter to diagnose lactose intolerance. However, the lactulose/mannitol excretion rate (p=0.0741), in spite of being a marginal value, revealed that such parameter indicates disturbance of mucosal permeabilily induced by lactose intolerance. The analysis of the ROC (Receiver Operating Characteristic) curve expressed, over the relation lactulose/mannitol excretion rate, a 61.76% sensibility and a 60.00% specificity, in a cutting edge of 0.0015. The lactose excretion curve evaluated p=0.1317 did not reveal to be a significant parameter to diagnose lactose intolerance. The research comprised the stratification of the correlation lactulose/mannitol excretion rate and lactulose excretion with or without usual ethylic ingestion. When no usual ethylic ingestion was observed, the lactulose/mannitol excretion rate did not showed as a positive predictive value for lactose intolerance at p=0.0876. On the other hand, no predictive value (p=0.2676) was found when usual ethylic ingestion was verified. **Conclusions**. The outcome suggests that the test *in vivo* to determine the urinary excretion of lactose, lactulose, mannitol and sucrose proved itself appropriated as a parameter for the functional evaluation of intestinal mucosa. Althout is not enougth specific and sensible to be used as parameter to diagnosis lactose intolerance. The usual ethylic ingestion d'ont induces disturbance of functional intestinal barrier and might not interfere in the result of the sugar excretion difference test.

Key words: Lactose Intolerance. Lactose Tolerance Test. Intestinal Permeability.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

®	-	marca registrada
µl	-	microlitro
µmol	-	micromol
2q21	-	localização de gen codificador
AINEs	-	antinflamatórios não esteróides
AMPc	-	adenosina monofosfato cíclico
C/C, C/T, T/T	-	alelos codificadores da lactose
Ca	-	cálcio
CEPH	-	HGDP collection
cols	-	colaboradores
Cr	-	cromo
D	-	dextrógiro
Da	-	dáltons – medida de peso molecular
dl	-	decilitro
dp	-	desvio-padrão
EDTA	-	ácido etilenodiaminotetracético
FMLP	-	N-formil-L-lencil-fenilalanina
GLP-2	-	glucagon-like peptide-2
g	-	grama
HPLC-PAD	-	hight performance liquid chromatography – pulsatil amperometric display
IBGE	-	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC	-	intervalo de confiança
IL	-	interleucina
kg	-	quilograma
L	-	litro
L	-	levógiro

LI	-	limite inferior
LPH	-	lactare-phlorizina-hidrolare
LS	-	limite superior
mg	-	miligrama
ml	-	mililitro
MLCK	-	miosyn light chain kinase
mmol	-	milimol
ms	-	milisegundo
n	-	população incluída
NaOH	-	hidróxido de sódio
nm	-	nanômetros
O	-	oxigênio
ºC	-	grau Celsius
OMS	-	Organização Mundial de Saúde
OR	-	odds ratio
p	-	significância estatística
P.M	-	peso molecular
PCR	-	polimerase chain reaction
PEG	-	polietileno glicol
pmol	-	picomol
ppm	-	parte por milhão
QSP	-	quantidade suficiente para
ROC	-	Receaver Operating Characteristic
sm	-	salário mínimo do Brasil
T84	-	tumor 84
Tc	-	tecnécio
TNF	-	tumor necrotizing fator
V	-	volt
ZO	-	zonula occludens (ou zonula ocludente)

LISTA DE TABELAS

1	Taxas de permeabilidade intestinal e recuperação de vários marcadores moleculares em indivíduos normais.....	31
2	Soluções-teste para a osmolaridade.....	49
3	Características da população do estudo quanto a etnia, escolaridade e renda individual. Fortaleza, CE – maio de 2005 a fevereiro de 2006....	55
4	Características da população do estudo quanto a diarréia, perda de peso, ingestão etílica e uso de medicamento. Fortaleza, CE – maio de 2005 a fevereiro de 2006.....	56
5	Características da população do estudo em relação a idade, taxa percentual de excreção lactulose/manitol, gênero e presença ou não da diarréia. Fortaleza, CE – maio de 2005 a fevereiro de 2006.....	58
6	Avaliação da glicemia e função renal da população do estudo. Fortaleza, CE – maio de 2005 a fevereiro de 2006.....	58
7	Teste de intolerância a lactose na população do estudo. Fortaleza, CE – maio de 2005 a fevereiro de 2006.....	59
8	Em cada grupo, comparação dos períodos em relação à média da lactose.....	61
9	Teste de permeabilidade intestinal na população do estudo. Fortaleza, CE – maio de 2005 a fevereiro de 2006.....	65
10	Teste de Mann-Whitney para comparação do percentual de excreção da lactulose, lactose e correlação do percentual de excreção da lactulose/manitol e lactose/manitol.....	73
11	Teste de permeabilidade intestinal[1] estratificando por ingestão etílica[2] na população do estudo. Fortaleza, CE – maio de 2005 a fevereiro de 2006.....	77
12	Estratificação dos grupos por condição de ingestão etílica habitual.....	78
13	Avaliação da deficiência de lactase e sacarase-isomaltase na população do estudo. Fortaleza, CE – maio de 2005 a fevereiro de 2006.....	81
14	Avaliação da absorção/permeabilidade intestinal na população do estudo. Fortaleza, CE – maio de 2005 a fevereiro de 2006.....	81

LISTA DE FIGURAS

1	Esquema de seções sagitais de embriões	122
2	Seções transversais de embriões	123
3	Mecanismo clonal gerador no vilo com os padrões de distribuição celular	124
4	Demonstração da migração celular da cripta ao topo do vilo.....	125
5	Anatomia do epitélio intestinal do intestino delgado	126
6	Representação da estrutura química da lactose	127
7	Mapa 1 - migrações humanas	128
8	Modelo especulativo dos poros nas junções celulares.....	129
9	Vias de absorção transcelular e paracelular.....	130
10	Esquema da junção celular e proteínas de ligação e oclusão.....	131
11	Mapa da cidade de Fortaleza e adjacências	46
12	Organograma de inclusão dos pacientes	54
13	Curvas de tolerância a lactose para casos e controles	60
14	Cromatograma do *HPLC* dos açúcares utilizados no estudo	63
15	Cromatograma dos açúcares utilizados nos casos do estudo.....	63
16	Cromatograma dos açúcares utilizados nos controles do estudo	64
17	Demonstra a interposição dos cromatogramas do *HPLC* para casos e controles, onde se observa a diferença de picos entre eles	64
18	Curva de ROC para análise percentual da excreção de manitol	66
19	Teste percentual de excreção do manitol na população de casos e controles	67
20	Curva de ROC de excreção percentual da lactulose.....	68
21	Distribuição da população do estudo para a taxa percentual de excreção da lactulose	69
22	Análise percentual da excreção da lactulose/manitol (permeabilidade intestinal) na população do estudo.....	70

23 Análise do percentual de excreção da lactose (curva de ROC)..... 71

24 Dispersão dos casos e controles em relação ao percentual de excreção da lactose..... 72

25 Análise do percentual de excreção lactulose/manitol..... 74

26 Taxa percentual de excreção lactulose/manitol nos voluntários..... 76

27 Curva de ROC para a taxa percentual de excreção da correlação lactose/manitol, considerando-se ingestão etílica..... 80

28 Percentual de excreção da lactose nos voluntários..... 82

29 Percentual de excreção da sacarose nos voluntários..... 83

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 15

1.1 Desenvolvimento Embriológico do Sistema Digestório 15

1.2 Evolução Clonal do Epitélio Gastrintestinal 16

1.3 Os Carboidratos na Alimentação Humana 17

1.4 Digestão e Absorção dos Carboidratos 18

1.5 Intolerância aos Carboidratos 19

1.6 Má Absorção de Lactose 20

1.7 Outros Fatores que Influenciam a Intolerância a Lactose 20

1.8 Fatores Genéticos na Intolerância a Lactose 21

1.9 Integridade e Permeabilidade do Epitélio Gastrintestinal 24

1.10 O Conceito de Permeabilidade Intestinal 25

1.11 Histórico dos Marcadores para Testes de Permeabilidade Intestinal 26

1.12 Medida da Permeabilidade Intestinal 28

1.13 Testes Diferenciais Utilizando Açúcares 31

1.14 Testes Utilizando Isótopos 33

1.15 Testes Utilizando Polímeros de Polietileno Glicóis (*PEGs*) 33

1.16 Fatores que Alteram a Integridade e a Permeabilidade do Epitélio Gastrintestinal 34

1.17 Mecanismos de Doenças que Alteram a Permeabilidade Intestinal 35

2 OS TESTES ATUAIS DE AVALIAÇÃO DA INTOLERÂNCIA AOS CARBOIDRATOS 40

2.1 Teste de Absorção dos Carboidratos com Curva Glicêmica 40

2.2 Teste do Hidrogênio Expirado 40

2.3 Determinação da Atividade das Dissacaridases na Mucosa 41

2.4 Genotipagem do Polimorfismo Hidrolase Lactase-Florizina 41

2.5 Teste Rápido de Lactase 42

3 JUSTIFICATIVA 43

4 OBJETIVOS 44

5 MATERIAIS E MÉTODOS 45
5.1 Ética 45
5.2 População do Estudo 45
5.3 Tipo de Estudo 47
5.4 Critérios de Inclusão/Exclusão 48
5.5 Teste de Tolerância a Lactose 48
5.6 Soluções para o Teste Múltiplo de Avaliação da Absorção de Dissacarídeos, Integridade da Mucosa, Área de Absorção e Permeabilidade Intestinal 49
5.7 Teste Múltiplo de Avaliação da Absorção de Dissacarídeos, Integridade da Mucosa, Área de Absorção e Permeabilidade Intestinal 50
5.8 Preparação das Amostras de Urina 50
5.9 Equipamentos e Condições Cromatográficas para Análise do HPLC-PAD 51
5.10 Análises Estatísticas 52

6 RESULTADOS 54
6.1 Fluxograma da População do Estudo 54
6.2 Avaliação da Área de Absorção, Lesão e Permeabilidade Intestinal 65
6.3 Avaliação da Excreção de Lactulose 68
6.4 Avaliação da Excreção de Lactose (como Teste Múltiplo de Açúcares) 70
6.5 Correlação entre o Percentual da Excreção Lactulose/Manitol 72
6.6 Estratificação dos Dados do Percentual de Excreção da Lactulose/Manitol e Correlação da Taxa de Excreção Lactulose/Manitol para Pacientes com e sem Ingestão Etílica Habitual 76
6.7 Correlação da Percentagem de Excreção Lactose/Manitol 79
6.8 Avaliação da Deficiência de Dissacaridases na Mucosa em Relação aos Testes aplicados na População do Estudo 80

7 DISCUSSÃO 84

8 CONCLUSÕES 96

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 97

ANEXOS 114

1 INTRODUÇÃO

1.1 Desenvolvimento Embriológico do Sistema Digestório

O desdobramento cefalocaudal e lateral do embrião leva uma parte da cavidade do saco vitelino, revestida por endoderma, a ser incorporada pelo embrião para formar o intestino primitivo. Outra duas partes da cavidade revestida de endoderma, o saco vitelino e a alantóide, permanecem fora do embrião. Nas partes cefálica e caudal do embrião, o intestino primitivo forma tubos com fundos cegos, o intestino anterior e posterior, respectivamente. A parte média, o intestino médio, permanece fora, temporariamente, ligada ao saco vitelino pelo duto vitelino. O desenvolvimento ocorre em quatro seções: intestinos faríngeo, anterior, médio e posterior. O ectoderma fora do revestimento epitelial dá origem ao parênquima das glândulas anexas fígado e pâncreas. A **Figura 1** (anexos) mostra a noção deste desenvolvimento nas suas primeiras etapas.

O intestino delgado é formado pela parte terminal do intestino anterior e parte cefálica do intestino médio. A junção destes dois segmentos localiza-se em posição imediatamente distal à origem do broto do fígado. Com a rotação do estômago, o duodeno assume a forma de alça em C e gira para a direita. Esta rotação, juntamente com o rápido crescimento da cabeça do pâncreas, faz com que o duodeno mude de sua posição mediana para o lado esquerdo da cavidade abdominal. Durante o 2º mês de gestação, a luz duodenal é obliterada pela proliferação das células de sua parede. Logo, a luz é recanalizada. O intestino anterior é suprido pela artéria celíaca, o intestino médio pela artéria mesentérica superior e o duodeno pelos ramos de ambas. O rápido desenvolvimento das alças intestinais, fígado e pâncreas, expulsa, temporariamente, as alças intestinais para fora do embrião, penetrando o celoma extra-embrionário do cordão umbilical – hérnia umbilical fisiológica. Durante a décima semana, as alças começam a retornar para a cavidade (LANGMAN, 1977; SULIK, 2003). A **Figura 2 (**anexos**)** mostra uma idéia sobre estas correlações.

1.2 Evolução Clonal do Epitélio Gastrintestinal

O epitélio gastrintestinal é formado por uma variedade de células mantidas juntas por extensas ligações intercelulares. Formam uma camada de células, recobrindo as criptas e os vilos. As células são formadas nas criptas e se movem para o topo dos vilos e são estruídas vários dias depois (MADARA; TRIER, 1994). As criptas contêm uma população de células-tronco, provavelmente células colunares basais das criptas (CHENG; LEBLOND, 1974), capazes de produzir todos os tipos de células. Como são células pluripotenciais, não originam diretamente as células maduras. Por exemplo, as células colunar e mucosa são derivadas de células imaturas, que foram objeto de várias divisões no meio das criptas, antes da diferenciação terminal no topo do vilo. A **Figura 3** (anexos) demonstra este processo.

O intestino humano é alvo de rápida renovação celular do epitélio. Esta renovação é dirigida pelas células-tronco da base das criptas (CHENG; LEBLOND, 1974; CHENG; BJERKNES, 1999). No intestino delgado, as células-tronco produzem os enterócitos absortivos e três tipos de células secretoras: células caliciformes (mucóides), enteroendócrinas e células de Paneth. Estas produzem peptídeos antimicrobianos, fatores do crescimento, enzimas digestivas e completam sua diferenciação na base da cripta. As outras células completam sua diferenciação durante a migração para o topo do vilo, onde são estruídas. A **Figura 4** (anexos) demonstra a migração celular da cripta ao topo do vilo.

Em um modelo de estudo em mamíferos para tecidos com renovação própria, o epitélio intestinal é representado por células basais multipotenciais, um compartimento de trânsito amplificador, várias linhagens binárias de decisão e células com morte programada (apoptose). Como a epiderme da pele, o epitélio intestinal constitui barreira formidável de proteção entre o organismo e o mundo externo (como deve ser visto, pelo menos do ponto de vista de agressões). O epitélio intestinal do adulto forma uma estrutura bidimensional de camada contínua. Nova camada de células é adicionada pelas criptas e estas são movidas para o topo do vilo, onde passam por apoptose (HEATH, 1996; RADTKE et al., 2005). A **Figura 5** (anexos) demonstra esta dinâmica celular.

As células de Paneth escapam desta migração, permanecendo na base da cripta (POTTEN, 1998). As células de transição têm autocapacidade limitada de renovação; após 3 ou 4 divisões celulares, atingem a diferenciação e conseqüente especialização, em uma das

linhagens maduras.

Uma camada de fibroblastos especializados é posta sob as células das criptas, separados apenas por uma membrana basal (POWELL et al., 1999). Os chamados fibroblastos mio-epiteliais formam um sinsício que se estende por todo o trato gastrintestinal. A linhagem de células enteroendócrinas se subdivide de acordo com os entero hormônios que secretam serotonina, substância P, e secretina, e representam a menor proporção de células (menos de 1 %) (HOCKER; WIEDERMANN, 1998).

A manutenção destes ciclos celulares responde a vários estímulos gênicos, como o peptídeo proglucagon 2 (GLP-2), que induz uma hiperplasia das criptas e aumento dos vilos (BURRI et al., 2001; DRUKER et al., 1996). Por outro lado, agressões como quimioterápicos, doenças inflamatórias, nutrição parenteral total e radiação induzem uma atrofia desses ciclos (CHANCE et al., 1997; CHANCE et al., 2000; CHENG; BJERKNES, 2001). Estímulos neurais (BJERKANES; CHENG, 2001), por meio de receptores celulares, como os da serotonina, glucagon, peptídeo intestinal vasoativo, subfamílias da proteína G, bem como toxinas e produtos de células inflamatórias, podem interferir na modulação celular intestinal (BENJAMIN et al., 2000).

1.3 Os Carboidratos na Alimentação Humana

Os carboidratos são macronutrientes da dieta humana, chegando a perfazer 50% das calorias diárias ingeridas (HAMMOND; LITMANN, 1985; RUMESSEM, 1992). Ao primeiro ano de vida, a lactose é o açúcar mais importante no desenvolvimento dos lactentes, como fonte de energia. Na criança maior e no adulto, o amido é o carboidrato predominante.

O leite humano contém em média 7% de lactose; no da vaca e da cabra o percentual de lactose é menor, cerca de 5%.

Além da lactose (3 a 5% das calorias para os adultos), outros carboidratos participam do conteúdo alimentar como energia: amido, glicogênio, sacarose, frutose, maltose e isomaltose.

De forma ideal, a lactose devia ser o carboidrato exclusivo da alimentação nos primeiros seis meses de vida.

A média de consumo diário de carboidratos para o adulto nos EUA é em torno de 1600 calorias ou 400g diários assim distribuídas: amido 55% - sacarose 35% - lactose 5% - frutose 3% (LEVITT, 1985).

1.4 Digestão e Absorção dos Carboidratos

A digestão e a absorção dos carboidratos ocorrem em várias etapas e segmentos no trato digestório. O aparelho digestivo humano está programado para absorver, na sua maioria, moléculas pequenas, como os monossacarídeos, resultantes da digestão dos carboidratos. Os carboidratos são digeridos por enzimas produzidas ao longo do trato digestório superior.

A hidrólise dos carboidratos mais complexos inicia-se pela amilase salivar e pancreática. Na primeira fase, são produzidas dextrinas, maltotrioses, maltoses e quantidades pequenas de glicose.

Por volta de 12 anos, a produção de amilase é igual à do adulto; embora a amilase seja desnaturada em pH menor do que 4, 3,15% da amilase do duodeno são de origem salivar. Este percentual pode ser de 50% em lactentes, o que os torna pouco tolerantes aos carboidratos (HEITLINGER et al., 1988).

Após esta fase, os produtos da digestão dos polissacarídeos, oligossacarídeos e dissacarídeos são incorporados aos microvilos dos enterócitos – células maduras das vilosidades – sendo aí alvo da ação das alfaglicosidases (sacarase, isomaltase, maltase e lactase).

A glicoamilase é uma alfaglicosidase que se localiza do meio para a base da vilosidade, em todo o intestino delgado. Degrada maltose e oligossacarídeos lineares (3 a 9 unidades de glicose) em moléculas de glicose.

A subunidade sacarase (sacarase-isomaltase) hidrolisa a sacarose e oligossacarídeos ligados ao carbono 1 (maltose e maltotriose), resultando em glicose como produto final.

A unidade isomaltase age nas ligações 1-6 dos oligossacarídeos (isomaltose e dextrinas alfalimites), resultando em glicose.

A sacarose (35% da dieta dos carboidratos do adulto) é hidrolisada, pelo complexo sacarase-isomaltase, em glicose e frutose.

A lactase é uma betagalactosidase detectada a partir da 3ª semana de gestação. Alcança capacidade de hidrolisar a lactose no final da gestação a termo (LEVITT, 1969; BEIGUELMAN et al., 1983). Sua atividade é menor do que outras dissacaridases, localizando-se no ápice do vilo, o que a torna mais susceptível às agressões da mucosa intestinal (BULLER et al., 1991). Hidrolisa lactose em glicose e galactose. Decresce significativamente a partir do 4º ou 5º ano de vida.

A atividade das dissacaridases decresce no sentido crânio-caudal do intestino delgado. Significa que a digestão e a absorção dos dissacarídeos são maiores na região proximal. Os monossacarídeos resultantes da hidrólise voltam ao lume intestinal, onde serão absorvidos. A baixa permeabilidade da borda em escova dos enterócitos para glicose, galactose e frutose faz com que existam mecanismos ativos de transporte para absorção destas moléculas (COMMITEE ON NUTRITION, 1978).

1.5 Intolerância aos Carboidratos

Não há relação constante entre má absorção e intolerância a um açúcar. A má absorção é a redução ou mesmo ausência de absorção de um nutriente. A intolerância ao açúcar é a manifestação clínica – náuseas, dor abdominal, distensão, flatulência e diarréia, decorrentes da má absorção do carboidrato.

A má absorção pode decorrer de má digestão, deficiência ou ausência de enzima digestiva, secreção ácida, velocidade do esvaziamento gastrintestinal, integridade estrutural e

funcional da mucosa absortiva.

1.6 Má Absorção de Lactose

Lactose é um dissacarídeo resultante da síntese, na glândula mamária, da união de uma molécula de beta-d-galactosee e outra de alfa-d-glicose, resultando na betagalactosil-1,4 glicose. Requer a ação da enzima galactosil tranferase e da lactoalbumina (BEIGUELMAN et al., 1983).

A má absorção de lactose pode ser primária ou secundária. A primária pode ser congênita, o que é raro (BULLER et al., 1991; COMMITEE ON NUTRITION, 1978), com ausência total ou níveis muito baixos da enzima. Decorre da herança autossômica recessiva nestes casos (SAVILAHTTI et al., 1983). Outra forma é a ontogenética, ocorrente após o desmame e é geneticamente determinada pela herança autossômica recessiva (BAYLESS, 1982). A **Figura 6** (anexos) mostra a representação molecular da lactose.

1.7 Outros Fatores que Influenciam a Intolerância a Lactose

Intolerância a proteína do leite de vaca é um distúrbio complexo. Numerosas proteínas do leite estão implicadas na resposta alérgica e se tem demonstrado que a maioria contém múltiplos epitopos alergênicos. A reação alérgica ao leite de vaca envolve múltiplos mecanismos imunológicos. A incidência e o mecanismo alergênico dominante mudam com a idade, sendo a reação IgE-mediada comum na infância e a reação não-IgE-mediada dominante em adultos. É freqüentemente confundida pelo público e médicos como intolerância a lactose, levando a um subdiagnóstico próprio ou clínico (CRITTENDEN; BENNETT, 2005).

Em pacientes com intolerância a lactose e sem intolerância, a flora colônica metaboliza de maneira diferente os produtos da lactose. Embora em ambos os grupos (com e sem intolerância a lactose) o padrão da flora não mude significativamente, o grupo de pacientes intolerantes produz d- e l-lactato, acetato, propionato, butirato mais rapidamente e em maior quantidade do que os grupos sem intolerância. Isto se correlaciona com os sintomas clínicos (HET et al., 2006). Utilizando-se a técnica de hibridização por fluorescência *in situ*

para quantificar as bactérias colônicas em pacientes com e sem intolerância a lactose, verifica-se que a quantidade não difere significativamente. Uma correlação negativa de *score* de sintomas, contudo, é encontrada no grupo de pacientes com intolerância a lactose (ZONG et al., 2004).

Quimioterápicos, como 5-flourouracil (5-FU) ou similares, são reconhecidamente indutores de um processo inflamatório no intestino (particularmente o delgado) conhecido como "mucosite". Isto aumenta a disabsorção de nutrientes, contribuindo para o estado de desnutrição nestes pacientes. Um dos mecanismos para o qual esta situação clinica contribui é o desencadeamento de intolerância a lactose adquirida, sendo maior nos pacientes que tomam 5-FU. É reversível, entretanto, após a suspensão da terapêutica (OSTERLUND et al., 2004).

A redução da hidrólise mucosa de oligômeros da glicose, atividade da glicoamilase, ocorre em 2 % das biopsias de intestino delgado de crianças com diarréia crônica, embora o aspecto histológico seja normal. Estas deficiências múltiplas estão codificadas nos genes MGAM, LCT e St, mapeadas nos cromossomos 7, 2 e 3, respectivamente (NICHOLS et al., 2002).

Outro aspecto relatado, concernente a deficiência de lactase, é a influência na microbiota colônica, modificando esta, de predominantemente proteolítica, para sacarolítica. Isto favorece um potencial prebiótico. Desta forma, pode-se inferir que, nas doenças intestinais colônicas, como câncer de cólon e enfermidades inflamatórias intestinais, como doença de Crohn e retocolite ulcerativa inespecífica, isto possa ter importância (*RCUI*) (SZILAG, 2002).

1.8 Fatores Genéticos na Intolerância a Lactose

Alguns povos mantêm a atividade lactásica na vida adulta, atribuindo-se este fato a vantagens seletivas. No Neolítico (7.000 a 2.500 anos a.C.), quando os povos do norte da África, em áreas desérticas da Arábia, passaram a desenvolver atividades pastoris e o leite e seus derivados foram incorporados a sua dieta (SIMOONS, 1969), a deficiência de lactase passou a se manifestar clinicamente.

A Paleontologia humana demonstra que o homem teve pelo menos duas grandes migrações da África para o resto do mundo. Uma arcaica, com o *Homo erectus e Homo heidelbergensi,* e outra nos últimos 100.000 anos, com o homem anatomicamente semelhante ao atual – *Homo sapiens* – que veio a resultar no atual – *Homo sapiens sapiens* (TRINKAUS, 2005).

Uma mutação genética ocorreu entre 5000 e 6000 anos, entre os povos criadores de gado no norte e centro da Europa, diferenciando a capacidade de proceder à digestão da lactose entre as populações (REED; TISHKOFF, 2006). Com efeito, podemos verificar que a distribuição mundial de intolerância a lactose é variável – 65 % da população mundial –, distribuídos assim: 50 % dos brasileiros; 99 % dos chineses; 1 % dos suecos e holandeses. Esta população foi beneficiada pela mutação de 5 milênios atrás. Esta mutação ocorreu no gene codificador da lactase (*LCT*) (*C/T*-13910), modificando os níveis da enzima lactase-florizina hidrolase (*LPH*). Este gene tem localização *2q21* (TISHKOFF et al., 2006). A **Figura 7** (anexos) mostra, no **mapa 1**, as possíveis migrações humanas e do homem moderno.

A genotipagem do polimorfismo da hidrolase lactase-florizina – polimorfismo 13910 (*LPH C→T*) por *PCR* (*polimerase chain reaction*) é utilizada para o diagnóstico da intolerância a lactose. Este teste se mostra útil na diferenciação de hipolatasemia primária e secundária. Avaliando em 220 indivíduos caucasianos com teste de hidrogênio espirado positivo para deficiência de lactase, a freqüência de polimorfismo foi de 21,4%, 41,8 % e 36,8 % para os genótipos C/C, C/T e T/T (BODLAJ et al., 2006).

A dificuldade do tratamento clínico desta enfermidade, com o uso de enzimas produzidas por bactérias, agindo de forma parcial e paliativa, levou à busca por terapias definitivas, com uso da terapêutica genética. Dentre os carreadores virais para este propósito, um vírus adeno-associado é particularmente útil nesta terapia gênica. É um vírus defectivo, *helper-dependent*, sendo o tipo selvagem não patogênico para seres humanos ou outras espécies (BERNS et al., 1979). Deste vetor recombinante, foi removida uma seqüência inteira, retendo apenas 145 pares de bases com terminal repetido. Este vetor é destituído de ação viral, reduzindo a possibilidade de recombinações e expressão gênica viral. O vetor, entretanto, pode induzir resposta imunológica, contudo relativamente mínima, comparada à resposta oferecida à primeira geração de vetores adenovirais (XAO; HAUWIRTH, 1996). É um vetor

muito útil, pois é resistente a pH baixo, solventes e temperaturas altas (BERNS; HAUWIRTH, 1979). Por último, este vetor viral pode induzir a expressão gênica de longa duração em células de diferenciação terminal, como tem sido demonstrado em células cerebrais após administração oral *in vivo* (KAPITT et al., 1991). Ratos adultos com 4 meses de idade da cepa Fisher 344 e da cepa Spague-Dawley, com 14 meses de idade (idade avançada), foram infectados pelo vetor. Em 3 dias e 6 meses após a expressão do *m-RNA*, da β-galactosidase foi positiva em todos os *müribus* do experimento.

A má absorção ontogenética da lactose varia por faixa etária e etnia (TADESSE et al., 1992; BEAN et al., 1990). O adulto, em geral, apresenta de 5 a 10% de atividade lactásica dos valores do lactente.

A má absorção secundária decorre de agressões à mucosa intestinal: gastrinterites, desnutrições, doença celíaca, giardíase, enteropatias perdedoras de proteínas e alérgicas (BEAN et al., 1990). Outros fatores que diminuem o contato da lactose com a mucosa: aceleração de trânsito, ressecções e supercrescimento bacteriano. Uma condição peculiar é a sobrecarga do dissacarídeo, o que resulta na oferta maior do que a capacidade enzimática.

Um declínio da atividade lactásica da mucosa intestinal ocorre após a infância e leva à condição conhecida como hipolactasemia do tipo adulto ou não-persistência da lactase. Num individuo afetado, a exposição a produtos lácteos leva a sintomas clínicos, como dores abdominais, distensão, cólicas. Flatulência e diarréia podem ocorrer em razão da presença de lactose não hidrolisada no lume intestinal (DAHLAVIST et al., 1963). A hipolactasemia do tipo adulto representa uma condição normal após o desmame (SIMOONS, 1970). A persistência da lactase, condição hereditária dominante é freqüente em populações expostas a produtos lácteos, particularmente no norte da Europa (SAHI et al., 1973; SIMOONS et al., 1978). A variante genética *C/T*-13910, localizada próximo de 14 kd acima do inicio do códon da lactase no cromossoma *2q21*, tem sido demonstrada como associada com a persistência da lactase ou não-persistência (ENATTAH et al., 2002; TROELSEN et al., 2003).

O diagnóstico da hipolactasemia do tipo adulto é habitualmente baseado no teste de tolerância a lactose, cuja especificidade varia de 77-96% e sensibilidade de 76-94% (AROLA, 1994). Para o teste do hidrogênio respirado, a especificidade relatada é de 89-100% e a sensibilidade de 69-100% (AROLA, 1994). O método clássico de referência é a dosagem

bioquímica direta da atividade dissacaridásica no duodeno em biopsias intestinais (DAHLAVIST, 1984). Um recente teste usa a determinação do genótipo *C/T*-13910 de linfócitos do sangue (LEVITT, 1969). Outra prova recente emprega o Teste Rápido de Lactase em biopsia duodenal endoscópica (Lactase Intolerance Quick Test Kit – Biohit PLC, Helsinki, Finlândia), que, quando comparado à determinação do polimorfismo *C/T*-13910, mostrou sensibilidade e especificidade de 100% (BAYLESS, 1982).

1.9 Integridade e Permeabilidade do Epitélio Gastrintestinal

A barreira funcional intestinal representa uma barreira seletiva ao transporte transepitelial de íons, solutos e água. As propriedades da barreira intestinal variam ao longo do epitélio sob influência de fatores fisiológicos e mais severamente por estímulos fisiopatológicos. Embora as propriedades básicas fisiológicas tenham sido delineadas na década de 1970 (BARRY; BOULPAEP, 1975; DIAMOND, 1978), contudo, só mais recentemente, as bases moleculares das propriedades seletivas e sua regulação fisiológica foram descritas (POWEL, 1981; TISUKIT; FURKUSE, 2002). As junções firmes intercelulares (*tight juntions*), sua fisiopatologia (NUSRAT et al., 2000), componentes moleculares (D'ATRI; CITI, 2002) e regulação (BALDA; MATTER, 2002; YU, 2003) desempenham papel importante no transporte epitelial na higidez e enfermidade. As junções dispõem de poros que contribuem, de modo geral, para as características fisiológicas de cada epitélio. As ditas *leaky* são encontradas em epitélios que lidam com grandes volumes de líquidos isoosmóticos, como o intestino. As junções *tight* são encontradas em epitélios que lidam com grandes gradientes eletroosmóticos, como nos túbulos distais e coletores renais (POWELL, 1981). Comparados aos canais transmembrânicos, os poros paracelulares são mais largos e menos discriminativos para o tamanho e carga molecular (DIAMOND, 1978; TANG; GOODENOUGT, 2003). Um grupo de proteínas, chamadas claudinas, é responsável pela seletividade dos poros e transporte paracelular (YU, 2003). A **Figura 8** (anexos) demonstra um modelo especulativo para os poros das junções firmes intercelulares (*tight juntions)*.

A condutância das junções intercelulares pode ser afetada por estímulos fisiológicos e patológicos, como toxinas bacterianas (SEARS, 2003), componentes citotóxicos (POWELL, 1981), citocinas (NUSRAT et al., 2000) e hipóxia (WITT et al., 1998). A miosina

quinase de cadeia leve (*MLCK*) é considerada um efeito nas mudanças da condutância, estimulando a contração prejuncional do citoesqueleto por fosforilação (TURNER et al., 1977; TURKSEN; TROY, 2001). Isto estreita ou alarga os poros, dependendo do estímulo.

1.10 O Conceito de Permeabilidade Intestinal

No intestino delgado ocorrem digestão e absorção de nutrientes, essenciais ao desenvolvimento e manutenção da vida. Normalmente o estado nutricional do indivíduo está ligado à capacidade dos enterócitos absorverem os nutrientes provenientes da dieta. Modificações no balanço da homeostase do intestino delgado e o estado nutricional em condições hígidas e patológicas, tais como na doença celíaca (BRUNSER et al., 1966), doença de Crohn (FARMER; MICHENER, 1979), linfangiectasia intestinal (VARDY et al., 1975) e outras enfermidades diarréicas (SNYDER; MARSON, 1982; BERN et al., 1992; SCHORLING et al., 1990, LIMA; GUERRANT, 1992) foram extensamente descritas.

A permeabilidade intestinal relaciona-se à barreira funcional e à permeação de marcadores, sendo utilizada para medir a permeabilidade (MENZIES, 1984; TRAVIS; MENZIES, 1992). Permeabilidade é o fluxo de solutos através de uma unidade de área de membrana em certo tempo. A permeação depende do relacionamento estreito da substância em questão com os constituintes da membrana a ser ultrapassada. A permeação relaciona-se ao tamanho molecular da substância ou íon de que se trata, em relação aos poros hidrofílicos da membrana. A permeabilidade é inerente à facilidade com que a superfície da mucosa intestinal pode ser penetrada por substâncias, por difusão, sem a ingerência de mediadores de constituintes específicos. A difusão não facilitada significa a passagem de moléculas, dependente de gradiente de concentração, sem assistência passiva ou ativa de um sistema bioquímico de transporte. A difusão obedece à lei de Graham, segundo a qual a difusão é inversamente proporcional à raiz quadrada do peso molecular da substância em foco (TRAVIS; MENZIES, 1992).

Em uma investigação clínica, a permeabilidade intestinal é aplicada para permeação de moléculas com massa maior do que 150 dáltons, em vez de íons, como sódio ou cloreto, para os quais a expressão permeabilidade de membrana é normalmente usada. A

permeabilidade intestinal pode ser afetada por enfermidades, drogas, dieta, citocinas, hormônios ou o próprio ambiente, mas não parece ser comprometida pela idade, raça ou fatores hereditários (TRAVIS; MENZIES, 1992). Alterações da permeabilidade intestinal decorrentes de patologias diarréicas, alergias alimentares e outras abrem potencial para o acesso não invasivo na avaliação e diagnóstico de doenças, bem como parâmetros para terapêuticas, sendo a razão para o alto interesse na utilização dos testes de permeabilidade intestinal. Neste trabalho, avalia-se a aplicação destes testes, utilizando uma nova metodologia que aborda simultaneamente a integridade da mucosa, a permeabilidade da mucosa, a área de absorção e a capacidade de dissacaridases do enterócito.

