

**IDENTIFICACIÓN DE LAS VARIANTES C/T-13910 Y G/A-22018
ASOCIADAS CON HIPOLACTASIA PRIMARIA TIPO ADULTO
(HPTA) EN CAUCÁSICOS, EN UNA POBLACIÓN
AFRODESCENDIENTE DE LA COSTA CARIBE COLOMBIANA**

MARENA LUZ RODRÍGUEZ FERRER

DIRECTOR
CARLOS SILVERA REDONDO, MD, Esp, PhD.
Grupo de Genética y Medicina Molecular
Universidad del Norte

UNIVERSIDAD DEL NORTE
BARRANQUILLA
2011

**IDENTIFICACIÓN DE LAS VARIANTES C/T-13910 Y G/A-22018
ASOCIADAS CON HIPOLACTASIA PRIMARIA TIPO ADULTO
(HPTA) EN CAUCÁSICOS, EN UNA POBLACIÓN
AFRODESCENDIENTE DE LA COSTA CARIBE COLOMBIANA**

MARENA RODRIGUEZ FERRER

Informe final presentado como requisito para optar
al título de Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas con énfasis en Genética

Director

CARLOS SILVERA REDONDO, MD, Esp, PhD.
Grupo Genética y Medicina Molecular
Universidad del Norte

Co- Director

DANIEL VILLANUEVA TORREGROSA, MSc, PhD
Grupo Bioquímica Patológica
Universidad Libre

**UNIVERSIDAD DEL NORTE
BARRANQUILLA
2011**

Nota de aceptación

Firma del presidente del jurado

Firma del jurado

Firma del jurado

Ciudad y Fecha:

Dedico este esfuerzo a Dios, por ser fuente inagotable de fortaleza; a mis Padres Wilfrido y Lelia, por su amor, comprensión y apoyo en todo momento.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a las personas que participaron este estudio de población afrodescendiente de San Basilio de Palenque, quienes suministraron información valiosa para el logro de los objetivos propuestos.

Agradezco al Centro de Investigación de la Universidad Libre, CIUL, por la financiación de esta investigación; al Grupo de Investigación en Bioquímica Patológica “GRUBIOPAT”, muy especialmente al Dr. Daniel Villanueva, por el interés mostrado en la dirección de la tesis, por su acompañamiento en el trabajo de campo, por el apoyo científico, por su asesoría teórica y metodológica para el abordaje del problema de investigación y por ser un buen maestro quien nos regala sus sabios consejos y nos dirige por el camino de las ciencias.

Al grupo de Investigaciones en Biología Molecular de la Universidad del Norte, especialmente al Dr. Carlos Silvera, por su asesoría, por su apoyo, sus enseñanzas, su paciencia y el tiempo dedicado a la corrección de este documento.

Agradezco especialmente al Dr. Herber Cárdenas por su valiosísima ayuda en el análisis estadístico de los polimorfismos estudiados en la población.

A mi padre, Wilfrido Rodríguez Reales, quien me acompañó en todas las largas jornadas de trabajo de campo en la población de San Basilio de Palenque.

A todos mis amigos y compañeros de trabajo, quienes me ayudaron con sus apreciados consejos y sugerencias para lograr alcanzar esta meta, por haber tolerado mis problemas profesionales y por reconfortarme con sus palabras. Sin su apoyo moral este trabajo no se habría culminado. **A todos....Gracias.**

CONTENIDO

	Pag
ABREVIATURAS	14
RESUMEN	15-16
SUMMARY	17-18
INTRODUCCIÓN	19-22
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	23
1. LACTOSA Y SU METABOLISMO	23
1.1. Estructura química y características de la Lactosa.....	23-24
1.2. Metabolismo de la Lactosa.....	24
1.3. Valor nutritivo de la Lactosa.....	25
2. LACTASE-PHLORIZIN HYDROLASE (LPH)	26
2.1 Estructura y función de la LPH	26-27
2.2 Estructura del Gen de la Lactasa (<i>LCT</i>).....	27-30
2.3 Biosíntesis de la LPH	30-31
2.4 Regulación de la expresión de la LPH.....	31-35
3. DEFICIENCIAS DE LACTASA	35
3.1 Terminología y clasificación de las deficiencias de Lactasa.....	35
3.2. Deficiencia de Lactasa Primaria.....	35
3.2.1. Deficiencia de Lactasa Congénita (CLD).....	35-36
3.2.2. Hipolactasia Primaria Tipo Adulto	36
3.2.2.1. Mecanismo base de la Hipolactasia tipo adulto.....	36-38
3.2.2.2. Características Clínicas.....	39
3.2.2.3. Métodos de Diagnóstico.....	39
3.2.2.3.1. Método Directo.....	40
3.2.2.3.2. Métodos Indirectos.....	40
3.2.2.3.2.1. Prueba de Tolerancia a la lactosa (LTT).....	40-41
3.2.2.3.2.2. La prueba del Hidrógeno en el aliento (BHT)	41
3.3. Deficiencia de Lactasa Secundaria.....	41-42

CONTENIDO

	Pag
4. POLIMORFISMOS DE UN ÚNICO NUCLEÓTIDO (SNP)	42-43
4.1. Análisis Descriptivo de un Polimorfismo tipo SNP.....	43-44
4.1.1. Haplotipos.....	44-45
4.1.2. Desequilibrio de Ligamiento.....	45
4.1.3. Ley de Hardy – Weinberg.....	46-48
5. GENÉTICA DE LA HIPOLACTASIA PRIMARIA TIPO ADULTO	48
5.1. Prevalencia de la Hipolactasia Primaria Tipo Adulto (HPTA).....	48-50
5.2. Hipolactasia Primaria Tipo Adulto–Condición genéticamente determinada...	51
5.3. Identificación de Polimorfismos tipo SNP asociada con la HPTA.....	52
5.4. Técnicas moleculares para la identificación de SNPs.....	52-53
5.4.1. PCR (Reacción en cadena de la polimerasa).....	53-56
5.4.2. RFLP.....	56
5.4.3. Pirosecuenciación	57
5.4.4. Minisequenciación Fluorescente en fase sólida.....	57-58
6. COMUNIDAD AFRODESCENDIENTE DE SAN BASILIO DE PALENQUE	58
6.1. Ubicación geográfica.....	58
6.2. Historia.....	58-61
6.3. Población.....	61-62
6.4. Economía.....	63
7. OBJETIVOS	64
7.1. Objetivo General.....	64
7.2. Objetivos específicos.....	64

CONTENIDO

	Pag
8. METODOLOGÍA	65
8.1. Grupo de estudio.....	65
8.2. Selección de muestra.....	66-67
8.3. Genotipificación de los SNP C/T-13910 y G/A-22018.....	67
8.3.1. Extracción de ADN.....	67
8.3.2. Amplificación y Digestión del SNP C/T 13910.....	67-68
8.3.3. Amplificación y Digestión del SNP G/A -22018.....	68-69
8.3.4. Electroforesis de la digestión de los productos amplificados.....	70-71
8.3.5. Análisis Estadístico.....	71
9. RESULTADOS	71
9.1. Perfil genotípico de la población de estudio para el SNP C/T-13910.....	71-73
9.2. Perfil genotípico de la población de estudio para el SNP G/A-22018.....	73-76
9.3. Análisis del Desequilibrio de ligamiento.....	76-79
9.4. Análisis Comparativo del perfil genotípico C/T-13910 y G/A-22018 obtenido en la población de estudio con los datos de dos grupos poblacionales de Colombia.....	80-82
9.5. Análisis Comparativo del perfil genotípico C/T-13910 y G/A-22018 obtenido en la población de estudio con otras poblaciones a nivel mundial.....	82-86
10. DISCUSIÓN	87-91
11. CONCLUSIONES	92
12. RECOMENDACIONES	93
14. BIBLIOGRAFÍA	94-100
ANEXOS	101-107

LISTA DE TABLAS

	Pag.
Tabla 1. Prevalencia de lactasa persistencia y lactasa no persistencia a nivel mundial.	50
Tabla 2. Digestión de los productos de PCR para los SNPs C/T-13910 y G/A-22018 con las enzimas de restricción Hinf I y HhaI respectivamente.	70
Tabla 3. Distribución de la muestra según los fenotipos y las frecuencias genotípicas de los SNPs C/T-13910 y G/A-22018: observadas y esperadas en la población de estudio.	74
Tabla 4. Frecuencias Alélicas encontradas (C,T,A,G) en la población de estudio.	75
Tabla 5. Distribución de los Haplotipos encontrados (CG,CA,TA) en la población de estudio.	75
Tabla 6. Distribución de las Frecuencias gaméticas: observadas – esperadas y X^2 para el análisis del desequilibrio de ligamiento.	77
Tabla 7. Frecuencias Genotípicas observadas y esperadas de los polimorfismos C/T-13910 y G/A-22018 en la población de estudio.	80

LISTA DE TABLAS

	Pag
Tabla 8. Frecuencias Genotípicas observadas y esperadas de los polimorfismos C/T-13910 and G/A-22018 en una muestra de una población mestiza del Caribe Colombiano.	81
Tabla 9. Frecuencias Genotípicas observadas y esperadas de los polimorfismos C/T-13910 and G/A-2201 en una muestra de una población Indígena Wiwa.	81
Tabla 10. Análisis Comparativo entre las frecuencias de los Genotipos C/T-13910 y G/A-22018 obtenidas en la población de estudio y los datos de otras poblaciones.	83

LISTA DE FIGURAS

		Pag.
FIGURA 1.	Formula estructural de la lactosa y la Hidrólisis por acción de la lactasa	23
FIGURA 2.	Acción del Complejo Lactosa Sintasa.	24
FIGURA 3.	Locus del Gen LCT en el Cromosoma 2.	27
FIGURA 4.	Estructura y Biosíntesis de la Lactasa.	29
FIGURA 5.	Importancia de los polimorfismos de un sólo nucleótido en regiones reguladoras (rSNPs).	32
FIGURA 6.	Secuencia conservada de ADN que comprende el promotor del gen LCT (150 pb) en varias especies, mostrando los puntos de unión de algunos factores de transcripción	34
FIGURA 7.	Ubicación de las Variantes asociadas a HPTA, C/T-13910 y G/A -22018 corriente arriba del gen LCT en MCM6.	38
FIGURA 8.	Déficit de LPH. Secuencias que pueden estar implicadas en la HPTA.	51
FIGURA 9.	Esquema de un Ciclo de PCR convencional. Mezcla de reacción de la PCR.	55
FIGURA 10:	Ubicación geográfica de San Basilio de Palenque	59

LISTA DE FIGURAS

		Pag.
FIGURA 11.	Electroforesis en gel de poliacrilamida al 8% teñido con bromuro de etidio, con productos de la digestión con Hinf I para C/T-13910.	72
FIGURA 12.	Electroforesis en gel de poliacrilamida al 8% teñido con bromuro de etidio, con productos de la digestión con Hha I para G/A-22018.	73
FIGURA 13.	Distribución de las frecuencias genotípicas observadas y esperadas para los SNPs C/T-13910 y G/A-22018 y su relación con los fenotipos reportados por Enattah <i>et al</i> , en Finlandeses.	76
FIGURA 14.	Distribución de las Frecuencias Gaméticas a) observadas y b) esperadas para el análisis del desequilibrio de ligamiento.	79
FIGURA 15.	Distribución de Frecuencias Genotípicas observadas y esperadas para los SNPs C/T-13910 y G/A-22018 en tres grupos poblacionales de Colombia.	82
FIGURA 16.	Mapa político de África: Se muestran las 9 regiones de África donde se desarrolló el estudio de Mulcare <i>et al</i> 2004 ¹⁴³ para el análisis del genotipos C/T-13910	86

ANEXOS

	Pag.
ANEXO 1. Consentimiento Informado.	102
ANEXO 2. Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial.	103-107

ABREVIATURAS

µg: microgramo

µL: microlitro

AA: homocigoto relacionado con la persistencia de lactasa (G/A-22018)

ADN: ácido desoxirribonucleico

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

BH2T: test de hidrógeno espirado

C/T-13910: polimorfismo situado a 14 kb corriente arriba del gen de la lactasa

CC: homocigoto relacionado con hipolactasia (mala digestión) (C/T-13910)

CT: heterocigoto relacionado con la persistencia de lactasa (digestión) (C/T-13910)

-13910*C: alelo C de la variante C/T-13910, asociado con hipolactasia

-13910*T: alelo T de la variante C/T-13910, asociado con la persistencia de lactasa

dNTPs: didesoxinucleótido trifosfato

EDTA: etilen diamino tetra acético

G/A-22910: polimorfismo situado a 22 kb corriente arriba del gen de la lactasa

GA: heterocigoto relacionado con la persistencia de lactasa (G/A-22018)

GG: homocigoto relacionado con la no persistencia de lactasa (G/A-22018)

LCT: gen de la lactasa

LPH: lactasa florizin hidrolasa

Mb: megabase

mL: mililitro

ng: nanogramo

pb: pares de bases

PCR: Reacción en cadena de la Polimerasa

RFLP: Restriction fragment length polymorphic

PM: peso molecular

SNP: Single Nucleotid Polymorphism

TT: homocigoto relacionado con la persistencia de lactasa (C/T-13910)

RESUMEN

La Hipolactasia primaria tipo adulto (HPTA), es una condición muy frecuente en la especie humana, de herencia autosómica recesiva, determinada genéticamente por la presencia de variantes tipo SNPs corriente arriba del gen de la Lactasa, afecta a más del 50% de la población mundial y se caracteriza por una deficiente expresión de la Lactasa, resultante de la declinación de la actividad de esta enzima, en células intestinales, después del destete. Se ha determinado que la prevalencia de la HPTA varía ampliamente a nivel mundial, dependiendo del origen étnico y situación geográfica. Afecta a los asiáticos casi en un 100%, a los negros africanos en un 70% y a los caucásicos entre un 20 o 30%; en Colombia es mayor al 50%, siendo similar al de otras poblaciones de Latinoamérica. En la población restante, se conserva la actividad de la enzima, constituyendo el fenotipo lactasa persistencia, de carácter autosómico dominante y consiste en el mantenimiento, después del destete, de los altos niveles de la enzima, propios de la primera infancia. Su frecuencia varía, siendo mayor del 70% en el Norte de Europa; en algunas poblaciones nómadas del Norte y Centro de África y cercana al 90% en la mayoría de los Caucásicos. La HPTA se asocia a dos genotipos (C/C-13910 y G/G-22018) localizados aprox. a 14 kb y 22 kb corriente arriba del promotor LCT, del gen que codifica la lactasa-floricin hidrolasa, dentro de los intrones 9 y 13 del *Microsoma adyacente de Mantenimiento 6* (MCM6) en el cromosoma 2q-21. Varios estudios han demostrado que el genotipo CC de la variante C/T-13910, está asociado con una baja expresión del ARNm para la Lactasa y con una baja actividad de esta enzima en biopsias intestinales, sugiriendo HPTA, en comparación con los genotipos CT y TT, los cuales se asocian con alta expresión de ARNm específico y una alta actividad enzimática, siendo indicativo de Lactasa persistencia; estos polimorfismos podrían tener el mismo valor predictivo en otras poblaciones humanas. Un segundo SNP G/A 22018, no segregaba con la Hipolactasia en el 10% de los casos, se piensa que solo está en desequilibrio de ligamiento con la variante *T-13910. El objetivo de este proyecto fue determinar las frecuencias alélicas y genotípicas de los SNPs

C/T-13910 y G/A-22018 en una muestra de la población afrodescendiente del Caribe colombiano, para obtener información respecto a los perfiles genéticos poblacionales relacionados con la HPTA en esta población específica. Con estos resultados se generaron datos de valor antropogenético para la población afrocolombiana estudiada. Para tal propósito, se extrajo ADN a partir de muestras de sangre periférica de 130 afrodescendientes y se identificaron estos polimorfismos mediante la técnica PCR/RFLP; la digestión enzimática se realizó con las enzimas HinfI y HhaI. Las frecuencias alélicas y genotípicas, el Equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) y el equilibrio de ligamiento, se determinaron con la ayuda del software estadístico TFGA 1.3. Las frecuencias genotípicas para el polimorfismo C/T-13910 fueron CC (90%), CT (10%) y TT (0%). Las frecuencias alélicas para *C y para *T fueron de 95% y 5% respectivamente. Las frecuencias genotípicas esperadas por HWE fueron: CC (90%), CT (9,5%), TT (0.3%). Se estimó el HWE utilizando el test de Chi-cuadrado (χ^2 de Pearson); con un valor de 0.0961, indicando que la población se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg ($p > 0.05$). Para el polimorfismo G/A-22018 las frecuencias genotípicas observadas fueron: AA (42%), GA (58%) y GG (0%). Las frecuencias alélicas para *A y para *G fueron de 71% y 29% respectivamente. Las frecuencias genotípicas esperadas, por HWE fueron: AA (51%), GA (41%), GG (8%). Se estimó el HWE utilizando χ^2 ; en un valor de 19.82, indicando que la población no se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg ($p < 0.05$). De acuerdo con los resultados obtenidos, los SNP's propios de la población caucásica sí están presentes en esta población afrocaribeña, pero muestran un patrón de distribución diferente al encontrado en poblaciones norte-europeas. El polimorfismo C/T-13910 ofrece posibilidades de utilizarse como marcador genético de Hipolactasia en la población de estudio, pero G/A-22018 no parece estar ligado a Hipolactasia, por lo cual no sería un buen predictor de esta condición en la población de estudio. Un estudio de correlación es imperativo.

Palabras claves: *Hipolactasia tipo adulto, polimorfismos SNP, Lactasa o lactasa phlorizin hidrolasa (LPH).*

SUMMARY

Adult-type hypolactasia (AHP), a recessive autosomic condition, is frequently found in human populations. Several SNPs variants upstream of the gene encoding Lactase have been correlated with such phenotype. More than 50% of the world population has this condition, in which intestinal cells showed a reduced production of this enzyme after weaning. AHP prevalence amply fluctuates around the world, depending on the ethnical origin and geographic localization. All Asian descendants, around 70% of the black Africans, and approximately 20-30% of Caucasian people have been shown to have this phenotype. In Colombia, the prevalence of this condition is estimated to be around 50%, which is similar to those previously reported in other Latin American countries. There are some individuals in whom the the production of the enzyme is kept along the lifespan, and this has been named as the lactase persistence phenotype. The inheritance pattern shows a dominant autosomic trait, and the enzyme is produced as the same levels as those present in the early childhood. The prevalence of this condition also fluctuates, being higher than 70% in the Northern of Europe and in some nomads of the North and Center of Africa, while is close to 90% in most of the Caucasians. There are 2 genotypes associated to AHP, C/C-13910 and G/G-22018, which are approximately localized 14 kb and 22 kb upstream of LCT promoter – the gene encoding the lactase-floricin hydrolase (LPH). These SNPs are in the introns 9 and 13 of the microsome adjacent to Maintenance 6 (MCM6) located in the chromosome 2q-21. Several studies have demonstrated that the genotype CC of the variant C/T -13910 is associated with a low mRNA expression for lactase, which may explain the low enzymatic activity found in intestinal biopsies, suggesting AHP; while the genotypes CT and TT showed association with high mRNA expression and high level of enzymatic activity, which obviously indicates lactase persistence. These polymorphisms are expected to have the same predictive value for other populations. A second SNP G/A -22018, which

does not segregate with hypolactasia in 10% of the cases, is considered to be in linkage disequilibrium with the variant *T-13910. Consequently, the aim of the present work was to determine both allelic and genotypic frequencies of SNPs C/T-13910 and G/A-22018 in a sample of Afro-Colombian population resident in the Colombian Caribbean. This allowed both obtaining information regarding AHP genetic profile and estimating their prevalence in this specific population. In addition, these results provided important anthropogenetic data for the Afro-Caribbean population we studied. Our methodology consisted of isolating DNA from peripheral blood samples obtained from 130 afro-Colombians, and their polymorphisms were identified by PCR/RFLP – the enzymatic digestion was done using HinfI and HhaI. The allelic and genotypic frequencies, Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) and the linkage equilibrium were determined using the statistical software TFPGA 1.3. The genotypic frequencies for the polymorphism C/T -13910 were CC (90%), CT (10%) and TT (0%). The allelic frequencies for *C and for *T were 95% and 5% respectively. The expected HWE genotypic frequencies were: CC (90%), CT (9.5%), and TT (0.3%). The X^2 test for HWE was found to be 0.0961, which was in Hardy-Weinberg equilibrium ($p>0.05$). For G/A -22018 polymorphism, the genotypic frequencies were: AA (42%), GA (58%) and GG (0%). The allelic frequencies were 71% and 29% for *A and for *G respectively. The expected HWE genotypic frequencies were AA (51%), GA (41%), and GG (8%). The X^2 test was 19.82, indicating that the population was not in HWE ($p<0.05$). According to the results, Caucasian SNPs were present in this Afro-Caribbean population, but their profile had a different distribution pattern compared with the one found in northern European population. The C/T-13910 polymorphism may be used as a genetic marker for hypolactasia in this population, but G/A -22018 seems not to be linked with hypolactasia, therefore, it won't be a good predictor. A correlation study is an imperative.

Key words: Adult *Hypolactasia*, *SNiP polymorphism*, *Lactase o lactase phlorizin hidrolase (LPH)*.

INTRODUCCION

La lactosa es el principal azúcar de la leche; es un disacárido que es hidrolizado a glucosa y galactosa por la enzima Lactasa Phlorizin Hidrolasa (LPH), la cual se localiza en la microvellosidad del intestino delgado, teniendo una mayor actividad en el yeyuno¹. En la humanidad se presentan dos fenotipos de actividad de lactasa: Hipolactasia Primaria Tipo Adulto (HPTA) y la Lactasa Persistencia. El primero, también conocido como Lactasa No-persistencia ², es la más común de las deficiencias enzimáticas, está presente en más de la mitad de la población mundial, se hereda como un rasgo autosómico recesivo y es el resultado del declive fisiológico en la actividad de la LPH en las células intestinales después del destete. La HPTA puede generar mala digestión e intolerancia a la lactosa, limitando, así, el consumo de la leche y sus derivados^{3, 4}, puesto que la leche es la principal fuente de calcio para el mantenimiento de la integridad de los huesos en el adulto, se afectaría de manera importante la asimilación del calcio y a largo plazo podría predisponer al desarrollo de osteoporosis en edades tempranas de la vida. Así, se ha observado una elevada proporción de hipolactásicos entre sujetos con osteoporosis. ^{5, 6}

La HPTA tiene un papel significativo en la producción del dolor abdominal recurrente que se presenta en la población adulta. Su frecuencia varía ampliamente entre países, grupos étnicos y poblaciones. Es el fenotipo más prevalente en el Este y Sureste de Asia, y en África tropical con una frecuencia del 80 al 100%⁷, mientras que los descendientes del Norte de Europa, habitantes de oriente medio (Nigeria, Zaire y Tailandia) y en algunas tribus nómadas del Norte de África, la prevalencia de la HPTA varía entre el 1 al 18%.⁸ El segundo fenotipo, lactasa persistencia, se hereda como carácter dominante y se caracteriza porque quienes lo exhiben mantienen alta la actividad de la enzima en la vida adulta, lo que confiere una ventaja adaptativa frente a los individuos que son Hipolactásicos.⁹

El diagnóstico directo de la HPTA consiste en la determinación de la actividad de la lactasa a partir de la biopsia intestinal; este método es invasivo y además no refleja la actividad enzimática real del individuo, en la medida en que su resultado solo evalúa una pequeña área de la mucosa.¹⁰ Un método indirecto alternativo es la medición del Hidrógeno en el aliento después de la administración oral de lactosa; esta prueba evalúa la capacidad de digerir la lactosa, y en cierta proporción, se relaciona con la actividad enzimática.^{11,12} La inexactitud de las pruebas indirectas para el diagnóstico o lo contrario de la prueba directa, hacen necesario un test fiable, eficaz, no invasivo y que proporcione resultados en poco tiempo para el diagnóstico de la Hipolactasia primaria de tipo adulto en la práctica clínica.^{13,14,15,16} Recientemente se ha demostrado que el estado lactasa-persistente (LP) ó el estado lactasa-no persistente (LNP) del adulto se puede determinar genéticamente y se encuentran muy ligados al grupo étnico del que procede el individuo, por lo cual es importante identificar las variantes genéticas responsables de esta condición.

Recientemente se han descubierto las bases moleculares de la persistencia/no persistencia, al describir que los polimorfismos tipo SNP, C/T -13910 y G/A -22018, localizados aproximadamente a 14 kb y 22 kb, corriente arriba del gen de la Lactasa, presentan alelos que co-segregan con la Hipolactasia en un grupo de familias caucásicas estudiadas y por lo tanto se encuentran asociados con la persistencia/no persistencia de lactasa.^{17,18} Por tal razón, la identificación de estos polimorfismos se utiliza como método de diagnóstico molecular de HPTA en esa población. Efectivamente, se ha observado que en los individuos Finlandeses que presentaron el genotipo C/C para el SNP C/T-13910 y el genotipo G/G del polimorfismo G/A-22018 se presenta el fenotipo Hipolactasia.¹⁹ Este planteamiento ha inducido estudios orientados a entender el origen y la evolución de la mutación responsable de la Hipolactasia en los humanos.^{1,20,21}

La perfecta correlación existente entre el genotipo C/C-13910 y la baja actividad de la enzima Lactasa, explica que la variante C/T-13910 se puede utilizar para el test de screening primario de la HPTA en la práctica clínica^{22,23, 24}

En Colombia, se han estimado frecuencias de la condición hipolactásica cercanas al 60%²⁵, lo que concuerda con las estimaciones generales para Latinoamérica²⁶. Sin embargo, debido a las diferencias étnicas existentes entre los grupos que componen la población colombiana, se esperaría encontrar regiones o zonas con mayor o menor prevalencia de HPTA.

La etnografía de Colombia se caracteriza por ser el resultado de la mezcla de tres grupos raciales primarios: principales: indígenas, europeos y africanos, de tal forma que la población colombiana está compuesta por tres grupos étnicos principales que son, indígenas (amerindios), afrodescendientes y mestizos. Según datos del DANE, con base en el Censo general de población de 2005, se identificó como Blanco y Mestizo el 86%, indígena el 3,43% y afrocolombiana el 10,6%²⁷. El 32% de la población afrocolombiana, equivalente a 1.380.102 habitantes, reside en los diferentes departamentos del Caribe. En San Basilio de Palenque, departamento de Bolívar, se encuentran aproximadamente 3.762 habitantes, pertenecientes a 681 familias que habitan 592 viviendas. La población fue fundada por esclavos africanos que se fugaron y constituyeron los palenques de la Costa Norte de Colombia durante el periodo colonial. San Basilio es el único palenque que ha conservado su identidad y sus elementos culturales propios, siendo testimonio de la riqueza y trascendencia cultural africana en el territorio colombiano.

En este estudio, la búsqueda de los SNPs C/T -13910 y G/A -22018 en una muestra de la población afrodescendiente de San Basilio de Palenque de la Costa Caribe Colombiana, permitió caracterizar la estructura genética de la población para dichos SNPs, determinando las frecuencias fenotípicas y genotípicas de tales

variantes. Los resultados podrían servir como un punto de referencia para el estudio de los caminos evolutivos y aspectos genético-demográficos que han marcado la historia de esta población y permiten explorar la posibilidad de saber si es factible utilizar la detección de estos *SNPs* como prueba diagnóstica de la HPTA en la población de estudio

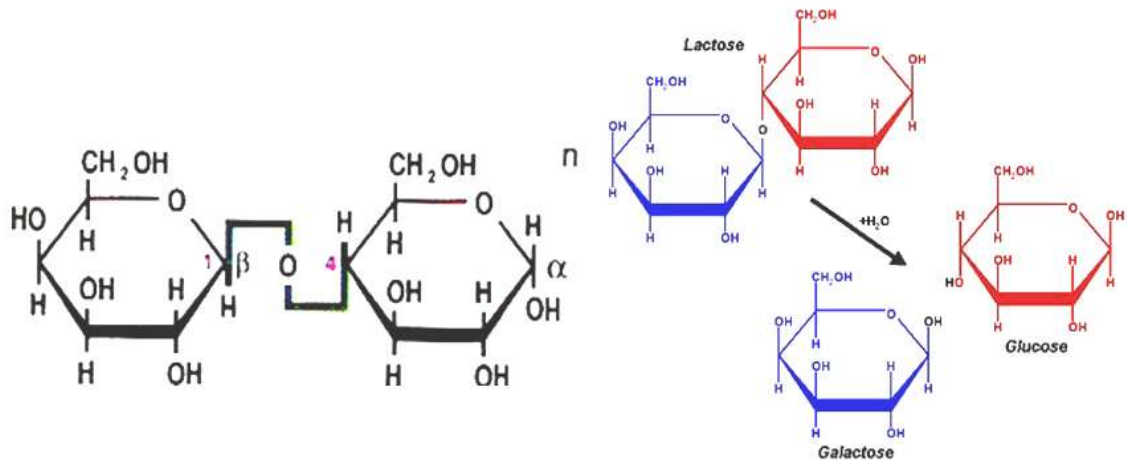
REVISION BIBLIOGRÁFICA

1. LACTOSA Y SU METABOLISMO

1.1 Estructura química y características de la Lactosa

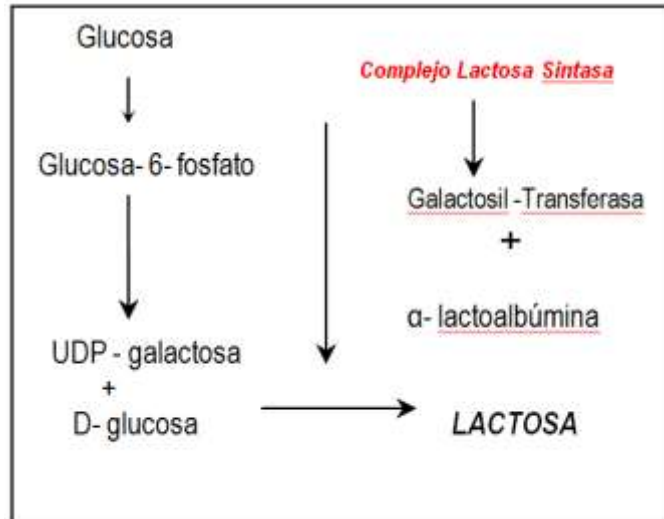
La Lactosa (*beta-D-galactopiranosil-D-glucopiranososa*), es un disacárido formado por la β -D-galactopiranososa (galactosa) y la α -D-glucopiranososa (glucosa) acopladas por los carbonos 1 y 4, respectivamente ²⁸, mediante enlace O-glucosídico $\beta(1-4)$, con pérdida de una molécula de agua (Figura 1). ²⁹

Figura 1: Fórmula estructural de la Lactosa : β -D-Galactopiranosil-(1-- 4)- α -D-Glucopiranososa y proceso de hidrólisis de la Lactosa (Tomado de la referencia²⁹)



La lactosa es el único disacárido que se encuentra en la leche de los mamíferos; es sintetizada en la glándula mamaria por acción del complejo Lactosa Sintasa, formado por dos enzimas: la uridindifosfato- β 1,4-Galactosil *Tranferasa* (EC2.4.1.22) y la α -lactoalbúmina (Figura 2). ^{30, 31.}

Figura 2: Acción del Complejo Lactosa-Sintasa (Tomado de la referencia ³⁰)



La leche humana tiene un alto contenido de lactosa (7%), la leche de vaca tiene 4,8% de lactosa, este disacárido comprende la mayor fuente de carbohidratos durante el periodo neonatal.