1.11 Histórico dos Marcadores para Testes de Permeabilidade Intestinal

O uso de marcadores para avaliar a passagem de substâncias através da barreira intestinal vem de longa data. Lister (1873) introduziu no intestino de um cão um corante azul com massa de 262 dáltons, numa tentativa de mostrar sua passagem através da parede intestinal (LISTER, 1873). Os trabalhos de Reid (1892) indicaram a importância de se manter gradiente osmótico e de pressão hidrostática para investigação *in vitro* das alterações de permeabilidade e transporte intestinal. Reid (1892) utiliza o fluxo retrógrado de cloreto de sódio para banho do lado mucoso, o qual ocorre quando a mucosa é lesada ou apresenta alterações de permeabilidade.

Em 1901, Hober usou o molibdato (P.M. = 180 Da) para demonstrar que a absorção era por via transcelular e Osterhout (1912) demonstrou que substâncias antagonistas modificam determinados processos que controlam a permeabilidade intracelular em membranas biológicas. A permeabilidade é, portanto, uma propriedade dinâmica das membranas biológicas.

McCance e Madders (1930) utilizaram marcadores, tais como ramnose, xilose e arabinose, para demonstrar a taxa de absorção de uma variedade de substâncias, ficando estabelecido, em ratos, que depende do peso molecular e da lipossolubilidade (HOBER; HOBER, 1937).

Moléculas com massa acima de 180 dáltons apresentam dificuldade de absorção e o raio estimado para estas substâncias é de aproximadamente 0,4 nanômetro (nm) (SCHULTZ; SOLOMON, 1961). Por outro lado, o critério de peso molecular, isoladamente, não é parâmetro seguro para avaliar a difusão de substâncias através de um gradiente de concentração em membranas biológicas (HOLLANDER et al., 1988). Utilizando-se modelos matemáticos em computação, que levam em consideração vários parâmetros – como composição molecular, massa, geometria da molécula, conformação óptica e raio de van der Waals – os autores sugerem que as moléculas devem ter o tamanho bem menor do que anteriormente estimado (HOLLANDER et al., 1988).

Os primeiros estudos da permeabilidade intestinal em humanos foram realizados por Fordtram et al. (1965), utilizando marcador não absorvível, como o polietileno glicol – PEG-400 e solutos de massas diferentes. Esses estudos foram capazes de sugerir a presença de poros hidrofílicos na membrana apical do enterócito. Observaram poros de 0,8 nm no jejuno e de 0,3 nm no íleo distal. A diferença de permeabilidade entre o jejuno e o íleo terminal é confirmada, posteriormente, em estudos com marcadores para fluxos unidirecionais (DAVIS et al., 1982).

A definição, por fisiologistas e microscopistas eletrônicos, das propriedades da barreira epitelial funcional, deu novo impulso às pesquisas. Os estudos de Farquhar e Palade (1963) foram decisivos para descoberta das zonas de adesões observadas nas conexões entre as células de vários epitélios. Estas são hoje conhecidas como zônulas de oclusões ou *tight junctions*.

Trabalhos de Ussing e Windhager (1964), utilizando microeletrodos na pele de sapos, observam a importância da via paracelular para a transferência de íons, demonstrando, assim, que esta via não está obstruída. A seguir, Fromter e Diamond (1972) introduziram os termos em inglês *tight* e *leaky* para caracterizar diferenças na permeabilidade, demonstradas por alterações na resistência elétrica em membranas biológicas. O intestino delgado humano é considerado *leaky* por apresentar resistência total do tecido <1000 ohm/cm^2. De outro modo, o intestino grosso é caracterizado por *tight* ou moderadamente *tight* por apresentar resistência alta, dificultando a entrada de substâncias polares.

O uso de testes não invasivos para determinar a permeabilidade intestinal vem das

observações em pacientes com doença celíaca. Nestes, postula-se que há alterações na permeabilidade intestinal, porque apresentam dissacaridúria (GRYBOSKI et al., 1963; WESER; SLEISENGER, 1965). Simultaneamente, na época, existiu grande interesse no estudo do modo como o intestino absorvia proteínas e toxinas antigênicas. Deste modo, na década de 1970, foram utilizados marcadores, como dextran marcado com fluoresceína ou em combinação com lactose (342 Da), rafinose (504 Da) e estachiose (666 Da) para teste não invasivo de permeabilidade intestinal (WHEELER et al., 1978). No final da década de 1970, foram introduzidos testes diferenciais utilizando a combinação de dissacarídeos e monossacarídeos, como celobiose/manitol (COBDEN et al., 1978) e lactulose/L-ramnose (MENZIES et al., 1979). Os testes de permeabilidade utilizando polietilenos glicois (CHADWICK et al., 1977) e ^{51}Cr-EDTA (acido etilenodiaminotetracetico) (BJARNASON et al., 1983) foram introduzidos no final da década de 1970 e início de 1980. Diferentemente dos carboidratos utilizados como marcadores, estes últimos não são degradados pelas bactérias e são teoricamente bem indicados para o intestino grosso, onde existe intensa proliferação bacteriana.

1.12 Medida da Permeabilidade Intestinal

A mucosa intestinal saudável é altamente seletiva. Moléculas inertes passam através das superfícies absortivas, tendo como pontos críticos o gradiente de concentração, a área da superfície exposta, o tempo de exposição mucosa, bem como a permeabilidade da mucosa intestinal. A mucosa saudável tem acentuada discriminação no que concerne à dimensão da molécula, configuração molecular e solubilidade, representada pela polaridade molecular (MENZIES et al., 1983). Esta discriminação está prejudicada com o dano à mucosa. A integridade da mucosa pode ser testada de maneira não invasiva (TURNAHAM et al., 2000; CHEN et al., 2003). Alguns açúcares são moléculas hidrofílicas e têm baixa atividade pelo sistema de transporte de monossacarídeos da mucosa intestinal. Não são metabolizados e são absorvidos passivamente. Após sua captação, circulam no sangue e são excretados intactos na urina (LIMA et al., 1997; WYATT et al., 1993; PEARSON et al., 1982; LAKER; MENZIES, 1977).

O manitol penetra pela via transcelular, ou seja, através da membrana celular. Já a

lactulose entra pela via paracelular, por entre as células absortivas mucosas, constituídas pelas zônulas de oclusão, pelo espaço intercelular, zonas de extrusão resultantes da morte celular e pelas áreas de exsulcerações.

A perda da integridade da mucosa intestinal faz aumentar a absorção de lactulose e a perda das áreas absortivas diminui a absorção do manitol (FLEMING et al., 1990). A razão da permeabilidade entre lactulose/manitol indica uma medida quantitativa da integridade e função absortiva intestinal.

Duas vias de permeação encontram-se disponíveis no epitélio intestinal normal - através da célula (transcelular) e entre as células (paracelular). A **Figura 9** (anexos) apresenta esquema das duas vias de absorção.

Utilizando-se marcadores moleculares de tamanhos diferentes e aplicando-se gradiente osmótico na mucosa ou serosa, é possível identificar poros eletroneutros largos (6,5 nm) e poros seletivos para cátions pequenos (0,7 nm), provavelmente localizados entre as células (PAPPENHEIMER et al., 1951). Os poros eletroneutros pequenos (0,4 nm) são identificados, por exemplo, na membrana apical do íleo do coelho (NAFTALIN; TRIPATHI, 1985).

A via paracelular é constituída pelas zônulas de oclusões, o espaço intercelular, as zonas de extrusões resultantes da morte celular e áreas de ulcerações. Existem várias razões para se acreditar que essa via é normalmente utilizada por moléculas de massa superior a 180 Da, tais como lactulose, celobiose, EDTA, rafinose ou dextran. Essas moléculas permanecem no espaço extracelular quando administradas por via intravenosa, sugerindo que as moléculas não atravessam as membranas celulares. As junções paracelulares ocupam menos de 5% da área total do epitélio intestinal, o que está de acordo com a localização de pequenas quantidades de poros largos (MARCIAL et al., 1984). Poros seletivos para cátions estão localizados na junção intercelular, o que limita adicionalmente a permeação de moléculas maiores com cargas negativas, como oligossacarídeos e EDTA (NAFTALIN; TRIPATHI, 1985).

As zônulas de oclusões (*ZO*) são estruturas que circundam as células epiteliais na porção apical, conectando uma célula a outra, mantendo, assim, a polaridade apical e

basolateral da membrana celular (CEREIJIDO et al., 1988). As *ZO*s são formadas por fibras protéicas (cingulina e *ZO*-1), conectadas ao citoesqueleto das células adjacentes (CITI et al., 1988; STEVENSON et al., 1986; MADARA, 1987). Esta estrutura é regulada por mediadores intracelulares como *AMP*c (adenosina monofosfato cíclico) e $Ca2^{+}$ (DUFFEY et al., 1981; PALANT et al., 1983), os quais aumentam a resistência e a proteína cinase C ativada por vários ésteres de forbois, a qual diminui a resistência nas *ZO*s (MULLIN; O`BRIEN, 1986).

Os espaços intercelulares são relativamente estreitos e tortuosos, podendo dificultar a passagem de solutos maiores. Por outro lado, é possível que moléculas maiores passem através da extrusão de células ou ulcerações do epitélio intestinal (CLARKSON, 1967; MOORE et al., 1989).

A via intracelular permite a passagem de solutos através da membrana celular; monossacarídeos, como ramnose e moléculas pequenas de *PEG*s, são capazes de penetrar o eritrócito e podem passar através da membrana do enterócito (TRAVIS; MENZIES, 1992). Estudos realizados por Naftalin e Triphati (1985) sugerem a presença de poros pequenos eletroneutros (0,4 nm), na membrana do enterócito do íleo de coelho, os quais permitem a passagem de solutos como manitol, ramnose e *PEG*s de permeabilidades diferentes, que podem alterar ou induzir a erros na medida do teste.

A molécula de prova ideal para o teste de permeabilidade intestinal deve ser biologicamente inerte, hidrossolúvel e atravessar o epitélio intestinal obedecendo à lei de Graham. Esses marcadores são normalmente excretados e medidos nas amostras de urinas, após ingestão por via oral. A excreção urinária do marcador deve ser feita por meio da filtração glomerular e este não deve ser reabsorvido nos túbulos renais. É importante, nesse caso, determinar a quantidade de recuperação do marcador, após administração intravenosa. É imprescindível, também, que os testes com os marcadores escolhidos apresentem alta sensibilidade, precisão e acurácia, bem como sejam facilmente exeqüíveis nos fluídos biológicos, como urina. A **Tabela 1** resume as taxas de permeabilidade intestinal, bem como o percentual de recuperação, após injeção intravenosa de vários marcadores moleculares.

Tabela 1 – Taxas de permeabilidade intestinal e recuperação de vários marcadores moleculares em indivíduos normais.

Marcador	Peso mol (Da)	Permeação (% Excreção Urinária/5h)	Permeação (% Excreção Urinária/5h)	Recuperação* (% Excreção após dose i.v.)
		Iso-osmolar^{o}	Hiperosmolar°	
L-arabimnose•	150	17,5	-	73
L-ramnose	164	10,1	11,7	72
D-manitol	182	16,8	20,6	79
Lactulose	342	0,25	0,41	97
Celobiose	342	-	0,38	92
^{51}Cr-EDTA	359+	0,64	0,70	96
Rafinose	504	0,26	-	97
PEG-400	194-502	18,2	20,3	41
^{99}mTc-DTPA	549	2,8	-	-
Dextran	3000	0,04	0,12	96

º Iso-osmolar=200-300 mosmol/kg e hiperosmolar=1350-1500 mosmol/kg
* Média de urina coletada por 12 horas.
• Parte através do transporte mediado por carreador.
+ Peso molecular do ligante
Fonte: TRAVIS; MENZIES (1992).

1.13 Testes Diferenciais Utilizando Açúcares

A variação individual na permeação dos marcadores depende de fatores como o esvaziamento gástrico, o trânsito intestinal e a diluição no lúmen intestinal. Estes fatores podem ser minimizados com a utilização de testes diferenciais de permeabilidade. A combinação de um marcador maior, como lactulose, celobiose ou *EDTA,* com um menor, como *L*-ramnose ou manitol, permite o cálculo da razão marcador maior/marcador menor, o qual reduz a variação individual e aumenta a acurácia na avaliação da permeabilidade intestinal (MENZIES, 1974). Acredita-se que a *L*-ramnose ou manitol atravesse o epitélio intestinal por meio das vias transcelular e paracelular, respectivamente, permitindo, assim, no teste diferencial, um denominador comum para ajuste da área individual de absorção. A lactulose, celobiose ou *EDTA* atravessam quase exclusivamente pela via paracelular, medindo assim o grau de lesão e/ou alterações nas zônulas ocludentes do epitélio intestinal.

Os testes diferenciais com duplo açúcar (dissacarídeos-monossacarídeos)

apresentam apenas pequenas diferenças quando comparados entre si, e algumas vezes associados a outros açúcares, para determinar má absorção de carboidratos ou deficiência na atividade de dissacaridases (MAXTON et al., 1990; NOONE et al., 1986).

As combinações de celobiose-manitol (COBDEN et al., 1985; JUBY et al., 1989; COBDEN et al., 1980) e lactulose-manitol (UKABAM; COOPER, 1984; JUBY et al.; 1989; ANDRE et al., 1988) são consideradas os melhores testes com duplos açúcares, hoje utilizados para medida da permeabilidade intestinal. Alguma possibilidade de erro na avaliação pode ocorrer e está normalmente relacionada com o metabolismo e análise dos açúcares. Apesar de a lactulose não ser metabolizada por nenhuma das dissacaridases humanas, a celobiose é hidrolisada pela lactase intestinal (DAHLQVIST, 1964). A afinidade da lactase para com a celobiose, entretanto, é suficientemente baixa para não interferir na medida da permeabilidade. Em animais experimentais como ratos e cachorros, o manitol pode ser degradado em torno de 15 % do total ingerido, provavelmente via ação da enzima sorbitol de-hidrogenase (PAPPENHEIMER, 1990). Por outro lado, o percentual de recuperação do manitol nos pacientes é de aproximadamente 70% (COBDEN et al., 1985).

Outras combinações de açúcares são também utilizadas, tais como lactulose/L-ramnose e celobiose/L-ramnose. A lactulose normalmente é recuperada quase que totalmente na urina, ao passo que a *L*-ramnose é recobrada em torno de 75% na urina, após injeção intravenosa (MAXTON et al., 1986; ELIA et al., 1987).

A atividade das dissacaridases ou transporte mediado por sistemas de transportadores intestinais pode ser associada a testes diferenciais de permeabilidade, que utilizam o principio comum dos marcadores já descritos. Por exemplo, a combinação do teste de lactulose/L-ramnose com lactose, sacarose e palatinose, em uma solução iso-osmolar, permite a avaliação simultânea da atividade da lactase, sacarase e isomaltase, bem como a permeabilidade (MAXTON et al., 1990). Neste teste, é possível fazer distinção entre deficiência primária e secundária de dissacaridases (MENZIES, 1974; NOONE et al., 1986; MAXTON et al., 1990). A *D*-xilose e 3-*O*-metil-*D*-glicose atravessam o epitélio intestinal por difusão e mediado por transportador protéico, respectivamente. Neste caso, a combinação simultânea de lactulose e *L*-ramnose com *D*-xilose e 3-*O*-metil-*D*-glicose pode ser utilizada para avaliar permeabilidade e transportes intestinais por difusão e mediados por transportadores (COOK; MENEZES, 1986). Este teste é melhor e especifico do que o teste

utilizando-se a *D*-xilose isoladamente para avaliar a função intestinal em condições patológicas, tais como doença celíaca e outras patologias diarréicas (TRAVIS et al., 1986).

1.14 Testes Utilizando Isótopos

Marcadores com isótopos são mais fáceis de medir, em comparação com outros, porém apresentam as desvantagens de serem marcadores únicos e utilizarem radioatividade.

O ^{51}Cr-EDTA é aplicado para medida do ritmo de filtração glomerular renal e é empregado também para medida de permeabilidade intestinal (BJARMASON et al., 1983; MAXTON et al., 1986; JENKINS et al., 1988). Diferentemente dos marcadores com açúcares, o ^{51}Cr-EDTA não é degradado por bactérias e pode, assim, servir para medir permeabilidade no cólon. A combinação de ^{51}Cr-EDTA com lactulose é utilizada com esse propósito, isto é, a lactulose avalia a permeabilidade do intestino delgado (JENKINS et al., 1991). As principais desvantagens do uso do ^{51}Cr-EDTA como marcador reside na significativa variação dos valores de excreção urinaria após administração e na meia-vida relativamente curta, 27 dias, para testes em localizações distantes do local de medida (AINSWORTH et al., 1989; AABAKKEN, 1989). Esse teste é menos sensível e acurado do que os testes com duplo açúcar para avaliação, por exemplo, da permeabilidade na doença celíaca (MARTINES et al., 1988). O ^{99}m Tc-acetato de dietilenotriaminopenta (^{99}Tc-DTPA., P.M.= 549 Da) é indicado para medida da permeabilidade colônica. Não mostra, entretanto, melhor sensibilidade e acurácia do que o ^{51}Cr-EDTA para essa medida (CASELAS et al., 1986).

1.15 Testes Utilizando Polímeros de Polietileno Glicóis (*PEG*s)

Os polímeros de *PEG*s são comercializados com diferentes tamanhos, como *PEG*-400, *PEG*-600, *PEG*-900, *PEG*-1000 e *PEG*-4000. O *PEG*-400, por exemplo, é composto de tamanhos diferentes de moléculas, variando de 194 a 502 da (MAXTRON et al., 1986), os quais podem ser separados e medidos por cromatografia líquida/gasosa ou cromatografia líquida de alta precisão (DELAHUNTY; HOLLANDER, 1986).

O uso desses marcadores, especialmente os de baixo peso molecular – como *PEG*-400, são hoje recomendados com reservas para medida da permeabilidade intestinal. A variação do tamanho molecular desses compostos torna sua excreção, quando administrado por via oral, bastante variável para medida da permeabilidade (MA et al., 1990; PHILIPSEN et al., 1988). Essa variação também é observada quando esses marcadores são injetados por via intravenosa (MAXTON et al., 1986). As opiniões divergem quando são empregados para medida da permeabilidade em doenças do intestino delgado (CHADWICK et al., 1977; JENKINS et al., 1986; HOLLANDER et al., 1986). A respeito da via de permeação desses compostos, há também controvérsias, dificultando a interpretação dos possíveis mecanismos envolvidos nas alterações da permeabilidade intestinal (MA et al., 1990).

1.16 Fatores que Alteram a Integridade e a Permeabilidade do Epitélio Gastrintestinal

A permeação das vias transcelular e paracelular, medida por meio dos marcadores aqui descritos, é alterada por fatores físicos, estresse cirúrgico, drogas, doenças, mediadores e receptores agonistas e antagonistas celulares, como citocinas, prostaglandinas e outros.

O estresse hiperosmolar, com soluções acima de 1500 mosmo-kg, é suficiente para aumentar a permeabilidade, no intestino normal, a marcadores polares com raios superiores a 0,5 nm (MENZIES, 1972; LAKER; MENZIES, 1977; WHEELER et al., 1978; MAXTON et al., 1986). É estabelecido o fato de que soluções com osmolaridades menores são capazes de aumentar a permeabilidade intestinal em situações de estresse cirúrgico e doenças. Solutos pouco absorvíveis, como lactulose, manitol, rafinose e sulfato de magnésio, causam diluição porque retêm líquidos no lúmen intestinal, resultando no aumento do peristaltismo intestinal e alterações na medida da permeabilidade (MENZIES et al., 1990; FORDTRAN, 1975).

Drogas como antiinflamatórios não esteroidais (AINEs) e quimioterápicos são conhecidas pelo fato de alterarem a permeabilidade intestinal. Os AINEs causam aumento na permeabilidade (NELL et al., 1977; BJARNASON et al., 1986), o que faz se defender a idéia de que esteja relacionado com a potência e seletividade de ação deles na inibição da ciclooxigenase induzida e/ou constitutiva. Quimioterápicos como 5-fluorouracil

(SIBER et al., 1980) ou metotrexato (LIFSCHITZ; MAHONEY, 1989), e radioterapia (COLTAR et al., 1988), são capazes de alterar a integridade e a permeabilidade intestinal.

1.17 Mecanismos de Doenças que Alteram a Permeabilidade Intestinal

Várias patologias que acometem o homem, como doenças diarréicas, do tipo enfermidade celíaca, doença de Crohn e colite ulcerativa, estão freqüentemente associadas com alterações na integridade e na permeabilidade intestinal.

Crianças com diarréia aguda (< 14 dias de duração) apresentam diminuição na área de absorção e aumento na permeabilidade intestinal, quando medidas pelo teste diferencial de permeabilidade, combinando lactulose/manitol. Esses parâmetros se tornam mais severos quando analisados naquelas crianças com diarréia persistente (>14 dias de duração) e/ou associadas com etiologia por *Criptoporidium* ssp., um protozoário freqüentemente vinculado à etiologia dessa doença. As alterações da permeabilidade e lesão ainda são mais severas, com potencial conseqüência para o estado nutricional desses pacientes (LIMA et al., 1997). Os mecanismos envolvidos nessas alterações, no entanto, são complexos e ainda pouco conhecidos.

Na doença celíaca, existe aumento de permeabilidade intestinal bem documentada (MENZIES, 1992; WHEELER et al., 1978; CODBEN et al., l978), associada com alteração da via paracelular. A diminuição na resistência transepitelial e alterações morfológicas das zônulas de oclusões, observadas em biopsias jejunais de pacientes com doença celíaca, confirmam os achados anteriores (SCHULZKE; SCHULZKE, l991). Os testes diferenciais com duplo açúcar são também utilizados para detecção de pacientes suspeitos de apresentar doença celíaca (COBDEN et al., 1980). O diagnóstico definitivo, entretanto, só é feito com a biopsia jejunal, acompanhada de exame histopatológico, bem como a utilização de anticorpos antigliadina, anti-endomísio e antitransglutaminase e/ou dieta isenta de glúten para diagnóstico e terapia da doença.

Na doença de Crohn e colite ulcerativa, são bem documentadas as alterações na permeabilidade intestinal (BJARMASON et al., 1983; PEARSON et al., 1982;

UKABAM et al., l983; JENKINS et al., 1988). Em ambos os casos existe aumento da permeabilidade medida com marcadores dos carboidratos ou ^{51}Cr-EDTA; assim como, na doença celíaca, os testes diferenciais com duplo açúcar são recomendados para detecção dos suspeitos dessas doenças (WYATT et al., l993). O diagnóstico definitivo fica na dependência da biopse intestinal e exame histopatológico.

Outras doenças relacionadas com o trato gastrintestinal, como hipercolonização bacteriana (PIGNATA et al., l990), infecção pelo *Clostridium difficile* (RYBOLT et al., 1989), gastrenterite viral (NOONE et al., l986), inanição (MAXTON et al., 1989), diarréia dos diabéticos (COOPER et al., 1987) e alergias associadas a proteínas do leite e alimentos (SCHRANDER et al., 1990; JACKSON et al., 1981), são associadas com aumento na permeabilidade.

As zônulas de oclusão possuem papel central na regulação da permeabilidade paracelular (MADARA, 1992). As doenças intestinais podem alterar a permeabilidade intestinal por meio de mecanismo via zônulas de oclusões, provavelmente com a mediação de células inflamatórias e mediadores químicos, bem como alterando a composição da membrana citoplasmática e da área intestinal total para absorção. Em adição, drogas podem introduzir mecanismos diferentes, como o bloqueio na divisão celular (quimioterápicos) ou de enzimas como ciclooxigenase (AINEs), os quais participam direta ou indiretamente na regulação da permeabilidade. A **Figura 10** (anexos) indica as proteínas de ligações intercelulares, regiões onde podem agir estes fatores que alteram a permeabilidade intestinal.

A participação de células inflamatórias e mediadores na regulação da permeabilidade é ainda pouco identificada. Em um estudo utilizando células epiteliais em cultura, como células T-84 de carcinoma de cólon humano, foi possível documentar o aumento de permeabilidade resultante da migração transepitelial de neutrófilos, induzido pelo peptídeo bacteriano denominado *N*-formil-*L*-leucil-*L*-fenilalamina (*FMLP*) (MILKS et al., 1986). Essa observação leva a que se postule o argumento de que, nas doenças inflamatórias intestinais, esse mecanismo também ocorra, resultando na alteração de permeabilidade. Utilizando o mesmo modelo *in vitro,* outros pesquisadores demonstraram que o interferon-y, mas não o *TNF, IL*-1 ou *IL*-2, causa a diminuição na resistência transepitelial, resultando no aumento da permeabilidade em monocamadas de células T-84 (MADARA; STAFFORD, 1989). É possível que outros mediadores dessa regulação da permeação transepitelial estejam

relacionados aos mecanismos envolvidos nas doenças inflamatórias e não inflamatórias intestinais.

Em várias patologias, como a doença celíaca, colite ulcerativa, doença de Crohn e outras, foi observada diminuição na área de absorção, e isso está, sem dúvida, relacionado à redução da permeação de marcadores como manitol e ramnose (MENZIES et al., 1979; COBDEN et al., 1978). Na colite ulcerativa e doença de Crohn, foram detectadas alterações na composição lipídica da membrana citoplasmática dos enterócitos, as quais parecem estar associadas com alterações na permeação de água, íons e solutos de baixo peso molecular (BRASITUS et al., 1986; SANDLE et al., 1990; MEDDINGS, 1989; PACHECO et al., 1987).

A integridade e a reparação da membrana celular estão relacionadas com muitos fatores. Dentre estes, a superfamília das lipocalinas, incluindo no rato e homólogos humanos 24p3/Icn2, e a lipocalina neutrofílica gelatinase-associada demonstram grande diversidade funcional, incluindo atividade na olfação, transporte e síntese das prostaglandinas em mamíferos. São representadas por um grupo de pequenas proteínas extracelulares com uma estrutura comum lâmina-β-dominante tridimensional (FLOWER et al., 2000). Playford et al. avaliaram as mudanças na expressão da *24p3/Inc2* no intestino do rato e em células do cólon humano *HT29* e *HCT116* em resposta a vários agentes nóxicos. Utilizaram técnicas de *Nortthern Bloot*, hibridização *in situ* e imuno histoquímica para identificar as alterações. O efeito da *24p3/Icn2* na proliferação, mediante a captação da ^{3}H-timidina, e na reconstrução pelas células em lesões, foi avaliado. Utilizaram como agentes lesivos a indometacina (20 mg/Kg) e o sulfato sódico de dextran. Verificaram que a atividade promigratória elevou-se 3-4 vezes quando comparados a controles ($p<0,01$). Concluíram que o *24p3/Icn2* facilita a regeneração mucosa, promovendo na migração celular (PLAYFORD et al., 2005).

A integridade epitelial intestinal e a permeabilidade estão intimamente relacionadas ao complexo de junções intercelulares. A regulação deste complexo ainda não é totalmente compreendida. A fosforilação e a defosforilação da proteína de membrana ocludina constituem um fator determinante na formação e na permeabilidade mucosa. Dalton et al., (2006) estudaram a função do linfócito intestinal intraepitelial na regulação da permeabilidade intestinal em resposta a infecção. Utilizaram para isto a depleção dos

linfócitos intestinais intraepiteliais causada por cepas recombinantes de *Toxoplasma gondi,* na mucosa intestinal de ratos selvagens e ratos com depleção de linfócitos intraepiteliais. Na ausência de linfócitos intraepiteliais, a capacidade da barreira funcional de impedir a transmigração epitelial da infecção por *Salmonella typhimurium* foi severamente comprometida. No rato deficiente, ocorre ausência de fosforilação do resíduo de serina da ocludina e ausência de claudina 3 da proteína-1 da zônula de oclusão da junção celular. Os achados demonstraram o papel dos linfócitos intestinais transepiteliais na manutenção da integridade das junções intercelulares e manutenção da barreira funcional intestinal (DALTON et al., 2006).

O fator de necrose tumoral é crítico no desencadeamento da doença intestinal. No epitélio intestinal, o fator de necrose tumoral causa ruptura das junções celulares, afetando a barreira funcional intestinal por super-regulação da atividade e expressão da cadeia leve da miosina quinase. Os mecanismos não são totalmente compreendidos, contudo, os estudos recentes sugerem que o interferon-γ e o fator de necrose tumoral têm importante papel como mediadores da disfunção da barreira mucosa *in vivo* e *in vitro* (SUENAERT et al., 2004; CLAYBURGH et al., 2005). Wang et al. usaram células Caco-2 com receptores-1 do fator de necrose tumoral humano e células sem receptores, em células colônicas de ratos, para estudo fisiológico, morfológico e análise bioquímica. Observaram que a colite induzida pela transferência adotiva de células T $CD4^+$ está relacionada com a super-regulação da cadeia leve de miosina quinase e fosforilação da cadeia leve da miosina II regulatória, bem como a ruptura das junções intercelulares. Concluíram que o interferon-γ pode induzir o bloqueio do fator de necrose tumoral, fazendo parte da abordagem de restauração da barreira funcional intestinal (WANG et al., 2006).

A barreira funcional através do epitélio e do endotélio é fundamental na regulação da homeostase tissular. A astróglia interage com o endotélio cerebral para manutenção da barreira hemotoencefálica (BALLABH et al., 2004; ABBOT et al., 2006). Savdige et al. usaram marcadores fluorescentes para medir a barreira funcional intestinal *in vivo* após a ablação da glia entérica em ratos transgênicos. A regulação da glia na integridade da barreira epitelial foi modelada *in vitro* usando cocultura. Os fatores indutores derivados da glia foram caracterizados por cromatrografia de exclusão de tamanho e espectrometria de massa. A integridade da barreira epitelial foi avaliada pela resistência epitelial e medida quantitativa da expressão de proteínas da junção epitelial pela reação de cadeia de polimerase e *Western blot*.

Verificaram que células da glia entérica, no rato transgêncico, causa disfunção da barreira mucosa intestinal, resultando em inflamação.

O derivado da glia s-nitrosoglutatião foi identificado como potente indutor da barreira mucosa funcional *in vivo* e *in vitro*, atenuando a inflamação após a ablação da glia entérica. A regulação do s-nitrosoglutatião está diretamente ligada ao crescimento da expressão da actina-*F* prejuncional e a proteínas da zônula ocludente-1 e ocludina. O s-nitrosoglutatião restitui significativamente a barreira funcional mucosa em biopsias colônicas de pacientes com doença de Crohn. Concluíram que a glia entérica, através dos astrócitos, regula a integridade das junções celulares, semelhante a barreira hematoencefálica (SAVIDGE et al., 2007).

Os receptores-como-ferramentas representam uma classe de receptores transmembrânicos essenciais ao reconhecimento microbiano e controle da resposta imune nativa. As bactérias comensais assumem importante papel na manutenção da tolerância e estabilidade ativa da barreira epitelial intestinal pela supressão da inflamação intestinal. Cario et al., utilizando o ligante do receptor-como-ferramenta-2, identificado por meio da técnica do *Western Blotting* e microscopia confocal, na colite induzida em ratos do tipo selvagem, verificaram que a estimulação do receptor-como-ferramenta-2 preserva a barreira funcional intestinal. Observaram, também, que o receptor-como-ferramenta-2 regula, *in vivo,* a susceptibilidade da mucosa a lesão e inflamação. Concluíram que o receptor-como-ferramenta-2 é um alvo farmacêutico da lesão e inflamação intestinal (CARIO et al., 2007).

Como ficou demonstrado, a barreira funcional intestinal é um complexo de interações do meio interno e com o externo. O estudo de suas funções e mecanismos desperta o interesse de toda a comunidade mundial de pesquisadores, pelos desafios inerentes para entendê-los e os aplicar na prática médica. A utilização de marcadores moleculares, como os açúcares, demonstra ser uma técnica útil, eficaz e fidedigna na avaliação da permeabilidade intestinal. Este estudo pretende dar alguma contribuição nesse sentido.

2 OS TESTES ATUAIS DE AVALIAÇÃO DA INTOLERÂNCIA AOS CARBOIDRATOS

2.1 Teste de Absorção dos Carboidratos com Curva Glicêmica

Após jejum de 8 horas (pacientes eutróficos) e de 4 horas (pacientes desnutridos), coleta-se amostra de sangue. A seguir, administra-se, por via oral, o açúcar (ou dissacarídeo) a ser testado em solução a 20 %, na dose de 2gr/kg de peso corporal, na dose máxima de 50gr (HEITLINGER; LEBETHAL, 1988); colhem-se, após 15, 30, 60 e 90 minutos, amostras de sangue para determinação da glicemia. Um aumento de 25mg/dl em relação à glicemia de jejum, em qualquer amostra, é considerado normal. Entre 20 e 25, é duvidoso, e menos de 20mg/dl é medida considerada anormal.

Este teste é considerado padrão-ouro. Na deficiência isolada de lactase ou em doenças que envolvam dano mucoso intestinal, o nível de lactase está diminuído e é incapaz de hidrolisar mesmo pequenas quantidades de lactose (GRAY; SANTIAGO, 1966). A sensibilidade (76 a 94%) e a especificidade (77 a 96%), utilizando-se a curva glicêmica, estão estabelecidas (VILLAKPK; MARRONS, 1994). É, porém, um teste invasivo e analisa apenas a persistência ou não da capacidade de a lactase hidrolisar a lactose.

2.2 Teste de Hidrogênio Expirado

Baseia-se em que a única fonte do hidrogênio, no ser humano, é o resultado da fermentação de carboidratos pelas bactérias da flora intestinal (ENATTA et al., 2002). Do hidrogênio formado, 85% são eliminados pelo trato digestório.

Os 15% restantes são absorvidos e exalados no ar expirado (LEVITT, 1969). A determinação do hidrogênio em partes por milhão (ppm), mediante cromatografia gasosa, é a base do teste.

Após jejum de 12 horas, colhe-se amostra do ar expirado. Administra-se o açúcar a ser testado em solução a 20%, 2g/kg de peso (máximo de 50 gramas). Colhe-se amostra do ar expirado aos 60, 90, 120, 150 e 180 minutos. Se ocorrer aumento de 20 *ppm*, em qualquer amostra, considera-se positivo, isto é, ocorre má absorção (BULLER et al., 1991). É um teste simples, não invasivo, de boa sensibilidade (69 a 100%), especificidade (89 a 100%), considerado de escolha para má absorção de carboidratos (BOND; LEVITT, 1972). Vale salientar, no entanto, que a quantidade e a composição bacteriana da flora intestinal são variáveis e influenciadas por vários fatores, como dieta, uso de antibióticos recentes e estado imunológico do paciente, podendo interferir nos resultados.

2.3 Determinação da Atividade das Dissacaridases na Mucosa

É retirado um fragmento fresco de mucosa, obtido por biopsia jejunal próximo do ângulo duodenal (ângulo de Treitz).

A atividade é expressa em unidades por grama do tecido homogeneizado ou de proteínas. Cada unidade representa a quantidade de enzimas necessária para hidrolisar, em um minuto, 1 μmol do açúcar a ser analisado (BEIGUELMAN; SEV-PEREIRA, 1983).

Tem o inconveniente de analisar pequena área da mucosa e ser invasivo. Tem importância quando a intolerância é primária e existe integridade da mucosa intestinal e ausência ou baixa atividade de enzima (HERTLINGER; ROSSI, 1991).

2.4 Genotipagem do Polimorfismo Hidrolase Lactase-Florizina

A genotipagem do polimorfismo da hidrolase lactase-folizina por ciclo-leve reação de cadeia de polimerase é um novo tipo de teste. É desenvolvido utilizando-se o genótipo *C/C* da variante genética *C→T* (-13910). Utiliza a purificação automática de DNA na MagNA Purê LC e *real-time PCR on the LigthCycler*. Bodlaj e cols. em 2006 utilizaram amostras de 220 indivíduos caucasianos, para estima a freqüência de genótipos. Foi encontrado o genótipo LPH→T(-13910) em 54 indivíduos, com teste do hidrogênio expirado

positivo e sintomas de intolerância a lactose. Nos 220 analisados, o genotipo C/C foi de 21,4%, o c/t de 41,8% e o T/T de 36,8%. Nos 54 indivíduos com teste do hidrogênio expirado positivo, apenas 50% apresentaram genótipo C/C que é sugestivo de hipolactasemia primária do adulto. Os indivíduos com genótipo C/C uma média maior do hidrogênio expirado (108 ppm), significantemente maior que os com genótipo C/T (65 ppm) e T/T (44 ppm). Concluíram que o teste permite a diferenciação da hipolactasemia primária e secundária, em pessoas com sintomas de intolerância a lactose (BODLAJ et al., 2006). É um teste de boa especificidade e sensibilidade; analisa apenas o aspecto da capacidade lactásica.

2.5 Teste Rápido de Lactase

É realizado em biopsias endoscópicas de mucosa duodenal e demonstrou 100% de sensibilidade e especificidade quando comparado com a determinação do polimorfismo genético C/T-13910. Colhem-se 3 fragmentos de biopsias na 2ª porção do intestino delgado, colocando-os em frasco contendo solução de lactose e reagente de tornasol, em pH alcalino. A degradação da lactose acidifica o meio, mudando a cor da solução. Assemelha-se ao Teste Rápido da Urease para o diagnóstico do *Helicobacter pylori* no estômago (ABYLESS, 1982). É invasivo, porém, e em crianças requer anestesia geral e analisa apenas a capacidade lactásica.

3 JUSTIFICATIVA

O trato gastrintestinal é indispensável, particularmente o intestino delgado, à manutenção da vida. O estado nutricional é mantido, principalmente, pela absorção, no intestino delgado, de nutrientes provindos da alimentação. A importância da associação entre o intestino delgado e o estado nutricional é bem documentada em condições hígidas e patológicas. Os nutrientes, para serem absorvidos, dependem da degradação enzimática em monocomponentes, uma vez que a mucosa não absorve moléculas complexas normalmente, sendo, portanto, altamente seletiva (CHEN et al., 2003).

Ao se utilizar a lactulose para a avaliação da integridade mucosa do intestino delgado, identifica-se a lesão mucosa. Já a utilização do manitol avalia a área comprometida; quando se faz a relação lactulose/manitol, permite aferir a permeabilidade, integridade e área de absorção da mucosa.

Os estudos *in vitro* estabeleceram este método como padrão-ouro de avaliação da mucosa, permitindo que se possa utilizar tal método como forma de averiguar os parâmetros aferidos e a integridade da mucosa. Não há, porém, dados na literatura expressando que, ao utilizar esta técnica, ela permita estabelecer um padrão absortivo/integridade/permeabilidade/capacidade enzimática de dissacaridases. Ao se utilizar um conjunto de açúcares, é possível uma avaliação destes parâmetros, simultaneamente.

Um teste não invasivo, que possibilite aferir, simultaneamente, integridade mucosa (presença ou não de lesão), área comprometida (extensão da lesão mucosa), permeabilidade desta mucosa e integridade de enzimas (dissacaridases) da borda em escova do enterócito intestinal, não tem qualquer registro na literatura (BRUMMER et al., 1993). A proposta deste estudo é desenvolver este teste, utilizando os açúcares conhecidos para este fim, validando-o, em comparação ao teste de tolerância a lactose e verificando as alterações que possa haver em pacientes com intolerância a lactose, comparando-se com pacientes que não tenham esta alteração.

4 OBJETIVOS

Primários

A Determinar as concetrações de manitol, lactose, lactulose e sacarose em amostras de urina *in vivo* por intermédio de cromatografia líquida de alta precisão com detecção amperométrica pulsátil.

B Validar um novo teste não invasivo para atividade de dissacaridases e barreira funcional intestinal em pacientes adultos sadios, com e sem intolerância a lactose.

C Avaliar a medida combinada do teste de detecção diferencial da excreção de açúcares para determinação da deficiência de dissacaridases e da barreira funcional intestinal.

Secundário

D Avaliar o efeito da ingestão etílica habitual como fator de modificação do teste múltiplo da excreção urinária de açúcares.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Ética

Todo paciente que não concordou ou não assinou o termo de consentimento informado foi excluído. Não será permitida a identificação ou divulgação, por meio científico ou imprensa leiga, de cada caso. Rejeitaram-se casos cujo estudo se achou inconveniente proceder. A investigação foi aprovada pelo Comitê de Ética do Hospital Universitário da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará em 06/03/2005 e teve início em maio de 2005 (ver anexos). Protocolo COMEPE Nº 269/2005.

Acresce referir o fato de que o presente ensaio incorporou os referenciais básicos da Bioética, estabelecidos pela Resolução número 196/96, do Conselho Nacional de Saúde – MS – Brasil, reguladores de investigações que tenham o concurso de seres humanos (in anima mobili). Tais marcos éticos configuram, aos sujeitos das pesquisas, a garantia dos pressupostos da autonomia, não-maleficência, beneficência e justiça.

5.2 População do Estudo

Todos os pacientes estudados eram provenientes dos municípios que fazem parte da região de Fortaleza e adjacências no Estado do Ceará, como demonstra a **Figura 11**. Foram recrutados pacientes ambulatoriais que apresentassem sintomas compatíveis com intolerância a lactose ou que já tivessem realizado Teste de Tolerância a Lactose e apresentaram teste positivo ou negativo.

Figura 11. Mapa da cidade de Fortaleza e adjacências.
Fonte: IBGE

Dos 114 voluntários inventariados, 65 aceitaram participar. Foram divididos em casos e controles, de acordo com os critérios estabelecidos no Protocolo de Inclusão. Os 65 pacientes incluídos eram adultos de ambos os sexos, sem discriminações de qualquer natureza; os 34 casos intolerantes a lactose foram constituídos de 13 do sexo masculino (38,2%) e 21 do sexo feminino (61,8%). A etnia de brancos entrou com 28 (82,4%), mulato com 05 (14,7%) e negros com 01 (2,9%). Não houve participação de semi-analfabetos, com 00 (0,0%), para 1° grau completo com 04 (11,8%), 2° grau completo com 14 (41,2%) e nível superior com 14 (47,1%). A renda pessoal individual, considerando-se a base de 05

salários-mínimos, foi maior em 23 (74,2%) e menor em 08 (25,8%), para renda individual. Em relação a sintomas e hábitos no item diarréia com derivados lácteos, 18 (56,3%) apresentavam e 14 (43,8%) não apresentavam. Para perda de peso, 08 (25,0%) relataram e 24 (75,0%) não o fizeram. Para o hábito de ingestão etílica habitual, 07 (21,2%) confirmaram e 26 (78,8%) não. Com referência ao uso regular para medicamentos (de qualquer tipo e/ou formulação), 22 (64,7%) confirmaram e 12 (35,3%) não o fizeram.

Nos 31 controles que não apresentavam intolerância a lactose, o sexo masculino contribuiu com 06 (19,4%) e o feminino com 25 (80,6%). A etnia branca incluiu 23 (74,2%), a mulata 07 (22,6%) e negra 01 (3,2%). Para a escolaridade, semi-analfabeto com 01 (3,2%), 1º grau completo com 05 (16,1%), 2° grau completo com 13 (41,9%) e superior com 12 (38,7%). Avaliando-se a renda com a mesma base do grupo casos, < que 05 salários mínimos com 23 (85,2%) e > que 05 salários com 04 (14,8%), para renda individual. O sintoma diarréia esteve presente em 06 (20,0%) e ausente de 24 (80,0%). Para perda de peso, 10 (33,3%) relataram e 20 (66,7%) não relataram. A ingestão etílica regular foi relatada em 13 (41,9%) e não relatada em 18 (58,1%). O uso habitual de medicamentos foi expresso por 19 (61,3%) e 12 (38,7%) não o exprimiram.

Dos 65 pacientes observados, 100,0% residem em casa de alvenaria; de 63 casos válidos, 100,0% possuem esgoto e água encanada na sua residência.

5.3 Tipo de Estudo

O tipo de estudo foi caso-controle, sendo o caso definido com o paciente com o teste de tolerância a lactose positivo. Os controles são os pacientes com teste de tolerância a lactose negativo.

Todos leram e assinaram o consentimento informado para participarem do estudo.

Os pacientes foram de ambos os sexos, acima de 18 anos de idade e menos ou igual a 70 anos, de qualquer cor, credo ou raça. Todos foram submetidos (ou já tinham sido) a teste de tolerância a lactose, dentro da técnica preconizada.

5.4 Critérios de Inclusão/Exclusão

Todos os pacientes que tiverem diagnóstico firmado, conforme descrito há pouco, estarão disponíveis para o estudo. Os pacientes que apresentaram teste de tolerância a lactose duvidoso foram excluídos.

Nenhum dos pacientes apresentou outras condições clínicas de má absorção de carboidratos, como, por exemplo, insuficiência pancreática, doença celíaca (glúten induzido), gastrenterites agudas ou crônicas, enteropatia perdedora de proteína, linfoma ou linfangectasia intestinal, enteroparasitose do delgado (giardíase, strongiloidíase), pelo menos na avaliação clínica geral de cada caso. Os pacientes deveriam ter exame parasitológico das fezes negativos ou ter usado medicação antiparasitária pelo menos até 6 meses anteriores à inclusão. Todos os casos selecionados já eram clientes do pesquisador há vários anos e tinham outros exames prévios que confirmam os dados clínicos. Após aprovação, todos foram submetidos a técnica para o estudo. A função renal foi avaliada pela dosagem da creatinina de cada caso, pelo método de ensaio colorimétrico cinético/Roche Hitach 917. Na dosagem da glicose, utilizou-se o mesmo método. Foram avaliados o perfil socioeconômico e as condições higiênico-sanitárias de cada caso.

5.5 Teste de Tolerância a Lactose

Após jejum de 8 horas, foi coletada uma alíquota de sangue venoso (tempo 0). A seguir foi administrada, por via oral, solução de lactose a 20%, na dose de 2g/kg de peso corporal, em dose máxima de 50 gramas. Na seqüência, colheu-se amostra de sangue venoso (com a utilização de Gelcro® ou Abocate®, que permaneceu na mesma veia inicial, sem necessidade de novas punções venosas em cada coleta, durante o período do exame). Aos 15, 30, 60 e 90 minutos seguintes, foram colhidas novas alíquotas de sangue (2 ml) venoso para determinação da glicemia. Aumento de mais de 25mg/dl da glicemia, em relação a glicemia de jejum, ou em qualquer das amostras, é considerado normal. Se for de 20 a 25mg/dl, é havido como duvidoso; se menos de 20mg/dl, é tido por anormal. Além da curva glicêmica, devem ser observadas manifestações clínicas associadas a sobrecarga do açúcar (lactose), como diarréia, distensão abdominal, meteorismo, cólicas, como parte do protocolo do método.

5.6 Soluções para o Teste Múltiplo de Avaliação da Absorção de Dissacarídeos, Integridade da Mucosa, Área de Absorção e Permeabilidade Intestinal

Foram avaliadas 03 (três) soluções, em diluições diferentes, e medidas suas osmolaridades, para que se pudesse avaliar a tolerância intestinal.

A **Tabela 2** mostra as soluções-teste com os açúcares lactulose, lactose, manitol e sacarose em diferentes concentrações. Conforme se pode observar, verificou-se que a solução em 200 ml, com as quantidades preconizadas, apresenta uma osmolaridade semelhante à fisiológica do plasma.

Tabela 2 – Soluções-teste para a osmolaridade.

Quantidade	QSP[1] 200 ml	QSP[1] 250 ml	QSP[1] 300 ml
Dosagens	**Valor / Osmolaridade²**	**Valor / Osmolaridade²**	**Valor / Osmolaridade²**
1	321	275	232
2	320	274	233
3	330	280	235
4	323	269	233
4	332	272	234
Média	325	274	233

Soluções: 1.1 – Lactulose..... 5 grs. (10 ml)
1.2 – Lactose..... 5 grs.
1.3 – Manitol..... 1 gr.
1.4 – Sacarose..... 5 grs.
1.4 – Água mineral natural QSP¹ 200 ml / QSP¹ 250 ml / QSP¹ 350 ml
¹ quantidade suficiente para. ² mmols/l.
Fonte: dados da pesquisa

Optou-se pela solução com 200 ml de água mineral natural, fervida e resfriada, para diluição dos açúcares, de acordo com as quantidades há pouco relacionadas, por ser de menor volume para ingestão e não exceder a capacidade osmolar do intestino delgado (1500 mmols/l). A solução foi preparada, embalada em vidros lavados com detergente, limpos com água destilada, esterilizados em autoclave, com capacidade para 250 ml, lacrados, com armazenamento em geladeira e período de validade de 7 dias para utilização.

5.7 Teste Múltiplo de Avaliação da Absorção de Dissacarídeos, Integridade da Mucosa, Área de Absorção e Permeabilidade Intestinal

Técnica de cromatografia líquida de alta precisão com detecção amperométrica pulsátil (*CLAP*) (*HPLC – Hight Performance Liquid Cromatography*) (DIONEX, 2000; JOHNSON; LaCOURSE, 1990).

Após jejum de 10 a 12 horas, o paciente esvaziou a bexiga e ingeriu 200 ml da solução de açúcares (lactulose 5g, lactose 5g, manitol 1g, sacarose 5g, em 15 – 20 minutos. O paciente alimentou-se 2 horas após ingestão da solução, com alimentos isentos de produtos lácteos (pães, suco de frutas, frutas frescas, chá, café). O volume urinário das 5 horas seguintes, após a ingestão da solução, foi coletado em recipiente higienizado, com todas as alíquotas no mesmo recipiente. A urina foi estocada em recipiente contendo 1 gota de cloro hexidina para cada 50 ml de urina (40 mg/ml; Sigma Chenical Loucs, MO). A urina total coletada foi anotada e alíquota de 5 ml foi estocada em *freezer* a – 80ºC para determinação dos açúcares, por cromatografia líquida de alta precisão com detecção pulsátil amperométrica (*HPLC-PAD*).

5.8 Preparação das Amostras de Urina

Para a realização das dosagens dos açúcares, foram utilizados dois tipos de amostras: uma contendo todos os açúcares em concentração conhecida (solução-padrão) e outra contendo os açúcares presentes na urina acrescidos do açúcar sorbitol como padrão interno.

Cada amostra-padrão continha 600μL de uma solução (60μM) dos açúcares sorbitol, manitol, lactulose, lactose e sacarose. As soluções-padrão foram utilizadas para calibrar o sistema de *HPLC* no início de cada dosagem e em seguida a cada oito amostras para corrigir a perda de sensibilidade em razão do acúmulo de materiais nos eletrodos.

As amostras para dosagem de açúcares foram preparadas por intermédio da diluição de 50μL de urina do paciente mais 50μL de uma solução contendo sorbitol (3,6mM)

como padrão interno diluído em 2,9mL de água bidestilada e deionizada. Após centrifugação, 600µL foram utilizados para detecção pelo *HPLC*.

5.9 Equipamentos e Condições Cromatográficas para Análise do HPLC-PAD

O sistema utilizado foi analisador de carboidratos BioLC, composto de um módulo de bomba de gradiente GPM-2, um módulo de desgasificação de eluente EDM-II e um módulo de detector amperométrico pulsado com um eletrodo de trabalho de ouro (Dionex, Sunnyvale, CA, USA). Neste método, utilizou-se uma coluna de troca de ânions CarboPac-MA1 associada à coluna-guarda, também da Dionex. As amostras de urina foram injetadas através de *autosampler* e as análises foram quantificadas usando-se um sistema de dados BioAutoIon 450, ambos da Dionex.

A análise de HPLC-PAD para mono e dissacarídeos foi realizada por meio de um sistema Dionex BioLC, composto de um módulo de bomba GP40 e detector ED40. Os açúcares foram eluídos com um eluente isocrático de NaOH (480mM) a um fluxo de 0,4 ml/min, e a coluna mantida a temperatura ambiente. Os açúcares foram determinados com um detector amperométrico pulsado com a forma de onda consistindo do seguinte perfil de potencial-duração: amostragem, 0,15V, 720 ms; oxidação, 0,70V, 120ms; e redução, -0,30V, 360ms. A faixa de saída do detector foi fixada em 1,0 mA, com tempo de resposta de integração de 3s.

Os valores dos açúcares obtidos pelo HPLC são reportados em picomoles por 50µL de volume. Posteriormente, esses valores são correlacionados com a dose ingerida pelo paciente (g) e volume urinário excretado (l), obtendo-se o percentual de excreção para cada açúcar. Foi utilizado o programa Excel (Microsoft Corp, Cupertine, CA) para integração desses dados.

5.10 Análises Estatísticas

5.10.1 Cálculo do tamanho da amostra

As alterações nos logaritmos da taxa de excreção urinária da lactulose/manitol, lactose e sacarose foram selecionadas como desfecho primário, por serem dados objetivos e refletirem a função da barreira mucosa, área de superfície de absorção, integridade mucosa e capacidade de dissacaridases.

Estimou-se que 60 pacientes, sendo 30 com curva de tolerância a lactose positiva e 30 com curva de tolerância a lactose negativa, seriam suficientes para o objetivo do estudo. Este número foi calculado da seguinte maneira:

$$\underline{n = (u + v)^2 (sd_1^2 + sd2^2)}$$
$$(\mu_1 - \mu_2)^2$$

onde:
n = número de indivíduos;
sd = desvio padrão do logaritmo da razão lactulose/manitol, lactose e sacarose;
$\mu_1 - \mu_2$ = diferença esperada entre as médias dos grupos estudados;
u = ponto percentual colateral da distribuição normal correspondente a 100% - a força, ex.: neste caso a força = 90%, u = 1,28v = ponto percentual da distribuição normal correspondente ao nível de significância bilateral (neste caso, o nível de significância = 5%, v = 1,96).

5.10.2 Análise estatística

Fez-se dupla entrada dos dados por dois digitadores independentes e os dados foram validados mediante o programa Microsoft Excel versão 4.0. A análise estatística foi realizada utilizando-se o Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) version 13 for Windows (Microsoft Corp.; Seattle, WA, EUA).

A análise descritiva para as variáveis qualitativas foi realizada por intermédio de tabelas e gráficos e, para variáveis quantitativas, foram empregadas medidas de tendência central, de variabilidade e medidas separatrizes.

Para avaliação da normalidade na distribuição das variáveis quantitativas utilizou-se o teste de Shapito-Wilk e, para avaliar a igualdade das variâncias, usou-se o teste de Levene. Os resultados observados para as variáveis quantitativas com distribuição normal foram expressos como média ± desvio-padrão (dp). A comparação das médias de populações independentes foi realizada pelo teste t de Student.

Para as variáveis sem normalidade na distribuição, os resultados foram expressos como mediana e os da variação da distribuição, como valores mínimo e máximo. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para comparação de populações independentes.

Para verificar homogeneidade entre os grupos em relação à distribuição de variáveis categorizadas, foram empregados o teste Exato de Fisher e o teste do Qui-Quadrado (q^2) de Pearson.

Para análise de teste de diagnóstico utilizaram-se a curva de ROC (*Receaver Operating Characteristic*), bem como a estimativa dos parâmetros para análise do teste.

Foram estratificados os dados do percentual de excreção da lactulose e correlação da excreção lactulose/manitol para pacientes com e sem ingestão etílica habitual.

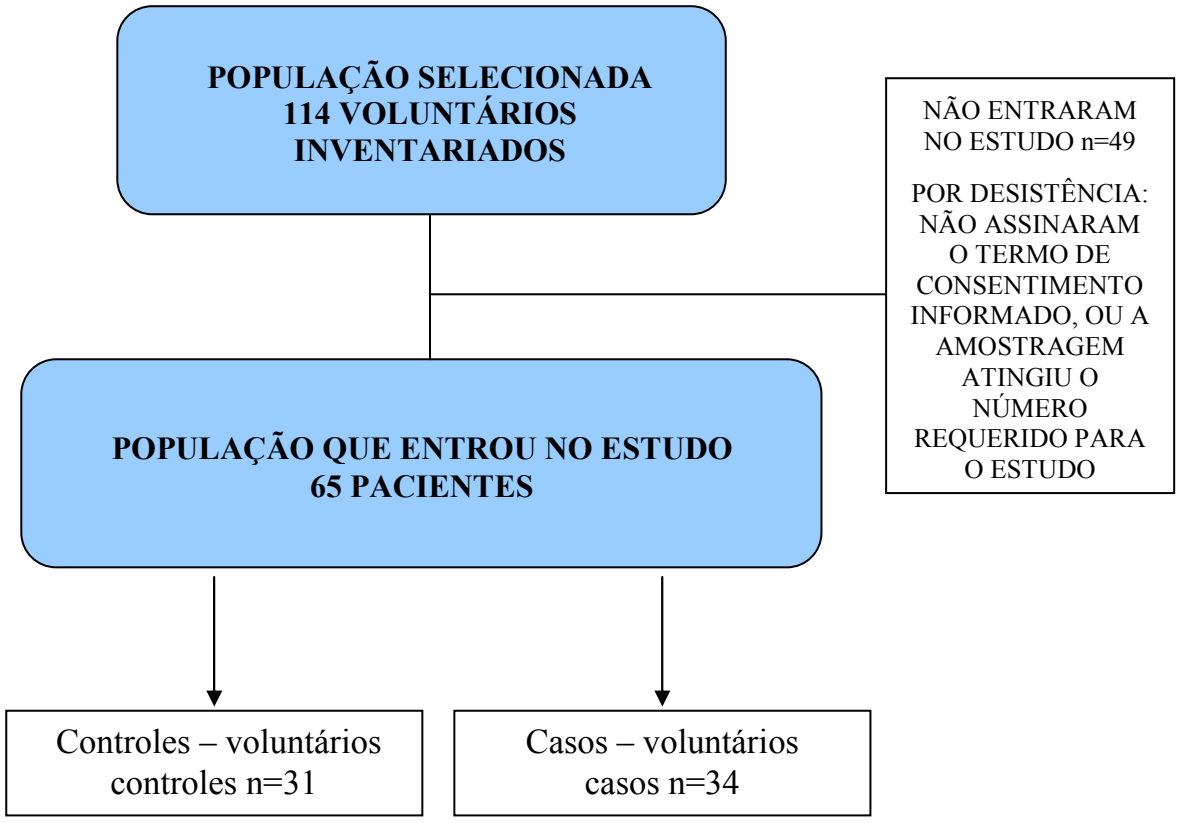
O nível significativo utilizado nos testes estatísticos foi de 5% ($p < 0,05$).

6 RESULTADOS

6.1 Fluxograma da População do Estudo

Seleção da população incluída no estudo. A **Figura 12** demonstra como foram incluídos os casos e controles do estudo.

Figura 12. Organograma de inclusão dos pacientes



A **Tabela 3** resume os dados, com os respectivos valores de *p*, onde não houve significância estatística para o dado avaliado dos parâmetros coletados.

Tabela 3 – Características da população do estudo quanto a etnia, escolaridade e renda individual. Fortaleza, CE – maio de 2005 a fevereiro de 2006.

Variáveis		Caso [1]		Controle [2]		Total		P [3]
		n	%	n	%	N	%	
Etnia [4]	Branco	28	82,4%	23	74,2%	51	78,5%	
	Mulato	5	14,7%	7	22,6%	12	18,5%	
	Negro	1	2,9%	1	3,2%	2	3,1%	
Escolaridade [5]	Semi-Analfabeto	0	0,0%	1	3,2%	1	1,5%	
	1º Grau Completo	4	11,8%	5	16,1%	9	13,8%	
	2º Grau	14	41,2%	13	41,9%	27	41,5%	
	Nível Superior	16	47,1%	12	38,7%	28	43,1%	
Renda Individual	< 5 sm	23	74,2%	23	85,2%	46	79,3%	0,348
	> 5 sm	8	25,8%	4	14,8%	12	20,7%	

1. Paciente com intolerância a lactose.
2. Paciente sem intolerância a lactose.
3. Os seguintes testes estatísticos utilizados: Teste t Student.
4. A Etnia foi avaliado com os critérios do IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.
5. Escolaridade foi avaliada pelos critérios do IBGE semi-analfabeto é o que só lê e soma.
Fonte: pesquisa direta – critérios do IBGE.

A análise da renda individual foi realizada estatisticamente, resultando em um valor de p = 0,348, portanto, sem diferença entre as amostras estudadas.

A **Tabela 4** resume as características da população do estudo, quando avaliados a presença ou não de diarréia, perda de peso, ingestão etílica habitual e uso de medicamentos.

Tabela 4 – Características da população do estudo quanto a diarréia, perda de peso, ingestão etílica e uso de medicamento. Fortaleza, CE – maio de 2005 a fevereiro de 2006.

Variáveis		Caso[1]		Controle[2]		Total		P [3]
		n	%	n	%	n	%	
Diarréia[4]	Sim	18	56,3%	6	20,0%	24	38,7%	0,004
	Não	14	43,8%	24	80,0%	38	61,3%	
Perda de Peso[5]	Sim	8	25,0%	10	33,3%	18	29,0%	0,579
	Não	24	75,0%	20	66,7%	44	71,0%	
Ingestão Etílica[6]	Sim	7	21,2%	13	41,9%	20	31,3%	0,106
	Não	26	78,8%	18	58,1%	44	68,8%	
Uso Atual de Medicamentos[7]	Sim	22	64,7%	19	61,3%	41	63,1%	0,802
	Não	12	35,3%	12	38,7%	24	36,9%	

1. Paciente com intolerância a lactose.
2. Paciente sem intolerância a lactose.
3. Os seguintes testes estatísticos foram utilizados: Teste t Student.
4. Considerado duas ou mais evacuações/dia por período maior que 7 dia.
5. Perda de peso pela auto-avaliação e controle.
6. A ingestão etílica por auto-avaliação e quando fosse habitual embora não sendo etilista pelos critérios da OMS*.
7. Uso de medicamentos que ingere habitualmente, como anti-hipertensivos, analgésicos, antiinflamatórios.

*OMS – Organização Mundial de Saúde.

Fonte: dados da pesquisa

Na **Tabela 4,** observa-se que a presença de diarréia foi mais freqüente nos casos do que nos controles, com valor significativo de p= 0,004; isto é de se esperar, uma vez que pacientes com intolerância a lactose tem maior tendência a diarréia que os não intolerantes. Quanto a perda de peso, ingestão etílica habitual e uso de medicamentos, não houve diferença entre os grupos.

Foram estudados 65 pacientes, sendo 34 com testes de tolerância a lactose positivos, ou seja, já foram avaliados por este método e cuja curva glicêmica, no pico, não excedeu 20 por cento da glicemia basal, após sobrecarga oral, com 50 gramas de lactose, em solução isoosmolar, por via oral; os outros 31 pacientes com o teste de tolerância a lactose negativo, ou seja, curva glicêmica normal, com o aumento de 20 ou mais por cento da glicemia basal em uma ou mais medidas de glicemia, após 50 gramas de lactose, em solução isoosmolar, via oral. O estudo contemplou um grupo de idade de 18 a 70 anos.

Grupo de voluntários-casos (34 casos)

A média de idade foi de 39,43 anos (variando de 21 a 60 anos). O sexo masculino contribuiu com 13 casos e o feminino com 21. A etnia destes casos foi de brancos, com 28, morenos, com 05, e negros, com 01 caso. O grau de instrução incluiu em 1º grau (04 casos), em 2º grau (13) e superior (17 casos). A renda mensal individual foi de > 5 salários mínimos em 12 casos e < 5 salários mínimos com 25. Todos dispunham de casas de alvenaria, água tratada encanada e sistema de esgotamento sanitário em suas residências.

Grupo de voluntários-controles (31 controles)

A média de idade foi de 46,32 anos (variando de 21 a 68 anos). O sexo masculino contribuiu com 05 casos e o feminino com 26. A etnia foi de 23 brancos, 07 morenos e 01 negro. O grau de instrução em 1º grau (05 casos), em 2º grau (14), e superior (12 casos). A renda mensal individual foi > 5 salários mínimos em 06 casos e < 5 salários mínimos com 25. Todos dispunham de casas de alvenaria com água tratada encanada e sistema de esgotamento sanitário em suas residências.

Os fatores sociodemográficos são resumidos nas **Tabelas 5 e 6.**

Tabela 5 – Características da população do estudo em relação a idade, taxa percentual de excreção lactulose/manitol, gênero e presença ou não da diarréia. Fortaleza, CE – maio de 2005 a fevereiro de 2006.

Variáveis		Caso [1]	n	Controle[2]	n	Total	n	P [3]
Idade (Mediana/Variação)	Mínimo	20,44	34	21,00	31	20,44	65	0,5487
	Máximo	65,81	34	68,04	31	68,04	65	
	Mediana	46,93	34	44,43	31	46,58	65	
Taxa % Lactulose/Manitol	Mínimo	0,0000	34	0,0000	31	0,0000	65	0,0741
	Máximo	0,1081	34	0,0412	31	0,1081	65	
	Mediana	0,0105	34	0,0000	31	0,0035	65	
Variáveis		**n**	**%**	**n**	**%**	**n**	**%**	**P [3]**
Gênero	Masculino	13	38,2%	6	19,4%	19	29,2%	0,110
	Feminino	21	61,8%	25	80,6%	46	70,8%	
Diarréia 4	Sim	18	56,3%	6	20,0%	24	38,7%	0,004
	Não	14	43,8%	24	80,0%	38	61,3%	

1. Paciente com intolerância a lactose.
2. Paciente sem intolerância a lactose.
3. Teste estatístico utilizado: Teste t Student.
4. Considerando duas ou mais evacuações/dia por período maior do que 7 dias.
Fonte: pesquisa direta.

Na **Tabela 5**, observa-se que na taxa % de excreção lactulose/manitol existe diferença marginal, p= 0,0741, entre os grupos caso/controle em relação à distribuição da lactulose/manitol (%) e da presença da diarréia maior no grupo de casos (p=0,004).

Tabela 6 – Avaliação da glicemia e função renal da população do estudo. Fortaleza, CE - maio de 2005 a fevereiro de 2006.

Variáveis		n	Média	Dp	P [3]
Glicose Sangüínea 4	Caso [1]	34	88,4118	10,4740	0,1190
	Controle [2]	31	84,1290	11,3864	
Creatinina5	Caso [1]	34	23,5882	4,9121	0,0160
	Controle [2]	31	26,5161	4,5889	

1. Paciente com intolerância a lactose.
2. Paciente sem intolerância a lactose.
3. Teste estatístico utilizado: Teste t Student.
4. Glicemia de jejum pela técnica Glicose Oxidase Rocha/Itachi.
5. Creatinina sérica de jejum pela técnica Creatinina/Glutamato-desidroginase - Rocha/Itachi.
Fonte: pesquisa direta.

Na **Tabela 6**, nota-se que existe diferença significativa, p=0,0160, entre os grupos caso/controle em relação à média da creatinina, pois, segundo os dados observados, o grupo-controle apresenta valor em média de 26,5161 mg/dl (+ ou – 0,82), superior ao grupo de casos, com valor de 23,5882 mg/dl (+ ou – 0,84).

Todos os pacientes foram submetidos ao Teste de Tolerância a Lactose, de acordo com o descrito nos métodos, os resultados estão resumidos na **Tabela 7** e **Figura 13.**

Verifica-se a média da dosagem da glicose inicial, isto é, no tempo "0", são semelhantes nos caso e controles; aos 15' já diferenças que se repetem aos 30', 60' e 90', com valores de p significativos para caso e controles. Estes dados corroboram as curvas plana para casos e curva normal para controles, como se observa na **Figura 13**.

Tabela 7 – Teste de intolerância a lactose na população do estudo. Fortaleza, CE – maio de 2005 a fevereiro de 2006.

Variáveis[1]		**Caso**[2] n=34	**Controle**[3] n=31
Glicose inicial	Média	88,4118	84,1290
	Desvio-padrão (DP)	10,4740	11,3864
	P[4]	0,1190	0,1190
Glicose 15 min	Média	89,3529	100,4839
	Desvio-padrão (DP)	10,3012	9,359
	P[4]	0,4870	0,0001
Glicose 30 min	Média	90,1765	109,197
	Desvio-padrão (DP)	117,4839	19,8341
	P[4]	0,7270	0,0001
Glicose 60 min	Média	89,4118	111,820
	Desvio-padrão (DP)	111,9355	20,6719
	P[4]	0,6680	0,0001
Glicose 90 min	Média	87,5882	105,129
	Desvio-padrão (DP)	10,5919	18,435
	P[4]	0,2240	0,0001

1. Os dados das variáveis são apresentados em média e mais ou menos desvio-padrão da média.
2. Paciente com intolerância a lactose.
3. Paciente sem intolerância a lactose.
4. O intervalo de confiança utilizado para análise foi de 95%; média mais ou menos desvio-padrão da média foi utilizado para análise estatística.

Fonte: pesquisa direta.