1.2 Metabolismo de la Lactosa

Después de la ingestión de lactosa, ésta es digerida (hidrolizada) en dos monosacáridos, glucosa y galactosa, por la enzima Lactosa floricin hidrolasa (LPH), ubicada en el borde de cepillo del epitelio intestinal, principalmente en el yeyuno. La lactosa que no se digiere en el intestino delgado se metaboliza por acción de la flora bacteriana colónica, lo que produce gases como hidrógeno, dióxido de carbono y metano, de los cuales se absorbe el 98%; mientras el 2% a 2,5% de ellos se excreta por vía rectal. Además, se producen ácidos grasos de cadena corta como acetato, butirato y propionato, que la flora comensal colónica utiliza como fuente de energía.

1.3. Valor nutritivo de la Lactosa

La leche constituye uno de los alimentos naturales más completos y equilibrado, su valor nutritivo es tal que no puede ser fácilmente sustituida por otros alimentos. Es uno de los alimentos básicos de la nutrición humana, por la diversidad y asimilación de los compuestos esenciales que la integran, incluyendo proteínas, calcio, potasio, fósforo y riboflavina. Según datos de la FAO³², cubre más del 20% de las necesidades energéticas, 25% de las proteínas y 50% del calcio de la población en países desarrollados.³³ El aporte calórico de la lactosa es muy importante en la primera infancia, ya que durante este período los hidratos de carbono ingeridos representan 35-50% del total de calorías de la dieta.

El principal hidrato de carbono en la leche es la lactosa, su concentración es relativamente constante y promedia alrededor del 5%, además de ser fuente energética, aporta galactosa, necesaria para la producción de galactolípidos propios de los cerebrósidos y glucolípidos claves para el desarrollo del sistema nervioso central.³⁴

La leche es buena fuente de calcio y fósforo, necesarios para el crecimiento del esqueleto del lactante y el mantenimiento de la integridad de los huesos en el adulto. La digestibilidad del calcio y fósforo es generalmente alta, en parte debido a que se encuentran en asociación con la caseína de la leche³⁵. Además de aportar nutrientes esenciales para el mantenimiento óptimo de la salud en adolescentes y adultos jóvenes, la leche proporciona el calcio necesario para el desarrollo óseo en las distintas etapas del crecimiento y el mantenimiento de la densidad ósea en la edad adulta cuando ésta empieza a decrecer³⁶. Por lo tanto debe ingerirse leche diariamente desde el nacimiento a través de la leche materna y a lo largo de la vida a través de la leche y productos lácteos.³⁷

2. LACTASE-PHLORIZIN HYDROLASE (LPH)

2.1 Estructura y Función de la enzima LPH

La lactosa de la dieta no se absorbe a través del epitelio intestinal, sino que es hidrolizada a galactosa y glucosa, por acción de una disacaridasa (Figura 1), la LPH. Esta enzima es una β -galactosidasa de 150 kDa, codificada por el gen de la Lactasa (*LCT*), de aproximadamente 50 kb ³⁸, sintetizada en los enterocitos a partir de una proteína precursora de 220 kDa tras un complejo proceso de transcripción, traducción y maduración. ³⁹

La LPH se ubica exclusivamente en la superficie apical del borde en cepillo de los enterocitos, donde está anclada a la membrana por su extremo C-terminal y tiene la mayor parte de la molécula proyectándose hacia el intestino¹. Su máxima expresión se encuentra en el intestino medio (yeyuno y el íleon proximal) y sus bajos niveles de actividad en el duodeno e íleon distal. ^{40, 41, 42}

Es una enzima multifuncional con dos actividades enzimáticas, actúa como Lactasa (*E.3.2.1.108*) responsable de la hidrólisis de la lactosa a glucosa y galactosa, y como Floricin hidrolasa (*EC 3.2.1.62*) con una actividad de B-glicosidasa para ceramidas glicosiladas. ^{43,44,45}

La actividad lactasa está restringida en mamíferos, mientras que la actividad Floricin hidrolasa ha sido detectada en vertebrados. Ambas actividades catalíticas están localizadas en posiciones diferentes en la proteína que apuntan hacia un modelo con dos sitios activos. ^{46,47,48}

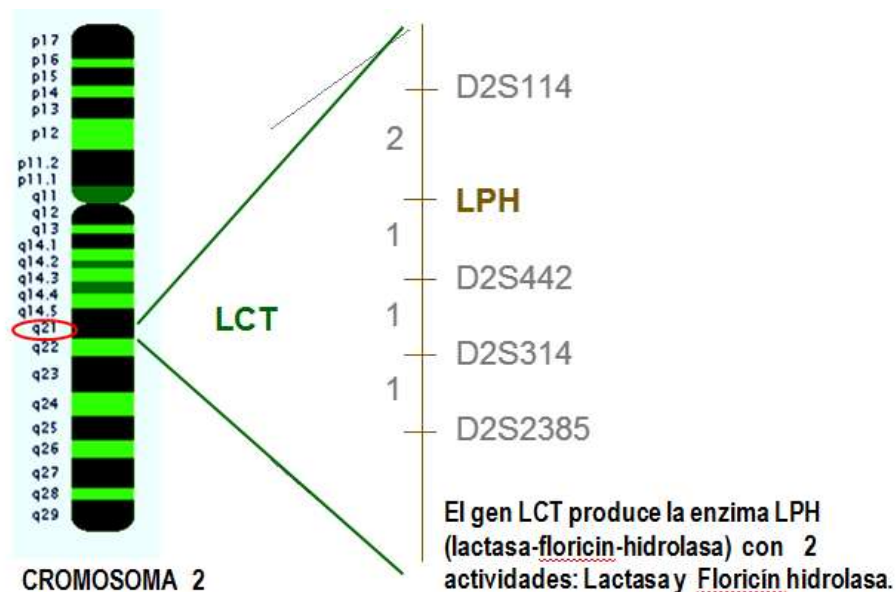
La actividad de la lactasa es baja durante los dos primeros tercios de la gestación, después su producción y su capacidad hidrolítica están presentes al iniciar el segundo trimestre de vida fetal. En los recién nacidos prematuramente la

actividad de la lactasa suele estar disminuida, aumenta progresivamente en el neonato, permanece discretamente elevada durante la primera infancia y en la mayor parte de la humanidad, después del destete, aproximadamente a los cinco años de edad y por razones genéticas, su actividad declina, significativamente⁴⁹, de tal manera que en la vida adulta solo se tiene alrededor de 5- 20% de la actividad que se tuvo durante la etapa de lactación.⁵⁰

2.2 Estructura del Gen de la Lactasa (*LCT*)

El gen que codifica para lactasa-floricin hidrolasa fue localizado, en 1988, en el cromosoma 2q y más específicamente en 2q21, en 1993. El gen *LCT* está localizado en el brazo largo del cromosoma 2q21 (Figura 3), alcanza un tamaño genómico de 50 kb y está compuesto de 17 exones, desde 79 a 1551 pb en tamaño ^{51,52}, presenta una región promotora de 1 kb que precede al gen *LCT*.
51,94

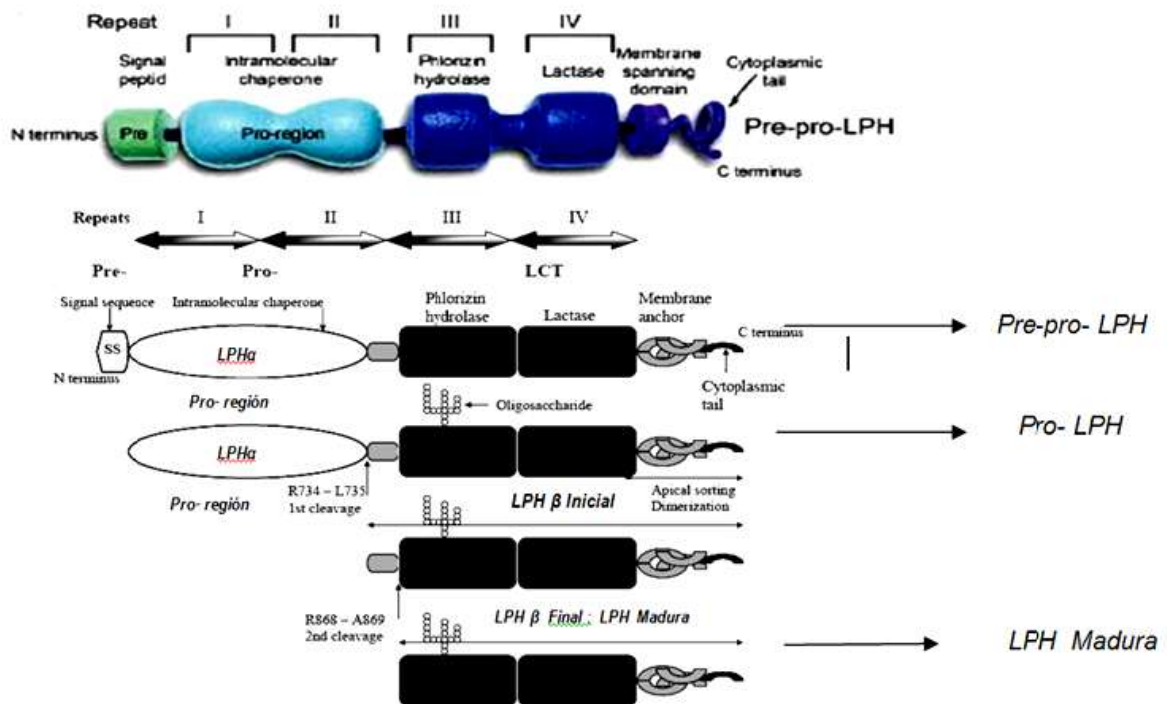
Figura 3: Locus del Gen *LCT* localizado en el Cromosoma 2: 2q21. Fine mapping of LPH in 1993 (Harvey et al ⁵¹). Sequence and mapping of LPH in 1988 (Mantei et al ⁵² Kruse et al ⁹⁴)



El tamaño del RNA mensajero (mRNA) de la LPH humana es de 6274 bases (6.2 kb), desde el codón de iniciación hasta el codón Stop, codifica para una pre-proteína que contiene 1927 aminoácidos⁴¹, el producto primario de traducción (pre-pro-LCT)⁵³, contiene 5 dominios, dos de ellos no aparecen en la proteína madura; un pre-dominio con una secuencia señal de 19 aminoácidos en el extremo amino terminal la cual es clivada durante el proceso de maduración; un pro-dominio de 849 aminoácidos⁵⁴ que incluye las secuencias repetidas I y II, la cual es clivada en el retículo endoplásmico produciendo la denominada LPH α , que se ha descrito como chaperona intramolecular de la misma proteína. Los dominios III y IV, corresponden a una enzima madura; un dominio extracelular de 1014 aminoácidos llamado LPH β , cadena polipeptídica que contiene tanto el sitio de catálisis de la floridin hidrolasa (secuencia repetida III) y un sitio de actividad lactasa (secuencia repetida IV), un dominio transmembrana hidrofóbico de 19 aminoácidos que funciona como sitio de anclaje a la membrana celular y un dominio hidrofílico citoplasmático en el extremo C-terminal de 26 aminoácidos (Figura 4).⁵⁵

La comparación de secuencias nucleotídicas indica que la región codificante está comprendida por cuatro secuencias aminoacídicas repetidas, homólogas al de una β -glicosidasa, sugiriendo que el gen es el producto de dos eventos de duplicación génica durante la evolución.^{56, 57} Los cuatro dominios simétricos, los dominios I y II son importantes para el correcto plegamiento de la proteína naciente, los cuales son eliminados durante el proceso de maduración quedando una proteína madura compuesta por dos dominios que contienen un sitio activo cada uno (dominio III y IV).⁵⁸

Figura 4: Estructura y Biosíntesis de la Lactasa (Tomado de la referencia ^{45, 59, 60})



Mediante un estudio desarrollado, donde utilizaron un mecanismo basado en la inhibición de la actividad enzimática, se demostró que la actividad lactasa de la LPH aislada del intestino está exclusivamente localizada en el sitio de actividad de la región IV. Además encontraron que la actividad florición hidrolasa está localizada en la región III, aunque una pequeña contribución de esta actividad está en el sitio de actividad IV ($\approx 10\%$). Aunque aún no ha sido discutido, actualmente se considera que el sitio activo de Glu 1273 en el dominio III es responsable de la hidrólisis de los glúcidos como el floricin, mientras que el otro dominio IV Glu 1749 cataliza la hidrólisis de los galactosidos como la lactosa. ⁶¹

El mRNA del LCT se expresa solamente en las vellosidades de los enterocitos a nivel del intestino delgado, pero está presente en muy pequeñas cantidades en el colon fetal. El yeyuno distal y el íleon proximal contienen altos niveles de mRNA del LCT mientras que los niveles disminuyen a lo largo del yeyuno proximal e íleon

distal.⁶² El mRNA del gen *LCT* permanece bajo justamente antes del nacimiento, y después se aumenta y permanece elevado hasta el destete, cuando declina al menos el 10% del valor neonatal.⁶³ Esta disminución post-destete de la expresión del mRNA del gen *LCT* se mantiene a lo largo de la vida adulta.^{64,65}

2.2 Biosíntesis de la LPH

La estructura primaria completa de LPH humana se estableció en 1988 y la organización completa intrón-exón en 1991. Actualmente se conoce que la LPH es sintetizada como un polipéptido de alrededor de 220 kDa que luego sigue una ruta de procesamiento compleja que incluye una glicosilación con unión N y O carbohidratos, obteniéndose así una forma intermedia de peso molecular de por encima de 280 kDa y a partir de esta, a través de uno o dos pasos de proteólisis se obtiene un producto maduro con un peso molecular de alrededor de 160 KD.⁴¹

La enzima LPH sufre un proceso de maduración pos-traducciona que incluyen primeramente el corte de la secuencia de 19 aminoácidos de la Pre-pro-proteína a Pro-proteína, que tiene lugar en el retículo endoplasmático (RE) y ocurre durante el proceso de translocación de la Pro-LPH a través del RE.^{56,66} Seguido a esto, se llevan a cabo varias reacciones de glicosilación, necesarias tanto para la actividad enzimática, como para el transporte intracelular de la enzima^{67,68,69} y además como en otras glicoproteínas, la glicosilación tiene un rol en la degradación de la enzima, pero aun no está claro si esta posee un papel en la marcación intracelular de la lactosa a nivel de las microvellosidades o en el desarrollo de cambios en la expresión de la actividad de la lactasa.² La pro-LPH es N-glicosilada formando una estructura rica en manosa para luego formar un homodímero en el RE. La dimerización envuelve al dominio transmembranal C terminal y la región final citoplasmática⁷⁰. Posteriormente la pro-LPH es transportada al complejo de Golgi donde es O glicosilada. Existen evidencias que la lactasa es O-glicosilada por serinas y treoninas, como también N-glicosilada por asparagina y que ésta

glicosilación afecta probablemente la actividad enzimática así como el transporte intracelular ⁷¹. Parece ser que la función de la Pro-secuencia solo está relacionada con la necesidad de la salida de la LPH del RE, demostrado por algunos estudios, la Lactasa expresada en las células COS sin su Pro-secuencia es retenida en el RE. ^{72,73,74} Una vez modificada la lactasa en su composición de carbohidratos en el aparato de Golgi, ella sufre clivajes proteolíticos por la tripsina pancreática. La LPH β final dimeriza y se colocaliza en la membrana del enterocito maduro.

El corte proteolítico de la proteína madura parece ocurrir de la siguiente manera: El primero ocurre intracelularmente y remueve el largo fragmento de LPH α en arg 734/Leu 735 resultando en una LPH β inicial Leu 735/Tyr 1927. ^{64, 75} Luego la LPH β inicial se dirige a la superficie de la membrana intestinal y es cortada por una tripsina en Arg 868/Ala 869 alcanzando una enzima madura LPH β final de 160 Kda. ^{61,66} En un estudio realizado por Jhon White, evidenció la forma de la proteína de 190 kda que se acumuló por varias horas antes de detectar cantidades significativas de la proteína madura. Este proceso coincide con la disminución secuencial en la cantidad de la forma precursora de la lactasa presente, rica en manosa, lo que soporta el papel de esta forma molecular como un cierto intermediario en la biosíntesis de la lactosa humana.

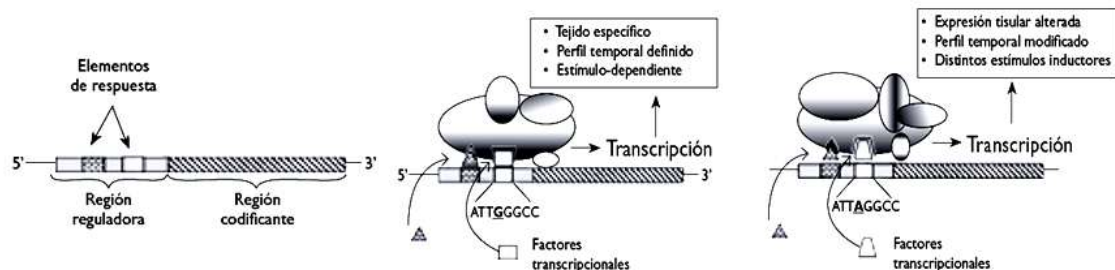
2.3 Regulación de la expresión genética de LPH

La regulación de la expresión genética se refiere a los mecanismos celulares que controlan el perfil espaciotemporal del producto funcional de un gen. La regulación puede actuar a nivel de la transcripción o a nivel postranscripcional.

La intensidad de la transcripción de un gen que codifica a una proteína depende, al menos, de la unión de factores de transcripción activados a regiones reguladoras en la molécula de ADN y del reclutamiento del complejo activo de la ARN polimerasa II, que en conjunto determinan la frecuencia de síntesis del

ARNm correspondiente.⁷⁶ Los factores de transcripción son proteínas que al unirse a sitios específicos del ADN, denominados elementos de respuesta (ER) de aproximadamente 4 a 15 pb, pueden interactuar con otros factores transcripcionales para formar un complejo de proteínas y ADN que permite la iniciación de la transcripción del gen. Diferentes familias de factores transcripcionales reconocen distintos ER. Los cambios sutiles en la secuencia de un ER pueden inducir cambios en la afinidad con la que se une el factor transcripcional correspondiente y modificar así los niveles de transcripción (Figura 5).^{77, 80}

Figura 5: Importancia de los polimorfismos de un solo nucleótido en regiones reguladoras (rSNPs) (Tomado de la referencia ⁷⁷)



Un gen posee una región reguladora que contiene elementos de respuesta reconocidos por factores de transcripción y una región codificante que tiene la información necesaria para sintetizar una proteína. Para que un gen se exprese en una célula determinada, ésta debe poseer los factores de transcripción adecuados; además, los elementos de respuesta deben estar expuestos para que puedan reconocerlos los factores transcripcionales.⁷⁸

En los vertebrados, los ER pueden encontrarse en tres tipos de regiones reguladoras conocidas. Los que componen al promotor suelen localizarse dentro de las primeras 1000 pb en la región 5' del inicio de la transcripción; otros pueden situarse a grandes distancias de dicho sitio (hasta 100 kb 5' o 3' del gen) en

estructuras conocidas como *enhancers* (o potenciadores), que pueden incrementar la frecuencia de inicio desde el promotor con el que se relacionan, así como en los *silencers* (o silenciadores), que pueden reducir o suprimir la transcripción.⁷⁹ Las mutaciones en los ER de cualquiera de estos tres tipos de regiones reguladoras en el genoma (rSNP) pueden modificar la transcripción e influir en el fenotipo del individuo.

Los factores que afectan la transcripción también pueden catalogarse como factores en *cis*, aquellos que ejercen su efecto en la misma cadena de ADN y cerca del gen en cuestión. Los elementos de respuesta y sus variantes polimórficas, afectan la transcripción en *cis*. Por otro lado, los efectos en *trans* surgen de un gen o factor adicional. Los efectos en *trans* pueden originarse por factores no genéticos, como estímulos ambientales (drogas, patógenos, enfermedades) o bien variaciones genéticas en otros genes (p. ej., factores transcripcionales) que afectan la expresión del gen en cuestión.^{80 81}

El gen de la lactasa tiene un patrón de regulación complejo, tanto a nivel celular (la expresión dependiente de la diferenciación en los enterocitos), como a nivel de órgano (expresión diferencial específica para los tejidos a lo largo del eje longitudinal del intestino delgado) o durante el desarrollo (el declive post destete).

Se ha descrito que la secuencia contexto al polimorfismo C/T (13910) funciona como un elemento en *cis* para la regulación transcripcional del gen de la lactasa, sobre el cual se unen factores proteicos que eventualmente aumentan la transcripción.⁸ Estudios *in vitro* sobre el promotor de la lactasa y los factores de transcripción que regulan la expresión de la lactasa, han identificado algunos de los mecanismos moleculares potenciales que controlan esta regulación. En el patrón de expresión de este gen, intervienen varios factores de transcripción como GATA-4, -5 y -6, el factor nuclear del hepatocito 1 α (HNF1 α), HOXC11 y Cdx2, los cuales se unen al promotor o cerca de este, en una región de 150 pb del

promotor, justo corriente arriba del sitio de transcripción inicial, esta secuencia está bien conservada en ratas, ratones, conejos, cerdos y humanos, indicando que en esta región, se localizan importantes elementos reguladores en *cis*- (Figura 6).

Figura 6: Secuencia conservada de ADN que comprende el promotor del gen LCT (150 pb) en varias especies, mostrando los puntos de unión de algunos factores de transcripción. (Tomado de la referencia ⁷⁷)

	-149	CE-1c (Cdx-2)			
human	.TCTTTACAT	TTTTAAATAT	TGCATTAGTG	AACCGTGTAC	TGATTTTGTG
pig	.TTTTTAAAT	TTTTTGATAT	TTCATT..G	AACATGTAC	TATTTTATT
rat	CTTTTCCCC	CTGAAGATTA	TAC.TGGCTG	AACCAAGTTC	TGATTTATCT
mouse	.CTTTCCCC	TTGAAGGTTA	TACCAGT.TG	ATCCAAGTTC	TGATTTATCT
		GATA CE-2c (HNF-1α)		GATA	
human	ATCATAGATA	AACCAGTTAA	ATATTAAGTC	TTAATTATCA	CTTAGPATTT
pig	ATCAGAGATA	AACCAGTTAC	ATATTAAGTG	TTAAAAATCA	CCTAGPATTT
rat	ATCCTAGATA	AACCAGTTAA	ATATT..GTG	TGGATAATCA	CTATG..TTT
mouse	GTCCTAGATA	AACCAGTTAA	ATATT..GTA	TGGATAATCA	CT..GTATTT
		CE-1a (Cdx-2)	TATA	Pdx-1	-12
human	TACAACTCA	GTTGCAGTTA	TAAAGTAAGG	GTTCCACAT	
pig	TACAACTCA	GTTGTAGTTA	TAAAGTAAGT	ATTCTGCAG	
rat	TACAGCCTTG	GCTGTGCTCA	TAAAGTTAGG	ATTCCTTCC	
mouse	TACAGCCTTG	GCTGTGCTCA	TAAAGTCAGG	ATTCCTTCC	

Análisis funcionales del promotor han revelado que esta parte proximal del promotor de la lactasa tiene una baja actividad en líneas de células intestinales y que no tienen actividad en los tipos de células no intestinales. ^{82,83,84,85,86}

Estudios In vitro proporcionan evidencia que el alelo 13910*T incrementa la transcripción del promoter-reporter de ensayos realizados en líneas celulares, ^{87 88} ⁸⁹ sugiriendo que puede tener actividad enhancer In vivo.

Hace poco tiempo se logró co-purificar in vitro la proteína Oct-1 ligada al contexto del C/T, pudo demostrarse por ensayos de transfección que la unión de Oct-1 a la variante 13910*T, aumenta la transcripción del gen LCT mas que la variante nativa G, proporcionando un posible mecanismo para el up-regulación de LCT,⁷⁸

sugiriendo que la causa de persistencia de la lactasa ha sido identificada.⁹⁰ No obstante Oct-1 no explica el aumento de la transcripción con el polimorfismo G/A 13915 lo que indica que la proteína de unión que funciona como elemento en *trans* aún sigue sin identificarse.¹²¹

3. DEFICIENCIAS DE LACTASA

3.1 Terminología y clasificación de las deficiencias de lactasa

Desde el punto de vista genético hay dos tipos de deficiencia de lactasa: primaria y secundaria.

3.2. Deficiencia Primaria de Lactasa

La deficiencia primaria puede ser congénita o puede aparecer después de la infancia ó en la vida adulta.

3.2.1. Deficiencia de Lactasa Congénita (DCL)

Es una forma de deficiencia primaria de lactasa, una situación originada por una ausencia casi total de actividad de lactasa en la mucosa intestinal, aunque sean normales las demás enzimas intestinales y exista normalidad morfológica de la mucosa. La DCL es heredada como un rasgo autosómico recesivo, pero no se conocen con exactitud los mecanismos moleculares. Es un error metabólico raro que prevalece en la población Finlandesa, con una incidencia estimada de 1 en 60,000 recién nacidos en Finlandia y hasta el momento se han encontrado 46 pacientes mientras que en otras partes del mundo se han reportado sólo 18 casos. Se considera como parte de la herencia finlandesa de enfermedad, enriquecida en la población finlandesa debido el efecto fundador y a la deriva genética. Casos individuales de DCL se han reportado fuera de Finlandia. Se

detecta por la aparición de los síntomas tan pronto como el recién nacido es alimentado con leche conteniendo lactosa. Fue descrita por Holzel desde 1959, se manifiesta desde el nacimiento y constituye la verdadera deficiencia de lactasa. El diagnóstico se hace determinando la actividad enzimática en la biopsia, la actividad de lactasa en las biopsias de yeyuno se observan en el rango de 0 a 10 U/g proteína y el tratamiento consiste en retirar la leche de la dieta, los niños se recuperan, con crecimiento y desarrollo normales.

3.2.2. Hipolactasia Primaria Tipo Adulto

La hipolactasia tipo adulto fue reportada por grupos italianos y suecos en 1963. Constituye el trastorno genético más frecuente en la especie humana, con fenotipo ancestral, afectando a más del 50% de la población mundial. Se caracteriza por una pérdida de la capacidad de digerir la lactosa antes de la adultez o antes de la vida adulta, resultando la Hipolactasia de tipo adulto. La disminución de lactasa intestinal puede aparecer entre los dos y los cinco años de edad, avanza progresivamente y no se recupera en edades posteriores. La reducción es irreversible por estar programada genéticamente a través de un mecanismo autosómico recesivo, rasgo que lleva a la baja regulación de la actividad de la lactasa en la mucosa intestinal.^{91,92,93} Este tipo se encuentra en varias culturas asiáticas y africanas donde el consumo de productos lácteos industrializados y comerciales es poco común. La hipolactasia tipo adulto causa la maldigestión primaria de lactosa.

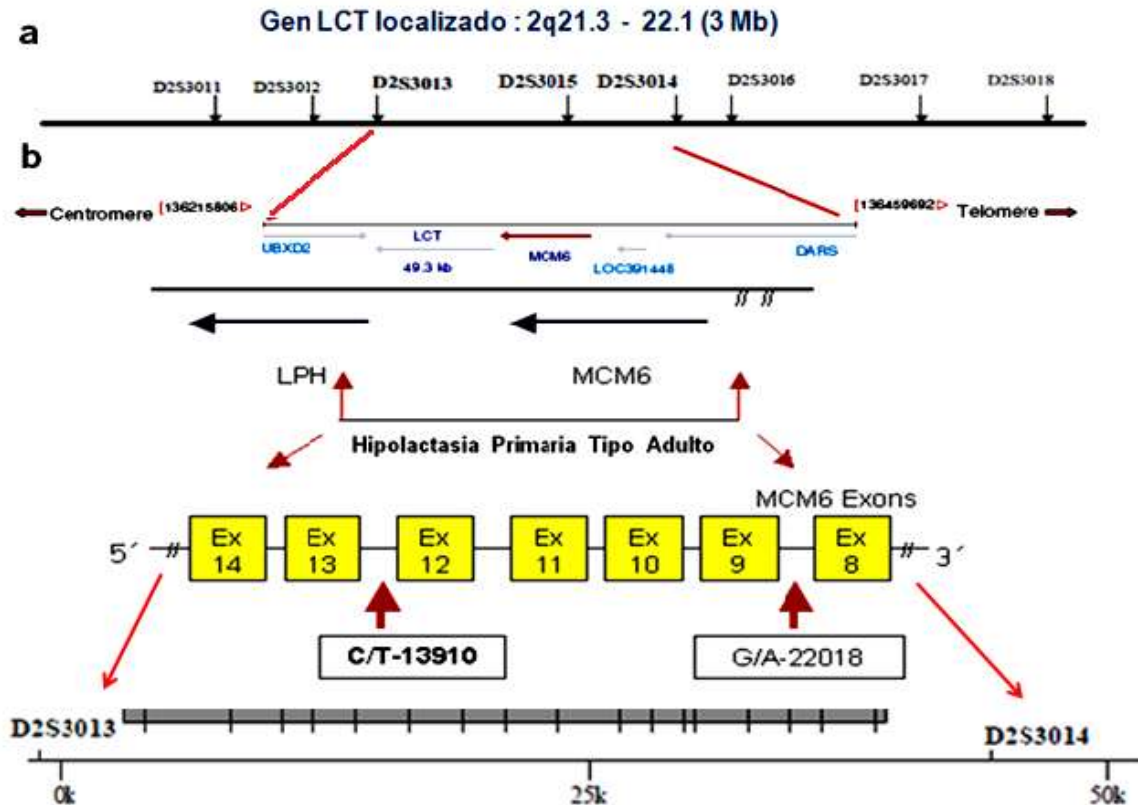
3.2.2.1 Mecanismos que son la base de la Hipolactasia Primaria Tipo Adulto

Estudios realizados con sujetos de diferentes partes del mundo, confirmaron que la deficiencia de lactasa de tipo adulto es una característica racial y los estudios en familias mostraron que es un carácter genético que se transmite de forma autosómica recesiva.