Figura 13 – Curvas de tolerância a lactose para casos e controles

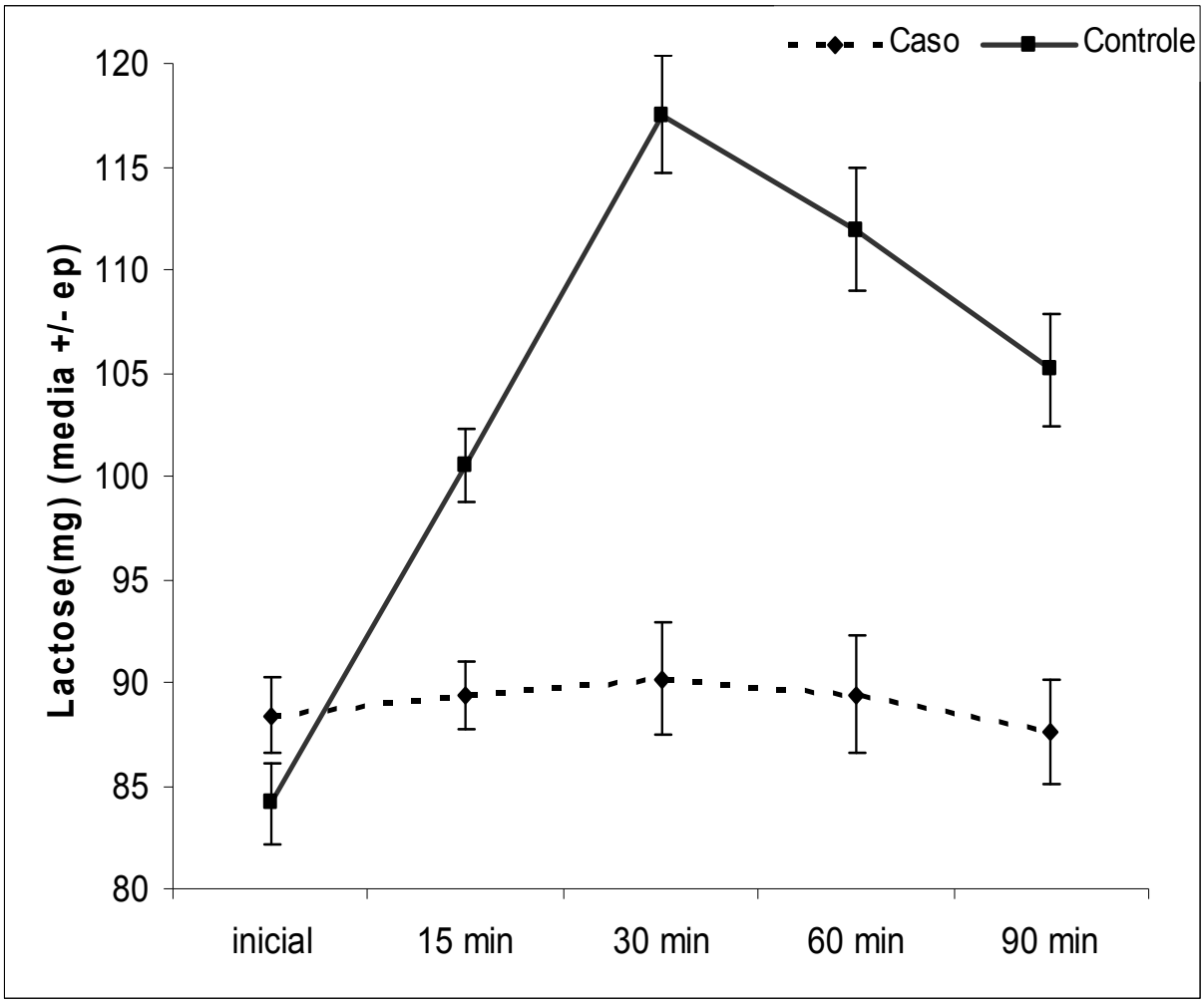


Figura 13. Curvas de tolerância a lactose para casos e controles: como se observa, a curva superior representa os controles (sem intolerância a lactose), onde a glicemia se eleva e cai após ingestão da lactose (50 g em solução); ao contrário, na curva inferior, a glicemia permanece quase estável no período avaliado (intolerantes a lactose nos casos).
Fonte: pesquisa direta.

Tabela 8 – Em cada grupo, comparação dos períodos em relação à média da lactose.

Grupo	Per I – Per J		Estimativa	IC com 95% de confiança		p[1]
				Li	LS	
CASO[2]	Inicial	15 min	-0,9412	-3,6310	1,7487	0,4870
		30 min	-1,7647	-5,8374	2,3080	0,3900
		60 min	-1,0000	-5,1944	3,1944	0,6350
		90 min	0,8235	-3,3856	5,0326	0,6970
	15 min	30 min	-0,8235	-5,5152	3,8682	0,7270
		60 min	-0,0588	-4,7981	4,6804	0,9800
		90 min	1,7647	-3,1453	6,6747	0,4750
	30 min	60 min	0,7647	-2,7811	4,3105	0,6680
		90 min	2,5882	-1,5796	6,7560	0,2190
	60 min	90 min	1,8235	-1,1416	4,7886	0,2240
CONTROLE[3]	Inicial	15 min	-16,3548	-19,1719	-13,5378	<0,0001
		30 min	-33,3548	-37,6201	-29,0896	<0,0001
		60 min	-27,8065	-32,1992	-23,4138	<0,0001
		90 min	-21,0000	-25,4081	-16,5919	<0,0001
	15 min	30 min	-17,0000	-21,9135	-12,0865	<0,0001
		60 min	-11,4516	-16,4149	-6,4883	<0,0001
		90 min	-4,6452	-9,7872	0,4969	0,0760
	30 min	60 min	5,5484	1,8350	9,2618	<0,0001
		90 min	12,3548	7,9900	16,7196	<0,0001
	60 min	90 min	6,8065	3,7012	9,9117	<0,0001

1. Valores de p calculados pelo teste t Student.
2. Caso – definido como intolerante a lactose.
3. Controle – definido como sem tolerância a lactose.

Fonte: pesquisa direta.

Pode-se observar na **Tabela 8** que os valores de p para os casos são todos não significativos, uma vez que todos apresentam intolerância a lactose. Nos controles, entretanto, todos são significativos, exceto aos 90 minutos, uma vez que não são intolerantes a lactose e aos 90 minutos a glicemia decresce para níveis próximos do normal.

Como se observa, a média de glicemia em jejum foi de 88,4118 mg/dl para os casos e de 84,1290 mg/dl para os controles. Desta forma, não há diferenças significativas, incluindo-se a possibilidade do diabetes entre todos. Aos 15 minutos, a glicemia foi de, em média, 89,3529 mg/dl para os casos e 100,4839 mg/dl para os controles; aos 30 minutos, foi de 90,1765 mg/dl para os casos e de 117,4839 mg/dl para os controles; aos 60 minutos, foi de

89,4118 mg/dl para os casos e de 111,9355 mg/dl para os controles; e, aos 90 minutos, de 87,5882 mg/dl para os casos e de 105,1290 mg/dl para os controles. Analisando-se a diferença entre as médias menor dos casos (87,5882 mg/dl) e maior (90,1765 mg/dl), não houve aumento maior do que 20 mg/dl, definido como havendo intolerância a lactose (curva plana). Para os controles, contudo, houve aumento médio de 33,2999 mg/dl. Para este teste, um aumento maior do que 25 mg/dl entre a maior e a menor dosagem estabele o fato de não haver intolerância a lactose (curva não plana).

Como se pode observar, as médias de idade dos casos com 44,87 anos, com desvio-padrão de 10,94, e dos controles, de 46,64 anos, com desvio-padrão de 12,72, sendo a idade mínima de 20,44 e 21,00, respectivamente, e máxima de 65,81 e 68,04 anos, estão dentro do preconizado pelo estudo, que contemplou um grupo de pacientes entre 18 e 70 anos.

A fim de afastar a possibilidade de dano renal, que pudesse interferir na excreção molecular dos açúcares analisados, utilizou-se a dosagem sérica da creatinina. As médias para casos de 23,5882 mg/dl com desvio-padrão de 4,9121, para casos, e para controles, de 26,5161 mg/dl, com desvio-padrão de 4,5889, demonstram que não houve casos de pacientes com insuficiência renal.

Em relação às curvas de excreção urinária dos açúcares utilizados nos resultados do ***HPLC-PAD***, como foi possível observar nas curvas para os casos, os picos para cada açúcar diferem entre si; isto é, de se esperar, uma vez que cada açúcar tem uma absorção diferente na via de permeação mucosa. A **Figura 14** demonstra estas curvas.

Figura 14 – Cromatograma do *HPLC* dos açúcares utilizados no estudo

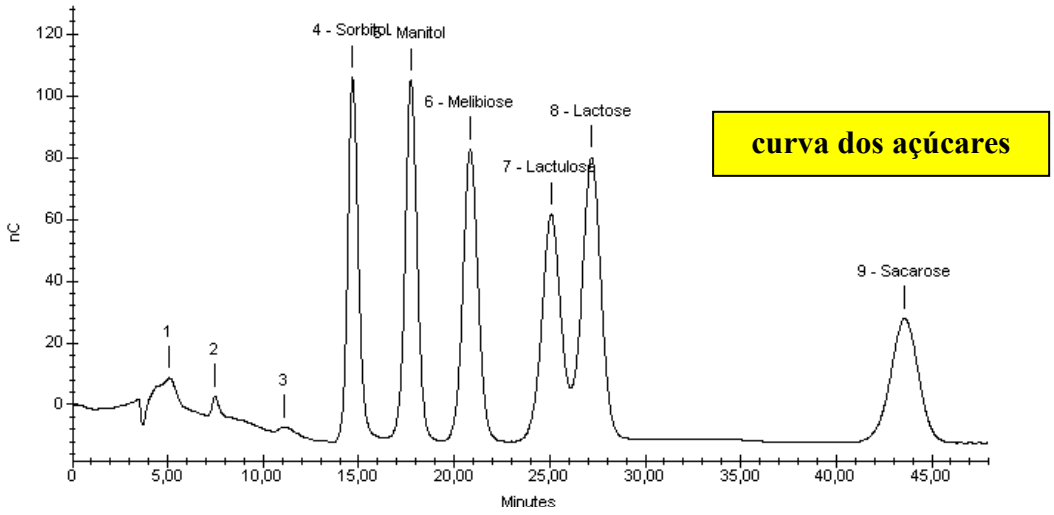


Figura 14 – Cromatograma-padrão dos açúcares utilizados no teste de permeabilidade e padrões internos para controle de qualidade na cromatografia líquida de alta precisão com detecção amperométrica pulsátil. Observar os picos bem definidos e uma excelente linha de base, sem interferência de fatores externos na cromatografia.

Fonte: dados da pesquisa.

Figura 15 – Cromatograma dos açúcares utilizados nos casos do estudo

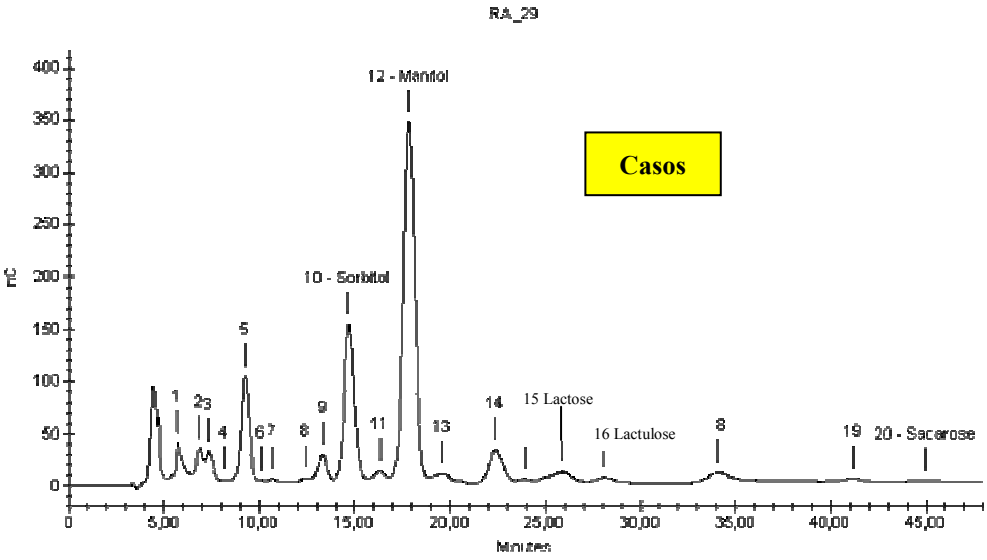


Figura 15 – Demonstra os picos dos açúcares para os casos, onde se observa cada açúcar ultilizado com o pico bem definido.

Fonte: dados da pesquisa.

Figura 16 – Cromatograma dos açúcares utilizados nos controles do estudo

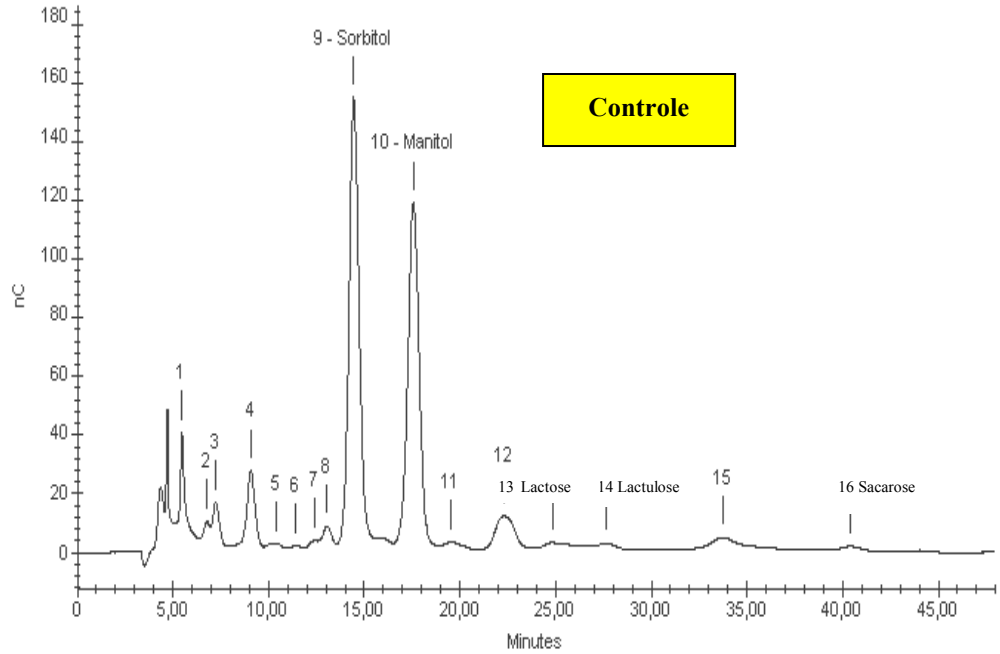
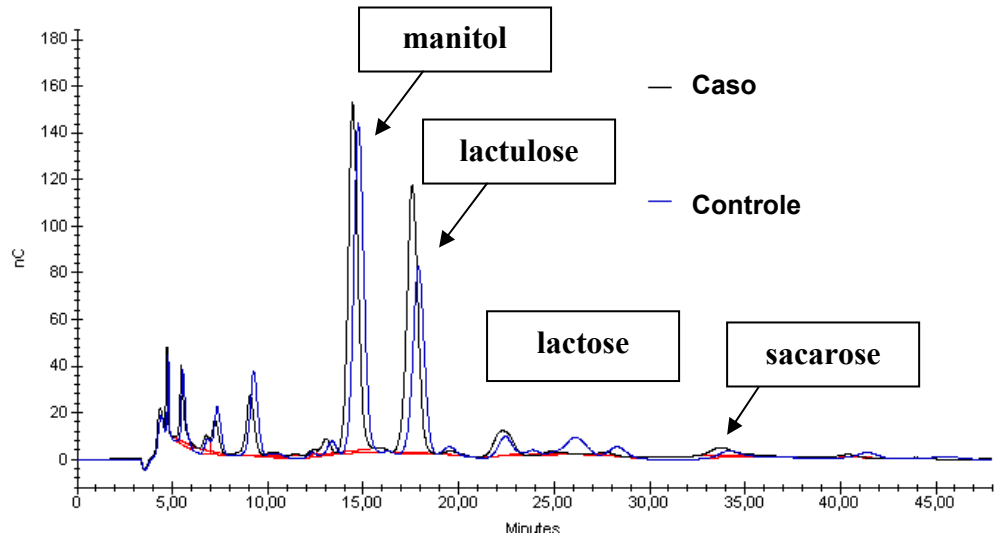


Figura 16 – Demonstra os picos dos açúcares para os controles, onde se observa cada açúcar utilizado com o pico bem definido, com tudo diferente dos casos.

Figura 17 – Demonstra a interposição dos cromatogramas do HPLC para casos e controles



A **Figura 17 –** Resulta da interposição das curvas de casos e controles que procura apresentar os picos dos açúcares utilizados em um mesmo gráfico para facilitar o entendimento sobre a destruição específica de cada açúcar; pode-se observar que as curvas são coincidentes, contudo em picos distintos para casos e controles.

6.2 Avaliação da Área de Absorção, Lesão e Permeabilidade Intestinal

A dosagem urinária do manitol em pmol, com média de 2,3639 para casos e de 2,2988 pmol para os controles, com erro-padrão da média de 0,0760 para casos e 0,1837 para controles, foi diferente em ambos os grupos.

A **Tabela 9** apresenta estes dados, comparando-os para casos e controles, utilizando-se a média e o desvio-padrão, considerando os açúcares lactulose e manitol e a correlação da taxa de excreção de ambos, o que permite avaliar a área de absorção e a permeabilidade intestinal. Pode-se observar um valor de p=0,0741, embora marginal, mas que demonstra diferença para casos e controles na permeabilidade intestinal.

Tabela 9 – Teste de permeabilidade intestinal na população do estudo. Fortaleza, CE – maio de 2005 a fevereiro de 2006.

Variáveis [1]		N	Média	dp	p[4]
Excreção de Lactulose	Caso [2]	34	0,1678	0,2389	0,103
	Controle [3]	31	0,1045	0,1970	
	Total	65	0,1376	0,2205	
Excreção de Manitol	Caso [2]	34	11,5945	5,6309	0,3511
	Controle [3]	31	12,8636	7,4445	
	Total	65	12,1997	6,5373	
Taxa Lactulose/Manitol	Caso [2]	34	0,0182	0,0273	0,0741
	Controle [3]	31	0,0071	0,0106	
	Total	65	0,0130	0,0217	

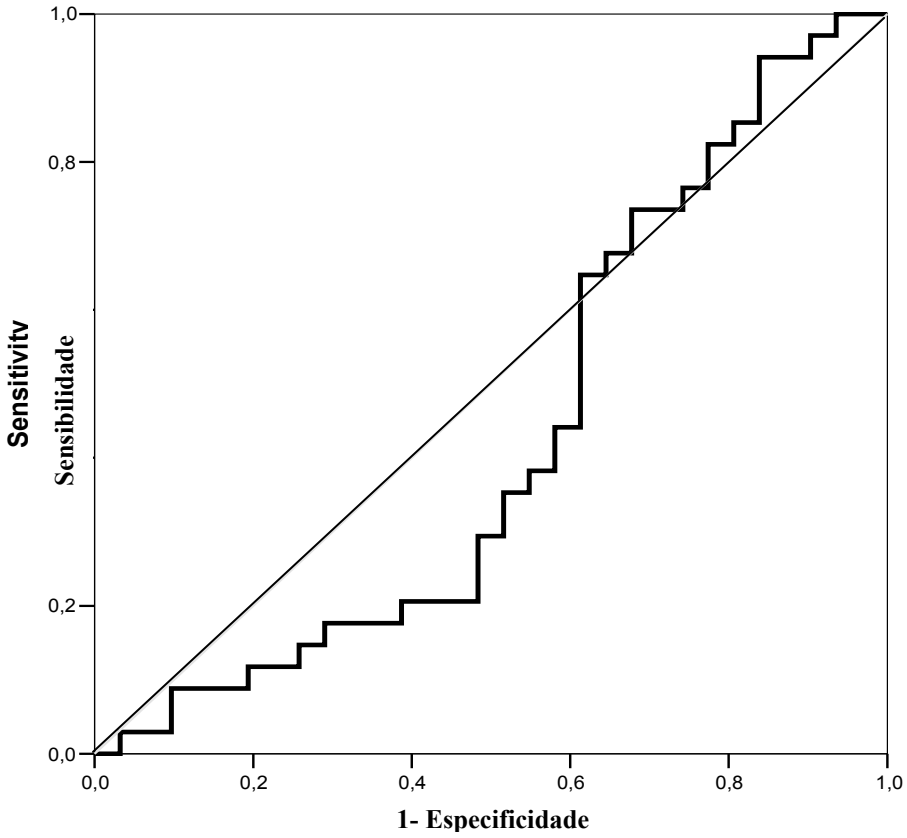
1. Os dados das variáveis são apresentados em média e desvio-padrão da média.
2. Paciente com intolerância a lactose.
3. Paciente sem intolerância a lactose.
4. O intervalo de confiança utilizado para análise foi de 95%; média e desvio-padrão da média foram usados para análise estatística.

Fonte: Pesquisa direta.

Na análise do teste t Student para comparação dos grupos casos/controles em relação às médias, observa-se que os percentuais de excreção do manitol para casos/controles, em média, foram de 11,5945 e 12,8636, com desvio-padrão de 5,6309 e 7,4445,

respectivamente. A análise da curva de ROC (*Receiver Operating Characteristic*) para percentagem de excreção do manitol demonstra, para a área de 0,4326, ep de 0,0740, p de 0,3511, com intervalo de confiança de 95% em um LI de 0,2876 e LS de 0,5776, confirmando que este parâmetro, por si, não é diferencial no diagnóstico da intolerância a lactose (p = 0,7363).

Figura 18 – Curva de ROC para análise percentual de excreção de manitol



Área sob a curva de ROC: % de manitol

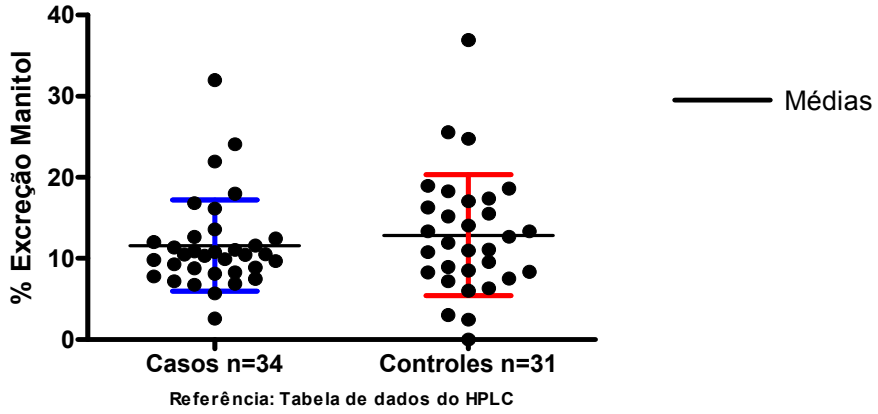
Área	ep	p	IC com 95% de confiança	
			LI	LS
0,4326	0,0740	0,3511	0,2876	0,5776

Na **Figura 18** observa-se a análise da percentagem de excreção do manitol como fator para diagnóstico da intolerância a lactose.
Curva de ROC, supondo que, para valores da % manitol > = x, então maior chance de positividade.
Fonte: pesquisa direta.

A **Figura 18** apresenta a análise do percentual de excreção do manitol com o fator diagnóstico para intolerância a lactose, onde se observa na curva de ROC, para uma área de 0,4326, com ep de 0,0740 e intervalo de confiança de 95 %, LI de 0,2676 e LS de 0,5776, resultando em um valor de p=0,3511, portanto não significativo para o diagnóstico de intolerância a lactose por este dado isolado.

A **Figura 19** apresenta a distribuição dos pacientes segundo casos e controles em relação à distribuição do percentual da taxa de excreção do manitol. Observa-se que, nos casos, esta distribuição é mais condensada.

Figura 19 – Teste percentual de excreção do manitol na população de casos e controles



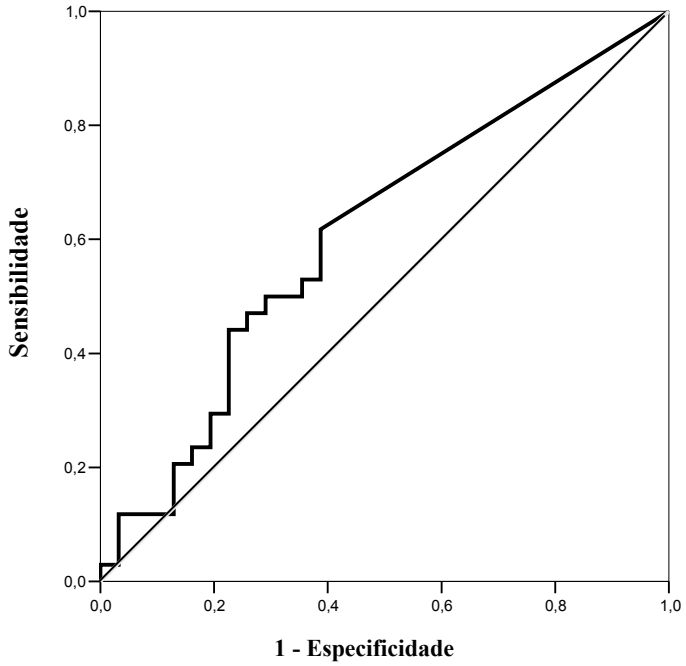
Na **Figura 19.** Observa-se a distribuição dos pacientes quanto a casos e controles em relação ao percentual de excreção do manitol (médias foram utilizadas).
Fonte: pesquisa direta.

A avaliação do percentual de excreção do manitol como fator preditor da intolerância a lactose, supondo-se que para valores do % de excreção manitol > = x, com maior chance de positividade, observa-se, para uma área de 0,4326, com ep de 0,0740, valor de p= 0,3511, com intervalo de confiança de 95% e LI 0,2876, LS 0,5776. Segundo os dados observados, nada leva a se crer que a percentagem de excreção do manitol seja bom preditor para o diagnóstico de intolerância a lactose.

6.3 Avaliação da Excreção de Lactulose

Para a lactulose, os valores para os casos do % de excreção foram, em média, de 0,1678 (mínimo 0,0000 e máximo 1,668) (dp=0,2389); e para os controles, de 0,1045 (mínimo 0,0000 e máximo 0,9669) (dp=0,1970), resultando em valor de p=0,1030, portanto, não significativo.

Figura 20 – Curva de ROC de excreção percentual da lactulose



Área sob a curva de ROC: % de excreção da Lactulose

Área	Ep	P	IC com 95% de Confiança	
			LI	LS
0,6105	0,0706	0,1260	0,4721	0,7490

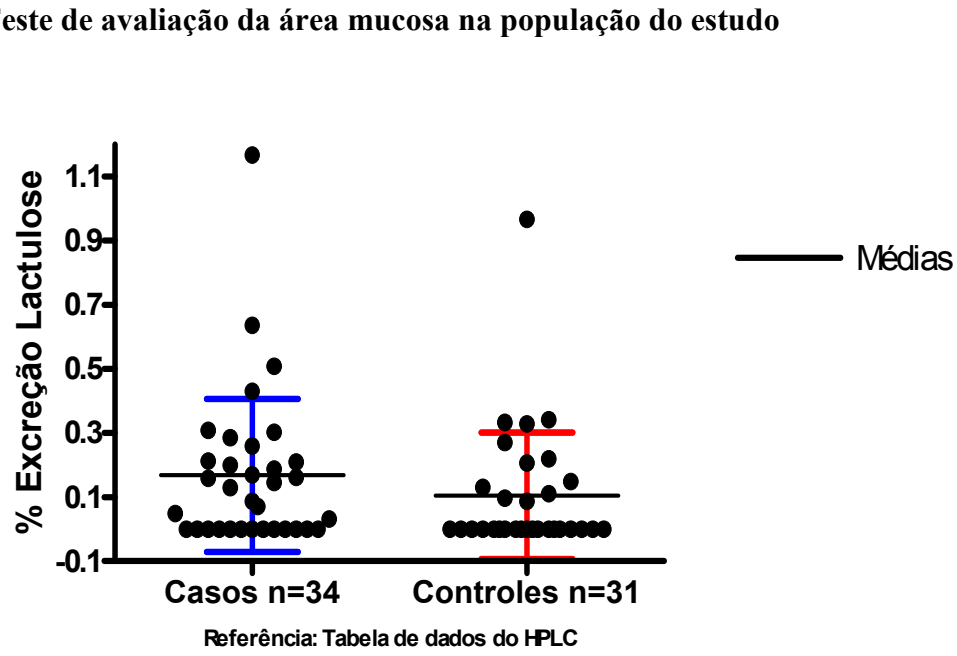
Fonte: pesquisa direta.

Como se observa na **Figura 20,** a análise da curva de ROC para o % de excreção da lactulose como fator para o diagnóstico da intolerância a lactose, para uma área sob a curva

de 0,6105, com ep de 0,0706, obtém-se valor de p=0,1260, portanto, sem significância, num intervalo de confiança de 95% e LI de 0,4721 e LS de 0,7490. Portanto, pela área da curva de ROC, verifica-se que a percentagem de excreção da lactulose não é bom preditor para o diagnóstico de intolerância a lactose.

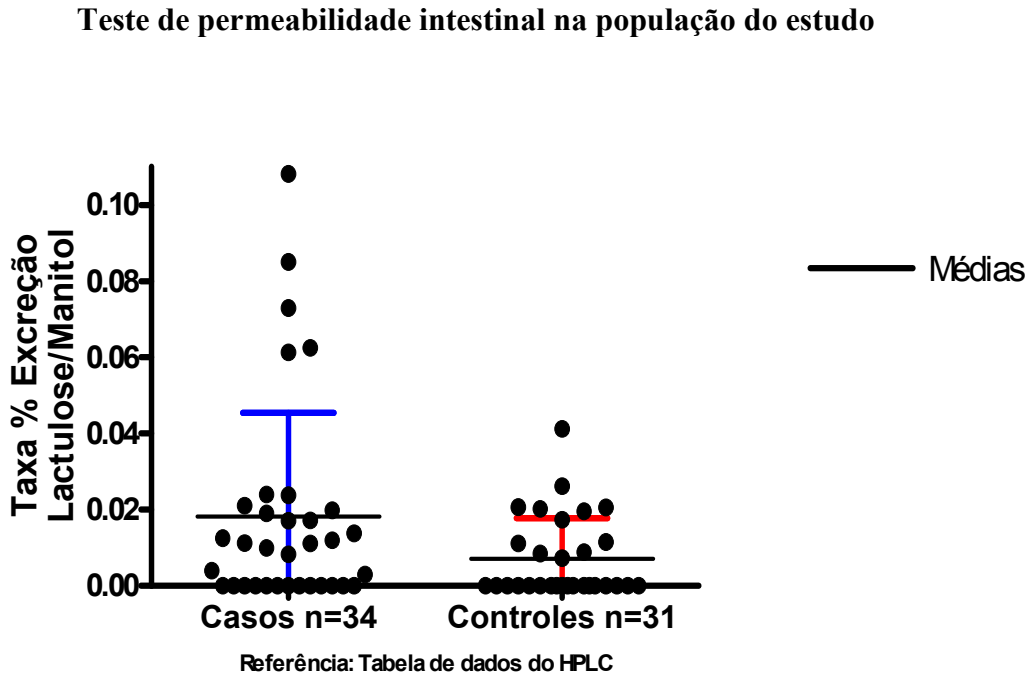
Observa-se na **Figura 21,** que a distribuição de casos e controles para o percentual da taxa de excreção da lactulose difere, sendo nos casos mais dispersos do que nos controles. Na **Figura 22** observa-se também uma dispersão maior nos casos que nos controles quanto à taxa percentual da excreção lactulose/manitol.

Figura 21 – Distribuição da população do estudo para a taxa percentual de excreção da lactulose



Fonte: pesquisa direta.

Figura 22 – Análise percentual da excreção lactulose/manitol (permeabilidade intestinal) na população do estudo

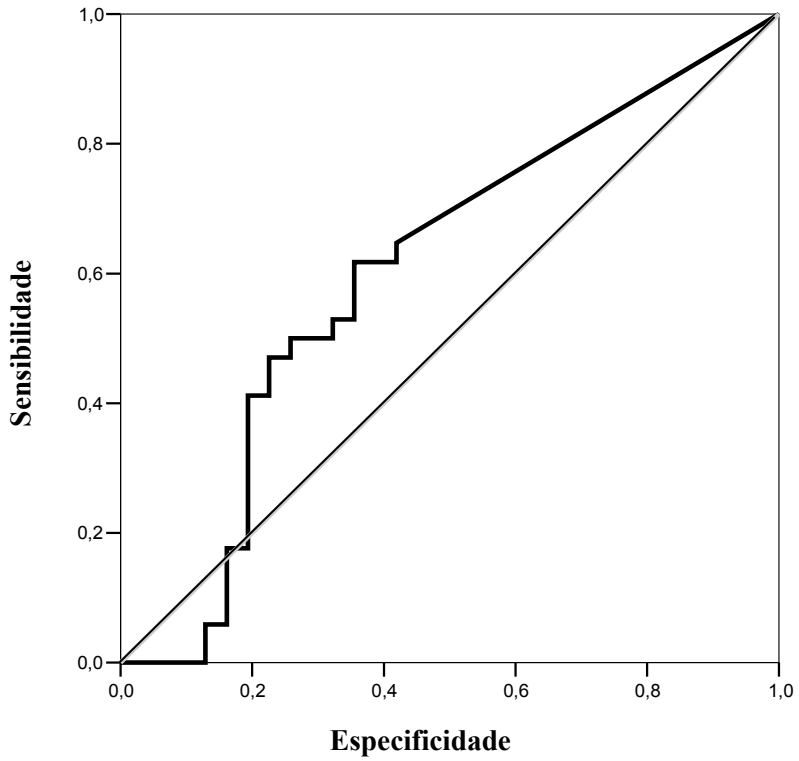


Fonte: pesquisa direta.

6.4 Avaliação da Excreção de Lactose (como Teste Múltiplo de Açúcares)

Para a lactose, a média % de excreção de 0,0562 (mínimo=0,0000 e máximo=0,1721 com dp=0,0551) para os casos, e a média % de excreção 0,0704 (mínimo=0,0000, máximo=0,5489 com dp=0,1419) para os controles, resultando em valor de p=0,1317, mostram que este parâmetro não é significativo para o diagnóstico de intolerância a lactose.

Figura 23 – Análise do percentual de excreção da lactose (Curva de ROC)



Área sob a curva de ROC: % de excreção da Lactose

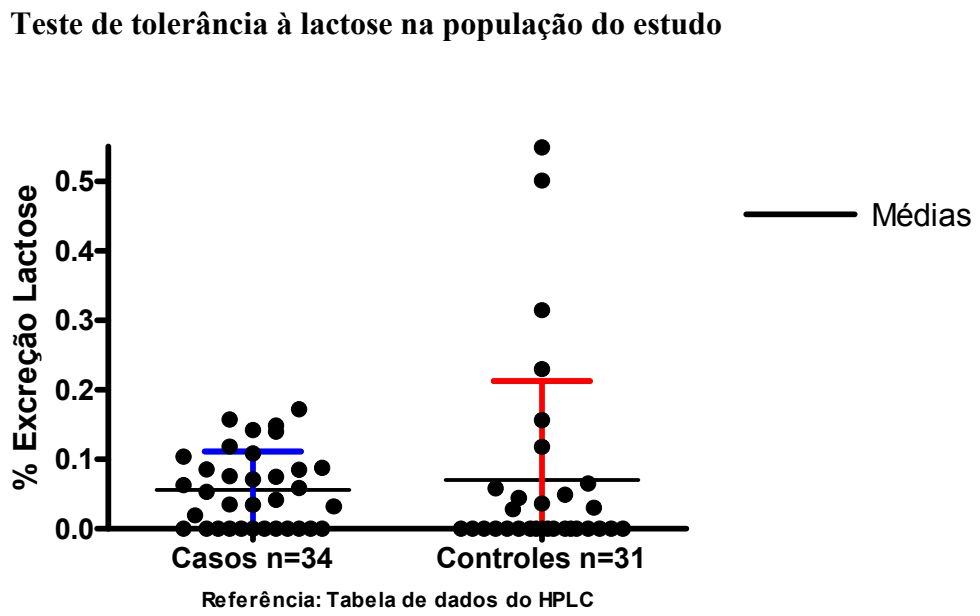
Área	ep	P	IC com 95% de confiança	
			LI	LS
0,6034	0,0725	0,1523	0,4613	0,7455

Fonte: pesquisa direta.

Como se observa na **Figura 23**, a análise da percentagem de excreção da lactose como fator preditor para o diagnóstico de intolerância a lactose, supondo-se, na curva de ROC *(Receiver Operating Characteristic*), que, para valores da % de excreção da lactose > = x, com maior chance de positividade, obtém-se para uma área da curva de 0,6034, com ep de 0,0725. Nota-se que, segundo os dados observados, a % de excreção da lactose não é bom preditor para o diagnóstico de intolerância a lactose, pois resulta em valor de p de 0,1523, pelo menos na dosagem utilizada neste estudo, de 5 gramas, e na amostra estudada.

A **Figura 24** apresenta a distribuição dos casos e controles para o percentual de excreção da lactose, quando utilizada como teste múltiplo de açúcares, sendo neste caso a dose de 5 gramas, como preconizado nos métodos. Maior dispersão ocorre nos controles do que nos casos.

Figura 24 – Dispersão dos casos e controles em relação ao percentual de excreção da lactose



Fonte: pesquisa direta.

6.5 Correlação entre o Percentual de Excreção Lactulose/Manitol

A correlação entre a percentagem de excreção da lactulose/manitol com valores de 0,0182 (mínimo=0,0000 e máximo=0,1081, com dp=0,0273), para os casos, e de 0,0,0071 (mínimo=0,0000 e máximo=0,0412 com dp=0,0106), para os controles, demonstra que este parâmetro é fidedigno na avaliação de deficiência de lactase, uma vez que, quando existe intolerância a lactose, a alteração da permeabilidade mucosa é suficiente para um diagnóstico diferencial não invasivo.

No teste de Mann-Whitney, comparando-se os grupos (casos/controles), observa-se correlação lactulose/manitol significativa com relação ao valor p= 0,0741.

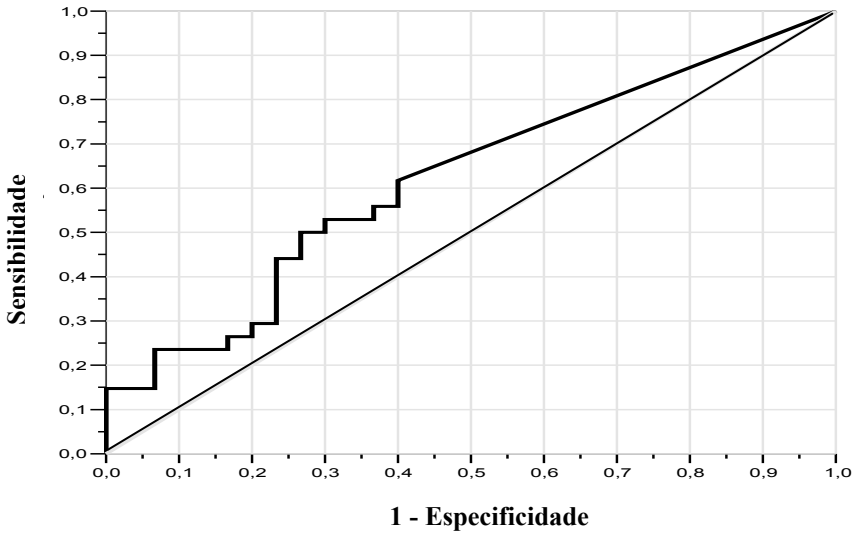
Tabela 10 – Teste de Mann-Whitney para comparação do percentual de excreção da lactulose, lactose e correlação do percentual de excreção da lactulose/manitol e lactose/manitol.

Teste Mann-Whitney para a comparação dos grupos caso/controle, em função da distribuição das variáveis

Variáveis	Grupo	n	Media	ep	Mediana	P
Volume urinário (L)	Caso	34	0,2982	0,0305	0,2300	0,3047
	Controle	31	0,3310	0,0317	0,2700	
Sacarose % Exc	Caso	34	0,0028	0,0011	0,0000	0,4389
	Controle	31	0,0030	0,0021	0,0000	
Lactose % Exc	Caso	34	0,0562	0,0094	0,0476	0,1317
	Controle	31	0,0704	0,0255	0,0000	
Manitol % Exc	Caso	34	11,5945	0,9657	10,4598	0,3511
	Controle	31	12,8636	1,3371	11,9005	
Lactulose % Exc	Caso	34	0,1678	0,0410	0,1080	0,1030
	Controle	31	0,1045	0,0354	0,0000	
Sacaros (%)/Manitol (%)	Caso	34	0,0003	0,0001	0,0000	0,4130
	Controle	30	0,0002	0,0001	0,0000	
Lactose (%)/Manitol (%)	Caso	34	0,0062	0,0018	0,0037	0,1085
	Controle	30	0,0037	0,0011	0,0000	
Lactulose (%)/Manitol (%)	Caso	34	0,0182	0,0047	0,0105	
	Controle	30	0,0071	0,0019	0,0000	0,0741

Na **Tabela 10** observam-se os resultados do teste de Mann-Whitney do percentual de excreção da lactulose, lactose e percentual de excreção da relação lactulose/manitol e lactose/manitol.

Figura 25 – Análise do percentual de excreção lactulose/manitol



Área sob a curva para a % lactulose / % manitol

Área	ep	P	IC com 95% de Confiança	
			LI	LS
0,6225	0,0701	0,0926	0,4852	0,7599

Fonte: pesquisa direta.

A análise da curva de *ROC* para a taxa percentualde excreção da lactulose/manitol apresenta uma área de 0,6225, com ep=0,0701, com IC de 95%, Li=0,4852, LS=0,7599 e um valor de p=0,0926.

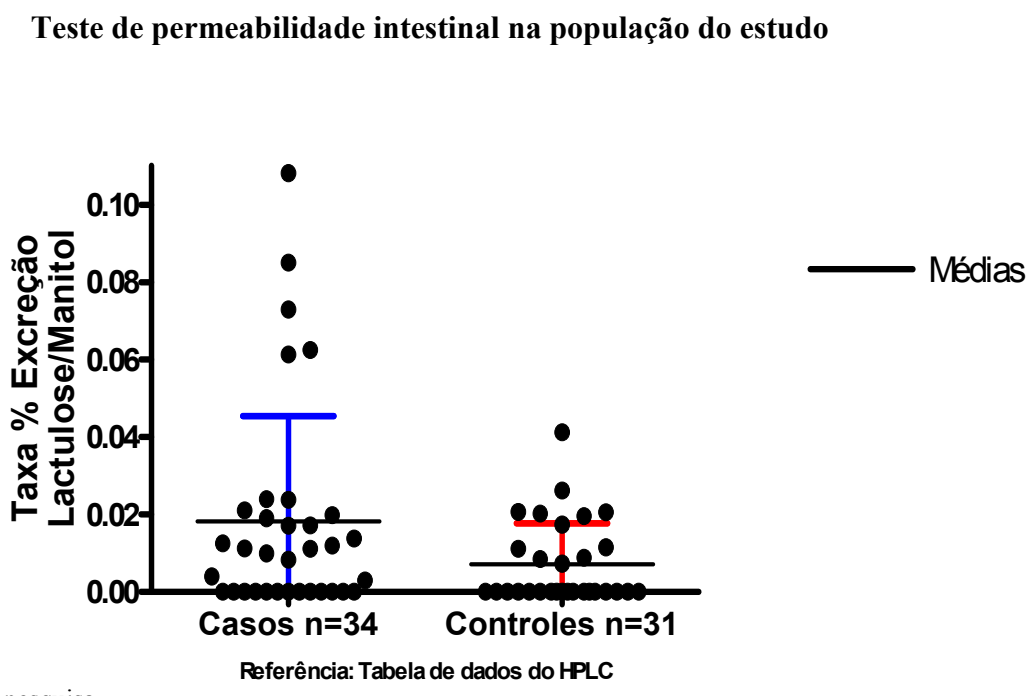
Positivo se > = x	Sensibilidade	Especificidade
0,0000	1,0000	0,0000
0,0015	**0,6176**	**0,6000**
0,0035	0,5882	0,6000
0,0056	0,5588	0,6000
0,0078	0,5588	0,6333
0,0084	0,5294	0,6333
0,0087	0,5294	0,6667
0,0093	0,5294	0,7000
0,0105	0,5000	0,7000
0,0111	0,5000	0,7333
0,0112	0,4706	0,7333
0,0114	0,4412	0,7333
0,0118	0,4412	0,7667
0,0123	0,4118	0,7667
0,0131	0,3824	0,7667
0,0154	0,3529	0,7667
0,0172	0,3235	0,7667
0,0173	0,2941	0,7667
0,0182	0,2941	0,8000
0,0193	0,2647	0,8000
0,0197	0,2647	0,8333
0,0200	0,2353	0,8333
0,0204	0,2353	0,8667
0,0206	0,2353	0,9000
0,0209	0,2353	0,9333
0,0224	0,2059	0,9333
0,0239	0,1765	0,9333
0,0251	0,1471	0,9333
0,0337	0,1471	0,9667
0,0513	0,1471	1,0000
0,0619	0,1176	1,0000
0,0677	0,0882	1,0000
0,0789	0,0588	1,0000
0,0965	0,0294	1,0000
0,1100	0,0000	1,0000

Fonte: dados de pesquisa.

Nesses casos, supondo-se que, para valores da taxa % de excreção lactulose/manitol >=x mostra uma sensibilidade de 61,76 %, uma especificidade de 60,00 % em relação ao fator diagnóstico de intolerância a lactose (curva de *ROC* para lactulose/manitol), quando se usa um ponto de corte de 0,0015.

A **figura 26** apresenta a dispersão; foram usadas as médias dos casos e controles em relação à taxa percentual de excreção da lactulose/manitol, onde se observa maior dispersão nos casos do que nos controles.

Figura 26 – Taxa percentual de excreção lactulose/manitol nos voluntários



Fonte: dados da pesquisa

Este parâmetro, por si, já é um fator do diagnóstico não invasivo de intolerância a lactose, demonstrado indiretamente pela alteração de permeabilidade mucosa induzida pela intolerância à lactose.

6.6 Estratificação dos Dados do Percentual de Excreção da Lactulose/Manitol e Correlação da Taxa de Excreção Lactulose/Manitol para Pacientes com e sem Ingestão Etílica Habitual

Estratificando-se os dados para pacientes que relataram ingestão etílica positiva ou negativa, utilizando-se os valores obtidos para lactulose e a correlação lactulose/manitol, foram encontradas diferenças significativas. Os dados demonstram a realidade.

Considerando a estratificação por ingestão etílica sim/não, encontra-se:

Tabela 11 – Teste de permeabilidade intestinal[1] estratificando por ingestão etílica[2] na população do estudo. Fortaleza, CE – maio de 2005 a fevereiro de 2006.

Variáveis [3]	Ingestão Etilica	Caso/Controle	n	Mínimo	Mediana	Máximo	P[6]
% Lactulose	Sim	Caso [4]	7	0,0000	0,1876	0,6359	
		Controle [5]	13	0,0000	0,0867	0,3416	0,2691
		Total	20	0,0000	0,1394	0,6359	
% Lactulose	Não	Caso [4]	26	0,0000	0,0791	1,1668	
		Controle [5]	18	0,0000	0,0000	0,9669	0,0876
		Total	44	0,0000	0,0000	1,1668	
% Manitol	Sim	Caso [4]	7	2,5732	9,6844	13,5844	
		Controle [5]	13	2,4489	11,9005	25,5589	0,4054
		Total	20	2,4489	10,2888	25,5589	
% Manitol	Não	Caso [4]	26	5,6786	10,493	31,9744	
		Controle [5]	18	0,0000	11,8739	36,9029	0,5667
		Total	44	0,0000	10,8915	36,9029	
Taxa Lactulose/Manitol	Sim	Caso [4]	7	0,0000	0,0210	0,0850	
		Controle [5]	13	0,0000	0,0073	0,0412	0,1104
		Total	20	0,0000	0,0098	0,0850	
Taxa Lactulose/Manitol	Não	Caso [4]	26	0,0000	0,0091	0,1081	
		Controle [5]	17	0,0000	0,0000	0,0262	0,0943
		Total	43	0,0000	0,0000	0,1081	

1. Avaliada pela a relação da taxa de excreção/lactulose/manitol.

2. A ingestão etílica por auto-avaliação e, quando fosse habitual, embora não sendo etilista pelos critérios da OMS.

3. Os dados das variáveis são apresentados em mediana e valores máximo e mínimo.

4. Paciente com intolerância a lactose.

5. Paciente sem intolerância a lactose.

6. O intervalo de confiança utilizado para análise foi de 95%; média e erro-padrão da média foram utilizados para análise estatística.

Fonte: pesquisa direta.

Quando se estratificou o total de pacientes por condição de ingestão etílica habitual, comparando-se os grupos casos e controles, foram obtidos os dados da **Tabela 11,** para o percentual de excreção dos açúcares utilizados.

Tabela 12 – Estratificação dos grupos por condição de ingestão etílica habitual.

Ingestão Etílica[1]	Grupo	N	Média	Dp	Mediana	P[4]
		Sacarose (%)				
Sim	Caso[2]	7	0,0017	0,0017	0,0000	0,6916
	Controle[3]	13	0,0064	0,0048	0,0000	
Não	Caso[2]	26	0,0032	0,0014	0,0000	0,1243
	Controle[3]	18	0,0006	0,0006	0,0000	
		Lactose (%)				
Sim	Caso[2]	7	0,0709	0,0231	0,0419	0,2965
	Controle[3]	13	0,0483	0,0232	0,0305	
Não	Caso	26	0,0517	0,0108	0,0440	0,3154
	Controle	18	0,0864	0,0408	0,0000	
		Manitol (%)				
Sim	Caso[2]	7	9,3771	1,3890	9,6844	0,4054
	Controle[3]	13	13,2970	1,9849	11,9005	
Não	Caso[2]	26	12,2405	1,1887	10,4930	0,5667
	Controle[3]	18	12,5506	1,8469	11,8739	
		Lactulose (%)				
Sim	Caso[2]	7	0,2180	0,0817	0,1876	0,2691
	Controle[3]	13	0,1123	0,0356	0,0867	
Não	Caso[2]	26	0,1595	0,0491	0,0791	0,0876
	Controle[3]	18	0,0988	0,0562	0,0000	
		Sacarose/Manitol (%)				
Sim	Caso[2]	7	0,0001	0,0001	0,0000	0,6916
	Controle[3]	13	0,0004	0,0003	0,0000	
Não	Caso[2]	26	0,0004	0,0002	0,0000	0,1420
	Controle[3]	17	0,0001	0,0001	0,0000	
		Lactose (%)/Manitol (%)				
Sim	Caso[2]	7	0,0128	0,0077	0,0038	0,2965
	Controle[3]	13	0,0040	0,0014	0,0026	
Não	Caso[2]	26	0,0045	0,0011	0,0031	0,1514
	Controle[3]	17	0,0035	0,0016	0,0000	
		Lactulose (%)/Manitol (%)				
Sim	Caso[2]	7	0,0307	0,0130	0,0210	0,1104
	Controle[3]	13	0,0100	0,0035	0,0073	
Não	Caso[2]	26	0,0154	0,0049	0,0091	0,0943
	Controle[3]	17	0,0049	0,0021	0,0000	

1. Considerando ingestão etílica habitual, mas não preenchendo os critérios de etiloismo da OMS.
2. Caso – paciente com intolerância a lactose.
3. Controle – paciente sem intolerância a lactose.
4. Valor de p pelo teste de Mann-Whitney.

Fonte: dados da pesquisa

Pela **Tabela 12**, na distribuição dos percentuais de excreção dos açúcares, com média mediana, desvio-padrão e valores de p.

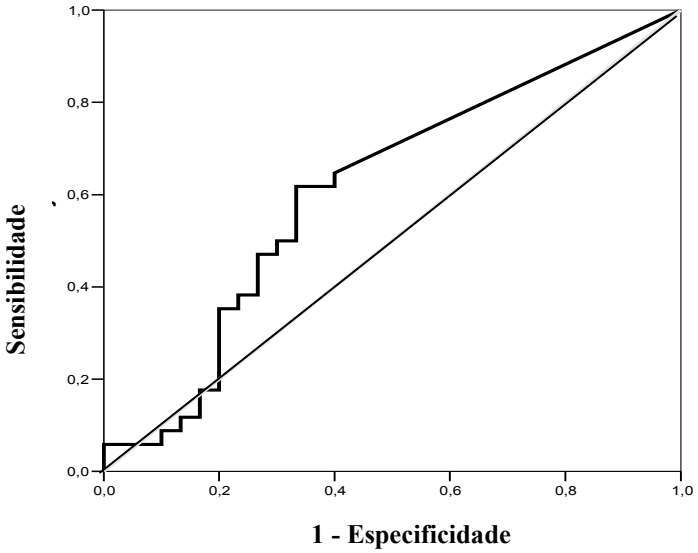
- Não existe diferença marginal na distribuição da % lactulose, p=0,0876, entre os grupos caso e controle, quando se consideram os pacientes sem ingestão etílica.
- Não existe diferença marginal, p=0,0943, na distribuição da % lactulose/ % manitol, p=0,0943, entre os grupos caso e controle, quando se consideram os pacientes sem ingestão etílica.

Desta forma, observa-se que, para a percentagem de excreção da lactulose, não existe diferença significativa, com valor de p=0,0876, entre os grupos caso e controle, considerando-se os pacientes sem ingestão etílica. Para a correlação da percentagem de excreção lactulose/manitol, também não existe diferença significativa, com valor de p=0,0943 nos pacientes sem ingestão etílica.

6.7 Correlação da Percentagem de Excreção Lactose/Manitol

A correlação da percentagem de excreção da lactose/manitol, contendo, 0,04 para os casos e de 0,02 para os controles, demonstra que este parâmetro não se mostrou fidedigno de um diagnóstico diferencial (curva de ROC lactose/manitol) nos pacientes com ingestão etílica habitual, como se observa na **Figura 27.**

Figura 27 – Curva de ROC para a taxa percentual de excreção da correlação lactose/manitol, considerando-se a ingestão etílica



Área sob a curva para a % lactose / % manitol

Área	ep	P	IC com 95% de Confiança	
			LI	LS
0,6108	0,0722	0,1285	0,4693	0,7522

Fonte: pesquisa direta.

6.8 Avaliação da Deficiência de Dissacaridases na Mucosa em Relação aos Testes aplicados na População do Estudo

A **Tabela 13** demonstra as médias dos valores obtidos na avaliação da atividade mucosa das dissacaridases – lactase e sacarase-isomaltase.

Tabela 13 – Avaliação da deficiência de lactase e sacarase-isomaltase na população do estudo. Fortaleza, CE – maio de 2005 a fevereiro de 2006.

Variáveis [1]		Caso[2] n=34	Controle[3] n=31	Total n=65	P [4]
Excreção de Lactose	Média	0,0562	0,0704	0,0630	0,1317
	Desvio-padrão (DP)	0,0551	0,1419	0,1052	
Excreção de Sacarose	Média	0,0028	0,0030	0,0029	0,4389
	Desvio-padrão (DP)	0,0065	0,0115	0,0092	

1. Os dados das variáveis são apresentados em média e mais ou menos erro-padrão da média.
2. Paciente com intolerância a lactose.
3. Paciente sem intolerância a lactose.
4. O intervalo de confiança utilizado para análise foi de 95%; média mais ou menos desvio-padrão da média em uso para análise estatística.

Fonte: dados da pesquisa.

Tabela 14 – Avaliação da absorção/permeabilidade intestinal na população do estudo. Fortaleza, CE – maio de 2005 a fevereiro de 2006.

Variáveis[1]		Caso[2] n=34	Controle[3] n=31	Total n=65	P[4]
Excreção de Manitol	Média	11,5945	12,8636	12,1997	0,3511
	Desvio-padrão (DP)	5,6309	7,4445	6,5373	
Taxa Lactose/Manitol	Média	0,0062	0,0037	0,0050	0,1085
	Desvio-padrão (DP)	0,0105	0,0060	0,0087	
Taxa Sacarose/Manitol	Média	0,0003	0,0002	0,0003	0,413
	Desvio-padrão (DP)	0,0008	0,0008	0,0008	

1. Os dados das variáveis são apresentados em média e mais ou menos erro-padrão da média.
2. Paciente com intolerância a lactose.
3. Paciente sem intolerância a lactose.
4. O intervalo de confiança utilizado para análise foi de 95%; média mais ou menodesvio padrão da média foi utilizado para análise estatística.

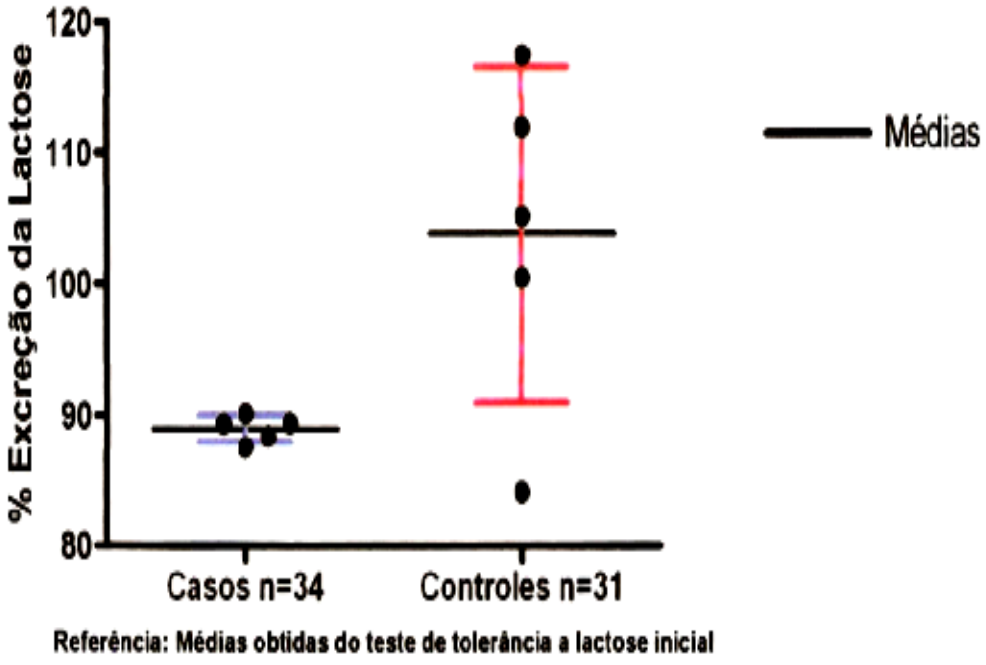
Fonte: dados da pesquisa.

Como se pode observar nas **Tabelas 13 e 14**, para a excreção da lactose, foram obtidas média de 0,0562 (dp=0,0551), para os casos, e média de 0,0704 (dp=0,1419), para os controles, com total de 0,063 (dp=0,1052), resultando em valor de p=0,1317. Para a excreção

de sacarose, foram obtidas as médias de 0,0028 (dp=0,0065) para os casos e de 0,0030 (dp=0,0115) para os controles, com total de 0,0029 (dp=0,0092), resultando em valor de p=0,4389. Para o manitol, as médias foram de 11,5945 (dp=5,6309) para os casos e de 12,8636 (dp=7,4445) para os controles, com total de 12,1887 (dp=6,5373), resultando em valor de p=0,2511. Na taxa de excreção lactose/manitol, as médias foram de 0,0062 (dp=0,0105) para os casos e de 0,0003 (dp=0,0037) (dp=0,0060) para os controles, com total de 0,0050 (dp=0,0087), resultando em valor de p=0,1015. Na taxa de excreção sacarose/manitol, as médias de 0,0003 (dp=0,0008) nos casos e de 0,0002 (dp=0,0008) nos controles, com total de 0,0003 (dp=0,0008), resultando em valor de p=0,413.

A **Figura 28** mostra a dispersão de casos e controles em relação ao percentual de excreção da lactose na população do estudo, considerando-se a estratificação para ingestão etílica ou não.

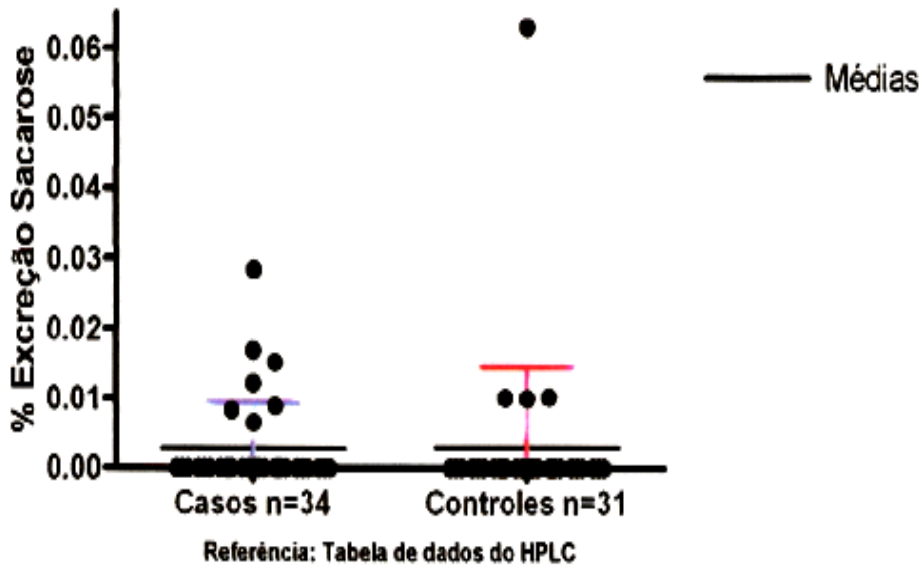
Figura 28 – Percentual de excreção da lactose nos voluntários



Fonte: dados da pesquisa

A **Figura 29** mostra a dispersão de casos e controles para o percentual de excreção da sacarose, considerando-se a estratificação para ingestão etílica ou não.

Figura 29 – Percentual de excreção da sacarose nos voluntários



Fonte: dados da pesquisa

7 DISCUSSÃO

Os carboidratos fazem parte da alimentação humana desde os primórdios da Humanidade. Os pré-hominídeos já catavam frutos, raízes, tubérculos, sementes e folhas como parte da sua dieta. Eventualmente, ingeriam alguma proteína animal, utilizando-se de insetos, pequenos animais ou raramente caçavam seres assemelhados e os devoravam. Os registros fósseis datam de um período entre 150 e 190.000 anos atrás (WHITE et al., 2003). Há cerca de 100.000 anos, já havia populações arcaícas, como o *Homo erectus* e *Homo heidelbergensis*, migrando para outras partes do globo (TRINKAUS, 2005). Já na Era Glacial, havia padrões de sobrevivência, com diversos modos de agricultura, pastoreio e caçadores. Mudanças climáticas dramáticas, contudo, ocorreram entre 30 e 10.000 anos atrás (KUPER; KROPELIN, 2006). Embora o modelo paleológico e paleobiológico da origem multirregional do homem moderno possa ser aplicado, muitas miscigenações devem ter ocorrido dentro de uma simples região continental. Apesar de o leste e sudoeste da África terem sido berços do homem moderno em torno de 90.000 anos atrás (McDERMOTT et al., 1993), rapidamente se disseminou para o resto da África e Eurásia. Vários estudos genômicos modernos demonstram a origem africana do homem moderno (MACOULA et al., 2005).

Entre 15 e 10.000 anos atrás, com o início dos primeiros assentamentos humanos, formando colônias e aldeamentos, o pastoreio e a domesticação de animais produtores de leite tiveram início. A introdução do leite animal na composição da dieta humana trouxe mudanças de hábitos (SIMOONS, 1969). Antes, apenas os lactentes eram amamentados em suas mães biológicas ou não, quando a atividade lactásica intestinal estava em sua capacidade máxima. Esta atividade declinou com a idade e o adulto, em geral, apresenta apenas 5 a 10% da atividade lactásica do lactente (TADESSE et al., 1992; BEAN et al., 1990).

Hoje em dia, a indústria do leite e derivados está difundida em todo o globo terrestre. Grande variedade de alimentos contém produtos lácteos em sua composição. Somente em algumas regiões restritas, podem ser encontrados alguns produtos que contêm leite ou derivados em sua composição, sem lactose. De modo geral, pode-se afirmar que 50%

da população mundial adulta apresentam deficiência de lactase (TISHKOFF et al., 2006).

Os carboidratos representam 50% das calorias ingeridas por um adulto normal e a lactose contribui com 3 a 5 % deste total (HAMMOND, 1985). A absorção destes depende da digestão enzimática para transformá-los em mono ou dissacarídeos, uma vez que a mucosa intestinal é seletiva e praticamente não absorve macromoléculas (COMMITEE ON NUTRITION, 1979).

A lactose é um dissacarídio, resultante da síntese, na glândula mamária, da união de uma molécula de beta-d-glactose e outra de alfa-d-glicose, com o concurso da enzima galactosil transferase e da lactoalbumina (BEIGUELMAN et al., 1983). Ao ser ingerida, ocorre a ação enzimática da lactase, enzima da borda em escova do enterócito, que a degrada em galactose e glicose, monossacarídeos capazes de absorção pelo enterócito, pela via transcelular. Duas formas de deficiência de lactase são descritas: a primária, congênita e rara, e a secundária, resultante de não-persistência da lactase e agressões à mucosa (BULLER et al., 1991). A má absorção ontogenética da lactose varia por faixa etária e etnia, apresentando, o adulto em geral, apenas 5 a 10% da capacidade lactásica do lactente (TADESSE et al., 1992; BEAN et al., 1990).

No indivíduo com hipolactasemia, a ingestão de produtos lácteos contendo lactose leva ao desenvolvimento de sintomas clínicos, como dores abdominais, distensão, flatulência, cólicas e diarréia, dependendo da quantidade ingerida (DAHLAVIST et al., 1963). A hipolactasemia do tipo adulto é uma condição normal após o desmame (SIMOONS, 1970). Metade da população humana, porém, apresenta a condição genética de persistência da lactase, particularmente no norte da Europa, na população exposta a produtos lácteos (SAHI et al., 1973).

O diagnóstico de hipolactasemia do tipo adulto é habitualmente baseado no teste de tolerância a lactose (*gold standard*), cuja especificidade varia de 77 a 96% e sensibilidade de 76 a 94% (AROLA, 1994). Outros testes são utilizados, como do hidrogênio expirado, cuja especificidade varia de 89 a 100% e sensibilidade de 69 a 100% (AROLA, 1994). Um método clássico é a dosagem bioquímica direta da atividade dissacaridásica em biopsias do intestino delgado (DAHLQVIST, 1984). A utilização da determinação do genótipo *C/T*-13910 de linfócitos do sangue (LEVITT, 1969), contudo, é um método caro e não é utilizado na

prática da clínica. O Teste Rápido de Lactase - realizado em biopsias endoscópicas do intestino delgado –, demonstrou 100% de especificidade e sensibilidade, quando comparado com a determinação do polimorfismo genético *C/T*-13910 (ABYLESS, 1982).

Todos os testes descritos, no entanto, avaliam apenas um aspecto: a condição de persistência ou não da capacidade lactásica e alguns são invasivos. Neste estudo, desenvolveu-se um novo tipo de teste e se aferiu sua validade, que fosse capaz da avaliar aspectos funcionais da mucosa intestinal, simultaneamente, como integridade da mucosa (presença ou não de lesão), área mucosa comprometida (extensão da lesão), permeabilidade da mucosa e integridade de enzimas (dissacaridases), de forma não invasiva.

Sabe-se que a permeabilidade intestinal é condição fundamental no balanço do intestino delgado e estado nutricional em condições hígidas e patológicas (BRUNSER et al., 1966). Condições patológicas como doença de Crohn (FARMER; MICHENER, 1979), linfangiectasia intestinal (VARD et al., 1975) e outros estados diarréicos (SNYDER; MARSON, 1982; BERN et al., 1975; SCHORLING et al., 1990; LIMA; GUERRANT, 1992) afetam a permeabilidade intestinal, comprometendo suas propriedades fundamentais de manutenção da vida: a barreira de proteção a diversos agentes nóxicos e o transporte de nutrientes relacionados ao equilíbrio metabólico orgânico. A permeabilidade é o fluxo de solutos por intermédio da unidade de membrana em um certo tempo. A permeabilidade intestinal relaciona-se à barreira funcional e a permeação de marcadores é utilizada para medir a permeabilidade (MENZIES, 1984; TRAVIS; MENZIES, 1992).

Duas vias de permeação encontram-se presentes no epitélio intestinal normal: através da célula (transcelular) e entre as células (paracelular). Pode-se identificar poros eletroneutros largos (6,5 nm) e poros seletivos pequenos (0,7 nm), localizados entre as células entéricas (PAPPENHEIMER et al., 1951). As junções paracelulares ocupam menos de 5% da área total do epitélio intestinal, quando avaliada pela quantidade de poros largos (MARCIAL et al., 1984). Poros seletivos localizados na junção intercelular limitam a permeação de moléculas maiores com carga negativa, como oligossacarídeos e EDTA (NAFTALIN; TRIPATHI, 1985). Por outro lado, é possível que moléculas maiores passem através da extrusão de células ou ulcerações do epitélio (CLARKSON, 1967; MOORE et al., 1989). Monossacarídeos, como ramnose e moléculas pequenas de PEGs, são capazes de penetrar a membrana do enterócito, utilizando, portanto, a via transcelular (TRAVIS; MENZIES, 1992). A utilização de duplo açúcar (dissacarídeo/monossacarídeo) apresenta pequenas diferenças,

quando eles são comparados. Quando associados a outros açúcares, permite determinar a má absorção de carboidratos e deficiência na atividade de dissacaridases (MAXTON et al., 1990; NOONE et al., 1986).

As combinações de celubiose/manitol (COBDEN et al., 1985; JUBY et al., 1989; COBDEN et al., 1980) e lactulose/manitol (UKABAM; COOPER, 1984; JUBY et al., 1989; ANDRE et al., 1988) são consideradas os melhores testes com duplo açúcar, utilizados para medir a permeabilidade intestinal.

A atividade de dissacaridases e o transporte mediado por sistemas de transportadores intestinais podem ser associados com testes diferenciais de permeabilidade, que utilizam o princípio comum dos marcadores já descritos. Por exemplo, a combinação do teste lactulose/manitol com lactose, sacarose e palatinose, em solução iso-osmolar, permite a avaliação simultânea da atividade da lactase, sacarase e isomaltase, bem como a permeabilidade (MAXTON et al., 1990). Neste teste, é possível fazer a diferenciação entre deficiência primária e secundária de dissacaridases (MENZIES, 1974; NOONE et al., 1986; MAXTON et al., 1990). A D-xilose e 3-O-metil-D-glicose atravessam o epitélio intestinal por difusão e com mediação por transportador protéico, respectivamente. A combinação de lactulose/manitol com D-xilose e O-metil-D-glicose pode ser utilizada para medir permeabilidade e transporte intestinal por difusão, com mediação por transportadores (COOK; MENEZES, 1986); um teste mais específico do que se utilizando a D-xilose isoladamente para avaliar a função intestinal em condições patológicas, com doença celíaca e outras doenças diarréicas (TRAVIS et al., 1986).