Uno de los estudios más importantes en el desarrollo del conocimiento genético sobre la hipolactasia de tipo adulto, pertenece a un equipo de investigadores finlandeses: Enattah *et al.*¹⁹ Ellos realizaron estudios de ligamiento utilizando varios marcadores microsatélites localizados en la vecindad del gen LCT en familias finlandesas. Los análisis de los marcadores microsatélites sugirieron que esta región contenía una mutación causal. Utilizando el desequilibrio de ligamiento y el análisis de haplotipo de los marcadores estrechamente ligados, la región más probable fue localizada en el exterior del gen LCT. El equipo encontró una asociación completa entre la no persistencia de la lactasa, verificada bioquímicamente, en unas familias finlandesas y los polimorfismos C/T-13910 y G/A-22018, situados a 14 kb y 22 kb, respectivamente, corriente arriba al promotor del gen LCT ubicados en segmentos intrónicos del gen MCM6 que codifica para una proteína del ciclo celular. El polimorfismo C/T-13910 es el más fuertemente asociado con los rasgos persistente y NO persistente, de tal forma que el 100% de las personas con la variante C homocigótica presentan hipolactasia y un poco más del 95% de las personas con la variante T homocigótica son lactasa-persistentes, esto en las poblaciones del norte de Europa y las derivadas de esta. (Figura 7).

El gen de la lactasa (LCT) se consideró un gen candidato evidente para la Hipolactasia⁹⁴, por lo que Wang *et al.*⁹⁵ se propusieron investigar si esas supuestas variantes genéticas (C/T-13910 y G/A-22018) actuaban en *cis*- o bien si se debían a factores *trans*- activadores, por lo que estudiaron polimorfismos intra-génicos y vieron que había una correlación con los niveles de expresión del gen, lo que significa que el polimorfismo responsable de persistencia/no persistencia se encontraba en *cis*- .

Figura 7: Ubicación de las Variantes asociadas a HPTA: SNPs C/T-13910 y G/A -22018 corriente arriba del gen LCT en MCM6 (Tomado de la referencia ¹¹⁹).



La Hipolactasia tipo adulto, está asociada a la disminución de la actividad de la lactasa intestinal; ésta se encuentra genéticamente determinada, por un gen localizado en el cromosoma 2 que codifica para la pérdida de su expresión y que es autosómico recesivo ⁹⁶, mientras que su persistencia es establecida por un gen autosómico dominante.⁹⁷ Una serie de complejos mecanismos que intervienen en el procesamiento, la externalización y la activación enzimática de la lactasa, hacen que se presente la Hipolactasia tipo adulto.

3.2.2.2 Características clínicas

Los bajos niveles de la enzima pueden ocasionar maldigestión de lactosa, dependiendo de la cantidad de ésta y del propio nivel enzimático; la maldigestión puede provocar manifestaciones desagradables tales como diarrea, flatulencia y dolor, en cuyo caso el individuo es intolerante. La intolerancia genera aversión a la leche con lo cual el individuo, al no consumirla, se priva de la leche, alimento rico en proteínas de alto valor biológico, fuente de nutrientes energéticos, vitaminas y minerales, entre ellos el calcio. Una baja actividad de la lactasa provoca a menudo síntomas como la diarrea, el dolor abdominal o flatulencia, después del consumo de grandes cantidades de leche fresca o de otros productos lácteos. Esto ocurre porque la lactosa no es hidrolizada eficientemente en el intestino delgado y como consecuencia, llega al íleon distal y al colon, donde la lactosa es fermentada por las bacterias. Los productos de fermentación provocan los síntomas de intolerancia a la lactosa, causando trastornos metabólicos, limitando, así, el consumo de la leche y otros productos derivados de la leche ^{5,6}

3.2.2.3. Métodos de Diagnóstico

La HPTA por si sola no produce molestias en los sujetos hipolactásicos, sólo después de la ingestión de alimentos que contengan lactosa se padecen los síntomas, que van desde meteorismo, flatulencia, dolores abdominales, sensación de plenitud y cólicos, hasta diarrea. ⁹⁸ Existe una considerable variación de la manifestación de los síntomas, lo cual depende de la carga láctea ingerida y la sensibilidad individual a los trastornos intestinales.

Existen dos tipos de métodos para el diagnóstico de HPTA: el método directo y los métodos indirectos ^{99, 100, 101}.

3.2.2.3.1. Método Directo

El diagnóstico directo de la HPTA se basa en la medición de la actividad de la LPH en biopsias intestinales por medio de la medición de galactosa o glucosa liberada después de la hidrólisis de la lactosa, por acción de la enzima ¹⁰. El diagnóstico positivo de Hipolactasia es sugerido cuando la actividad de la lactasa es <10 UI / g y la relación lactasa/sacarasa sea $<0,3$ con una histología normal. ²²

Desde su publicación, el método descrito ha sido el estándar de oro, pues mide los productos directos de la actividad de la lactasa sobre el sustrato. Sin embargo, este análisis resulta ser muy invasivo por lo que no se realiza frecuentemente. Por otra parte, esta prueba no refleja el estado fisiológico general del individuo en la medida en que su resultado determina la actividad enzimática en un punto determinado del intestino, a pesar de que la enzima se encuentre en una gran superficie de la mucosa intestinal.

3.2.2.3.2. Métodos Indirectos

El diagnóstico indirecto está basado en pruebas con las que se puede evaluar la capacidad del individuo para digerir lactosa y que en cierta proporción se relaciona con la actividad enzimática. Dentro de estas pruebas se encuentran: La medición del incremento del Hidrógeno eliminado en el aliento y Prueba de Tolerancia a la lactosa.

3.2.2.3.2.1. Prueba de Tolerancia a la lactosa (LTT)

Se basa en las mediciones del aumento de los niveles de glucosa en sangre tras una carga oral de lactosa. Dado que la lactasa hidroliza la lactosa produciendo galactosa y glucosa, y esta última es absorbida por el intestino y llevada a la sangre la medición del aumento de la glucosa en sangre refleja la actividad de la

enzima ¹⁰². La Hipolactasia se diagnostica si la concentración de glucosa en sangre aumenta 20 mg/100 por encima del nivel basal, en cualquier medición durante 2 horas, después de la administración de la lactosa. ¹⁰³ Se trata de un examen que mide la capacidad de los intestinos para digerir la lactosa y se utiliza para diagnosticar una deficiencia de lactasa intestinal.

3.2.2.3.2.2. La prueba del Hidrógeno en el aliento (BHT)

La medición del incremento del Hidrógeno eliminado en el aliento, con respecto a un nivel basal, permite evaluar indirectamente la función de la Lactasa después del consumo de una carga de lactosa. ¹⁰⁴ La determinación del hidrógeno espirado se hace por cromatografía de gases, después de una dosis oral de lactosa. Un aumento en la concentración del hidrógeno de > 20 ppm o > 0,3 ml / min se interpreta como un diagnóstico positivo de Hipolactasia. ¹⁰⁵ Los métodos indirectos también son engorrosos e inconvenientes, porque someten a los pacientes a diferentes dosis de lactosa produciendo en ellos, los síntomas antes descritos. ¹⁰⁶

3.3 Deficiencia de Lactasa secundaria

Es aquella en la que la actividad de la enzima lactasa se ve afectada junto a otras disacaridasas de las células epiteliales del intestino. Este tipo de deficiencia de lactasa es adquirida y suele ser debida a un decremento reversible de la actividad de la enzima asociado con problemas gastrointestinales, como pequeñas resecciones intestinales, gastrectomías, enfermedad inflamatoria Intestinal, gastroenteritis aguda, desnutrición, síndrome de malabsorción, colitis ulcerosa, desnutrición, enteritis aguda, enfermedad celíaca no tratada, infecciones parasitarias como giardiasis y ascariasis, síndrome de Inmunodeficiencia, fibrosis quística, enfermedades agudas o crónicas que lesionan el intestino. ¹⁰⁷

También la deficiencia grave de proteínas y medicamentos orales, como la neomicina, y la colchicina o la exposición a rayos gamma pueden dar lugar a la lesión de la mucosa intestinal y conducir a deficiencia secundaria de las enzimas intestinales.⁸

4. POLIMORFISMOS DE UN ÚNICO NUCLEÓTIDO (SNP)

A la variación entre individuos en una localización puntual del genoma, debido al cambio de un sólo nucleótido en el contexto de una secuencia genética se le denomina *polimorfismo de un solo nucleótido* o SNP («*Single Nucleotide Polymorphism*»). Los SNPs son marcadores bialélicos cuya variabilidad interindividual surge por el cambio (sustitución, inserción o delección) de un único nucleótido en el genoma humano, adenina (**A**), timina (**T**), citosina (**C**) o guanina (**G**), es decir, sólo existen dos alelos posibles para cada locus, determinado por la presencia de una base u otra en esa posición.

Se distribuyen de manera heterogénea por todo el genoma, representan la variante más frecuente del ADN y se encuentran en una localización genética específica del material genético, como exones, el cual codificará una cadena polipeptídica con características diferentes a la cadena original y a su vez, presentará un posible cambio en el fenotipo; también puede formar parte de la región no codificante del gen como podría ser un intrón, una región promotora o un espacio intergénico pero cuya presencia puede asociarse con una característica específica; así como en las zonas del genoma en donde no registran genes conocidos.¹⁰⁸

Los SNPs se consideran la principal fuente genética de la variabilidad fenotípica que distingue a individuos dentro de una especie dada.

Para ser considerado un SNP debe implicar la alteración de un nucleótido determinado dentro de una región específica a nivel poblacional mayor al 1 %. Se ha estimado la existencia de 1,4 millones de SNP a lo largo del genoma humano, lo que representa un SNP cada 1.000 pares de bases (pb). El SNP Consortium ha creado una base de datos que contiene alrededor de 1,8 millones de SNPs. ¹⁰⁹

Los SNPs constituye la fuente más común de variación genética y representan la clase más abundante de polimorfismos humanos, además proporciona una valiosa información acerca de la historia evolutiva de las poblaciones humanas. La forma a través de la cual los investigadores se apoyan en los SNP para establecer relaciones filogenéticas en común está ligada a demostrar que las mutaciones pasadas han sido acumuladas a lo largo de la historia evolutiva de las especies y podrían conformar un rasgo único. El grado de variación entre regiones que sirven como marcadores y que están delimitadas por SNP específicos permite su uso como reloj evolutivo. Con base en estas aseveraciones, se han construido mapas de identificación de SNP. Las características de historia evolutiva humana se pueden obtener usando estos mapas, los cuales caracterizan la diversidad del haplotipo (combinación específica de 2 o más SNP) a través del genoma. ¹¹⁰ El conocimiento de los SNP es de gran ayuda ya que a través de los mismos se puede obtener información de las migraciones llevadas a cabo por poblaciones humanas hasta constituir las diferentes poblaciones actuales. Las migraciones han jugado un papel muy importante en la evolución del *Homo sapiens*, debido a éstas se han generado los diversos fenotipos presentes en los grupos humanos. ¹¹¹

4.1. Análisis descriptivo de un polimorfismo tipo SNP

Una población genética, se define como un grupo de individuos que comparten un mismo grupo de genes. En consecuencia, entre dichos individuos existen relaciones genéticas que confieren a la población características propias que la hacen diferente a otra u otras poblaciones. Para poder explorar los proceso

evolutivos que forman la variación genética debemos describir la estructura genética de una población, y la manera habitual de efectuarla es enumerando los diferentes tipos de alelos, las frecuencias alélicas y las genotípicas de una población. En el caso de las poblaciones grandes, en las cuales no es práctico determinar los genes de todos los individuos, suele tomarse una muestra de individuos provenientes de las poblaciones, calculando las frecuencias genotípicas y alélicas para la muestra, utilizándola para representar el conjunto génico de la población.

En una población con reproducción sexual los genotipos son sólo ensambles transitorios de alelos, es decir los genotipos se desintegran cuando los alelos individuales se transfieren a las siguientes generaciones a través de los gametos, por tanto son los alelos y no los genotipos los que tiene continuidad real de una generación a otra.¹⁰⁹

La descripción estadística de un polimorfismo consiste, en primer lugar, en estimar la prevalencia en la población de cada alelo y de cada genotipo posible, lo que en nomenclatura genética se denomina estimar las frecuencias alélicas y genotípicas, respectivamente. Las frecuencias genotípicas, por tanto, se estiman directamente calculando la proporción de individuos con cada genotipo. Para estimar las frecuencias alélicas simplemente se duplica la muestra tomando como unidad de observación el cromosoma (cada individuo contribuye con 2 cromosomas) y se calcula la proporción de cada alelo.¹¹²

4.1.1. Haplotipos

Se define como haplotipo, la combinación de alelos en un cromosoma. En el genoma se pueden encontrar bloques de SNPs que conforman haplotipos conservados. El tamaño de estos bloques está definido por condiciones específicas. Grupos de SNPs en el mismo cromosoma son heredados en bloques

llamados *haplotype blocks*, de varios kb de largo. Cerca del 65% al 85% del genoma humano está organizado en bloques de haplotipos. Cada bloque tiene tres o cuatro versiones que abarcan la mayoría de la diversidad genética de la población mundial.

Dada la alta variabilidad alélica en el genoma humano, la probabilidad de que dos individuos no relacionados presenten un mismo haplotipo, es prácticamente nula. Es por esto que el estudio de haplotipos se ha convertido en una herramienta útil en la determinación de relación génica entre individuos, y por lo tanto en el estudio del origen de mutaciones causantes de diversos padecimientos. Los estudios han dado cuenta que los SNPs se heredan en grupos que se encuentran estrechamente relacionados en el ADN, en contraste con la tesis sostenida hasta el momento, en la que se planteaba la segregación al azar debido a la recombinación genética. A este grupo de SNPs que se heredan en bloque, es a lo que se denominó haplotipos.

4.1.2. Desequilibrio de Ligamiento

El desequilibrio por ligamiento (LD) describe la tendencia de dos alelos de ser heredados en conjunto más frecuentemente que lo esperado por segregación independiente. El mapeo por LD es una buena aproximación para la detección de genes involucrados en enfermedades, especialmente enfermedades complejas. Refleja la historia de las poblaciones y la distancia entre los marcadores genéticos, tamaño de la población analizada y densidad de los polimorfismos. Factores que afectan el desequilibrio por ligamiento: recombinación, mutaciones recurrentes, selección natural, historia demográfica.

4.1.3. Ley de Hardy – Weinberg

El objetivo principal de la genética poblacional es comprender los procesos que forman el conjunto génico de una población. Primero se debe comprender los efectos que tienen la reproducción y la herencia Mendeliana sobre las frecuencias genotípicas y alélicas, además de la influencia de la segregación independiente de alelos en la formación de gametos y la combinación al azar de los alelos en las células sexuales durante la fertilización, sobre el conjunto génico de un individuo. La respuesta a estas inquietudes se encuentra en la ley de Hardy Weinberg. Esta ley fue formulada en forma independiente y en el mismo año, por el matemático inglés George H. Hardy y el físico alemán Wilhem Weinberg en 1908, representa un modelo matemático que evalúa los procesos que causan cambios en frecuencias alélicas y genotípicas en poblaciones, basado en la herencia Mendeliana. ¹¹³

El Principio de Hardy-Weinberg (PHW) (también equilibrio de Hardy-Weinberg o ley de Hardy-Weinberg) determina qué frecuencias deben observarse en la población para cada genotipo en función de las frecuencias de los alelos, establece que la composición genética de una población permanece en equilibrio mientras no actúen fenómenos distorsionadores, como la selección natural o la aparición de nuevas mutaciones. Esta ley afirma que, bajo ciertas condiciones, tras una generación de apareamiento al azar, las frecuencias alélicas y de los genotipos de un locus individual permanecen constantes. El propio mecanismo de herencia mendeliana preserva la variación genética presente en una población. También especifica que esas frecuencias de equilibrio se pueden representar como una función sencilla de las frecuencias alélicas en ese locus. En el caso más sencillo, de un locus con dos alelos A y a, con frecuencias alélicas de p y q respectivamente, el principio de HW predice que la frecuencia genotípica para el homocigoto dominante AA es p^2 , la del heterocigoto Aa es $2pq$ y la del homocigoto recesivo aa, es q^2 . ¹¹⁴ Cuando los genotipos están en la proporción esperada de p^2 (AA) $2pq$ (Aa) y q^2 (aa), se dice

que la población se encuentra en equilibrio de Hardy Weinberg. Por tanto la ley Hardy Weinberg describe el modo en que la reproducción y los principios mendelianos afectan las frecuencias alélicas y genotípicas de la población. ¹¹⁵

Los Supuestos de la ley de Hardy Weinberg son:

Supuesto 1º: La ley de Hardy Weinberg requiere que una población tenga un tamaño infinitamente grande, pero este requisito es, por cierto, poco realista. En la práctica muchas poblaciones grandes caben en la proporción y las desviaciones importantes solo surgen cuando el tamaño de la población es más bien pequeño.

Supuesto 2º: Asunción de la ley Hardy Weinberg es que los individuos en la población se apareen al azar, lo que significa que cada genotipo se aparee en proporción a su frecuencia.

Supuesto 3º: Las frecuencias alélicas de la población no son afectadas por la selección natural, la migración o la mutación. Si bien en toda población aparecen mutaciones, su tasa es tan baja que tiene poco efecto en las predicciones de la Ley. ¹¹⁶

Cualquier población que se encuentre uniformemente distribuida, que presente datos de renovación y extinción mínimas o nulas, con un número constante de individuos de cada sexo, tiende a mantenerse constante en el tiempo. Esta ley denota la gran variabilidad de las poblaciones naturales ya que pocas veces se mantendrá dichas condiciones.

Una población no puede evolucionar si cumple los supuestos de Hardy Weinberg, puesto que la evolución consiste en cambio en la frecuencia alélica de una población. Sin embargo, la reproducción sola no produce evolución requiere de otros procesos como selección natural, mutación, migración o azar para que las

poblaciones evolucionen. El hecho de que los genotipos estén en proporciones Hardy Weinberg significa que estas fuerzas de selección natural, no han actuado desde que tuvo lugar el último apareamiento aleatorio. ¹¹⁷

La ley de Hardy Weinberg contiene tres principios fundamentales:

- a. En una población las frecuencias alélicas en un locus autosómico no cambian de una generación a la siguiente.
- b. Las frecuencias genotípicas de la población están determinadas de una manera predecible por las frecuencias génicas.
- c. El equilibrio es neutro, es decir, si se perturba la población el equilibrio se restablecerá en una sola generación de apareamiento al azar, pero con las nuevas frecuencias alélicas y si todos los restantes requisitos se mantienen.

Como las poblaciones naturales difícilmente se encuentran en equilibrio estricto, hay que determinar si las desviaciones observadas en la muestra pueden atribuirse simplemente al azar o si por el contrario, son tan grandes que permiten afirmar la existencia de algún proceso que este desviando la población de la situación del equilibrio (mutación, selección, migración, deriva génica, etc.).

5. GENÉTICA DE LA HIPOLACTASIA PRIMARIA TIPO ADULTO

5.1. Prevalencia de la Hipolactasia Primaria Tipo Adulto (HPTA)

Los estudios de frecuencia y distribución de los fenotipos Persistencia/No persistencia de la Lactasa, realizados en muchos países, en variadas regiones geográficas y en diversos grupos étnicos, han permitido establecer lo siguiente:

- a). Aproximadamente dos terceras partes de la humanidad son Hipolactásicos (no persistentes) mientras la otra tercera parte es persistente. b). El mapa de la

distribución mundial señala que los adultos Europeos del Norte y sus descendientes en U.S.A. y Australia son mayoritariamente (> 70 %) persistentes¹¹⁸, al igual que ciertos grupos pastoriles del Norte y del Este Africano¹¹⁹. c). En los alrededores del Mediterráneo, Medio Oriente y la región Centro-Sur de Asia la frecuencia de adultos persistentes es intermedia (30-70%). d). En aborígenes nativos de América y de Oceanía y en las poblaciones del África sub-Sahara, Lejano Oriente y Sureste Asiático prevalece la Hipolactasia. e). Desde el punto de vista étnico hay consenso al señalar que los caucásicos y sus descendientes son persistentes, mientras que los negros, los indios americanos y los aborígenes australianos son Hipolactásicos. f). En Colombia, los estudios de Angel *et al*²⁵ muestran una prevalencia de Hipolactasia del 60% (Tabla 1). g). Diversas teorías intentan explicar la aparición del fenotipo Lactasa persistencia (LP); básicamente se plantea que es una respuesta evolutiva frente a la necesidad del consumo de leche por parte de grupos étnicos pastoriles ancestrales; los persistentes de hoy serían descendientes de aquellos.¹²⁰

La distribución de los fenotipos de lactasa entre países, razas y poblaciones humanas es altamente variable.¹ Los SNPs han sido estudiados en: Norte de África^{121,122} Finlandia²², Brazil, Europa¹⁵⁵, Portugal, República Democrática de Santo Tomé y Príncipe, Mozambique, Camerún¹⁵⁰, Alemania, Viena,¹²³ China¹²⁴ y recientemente en Chile.¹²⁵

Tabla 1 Prevalencia de lactasa persistencia y no persistencia a nivel mundial (Tomado de la referencia ¹⁵⁷)

Población	Fenotipo	Frecuencia
Adultos Europeos del Norte y sus descendientes en U.S.A. y Australia	Lactasa Persistentes	> 70 %
Grupos pastoriles del Norte y del Este Africano	Lactasa Persistentes	> 70 %
En los alrededores del Mediterráneo, Medio Oriente y la región Centro-Sur de Asia	Lactasa Persistentes	30 -70%
Aborígenes nativos de América y de Oceanía y en las poblaciones del África sub-Sahara, Lejano Oriente y Sureste Asiático	Lactasa No Persistentes ó Hipolactasia	Mayor prevalencia
Caucásicos y sus descendientes	Lactasa Persistentes	> 70 %
Negros, indios americanos y aborígenes australianos	Lactasa No Persistentes ó Hipolactasia	> 60 %
En Colombia (Ángel <i>et al</i>)	Lactasa No Persistentes ó Hipolactasia	60%

Por otra parte, diversas publicaciones han mostrado importantes variaciones étnicas y geográficas en las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos C/T-13910 y G/A-22018 asociados con Lactasa persistencia/ Lactasa no persistencia. *Enattah et al 2002* ²², estudió una cohorte de 196 individuos no relacionados de origen Finandés, de los cuales 59 fueron Lactasa no persistentes, informando una correlación del 100% entre el fenotipo Lactasa no persistencia con la presencia de alelo C del SNP C/T-13910; todos presentaron el genotipo homocigótico CC (100%), el genotipo CT y el TT estaban ausentes.

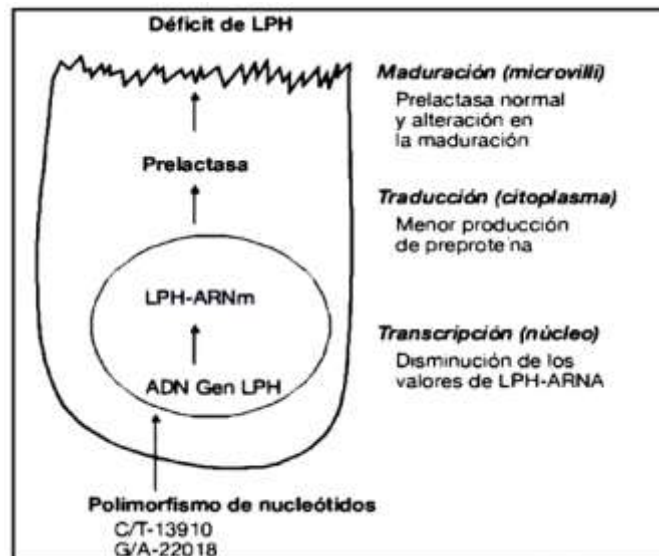
Los datos reportados por *Enattah et al* del 2007, muestran una alta correlación entre el alelo *T-13910, *A-22018 y el fenotipo lactasa persistencia en países Europeos y tiene una correlación firme con la persistencia de lactase publicada a nivel mundial.

5.2. Hipolactasia Primaria Tipo Adulto–Condición genéticamente determinada

En este declive se han implicado diferentes alteraciones en las vías moleculares de la producción de LPH: una reducción del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) responsable de la síntesis de la LPH (LPH-ARNm), o bien, en la síntesis de proteína precursora de la LPH (alteración en la transcripción), un enlentecimiento en la producción de LPH (alteración en la traducción) y una disminución del número de enterocitos fabricantes (alteración en la maduración) (Figura 8).

En muestras de mucosa intestinal estudiadas, la LPH-ARNm se correlaciona con los valores de actividad de lactasa; no obstante, en un cierto número de sujetos se han evidenciado valores elevados de LPH-ARNm y valores bajos de actividad. Muestras tomadas de un mismo intestino y de una misma vellosidad pueden diferenciarse en los valores de lactasa y de LPH-ARNm. Estas heterogeneidades se han observado según el grupo étnico estudiado, lo que podría conllevar la teoría de que en un grupo se ve afectada la transcripción y en otros la traducción o incluso la maduración¹²⁶.

Figura 8: Déficit de LPH. Secuencias que pueden estar implicadas en la HPTA (Tomado de la referencia¹²⁶)



5.3. Identificación de Polimorfismos tipo SNP asociados con la HPTA

Los fenotipos Lactasa persistencia y No persistente de lactasase encuentran fuertemente asociados con dos polimorfismos de nucleótido único (SNPs): G/A(-22018) y C/T(-13910). El polimorfismo C/T(-13910) es el más fuertemente asociado con los rasgos lactasa persistencia y lactasa no persistente, de tal forma que el 100% de las personas con la variante C homocigótica presentan hipolactasia y un poco más del 95% de las personas con la variante T homocigótica son lactasa-persistentes, esto en las poblaciones del norte de Europa y las derivadas de esta ¹⁹. La variante C es la ancestral, acorde con el hecho que en los mamíferos se pierde la actividad lactasa luego del destete, y se calcula que hace aproximadamente 8.000 años surgió la variante T en las poblaciones del norte de Europa.

5.4. Técnicas moleculares para la identificación de polimorfismos tipo SNPs por PCR/RFLP

Una forma de identificar los alelos, por individuo, de cada uno de los polimorfismos C/T -13910 y G/A -22018 es por medio de técnicas de biología molecular como la PCR (Reacción en cadena de la Polimerasa) para obtener miles de copias del fragmento de ADN que contiene la secuencia dentro de la cual se encuentra el SNP y digestión de los productos de amplificación de la PCR, con endonucleasas para discriminar entre los alelos.¹²⁷ Los fragmentos de restricción obtenidos son visualizados mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% con tinción en bromuro de etidio.

Aquellas muestras que presentan una sola banda de 201 pb *C ó de 177 pb *T se interpretan como genotipos homocigoto: **CC** y **TT**, respectivamente; mientras que las muestras que presentan dos bandas, una de 201 pb *C y otra de 177 pb

*T, se interpretan como genotipo heterocigoto: **CT**. Para el SNP G/A -22018, las muestras que presentaron una sola banda de 271 pb *A o 196 pb *G se interpretan como genotipos homocigoto: **AA** y **GG**, respectivamente; mientras que las muestras que muestran dos bandas, una de 271 pb *A y otra de 196 pb *G, se interpretan como genotipo heterocigoto: **GA**.

5.4.1. PCR

La Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) es una técnica de biología molecular altamente específica, rápida, sensible y versátil, se fundamenta en la amplificación enzimática de un fragmento de ADN flanqueado por dos secuencias de oligonucleótidos que hibridan en la cadena complementaria de la molécula molde que se va a amplificar (cebadores o “primers”) y que son utilizados por una ADN polimerasa termoresistente para copiar la secuencia de la misma. La PCR permite la obtención *in vitro* de millones de copias de un fragmento de ADN específico a partir de una cantidad ínfima de ADN, mediante una reacción enzimática cíclica con diferentes períodos y temperaturas de incubación en presencia de una enzima ADN polimerasa termoestable.^{128, 129}

Las versiones modernas de la PCR utilizan una Taq Polimerasa que es termoestable, inicialmente extraída de *Termus Aquaticus*, una bacteria termófila que vive en los manantiales de agua caliente del parque Nacional de Yellowstone (Estados Unidos); como la Taq polimerasa no resulta destruida por las elevadas temperaturas a las que transcurre la PCR, basta con añadirla una vez, al principio de la reacción. La Taq polimerasa se fabrica actualmente con bacterias modificadas genéticamente. La ADN Polimerasa necesita otros ingredientes para copiar ADN, los nucleótidos, par de *oligonucleótidos* o *cebadores* formado por varios nucleótidos de cadena simple cuya secuencia es complementaria a las regiones que flanquean al segmento de ADN de interés y permiten el inicio de la

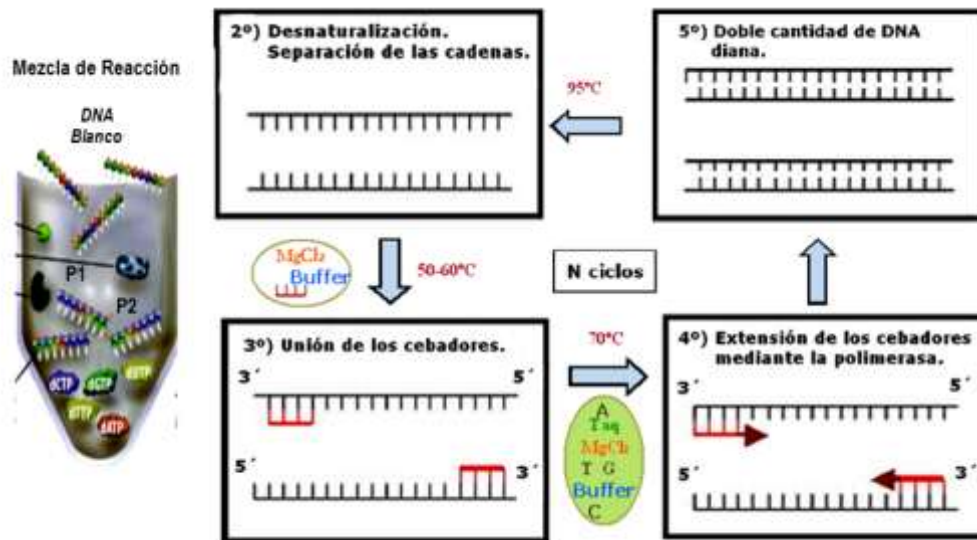
replicación; el tercero es el *ADN molde* extraído a partir de la muestra objeto de análisis, y por último el tampón y las sales necesarias para el óptimo funcionamiento de la enzima.

La reacción para multiplicar rápidamente un pequeño fragmento de ADN específico, consta, por lo regular, de una treintena de ciclos repetitivos conformados cada uno de tres fases: desnaturalización, hibridación y extensión. Durante la primera, llamada Desnaturalización, la plantilla o fragmento original de ADN se calienta hasta una temperatura de 90 a 95 °C durante 1 minuto, esto provoca la ruptura de los puentes de hidrógeno intercatenarios del ADN para la separación de las dos cadenas que la componen.

En la segunda llamada Hibridación, una vez que el ADN está desnaturalizado se disminuye la temperatura de la reacción hasta un rango comprendido entre los 40 y los 60°C durante 1 minuto para que se pueda producir la hibridación específica de los cebadores a las secuencias complementarias flanqueantes del fragmento que se desea amplificar. Ambas cadenas originales del ADN sirven simultáneamente como moldes para sintetizar sus respectivas cadenas complementarias nuevas. La temperatura a la que se realiza esta etapa, depende de la temperatura de fusión (T_m) de los cebadores y debe establecerse para cada reacción en función de la longitud de los cebadores y su secuencia.

Finalmente, en la tercera o Elongación, la temperatura se eleva hasta 72 °C durante 1 minuto, ya que es la temperatura a la que la "*Taq polimerasa*" alcanza su máxima actividad. A esta temperatura la ADN Polimerasa termorresistente comienza a extender la longitud de los cebadores, incorporando nucleótidos en el extremo 3' del cebador utilizado como molde a la cadena de ADN previamente desnaturalizada (Figura 9).¹³⁰

Figura 9: Esquema de un Ciclo de PCR Convencional. La PCR se integra por ciclos de tres diferentes períodos de incubación y temperaturas. Mezcla de reacción que contiene la secuencia de DNA que se quiere amplificar, dos oligonucleótidos sintéticos (P1 y P2) que servirán como cebadores, una DNA polimerasa termoestable (Taq) y los cuatro desoxirribonucleótidos trifosfato – dATP, dGTP, dCTP y dTTP–.



Estos tres pasos se repiten cíclicamente entre 25 y 35 veces, de forma que el proceso total de la reacción dura aproximadamente 3 horas. En cada ciclo se produce un incremento exponencial en el número de copias, de forma que el resultado de la reacción de PCR es la obtención de una solución con millones de copias del segmento de ADN interesado. La PCR se lleva a cabo en un *termociclador*, aparato que permite un rápido y preciso calentamiento y enfriamiento de las muestras y que admite numerosas variaciones de los programas de reacción para su ajuste al análisis interesado. ¹³¹

El uso de esta técnica exige mucho cuidado, principalmente por los riesgos de contaminación de la mezcla reactiva, esto indica que es muy sensible, tanto así que permite multiplicar accidentalmente cantidades mínimas de ADN contaminante, para evitar esto se utilizan procedimientos especiales, tales como

preparar y analizar las reacciones de PCR en áreas separadas de laboratorio (Áreas de pre-PCR, PCR y post PCR), utilizando el equipamiento específico para la técnica (particularmente micropipetas), reactivos e insumos autoclavados y múltiples controles en cada reacción.

5.4.2. RFLP

El método de análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción o RFLP («*Restriction Fragment Length Polymorphism*») se basa en la utilización de unas enzimas denominadas *enzimas de restricción o restrictasas* que funcionan a modo de «tijeras moleculares» y cortan el ADN de forma específica en determinadas secuencias que han reconocido previamente. Las posibles diferencias en la secuencia del ADN entre dos individuos hacen que, para cada marcador, el tamaño de los fragmentos de ADN generados pueda ser distinto. Los fragmentos de restricción resultantes pueden separarse en función de su tamaño mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida porque confiere una mayor resolución y separación de fragmentos de ADN con tamaños moleculares similares. Así, fragmentos de ADN de diferente tamaño van a migrar de forma distinta en una electroforesis y lo hacen a una velocidad inversamente proporcional a su tamaño, de tal manera que los fragmentos más pequeños alcanzan posiciones más adelantadas en el gel que los fragmentos más grandes. La electroforesis en gel de poliacrilamida confiere una mayor resolución y separación de fragmentos de DNA con tamaños moleculares similares. Además posee una serie de ventajas tales como ser químicamente inertes, estables en un amplio rango de pH, temperatura y fuerza iónica y fáciles de generar mediante la polimerización de acrilamida. En la mayoría de los casos, el gel se dispone entre dos receptáculos independientes y separados que contienen tampón de electroforesis y los electrodos positivo y negativo, de forma que la conexión eléctrica entre ambos receptáculos sólo es posible a través del gel.¹³²

5.4.3. Pirosecuenciación

La pirosecuenciación es un método de secuenciación de ADN basado en la monitorización a tiempo real de la síntesis de ADN. La estrategia utilizada consiste en la detección de bioluminiscencia que se produce por la acción de la Luciferasa al incorporarse los deoxinucleótidos trifosfato (dNTP) a la cadena en extensión (Fig. 1). La incorporación de un dNTP libera un grupo pirofosfato (PPi). La ATP sulfurilasa convierte el PPi en ATP en presencia de ADP. El ATP junto con la luciferasa cataliza la conversión de luciferina a oxiluciferina y la emisión de luz. La detección de la luz emitida permite establecer el número y orden de los nucleótidos incorporados en la reacción de secuenciación. Los nucleótidos se dispensan por separado y en el orden deseado, sabiendo, por tanto, cual se incorpora en cada momento y posibilitando el establecimiento de correlaciones entre el pico de luz con el nucleótido que se añade en cada momento.¹³³

5.4.4. Mini secuenciación Fluorescente en fase sólida.

La utilidad de este método consiste en la detección de cambios en la secuencia de ADN que suponen la sustitución de una sola base o pequeñas inserciones o deleciones; aumentando la sensibilidad de la técnica mediante el marcaje fluorescente, tiene una gran aplicación para el análisis de polimorfismos tipo SNP. La técnica comprende dos fases, una de amplificación y otra de secuenciación. La primera de ellas consiste en amplificar el fragmento de ADN molde con uno de los primers marcado con biotina en su extremo 5'. El producto así amplificado se introduce en una matriz sólida que contiene estreptavidina capaz de producir una reacción enzimática con la biotina. De esta manera el producto amplificado queda capturado e inmovilizado y tras la elución de la hebra de ADN no marcada y del exceso de primers bajo condiciones alcalinas, queda disponible el ADN molde para su secuenciación. En la segunda fase se elige un

primer que hibride con el molde justo una base antes de donde se encuentra el polimorfismo. Se elonga dicho primer en presencia de Taq polimerasa y nucleótidos marcados con fluorescencia y modificados de tal manera que sólo se incorpore una única base, la complementaria al polimorfismo. La lectura se realiza en un secuenciador automático capaz de diferenciar el tipo de nucleótido incorporado según el color de la fluorescencia emitida.

El método permite la identificación de sustituciones de nucleótidos en muestras de individuos homo y heterocigotos. Un individuo homocigoto generará un solo tipo de señal correspondiente al nucleótido presente mientras que un individuo heterocigoto producirá dos tipos de señales correspondientes a los dos nucleótidos presentes en su ADN.¹³⁴

6. COMUNIDAD DE AFRODESCENDIENTES DE LA POBLACION DE SAN BASILIO DE PALENQUE

6.1. Ubicación geográfica

San Basilio de Palenque, en el departamento de Bolívar, Colombia, es un corregimiento adscrito al municipio de Mahates, en el departamento de Bolívar. Se encuentra ubicado en las faldas de los Montes de María, a 47 km de la ciudad de Cartagena de Indias, y limita con los municipios de Malagana, San Cayetano, San Pablo y Palenquito.¹³⁵ Es un territorio simbólico de las luchas libertarias de los africanos esclavizados en Colombia, y contexto afro diaspórico significativo para el país, para América y el mundo (Figura 10).

6.2. Historia

El Palenque de San Basilio, situado a 47 km de Cartagena, es una comunidad de descendientes de cimarrones africanos del siglo XVII. Cimarrón era el africano que huía de sus captores y se escondía en el monte.

Figura 10: Ubicación geográfica de San Basilio de Palenque (Tomado de la referencia 135)



Cuentan los historiadores que en cuanto llegaban a Cartagena o a otros puertos, los africanos iniciaban la huida y, muy pronto también la formación de palenques, (lugares en los cuales vivían, se protegían) y con el tiempo dieron origen a una forma de vida en libertad desde el siglo XVI. La historia de estos pueblos rebeldes sobrevive y se reconstruye en el actual Palenque de San Basilio, el cual fue conformado por esclavos fugados principalmente de Cartagena de Indias, que representan una comunidad descendiente de los cimarrones del siglo XVII y liderado por Domingo Biohó fue el líder mítico cuya fiereza quedó plasmada en los reportes que los gobernadores de la Provincia de Cartagena enviaban a la Corona. Desde 1603, la fuga de esclavizados de la ciudad de Cartagena y sus alrededores fue una amenaza para las autoridades y para la estabilidad política de la provincia. Los fugitivos no sólo partían con las herramientas de labranza y las armas de fuego, sino que fundaban pueblos en las ciénagas inaccesibles de la región. Desde sus fortalezas descendían al valle del río Magdalena para asaltar las embarcaciones que transportaban víveres, oro y todo tipo de mercancías. De hecho constituyeron una fuerza en rebelión, en defensa de su libertad, pero también punto de partida para la creación de una organización social de nuevo tipo.¹³⁶

Arrazola (1970), citado por Fals Borda (1976)¹³⁷ escribió: En la huida de Cartagena, durante los siglos XVI y XVII, los negros cimarrones tomaron tres direcciones: hacia el sur por la Costa de Sotavento, por Matuna y Berrugas hasta San Antero; hacia el centro de la región, para llegar a Arroyohondo, San Miguel y San Basilio, que se constituyó en palenque principal; y hacia el río Magdalena para establecer palenques en Tabacal, San Benito, Metuderé y Río Grande. A principios del siglo XVIII ocurrió otro desplazamiento negro desde Antioquia. Hacia finales del siglo XVII existían tres núcleos de asentamientos palenqueros en la Provincia de Cartagena de Indias: los del norte de la Sierra del Luruaco, los del sur en la Serranía de San Lucas y los de los Montes de María.

De este modo, el Palenque de San Basilio tiene un importante valor simbólico en la historia del poblamiento negro en la región Caribe colombiana, por haber resistido tanto a la dominación colonial española como a la amenaza de la propia existencia a través de los siglos, logrando, finalmente, conservar historia, memoria, cultura, lengua y saberes.¹³⁶

Los palenques albergaban gentes de diversos orígenes africanos. El liderazgo político, militar y religioso fue una constante en este tipo de sociedades guerreras organizadas por grupos de edad, es decir, mediante un sistema que propendía por la reunión de todas las personas según sus años y su sexo. Esta forma de articular a la colectividad era una respuesta táctica a la necesidad de mantener en pie de guerra partidas de soldados dispuestos a defender el palenque.

El aislamiento les ha permitido mantener la mayoría de las tradiciones culturales africanas en Colombia (música, prácticas médicas, organización social, ritos fúnebres, etc) y aún más, han desarrollado una lengua criolla, mezcla del español con las lenguas africanas originarias, es la lengua palenquera, la única lengua criolla de las Américas que combina una base léxica española con las

características gramaticales de lenguas bantúes. Esta lengua constituye un factor primordial que refuerza la cohesión social entre los miembros de la comunidad. Debido a sus características únicas en su historia, formación, cultura y lengua, el Palenque ha sido declarado por la Unesco como Patrimonio Cultural Inmaterial de la Humanidad gracias a la labor de organizaciones y destacados líderes de su tierra como Dionisio Miranda Tejedor. De los muchos palenques que existían en épocas anteriores, sólo el de San Basilio de Palenque ha sobrevivido hasta hoy, se considera el primer pueblo libre de América, declarado por la organización de las Naciones Unidas para la educación, la Ciencia y la Cultura (UNESCO) como obra maestra del patrimonio oral e inmaterial de la humanidad.¹³⁸

6.3 Población

La población afrocolombiana corresponde a las comunidades descendientes de las personas africanas esclavizadas por los españoles y las comunidades cimarronas que conquistaron su libertad, entre 1510 y 1852. En los primeros años de la conquista los negros esclavos introducidos por Cartagena procedían de Guinea y Cabo Verde, pero los enclaves de las costas africanas que proveyeron de esclavos durante toda la trata se extendían desde las costas de Senegambia hasta Angola. Entre 1550-1640, cuando la trata estuvo en manos de los portugueses, las tres cuartas partes de los esclavos fueron sacados de Guinea y de Angola. Para los años 1705-1748 la mitad de los esclavos fueron proporcionados por Costa de Oro, Golfo de Benin, Golfo de Biafra y África Central.¹³⁶

Son africanos por su ancestro genético, étnico, cultural y espiritual, asumiendo la africanidad como un valor personal y de la sociedad colombiana.

La población afrocolombiana surgió con la expedición en 1851 de la Ley de libertad de los esclavos, que abolió legalmente la esclavitud y la esclavización de personas en Colombia. Los ex esclavos, los cimarrones y sus descendientes quedaron en el país como ocupantes de hecho más no en derecho y con derechos. Quedaron ocupando el territorio pero ilegales, por haber sido excluidos del ordenamiento jurídico republicano y del Estado de Derecho, e ignorados en las leyes como sujetos jurídicos con derechos étnicos y ciudadanos especiales.¹³⁹

Dentro de la población negra o afrocolombiana se pueden diferenciar cuatro grupos importantes: los que se ubican en el corredor del pacífico colombiano, los raizales del Archipiélago de San Andrés Providencia y Santa Catalina, la comunidad de San Basilio de Palenque y la población que reside en las cabeceras municipales o en las grandes ciudades.¹⁴⁰

Según datos del DANE con base en el Censo general 2005²⁷, el 32% de la población afrocolombiana, equivalente a 1.380.102 habitantes, habita en los diferentes departamentos del Caribe. El corregimiento de San Basilio de Palenque cuenta con un total de 592 viviendas en las que habitan aproximadamente 2.843 personas que conformaban 681 hogares. Según encuesta del Sisben 2004, actualizada en Julio de 2007, la población del corregimiento era de 3.762 habitantes. Fundada por esclavizados africanos que se fugaron y se refugiaron en los palenques de la Costa Norte de Colombia durante el periodo colonial. San Basilio es el único palenque que ha conservado su identidad y sus elementos culturales propios, siendo testimonio de la riqueza y trascendencia cultural africana en el territorio colombiano.¹⁴¹

En Colombia residen 4.311.757 afrocolombianos que corresponden al 10,62% de la población del país.²⁷ Los que concentran aproximadamente el 50% de la población afro del país son: Valle del Cauca, Antioquia y Bolívar.

6.4. Economía

Gracias a los documentos coloniales se sabe que los palenques de la costa Caribe, en especial los que estaban situados en los Montes de María, como el Palenque de San Basilio, tuvieron una economía de subsistencia basada en sementeras de yuca y maíz, y que establecieron contactos con los esclavizados de las haciendas vecinas, quienes les servían de intermediarios para cambiar pequeñas cantidades de oro extraído de las arenas auríferas de los ríos por armas de fuego.

La principal actividad productiva es la agropecuaria, cerca de 26.000 hectáreas (90%) del territorio, se dedican a la actividad pecuaria. La agricultura ocupa el segundo lugar con cerca de 2.800 hectáreas de cultivo (9.7% del territorio) y cumple un papel importante en el desarrollo económico-social de la población. ¹¹⁸

En la población de los negros de San Basilio de Palenque, la leche es un alimento fundamental que provee de nutrientes esenciales a quienes la consumen, incluyendo el calcio, además por su bajo costo, su consumo es más generalizado que el de cárnicos y otros alimentos, de tal manera que excluirla de la dieta sin haber descartado la presencia o ausencia de Hipolactasia o intolerancia a alguno de sus componentes, sería privarlos de los beneficios de la leche y sus derivados, representando un riesgo a largo plazo para la salud de estos individuos.

7. OBJETIVOS

7.1 Objetivo General

Identificar las variantes C/T-13910 y G/A-22018 asociadas con Hipolactasia primaria tipo adulto (HPTA) en caucásicos, en una población afrodescendiente de San Basilio de Palenque de la Costa Caribe Colombiana

7.2 Objetivos Específicos

- Genotipificar las variantes C/T-13910 y G/A-22018 en una muestra de una población afrodescendiente de San Basilio de Palenque.
- Determinar las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos C/T-13910 y G/A-22018 presentes en la población de estudio.
- Determinar la prevalencia de Hipolactasia Primaria tipo Adulto (HPTA) en la población en estudio relacionado con las variantes C/T-13910 y G/A-22018.
- Comparar los datos obtenidos de una población afrodescendiente de San Basilio de Palenque con datos de otras poblaciones.

8. METODOLOGÍA

8.1. Grupo de estudio

Participaron 130 individuos afrodescendientes, no relacionados, con edades comprendidas entre los 18 y 90 años, (Media 48 ± 1), de ambos sexos, nativos de la población de San Basilio de Palenque, en el departamento de Bolívar. A Todos los participantes se les tomó muestra de sangre por venopunción, en tubos vacutainer con anticoagulante EDTA. Cada uno de los participantes firmó el respectivo consentimiento informado para participar en la investigación. Este estudio fue realizado en conformidad con los principios éticos definidos en la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial. El proyecto fue aprobado por el Comité de ética de la Universidad Libre Seccional Barranquilla y cumple con las leyes y regulaciones de Colombia para estudios en seres humanos.

Mediante una encuesta se registraron los siguientes datos: nombre completo, edad, lugar de nacimiento del participante, lugar de nacimiento de sus padres y abuelos paternos, identidad racial, datos de filiación, hábitos de consumo lácteo, reacción frente a la ingesta láctea.

Se tuvieron en cuenta los siguientes criterios de inclusión: individuos mayores de 18 años, de ambos sexos, con rasgos físicos característicos del grupo étnico afrodescendiente, nativos de San Basilio de Palenque, quienes expresaron su consentimiento para participar de la investigación. En todos los casos se confirmó el origen del individuo mediante los apellidos más representativos del grupo étnico estudiado y el lugar de nacimiento.

Criterios de Exclusión: Embarazo, antecedentes de cirugías del tracto gastrointestinal, rechazo del individuo a participar en el estudio.

8.2 Selección de la muestra

Según datos suministrados por el DANE con base en el Censo de 2005, el 32% de la población afrocolombiana, equivalente a 1.380.102 habitantes, residen en los diferentes departamentos del Caribe. En San Basilio de Palenque, departamento de Bolívar, habitan aproximadamente 3.762 personas.

El tamaño de la muestra necesaria para la realización de este estudio fue calculado con base en la siguiente fórmula:

$$n = \frac{Z^2 P Q N}{NE^2 + Z^2 P Q}$$

En donde:

n = Tamaño de la muestra

Z = El nivel de confianza o seguridad. Para una seguridad del 95%

Z = 1,96

$Z\alpha^2 = 1.96^2$ (3,8416)

p = proporción esperada (en este caso 5% = 0.05)

q = 1 – p (1- 0,5 = 0,5)

N = Tamaño de la población = 3.762

E = Error máximo admisible (precisión deseada para el estudio = 5% (0,05)

$$n = 76.60$$

n = Tamaño de la muestra requerida para este estudio fue de 76 individuos afrodescendientes de San Basilio de Palenque, pero por conveniencia y dada una mayor disponibilidad de individuos, se trabajó con un total de 130.

Los individuos que participaron en el estudio se seleccionaron de manera aleatoria, por muestreo aleatorio simple, asignándole un número a cada individuo del universo en estudio que es una población finita (San Basilio de Palenque), y escogiéndolos por sorteo hasta agotar el tamaño muestral calculado.

8.3. Genotipificación de los polimorfismos tipo SNP C/T-13910 Y G/A-22018

La identificación de los polimorfismos C/T -13910 y G/A -22018 se realizó mediante la técnica de biología molecular PCR/RFLP (*Polymerase Chain Reaction / Restriction Fragment Length Polymorphism*) la cual consistió en analizar el tamaño de los fragmentos de restricción obtenidos por la digestión con dos endonucleasas, HinfI y HhaI, para discriminar entre los alelos ^{142, 143}, después de haber amplificado dos fragmentos de ADN que contienen estos polimorfismos.

8.3.1. Extracción de ADN: a partir de sangre venosa (300 µl) se hizo la extracción y purificación del ADN genómico, para lo cual se utilizó el kit: Wizard™ Genomic DNA Purification Kit (*Promega Corporation, USA*), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se obtienen de 5 a 15 µg de ADN a partir de 300 µl de sangre periférica.

8.3.2. Amplificación y Digestión del SNPs C/T -13910:

La región de ADN que contiene el SNP C/T -13910 fue amplificada por PCR, utilizando los siguientes Primers propuestos por Enattah,¹⁹ siguiendo los protocolos de Mulcare.¹⁵⁰

1. Primer Forward: 5'-GCTGGCAATACAGATAAGATAATGGA-3' y
2. El Primer Reverse: 5'-CTGCTTTGGTTGAAGCGAAGAT-3'

La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador MJ Research PTC-100 utilizando el siguiente protocolo de amplificación en un volumen final de 19,5 µL con 100- 500 ng de ADN: MgCl₂ 1,5 mM, dNTPs 0,2 mM, Taq polimerasa 1,5 U en un Buffer estándar Tris HCl 1X pH 9.0, y 1 µM por cada Primer, todos los reactivos se utilizaron de la casa comercial Bioline™

Las condiciones de PCR fueron las siguientes: un paso de desnaturalización inicial a 95°C por 10 min, seguido de 35 ciclos de amplificación que comprenden una etapa de desnaturalización a 95°C por 1 min, una etapa de anillamiento a 59°C por 1 min, una etapa de elongación a 72°C por 1 min, y por último una extensión final a 72°C por 8 min.

Para la PCR-RFLP se digirieron 10 µl del producto de PCR con 0,5 U de la enzimas de restricción *Hinfl*, las muestras se incubaron a 37°C por 16 horas, de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (New England Biolabs, USA™).

Los productos amplificados de la PCR, se detectaron por electroforesis, en un gel de agarosa al 2%, utilizando Buffer TBE 0.5X. El gel de agarosa fue previamente teñido con Bromuro de Etidio (5 µg/mL) y visualizado en un Fotodocumentador UV Gel Doc XR System de Bio-Rad. La observación de una banda de 201 pb indicó la presencia del producto amplificado específico.

Los productos digeridos se visualizaron en un gel de poliacrilamida al 8% teñido con bromuro de etidio. Los parámetros de digestión del producto amplificado del C/T -13910, con la enzima *Hinfl*, originó dos fragmentos de restricción, uno de 201 pb y otro de 77 pb cuando está presente el alelo *T (Heterocigoto CT), pero si está presente el alelo *C en lugar de *T, se obtiene un fragmento de restricción de 201 pb (Homocigoto nativo CC) (Tabla 2).

8.3.3. Amplificación y Digestión del SNPs G/A -22018:

La región de ADN que contiene el SNP G/A -22018, se amplificó por PCR, siguiendo el protocolo de Coelho *et al.*¹⁴⁴ utilizando los siguientes Primers:

1. Primer Forward: 5'-CTCAGTGATCCTCCACCTC-3'
2. El Primer Reverse: 5'-CCCCTACCCTATCAGTAAAGGC-3'

La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador MJ Research PTC-100 utilizando el siguiente protocolo de amplificación en un volumen final de 19,5 μ L, con 100- 500 ng de ADN: primer(F) 1 μ M y primer(R) 1 μ M, MgCl₂ 1,5 mM, dNTPs 0,2 mM, Taq polimerasa 1,5 U en un Buffer estándar Tris HCl 1X pH 9.0, todos los reactivos se utilizaron de la casa comercial Bioline,TM.

Las condiciones de los ciclos de amplificación para PCR fueron las siguientes: una etapa de desnaturalización inicial a 95°C por 10 min, seguida de 34 ciclos de amplificación, cada ciclo comprende una etapa de desnaturalización a 94°C por 1 min, una etapa de anillamiento a 62°C por 1 min, una etapa de elongación a 72°C por 1 min y una extensión final a 72°C por 8 min.

Los productos amplificados de la PCR, se detectaron por electroforesis, en un gel de agarosa al 2%, utilizando Buffer TBE 0.5X. El gel de agarosa fue previamente teñido con Bromuro de Etidio (5 μ g/mL) y visualizado en un Fotodocumentador UV Gel Doc XR System de Bio-Rad. La observación de una banda de 271 pb indicó la presencia del producto amplificado específico.

Para la PCR-RFLP se digirieron 10 μ l del producto de PCR con 0,5 U de la enzima de restricción *HhaI*, las muestras se incubaron a 37°C por 16 horas, de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (New England Biolabs, USATM).

Los parámetros de digestión del producto amplificado G/A -22018 con la enzima *HhaI*, cuando el alelo *G está presente, originó dos fragmentos, uno de 271 pb y otro de 196 pb (Heterocigoto GA). Cuando está presente el alelo *A en lugar de *G, solo se obtiene un fragmento de 271 pb (Homocigoto nativo AA). (Tabla 2)

Tabla 2. Digestión de los productos de PCR para los SNPs C/T-13910 y G/A-22018 con las enzimas de restricción *Hinf I* y *HhaI* respectivamente

Autor	Marcador	Tamaño del producto	Enzima / sitio de reconocimiento		Alelo (Hipolactasia)
<i>Mulcar et al</i> 2004	C/T -13910	201 pb	<i>Hinf I</i> 5'...G ANTC...3' 3'...CTNAIG...5'	T= 177 + 24 pb CT= 201 + 177pb	C= 201 pb
<i>Coelho et al</i> 2005	G/A -22018	271 pb	<i>Hha I</i> 5'...GCG C...3' 3'...CIGCG...5'	A= 271 pb GA= 271 + 196 pb	G= 196 + 75pb

8.3.4. Electroforesis

Para la visualización de los productos de la digestión de C/T -13910 y G/A -22018, se utilizó geles de poliacrilamida al 8% (relación de acrilamida: N,N'-metilene-bisacrilamida de 29:1) que contenía TBE 0.5X (0.045 M tris-borato, 0.001 M EDTA, pH 8.0) para la separación efectiva de fragmentos de ADN con rangos entre 60 y 400 pb. Las muestras se corrieron a 40 voltios y 60 mA durante 6 horas en buffer de corrido TBE 0.5X. Se tiñó el gel en una solución de bromuro de etidio con una concentración de 0.5 µg/ml¹⁴⁵ y posteriormente los fragmentos de restricción se visualizaron y fotografiaron en un Fotodocumentador Gel Doc XR System de Bio-Rad.

El corrido electroforético se realizó en una cámara de electroforesis horizontal submarina: SIGMA modelo 237, 240-1, con capacidad para dos geles. El Marcador de peso molecular utilizado fue el pGEM® DNA Markers (20ng/μl) de Promega y el buffer de carga (*loading buffer*) Tipo III; descrito por Sambrook & Russell.¹⁴⁵

8.3.5. Análisis Estadístico

Se realizó el test del Chi cuadrado para verificar si las frecuencias observadas de los genotipos guardaban concordancia con las esperadas bajo la hipótesis de Hardy-Weinberg. El análisis estadístico se hizo con el programa Tools for Population Genetic Analyses (TFPGA) versión 1.3.¹⁴⁶

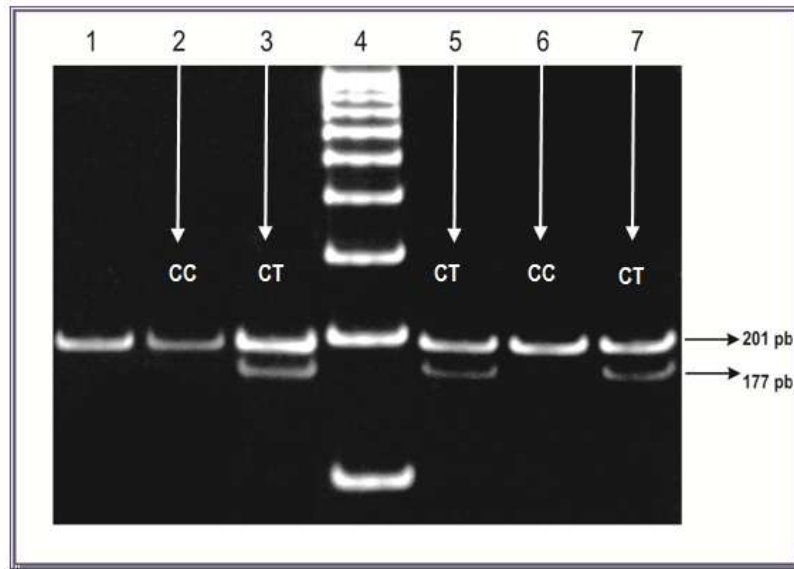
9. RESULTADOS

Los resultados presentados a continuación se refieren a las muestras de ADN obtenidas de 130 individuos afrodescendientes de San Basilio de Palenque, las cuales se genotipificaron para los SNPs C/T-13910 y G/A-22018. Se determinaron las frecuencias alélicas y genotípicas de estos polimorfismos presentes en la población de estudio, utilizando el paquete estadístico *Tools for Population Genetic Analyses (TFPGA) versión 1.3*.¹⁴⁶ Se realizó un análisis comparativo con los datos obtenidos en otras poblaciones.