Vários fatores alteram a integridade e a permeabilidade do epitélio intestinal. Os mecanismos são ainda pouco conhecidos, mas a permeação das vias transcelular e paracelular, medidas pelos marcadores descritos, são modificadas por fatores como físico, estresse cirúrgico, drogas, doenças intestinais e sistêmicas e mediadores intercelulares, como citocinas, prostaglandinas, agonistas e antagonistas de receptores intestinais, antiinflamatórios não hormonais, quimioterápicos (NELL et al., 1977; BJARNASON et al., 1986).

No homem, várias afecções diarréicas, como as doenças celíaca, de Crohn e retocolite ulcerativa inespecífica (RCUI), estão associadas a integridade e permeabilidade intestinal alteradas. Doenças diarréicas crônicas (>14dias), particularmente quando associadas

a etiologia por *Criptosporidium* ssp., *Microsporium ssp.,* alteram a permeabilidade e tornam as lesões ainda mais severas, com potencial conseqüência para o estado nutricional (LIMA et al., 1997). Doenças do trato gastrintestinal, com a hipercolonização bacteriana (PIGNATA & cols, 1990), infecção por *Clostridium difficile* (RYBOLT et al., 1989), gastrinterite viral (NOONE et al., 1986), inanição (MAXTON et al., 1989), diarréia dos diabéticos (COOPER et al., 1987) e alergias associadas a proteínas do leite ou de alimentos (SCHANDER et al., 1990; JAKSON et al., 1981), estão associadas a aumento da permeabilidade.

As zônulas de oclusão têm papel central na regulação da permeabilidade paracelular (MADARA, 1992). Enfermidades que alteram a permeabilidade por esta via, provavelmente, são mediadas por células inflamatórias e mediadores químicos, que alteram a composição da membrana citoplasmática e a área de absorção intestinal. Drogas podem agir por diferentes mecanismos, como bloqueio da divisão celular (quimioterápicos) e de enzimas produtoras de prostaciclinas e prostaglandinas, que induzem ao *turnover* celular, como os antiinflamatórios não hormonais.

Um estudo bem conduzido, utilizando culturas de células *T*-84 do carcinoma de cólon humano, documentou aumento da permeabilidade intestinal, induzida por migração transepitelial de neutrófilos na presença de peptídeo bacteriano *N*-formil-*L*-leucil-*L*-fenilanina (*fMLP*) (MILKS et al., 1986). Esta observação leva a se postular a idéia de que, nas doenças inflamatórias e infecciosas intestinais, este mecanismo ocorra. Um modelo *in vitro* demonstra que o interferon-γ, mas não o *TNF*, *IL*-1 ou *IL*-2, causa diminuição da resistência transepitelial, resultando em aumento da permeabilidade. Em monocamadas de células *T*-84 (MADARA; STAFFORD, 1989), nas doenças inflamatórias, como colite ulcerativa e doença de Crohn, foram observadas alterações na composição lipídica da membrana celular citoplasmática de enterócitos, associada a alterações da permeabilidade na permeação de água, íons e solutos de baixo peso molecular (BRASITUS et al., 1986; SANDLE et al., 1990; MEDDINGS, 1989; PACHECO et al., 1987).

Fordtran et al. (1965) utilizaram marcadores moleculares para avaliação da permeabilidade intestinal; iniciou-se, então, outra era neste estudo.

Estabeleceu-se que um marcador não deve ser reconhecido pelo sistema imune,

seja inerte e atóxico, e deve ser excretado pela filtração glomerular, possibilitando sua recuperação na urina. Alguns mono e dissacarídeos apresentam características muito próximas destas idéias, entre eles, a lactulose e o manitol são utilizados satisfatoriamente em várias enfermidades (PEARSON et al., 1982). O uso de duplo açúcar tem a vantagem de minimizar as variantes da motilidade intestinal, área de absorção, clareamento renal e medida do volume urinário, uma vez que os mesmos fatores alteram ambos (MENZIES, 1983).

Os dois utilizados neste estudo, lactulose e manitol, diferem na via de permeação no epitélio gastrintestinal. O manitol tem raio molecular de 0,4 nm e é absorvido pela via transcelular. A lactulose tem raio molecular de 0,52 nm e é absorvido pela via paracelular (PEARSON et al., 1982). A dificuldade para estes açúcares se relaciona com as diferenças de estruturas químicas e baixa concentração na urina (TRAVIS et al., 1996). O método de cromatografia líquida de alta precisão com detecção amperométrica pulsátil (*HPLC-PAD*) veio resolver este problema. Sua sensibilidade é melhor do que a cromatografia em gel de camada fina (TRAVIS; MENZIES, 1992). Estudo em voluntários sadios tem a linearidade do método, com as concentrações acima de 3 g/l dos açúcares e detecção possível em concentrações de 0,3 mg de lactose por litro (FLEMING et al., 1990). Os dados do grupo desse estudo e de outros autores comprovam a indicação do método na avaliação da permeabilidade intestinal, com a vantagem de ser inócuo, não invasivo, de fácil aplicabilidade, preciso e sensível (LIMA et al., 1997).

O presente experimento avançou na avaliação das alterações intestinais induzidas pela deficiência de lactase em adultos. A utilização de múltiplos açúcares, como lactulose, manitol, lactose, sacarose, permitiu a avaliação simultânea da permeabilidade intestinal, integridade mucosa (presença ou não de lesão), área comprometida (extensão da lesão mucosa) e integridade de enzimas (dissacaridases) da mucosa entérica do intestino delgado.

A experiência ambulatorial de 30 anos, no Hospital Universitário Walter Cantídio da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, permitiu que se inventariasse um número relativamente grande de pacientes; contudo, para os dados de variância estatística, era indicado que 30 casos em cada grupo seriam suficientes. Foram incluídos 65 pacientes, sendo 34 casos (intolerantes a lactose) e 31 controles (sem intolerância a lactose). Pode-se concluir, baseando-se nos cálculos estatísticos indicados, que estes números foram adequados para o estudo focalizado. A faixa etária ficou dentro do preconizado pelo projeto (18 a 70

anos), uma vez que se excluíram pacientes pediátricos ou adolescentes, já que protocolos de estudo nesta faixa etária requerem outros critérios.

A etnia contemplou uma população representativa da raça brasileira (se é que se pode dizer uma *raça brasileira,* como sugere Ariano Suassuna) (SUASSUNA, A; 1960), com as mesmas condições socioeconômicas e culturais em ambos os grupos.

Nenhum voluntário apresentou curva glicêmica compatível com *Diabetes mellitus* no teste de tolerância a lactose, uma vez que seria critério de exclusão. No questionário clínico, a avaliação de perda de peso, mesmo usando o critério subjetivo de auto-avaliação, não foi significante em ambos os grupos, o que indica, de modo indireto, que não havia doenças consuntivas nos grupos. Indagou-se a ingestão etílica habitual (de maneira regular, contudo, sem chegar aos critérios de alcoolismo da OMS) e ingestão de medicamentos. A primeira por se suspeitar que o uso habitual de álcool possa interferir em testes de absorção e permeabilidade intestinal. A segunda por se saber que várias drogas interferem nestes testes, como demonstrado em estudos anteriores.

A presença da diarréia foi mais significativa no grupo com intolerância a lactose (casos) ($p=0,004$), o que é já comprovado, porquanto a deficiência enzimática digestiva acarreta alterações da absorção, motilidade, pH fecal e fermentação bacteriana.

Os valores da dosagem sérica da creatinina, como parâmetro de função renal, foram discretamente mais elevados nos controles do que nos casos ($p=0,016$); mas isto não representa insuficiência renal, já que os valores absolutos para cada caso estão na faixa de normalidade para o método empregado, bem como a inclusão de pessoas acima dos 50 anos, faixa etária na qual a creatinina tende a ser mais elevada, pode ter contribuído para este resultado ou mesmo o estado de hidratação individual de cada paciente.

O teste de tolerância a lactose, a que foram submetidos todos os voluntários previamente, foi capaz de distinguir os casos e os controles, na curva de tolerância a lactose, portanto de acordo com o protocolo de estudo estabelecido.

Como se verificou nos resultados, em adultos, com (casos) e sem (controles) deficiência de lactase, a curva de excreção do manitol, isoladamente, não foi suficiente para

identificar pacientes com deficiência de lactase (p=0,3511). A curva de excreção da lactose também não se mostrou boa preditora de deficiência de lactase (p=0,1317), talvez pela pequena quantidade utilizada e número de amostragem reduzido.

Quando se avaliou, no entanto, a excreção da lactulose, isoladamente, não houve diferença significante entre o grupo de casos e controles normais (p=0,1030), para uma área da curva de ROC de 0,6105, com um IC de 95%, sendo LI 0,4721 e LS 0,7490.

Avaliando-se a correlação entre o percentual de excreção da lactulose/manitol, viu-se que esta correlação não é um fator preditivo positivo para o diagnóstico de intolerância a lactose, com valor de p=0,0926, para uma área da curva de ROC 0,6225, ep=0,071, com IC de 95% e LI de 0,4852 e LS de 0,7599, tendo, portanto, sensibilidade de 61,76% e especificidade de 60,00%. É válido inferir que, quando existe intolerância a lactose, há simultaneamente alterações das vias de absorção celular e paracelular, sendo esta correlação útil no diagnóstico da intolerância a lactose.

De forma secundária, mas importante, foi quando se fez a estratificação da correlação de excreção lactulose/manitol e excreção da lactulose com e sem ingestão etílica habitual. A excreção da lactulose, quando não existe ingestão etílica habitual, não foi fator preditivo de intolerância a lactose, com valor de *p*=0,0876. Nos casos com ingestão etílica, porém, não se mostrou fator preditivo (*p*=0,2676).

O mesmo ocorreu na correlação da excreção lactulose/manitol; se há ingestão etílica habitual, a correlação não é bom fator preditor de intolerância a lactose (*p*=0,1104). Se não há, porém, ingestão etílica habitual, também não é um fator preditor (*p*=0,0943). Pode-se inferir que, ao se utilizar este tipo de teste, não se deve levar em consideração se há ou não ingestão etílica habitual, pois isto não determina modificações no resultado do teste.

A avaliação da excreção de sacarose, quando existe ingestão etílica nos casos e controles, não mostrou diferença significativa (*p*=0,6916); se não há ingestão etílica, também não se mostrou significativa (*p*=0,1243). A correlação da excreção sacarose/manitol não revelou valores preditivos positivos (*p*=0,6916 com ingestão etílica) e (*p*=0,1420 sem ingestão etílica) para o teste de normalidade p de Shapiro-Wilk.

O transporte paracelular através das junções celulares difere, em vários pontos, do transporte transcelular feito através das membranas celulares. Primeiro é exclusivamente passivo, dirigido por gradiente eletrosmótico produzido pelo transporte transcelular ou ingestão de uma refeição. Segundo, mostram uma seletividade e condutância idênticas em ambas as direções - mucosa e serosa (POWELL, 1981). Terceiro, embora o transporte transcelular seja altamente regulado, há controvérsias relativamente à regulação fisiológica aguda do transporte paracelular. As propriedades variáveis do transporte paracelular, entre diferentes epitélios, incluem condutância elétrica, seletividade de cargas, seletividade a solutos sem carga e discriminação no tamanho molecular (VAN ITALIE; ANDERSON, 2004).

Acredita-se que as junções celulares são uma barreira perfurada por poros aquosos. Estudos iniciais demonstraram que a permeabilidade para moléculas hidrofílicas não eletrolíticas é inversamente proporcional ao seu tamanho, dependendo das características de cada epitélio (7 a 15 Ä *radius*) (POWELL, 1981). Isto sugere que a passagem molecular é restringida por poros de tamanhos definidos. A barreira é formada por uma rede de proteínas das células adjacentes, que se contatam no espaço intercelular. Diferentes números de fileiras e pontes cruzadas das proteínas são observadas em diferentes epitélios, embora as implicações fisiológicas desta organização sejam ainda pouco compreendidas (CLAUDE, 1978). É aceito, entretanto, o fato de que o número de conexões correlaciona-se à resistência elétrica através das junções celulares. A composição das proteínas de ligação é importante nestas propriedades juncionais celulares. Dado importante foi a contribuição de S. Tsukita e seu grupo, quando demonstraram que as proteínas ditas claudinas são as responsáveis pela adesão célula a célula (FARUSE et al., 1998; FARUSE et al., 2001).

As modificações nos resíduos extracelulares da claudina-15 converte o poro cátion seletivo em poro ânion seletivo (COLEGIO et al., 2002). Isto corrobora o achado deste ensaio, pois, quando há alteração dos poros celulares, induzidos por deficiência de lactase, ingestão etílica ou ambas, a passagem transmembrânica dos açúcares está alterada.

Estudos recentes demonstram a interferência de vários fatores na barreira funcional intestinal. Os diversos mecanismos ainda não são totalmente esclarecidos. Em estudo utilizando células Caco-2, contudo, acopladas ao receptor 1 e 2 do fator necrotizante tumoral humano, na colite induzida do rato, com células T $CD4^{+}$, foi associada a um aumento

da expressão e atividade da cadeia leve da miosina quinase.e fosforilação da cadeia leve da miosina reguladora II, como também a rotura das junções intercelulares (WANG et al., 2006). Estes dados corroboram os achados de que modificações das proteínas de junções celulares acarretam disfunções na barreira epitelial intestinal.

Outro importante estudo mostrou a interação da glia intestinal e com a barreira funcional intestinal. A ablação transgênica da glia do rato causa disfunção da barreira funcional intestinal e inflamação. O derivado glial s-nitrosoglutatião é capaz de restituir a barreira funcional intestinal. Os dados indicam que a glia entérica participa ativamente na manutenção da barreira fucional intestinal, regulando a permeabilidade epitelial (SAVIDGE et al., 2007).

Receptores transmembrânicos participam ativamente da preservação das junções celulares e são fundamentais no reconhecimento microbiano e controle da resposta imune nativa do intestino. Cario et al. mostraram que o receptor-como-ferramenta-2 (TLR2) estimula e preserva as junções celulares no intestino submetido a estresse no modelo de cultura de células da linhagem Caco-2 na colite induzida do rato selvagem. Advogam o argumento de que o TLR2 é um alvo farmacêutico na modulação da lesão e inflamação intestinal (CARIO et al., 2007).

Dalton et al. estudaram a função dos linfócitos intraepiteliais γδ+ na manutenção da integridade das junções epiteliais intestinais em resposta a infecção por *Salmonella typhimurium*. Utilizaram culturas recombinantes de *Toxoplasma gondii* que depletam a população de linfócitos intraepiteliais intestinal. No rato deficiente de linfócitos intraepiteliais γδ+, a função da barreira epitelial e a capacidade de restrigir a transmigração do toxoplasma e da bactéria patogênica intracelular Salmonella estão severamente comprometidos. A ruptura epitelial no rato deficiente de linfócitos intraepiteliais γδ+ está associada com a ausência de fosforilação do resíduo serina das claudinas e perda da claudina-3 na zônula ocludente-1 do complexo das junções celulares (DALTON at al., 2006).

Estudo que compara a secreção urinária de um conjunto de açúcares, rafinose, lactose, sacarose e manitol, (HESSELS J. at al., 2003) calculou as percentagens de excreção urinária e a taxa % de excreção de rafinose/manitol, lactose/rafinose e sacarose/rafinose. Os autores utilizaram o teste em 39 voluntários sadios, estabelecendo a média percentual de

recuperação da dose ingerida de 0,005-0,015, 0,13-0,63, e 0,09-0,47, respectivamente. Aplicaram também este teste de absorção de açúcares em três grupos de pacientes – 109 casos com sintomas gastrointestinais inespecíficos – e compararam com biopsia duodenal, correlacionando com o grau de dano mucoso; a sensibilidade e especificidade da taxa de excreção da rafinose/manitol foram de 93% e 91%, respectivamente, na detecção de dano duodenal. Em 70 pacientes com teste de tolerância a lactose positivo, a taxa % de excreção da lactose/rafinose propocionou elevada acurácia diagnóstica de hipolactasemia (sensibilidade de 81% e especificidade de 89%). Em 40 pacientes com pequena lesão mucosa localizada (doença de Crohn do íleo=21; doença celíaca com prova histológica=19); a taxa % de excreção rafinose/manitol estava aumentada em 100% dos pacientes com doença celíaca e 81% doas pacientes com doença de Crohn; aumento da taxa% de excreção de lactose/rafinose (hipolactasemia) e sacarose/rafinose (hiposacarosemia) estava presente em 89% e 95% dos pacientes com doença celíaca e 19% e 0% dos pacientes com doença de Crohn, respectivamente. Concluíram que a taxa % de excreção de rafinose/manitol e sacarose/rafinose parece ser um indicativo da distribuição da lesão mucosa intestinal.

Um teste semelhante ao deste experimento foi utilizado por Koetse (KOETSE, H. A., et al., 2006) para avalição do dano mucoso e permeabilidade intestinal em 7 pacientes sem intolerância a lactose e 8 pacientes com intolerância a lactose. Os pesquisadores utilizaram 25 g 13C-lactose, 0,5 g de 2h-glucose, 5 g de lactulose e 1 g de L-ramnose. Utilizaram a técnica de cromatografia de gás/combustão/média isotópica de espectrometria de massa e a determinação urinária de açúcares por cromatografia de gás. Houve uma correlação significante entre a taxa de excreção urinária de lactose/lactulose de 10 horas entre maus digestores de lactose e bons digestores de lactose. Na correlação da taxa de excreção urinária de lactulose/ramnose, não houve diferença entre os grupos.

Pode-se inferir que o complexo juncional celular do intestino exerce papel relevante na manutenção da homeostase intestinal. Suas alterações têm implicações importantes na fisiologia e fisopatologia das enfermidades digestivas. Testes que avaliem estas alterações podem contribuir para entendimento das implicações clínicas decorrentes, inerentes à ruptura da barreira mucosa funcional intestinal.

A perspectiva atual é de que testes cada vez mais sensíveis, específicos, de custo compatível e de fácil execução, possam substituir avaliações invasivas, caras, de pouca

exequibilidade clínica, avaliando globalmente a função absortiva mucosa. Isto permitirá entender melhor esta capacidade mucosa no paciente sadio e enfermo, inferindo as causas e seus mecanismos. Poder-se-á não só tratar o fator causal, mas também introduzir, na prática da clínica, fatores capazes de induzir uma recuperação mucosa de forma eficiente.

8 CONCLUSÕES

a) A determinação da excreção urinária de açúcares pelo *HPLC-PAD*, *in vivo*, usando manitol, lactose, lactulose e sacarose, mostrou-se adequada.

b) O teste não invasivo diferencial da excreção múltipla de açúcares analisados é válido como parâmetro de avaliação funcional da mucosa intestinal.

c) Pode-se verificar que, quando há modificações na barreira funcional intestinal, induzidas pela intolerância a lactose, o teste de excreção diferencial de açúcares não é suficientemente sensível e específico para sua utilização clínica.

d) O teste de excreção diferencial de açúcares foi capaz de identificar modificações da barreira funcional intestinal quando há deficiência de lactase.

e) Quando existe história clínica de ingestão etílica habitual, este fator não induz a modificações da barreira mucosa capazes de interferir no resultado do teste diferencial de excreção de açúcares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AABAKKEN, L. Cr-Ethylenediaminetetraacetic acid absorption test: methodologic aspects. **Scand. J. Gastroenterol.,** v. 24, p. 351-358, 1989.

ABBOTT, NJ; RONNBACK, L; HANSSON, E. Astrocyte-endothelial interactions at the brain-blood barrier. **Nature Rev** 2006;7:41-53.

AINSWORTH, M.; ERIKSEN, J.; RASMUSSEN, J. W.; SCHAFFALITZKY-DE-MUCKADELL, O. B. Intestinal permeability of 51 Cr-labelled ethylenediaminetetra-acetic acid in patients with Crohn's diseases and their health relatives. **Scand. J. Gastroenterol.,** v. 24, p. 993-998, 1989.

ANDRE, F.; ANDRE, C.; EMMERY, Y.; FORICHON, J.; DESCOS, L.; MINAIRE, Y. Assessment of the lactulose-mannitol test in Crohn's disease. **Gut,** v. 29, n. 4, p. 511-515, Apr. 1988.

AROLA, H. Dignosis of hypolactasia and lactose malabsortion. **Scand. J. Gastroenterol. Suppl**., v. 202, p. 26-35, 1994.

AROLA, H.; TAMM, A. Metabolism of lactose in the human body. **Scand. J. Gastroenterol**. **Suppl.**, v. 202, p. 21-25, 1994.

BALDA, M. S.; MATTER, K. Epitelial cell adhesion and revolution of gene expression. **Trends Cell Biol.,** v. 13, p. 310-318, 2003.

BARRY, C.; BOULPAEP, E. L. Noneletrolyte permeability of the paracelllular pathway in Neturus proximal tubule. **Am. J. Physiol.,** v. 228, p. 581-595, 1975.

BAYLESS, T. M. Lactose intolerance in the adolescent. **J. Adolescent Health Care**, v. 3, p. 65-68, 1982.

BALLABH, P; BRAUN, A; NEDERGAARD, M. The blod-brain barrier: an overview. Structure, regulation and clinical aplications. **Neurobiol Dis** 2004;16:1-13.

BEAN, J. R.; FONTAINE, O.; GARENNE, M. Monagement of malnounished children with acute diarrhoer and sugar intolerance**. J. Trop. Pediatr**., v. 36, p. 86-89, 1990.

BEIGUELMAN, B.; SEVE-PEREIRA, A. Deficiência de lactase intestinal e intolerância ao leite. **Ciênc. Cult.**, v. 35, p. 722-734, 1983.

BENJAMIN, M. A. ; McKAY, D. M.; YANG, P. C.; CAMERON, H.; PERDUE, M. H. Glucagon-like peptide-2 enhances intestinal epithelial barrier function of both transcellular and paracellular pathways in the mouse. **Gut,** v. 47, n. 1, p. 112-119, July 2000.

BERN, C.; MARTINES, J.; DE ZOYSA, I.; GLASS, R. I. the magnitude of the global problem of diarrheal disease: a ten-year update. **Bull. World Health Organ**., v. 70, p. 705-714, 1992.

BERNS, K. J.; HAUSWITH, W. W. Adeno-associated viruses. **Adv. Virus Res.,** v. 25, p. 407-409, 1979.

BJARNASON, I.; PETERS, T. J.; VEALL, N. A. Persistent defect in celiac disease demonstrated by a Cr-labelled EDTA absortion test. **Lancet**, v. 1, n. 8320**,** p. 323-325, Feb. 1983.

BJARNASON, I. ; ZANELLI, G. ; PROUSE, P. ; WILLIAMS, P.; GUMPEL, M. J.; LEVI, A. J. Effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on the human small intestine. **Drugs,** v. 32, suppl 1, p. 35-41, 1986.

BJERKNES, M.; CHENG, H. Modulation of specific intestinal epithelial progenitors by enteric neurons. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A,** v. 98, n. 22, p. 12497-12502, Oct. 2001.

BODLAJ, G.; STOCHER, M.; HUFNAGL, P.; HUBMANN, R.; BIESENBACH, G.; STEKEL, H.; BERG, J. Genotyping of lactase-phlorizin hydrolase - 13910 polymorphism by LigthCycler PCR and implications for the diagnosis of lactose intolerance. **Clin. Chem**., v. 52, n. 1, p. 148-151, Jan. 2006.

BOND, J. H.; LEVITT, M. D. Use of pulmonary by drogen (H_2): Measure ments to quantitative carbohydrate absortion. **J. Clin. Invest**., v. 51, p. 1219-1225, 1972.

BRASITUS, T. A.; DUDEJA, P. K.; WORMAN, H. J.; FOSTER, E. S. The lipid fluidity of rat colonic brush border membrane vesicles modulates Na:H exchange and osmotic water permeability. **Biochim. Biophys. Acta,** v. 855, p. 16-24, 1986.

BRUMMER, R. J. M.; KARIBE, M.; STOCKBRUGGER, R. W. Lactose mal absortion optimalization of investigational methods. **Scand. J. Gastroenterol**., v. 38, suppl. 200, p. 65-69, 1993.

BRUNSER, O.; REID A.; MONCKBERG, F.; MACCIONI. A.; CONTRERA, I. Jejunal biopsies in infantil malnutrion with special reference to mitotic index. **Pediatrics**, v. 38, n. 4, p. 605-612, Oct. 1966.

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

CALUDE, P. Morphological factors influencing transepithelial permeability: a model for the resistence of the zonula occludens. **J. Membr. Biol**., v. 39, p. 219-232, 1978.

CARIO,E; GERKEN, G; PODOLSKY, DK. Tool-like receptor 2 controls mucosal inflmmation by regulating epithelial barrier funtion. **Gastroenterology** 2007;132:1359-1374.

CASELLAS, F.; AGUADE, S.; SORIANO, B.; ACCARINO, A.; MOLERO, J.; GUARNER, L. Intestinal permeability to Tc diathylenetriaminopentaacetic acid in inflammatory bowel disease. **Am. J. Gastroenterol.,** v. 81, n. 9, p. 767-770, Sept. 1986.

CEREIJIDO, M.; PONCE, A.; GONZALEZ-MARISCAL, L. Tight junctions and apical/basolateral polarity. **J. Membr. Biol.,** v. 110, p. 1-9, 1988.

CHADWICK, V. S.; PHILLIPS, S. F.; HOFFMAN, A. F. Measurement of intestinal permeability using low molecular weight polyethylene glycols. **Gastroenterology,** v. 73, n. 2, p. 241-251, Aug. 1977.

CHANCE, W. T.; FOLEY-NELSON, T.; THOMAS, I.; BALASUBRAMANIAM, A. Prevention of parenteral nutrition-induced gut hypoplasia by coinfusion of glucagon-like peptide-2. **Am. J. Physiol**., v. 273, n. 2 pt1, p. G559-G563, Aug. 1997.

CHANCE, W. T.; SHERIFF, S.; FOLEY-NELSON, T.; THOMAS, I.; BALASUBRAMANIAM, A. Maintaining gut integrity during parenteral nutrition of tumor-bearing rats: effects of glucagon-like peptide 2. **Nutr. Cancer,** v. 37, n. 2, p. 215-222, 2000.

CHEN, L. C.; SCRIMSHAW, N. S. E. D. S. **Diarrhea and malnutrition**: interactions, mechanisms and intervention. New York, NY: Plenum Press, 1983. p.3-19.

CHENG, H.; BJERKNES, M. Clonal analysis of mouse intestinal progenitors. **Gastroenterology**, v. 116, p. 7-14, 1999.

CHENG, H.; LEBLOND, C. P. Origin, differenciation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. V. Unitarian theory of the origin of the four epithelial cell types. **Am. J. Anat.,** v. 141, p. 537-562, 1974.

CITI, S.; SABANAY, H.; JAKES, R.; GEIGER, B.; KENDRICK JONES, J. Cingulin, a peripheral component of tight junctions. **Nature,** v. 333, p. 272-276, 1988.

CLAYBURGH, DR; BARRETT, TA; TANG, Y; MEDDINGS, JB; Van ELDIK, LJ; WATTERSON, DM; CLARKE, LL; MRSNY, RJ; TURNER, JR. Epihtelial myosin ligtf chain kinase-dependent barrier dysfunction mediates T cell activation-induced diarrhea in vivo**. J Clin Invest** 2005; 166:2702-2715.

COBDEN, I.; DICKINSON, R. I.; ROTHWELL, J.; AXON, A. T. R. Intestinal permeability assessed by excretion rations of two moleculares: results in celiac disease. **Br. Med. J.,** v. 2, n. 6144, p.1060, Oct. 1978.

COBDEN, I.; HAMILTON, I.; TOTHWELL, J.; AXON, A. T. R. Cellobiose/mannitol test: physical proprieties of probe moleculares and influence of extraneus factores. **Clin. Chim. Acta**, v. 148, p. 53-62, 1985.

COBDEN, I.; ROTHWELL, L J.; AXON, A. T. R. Intestinal permeability and screening tests for celiac disease. **Gut,** v. 21, p. 512-518, 1980.

COLEGIO, O. R.; VAN ITALLIE, C. M.; MCCREA, H. J.; RAHNER, C.; ANDERSON, J. M. Claudins create charge-selective channels in the paracellular pathway between epithelial cells. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.,** v. 283, n. 1, p. C142-C147, July 2002.

COLTART, R. S.; HOWARD, G. C.; WRAIGHT, E. P.; BLEEHAND, N. M. The effect of hyperthemia and radiation on small bowel permeability using Cr-EDTA and C-Mannitol in man. **Int. J. Hyperthemia,** v. 4, p. 467-477, 1988.

COMMITTEE ON NUTRITION. The practical significance of lactose intolerance in children: supplement. **Pediatrics**, v. 62, n. 2, p. 240-245, Aug. 1978. Disponivel em: <http://pediatrics.aappublications.org/cgi/content/abstract/62/2/240>. Acesso em: 31 July 2007.

COOK, G. C.; MENZIES, I. S. Intestinal absorption and unmediated permeation of sugars in post-infective tropical malabsorption (tropical sprue). **Digestion**, v. 33, p. 109-116, 1986.

COOPER, B. T.; UKABAM, S. O.; O'BRIEN, I. A.; HARE, J. P.; CORRALL, R. J. Intestinal permeability in diabetic diarrhea. **Diabetic Med.,** v. 4, p. 49-52, 1987.

CRITTENDEN, R. G.; BENNETT, L. E. Cow's Milk Allergy: a complex disorder. **J. Am. Coll. Nutr.,** v. 24, n. 6 Suppl, p. 582S-591S, Dec. 2005.

DAHLQVIST, A. Assay of intestinal dissacaridases. **Scand. J. Clin. Lab. Invest**., v. 44, p.169-172, 1984.

DAHLQVIST, A. Method for assay of intestinal disaccharidases. **Anal. Biochem.,** v. 7, p. 18-25, 1964.

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, Oct. 1963.

DALTON, J.E.; CRUICKSHANK, S. M.; EGAN, C. E.; MEARS, R.; NEWTON, D. J.; ANDREW, E. M.; LOWRENCE, B.; HOWEL, G.; ELSE, K. J.; GUBBELS, MJ.; STRIEPEN, B.; SMITH, J. E.; WHITE, S. J.; CARDING, S. R. Intraeithelial γδ+ lymphocytes maintain the integrity of intestinal epithelial tight junctions in response to infection. **Gastroeterology** 131:818-829, 2006.

D'ATRI, F.; CITI, S. Molecular complexity of vertebrate tigth juntions. **Mol. Membr. Biol.,** v. 19, p. 103-112, 2002.

DAVIS, G.; SANTA ANA, C.; MORAWSKI, S.; FORDTRAN, J. Permeability characteristics of human jejunum, ileum, proximal colon and distal colon: results of potecial difference measurements and unidirectional fluxes. **Gastroenterology,** v. 83, p. 844-850, 1982.

DELAHUNTY, T.; HOLLANDER, D. A new liquid-chromatographic method for measuring polythylene glycol in urine. **Clin. Chem.,** v. 32, p. 351-353, 1986.

DIAMOND, J. M. Channels in epithelial cell membranes and junctions. **Fed. Proc**., v. 37, p. 2639-2644, 1978.

DIONEX Corporation. **Analysis of carbohydrates by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAE-PAD).** 2000. (Technical Note 20). Disponivel em:< http://www.dionex.com.cn/technic/Afiles/TN20.PDF>. Acesso em: 31 July 2007.

DRUCKER, D. J.; ERLICH, P.; ASA, S. L.; BRUBAKER, P. L. Induction of intestinal epithelial proliferation by glucagon-like peptide 2. **Proc. Natl. Acad. Sci.USA**, v. 93, n. 15, p. 7911-7916, July 1996.

DUFFEY, M. E.; HAINAN, B.; HO, S.; BENTSEL, C. J. Regulation of epithelial tigh junction permeability by cyclic AMP. **Nature,** v. 294, p. 451-453, 1981.

DURING, M. J.; XU, R.; YOUNG, D.; KAPLITT, M. G.; SHERWIN, R. S.; LEONE, P. Peroral gene therapy of lactose intolerance using an aden-associated virus vector. **Nat. Med.,** v. 4, n. 10, p. 1131-1135, Oct. 1998.

ELIA, M.; BEHRENS, R.; NORTHROP, C.; WRAIGHT, P.; NEALE, G. Evalution of mannitol, lactulose and Cr-labelled ethylenediaminotetra-acetate as markers of intestinal permeability in man. **Clin. Sci. (Lond.),** v. 73, n. 2, p. 197-204, Aug. 1987.

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, Feb. 2002.

FARMER, R.; MICHENER, W. Prognosis of Crohn's disease in childhood and adolescence. **Dig.Dis.Sci.,** v. 24, p. 752, 1979.

FARQUHAR, M. G.; PALADE, G. E Junctional complexes in various epithelia. **J. Cell Biol.,** v. 17, p. 375-412, 1963.

FLEMING, S. C.; KAPENBWA, M. S.; LAKER, M. F.; LEVIN, G. E.; GRIFFIN, G. E. Rapid and simultenous determination of lactulose and manitol in urine, by HPLC with pulsed amperometric detection for use in studies of intestinal permeability. **Clin. Chem**., v. 36, p. 797-799, 1990.

FORDTRAN, J. S. Stimulation of active and passive sodium absortion by sugars in the human jejunum. **J. Clin. Invest.,** v. 47, p. 728-737, 1975.

FORDTRAN, J. S.; RECTOR, F. C.; EWTON, M. F.; SOTER, N.; KINNEY, J. Permeability characteristics of the humam small intestine. **J. Clin. Invest.,** v. 44, p. 1935-4944, 1965.

FROMTER, E.; DIAMOND, J. Route of passive ion permeation in ephitelia. **Nature New Biol.,** v. 235, p. 9-13, 1972.

FURUSE, M.; FUJITA, K.; HIIRAGI, T.; FUJIMOTO, K.; TSUKITA, S. Claudin -1 and -2: a novel integral membrane proteins localizing at tigth juntions with no sequence similarity to occluding. **J. Cell Biol.,** v. 141, p. 1539-1550, 1998.

FURUSE, M.; FURUSE, K.; SASAKI, H.; TSUKITA, S. Conversion of zonulae occludentes from tigth to leaky strand type by introducing claudin-2 into Madi-Darby canine kidney I cells. **J. Cell Biol.,** v. 153, n. 2, p. 263-272, Apr. 2001.

GRAY, G. M.; SANTIAGO, N. Disacharidase absortion in normal and diseased human intestine. **Gastroenterology**, v. 51, p. 489-498, 1966.

GRYBOSKY, J. D.; THAYER, W. R.; GABRIELSON, I. W.; SPIRO, H. M. Disacchariduria in gastrointestinal disease. **Gastroenterology,** v. 45, p. 633-637, 1963.

HAMMOND, I. B. ; LITMANN, A. Dissacharide mal absortion. ln: BERK, J. E.; HAUBRICH, W. S.; KALSER, M. H.; ROTH, J. L. A.; SCHAFFNER, F. (Ed.). **Bockus gastroenterology.** 4th ed. Philadelphia: Sanders, 1985. p. 1703-1717.

HE, T.; PRIEBE, M. G.; HARMSEN, 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, Jan. 2006.

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

HEITLINGER, L. A.; LEE, P. C.; BROCKS, S. P. Human amylase: identification of pancreatic salivary and mammary amylase in duodenal fluids. **Gastroenterology**, v. 82, p. 105, 1982.