9.1. Perfil genotípico de la población de estudio para el SNP C/T-13910

Los patrones de bandas correspondientes a los genotipos del SNP C/T-13910, se muestran en la Figura 11, aquellas muestras cuyas bandas presentaron un fragmento de 201 pb, se interpretaron como genotipo CC homocigoto, las de dos bandas con fragmentos de 201pb y 177pb, se interpretaron como genotipo CT heterocigoto y no se obtuvieron genotipos homocigotos TT en la población afrodescendiente en estudio.

Figura 11. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 8% teñido con bromuro de etidio, con los productos de la digestión con Hinf I para C/T-13910. Carril 1, 2 y 6: muestran una sola banda de 201 pb lo que implica ausencia del sitio de restricción, genotipo CC, Carril 3, 5 y 7: muestran bandas de 201 pb y 171 pb que implica la existencia de un cambio de C por T al estado heterocigótico, genotipo CT, Carril 4: marcador de peso molecular de 100 pb pGEM® DNA Markers (Promega).



Las frecuencias alélicas y genotípicas encontradas para el SNP C/T-13910, en la población de estudio son mostradas en la Tabla 3. De este modo, los resultados de la genotipificación obtenidos para el SNP C/T -13910, en la población de estudios son los siguientes: de 130 individuos: 117 fueron CC, 13 CT y ninguno TT. Las frecuencias genotípicas calculadas se muestran en la Tabla 3, de esta manera, las frecuencias genotípicas observadas son: CC (90%), CT (10%) y TT (0%). Las frecuencias alélicas para *C y para *T fueron de 0.95 y 0.05 respectivamente. Las frecuencias genotípicas esperadas, por (HWE) fueron: CC (90%), CT (9.5%), TT (0.3%) (Figura 13a, 13b). El genotipo TT es el menos frecuente en la población de estudio de acuerdo con lo esperado.

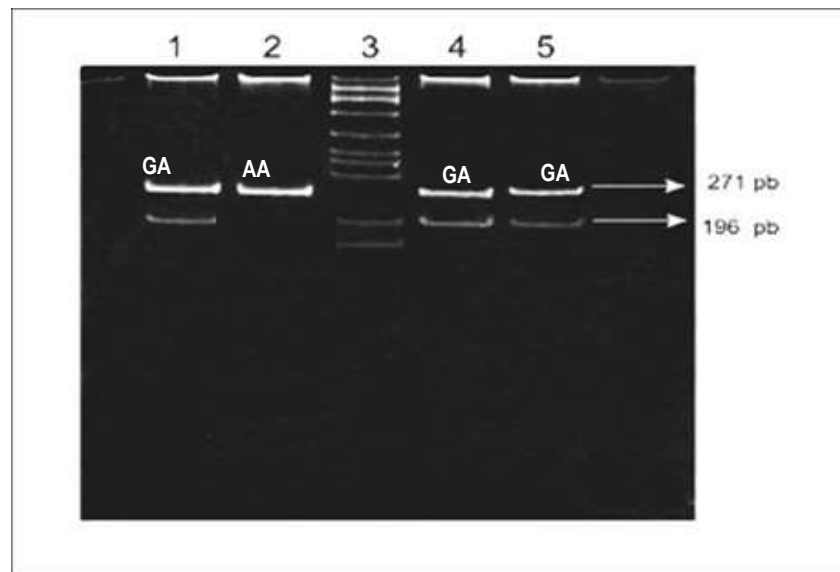
Por medio del software *Tools for Population Genetic Analyses* (TFPGA) versión 1.3¹⁴⁶, se estimó el equilibrio de Hardy-Weinberg, a partir de estas frecuencias utilizando el test del Chi-cuadrado de Pearson, $\chi^2_{HW} = \sum (O-E)^2 / E$; arrojando un valor de 0.0961. En la tabla estadísticas de distribución de X^2 , vemos que el valor crítico para un 1 grado de libertad y para un nivel de significancia del 0.05 (5%) de

error ($p= 0.05$) fue de 3.84, el valor límite para aceptar la hipótesis de que observados y esperados no difieren, es de 3.84, y como el resultado del valor de χ^2 obtenido para C/T-13910 (0.0961) es menor de 3.841, esto indica que se encuentra dentro de la zona de aceptación de la prueba, por tanto la población se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg con $p>0.05$.

9.2. Perfil genotípico de la población de estudio para el SNP G/A-22018

Los patrones de bandas correspondientes a los genotipos del SNP G/A-22018, se muestran en la Figura 12. Aquellas muestras cuyas bandas presentaron un fragmento de 271 pb, se interpretaron como genotipo AA homocigoto, las de dos bandas con fragmentos de 271 pb y 196 pb, se interpretaron como genotipo GA heterocigoto. No se obtuvieron genotipos homocigotos GG.

Figura 12. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 8% teñido con bromuro de etidio, con los productos de la digestión con Hha I para G/A-22018. Carril 1, 4 y 5: muestra bandas de 271 pb y 196 pb que implica la existencia de un cambio de G por A al estado heterocigótico, genotipo GA, Carril 2: muestra una sola banda de 271 pb lo que implica ausencia del sitio de restricción, genotipo AA, Carril 3: marcador de peso molecular de 100 pb pGEM® DNA Markers (Promega).



Los resultados de la genotipificación obtenidos para G/A-22018, en la población de estudio son los siguientes: de 130 individuos, 55 fueron AA; 75 fueron GA y ninguno GG. Las frecuencias genotípicas calculadas se muestran en la Tabla 3 Las frecuencias genotípicas observadas fueron: AA (42%), GA (58%) y GG (0%). Las frecuencias alélicas para *A y para *G fueron analizadas por equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) de 0.71 y 0.29 respectivamente. Las frecuencias genotípicas esperadas por (HWE) fueron: AA (51%), GA (41%), GG (8%) (Figura 13c,13d). A partir de estas frecuencias, se estimó el equilibrio de Hardy-Weinberg utilizando el test de χ^2 HW = $\sum (O-E)^2 / E$, arrojando un valor de 19.82. En la tabla estadística de distribución de X^2 , vemos que el valor crítico para un 1 grado de libertad y para un nivel de significancia del 0.05 (5%) de error ($p= 0.05$) fue de 3.841, el valor límite para aceptar la hipótesis de que observados y esperados no difieren, es de 3.84, y como el valor de χ^2 obtenido para G/A-22018 (19.82) es mayor de 3.841, esto indica que no se encuentra dentro de la zona de aceptación de la prueba, por lo tanto la población no se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg con $p<0.05$.

Tabla 3. Distribución de la muestra según los fenotipos y las frecuencias genotípicas de los SNPs C/T-13910 y G/A-22018 observadas y esperadas en la población de estudio.

POLIMORFISMO	FENOTIPO (según Enattah et al. 2002.)	GENOTIPO	FRECUENCIAS GENOTÍPICAS	
			Observada (n= 130)	Esperada (n=130)
C/T -13910	Hipolactasia	CC	117 (0.90)	117.33 (0.90)
	Persistencia	CT	13 (0,10)	12.35 (0.095)
	Persistencia	TT	0 (0.0)	0.325 (0.003)
G/A -22018	Persistencia	AA	55 (0.42)	65,8 (0.51)
	Persistencia	GA	75 (0.58)	53.4 (0.41)
	Hipolactasia	GG	0 (0.0)	10.8 (0.08)

Las Frecuencias Alélicas encontradas en la población de estudio muestran una mayor prevalencia del alelo *C (95%) y el alelo *A (71.2%) y una frecuencia muy baja del alelo *G(28,8) y el alelo *T (5.0%) (Tabla 4).

Tabla 4. Frecuencias Alélicas encontradas (C,T, A,G) en la población de estudio

SNP C/T -13910 Alelos	FRECUENCIAS ALELICAS (n=130)
C	0,9500
T	0,0500

SNP G/A -22018 Alelos	FRECUENCIAS ALELICAS (n=130)
A	0,7115
G	0,2885

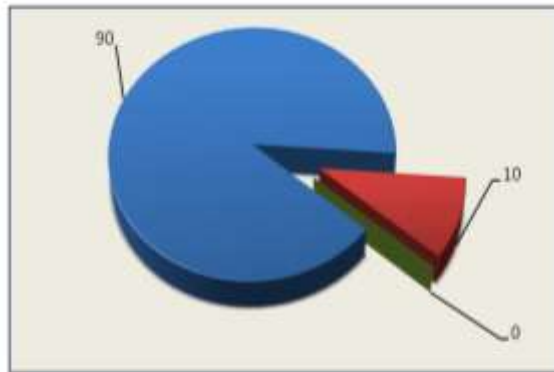
Las frecuencias de los haplotipos encontrados en la población de estudio se muestran en la Tabla 5, observándose las siguientes frecuencias: CG (58%), CA (53%), TG (0%) y TA (5,7%) las cuales se utilizaron para la estimación de la asociación alélica o haplotípica, de este modo, se hallaron las frecuencias gaméticas observadas y esperadas (Tabla 6).

Tabla 5. Distribución de los Haplotipos encontrados (CG,CA,TA) en la población de estudio

HAPLOTIPOS	FRECUENCIAS HAPLOTIPICAS (n= 130)	
	OBSERVADAS	ESPERADAS
CG	75 (0,576)	65,51 (0,503)
CA	59 (0,453)	40,46 (0,311)
TG	0	2,46 (0,018)
TA	13 (0,576)	1,52 (0,011)
TOTAL	130	

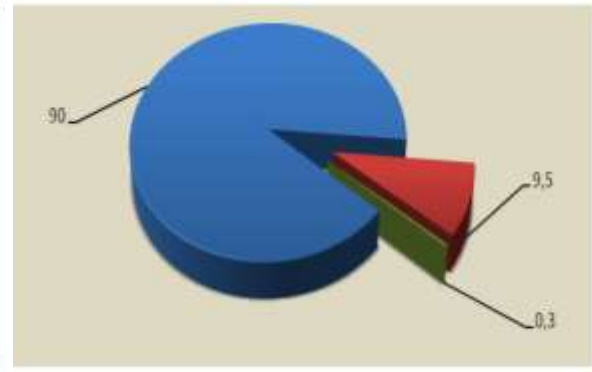
Análisis de Resultados

Figura 13. Distribución de las frecuencias genotípicas observadas y esperadas para los SNPs C/T-13910 y G/A-22018 y su relación con los fenotipos reportados por Enathan et al ¹⁸, en Finlandeses. **a)** Frecuencias genotípicas observadas para el C/T 13910. **b)** Frecuencias genotípicas esperadas para el C/T 13910. **c)** Frecuencias genotípicas observadas para el G/A 22018. **d)** Frecuencias genotípicas esperadas para el G/A22018. Se observa que los genotipos TT y AA no se encontraron en la población estudiada. (Datos tomados de la tabla 3)



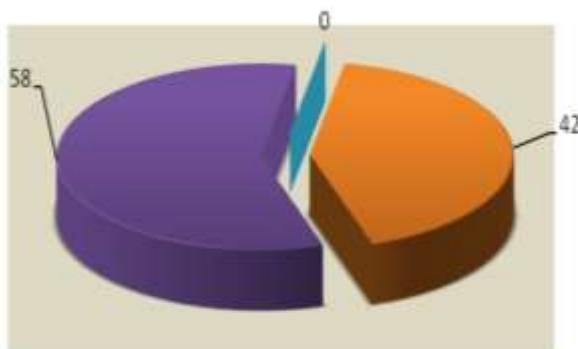
■ CC ■ CT ■ TT

a) Frecuencias genotípicas observadas C/T 13910



■ CC ■ CT ■ TT

b) Frecuencias genotípicas esperadas C/T 13910



■ AA ■ AG ■ GG

c) Frecuencias genotípicas observadas G/A 22018



■ AA ■ AG ■ GG

d) Frecuencias genotípicas esperadas G/A22018

9.3. Análisis del Desequilibrio de Ligamiento

Existen 9 genotipos posibles combinando las dos variantes genéticas C/T-13910 y G/A-22018 para el gen de la lactasa (LCT), CCAA, CCGA, CCGG, CTAA, CTGA, CTGG, TTAA, TTGA, TTGG. En los estudios realizados por Kuokkanen *et al*¹⁴⁷, se compara el genotipo de pacientes con la actividad de la enzima a través de material obtenido de biopsia intestinal y se identifican 4 genotipos : CCGG y CCGA asociados con Lactasa no persistencia y CTGA, TTAA asociados con Lactasa persistencia. En el presente estudio se identificaron 4 genotipos en la población: CCGA, CCAA, CTAA y CTGA.

Las frecuencias gaméticas CCAA, CCGA, CCGG, CTAA, CTGA, CTGG, TTAA, TTGA, TTGG se utilizaron para la estimación de la asociación alélica. De este modo se hallaron las frecuencias gaméticas observadas y esperadas (Tabla 6).

Tabla 6. Distribución de las Frecuencias gaméticas observadas - esperadas y χ^2 para el análisis del desequilibrio de ligamiento

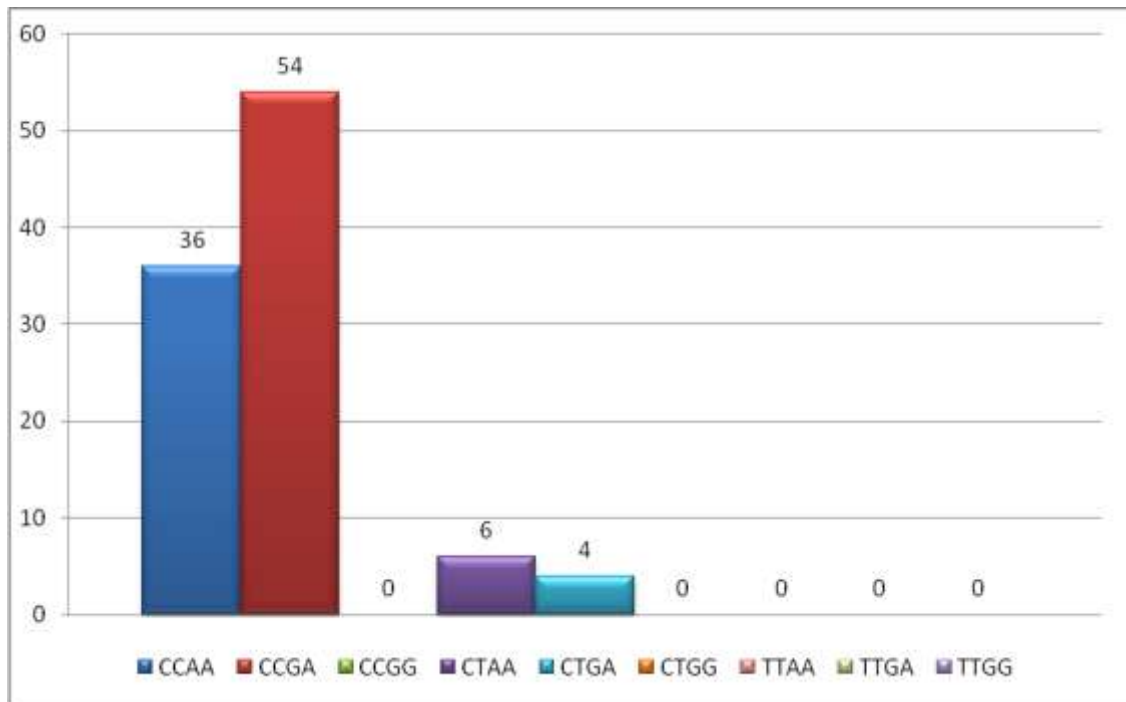
GAMETOS	FRECUENCIAS GAMÉTICAS (n= 130)		$\chi^2 = \sum (O-E)^2/E$
	OBSERVADAS	ESPERADAS	
CCAA	47 (0,36)	59,4 (0,46)	2,589
CCGA	70 (0,54)	48,16 (0,37)	9,904
CCGG	0	9,76 (0,075)	9,760
CTAA	8 (0,06)	6,253 (0,048)	0,488
CTGA	5 (0,04)	5,07 (0,039)	0,001
CTGG	0	1,03 (0,007)	1,030
TTAA	0	0,164 (0,001)	0,164
TTGA	0	0,133 ((0,001)	0,133
TTGG	0	0,027 (0.0002)	0,027
TOTAL	130		24,096

De acuerdo con los resultados, los gametos hallados con mayor frecuencia presentes en la población de estudio, fueron: CCGA (0,54) y CCAA (0,36); los menos frecuentes: CTAA (0,06) y CTGA (0,04), no se encontraron ninguno de los siguientes gametos CCGG, CTGG, TTAA, TTGA, TTGG (Figura 14a, 14b).

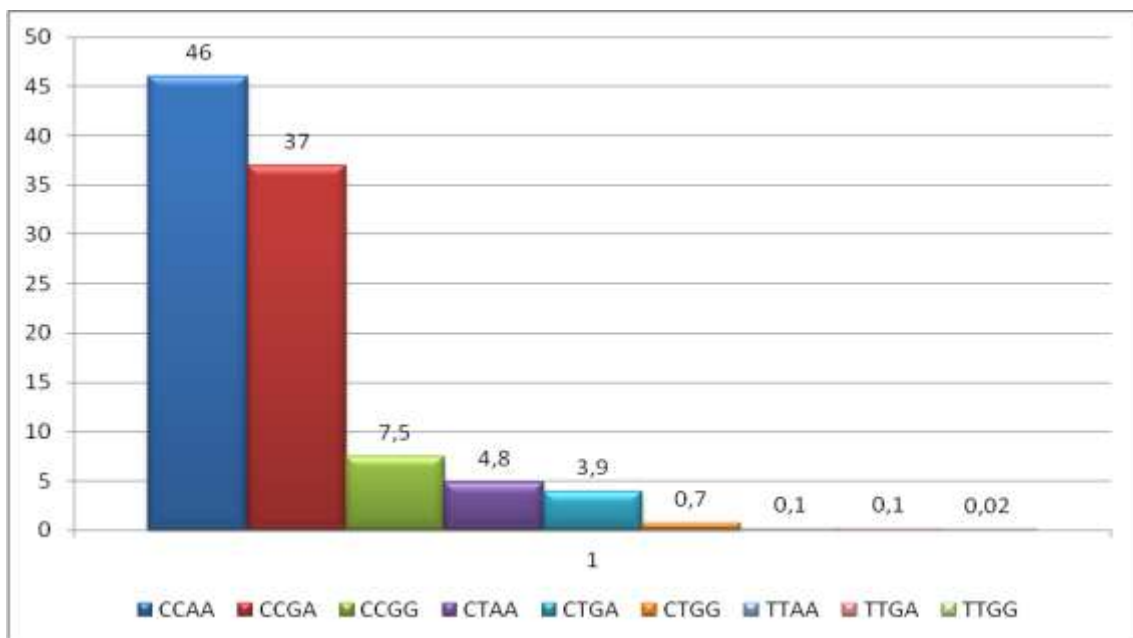
En cuanto a la distribución del Chi cuadrado (X^2 de Pearson) para la suma de las frecuencias gaméticas observadas sobre el total de alelos (130), se encontró un resultado de 24,1. Teniendo en cuenta lo observado en las tablas estadísticas de distribución de probabilidad, vemos que para 1 grado de libertad y para un nivel de significancia del 0.05 (5%) de error, el valor límite para aceptar la hipótesis de que observados y esperados no difieren, es de 3.84. Como el resultado fue de 24,1; este dato indica que no se encuentran dentro de la zona de aceptación de la prueba, ya que se presentan frecuencias alélicas demasiado bajas y presentan una diferencia bastante notoria con la frecuencia gamética en el valor del desequilibrio de ligamiento. De este modo se concluye que existe desequilibrio de ligamiento, encontrándose segregación independiente de los dos *loci* C/T y G/A ($p > 0,05$).

Los valores del Chi cuadrado (X^2 de Pearson) nos están indicando que estos dos *SNPs* (C/T-13910 y G/A-22018) están en desequilibrio de ligamiento, por eso sólo se encontraron dos haplotipos mayoritarios el CG (0,576) y CA (0,453), en lugar de 4, que sería lo normal de no estar en desequilibrio de ligamiento (Tabla 5). El hecho de que estén en desequilibrio de ligamiento, hace pensar que genotipificar los dos *SNPs* sería una práctica redundante. Con sólo genotipificar el C/T-13910 estaríamos obteniendo la información que se requiere, utilizándolo como un marcador genético de rastreo de Hipolactasia.

Figura 14. Distribución de las Frecuencias Gaméticas a) observadas y b) esperadas para el análisis del desequilibrio de ligamiento. (Datos tomados de la tabla 6)



a) Distribución de las Frecuencias Gaméticas observadas para el análisis del desequilibrio de ligamiento



b) Distribución de las Frecuencias Gaméticas esperadas para el análisis del desequilibrio de ligamiento

9.4. Análisis Comparativo del perfil genotípico para los SNPs C/T-13910 y G/A-22018 obtenido en la población de estudio con los datos de dos grupos poblacionales de Colombia.

Se realizó un análisis comparativo del perfil genético para los polimorfismo, C/T-13910 y G/A-22018 obtenido en la población de estudio (afrodescendientes) (Tabla 7) con los obtenidos en muestras procedentes de 2 poblaciones: Mestizos del Caribe Colombiano ¹⁴⁸ (156 muestras) (Tabla 8) e indígenas Wiwa ¹⁴⁹ (55 muestras) (tabla 9). Se observa que los tres grupos presentan una alta prevalencia del genotipo homocigótico CC, de un 90%, 81.4% y 92%, respectivamente. Los datos de los afrodescendientes son muy similares a los del grupo de mestizos. Les siguen el genotipo GA, de 58%, 46% y 76%, respectivamente, Se observó una mayor frecuencia en el grupo de los Wiwa. La prevalencia encontrada del genotipo AA es del 42% en los afrodescendientes, 55% en los mestizos y ausencia total en los Wiwa. Sólo se encontró el genotipo GG en la población Wiwa, con una frecuencia del 23%. En ninguno de los grupos se encontró el genotipo TT.

Tabla 7 : Frecuencias Genotípicas observadas y esperadas de los polimorfismos C/T-13910 and G/A-22018 en la población de estudio (Afrodescendientes de San Basilio de Palenque).

POLIMORFISMO	FENOTIPO (Según Enattah <i>et al.</i> 2002.)	GENOTIPO	FRECUENCIAS GENOTÍPICAS
			Observada (n= 130)
C/T -13910	Hipolactasia	CC	117 (0.90)
	Persistencia	CT	13 (0,10)
	Persistencia	TT	0
G/A -22018	Persistencia	AA	55 (0.42)
	Persistencia	GA	75 (0.58)
	Hipolactasia	GG	0

Tabla 8 : Frecuencias Genotípicas observadas y esperadas de los polimorfismos C/T-13910 and G/A-22018 en una muestra de una población Mestiza del Caribe Colombiano ¹⁴⁸

POLIMORFISMO	FENOTIPO (Según Enattah et al. 2002.)	GENOTIPO	FRECUENCIAS GENOTÍPICAS
			Observada (n= 156)
C/T -13910	Hipolactasia	CC	127 (0.814)
	Persistencia	CT	29 (0,186)
	Persistencia	TT	0
G/A -22018	Persistencia	AA	85 (0.545)
	Persistencia	GA	71 (0.455)
	Hipolactasia	GG	0

Tabla 9 : Frecuencias Genotípicas observadas y esperadas de los polimorfismos C/T-13910 and G/A-22018 en una muestra de una población Indígena Wiwa ¹⁴⁹

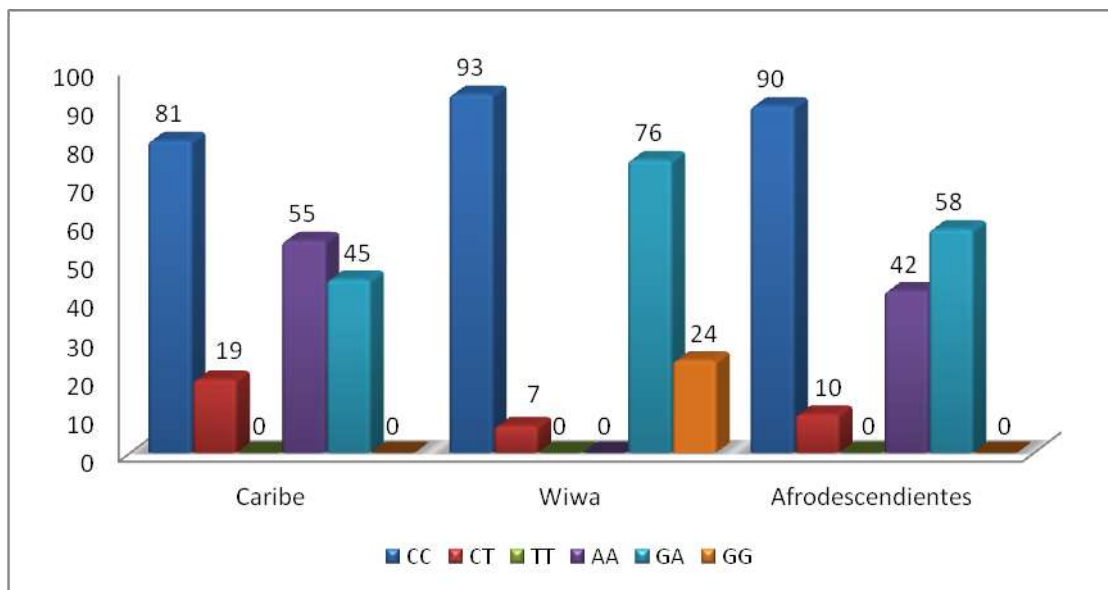
POLIMORFISMO	FENOTIPO (Según Enattah et al. 2002.)	GENOTIPO	FRECUENCIAS GENOTÍPICAS
			Observada (n= 55)
C/T -13910	Hipolactasia	CC	51 (0.92)
	Persistencia	CT	4 (0,07)
	Persistencia	TT	0
G/A -22018	Persistencia	AA	0
	Persistencia	GA	42 (0.76)
	Hipolactasia	GG	13 (0.236)

Haciendo un análisis comparativo, de las frecuencias genotípicas para los SNPs C/T-13910 y G/A-22018 encontradas en el presente estudio, son muy similares con lo reportado en otras poblaciones colombianas, Mestizos Caribeños¹⁴⁸ e indígenas Wiwa.¹⁴⁹ En cuanto al polimorfismo C/T-13910 los resultados de nuestra población de estudio son similares a la frecuencia genotípica del CC y el CT tanto en el grupo de los mestizos como el de los Wiwa y en los tres grupos está ausente el genotipo homocigótico TT. Por otro lado en cuanto al polimorfismo G/A-22018, los resultados de nuestra población de estudio son muy similares a lo encontrado en el grupo de los mestizos, tanto para el genotipo AA y el GA, en ambos grupos está ausente del genotipo homocigótico

GG; pero los datos difieren de lo encontrado en el grupo de los Wiwa, quienes presentan una mayor frecuencia para el genotipo GA (76%); sólo se encontró el genotipo homocigótico GG en esta población (24%) y está totalmente ausente el genotipo AA. (Fig. 15)

Los datos de las frecuencias alélicas y genotípicas para ambos SNPs C/T-13910 y G/A-22018 encontrados en la población afrodescendientes en estudio, son muy similares a lo observado en el grupo de mestizos del Caribe Colombiano, pero presentan diferencia con el grupo de los Wiwa en lo referentes a las frecuencias genotípicas para el SNP G/A-22018.

Figura 15. Distribución de las frecuencias genotípicas observadas para los SNPs C/T-13910 y G/A-22018 en tres grupos poblacionales de Colombia. (Tomado los datos de las Tablas 7,8,9)



9.5. Análisis Comparativo del perfil genotípico para los SNPs C/T-13910 y G/A-22018 obtenido en la población de estudio con los datos de Grupos Poblacionales de diferentes partes del mundo.

Tabla 10. Análisis Comparativo entre las frecuencias de los genotipos C/T-13910 y G/A-22018 obtenidas en la población de estudio y los datos de otras poblaciones

Población	Fuente	Número Total de individuos	CC		CT		TT		AA		GA		GG	
			No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
Noruega	<i>Enattah (2002)¹⁹</i>	45	27	(60)	15	(33.3)	3	(0,67)	---	---	---	---	---	---
USA (N. europeos)	<i>Enattah (2002)¹⁹</i>	92	7	(7.61)	33	(35.87)	52	(56.57)	---	---	---	---	---	---
UK (N. europeos)	<i>Swallow (2003)¹</i>	37	2	(5.41)	15	(40.54)	20	(54.05)	---	---	---	---	---	---
Finlandeses	<i>Enattah (2002)¹⁹</i>	59 LNP	59	(100)	0	(0.0)	0	(0.0)	0	(0.0)	6	(10)	53	(90)
		137 LP	0	(0.0)	63	(46)	74	(54)	74	(54)	63	(46)	0	(0.0)
Francia (Norte)	<i>Enattah (2002)¹⁹</i>	24	7	(29.17)	12	(50)	5	(20.83)	---	---	---	---	---	---
Arabia Saudita	<i>Imtiaz 2007¹⁵⁶</i>	430	428	(99.5)	2	(0,5)	0	(0.0)	---	---	---	---	---	---
USA (negros)	<i>Enattah (2002)¹⁹</i>	96	76	(79.17)	15	(15,62)	5	(5.21)	---	---	---	---	---	---
Camerún	<i>Mulcare 2004¹⁵⁰</i>	534	520	(97.4)	22	(4.11)	3	(0.56)	---	---	---	---	---	---
Nigeria	<i>Mulcare 2004¹⁵⁰</i>	176	176	(100)	0	(0.0)	0	(0.0)	---	---	---	---	---	---
Malawi	<i>Mulcare 2004¹⁵⁰</i>	263	263	(100)	0	(0.0)	0	(0.0)	---	---	---	---	---	---
Senegal	<i>Mulcare 2004¹⁵⁰</i>	181	180	(99,4)	1	(0.0)	0	(0.55)	---	---	---	---	---	---
Sudan (Norte)	<i>Mulcare 2004¹⁵⁰</i>	129	129	(100)	0	(0.0)	0	(0.0)	---	---	---	---	---	---
Sudan (Sur)	<i>Mulcare 2004¹⁵⁰</i>	120	120	(100)	0	(0.0)	0	(0.0)	---	---	---	---	---	---
Etiopia	<i>Mulcare 2004¹⁵⁰</i>	227	227	(100)	0	(0.0)	0	(0.0)	---	---	---	---	---	---
Uganda	<i>Mulcare 2004¹⁵⁰</i>	40	40	(100)	0	(0.0)	0	(0.0)	---	---	---	---	---	---
Afrodescendientes	<i>Presente estudio</i>	130	117	(90)	13	(10)	0	(0.0)	55	(42)	75	(58)	0	(0.0)
Caribe Colombiana	<i>Mendoza, E.¹⁴⁸ (2010)</i>	156	127	(81.4)	29	(18.6)	0	(0.0)	85	(54.5)	71	(45.5)	0	(0.23)
Indígena Wiwa	<i>Arevalo, E.¹⁴⁹ (2010)</i>	55	51	(92)	4	(7)	0	(0.0)	0	(0.0)	42	(76)	13	(2.3)

Nuestros resultados se compararon con los datos obtenidos por *Enattah et al (2002)¹⁹* en varias poblaciones, en las cuales se estudió la variante C/T-13910. Estudiaron una cohorte de 196 individuos no relacionados de origen Finlandés,

informando una correlación del 100% entre el fenotipo Lactasa no persistencia con la presencia de alelo C del SNP C/T-13910 localizado corriente arriba del gen de la lactasa. El estudio del fenotipo indicó que de los 196 individuos, 59 fueron Lactasa no persistentes y 137 fueron Lactasa persistentes. Los resultados de la genotipificación obtenidos para C/T-13910 y G/A-22018 mostraron que todos los individuos con fenotipo Lactasa no persistente presentaron el genotipo homocigótico CC (100%); además, no presentaron los genotipos CT y TT. Para el SNP G/A-22018 encontraron, en estos mismos individuos, las siguientes frecuencias: GG (90%), GA (10%) y ninguno presentó el genotipo AA. Los 137 individuos con fenotipo Lactasa persistencia, presentaron las siguientes frecuencias para el SNP C/T-13910: ninguno presentó el genotipo homocigoto CC, el genotipo CT (46%) y con una mayor frecuencia el genotipo TT (54%). Para el SNP G/A-22018, presentaron AA (54%), GA (46%) y ninguno presentó el genotipo homocigótico GG (Tabla 10).

En este mismo estudio, Enattah *et al* 2002 ¹⁹, analizaron otras poblaciones de Europa, incluyendo 24 individuos no relacionados del Norte de Francia. En la cohorte francesa encontraron las siguientes frecuencias: CC (29.17%) C/T (50%) y T/T (21%). Fue incluida una cohorte de 45 noruegos, la cual presentó las siguientes frecuencias: CC (60%), C/T (33.3%) y T/T (0,67%). Incluyeron 92 norte-europeos que habitan en Estado Unidos, los cuales presentaron los siguientes resultados: CC (5.41%), C/T (40.5%) y T/T (54%). También incluyeron 96 negros que habitan en Estados Unidos con las siguientes observaciones: CC (79.17%), C/T (15.62%) y T/T (5,21%). Finalmente, estudiaron 430 individuos de Arabia Saudita, de los cuales 428 fueron CC (99,5%), solamente 2 individuos presentaron el genotipo C/T (0.5%) y ninguno presentó el genotipo T/T (Tabla 10).

Al Revisar la literatura se analizaron los resultados de la prevalencia del polimorfismo C/T-13910 que fueron reportados por Mulcare *et al* ¹⁵⁰. Ellos trabajaron con diferentes poblaciones de África, sumando un total de 1630

africanos, los cuales genotipificaron para este polimorfismo. La mayoría de ellos fueron homocigotos para el alelo *C, presentando las siguientes frecuencias: Camerún 520 (97.4%), Nigeria 176 (100%), Malawi 263 (100%), Senegal 180 (99,4%), Sudán 149 (100%), Etiopía 227 (100%), Uganda 40 (100%) (Figura 16). Se observa una alta prevalencia, casi cerca del 100% del genotipo CC en la mayoría de estas poblaciones africanas asociadas con el fenotipo Lactasa no persistencia.

Haciendo un análisis comparativo de las frecuencias genotípicas del polimorfismo C/T-13910 encontradas en los afrodescendientes de San Basilio de Palenque, para el genotipo CC (90%), para el C/T(13%) y para el alelo T/T, el cual no fue detectado, concluimos que son muy similares a la alta prevalencia del genotipo homocigoto CC que se encontró en diferentes poblaciones africanas, cuya frecuencia oscila entre 97.4% y 100%. El genotipo C/T solo se encontró en Camerún 22 (4%) y Senegal 1 (0.06%) y, al igual que los resultados de nuestra población de estudio, no se encontró ningún individuo con el genotipo homocigótico TT.

Figura 16: Mapa político de África: muestra, identificadas por círculos, las 9 regiones de África donde se desarrolló el estudio de Mulcare et al 2004¹⁵⁰ para el análisis del genotipo C/T-13910.



10. DISCUSION

Para el presente estudio, el resultado de los análisis de las frecuencias alélicas y genotípicas para el SNP C/T -13910 sobre el gen *LCT*, según lo reportado por Enattah, *et al* ¹⁹ predice que los sujetos genotipificados son mayoritariamente hipolactásicos por ser portadores del genotipo CC (96%). Sólo un estudio asociativo que correlacione las variables genotípicas y las fenotípicas podría comprobarlo. La presencia de equilibrio de Hardy-Weinberg para este SNP, sugiere que ha sido ampliamente conservado y al parecer, sus frecuencias no han sido alteradas por fenómenos de selección natural, ofreciendo la posibilidad de poder utilizarse como marcador de rastreo de Hipolactasia.

Con respecto al SNP G/A-22018, en particular, no se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg, lo que determina que no es un posible marcador de rastreo de Hipolactasia. De acuerdo con sus frecuencias genotípicas, puede notarse que el 100% de los individuos son portadores del alelo *A dominante A-22018 que está ligado a Lactasa persistencia en la población caucásica del norte de Europa. Si este alelo realizara la misma función en la población de estudio, todos los individuos también serían Lactasa persistentes, sin embargo este dato no es coherente con los datos de prevalencia para Lactasa persistencia en Colombia, los cuales sugieren un 60% en población Caribeña ²⁵

Estos datos también difieren de la frecuencia del alelo *T dominante del SNP C/T-13910 indicativo de lactasa persistencia en los Europeos. La acción de la selección natural puede explicar las elevadas frecuencias de persistencia observadas en poblaciones nómadas del Norte de África y Próximo Oriente y en poblaciones del Centro y Norte de Europa, donde la ganadería, la practica pastoril y el consumo de productos lácteos están ampliamente distribuidos. El contraste entre la alta frecuencia del alelo * A-22018 y la baja frecuencia del alelo * T-13910 en la población de estudio, podría explicarse por las diferencias en fuerzas evolutivas que actúan en cada uno de los SNPs. De hecho, sólo

C/T-13910 se encontró en equilibrio de Hardy Weinberg.¹⁵¹

El análisis de los posibles haplotipos presentes en la población de estudio, mostró que los alelos de los SNP C/T-13910 y G/A-22018 asociados a Hipolactasia presentan desequilibrio de ligamiento. Dicho desequilibrio, significaría que, presuntamente, en la población de afrodescendientes, al ser de tamaño pequeño, la asociación alélica ocurriría de manera aleatoria debido a la recombinación genética y por lo tanto, no operaría la acción de la selección natural sobre estos SNPs, a diferencia de lo reportado en Finlandeses, en quienes la presencia de los alelos asociados a Lactasa persistencia les confirió ventajas evolutivas.

Para el caso del SNP C/T-13910, los hallazgos de este estudio concuerdan con los estudios de Mulcare¹⁵⁰ e Ingram¹²¹, quienes encontraron, en África, bajas frecuencias del alelo *T. También concuerdan nuestros datos con las frecuencias genotípicas reportadas en poblaciones africanas: CC (95%), CT (5%), TT (0%), en 65 individuos no emparentados;¹¹⁹ datos similares fueron reportados también en cinco poblaciones del norte China: CC (96%), CT (4%), TT (0%).

Haciendo un análisis comparativo, de las frecuencias genotípicas para los SNPs C/T-13910 y G/A-22018 encontradas en el presente estudio, con lo reportado en población de Mestizos Caribeños¹⁴⁸ y población indígena Wiwa¹⁴⁹, las frecuencias genotípicas estimadas para el genotipo homocigoto CC fue del 81% y 92%, respectivamente; y para el genotipo heterocigoto CT del 19% y 7%, respectivamente. Los resultados son semejantes a lo reportado en nuestro estudio y en ninguno de los tres grupos se encontró el genotipo homocigótico TT. Por otro lado, en cuanto al polimorfismo G/A-22018, los resultados son muy similares a lo encontrado en los mestizos para el genotipo AA (55%) y difiere de los Wiwa, porque en estos últimos, está ausente el genotipo homocigótico AA. Para el genotipo GA, se encontró en los mestizos una frecuencia del 46% y en

los Wiwa del 76%, observándose una mayor frecuencia en el grupo de los Wiwa. Sólo se encontró el genotipo GG en la población Wiwa con una frecuencia del 23%.

El comercio y mercado de esclavos fue para Cartagena durante dos siglos una de las principales actividades que en algún momento absorbió la vida económica y social de la ciudad. De tal manera que los individuos que poblaron a San Basilio de Palenque, fueron africanos que llegaron al puerto de Cartagena, en navíos de esclavos, viajando desde las costas occidentales de África, entre el siglo XVI al XIX. Ellos procedían de diversas regiones Africanas, desde las Costas de Senegambia hasta Angola, incluyendo Guinea, Cabo Verde, Bissau, Sierra Leona, Gambia, Senegal, Angola, Costa de Oro y Ararás entre otros.¹⁵².

Por la anterior se deduce que los afrodescendientes que poblaron a San Basilio de Palenque, provenían de diferentes regiones de África, encontrándose que las frecuencias genotípicas para el polimorfismo C/T-13910 encontradas en nuestra estudio, CC (90%), el C/T (13%) y ningún individuo presentó el alelo homocigótico T/T; tienen un comportamiento muy similar a lo reportado en un estudio realizado por Mulcare, *et al*, en diferentes poblaciones africanas, en quienes se genotificaron la misma variante, reportando una proporción máxima del CC (100)% en la población de Nigueria, Malawi, Sudan, Uganda y Etiopía. Después en orden decreciente en la población de Senegal CC (99.4%) y por último en los habitantes de Camerún CC (97.4%). Estos resultados son muy similares a los encontrados en nuestra población de estudio con una alta prevalencia del genotipo homocigoto CC. El genotipo C/T solo se encontró en Camerún (4%) y Senegal (0.06%) y al igual que en nuestro estudio, no se encontró ningún individuo con el genotipo homocigótico TT. En conclusión, los resultados de las poblaciones africanas genotipadas por Mulcare *et al*,¹⁵⁰ para el polimorfismo C/T-13910, confirman la distribución geográfica de la prevalencia de la Hipolactasia tipo adulto a nivel de África.

Diversos estudios de genotipificación realizados en poblaciones africanas, muestran ausencia del alelo *T-13910 en la mayoría de ellos, lo cual sugiere que este marcador no es un predictor fiable del fenotipo de lactasa persistencia en los individuos de esta región. Las poblaciones africanas muestran múltiples estilos de vida, como el caso de los angolas, congos de las etnias bantúes, los cuales eran básicamente agricultores, aunque también fueron herreros y comerciantes.¹⁵³ Además se resalta el hecho que la mayoría de estas poblaciones no tienen una historia de pastoralismo y el consumo de productos lácteos es poco común, lo que podría explicar del porqué la ausencia del alelo *T.

Los resultados de nuestro estudio son discordante con el de Bulhoes *et al*¹⁵⁴, quienes encontraron que los SNP C/T-13910 y G/A-22018, servirían como marcadores genéticos moleculares para el rastreo de Lactasa persistencia en Brasil. En este estudio incluyeron 20 sujetos brasileños, de los cuales 19 eran de origen Europeo, presumiblemente caucásicos y uno de origen asiático, los cuales, no hacen parte de la población mayoritariamente autóctona de Brasil.

La ausencia del alelo T-13910 identificada en la población de estudio se correlaciona con lo encontrado en varias poblaciones africanas, donde este alelo no está presente y no puede explicar los datos de prevalencia de Lactasa Persistencia en africanos.¹⁵⁰ Este hallazgo llevó a Ingram y Col, a sospechar que la causa de persistencia de lactasa en la población africana debió venir de un SNP diferente.¹²¹ Varios estudios revelan un grupo de SNPs, localizados en la vecindad de C/T-13910. Así, para algunos grupos africanos lactasa persistentes, se ha descrito recientemente el polimorfismo SNP G/A (13915) como el de mayor frecuencia, ubicado 5 nucleótidos corriente arriba del mencionado anteriormente. Fueron encontrados en poblaciones afroasiáticas (Kenianos, Tanzanianos, Nilo-sharianos) y pastoriles del medio oriente.^{119,121} En este caso la variante *G-13915 se asocia con persistencia de lactasa y

tolerancia a la lactosa. ¹²¹ Las variantes *G-13915 y *C-14010, están asociados con lactasa persistencia en diferentes partes del Este de África ¹⁵⁵. El *G-13915 sólo mostró estar asociado con alta expresión de lactasa en Arabia Saudita. ¹⁵⁶ Un tercer SNP *G-13907, mostró evidencia, un poco más débil, pero se encontró en varios estudios. ^{119,121,155}. Estos SNPs representan marcadores genéticos causantes de Lactasa persistencia en estas poblaciones.

Por lo anterior, se hace necesario realizar un estudio más extenso incluyendo la identificación de otros marcadores tipo SNP adyacentes al polimorfismo C/T-13910, para probar si la baja prevalencia observada de Lactasa persistencia entre los SNPs analizados, se correlaciona con la historia demográfica de esta población. ¹⁵⁷

En conjunto nuestros resultados comparados con los datos publicados de investigaciones realizadas en poblaciones europeas, asiáticas y africanas, demuestra la gran variabilidad de las frecuencias alélicas y genotípicas para los SNPs C/T-13910 y G/A-22018 y su correlación con la lactasa persistencia y Lactasa no persistencia. Siendo importante realizar la genotipificación de estas variantes en nuestra población de estudio, para determinar, acorde a su frecuencia y asociación con el fenotipo lactasa no persistencia, cuál de estos polimorfismos se puede utilizar como marcador genético de Hipolactasia en poblaciones genéticamente similares.

11. CONCLUSIONES

- ❖ En la población afrodescendiente de la Costa Caribe, se encontraron las dos variantes polimórficas C/T-13910 y G/A-22018 asociadas con Hipolactasia primaria tipo adulto en caucásicos.
- ❖ Los SNPs C/T-13910 y G/A-22018 en la población de estudio, mostraron una distribución alélica y genotípica diferente a lo encontrado en la población caucásica al Norte de Europa, pero muy semejante a lo reportado en diferentes poblaciones de África, en los que se ha demostrado que el SNPs C/T-13910 esta asociado con el fenotipo Lactasa no persistencia (Hipolactasia).
- ❖ La identificación del polimorfismo C/T-13910 asociada con el fenotipo persistencia/no persistencia de la Lactasa, ofrece posibilidades de utilizarse como marcador genético de Hipolactasia en la población objeto de estudio, por la alta prevalencia del homocigoto CC, de tal manera que podría incluirse como una prueba de primera línea en el diagnóstico de HPTA en poblaciones genéticamente similares con los africanos, quienes presentan una prevalencia relativamente alta de Hipolactasia.
- ❖ De acuerdo con los resultados obtenidos, el SNP G/A-22018 no sería predictor de Hipolactasia en la población de estudio. Al no encontrarse el genotipo GG en esta población, puede ser que el alelo no es causativo de esta condición y sólo está fuertemente asociado con el alelo causal; o en los afrodescendientes, se encuentre otra mutación diferente, a nivel de este polimorfismo, asociado con el fenotipo Lactasa no persistencia. Estos resultados podrían ser utilizados como referencia para otros estudios de distribución geográfica de este polimorfismo en poblaciones colombianas, para entender la evolución de la Lactasa persistencia en los humanos.

12. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda realizar un estudio de correlación entre los genotipos de C/T-13910 y los fenotipos Hipolactasia y Lactasa persistencia, utilizando un método diagnóstico de tipo directo o la prueba de referencia, el test del Hidrógeno en el aliento.
2. Por medio de análisis de secuenciación se podría verificar si los SNP asociados a lactasa persistencia: -14010*C presente en grupos pastoriles de Kenia y Tanzania (Tishkoff, *et al.* 2007); el -13915*G y el T/C-13913 presente en África (Camerún, Etiopía, Kenya, Sudán) y Arabia Saudita Jordania (Beduinos), (Imtiaz, *et al.* 2007); el -13907*C presente en población Beja (Afro-Asiática), Kenya, Sudán, Etiopía están asociados a la Lactasa persistencia o Hipolactasia en la población de estudio.
3. Por estos mismos análisis, se podría confirmar si existen otros SNPs, propios ó autóctonos, que puedan explicar mejor la presencia de los fenotipos Hipolactasia y Lactasa persistencia en la población de afrodescendientes de San Basilio de Palenque de la Costa Caribe colombiana.

13. BIBLIOGRAFIA

1. Swallow DM. Genetics of lactase persistence and lactose intolerance. *Annu Rev Genet* 2003;37:197-219.
2. Montgomery RK, Buller HA, Rings EHHM, Grand RJ. Lactose intolerance and the genetic regulation of intestinal lactase-phlorizin hydrolase. *FASEBJ*. 1991;5:2824-2832.
3. Sahi T, Isokoski M, Jussila J, Launiala K, Pyorala K. Recessive inheritance of adult-type lactose malabsorption. *Lancet*. 1973; 2:823-6
4. Sahi, T., Launiala, K. More evidence for the recessive inheritance of selective adult type lactose malabsorption. *Gastroenterology* 1977; 73, 231-232.
5. Birge S T, Kentmann H T, Cuatrecasas P & Whedon G D. Osteoporosis, intestinal lactase deficiency and low dietary calcium intake. *New Engl. J. Med.* 1967;276(8):445-448.
6. Newcomer, A. D., Hodgson, S. F., McGill, D. B. & Thomas, P. J. Lactase deficiency: prevalence in osteoporosis. *Annals of Internal Medicine* 1978; 89, 218-220.
7. Sahi T. Dietary lactose and the a etiology of human small-intestinal hypolactasia. *Gut* 1978; 19:1074-86
8. Gudman-Hoyer, E. The clinical significance of disacc maldigstion. *Am J Clin Nutr* 1994;59: 735S-741S.
9. Vesa, T. H., Marteau, P., Korpela, R., , Lactose intolerance. *Journal of the American College of Nutrition*. 2000; 19, 165-175.
10. Dhalqvist, A., Assay of intestinal disaccharidases. *Enzym. Biol. Clin.* 1970; 11: 52 - 56.
11. Hogenauer C, Hammer HF, Mellitzer K, Renner W, Krejs GJ, Toplak H. Evaluation of a new DNA test compared with the lactose hydrogen breath test for the diagnosis of lactase non-persistence. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2005 ;17(3):371-376.
12. Romagnuolo J, Schiller D, Bailey RJ. Using breath tests wisely in a gastroenterology practice: an evidence-based review of indications and pitfalls in interpretation. *Am J Gastroenterol* 2002;97(5):1113-1126.
13. Shaw AD, Davies GJ. Lactose intolerance: problems in diagnosis and treatment. *J Clin Gastroenterol* 1999; 28:208-16.
14. Vonk RJ, Lin Y, Koetse HA, Huang C, Zeng G, Elzinga H, et al. Lactose (mal) digestion evaluated by the 13C-lactose digestion test. *Eur J Clin Invest* 2000 ;30(2):140-146.
15. Arola H, Tamm A. Metabolism of lactose in the human body. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1994;202:21-5.
16. Swagerty DL, Walling AD, Klein RM. Lactose intolerance. *Am Fam Physician* **2002;65:1845-50.**
17. Poulter M, Hollox E, Harvey CB, Mulcare C, Peuhkuri K, Kajander K, Sarnar M, Korpela R, Swallow DM: The causal element for the lactase persistence/non-persistence polymorphism is located in a 1 Mb region of linkage disequilibrium in Europeans. *Ann Hum Genet* 2003; 67: 298-311
18. Bersaglieri, Todd, Pardis C. Sabeti, Nick Patterson, Trisha Vanderploeg, Steve F. Schaffner, Jared A. Drake, Matthew Rhodes, David E. Reich and Joel N. Hirschhorn. "Genetic Signatures of Strong Recent Positive Selection at the Lactase Gene" *American Journal of Human Genetics* 2004;74(6): 1,111-1,120
19. Enattah NS, Sahi T, Savilahti E, Terwilliger JD, Peltonen L, Jarvela I. Identification of a variant associated with adult-type hypolactasia. *Nat Genet* 2002 ;30(2):233-237.
20. Nilsson TK, Johansson CA. A novel method for diagnosis of adult hypolactasia by genotyping of the -13910 C/T polymorphism with Pyrosequencing technology. *Scand J Gastroenterol* 2004;39:287-90.
21. Buning C, Ockenga J, Kruger S, Jurga J, Baier P, Dignass A, Vogel A, Strassburg C, Weltrich R, Genschel J, Lochs H, Schmidt H: The C/C -13910 and G/G -22018 genotypes for adult-type hypolactasia are not associated with infl amatory bowel disease. *Scan J Gastroenterol* 2003; 5: 538-542.
22. Enattah NS, Sulkava R, Halonen P, Kontula K, Järvela I. The genetic variant of lactose malabsorption is associated with fractures in very old age. *J Am Geriatr Soc* 2005;53:79-82.
23. Kuokkanen M, Enattah NS, Oksanen A, Savilathi E, Orpana A, et al. Transcriptional regulation of the lactase-phlorizin hydrolase gene by polymorphisms associated with

- adulttype hipolactasia. *Gut* 2003;52:647-52.
24. Järvelä IE. Molecular genetics of adult-type hypolactasia. *Ann Med* 2005;37:179-85.
 25. Ángel LA, Calvo E, Muñoz Y. Prevalencia de Hipolactasia tipo adulto e intolerancia a la lactosa en adultos jóvenes. *Rev Col Gastroenterol* 2005; 20(4): 35-47.
 26. Swallow DM, Hollox EJ. The genetic polymorphism of intestinal lactase activity in adult humans. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds.) *The metabolic and molecular basis of inherited disease*, 8th ed. McGraw-Hill, New York, 2000.
 27. DANE "La población étnica y el Censo General 2005"; Colombia: una nación multicultural. Su diversidad étnica; 2007: 35.
 28. Devlin, Thomas M . *Bioquímica: Libro de texto con aplicaciones clínicas*. 4ª ed., Barcelona: Editorial Reverté, S.A. ;2004.
 29. Campbell MK, Farrell SO. *Bioquímica*. Cengage Learning Editores; 2006. 854 p
 30. Maraculla, José Ma; Goñi, Felix Ma . *Bioquímica Humana. Curso Básico: Vías Metabólicas Biosintética*, 2ª ed. Barcelona: Editorial Reverté, S.A. 1994: 268.
 31. Brodbeck U, Ebner KE. The subcellular distribution of the A and B proteins of lactose synthetase in bovine and rat mammary tissue. *J Biol Chem*. 1966;241:5526-32.
 32. Food and Agriculture Organization. Disponible en <http://www.rlc.fao.org/bases/alimento/default.htm>. Citado el 23 de agosto 2008
 33. Buchowski, M. S., S. Joyce, A. O. Johnson and FACN. Dietary Calcium Intake in Lactose Maldigesting Intolerant and Tolerant African American Women. *Journal of the American College of Nutrition*. 2002; 21: 47–54
 34. Aguilar, Cordero MJA. *Lactancia Materna: Composición de la leche materna*. Elsevier España; 2005; 694 p
 35. Leer PDF Online: [agroin.doc2 - vaca.agro.uncor.edu](http://agroin.doc2.vaca.agro.uncor.edu) | Biblioteca Virtual LibroSinTinta.com [Internet]; Available from: [http://www.librosintinta.in/biblioteca/verpdf/vaca.agro.uncor.edu/~pleche/material/](http://www.librosintinta.in/biblioteca/verpdf/vaca.agro.uncor.edu/~pleche/material/Citado) Citado 2011 Oct 12/agroin_doc2.pdf.htx
 36. Ángel L., Calvo E., Muñoz Y., Messing B. Deficiencia De Lactasa, Intolerancia A La Lactosa Y Pico De Masa Ósea En Adultos Jóvenes Colombianos. *Revista Colombiana De Reumatología*. 2006;13(4): 271-286
 37. *Tabla de composición de alimentos colombianos*. Instituto Colombiano de Bienestar Familiar. 5ª Edición. Bogotá, Colombia; 1988.
 38. Boll W, Wagner P, Mantei N. Structure of the chromosomal gene and cDNAs coding for lactase phlorizin hydrolase in humans with adult-type hypolactasia or persistence of lactase. *Am J Hum Genet*. 1991;48:889-902.
 39. Hauri HP, Sterchi EE, Bienz D, Fransen JA, Marxer A. Expression and Intracellular transport of microvillus membrane hydrolases in human intestinal epithelial cells. *J Cell Biol*. 1985;101:838-831.
 40. Robayo-Torres, C; Buford L Nichols. Molecular Differentiation of Congenital Lactase Deficiency from Adult-Type Hypolactasia. *Nutrition Reviews*; 2007; 65 (2):95
 41. Buller HA, Kothe MJC, Goldman DA, Grubman SA, Sasak WV, Matsudaira PT, Montgomery RK, Grand RJ Coordinate expression of lactase-phlorizin hydrolase mRNA and enzyme levels in rat intestine during development. *J Biol Chem*. 1990; 265:6978–6983
 42. Infante D. Intolerancia a la lactosa: en quién y por qué? *Anales de Pediatría. Unidad de Gastroenterología, Hepatología y Soporte Nutricional, Hospital Universitario Materno-Infantil Vall d' Hebron, Barcelona, España*; 2008.
 43. Mackey AD, McMahon RJ, Townsend JH, Gregory JF 3rd. Uptake, hydrolysis, and metabolism of pyridoxine-5'-beta-D-glucoside in Caco-2-cells. *J Nutr*. 2004;134:842-846.
 44. Nemeth K, Plumb GW, Berrin JG, Juge N, Jacob R, et al. Deglycosylation by small intestinal epithelial cell beta glucosidases is a critical step in the absorption and the metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans. *Eur J Nutr* 2003;42:29-42.
 45. Troelsen JT. Adult-type hypolactasia and regulation of lactase expression. *Biochim Biophys. Acta*. 2005;1723:19–32.
 46. Zecca L, Mesonero JE, Stutz A, Poiree JC, Giudicelli J, et al. Intestinal lactase-phlorizin hydrolase (LPH): the two catalytic sites; the role of the pancreas in pro-LPH maturation. *FEBS Lett* 1998;435:225-8.

47. Leese HJ, Semenza G. On the identity between the small intestinal enzymes phlorizin hydrolase and glycosylceramidase. *J Biol Chem* 1973;248:8170-3.
48. Wacker H, Keller P, Falchetto R, Legler G, Semenza G. Location of the two catalytic sites in intestinal lactase-phlorizin hydrolase. Comparison with sucrase-isomaltase and with other glycosidases, the membrane anchor of lactase-phlorizin hydrolase. *J Biol Chem*. 1992;267:18744-52
49. Dallas M. Swallow. Genetics Of Lactase Persistence And Lactose Intolerance. *Annu. Rev. Genet.* 2003;37:197–219
50. Vega – Franco L. Deficiencia de Lactasa en niños y sus implicaciones epidemiológicas. *Rev. Invest. Clín* 1996; 48:33-3.
51. Harvey CB, Fox MF, Jeggo PA, Mantei N, Povey S, et al. Regional localization of the lactase-phlorizin hydrolase gene, LCT, to chromosome 2q21. *Ann Hum Genet* 1993;57:179-85.
52. Harvey CB, Wang Y, Hughes LA, Swallow DM, Thurrell WP, Sams VR, et al. Studies on the expression of intestinal lactase in different individuals. *Gut*. 1995 Ene;36(1):28–33.
53. Mantei N, Villa M, Enzler T, et al. Complete primary structure of human and rabbit lactase-phlorizin hydrolase: implication for biosynthesis membrane, anchoring and evolution of the enzyme. *Embo, J.* 1988;7:2705-2713.
54. Sebastio G, Villa M, Sartorio R, Guzzeta V, Poggi V, et al. Control of lactase in human adult-type hypolactasia and in weaning rabbits and rats. *Am J Hum Genet* 1989;45:489-97.
55. Rasinperä H, Saarinen K, Pelkonen A, Järvelä A, et al. Molecularly defined adult-type hypolactasia in school-aged children with a previous history of cow's milk allergy *Gut* 2005;54:391-5.
56. Keller P, Zecca L, Boukamel R, Zwicker E, Gloor S, et al. Furin, PC1/3, and/or PC6A process-phlorizin hydrolase to the 180-kDa intermediate. *J Biol Chem* 1995;270:25772-8.
57. Mesonero JE, Gloor SM, Semenza G. Processing of human intestinal prolactase to an intermediate form by furin or by furin-like proprotein convertase. *J Biol Chem* 1998;273:29430-6.
58. Zecca L, Mesonero JE, Gloor SM, Semenza G. Species differences in the sites of cleavage of pro-lactase to lactase supports lack of selective pressure. *Biochim Biophys Acta* 1999;1435:51-60.
59. Naim HY. Molecular and cellular aspects and regulation of intestinal lactase-phlorizin hydrolase. *Histol Histopathol*; 2001; 16:553-61.
60. Harvey CB, Wang Y, Hughes LA, Swallow DM, Thurrell WP, Sams VR, et al. Studies on the expression of intestinal lactase in different individuals. *Gut*. 1995 Ene;36(1):28–33
61. Arribas JC, Herrero AG, Martin-Lomas M, Canada FJ, He S, Withers SG. Differential mechanism-based labeling and unequivocal activity assignment of the two active sites of intestinal lactase/phlorizin hydrolase. *Eur J Biochem* 2000;267:6996-7005
62. Semenza G, Auricchio S, Mantei N. Small Intestine disaccharidases. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. eds. *The Metabolic Bases of Inherited Diseases*. 8th Ed. New York, McGraw-Hill; 2001;1623-1650.
63. Lacey SW, Naim HY, Magness RR, Gething M-J, Sambrook JF. Expression of lactase-phlorizin hydrolase in sheep is regulated at the RNA level. *Biochem J.* 1994; 302:929–935
64. Henning SJ. Ontogeny of enzymes in the small intestine. *Annu Rev Physiol.* 1985;47:231-245.
65. Fajardo O, Naim HY, Lacey SW (1994) The polymorphic expression of lactase in adults is regulated at the messenger RNA level. *Gastroenterology* 106:1233-41.
66. Wuthrich M, Grunberg J, Hahn D, Jacob R, Radebach I, Naim HY, Sterchi EE. Proteolytic processing of human lactase-phlorizin hydrolase is a two-step event: identification of the cleavage sites. *Arch Biochem Biophys.* 1996;336:27-34.
67. Naim HY, Lentze MJ. Impact of O-glycosylation on the function of human intestinal lactase-phlorizin hydrolase. Characterization of glycoforms varying in enzyme activity and localization of O-glycoside addition. *J Biol Chem.* 1992;267:25494-504.
68. Naim HY. Processing and transport of human small intestinal lactase-phlorizin hydrolase (LPH). Role of N-linked oligosaccharide modification. *FEBS Lett.* 1994;342:302-7.
69. Jacob R, Weiner JR, Stadge S, Naim HY. Additional N-glycosylation and its impact on the

- folding of intestinal lactase-phlorizin hydrolase. *J Biol Chem*. 2000;275:10630-7.
70. Naim HY, Naim H. Dimerization of lactase-phlorizin hydrolase occurs in the endoplasmic reticulum, involves the putative membrane spanning domain and is required for an efficient transport of the enzyme to the cell surface. *Eur J Cell Biol*. 1996;70:198-208.
 71. Lottaz D, Oberholzer T, Bahler P, Semenza G, Sterchi EE. Maturation of human lactase-phlorizin hydrolase. Proteolytic cleavage of precursor occurs after passage through the Golgi complex. *FEBS Lett*. 1992;313:270-6.
 72. Jacob R, Peters K, Naim HY. The prosequence of human lactase-phlorizin hydrolase modulates the folding of the mature enzyme. *J Biol Chem*. 2002;277:8217-25.
 73. Naim HY, Jacob R, Naim H, Sambrook JF, Gething MJ. The pro region of human intestinal lactase-phlorizin hydrolase. *J Biol Chem*. 1994;269:26933-
 74. Oberholzer T, Mantei N, Semenza G. The pro sequence of lactase-phlorizin hydrolase is required for the enzyme to reach the plasma membrane. An intramolecular chaperone? *FEBS Lett*. 1993;333:127-31.
 75. Von Heijne, Flinta, C., Persson, B., Jornvall, H. Sequence determinants of cytosolic N-terminal protein processing. *Eur J Biochem*. 1986; 154 (1): 193-196.
 76. Kadonaga JT. Regulation of DNA polymerase II transcription by sequence-specific DNA binding factors. *Cell* 2004;116:247-257.
 77. Hernández-Romano J, Martínez-Barnette J, Valverde-Garduño V. Polimorfismos reguladores y su participación en la patogenia de enfermedades complejas en la era posgenómica. *Salud Pública de México*. 2009;(3):455–62
 78. Khorasanizadeh S. The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation. *Cell* 2004;116:259-272
 79. Levine M, Tjian R. Transcription regulation and animal diversity. *Nature* 2003;424:147-151.
 80. Buckland PR. The importance and identification of regulatory polymorphisms and their mechanisms of action. *Biochim Biophys Acta* 2006;1762:17-28.
 81. Pastinen T, Ge B, Hudson TJ. Influence of human genome polymorphism on gene expression. *Hum Mol Genet* 2006; 15 (1):R9–16
 82. Krasinski SD, Van Wering HM, Tannemaat MR, Grand RJ. Differential activation of intestinal gene promoters: functional interactions between GATA-5 and HNF-1 alpha. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2001;281:69.
 83. Van Wering HM, Bosse T, Musters A, de Jong E, de Jong N, Hogen Esch CE, Boudreau F, Swain GP, Dowling LN, Montgomery RK, Grand RJ, Krasinski SD. Complex regulation of the lactase-phlorizin hydrolase promoter by GATA-4. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004;287:899-909.
 84. Mitchelmore C, Troelsen JT, Spodsberg N, Sjöström H, Norén O. Interaction between the homeodomain proteins Cdx2 and HNF1alpha mediates expression of the lactase-phlorizin hydrolase gene. *Biochem*. 2000;346 (2):529-35.
 85. Fang R, Olds LC, Santiago NA, Sibley E. GATA family transcription factors activate lactase gene promoter in intestinal Caco-2 cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2001; 280:58-67.
 86. Verhave M, Krasinski SD, Christian SI, Van Schaik S, Van Den Brink GR, Doting EM, Maas SM, Wolthers KC, Grand RJ, Montgomery RK. Regulatory regions in the rat lactase-phlorizin hydrolase gene that control cell-specific expression. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2004; 39:275-85
 87. Lewinsky RH, Jensen TG, Moller J, Stensballe A, Olsen J, Troelsen JT. T-13910 DNA variant associated with lactase persistence interacts with Oct-1 and stimulates lactase promoter activity in vitro. *Hum Mol Genet*. 2005;14:3945–3953
 88. Olds LC, Sibley E. Lactase persistence DNA variant enhances lactase promoter activity in vitro: functional role as a cis regulatory element. *Hum Mol Genet* 2003;12:2333–2340
 89. Troelsen JT, Olsen J, Moller J, Sjoström H. An upstream polymorphism associated with lactase persistence has increased enhancer activity. *Gastroenterology*. 2003;125:1686–1694.
 90. Rasnpera H, Savilahti E, Enattah NS, Kuokkanen M, Totterman N, Lindahl H, Jarvela I, Kolho KL. A genetic test which can be used to diagnose adult-type hypolactasia in children. *Gut* 2004;53:1571–1576.
 91. Flatz G, Rotthauwe HW. The human lactase polymorphism: physiology and genetics of

- lactose absorption and malabsorption. *Prog Med Genet.* 1977;2:205-49.
92. Flatz, G. The genetic polymorphism of intestinal lactase activity in adult humans. En *The metabolic basis of inherited disease*, editado por C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly y D. Valle (New York: McGraw-Hill). 1989. pp. 2999-3006.
 93. Wang Y, Harvey CB, Hollox EJ, *et al.* The genetically programmed down-regulation of lactase in children. *Gastroenterology* 1998;114:1230-6.
 94. Kruse TA, Bolund L, Grzeschik K-H, Ropers HH, Sjöström H, Noren O, *et al.* The human lactase-phlorizin hydrolase gene is located on chromosome 2. *FEBS Lett* 1988;240:123-6.
 95. Wang Y, Harvey CB, Pratt WS, *et al.* The lactase persistence/non-persistence polymorphism is controlled by a cis-acting element. *Hum Mol Genet* 1995;4:657-62.
 96. Jarvela I, Sabri Enattah N, Kokkonen J, Varilo T, Savilahti E, Peltonen L. Assignment of the locus for congenital lactase deficiency to 2q21, in the vicinity of but separate from the lactase-phlorizin hydrolase gene. *Am J Hum Genet.* 1998;63:1078-85.
 97. Lloyd M, Mevissen G, Fischer M, Olsen W, Goodspeed D, Genini M, Boll W, Semenza G, Mantel N. Regulation of intestinal lactase in adult hypolactasia. *J Clin Invest* 1992; 89: 524-9.
 98. Villako K, Maaros H. Clinical picture of hypolactasia and lactose intolerance. *Scand J Gastroenterol* 1994;29(202):36-54.
 99. Swallow D. DNA test for hypolactasia premature. *Gut.* 2006;55(1):131.
 100. Metz G, Jenkins DJA, Peters JJ, Newman A, Blendis LM. Breath hydrogen as a diagnostic method for hypolactasia. *Lancet* 1976;1:1155-8.
 101. Newcomer AD, McGill DB, Thomas PJ, Hofman AF. Prospective comparison of indirect methods for detecting lactase deficiency. *N Engl J Med* 1975;293:1232-6.
 102. Kurt, Ü., M. W. A. Ghoush, A. Hasümü, M. A. Serdar and T. Kutluay, Comparison of Indirect Methods for Lactose Malabsorption. *Turk J Med Sci.* 2003; 33: 103-110
 103. Sahi T Lactose malabsorption in Finnish-speaking and Swedish-speaking populations in Finland. *Scand J Gastroenterol.* 1974; 9:303-8.
 104. Maya GC. Pruebas de aliento basadas en hidrógeno. *Medicina & laboratorio*, 2009; Vol 15, No. 19-10
 105. Krawczyk Marcin, Wolska Malgorzata, Schwartz Stephanie, Gruenhagen Frank, Terjung Birgit, Portincasa Piero, Sauerbruch Tilman, Lammert Frank. Concordance of Genetic and Breath Tests for Lactose Intolerance in a Tertiary Referral Centre. *J Gastrointestin Liver Dis.* June 2008 Vol.17 No 2, 135-139.
 106. Kerber M, Oberkanins C, Kriegshauser G, Kollerits B, Senbach-Glaninger A, Fuchs D, Ledochowski M (2007) Hydrogen breath testing versus LCT genotyping for the diagnosis of lactose intolerance: a matter of age? *Clin Chim Acta* 383:91-96.
 107. Walker-Smith JA, Murch SH. Mechanisms of malabsorption and secretion. In: *Diseases of the Small Intestine in Childhood*, Isis Medical Media, Oxford 1999;4:63-86.
 108. Budowle, B. 2004. SNP typing strategies. *Forensic. Sci. Int.* 146:S139-S142.
 109. International HapMap Consortium. A haplotype map of the human genome. *Nature* 2005;437:1299-1320.
 110. Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, Kakol JM, Stein LD, Marth G, *et al.* A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature.* 2001;409(6822):928-33.
 111. Brookes AJ. The essence of SNPs. *Gene.* 1999;8;234(2):177-86.
 112. Iniesta R, Guinó E, Moreno V. Análisis estadístico de polimorfismos genéticos en estudios epidemiológicos. *Gac Sanit.* 2005; 19 (4): 333-341.
 113. Lorenzano P. Bas Van Fraassen y la Ley de Hardy-Weinberg. *Principia*. Published by NEL—Epistemology and Logic Research Group, Federal University of Santa Catarina (UFSC). 2008; 12(2): pp. 121-54.
 114. Christensen K. Genética de poblaciones. Disponible en: www.husdyr.kvl.dk/htm/kc/popgen/genetica/genetik.pdf. Citado el 24 de noviembre de 2008.
 115. Kalmes R, Huret JL. Modelo de Hardy-Weinberg. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.* February 2001. Disponible en: <http://AtlasGeneticsOncology.org/Educ/HardySp.html>. Citado 24 de noviembre de 2008.
 116. Pierce BA. Genética. Un enfoque Conceptual 2ª Edición en español. Editorial Médica

- Panamericana; 2006.
117. Virgili RO. Genética médica. Edicions de la Universitat de Barcelona. 2004; 350.
 118. Peña JA, Alfonso-Sánchez MA, García-Obregón S, Pérez-Miranda A. Persistencia de actividad lactasa en población residente en el País Vasco. *Antropo*. 2002;3:51–60.
 119. Tishkoff SA, Reed FA, Ranciaro A, Voight BF, Babbitt CC, Silverman JS, et al. Convergent adaptation of human lactase persistence in Africa and Europe. *Nature genetics*. 2006;39(1):31–40
 120. Hollox EJ, Poulter M, Zvarik M, Ferak V, Krause A, Jenkins T, Saha N, Kozlov AI, Swallow DM (2001) Lactase haplotype diversity in the Old World. *Am J Hum Genet* 68:160-172
 121. Ingram CJE, Elamin MF, Mulcare CA, Weale ME, Tarekegn A, Raga TO *et al*. A novel polymorphism associated with lactose tolerance in Africa: multiple causes for lactase persistence?. *Hum Genet*. 2007;120: 779-88.
 122. Ingram CJE, Mulcare CA, Itan Y, Thomas MG, Swallow DM. Lactose digestion and the evolutionary genetics of lactase persistence. *Human genetics*. 2009;124(6):579–91.
 123. Bodlaj G, Stöcher M, Hufnagl P. Genotyping of the lactasephlorizin hydrolase -13910 polymorphism by LightCycler PCR and implications for the diagnosis of lactose intolerance. *Clin Chem* 2006; 52: 148-151
 124. Hai-ming S, Yuan-dong Q, Feng C, Li-dan X, Jing B, Song-bin F. The lactase gene -13910*T allele can not predict the lactase-persistence phenotype in north China. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*. 2007; 16 (4): 598-601.
 125. Alliende F, others. Intolerancia a la lactosa y otros disacáridos. *Gastr Latinoam*. 2007;18(supl 2):152–6.
 126. Rossi M, Maiuri L, Fusco MI, Salvati V, Fuccio A, Auricchio S, et al. Lactase persistence versus decline in human adults: Multi-factorial events are involved in down-regulation after weaning. *Gastroenterology*. 1997;112:1506-14.
 127. Schirru E, Corona V, Usai-Satta P, Scarpa M, Oppia F, Loriga F *et al*. Genetic testing improves the diagnosis of adult type hypolactasia in the Mediterranean population of Sardinia. *EUR J CLIN NUTR*. 2007; 1038: 1602-38.
 128. Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci. Am*. 1990 Abr;262(4):56–61, 64–5.
 129. Mullis K, Faloona F.: (1987) *Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction*. *Methods Enzymol*. 155: 335-350.
 130. Sánchez IPR, Saldaña HAB. La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. *Ciencia UANL*. 2004;(003):323–35.
 131. Spuny MJF. Introducción a la tecnología del ADN aplicada en el laboratorio forense. Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses. Departamento de Sevilla. 2005;3934–56.
 132. Avid E. G. [33] One-dimensional gel electrophoresis [Internet]. En: *Guide to Protein Purification*. Academic Press; 1990 [citado 2011 Nov 13]. p. 425–41. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/007668799082035>.
 133. Ronagui M., Uhlén M., Nyrén P. 1998. *Real-Time Pyrophosphate Detection for DNA Sequencing*; *Science* vol. 281: 363-364.
 134. Syvanen AC, Sajantila A, Lukka M (1993) Identification of individuals by analysis of biallelic DNA markers, using PCR and solid-phase minisequencing. *Am J Hum Genet* 52:46-59
 135. Palenque de San Basilio: Obra Maestra del Patrimonio Intangible de la Humanidad:[Internet]. [Citado el 26 de Noviembre de 2010]; Disponible en: <http://palenquedesanbasilio.masterimpresores.com/secciones/ubicacion.htm>
 136. Canavate DL. San Basilio de Palenque siglo XXI: Lengua ri palenge y Proyecto Etnoeducativo. *Reflexión Política*. 2010;(24):86–99.
 137. Fals Borda, Orlando (1976), *Capitalismo, Hacienda y Poblamiento en la Costa Atlántica*. Punta de Lanza, Bogotá. p.22-25.
 138. UNESCO (2006), *Obras Maestras del Patrimonio Oral e Inmaterial de la Humanidad*. Proclamaciones 2001, 2003 y 2005. Disponible en: <http://unesdoc.unesco.org/image/0014/001473/147344s.pdf>. Citado el 16 de Octubre de 2010];
 139. Dussán CP, Rodríguez GA. Comunidades étnicas en Colombia: cultura y jurisprudencia. Universidad del Rosario; 2005. 266 p

140. Mathieu C, others. El léxico negro-africano de San Basilio de Palenque. *Thesaurus*. 1984;39(1):80–169.
141. Restrepo E. Hacia los Estudios de las Colombias Negras¹. *Estudios afrocolombianos: aportes para un estado del arte*. 2004;:19
142. Büning C, Genschel J, Jurga J, Fiedler T, Voderholzer W, Fiedler EM. Introducing genetic test for adult-type hypolactasia. *Digestion* 2005;71:245-50.
143. Chao CK, Sibley E. PCR/RFLP genotyping assay for a lactase persistence polymorphism upstream of the lactase-phlorizin hydrolase gene. *Genet Test*. 2004; 8(2): 190-3
144. Coelho, M., D. Luiselli, G. Bertorelle, A Lopes, S Seixas et al., 2005. Microsatellite variation and evolution of human lactase persistence. *Hum. Genet* 117: 329-339.
145. Sambrook, J., and Russell, D. (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
146. Miller, M.P. 1997. Tools for Population Genetic Analysis (TFPGA), 1.3: A Windows Program for the Analysis of Allozyme and Molecular Population Genetic Data. Distribuido por el autor.
147. Kuokkanen M, Kokkonen J, Enattah NS, Ylisaukko-oja T, Komu H, Varilo T, et al. Mutations in the Translated Region of the Lactase Gene (LCT) Underlie Congenital Lactase Deficiency. *Am J Hum Genet*. 2006 Feb;78(2):339–44.
148. Mendoza, E., Hernández, A., Wilches, R., Varellarreal, J., Barrera L., Villanueva, D. Genotype frequencies of C/T-13910 and G/A-22018 polymorphisms in a Colombian Caribbean population do not correspond with lactase persistence prevalence reported in the region. *Colombia Médica*, 2010; Vol.41 No. 3 : 290-294.
149. Mendoza E, Arévalo E, Porto E, Villarreal JL, Varela L, Hernández E, Silvera C, Villanueva D. Distribución del SNP C/T-13910, asociados con Lactasa persistencia en caucásicos, en sendas muestras de las poblaciones indígenas Wiwa y Chimila. En: *Colombia Revista de la Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas ISSN: 0120-4173 Ed: Asociación Colombiana De Ciencias Biológicas v.22 fasc.1 p.140 - 141 ,2010.*
150. Mulcare CA, Weale ME, Jones AL, Connell B, Zeitlyn D, Tarekegn A *et al* . The *T allele of a Single Nucleotide Polymorphism 13,9 kb upstream of the lactase gene (LCT) (C-13,9kb T) does not predict or cause the lactase-persistence phenotype in Africans. *Am. J. Hum. Genet*. 2004; 74: 1102-10.
151. Sahi T. Genetics and epidemiology of adult-type hypolactasia with emphasis on the situation in Europe. *Food & Nutrition Research*. 2001; 45(0):161–2.
152. Del Castillo Mathieu, Nicolás. *Esclavos negros en Cartagena y sus aportes léxicos*. Bogotá, Publicaciones del Instituto Caro y Cuervo, tomo LXII, 1982
153. Ver Mapa # 1: Orígenes étnicos de los africanos llegados a Cartagena de Indias entre 1533 y 1580. *Ibíd*, Del Castillo Mathieu, 1982, pp:8.
154. Bulhoes AC, Goldani H.A.S, Oliveira F.S, Matte U.S, Mazzuca R.B. Correlation between lactose absorption and the C/T -13910 and G/A -22018 mutations of the lactase-phlorizin hydrolase (LCT) gene in adult-type hypolactasia. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* (2007) 40: 1441-6.
155. Enattah NS, Jensen TG, Nielsen M, Lewinski R, Kuokkanen M, Rasinpera H, El-Shanti H, Seo JK, Alifrangis M, Khalil IF, Natah A, Ali A, Natah S, Comas D, Mehdi SQ, Groop L, Vestergaard EM, Imtiaz F, Rashed MS, Meyer B, Troelsen J, Peltonen L. Independent introduction of two lactase-persistence alleles into human populations reXects diVerent history of adaptation to milk culture. 2008: *Am J Hum Genet* 82:57–72.
156. Imtiaz F, Savilahti E, Sarnesto A, Trabzuni D, Al-Kahtani K, Kagevi I, *et al*. T/G-13915 variant upstream of the lactase gene (LCT) is the founder allele of adult-type hypolactasia in an Arab population(s). *J Med Genet*. 2007; 44: e89.
157. Bedoya G, Montoya P, García J, Soto I, Bourgeois S, Carvajal, *et al*. Admixture dynamics in Hispanics: A shift in the nucleargenetic ancestry of a South American population isolate. *PNAS*. 2006; 103: 7234-9.

Anexos



Grupo de Investigación en Bioquímica Patológica (GRUBIOPAT)
Universidad Libre de Barranquilla
Facultad de Ciencias de la Salud



Grupo de Investigación en Genética
Universidad del Norte de Barranquilla
Facultad de Ciencias de la Salud

ANEXO 3

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Proyecto: "IDENTIFICACIÓN DE LAS VARIANTES C/T-13910 Y G/A-22018 ASOCIADAS CON HIPOLACTASIA PRIMARIA TIPO ADULTO (HPTA) EN CAUCASICOS, EN UNA POBLACION AFRODESCENDIENTE DE LA COSTA CARIBE COLOMBIANA"

Este estudio tiene el objetivo de determinar las frecuencias alélicas y genótípicas de los SNPs C/T-13910 y G/A-22018 en la población afrodescendiente de San Basilio de Palenque y establecer si este grupo étnico posee las variaciones genéticas descritas en otras poblaciones.

Los participantes de la investigación serán voluntarios mayores de 18 años de edad, que acepten la toma de una **muestra de sangre total (3 mL)** para establecer las variantes genéticas del estudio. Esta prueba carece de riesgo y no tienen costo alguno para los participantes, los cuales tienen el libre derecho de aceptar participar en el estudio. A cambio, el Grupo de Investigación en Bioquímica Patológica (GRUBIOPAT) se compromete a entregar a cada participante un informe escrito de los resultados obtenidos en las pruebas, las cuales serán realizadas con fines únicamente investigativos.

Se dará respuesta a cualquier pregunta y se aclararán dudas acerca de los procedimientos, beneficios y otros asuntos relacionados con la investigación.

La información obtenida en este estudio será divulgada en forma de datos estadísticos y será publicado en revistas científicas y a través de conferencias a las cuales podrán asistir los sujetos participantes en el estudio.

La información suministrada por cada sujeto participante en el estudio y el resultado de las pruebas serán estrictamente confidenciales y cada sujeto tiene la libertad de retirar su consentimiento en cualquier momento y dejar de participar en el estudio.

Yo _____ acepto participar en este estudio y manifiesto haber entendido sus objetivos, riesgos y beneficios y autorizo la publicación de los resultados de la manera como aparece mencionado en este formato.

Firma _____ Testigo _____
CC: _____ de _____ C.C. _____ de _____

Responsables: Daniel Villanueva, Carlos Silvera, Marena Rodríguez, Evelyn Mendoza y José Luis Villarreal.

DECLARACION DE HELSINKI DE LA ASOCIACION MÉDICA MUNDIAL.

Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos

Adoptada por la
18ª Asamblea Médica Mundial, Helsinki, Finlandia, junio 1964
y enmendada por la
29ª Asamblea Médica Mundial, Tokio, Japón, octubre 1975
35ª Asamblea Médica Mundial, Venecia, Italia, octubre 1983
41ª Asamblea Médica Mundial, Hong Kong, septiembre 1989
48ª Asamblea General Somerset West, Sudáfrica, octubre 1996
52ª Asamblea General, Edimburgo, Escocia, octubre 2000
Nota de Clarificación del Párrafo 29, agregada por la Asamblea General de la AMM,
Washington 2002
Nota de Clarificación del Párrafo 30, agregada por la Asamblea General de la AMM,
Tokio 2004
59ª Asamblea General, Seúl, Corea, octubre 2008

A. INTRODUCCION

1. La Asociación Médica Mundial (AMM) ha promulgado la Declaración de Helsinki como una propuesta de principios éticos para investigación médica en seres humanos, incluida la investigación del material humano y de información identificables.

“LA DECLARACIÓN DEBE SER CONSIDERADA COMO UN TODO Y UN PÁRRAFO NO DEBE SER APLICADO SIN CONSIDERAR TODOS LOS OTROS PÁRRAFOS PERTINENTES”.

2. Aunque la Declaración está destinada principalmente a los médicos, LA AMM INSTA A OTROS PARTICIPANTES EN LA INVESTIGACIÓN MÉDICA EN SERES HUMANOS A ADOPTAR ESTOS PRINCIPIOS.

3. El deber del médico es promover y velar por la salud de los pacientes, incluidos los que participan en investigación médica. Los conocimientos y la conciencia del médico han de subordinarse al cumplimiento de ese deber.

4. La Declaración de Ginebra de la Asociación Médica Mundial vincula al médico con la fórmula "velar solícitamente y ante todo por la salud de mi paciente", y el Código Internacional de Ética Médica afirma que: "El médico debe considerar lo mejor para el paciente cuando preste atención médica".

5. El progreso de la medicina se basa en la investigación que, en último término, debe incluir estudios en seres humanos. Las poblaciones que están subrepresentadas en la investigación médica deben tener un acceso apropiado a la participación en la investigación.

6. En investigación médica en seres humanos, el bienestar de la persona que participa en la investigación debe tener siempre primacía sobre todos los otros intereses.

7. El propósito principal de la investigación médica en seres humanos es comprender las causas, evolución y efectos de las enfermedades y mejorar las intervenciones preventivas, diagnósticas y terapéuticas (métodos, procedimientos y tratamientos). Incluso, las mejores intervenciones actuales deben ser evaluadas continuamente a través de la investigación para que sean seguras, eficaces, efectivas, accesibles y de calidad.

8. En la práctica de la medicina y de la investigación médica, la mayoría de las intervenciones implican algunos riesgos y costos.

9. La investigación médica está sujeta a normas éticas que sirven para promover el respeto a todos los seres humanos y para proteger su salud y sus derechos individuales. Algunas poblaciones sometidas a la investigación son particularmente vulnerables y necesitan protección especial. Estas incluyen a los que no pueden otorgar o rechazar el consentimiento por sí mismos y a los que pueden ser vulnerables a coerción o influencia indebida.

10. Los médicos deben considerar las normas y estándares éticos, legales y jurídicos para la investigación en seres humanos en sus propios países, al igual que las normas y estándares internacionales vigentes. No se debe permitir que un requisito ético, legal o jurídico Nacional o internacional disminuya o elimine cualquiera medida de protección para las personas que participan en la investigación establecida en esta Declaración.

B. PRINCIPIOS PARA TODA INVESTIGACION MÉDICA

11. En la investigación médica, es deber del médico proteger la vida, la salud, la dignidad, la integridad, el derecho a la autodeterminación, la intimidad y la confidencialidad de la información personal de las personas que participan en investigación.

12. La investigación médica en seres humanos debe conformarse con los principios científicos generalmente aceptados y debe apoyarse en un profundo conocimiento de la bibliografía científica, en otras fuentes de información pertinentes, así como en experimentos de laboratorio correctamente realizados y en animales, cuando sea oportuno. Se debe cuidar también del bienestar de los animales utilizados en los experimentos.

13. Al realizar una investigación médica, hay que prestar atención adecuada a los factores que puedan dañar el medio ambiente.

14. El proyecto y el método de todo estudio en seres humanos debe describirse claramente en un protocolo de investigación. Este debe hacer referencia siempre a las consideraciones éticas que fueran del caso y debe indicar cómo se han considerado los principios enunciados en esta Declaración. El protocolo debe incluir información sobre financiamiento, patrocinadores, afiliaciones institucionales, otros posibles conflictos de interés e incentivos para las personas del estudio y estipulaciones para tratar o compensar a las personas que han sufrido daños como consecuencia de su participación en la investigación. El protocolo debe describir los arreglos para el acceso después del ensayo a intervenciones identificadas como beneficiosas en el estudio o el acceso a otra atención o beneficios apropiados.

15. El protocolo de la investigación debe enviarse, para consideración, comentario, consejo y aprobación, a un comité de ética de investigación antes de comenzar el estudio. Este comité debe ser independiente del investigador, del patrocinador o de cualquier otro tipo de influencia indebida.

El comité debe considerar las leyes y reglamentos vigentes en el país donde se realiza la investigación, como también las normas internacionales vigentes, pero no se debe permitir que éstas disminuyan o eliminen ninguna de las protecciones para las personas que participan en la investigación establecidas en esta Declaración. El comité tiene el derecho de controlar los ensayos en curso. El investigador tiene la obligación de proporcionar información del control al comité, en especial sobre todo incidente adverso grave. No se debe hacer ningún cambio en el protocolo sin la consideración y aprobación del comité, formación y calificaciones científicas apropiadas. La investigación en pacientes o voluntarios sanos necesita la supervisión de un médico u

otro profesional de la salud competente y calificado apropiadamente. La responsabilidad de la protección de las personas que toman parte en la investigación debe recaer siempre en un médico u otro profesional de la salud y nunca en los participantes en la investigación, aunque hayan otorgado su consentimiento.