HEITLINGER, L. A.; ROSSI, T. M.; LEE, P. C.; LEBENTHAL, E. Human intestinal disacharidase activitres: correlations with age, biopsy techinique and degree of villou atrophy. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.,** v. 12, n. 2, p. 204-208, Feb. 1991.

HOBER, R. Ueber resorption im darm. **Plugers Arch. Gesamte Physiol. Menschen Tiere,** v. 56, p. 199-214, 1901.

HOBER, R.; HOBER, J. Experiments on the absorption of organic solutes in the small intestine of rats. **J. Ceil. Comp. Physiol.,** v. 10, p. 401-410, 1937.

HOLLANDER, D.; RICKETTS, D.; BOYD, C. A. R Importance ofprobe molecular geometry in determining intestinal permeability. **Can. J. Gastroenterol.,** v. 2, suppl. A, p. 35-38, 1988.

HOLLANDER, D.; VADHEIM, C. M.; BRETTHOLZ, E.; et al. Increased intestinal permeability in patients with Crohn's diseases and their relatives. A possible etiologic factor. **Ann. Intern. Med.,** v. 105, n. 6, p. 883-885, Dec. 1986.

HÖCKER, M.; WIEDENMANN, B. Molecular mechanisms of enteroendocrine differentiation. **Ann. N Y Acad. Sci**., v. 859, p. 160-174, Nov. 1998.

JACKSON, P. G.; LESSOF, M. H.; BAKER, R. W.; FERRETT, J.; MACDONALD, D. M. Intestinal permeability in patients with eczema and food allergy. **Lancet,** v. 1, n. 8233, p. 1285-1286, June 1981.

JENKINS, A. P.; TREW, D. R.; CRUMP, B. J.; NUKAJAM, W. S.; FOLEY, J. A.; MENZIES, I. S.; CREAMER, B. Do non-steroidal antinflammatory drugs increase colonic permeability? **Gut,** v. 32, n. 1, p. 66-69, Jan. 1991.

JENKINS, R. T.; GOODACRE, R. L.; ROONEY, P. J.; BIENENSTOCK, J.; SIVAKUMARAN, T.; WALKER, W. H. Studies of intestinal permeability in inflammatory diseases using polyethylene glycol 400. **Clin. Biochem.,** v. 19, n. 5, p. 298-302, Oct. 1986.

JENKINS, R. T.; RAMAGE, J. R.; JONES, D. B.; COLLINS, S. M.; GOODACRE, R. L.; HUNT, R. H. Small bowel and colonic permeability to Cr-EDTA in patients with active inflammatory bowel disease. **Clin. Invest. Med.,** v. 11, n. 2, p. 151-155, Apr. 1988.

JOHNSON, D. C.; LaCOURSE, W. R. Liquid chromatography with pulsed electrochemical detection at gold and platinum electrodes. **Anal. Chem**, v. 62, p. 589A-597A, 1990.

JUBY, L A. D.; ROTHWELL, J.; AXON, A. T. R. Lactulose/mannitol test: na ideal agree test for coeliac disease. **Gastroenterology,** v. 96, p. 79-85, 1989.

KAPLITT, M. G.; LEONE, P.; SAMULSKI, R. J.; XIAO, X.; PFAFF, D. W.; O'MALLEY, K. L.; DURING, M. J. Long-term gene expression and phenotipic correction using adeno-associated virus vector in the mamalian brain. **Nat. Gen**., v. 8, n. 2, p. 148-154, Oct. 1994.

KUOKKANEN, M.; MYLLYNIEMI, M.; VAUHKONEN, M.; HELSKE, T.; KAARIAINEN, I.; KARESVUORI, S. et al. A biopsy-based quisk test in the diagnosis of duodenal hypolactasia in upper gastrointestinal endoscopy. **Endoscopy**, v. 38, n. 7, p. 708-712, July 2006.

KUPER, R.; KROPELIN, S. Climate-controlled holocene ocupation in the Sahara: motor of Africa's evolution. **Science**, v. 313, n. 5788, p. 803-807, Aug. 2006.

LAKER, M. F.; MENZIES, I. S. Increase in humam intestinal permeability following following ingestion of hypertonic solutions. **J. Physiol.,** v. 265, n. 3, p. 881-894, Mar. 1977.

LEVITT, M. D. Carboydrate assimilation. In: BERK, J. E.; HAUBRICH, W. S.; KALSER, M. H.; ROTH, J. L. A.; SCHAFFNER, F. (Ed.). **Bockus gastroenterology.** 4th ed. Philadelphia: Sounders, 1985. p. 1520-1530.

LEVITT, M. D. Production and excretion of hydrogen in man. **N. Engl. J. Med**., v. 281, n. 3, p. 122-127, July 1969.

LIFSCHITZ, C. H.; MAHONEY, D. H. Low dose methotrexate induced chages in intestinal permeability determined by polyethylene glycol polymers. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.,** v. 9, p. 301-306, 1989.

LIMA, A. A. M.; GUERRANT, R. L. Persistent diarrhea in children: Epidemiologic, risck factors, pathophysiology, nutritional impact and management. **Epidemiol. Rev.,** v. 14, p. 222-242, 1992.

LIMA, A. A.; MOORE, S. R.; BARBOZA JUNIOR, M. S.; SOARES, A. M.; SCHLEUPNER, M. A.; NEWMAN, R. D. et al. Persistent diarrhea signals: critical period of increased diarrhea burden and nutritional shortfalls: a prospective cohort study among children in North east Brazil. **J. Infect. Dis.,** v. 181, n. 5, p. 1643-1651, May 2000.

LIMA, A. A.; SILVA, T. M.; GIFONI, A. M.; BARRETT, L. J.; MCAULIFFE, I. T.; BAO, Y. et al. Mucosal injury and disruption of intestinal barrier function in HIV-infected individuals with and without diarrhea and cryptosporidiosis in northeast Brazil. **Am. J. Gastroenterol.,** v. 92, n. 10, p. 1861-1866, Oct. 1997.

LISTER, M.A. Letter. **Philos. Trans. R. Soc. Lond.,** v. 8, p. 6060-6065, 1873.

MA, T. Y.; HOLLANDER, D.; KRUGLIAK, P.; KATZ, K. PEG-400, a hydrophic molecular probe for measuring intestinal permeability. **Gastroenterology,** v. 98, p. 39-46, 1990.

MaCAULAY, V.; HILL, C.; ACHILLI, A.; RENGO, C.; CLARKE, D.; MEEHAN, W. Single, rapid coastol settlement of Ásia revealed by analysis of complete mitochondrial genomes. **Science**, v. 308, n. 5724, p. 1034-1036, May 2005.

McCANCE, R. A.; MADDERS, K. Comparative rates of absorption from human intestine. **Biochem. J.,** v. 24, p. 795-804, 1930.

McDERMOTT, F.; GRÜN, R.; STRINGER, C. B.; HAWKESWORTH, C. J. Mass-spectrometric U-series dotes for Israeli Neanderthal/early modern hominid sites. **Nature**, v. 363, n. 6426, p. 252-255, 1993.

McDOUGALL, I.; FLEAGLE, J. G. Stratigraphic placement and age of modern humans from Kibish, Etuiopia. **Nature**, v. 433, p. 726-733, 2005.

MADARA, J. L. Intestinal absorptive cell tight junctions are linked to the cytoskeleton. **Am. J. Physiol.,** v. 253, p. C 171-C175, 1987.

MADARA, J. L.; PARKOS, C.; COLGAN, S.; NUSRAT, A.; ATISOOK, K.; KAOUTZANI, P. The movement of solutes and cells acros tight junctions. **Ann. N. Y. Acad. Sci.,** v. 664, p. 47-60, 1992.

MADARA, J. L.; RIER, J. S. Funtional morpholgy of the mucosa of the small intestine. In: JONSON, L. R. (Ed.). **Physiology of the gastrointestinal tract**. 3rd ed. New York: Raven, 1994. p. 1577-1622.

MADARA, J. L.; STAFFORD, J. Interferon-gamma directly affects barriers function of culture intestinal epithelial monolayers. **J. Clin. Invest.,** v. 83, p. 724-727, 1989.

MARCIAL, M.A.; CARLSON, S.L.; MADARA, J.L.. Partitioning of paracellular conductances along the ileal crypt-villus axis: a hypothesis based structural analysis with detailed consideration to tight-junction structure – function relationships. **J. Membr. Biol.** 80:59-70, 1984

MARTINES, D. ; MORRIS, A. I. ; GILMORE, I. T. ; WILLIAMS, A.; STOCKDALE, H.; CRITCHLEY, M.; SMITH, G. A.; BILLINGTON, D. Comparision between cellobiose/mannitol and 51Cr-labeled ethylenediaminetetra-acetate absortion tests in the detection of coliac disease. **Clin. Sci.,** v. 75, n. 4, p. 375-378, 1988.

MAXTON, D. G.; BJARNASON, I.; REYNOLDS, A. P.; CATT, S. D.; PETERS, T. J.; MENZIES, I. S. Lactulose, Cr-labelled ethylenediaminetetra-acetate, L-rhamnose and polyethyleneglycol 400 as probe marks for assessment in vivo of human intestinal permeability. **Clin. Sci.,** v. 71, n. 1, p. 71-80, 1986.

MAXTON, D. G.; CATT, S. D.; MENZIES, I. S. Combined assessment of intestinal disaccharide excretion. **J. Clin. Pathol.,** v. 43, p. 206-409, 1990.

MEDDINGS, J. B. Lipid permeability of the intestinal microvillus membrane may be modulated by membrane fluidity in the rat. **Biochim. Biophys. Acta,** v. 984, p.158-166, 1989.

MENZIES, I. S. Absortion of intact oligosaccharide in health and disease. **Biochem. Soc. Tans.,** v. 2, p. 1024-1027, 1974.

MENZIES, I. S. Alimentary disachariduria in adults related to the osmolality of ingested solution. **Biochem. J.,** v. 126, p.19-20, 1972.

MENZIES, I. S. Transmucosal passage of inert molecules in health and disease. In: SKADHAUGE, E.; HEINTZE, K. (Ed.). **Intestinal absorption and secretion**. Lancaster: MTP, 1983. p. 27-543. (Falk Symposium, 36).

MENZIES, I. S.; JENKINS, A. P.; HEDUAN, E.; CATT, S. D.; SEGAL, M. B.; CREAMER, B. The effect of poorly absorbed solute on intestinal absortion. **Scand. J. Gastroenterol.,** v. 25, n. 12, p. 1257-1264, 1990.

MENZIES, I. S.; LAKER, M. F.; POUNDER, R. E.; BULL, J.; HEYER, S.; WHEELER, P. G.; CREAMER, B. Abnormal intestinal permeability to sugars in villous atrophy. **Lancet,** v. 2, n. 8152, p. 1107-1109,1979.

MILKS, L. C.; BRONTOLI, M. J.; CRAMER, E. B. Ephitelial permeability and the transpithelial migration of human neutrophils. **J. Cell. Biol.,** v. 96, p. 1241-1247, 1986.

MOORE, R.; CARLON, S.; MADARA, J. L. Villus contraction aids repair of intestinal ephitelium after injury. **Am. J. Physiol.,** v. 357, p. G274-G283, 1989.

MULLIN, J. E.; O'BRIEN, T. G. Effects of tumour promoters on LLC-PK renal ephithelial tight Junctions and transepithelial fluxes. **Am. J. Physiol.,** v. 251, p. C597-C602, 1986.

NAFTALIN, R. J.; TRIPATHI, S. Passive water flows draw across rabbit ileum by osmotic, hydrostatic and electrical gradients. **J. Physiol.,** v. 360, p. 27-50, 1985.

NELL, G.; RUMMELL, W.; WANITSCHKE, R. Characterization of the paracellular pathway by test moleculares in the colonic mucosa. In: KRAMER, H. (Ed.). **Intestinal permeation**. Amsterdam: Excerpta Medica**,** 1977. p. 413-418. (Hoeschst Workshop, 4).

NICHOLS, L. N.; AVERY, S. E.; KARNSAKUL, W.; JAHOOR, F.; SEN, P.; SWALLOW, D. M. et al. Congenital maltase-glycoamilase deficiency associated with lactase and sucrase deficiencies. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr**., v. 35, n. 4, p. 573-579, Oct. 2002.

NOONE, C.; MENZIES, I. S.; BABATVALA, J. E.; SCOPES, J. W. Intestinal permeability and lactose hydrolysis in human rotaviral gastroenteritis assessed simultaneously by non-invasive differential sugar permeation. **Eur. J. Clin. Invest.,** v. 16, n. 3, p. 217-225, 1986.

NUSRAT, A.; TURNER, J. R.; MADARA, J. L. Molecular physiology and pathophysiology of tigth juntions. IV. Regulation of tight junctions by extracellular stimulic butrients, cytokines, and immune cells. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.,** v. 279, n. 5, p. G851-G857, 2000.

OSTERHOUNT, W. J. V. The permeability of protoplasm to íons and the theory of antagonism. **Science,** v. 35, p. 112-115, 1912.

OSTERLUND, P.; RUOTSALAINEN, T.; PEUHKURI, K.; KORPELA, R.; OLLUS, A.; IKONEN, M.; JOENSUU, H.; ELOMAA, I. Lactose intolerance associated with adjuvant 5-fluorouracil-based chemotherapy for coloretl cancer. **Clin. Gastroenterol. Hepatol**., v. 2, n. 8, p. 696-703, Aug. 2004.

PACHECO, S.; HILLIER, K.; SMITH, C. Increased arachidonic acid levels in phospholipids of human colonic mucosa in inflammatory bowel disease. **Clin. Sci.,** v. 73, p. 361-364, 1987.

PALANT, C. E.; DUFFY, M. E.; MOOKERJEE, B. K. S.; BENTZEL, C. J. Ca++ regularation of tight junction permeability and structure in necturus gallbladder. **Am. J. Physiol.,** v. 245, p. C203-C212, 1983.

PAPPENHEIMER, J. R. Paracellular intestinal absorption of glucose, creatinine and mannitol in normal animals: relation to body size. **Am. J. Physiol.,** v. 59, p. G290-G299, 1990.

PAPPENHEIMER, J. R.; RENKIN, E. M.; BORRERO, L. M. Filtration, diffusion and molecular seiving throught capillary membranes. A contribution to the pore theory of capillary permeability. **Am. J. Physiol.,** v. 167, p. 13-46, 1951.

PEARSON, A. D. J.; EASTHAM, E. J.; LAKER, M.; CRAFF, A. V.; NELSON, R. Intestinal permeability in children with Crohn's disease and coeliac disease. **Br. Med. J.,** v. 285, n. 6334, p. 20-21, 1982.

PHILIPSEN, E. K.; BATSBERG, W.; CHRISTENSEN, A. B. Gastrointestinal permeability to polyethylene glycol: an evaluation of urinary recovery of an oral load of polyethylene glycol as a parameter of intestinal permeability in man. **Eur. J. Invest.,** v. 18, p. 139-145, 1988.

PIGNATA, C.; BUDILLON, G.; MONACO, G.; NANI, E.; CUOMO, R.; PARRILLI, G.; CICCIMARRA, F. Jejunal bacterial overgrowth and intestinal permeability in children with immunodeficiency syndromes. **Gut,** v. 31, n. 8, p. 879-882, 1990.

PALYFORD, R. J.; BELO, A.; POULSOM, R.; FITZGERALD, A. J.; HARRIS,K.; RYON, J.; PAWLUCZYK, J. R.; DARBY, T.; NILSEN-HAMILTON, M.; GHOSH, S.; MARCHBANK, T. Efects of mouse and human lipocalin homologues 24p3/Icn2 and neutrophil gealtinase-associated lipocalin on gastrointestinal mucosal integrity and repair. **Gastroenterology** 131:809-817, 2006

POTTEN, C. S. Stem cells in gastrointestinal epithelium: numbers, characteristics and death. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci**., v. 353, n. 1370, p. 821-830, 1998.

POWELL, D. W.; MIFFLIN, R. C.; VALENTICH, J. D.; CROWE, S. E.; SAADA, J. I.; WEST, A. B. Myofibroblasts. II. Intestinal subepithelial myofibroblasts. **Am. J. Physiol.,** v. 277, p. 2 pt 1, p. C183-201, 1999.

POWELL, D. W. Barrier function of epithelia. **Am. J. Physiol.,** v. 241, n. 4, p. G275-G288, 1981.

RADTKE, F.; CLEVERS, H. Self-renewal and cancer of the gut: two sides of a coin. **Science**, v. 307, n. 5717, p. 1904-1909, 2005.

REED, R. A.; IISHKOFF, S. A. African human diversity, origins and migrations. **Curr. Opin. Gen. Dev**., v. 16, p. 597-605, 2006.

REID, E. W. Report on experiments upon absorption without osmosis. **Br. Med. J.,** v. 1, p. 323-326, 1892.

RUMESSEM, J. J. Fructose and food related carbohydrates Sources, intake, absorption, and clinical implications. **Scand. J. Gastroenterol., v. 27**, p. 819–828, 1992.

RYBOLT, A. H.; BENNETT, R. G.; LAUGHON, B. E.; THOMAS, D. R.; GREENOUGH, W. B.; BARTLETT, J. G. Protein-losing enteropathy associated with *Clostridium difficile* infection. **Lancet,** v. 1, n. 8651, p. 1343-1355, 1989.

SAHI, T. ; ISOKOSKI, M. ; JUSSILA, J.; LAUNIALA, K.; PYÖRÄLÄ, K. Recessive inheritance of adult-type lactose malabsortion. **Lancet,** v. 2, n. 7833, p. 823-826, 1973.

SANDLE, G. I.; HIGGS, N.; CROW, P.; MARSH, M. N.; VENKATESAN, S.; PETERS, T. J. Cellular basics for detective electrolyte transport in inflamed human colon. **Gastroenterology,** v. 99, n. 1, p. 97-105, 1990.

SAVILAHTTI, E.; KUITUNEN, P. Congenital lactose deficiency. **Arch. Dis. Child,** v. 58, p. 246-252, 1983.

SAVIDGE, T. C.; NEWMAN, P; POTHOULAKIS, C; RUHL, A; NEUNLIST, M; BOURRREILLE, A; HURST, R; SOFRONIEW, M. V. Enteric glia regulate intestinal barrier funtion and inflammation via release of s-nitrosogluitathione. **Gastroenterology** 2007; 132:1344-1358.

SCHORLING, J. B.; WANKE, C. A.; SCHORLING, S. K. McAULIFFE, J. F.; DE SOUZA, M. A.; GUERRANT, R. L. A prospective study of persistent diarrhea among children in an urban brazilian slum: patterns of occurrence and etiologic agents. **Am. J. Epidemiol.,** v. 132, n. 1, p. 144-156, 1990.

SCHRANDER, J. J.; UNSALAN-HOOYEN, R. W.; FORGET, R. P.; JANSEN, J. 51 Cr-EDTA intestinal permeability in children with cow's milk intolerance. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.,** v. 10, p. 189-192, 1990.

SCHULTZ, S. G.; CURRAN, P. F. Coupled transporto f sodium and organic solutes. **Physiol. Rev.,** v. 50, p. 637-718, 1970.

SCHULZKE, J. D.; SCHULZKE, I.; FROMM, M.; BENTZEL, C. J.; RIECKEN, E. O. Impaired epithelial barrier in celiac sprue. **Gastroenterology,** v. 100, p. A702, 1991.

SEARS, C. L. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions V. Assult of the tigth juntion by enteric pathogens. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.,** v. 279, p. 1129-1134, 2000.

SIBER, G. R.; MAYER, R. J. Increased gastrointestinal absortion of large molecules in patients after 5-fluourouracial therapy for metastatic colon carcinoma. **Cancer Res.,** v. 40, p. 3430-3436, 1980.

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

SIMOONS, F. J. Primary adult lactose intolerance and the milk habit: a problem biologic and cultural interrelations. II. A culture historical hypothesis. **Am. J. Dig. Dis.,** v. 15, n. 8, p. 695-710, Aug. 1970.

SIMOONS, F. J. The geographic hypothesis and lactose malabsortion: a weighing of the evidence. **Am. J. Dig. Dis.**, v. 23, n. 11, p. 963-980, Nov. 1978.

SNYDER, J. D.; MERSON, M. H. The magnitude of the global problem of acute diarrheal disease: a review of the active surveillance data. **Bull. World Health Organ.,** v. 60, p. 605-613, 1982.

STEVENSON, B. R.; SILICANO, J. D.; MOOSEKER, M. S.; GOODNOUGH, D. A. Identification o f ZO-I: a high molecular weight popypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in variety of ephitelia. **J. Cell. Biol.,** v. 103, p. 755-766, 1986.

SUENAERT, P; BULTELL, V; LEMMENS, L; NOMAM, N; GEYPENS, B; Van ASSCHE, G; GEBOES, K; CEUPPENS, JL; RUTGEERTS, P. Anti-tumor necrosis factor treatment restores the gut barrier in Crohn`s disease. **Am J gastroenterol** 2002; 97:2000-2004.

SZILAGYI, A. Review article: lactose – a potencial prebiotic. **Aliment Pharmacol. Ther.,** v. 16, p. 1591-1602, 2002.

SUASSUNA, A. A Farsa da Boa Preguiça, **Ed. José Olympio**, 1960.

TADESSE, K.; LEUNGG, D. T. Y.; YEN, R. C. F. The status of lactose absortion in Hong Kong Chinese Children. **Acta Pediatr**., v. 81, p. 598-600, 1992.

TANG, V. W.; GOODENOUGH, D. A. Paracellular íon channels at the tight junction. **Biophys. J.,** v. 84, n. 3, p. 1660-1673, 2003.

TISHKOFF, S. A.; REED, F. A.; RANCIARO, A.; VOIGHT, B. F.; BABBITT, C. C.; SILVERMAN, J. S. et al. Convergent adaptation of human lactase persistence in Africa and Europe. **Nat. Gen.,** v. 39, p. 31-40, 2006.

TRAVIS, S.; MENZIES, I. Intestinal permeability: functional assessment and significance. **Clin. Sci.,** v. 82, p. 471-478, 1992.

TRAVIS, S. P. L.; MENZIES, I. S.; CREAMER, B. Differential D-xylose/3-0methyl-D-glucose aborption in coelic disease. **Gut,** v**.** 30, p. A1508-1509, 1989.

TRINKAUS, E. Early modern humans. **Ann. Rev. Nthropol**., v. 34, p. 207-230, 2005.

TROELSEN, J. T.; OLSEN, J.; MOLLER, J.; SJOSTROM, H. An upstream polymorphism associated with lactase persistence has increased anhancer activity. **Gastroenterology**, v. 125, n. 6, p. 1686-1694, Dec. 2003.

TSUKITA, S.; FURUSE, M. Claudin-based barrier in simple and stratified cellular sheets. **Curr. Opin. Cell Biol.,** v. 14, p. 531-536, 2002.

TUKSEN, K.; TROY, T. C. Claudin-6: a novel tigth juntion molecule is developmentally regulated in mouse embryonic epithelium. **Dev. Dyn.**, v. 22, p. 292-300, 2001.

TURNER, J. R.; RILL, B. K.; CARLSON, S. L.; CARNES, D.; KERNER, R.; MRSNY, R. J.; MADARA, J. L. Physiological regulation of epithelial tigth juntions is associated with miosin ligth-chain phosphorylation. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 4, pt 1, p. C1378-C1385, 1997.

TURNHAM, D. I.; NORTHROP-CLEWES, A.; McCULLOUGH, F. J. W.; DAS, B. S.; LUNN, P. G. Innate imunity, gut integrity, andvitamin A in Gambatian and Indian infants. **J. Infect. Dis**., v. 182, suppl 1, p. S23-28, 2000.

UKABAM, S.O.; COOPER, B.T. Small intestinal permeability to mannitol, lactulose and polyethylene glycol 400 in celiac disease. **Dig. Dis. Sci.,** v. 29, p. 809-816, 1984.

USSING, H. H.; WINDHAGE, E. F. Nature of shunt path and active sodium transport path through skin epithelium. **Acta Physiol. Scand.,** v. 61, p. 484-504, 1964.

VARDY, P.; LEBANTHAL, E.; SCHWACHMAN, H. Intestinal lymphangiectasia: a reppraisal. **Pediatrics,** v. 55, p. 842-851, 1975.

VILLAKOK, M. H. Clinical picture of hypolactasia and lactose intolerance. **Scand. J. Gastroenterol.,** v. 29, suppl. 202, p. 36-54, 1994.

WANG, F; SCHWARZ, BT; GRAHAM, WV; WANG,Y; SU,L; CLAYBURGH, DR; ABRAHAM, C; TURNER,JR. IFN-γ-induced TNFR2 expression is required for TNF-dependente intestinal epithelial barrier dysfunction. **Gastroenterology** 2006; 131:1153-1163.

WESER, E.; SLEISENGER, M. H. Lactosuria and lactase deficiency in adult celiac disease. **Gastroenterology,** v. 48, p. 571-578, 1965.

WHEEELER, P. G.; MENZIES, I. S.; CREMER, B. Effect of hyperosmolar stimuli and celiac disease on permeability of the human gastrointestinal tract. **Clin. Sci. Mol. Med.,** v. 54, p. 495-501, 1978.

WHITE, T. D.; ASFAW, B.; DEGUSTA, D.; GILBERT, H.; RICHARDS, G. D.; SUWA, G.; HOWELL, F. C. Pleistocene homo sapiens from Midle Awash, Ethiopia. **Nature,** v. 423, n. 6941, p. 724-747, June 2003.

WITT, K. A.; MARK, K. S.; HOM, S.; DAVIS, T. P. Effects of hypoxia-reoxygenation on rat blood-brain barrier permeability and tigth juntional protein expression. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.,** v. 285, n. 6, p. H2820-H2831, Dec. 2003.

WYATT, J.; VOGELSANG, H.; HUBL, W.; WLADHOES, T.; LOCHS, H. Intestinal permeability and prediction of relapse in Crohn's disease. **Lancet**, v. 341, p. 1437-1439, 1993.

XIAO, X.; SAMUSKI, R. J. Efficient long-term gene transfer into muscle tissue of imuno-competent mice by adeno-associated vírus vector. **Virology,** v. 70, p. 3822-3828, 1996.

YU, A. S. Claudins and epithelial paracellular transport: the end of the beginning. **Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.,** v. 12, n. 5, p. 503-509, Sept. 2003.

ZONG, Y.; PRIEBE, M. G.; VONK, R. J.; HUANG, C.-Y.; ANTOINE, J. M.; HE, T. et al. The role of colonic microbiota in lactose intolerance. **Dig. Dis. Sci.,** v. 49, n. 1, p. 78-83, Jan. 2004.

ANEXOS

ANEXO ESPECIAL

AGRADECIMENTOS

A minha esposa Maria das Graças Barreto Couto Correia pela compreensão dispensada ao *mergulho* na ciência; ao filho Dr. Guilherme Couto Correia, que se dispõe a seguir estes passos; a filha Dra. Thereza Rachel Couto Correia, que concluiu seu doutorado antes de mim com nota 10 e louvor, em direitos humanos internacionais, criando um clima propício; e ao filho Dr. Ricardo Aires Correia Filho, que muito me auxiliou na digitação de dados de forma precisa, apesar de atuar em área dispare; aos meus netos, Arthur, Eduardo, Antonio David e Annabel que se resignaram a ausência do vovô em muitas horas de lazer.

ANEXO A

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE FERAL DO CEARÁ

COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA

Ilmo (a) Senhor (a)

Pela presente, venho solicitar a análise deste projeto de pesquisa, que será desenvolvido no IBIMED e Hospital Universitário Walter Cantídio da Universidade Federal do Ceará, Departamento de Farmacologia e Fisiologia, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. Objetiva servir de base para tese de doutoramento do Prof. Ricardo Aires Correia.

Atenciosamente,

Fortaleza, 05 de maio de 2005.

Ricardo Aires Correia

Doutorando

ANEXO B

Anuência

O diretor do Laboratório IBIMED, Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima concorda com este projeto, ficando este laboratório responsável pelas análises das amostras coletadas e fornecimento dos dados aos pesquisadores.

Fortaleza, 14 de fevereiro de 2005

ANEXO C

FICHA N_____
DATA: ____ /____/_____

1. IDENTIFICAÇÃO

Paciente: _____
Sexo: ____ Data de Nascimento: ____/____/____ Naturalidade: _____
Endereço: _____
Cidade: _____ Estado: _____
Fone: _____ Fone Trabalho:_____

2. HISTÓRIA CLÍNICA

2.1 Queixa Principal: _____
_____
_____

2.2 Diarréia: □ Sim □ Não Tempo _____ dias

2.3 Dor cólica □ □ Difusa no abdome

2.3.1 Características da diarréia (clínica) □ Alta □ Baixa

2.4 Relação com alimentos

Sim □ Não □ Tipo _____

2.5 Uso de medicamentos: □ Sim □ Não

Qual: _____
Quanto tempo: _____

2.6 Perda de peso:

□Sim □ Não

Quanto: _____ Tempo: _____

2.7 Ingestão etílica:

□ Sim □ Não

Quanto:_____
Tempo: _____

2.8 Condições de moradia:

□ Alvenaria □ Taipa □ Madeira □ Outro

Rede de esgoto □ Sim □ Não

Água tratada □ Sim □ Não

Água ingerida □ Sem tratamento □ Filtrada □ Fervida □ Ozonizada □ Mineral □ Outro

2.9 Formação escolar:

□ Analfabeto □ Semi-analfabeto □ 1°grau completo □ 2° grau □ Nível superior

2.10 Estado civil:

□ Solteiro □ Casado □ Divorciado □ Outro

2.11 Profissão: _____

Renda Mensal: □ < 1 SAL M □ 1 a 2 SAL M □ 2 a 3 SAL M

□ 3 a 5 SAL M □ > 5 SAL M

2.12 Exame do abdome

□ Sem anormalidades □ Alterações

Quais: _____

_____

2.13 Patologias concomitantes não excludentes do estudo:

_____

_____

_____

_____

2.14 Tem teste de tolerância a lactose já realizado:

□ Sim □ Não □ Será realizado

Resultado: _____

Glicemia de jejum: _____ mg/dl

15 min mg/dl

30 min mg/dl

60 min mg/dl

90 min mg/dl

ANEXO D

Universidade Federal do Ceará
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. Nº 628/05 Fortaleza, 18 de novembro de 2005
Protocolo COMEPE nº 269/05
Pesquisador responsável: Ricardo Aires Correia
Deptº./Serviço: Hospital Universitário Walter Cantídio/UFC
Título do Projeto: "Intolerância a lactose: detecção diferencial da excreção urinária de açúcares para identificação da deficiência de dissacaridases e barreira funcional intestinal em adulto"

Levamos ao conhecimento de V.Sª. que o Comitê de Ética em Pesquisa e do Complexo Hospitalar da Universidade Federal do Ceará – COMEPE, dentro das normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde, Resolução nº196 de 10 de outubro de 1996 e Resolução nº 251 de 07 de agosto de 1997, publicadas no Diário Oficial, em 16 de outubro de 1996 e 23 de setembro de 1997, respectivamente, aprovou o projeto supracitado na reunião do dia 10 de novembro de 2005.

Outrossim, informamos, que o pesquisador deverá se comprometer a enviar o relatório parcial e final do referido projeto.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Fernando A. Frota Bezerra
Coordenador Adjunto do Comitê de Ética em Pesquisa
COMEPE/HUWC/UFC

ANEXO E

MINISTÉRIO DA SAÚDE - Conselho Nacional de Saúde - Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

FOLHA DE ROSTO PARA PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

(versão outubro/99) Para preencher o documento, use as indicações da página 2.

1. Projeto de: INTOLERÂNCIA A LACTOSE:DETECÇÃO DIFERENCIAL DA EXCREÇÃO URINÁRIA DE AÇUCARES PARA IDENTIFICAÇÃO DA DEFICIÊNCIA DE DISSACARIDASES E BARREIRA FUNCIONAL INTESTINAL EM ADULTOS			
2. Área do Conhecimento (Ver relação no verso) GRUPO II	3. Código: 208	4. Nível: (Só áreas do conhecimento 4)	
5. Área(s) Temática(s) Especial (s) (Ver fluxograma no verso)	6. Código(s):	7. Fase: (Só área temática 3) I( ) II( ) III( ) IV( )	
8. Unitermos: (3 opções)INTOLERÂNCIA A LACTOSE/DEFICIÊNCIA DE DISSACARIDASES/ BARREIRA FUNCIONAL INTESTINAL			

SUJEITOS DA PESQUISA

9. Número de sujeitos 52 No Centro : 01 Total:	10. Grupos Especiais : <18 anos ( ) Portador de Deficiência Mental ( ) Embrião /Feto ( ) Relação de Dependência (Estudantes , Militares, Presidiários, etc) ( ) Outros ( ) Não se aplica (X)

PESQUISADOR RESPONSÁVEL

11. Nome:PROF. RICARDO AIRES CORREIA				
12. Identidade: 2218(CRM)	13. CPF.: 050907254-20	19.Endereço (Rua, nº): JOÃO LÔBO FLO.,	250	B. DE FÁTIMA
14. Nacionalidade: BRASILEIRA	15. Profissão: PROFESSOR	20. CEP: 60.055-350	21. Cidade: FORTALEA	22. U.F. CE
16. Maior Titulação: MESTRADO	17. Cargo PROF.ADJUNTO NIVEL IV	23. Fone: (085) 3257.7474	24. Fax (85)3257.7618	
18. Instituição a que pertence: UNIVARSIDADE FEDERAL DO CEARÁ			25. Email: ricardoaires@uol.com.br	

Termo de Compromisso: Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Res. CNS 196/96 e suas complementares. Comprometo-me a utilizar os materiais e dados coletados exclusivamente para os fins previstos no protocolo e a publicar os resultados sejam eles favoráveis ou não. Aceito as responsabilidades pela condução científica do projeto acima.

Data: 05/05/2005.

Assinatura

INSTITUIÇÃO ONDE SERÁ REALIZADO

26. Nome: HOSPITAL UNIVERSITARIO WLATER CANTIDIO	29. Endereço (Rua, nº): RUA CAPITÃO FCO. PEDRO, S/N		
27. Unidade/Órgão: IBIMED	30. CEP: 60.000-350	31. Cidade: FORTALEZA	32. U.F. CE
28. Participação Estrangeira: Sim ( ) Não (X)	33. Fone:40098338	34. Fax.:	

35. Projeto Multicêntrico: Sim ( ) Não (X) Nacional (X) Internacional ( ) (Anexar a lista de todos os Centros Participantes no Brasil)

Termo de Compromisso (do responsável pela instituição) : Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Res. CNS 196/96 e suas Complementares e como esta instituição tem condições para o desenvolvimento deste projeto, autorizo sua execução

Nome: PROF.SILVIO FURTADO

Cargo DIRETOR

Prof. Marcelo Alcantara Holanda
Diretor de Ensino e Pesquisa do
HUWC/UFC

Data: 05/05/2005.