17. La investigación médica en una población o comunidad con desventajas o vulnerable sólo se justifica si la investigación responde a las necesidades y prioridades de salud de esta población o comunidad y si existen posibilidades razonables de que la población o comunidad, sobre la que la investigación se realiza, podrá beneficiarse de sus resultados.

18. Todo proyecto de investigación médica en seres humanos debe ser precedido de una cuidadosa comparación de los riesgos y los costos para las personas y las comunidades que participan en la investigación, en comparación con los beneficios previsibles para ellos y para otras personas o comunidades afectadas por la enfermedad que se investiga.

19. Todo ensayo clínico debe ser inscrito en una base de datos disponible al público antes de aceptar a la primera persona.

20. Los médicos no deben participar en estudios de investigación en seres humanos a menos de que estén seguros de que los riesgos inherentes han sido adecuadamente evaluados y de que es posible hacerles frente de manera satisfactoria. Deben suspender inmediatamente el experimento en marcha si observan que los riesgos que implican son más importantes que los beneficios esperados o si existen pruebas concluyentes de resultados positivos o beneficiosos.

21. La investigación médica en seres humanos sólo debe realizarse cuando la importancia de su objetivo es mayor que el riesgo inherente y los costos para la persona que participa en la investigación.

22. La participación de personas competentes en la investigación médica debe ser voluntaria. Aunque puede ser apropiado consultar a familiares o líderes de la comunidad, ninguna persona competente debe ser incluida en un estudio, a menos que ella acepte libremente.

23. Deben tomarse toda clase de precauciones para resguardar la intimidad de la persona que participa en la investigación y la confidencialidad de su información personal y para reducir al mínimo las consecuencias de la investigación sobre su integridad física, mental y social.

24. En la investigación médica en seres humanos competentes, cada individuo potencial debe recibir informaciones adecuadas acerca de los objetivos, métodos, fuentes de financiamiento, posibles conflictos de intereses, afiliaciones institucionales del investigador, beneficios calculados, riesgos previsibles e incomodidades derivadas del experimento y todo otro aspecto pertinente de la investigación. La persona potencial debe ser informada del derecho de participar o no en la investigación y de retirar su consentimiento en cualquier momento, sin exponerse a represalias. Se debe prestar especial atención a las necesidades específicas de información de cada individuo potencial, como también a los métodos utilizados para entregar la información. Después de asegurarse de que el individuo ha comprendido la información, el médico u otra persona calificada apropiadamente debe pedir entonces, preferiblemente por escrito, el consentimiento informado y voluntario de la persona. Si el consentimiento no se puede otorgar por escrito, el proceso para lograrlo debe ser documentado y atestiguado formalmente.

25. Para la investigación médica en que se utilice material o datos humanos identificables, el médico debe pedir normalmente el consentimiento para la recolección, análisis, almacenamiento y reutilización. Podrá haber situaciones en las que será imposible o impracticable obtener el consentimiento para dicha investigación o podría

ser una amenaza para su validez. En esta situación, la investigación sólo puede ser realizada después de ser considerada y aprobada por un comité de ética de investigación.

26. Al pedir el consentimiento informado para la participación en la investigación, el médico debe poner especial cuidado cuando el individuo potencial está vinculado con él por una relación de dependencia o si consiente bajo presión. En una situación así, el consentimiento informado debe ser pedido por una persona calificada adecuadamente y que nada tenga que ver con aquella relación.

27. Cuando el individuo potencial sea incapaz, el médico debe pedir el consentimiento informado del representante legal. Estas personas no deben ser incluidas en la investigación que no tenga posibilidades de beneficio para ellas, a menos que ésta tenga como objetivo promover la salud de la población representada por el individuo potencial y esta investigación no puede realizarse en personas competentes y la investigación implica sólo un riesgo y costo mínimos.

28. Si un individuo potencial que participa en la investigación considerado incompetente es capaz de dar su asentimiento a participar o no en la investigación, el médico debe pedirlo, además del consentimiento del representante legal. El desacuerdo del individuo potencial debe ser respetado.

29. La investigación en individuos que no son capaces física o mentalmente de otorgar consentimiento, por ejemplo los pacientes inconscientes, se puede realizar sólo si la condición física/mental que impide otorgar el consentimiento informado es una característica necesaria de la población investigada. En estas circunstancias, el médico debe pedir el consentimiento informado al representante legal. Si dicho representante no está disponible y si no se puede retrasar la investigación, el estudio puede llevarse a cabo sin consentimiento informado, siempre que las razones específicas para incluir a individuos con una enfermedad que no les permite otorgar consentimiento informado hayan sido estipuladas en el protocolo de la investigación y el estudio haya sido aprobado por un comité de ética de investigación. El consentimiento para mantenerse en la investigación debe obtenerse a la brevedad posible del individuo o de un representante legal.

30. Los autores, directores y editores todos tienen obligaciones éticas con respecto a la publicación de los resultados de su investigación. Los autores tienen el deber de tener a la disposición del público los resultados de su investigación en seres humanos y son responsables de la integridad y exactitud de sus informes. Deben aceptar las normas éticas de entrega de información. Se deben publicar tanto los resultados negativos e inconclusos como los positivos o de lo contrario deben estar a la disposición del público. En la publicación se debe citar la fuente de financiamiento, afiliaciones institucionales y conflictos de intereses. Los informes sobre investigaciones que no se ciñan a los principios descritos en esta Declaración no deben ser aceptados para su publicación.

C. PRINCIPIOS APLICABLES CUANDO LA INVESTIGACION MEDICA SE COMBINA CON LA ATENCION MEDICA

31. El médico puede combinar la investigación médica con la atención médica, sólo en la medida en que tal investigación acredite un justificado valor potencial preventivo, diagnóstico o terapéutico y si el médico tiene buenas razones para creer que la participación en el estudio no afectará de manera adversa la salud de los pacientes que toman parte en la investigación.

32. Los posibles beneficios, riesgos, costos y eficacia de toda intervención nueva deben ser evaluados mediante su comparación con la mejor intervención probada

existente, excepto en las siguientes circunstancias:

- El uso de un placebo, o ningún tratamiento, es aceptable en estudios para los que no hay una intervención probada existente.
- Cuando por razones metodológicas, científicas y apremiantes, el uso de un placebo es necesario para determinar la eficacia y la seguridad de una intervención que no implique un riesgo, efectos adversos graves o daño irreversible para los pacientes que reciben el placebo o ningún tratamiento.

Se debe tener muchísimo cuidado para evitar abusar de esta opción.

33. Al final de la investigación, todos los pacientes que participan en el estudio tienen derecho a ser informados sobre sus resultados y compartir cualquier beneficio, por ejemplo, acceso a intervenciones identificadas como beneficiosas en el estudio o a otra atención apropiada o beneficios.

34. El médico debe informar cabalmente al paciente los aspectos de la atención que tienen relación con la investigación. La negativa del paciente a participar en una investigación o su decisión de retirarse nunca debe perturbar la relación médico-paciente.

35. Cuando en la atención de un enfermo las intervenciones probadas han resultado ineficaces o no existen, el médico, después de pedir consejo de experto, con el consentimiento informado del paciente o de un representante legal autorizado, puede permitirse usar intervenciones no comprobadas, si, a su juicio, ello da alguna esperanza de salvar la vida, restituir la salud o aliviar el sufrimiento. Siempre que sea posible, tales intervenciones deben ser investigadas a fin de evaluar su seguridad y eficacia. En todos los casos, esa información nueva debe ser registrada y, cuando sea oportuno, puesta a disposición del público.

- ¹ Swallow DM. Genetics of lactase persistence and lactose intolerance. *Annu Rev Genet* 2003;37:197-219.
- ² Montgomery RK, Büler HA, Rings EHHM, Grand RJ. Lactose intolerance and the genetic regulation of intestinal lactase-phlorizin hydrolase. *FASEBJ*. 1991;5:2824-2832.
- ³ Sahi T, Isokoski M, Jussila J, Launiala K, Pyörälä K (1973) Recessive inheritance of adult-type lactose malabsorption. *Lancet* 2:823-6
- ⁴ Sahi, T., Launiala, K., 1977, More evidence for the recessive inheritance of selective adult type lactose malabsorption. *Gastroenterology*, 73, 231-232.
- ⁵ Birge S T, Kentmann H T, Cuatrecasas P & Whedon G D (1967). Osteoporosis, intestinal lactase deficiency and low dietary calcium intake. *New Engl. J. Med.* Feb 23;276(8):445-448.
- ⁶ Newcomer, A. D., Hodgson, S. F., McGill, D. B. & Thomas, P. J. (1978-). Lactase deficiency: prevalence in osteoporosis. *Annals of Internal Medicine* 89, 218-220.
- ⁷ Sahi T (1978) Dietary lactose and the a etiology of human small-intestinal hypolactasia. *Gut* 19:1074-86.
- ⁸ Gudman-Hoyer, E. The clinical significance of disacc maldigestion. *Am J Clin Nutr* 1994;59: 735S-741S.
- ⁹ Vesa, T. H., Marteau, P., Korpela, R., 2000, Lactose intolerance. *Journal of the American College of Nutrition*, 19, 165-175.
- ¹⁰ Dhalqvist, A., 1970 Assay of intestinal disaccharidases. *Enzym. Biol. Clin.* 11: 52 - 56.
- ¹¹ Hogenauer C, Hammer HF, Mellitzer K, Renner W, Krejs GJ, Toplak H. Evaluation of a new DNA test compared with the lactose hydrogen breath test for the diagnosis of lactase non-persistence. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2005 Mar;17(3):371-376.
- ¹² Romagnuolo J, Schiller D, Bailey RJ. Using breath tests wisely in a gastroenterology practice: an evidence-based review of indications and pitfalls in interpretation. *Am J Gastroenterol* 2002 May;97(5):1113-1126.
- ¹³ Shaw AD, Davies GJ. Lactose intolerance: problems in diagnosis and treatment. *J Clin Gastroenterol* 1999; 28:208-16.
- ¹⁴ Vonk RJ, Lin Y, Koetse HA, Huang C, Zeng G, Elzinga H, et al. Lactose (mal) digestion evaluated by the 13C-lactose digestion test. *Eur J Clin Invest* 2000 Feb;30(2):140-146.
- ¹⁵ Arola H, Tamm A. Metabolism of lactose in the human body. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1994;202:21-5.
- ¹⁶ Swagerty DL, Walling AD, Klein RM. Lactose intolerance. *Am Fam Physician* 2002;65:1845-50.
- ¹⁷ Poulter M, Hollox E, Harvey CB, Mulcare C, Peuhkuri K, Kajander K, Sarner M, Korpela R, Swallow DM: The causal element for the lactase persistence/non-persistence polymorphism is located in a 1 Mb region of linkage disequilibrium in Europeans. *Ann Hum Genet* 2003; 67: 298-311
- ¹⁸ Bersaglieri, Todd, Pardis C, Sabeti, Nick Patterson, Trisha Vanderploeg, Steve F. Schaffner, Jared A. Drake, Matthew Rhodes, David E. Reich and Joel N. Hirschhorn. 2004. "Genetic Signatures of Strong Recent Positive Selection at the Lactase Gene" *American Journal of Human Genetics* 74(6): 1,111-1,120
- ¹⁹ Enattah NS, Sahi T, Savilahti E, Terwilliger JD, Peltonen L, Jarvela I. Identification of a variant associated with adult-type hypolactasia. *Nat Genet* 2002 Feb;30(2):233-237.
- ²⁰ Nilsson TK, Johansson CA. A novel method for diagnosis of adult hypolactasia by genotyping of the -13910 C/T polymorphism with Pyrosequencing technology. *Scand J Gastroenterol* 2004;39:287-90.
- ²¹ Buning C, Ockenga J, Kruger S, Jurga J, Baier P, Dignass A, Vogel A, Strassburg C, Weltrich R, Genschel J, Lochs H, Schmidt H: The C/C - 13910 and G/G -22018 genotypes for adult-type hypolactasia are not associated with inflammatory bowel disease. *Scan J Gastroenterol* 2003; 5: 538-542.
- ²² Enattah NS, Sulkava R, Halonen P, Kontula K, Järvelä I. The genetic variant of lactose malabsorption is associated with fractures in very old age. *J Am Geriatr Soc* 2005;53:79-82.
- ²³ Kuokkanen M, Enattah NS, Oksanen A, Savilahti E, Orpana A, et al. Transcriptional regulation of the lactase-phlorizin hydrolase gene by polymorphisms associated with adulttype hypolactasia. *Gut* 2003;52:647-52.
- ²⁴ Järvelä IE. Molecular genetics of adult-type hypolactasia. *Ann Med* 2005;37: 179-85.
- ²⁵ Ángel LA, Calvo E, Muñoz Y. Prevalencia de Hipolactasia tipo adulto e intolerancia a la lactosa en adultos jóvenes. *Rev Col Gastroenterol* 2005; 20(4): 35-47.
- ²⁶ Swallow DM, Hollox EJ. The genetic polymorphism of intestinal lactase activity in adult humans. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds.) *The metabolic and molecular basis of inherited disease*, 8th ed. McGraw-Hill, New York, 2000.
- ²⁷ DANE (2007) "La población étnica y el Censo General 2005"; Colombia: una nación multicultural. Su diversidad étnica, p. 35. . http://www.Dane.Gov.Co/Files/Censo2005/Etnia/Sys/Colombia_Nacion.Pdf
- ²⁸ Devlin, Thomas M (2004). *Bioquímica: Libro de texto con aplicaciones clínicas*. 4ª ed., Barcelona: Editorial Reverté, S.A..
- ²⁹ Campbell MK, Farrell SO. *Bioquímica*. Cengage Learning Editores; 2006. 854 p
- ³⁰ Maraculla, José Ma; Goñi, Felix Ma (1994). *Bioquímica Humana. Curso Básico: Vías Metabólicas Biosintética*, 2ª ed. Barcelona: Editorial Reverté, S.A, p 268.
- ³¹ Brodbeck U, Ebner KE. The subcellular distribution of the A and B proteins of lactose synthetase in bovine and rat mammary tissue. *J Biol Chem*. 1966;241:5526-32.
- ³² Food and Agriculture Organization. Disponible en: <http://www.irc.fao.org/bases/alimento/default.htm>. Consultado 23 de Agosto 2008.
- ³³ Buchowski, M. S., S. Joyce, A. O. Johnson and FACN, 2002 Dietary Calcium Intake in Lactose Maldigesting Intolerant and Tolerant African American Women. *Journal of the American College of Nutrition* 21: 47-54
- ³⁴ Aguilar, Cordero MJA. *Lactancia Materna: Composición de la leche materna*. Elsevier España; 2005. 694 p
- ³⁵ Leer PDF Online: [vaca.agro.uncor.edu](http://www.vaca.agro.uncor.edu) | Biblioteca Virtual LibroSinTinta.com [Internet]. [citado 2011 Oct 12]; Available from: http://www.librosintinta.in/biblioteca/verpdf/vaca.agro.uncor.edu/~pleche/material/agroin_doc2.pdf htx
- ³⁶ Ángel L., Calvo E., Muñoz Y., Messing B. Deficiencia De Lactasa, Intolerancia A La Lactosa Y Pico De Masa Ósea En Adultos Jóvenes Colombianos. *Revista Colombiana De Reumatología*. VOL. 13 No. 4, Diciembre 2006, pp. 271-286
- ³⁷ Tabla de composición de alimentos colombianos. Instituto Colombiano de Bienestar Familiar. 5ª Edición. Bogotá, Colombia, 1988.
- ³⁸ Boll W, Wagner P, Mantei N. Structure of the chromosomal gene and cDNAs coding for lactase phlorizin hydrolase in humans with adult-type hypolactasia or persistence of lactase. *Am J Hum Genet*. 1991;48:889-902.
- ³⁹ Hauri HP, Sterchi EE, Bienz D, Fransen JA, Marxer A. Expression and Intracellular transport of microvillus membrane hydrolases in human intestinal epithelial cells. *J Cell Biol*. 1985;101:838-831.
- ⁴⁰ Robayo-Torres, C; Buford L Nichols. Molecular Differentiation of Congenital Lactase Deficiency from Adult-Type Hypolactasia. *Nutrition Reviews*; Feb 2007; 65, 2; Research Library Core.pg. 95
- ⁴¹ Buller HA, Kothe MJC, Goldman DA, Grubman SA, Sasak WV, Matsudaira PT, Montgomery RK, Grand RJ (1990) Coordinate expression of lactase-phlorizin hydrolase mRNA and enzyme levels in rat intestine during development. *J Biol Chem* 265:6978-6983

- ⁴² Infante D. Intolerancia a la lactosa: en quién y por qué? *Anales de Pediatría. Unidad de Gastroenterología, Hepatología y Soporte Nutricional, Hospital Universitario Materno-Infantil Vall d' Hebron, Barcelona, España* 2008.
- ⁴³ Mackey AD, McMahon RJ, Townsend JH, Gregory JF 3rd. Uptake, hydrolysis, and metabolism of pyridoxine-5'-beta-D-glucoside in Caco-2-cells. *J Nutr.* 2004;134:842-846.
- ⁴⁴ Nemeth K, Plumb GW, Berrin JG, Juge N, Jacob R, et al. Deglycosylation by small intestinal epithelial cell beta glucosidases is a critical step in the absorption and the metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans. *Eur J Nutr* 2003;42:29-42.
- ⁴⁵ Troelsen JT. Adult-type hypolactasia and regulation of lactase expression. *Biochim Biophys. Acta* 2005;1723:19-32.
- ⁴⁶ Zecca L, Mesonero JE, Stutz A, Poiree JC, Giudicelli J, et al. Intestinal lactase-phlorizin hydrolase (LPH): the two catalytic sites; the role of the pancreas in pro-LPH maturation. *FEBS Lett* 1998;435:225-8.
- ⁴⁷ Leese HJ, Semenza G (1973) On the identity between the small intestinal enzymes phlorizin hydrolase and glycosylceramidase. *J Biol Chem* 248:8170-3.
- ⁴⁸ Wacker H, Keller P, Falchetto R, Legler G, Semenza G (1992) Location of the two catalytic sites in intestinal lactase-phlorizin hydrolase. Comparison with sucrase-isomaltase and with other glycosidases, the membrane anchor of lactase-phlorizin hydrolase. *J Biol Chem* 267:18744-52
- ⁴⁹ Dallas M. Swallow. Genetics Of Lactase Persistence And Lactose Intolerance. *Annu. Rev. Genet.* 2003. 37:197-219
- ⁵⁰ Vega - Franco L. Deficiencia de Lactasa en niños y sus implicaciones epidemiológicas. *Rev. Invest. Clín* 1996; 48:33-3.
- ⁵¹ Harvey CB, Fox MF, Jeggo PA, Mantei N, Povey S, et al. Regional localization of the lactase-phlorizin hydrolase gene, LCT, to chromosome 2q21. *Ann Hum Genet* 1993;57:179-85.
- ⁵² Harvey CB, Wang Y, Hughes LA, Swallow DM, Thurrell WP, Sams VR, et al. Studies on the expression of intestinal lactase in different individuals. *Gut.* 1995 Ene;36(1):28-33.
- ⁵³ Mantei N, Villa M, Enzler T, et al. Complete primary structure of human and rabbit lactase-phlorizin hydrolase: implication for biosynthesis membrane, anchoring and evolution of the enzyme. *Embo. J.* 1988;7:2705-2713.
- ⁵⁴ Sebastio G, Villa M, Sartorio R, Guzzeta V, Poggi V, et al. Control of lactase in human adult-type hypolactasia and in weaning rabbits and rats. *Am J Hum Genet* 1989;45:489-97.
- ⁵⁵ Rasinperä H, Saarinen K, Pelkonen A, Järvelä A, et al. Molecularly defined adult-type hypolactasia in school-aged children with a previous history of cow's milk allergy *Gut* 2005;54:391-5.
- ⁵⁶ Keller P, Zecca L, Boukamel R, Zwicker E, Gloor S, et al. Furin, PC1/3, and/or PC6A process-phlorizin hydrolase to the 180-kDa intermediate. *J Biol Chem* 1995;270:25772-8.
- ⁵⁷ Mesonero JE, Gloor SM, Semenza G. Processing of human intestinal prolactase to an intermediate form by furin or by furin-like proprotein convertase. *J Biol Chem* 1998;273:29430-6.
- ⁵⁸ Zecca L, Mesonero JE, Gloor SM, Semenza G. Species differences in the sites of cleavage of pro-lactase to lactase supports lack of selective pressure. *Biochim Biophys Acta* 1999;1435:51-60.
- ⁵⁹ Naim HY. Molecular and cellular aspects and regulation of intestinal lactase-phlorizin hydrolase. *Histol Histopathol.* 2001; 16:553-61.
- ⁶⁰ Harvey CB, Wang Y, Hughes LA, Swallow DM, Thurrell WP, Sams VR, et al. Studies on the expression of intestinal lactase in different individuals. *Gut.* 1995 Ene;36(1):28-33.
- ⁶¹ Arribas JC, Herrero AG, Martín-Lomas M, Canada FJ, He S, Withers SG (2000) Differential mechanism-based labeling and unequivocal activity assignment of the two active sites of intestinal lactase-phlorizin hydrolase. *Eur J Biochem* 267:6996-7005
- ⁶² Semeza G, Auricchio S, Mantei N. Small Intestine disaccharidases. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. eds. *The Metabolic Bases of Inherited Diseases.* 8th Ed. New York, McGraw- Hill ; 2001:1623-1650.
- ⁶³ Lacey SW, Naim HY, Magness RR, Gething M-J, Sambrook JF (1994) Expression of lactase-phlorizin hydrolase in sheep is regulated at the RNA level. *Biochem J* 302:929-935
- ⁶⁴ Henning SJ. Ontogeny of enzymes in the small intestine. *Annu Rev Physiol.* 1985;47:231-245.
- ⁶⁵ Fajardo O, Naim HY, Lacey SW (1994) The polymorphic expression of lactase in adults is regulated at the messenger RNA level. *Gastroenterology* 106:1233-41.
- ⁶⁶ Wuthrich M, Grunberg J, Hahn D, Jacob R, Radebach I, Naim HY, Sterchi EE. Proteolytic processing of human lactase-phlorizin hydrolase is a two-step event: identification of the cleavage sites. *Arch Biochem Biophys.* 1996;336:27-34.
- ⁶⁷ Naim HY, Lentze MJ. Impact of O-glycosylation on the function of human intestinal lactase-phlorizin hydrolase. Characterization of glycoforms varying in enzyme activity and localization of O-glycoside addition. *J Biol Chem.* 1992;267:25494-504.
- ⁶⁸ Naim HY. Processing and transport of human small intestinal lactase-phlorizin hydrolase (LPH). Role of N-linked oligosaccharide modification. *FEBS Lett.* 1994;342:302-7.
- ⁶⁹ Jacob R, Weiner JR, Stadje S, Naim HY. Additional N-glycosylation and its impact on the folding of intestinal lactase-phlorizin hydrolase. *J Biol Chem.* 2000;275:10630-7.
- ⁷⁰ Naim HY, Naim H. Dimerization of lactase-phlorizin hydrolase occurs in the endoplasmic reticulum, involves the putative membrane spanning domain and is required for an efficient transport of the enzyme to the cell surface. *Eur J Cell Biol.* 1996;70:198-208.
- ⁷¹ Lottaz D, Oberholzer T, Bahler P, Semenza G, Sterchi EE. Maturation of human lactase-phlorizin hydrolase. Proteolytic cleavage of precursor occurs after passage through the Golgi complex. *FEBS Lett.* 1992;313:270-6.
- ⁷² Jacob R, Peters K, Naim HY. The prosequence of human lactase-phlorizin hydrolase modulates the folding of the mature enzyme. *J Biol Chem.* 2002;277:8217-25.
- ⁷³ Naim HY, Jacob R, Naim H, Sambrook JF, Gething MJ. The pro region of human intestinal lactase-phlorizin hydrolase. *J Biol Chem.* 1994;269:26933-
- ⁷⁴ Oberholzer T, Mantei N, Semenza G. The pro sequence of lactase-phlorizin hydrolase is required for the enzyme to reach the plasma membrane. An intramolecular chaperone? *FEBS Lett.* 1993;333:127-31.
- ⁷⁵ Von Heijne, Flinta, C., Persson, B., Jornvall, H. (1986) Sequence determinants of cytosolic N-terminal protein processing. *Eur J Biochem* 154 (1) : 193-196.
- ⁷⁶ Kadonaga JT. Regulation of DNA polymerase II transcription by sequence-specific DNA binding factors. *Cell* 2004;116:247-257.
- ⁷⁷ Hernández-Romano J, Martínez-Barnette J, Valverde-Garduño V. Polimorfismos reguladores y su participación en la patogenia de enfermedades complejas en la era posgenómica. *Salud Pública de México.* 2009;(3):455-62
- ⁷⁸ Khorasanizadeh S. The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation. *Cell* 2004;116:259-272
- ⁷⁹ Levine M, Tjian R. Transcription regulation and animal diversity. *Nature* 2003;424:147-151.

- ⁸⁰ Buckland PR. The importance and identification of regulatory polymorphisms and their mechanisms of action. *Biochim Biophys Acta* 2006;1762:17-28.
- ⁸¹ Pastinen T, Ge B, Hudson TJ. Influence of human genome polymorphism on gene expression. *Hum Mol Genet* 2006; Abr 15 Spec No 1:R9-16.
- ⁸² Krasinski SD, Van Wering HM, Tannemaat MR, Grand RJ (2001) Differential activation of intestinal gene promoters: functional interactions between GATA-5 and HNF-1 alpha. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 281:G69-
- ⁸³ Van Wering HM, Bosse T, Musters A, de Jong E, de Jong N, Hogen Esch CE, Boudreau F, Swain GP, Dowling LN, Montgomery RK, Grand RJ, Krasinski SD (2004) Complex regulation of the lactase-phlorizin hydrolase promoter by GATA-4. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 287:G899-909
- ⁸⁴ Mitchelmore-2000 Mitchelmore C, Troelsen JT, Spodsberg N, Sjöström H, Norén O (2000) Interaction between the homeodomain proteins Cdx2 and HNF1alpha mediates expression of the lactasephlorizin hydrolase gene. *Biochem J* 346 Pt 2:529-35.
- ⁸⁵ Fang R, Olds LC, Santiago NA, Sibley E (2001) GATA family transcription factors activate lactase gene promoter in intestinal Caco-2 cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280:G58-67.
- ⁸⁶ Verhave M, Krasinski SD, Christian SI, Van Schaik S, Van Den Brink GR, Doting EM, Maas SM, Wolthers KC, Grand RJ, Montgomery RK (2004) Regulatory regions in the rat lactasephlorizin hydrolase gene that control cell-specific expression. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 39:275-85
- ⁸⁷ Lewinsky RH, Jensen TG, Moller J, Stensballe A, Olsen J, Troelsen JT (2005) T-13910 DNA variant associated with lactase persistence interacts with Oct-1 and stimulates lactase promoter activity in vitro. *Hum Mol Genet* 14:3945-3953
- ⁸⁸ Olds LC, Sibley E (2003) Lactase persistence DNA variant enhances lactase promoter activity in vitro: functional role as a *cis* regulatory element. *Hum Mol Genet* 12:2333-2340
- ⁸⁹ Troelsen JT, Olsen J, Moller J, Sjoström H (2003) An upstream polymorphism associated with lactase persistence has increased enhancer activity. *Gastroenterology* 125:1686-1694
- ⁹⁰ Rasinpera H, Savilahti E, Enattah NS, Kuokkanen M, Totterman N, Lindahl H, Jarvela I, Kolho KL (2004) A genetic test which can be used to diagnose adult-type hypolactasia in children. *Gut* 53:1571-1576
- ⁹¹ Flatz G, Rothhauwe HW. The human lactase polymorphism: physiology and genetics of lactose absorption and malabsorption. *Prog Med Genet.* 1977;2:205-49.
- ⁹² Flatz, G. The genetic polymorphism of intestinal lactase activity in adult humans. En *The metabolic basis of inherited disease*, editado por C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly y D. Valle (New York: McGraw-Hill). 1989. pp. 2999-3006.
- ⁹³ Wang Y, Harvey CB, Hollox EJ, et al. The genetically programmed down-regulation of lactase in children. *Gastroenterology* 1998;114:1230-6.
- ⁹⁴ Kruse TA, Bolund L, Grzeschik K-H, Ropers HH, Sjöström H, Noren O, et al. The human lactase-phlorizin hydrolase gene is located on chromosome 2. *FEBS Lett* 1988;240:123-6.
- ⁹⁵ Wang Y, Harvey CB, Pratt WS, et al. The lactase persistence/non-persistence polymorphism is controlled by a cis-acting element. *Hum Mol Genet* 1995;4:657-62.
- ⁹⁶ Jarvela I, Sabri Enattah N, Kokkonen J, Varilo T, Savilahti E, Peltonen L. Assignment of the locus for congenital lactase deficiency to 2q21, in the vicinity of but separate from the lactase-phlorizin hydrolase gene. *Am J Hum Genet.* 1998;63:1078-85.
- ⁹⁷ Lloyd M, Mevissen G, Fischer M, Olsen W, Goodspeed D, Genini M, Boll W, Semenza G, Mantel N. Regulation of intestinal lactase in adult hypolactasia. *J Clin Invest* 1992; 89: 524-9.
- ⁹⁸ Villako K, Maaros H. Clinical picture of hypolactasia and lactose intolerance. *Scand J Gastroenterol* 1994;29(Suppl 202):36-54.
- ⁹⁹ Swallow D. DNA test for hypolactasia premature. *Gut.* 2006;55(1):131.
- ¹⁰⁰ Metz G, Jenkins DJA, Peters JJ