Assinatura

PATROCINADOR Não se aplica (X)

36. Nome:	39. Endereço		
37. Responsável:	40. CEP:	41. Cidade:	42. UF
38. Cargo/Função:	43. Fone:	44. Fax:	

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP

45. Data de Entrada: / /	46. Registro no CEP:	47. Conclusão: Aprovado ( ) Data: / /	48. Não Aprovado ( ) Data: / /
49. Relatório(s) do Pesquisador responsável previsto(s) para:		Data: / /	Data: / /
Encaminho a CONEP: 50. Os dados acima para registro ( ) 51. O projeto para apreciação ( ) 52. Data: / /		53. Coordenador/Nome Assinatura	Anexar o parecer consubstanciado

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA - CONEP

54. Nº Expediente : 56.Data Recebimento : 55. Processo :	57. Registro na CONEP:

ANEXO F

FIGURAS

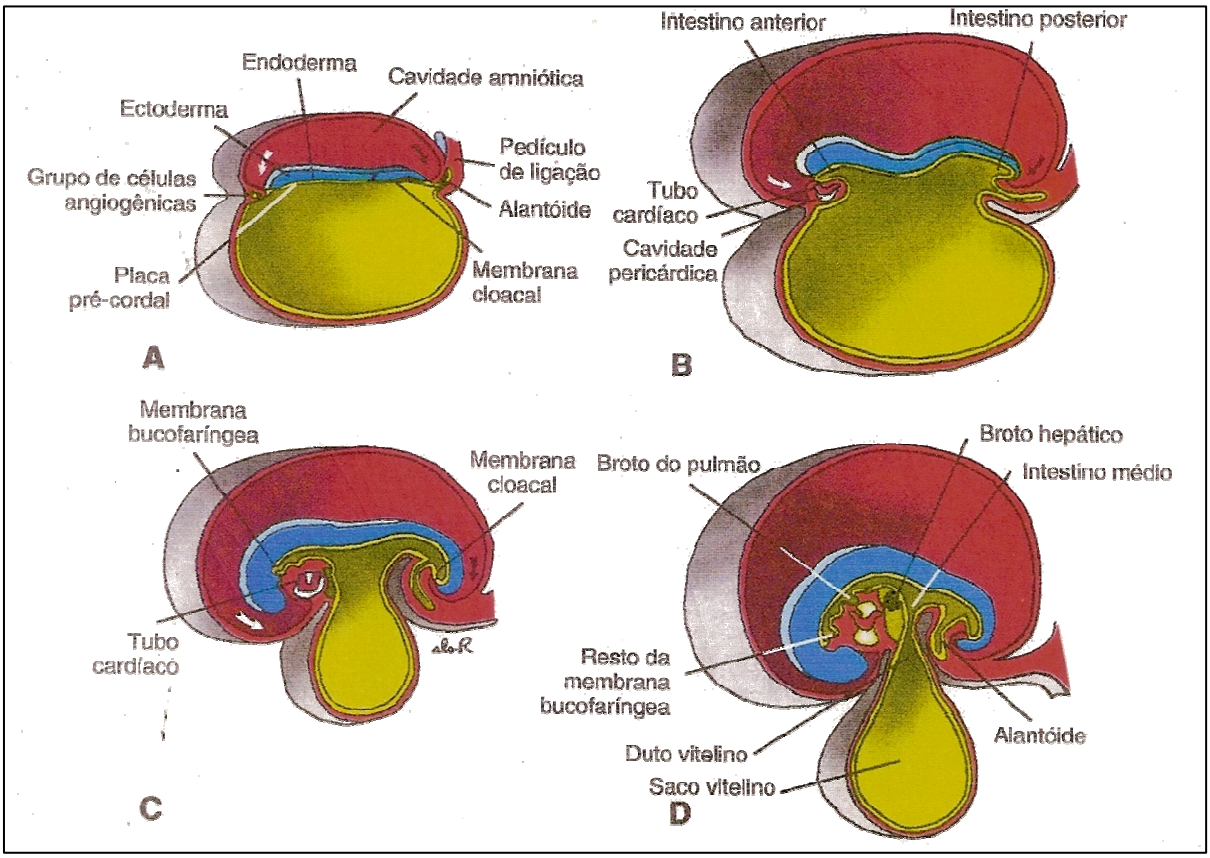


Figura 1. Esquema de seções sagitais de embriões; A. embrião pré-somítico; B. embrião com sete somitos - observar intestino anterior e posterior; C. embrião com 14 somitos; D. embrião no fim do primeiro mês, onde se observam intestinos anterior, médio e posterior.
Fonte: (LANGMAN, 1997).

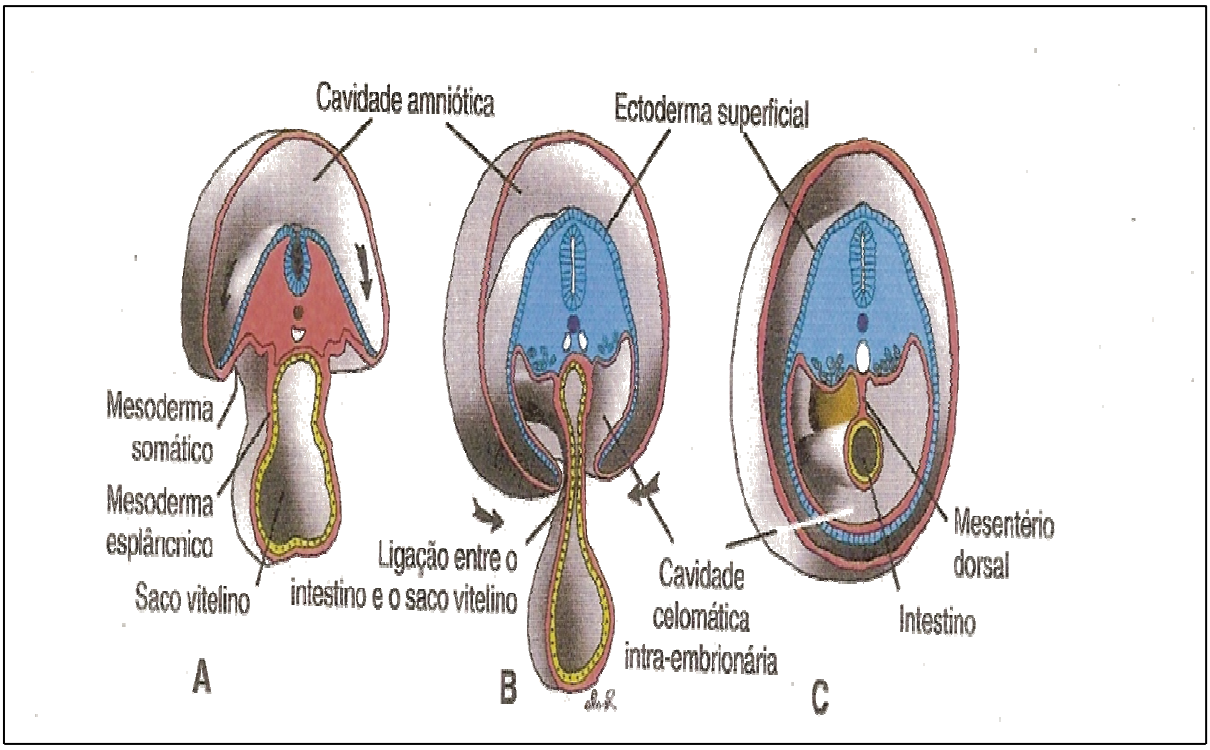


Figura 2. Seções transversais de embriões. A. celoma intra-embrionário, delimitado pelas camadas esplâncnicas e somática da placa mesodérmica lateral, em comunicação livre com a cavidade extra-embrionária. B. celoma intra-embrionário está perdendo sua conexão com a cavidade extra-embrionária. C. ao fim da 4ª semana, as camadas do mesoderma esplâncnico estão fundidas na linha mediana e formam a camada dupla do mesentério dorsal.
Fonte: (LANGMAN, 1997)

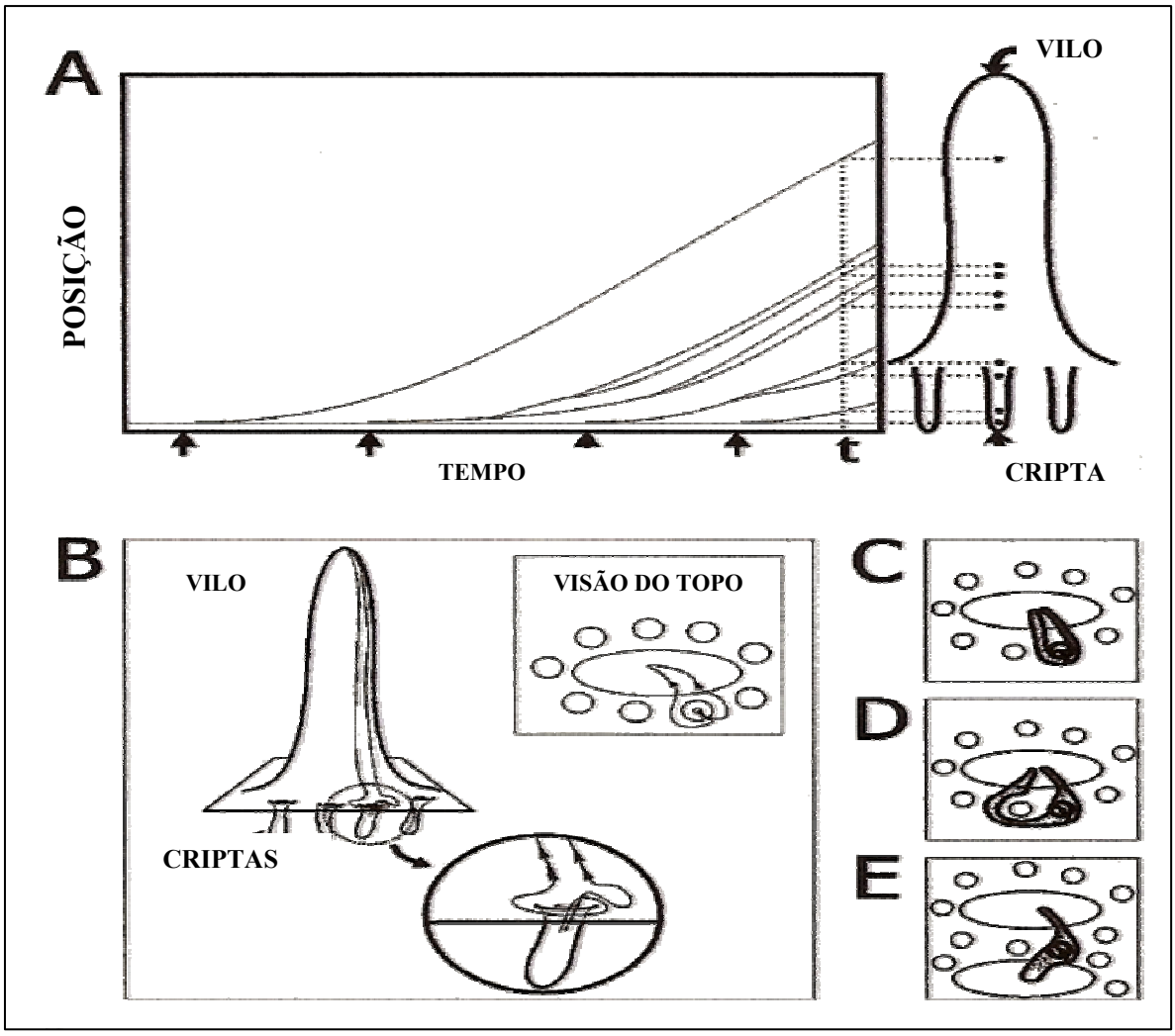


Figura 3. Mecanismo clonal gerador no vilo com os padrões de distribuição celular. A. posição das células mutantes mucosas ao longo do axis do vilo; as curvas mostram as etapas das divisões celulares e suas progenitôras. **B**. as unidades de criptas com o fluxo descontínuo de células ao topo do vilo. **C**. visão de cima da cripta e vilo; **D**. dupla geração de células com fluxo divergente adjacente à cripta. E. fluxo adjacente ao vilo de uma cripta mutante simples.
Fonte: (BJERKNES; CKENG, 1999).

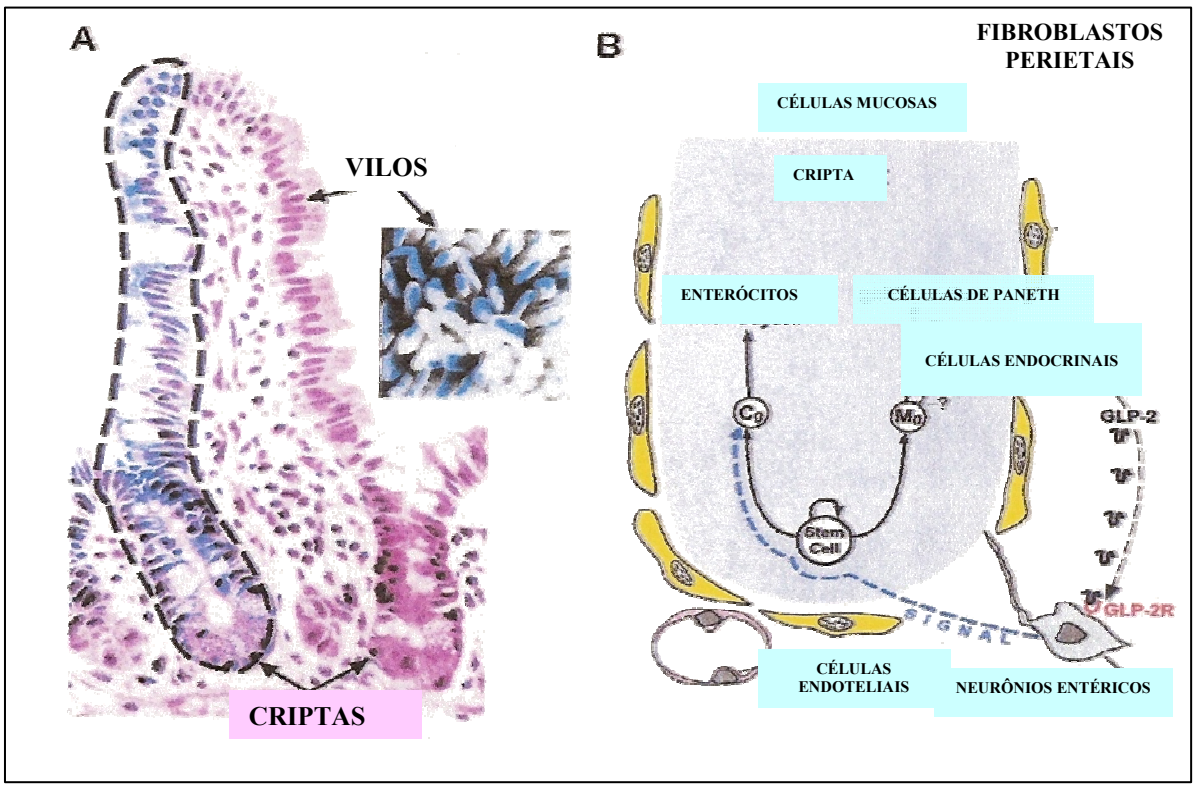


Figura 4. Demonstração da migração celular da cripta ao topo do vilo - Em **A**. observa-se a hierarquia das células-tronco da cripta; as células são fornecidas por duas criptas adjacentes; as células em azul representam um grupo genético e as em vermelho outro grupo. **B**. a representação demonstra um nicho de células-tronco; produzem filhas que desenvolverão os enterócitos. O GLP-2 (glucagon-like-peptide), produzido nas células enteroendócrinas, estimula o neurônio entérico, o qual induz um aumento na proliferação de enterócitos.
Fonte: (MILLS; GORDON, 2001).

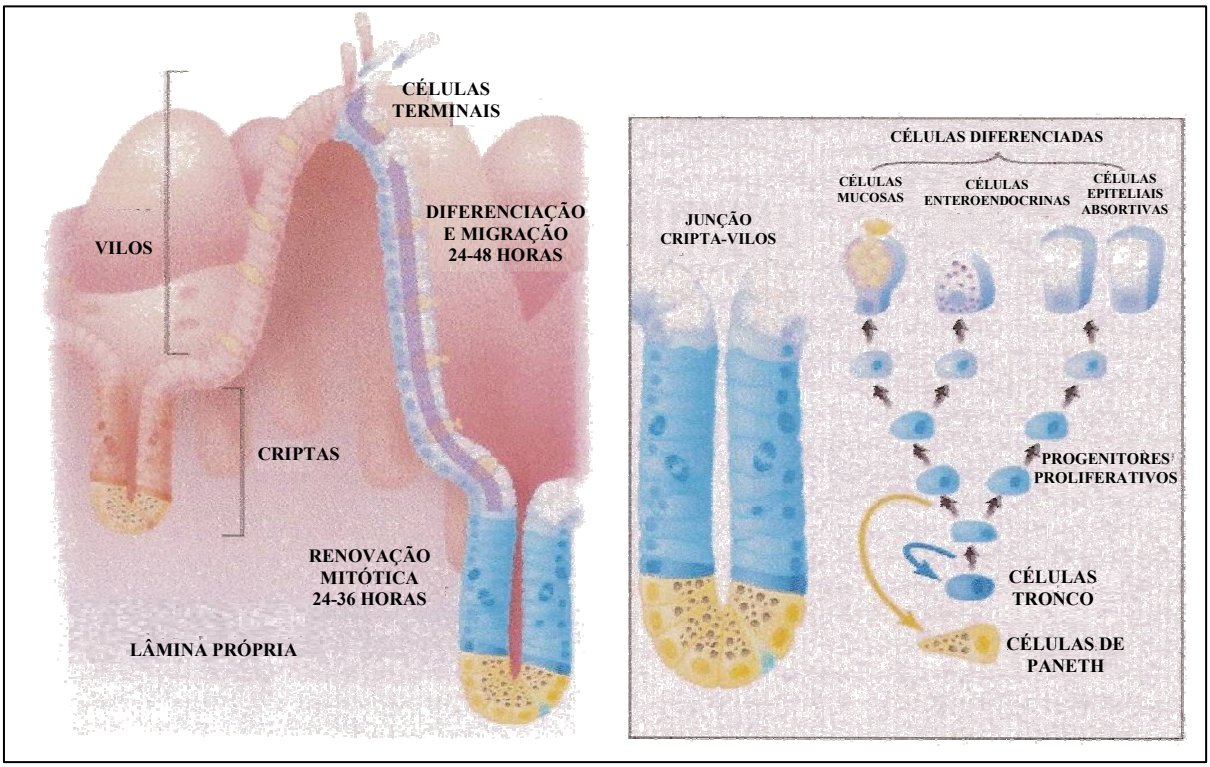


Figura 5. Anatomia do epitélio intestinal do intestino delgado. O epitélio possui criptas e vilos (à esquerda). À direita, o esquema de linhagens que inicia nas células-tronco, um compartimento transitório de amplificação celular, e dois ramos de diferenciação. O ramo direito é a linhagem de enterócitos e o esquerdo de células secretoras.
Fonte: (RADTKE F et al., 2005).

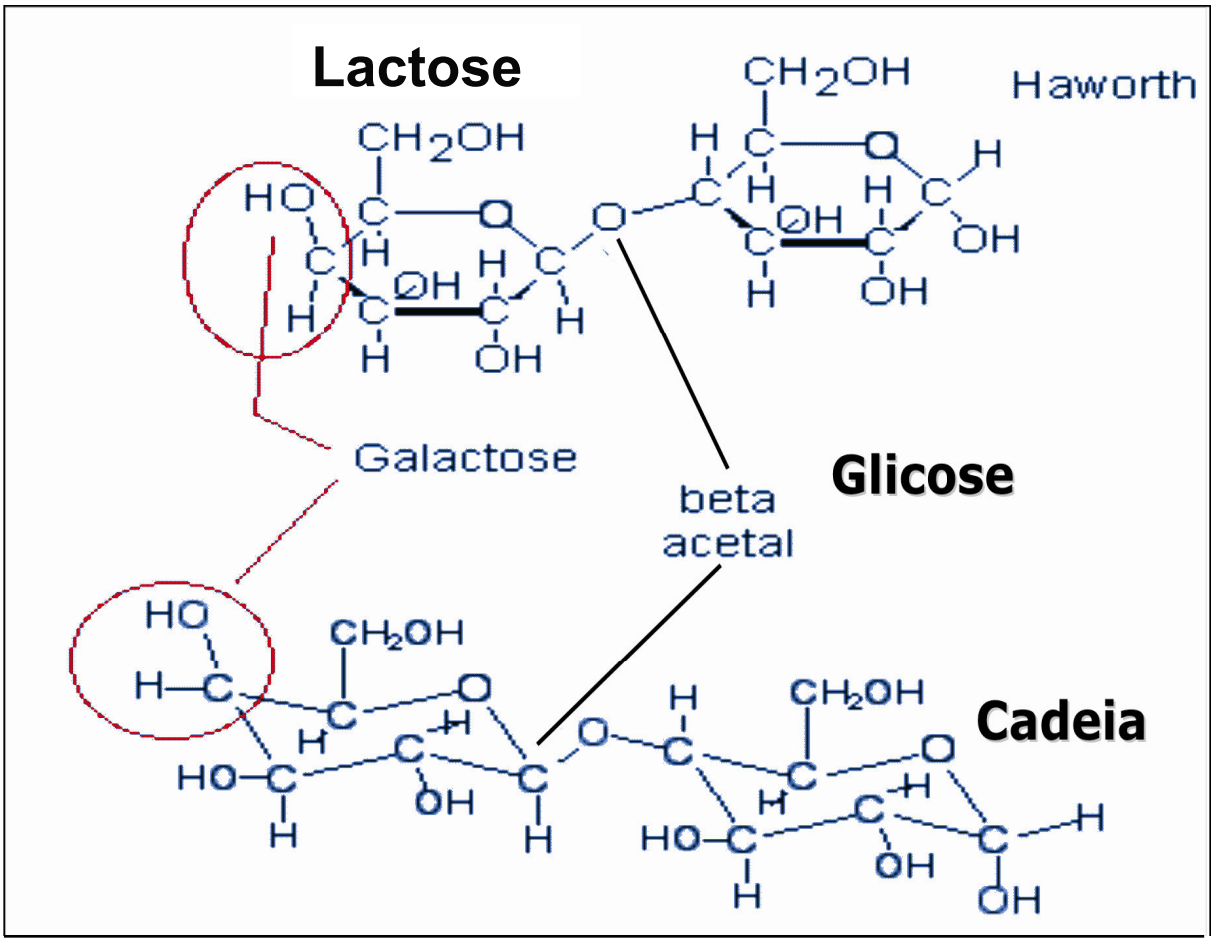


Figura 6. Representação da estrutura química da lactose, notando-se a fração galactose e glicose, unidas pela ponte beta-acetal, onde age a lactase, desmembrando a molécula em galactose e glicose que podem ser absorvidas pelo enterócito.
Fonte: (OPHARDT, C. 2003).

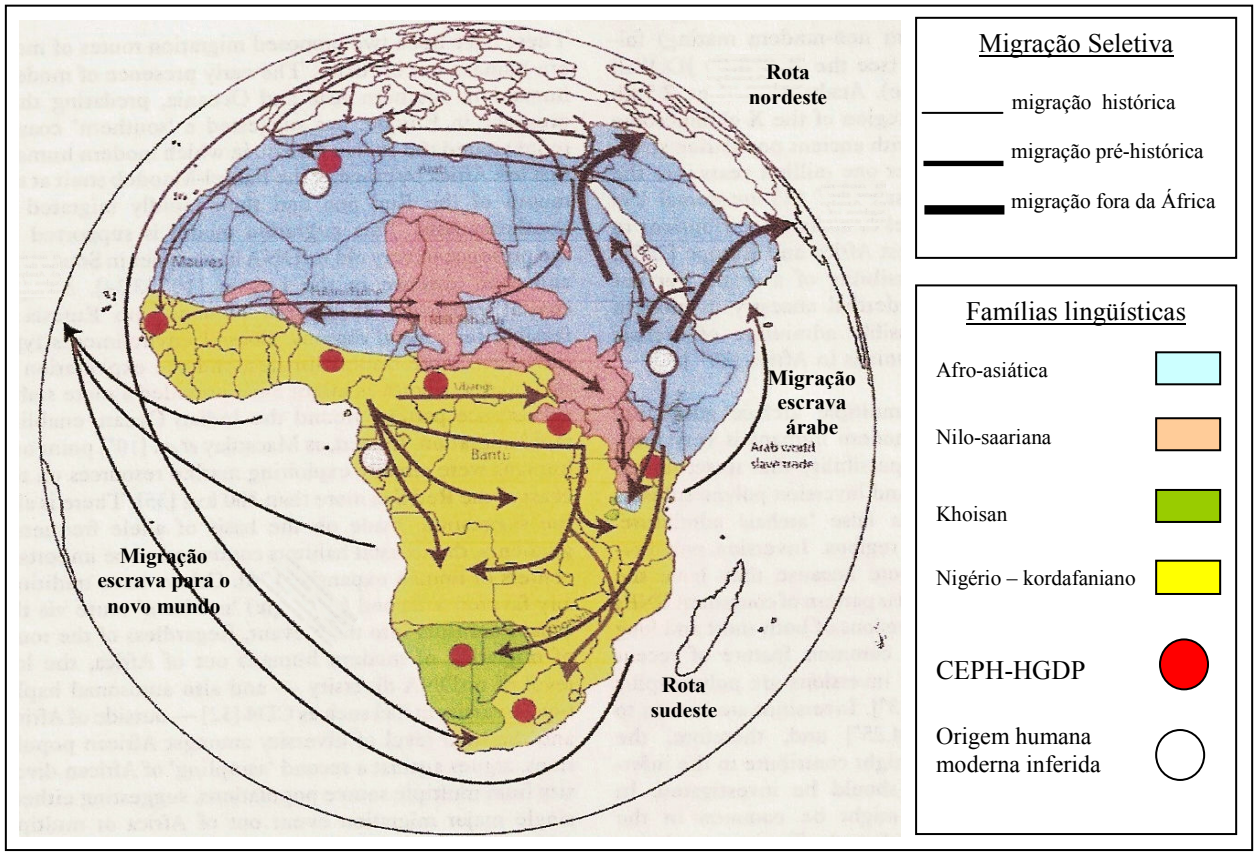


Figura 7. Mapa 1 - migrações humanas e as famílias lingüísticas distribuídas nas setas espessas mostram as migrações hipotéticas antigas.
Fonte: REED, F. A. e TISHKOFF, A. S., 2006.

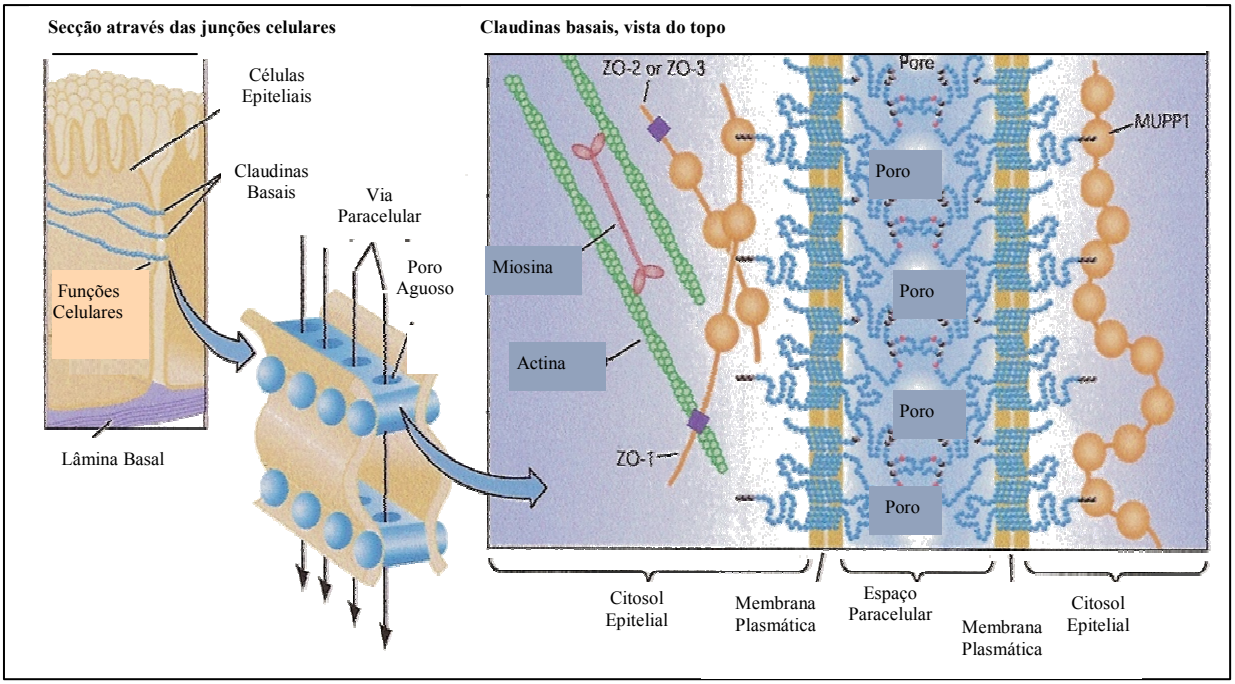


Figura 8. Modelo especulativo dos poros nas junções celulares. As claudinas formam fileiras contínuas e adesões homotípicas e os resíduos extracelulares têm influência eletrostática no movimento paracelular de íons. Isto sugere que as claudinas formam poros seletivos na via paracelular. Os filamentos intracelulares conectam-se ao citoesqueleto de actina e miosina, explicando a regulação fisiológica da barreira pelo citoesqueleto.
Fonte: VAN ITALIE; ANDERSON, 2004.

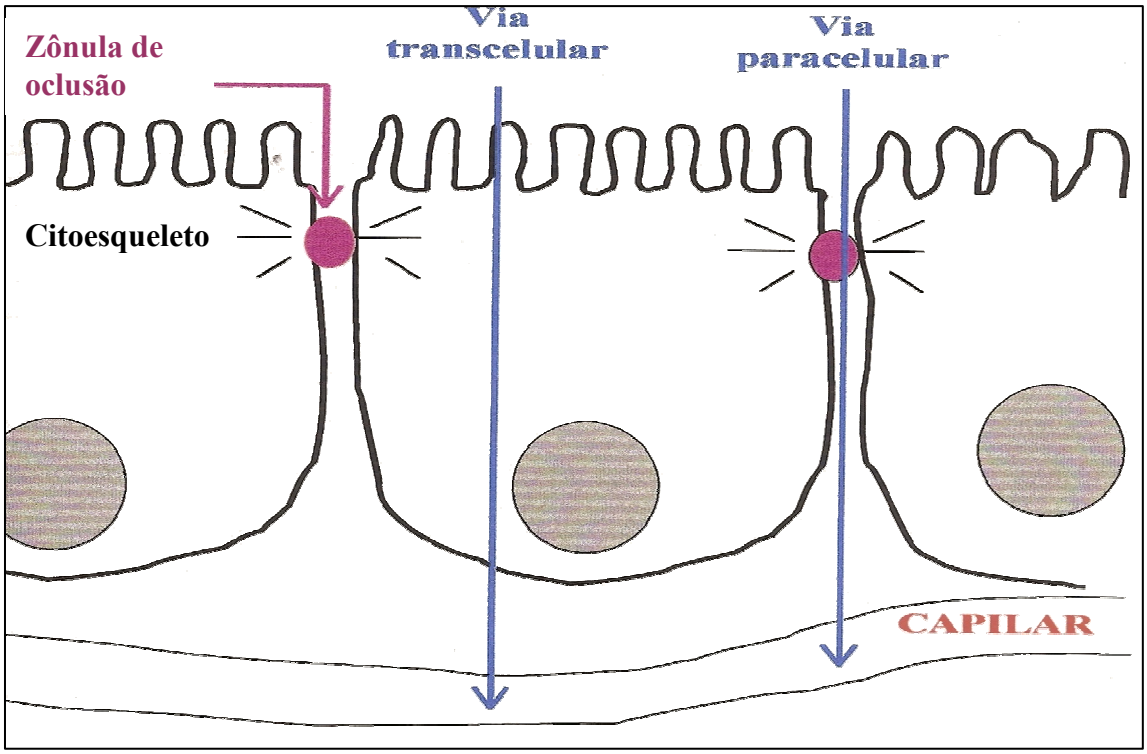


Figura 9. Vias de absorção transcelular e paracelular.
Fonte: (LIMA, 1998).

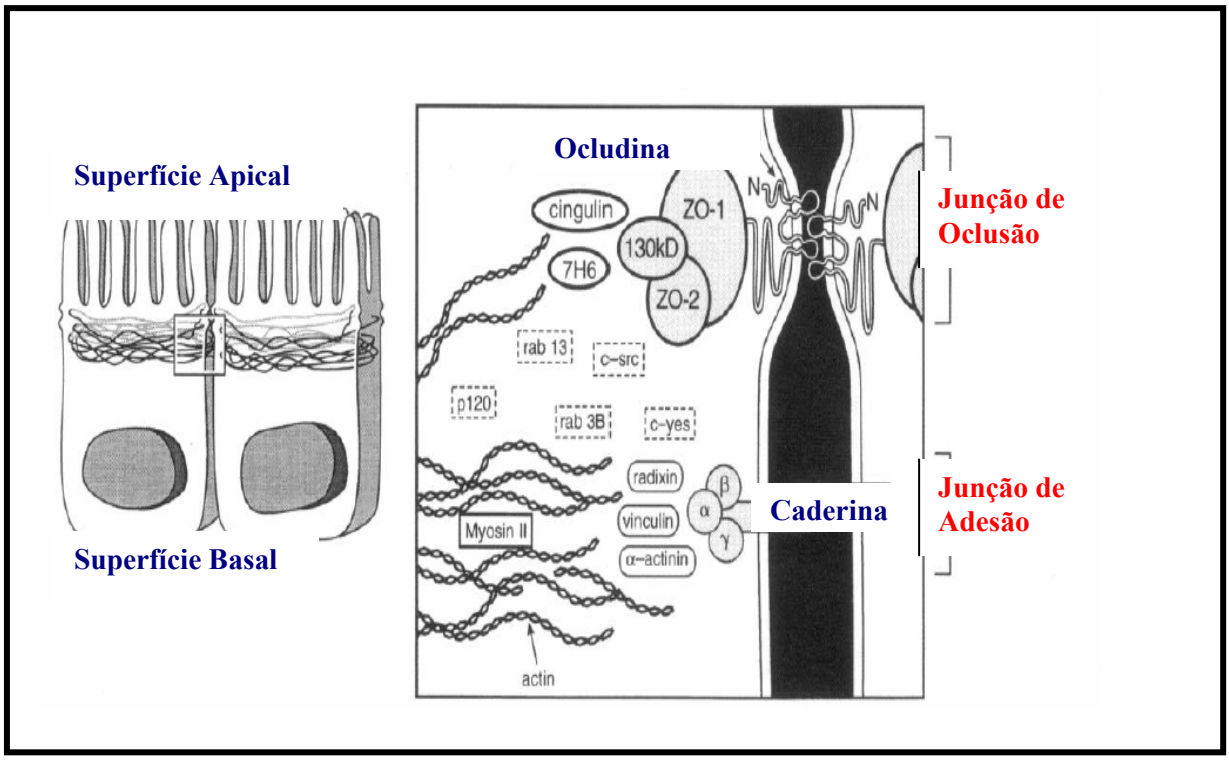


Figura 10. Esquema da junção celular e proteínas de ligação e oclusão.
Fonte: Anderson e Van Itale (1995).

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo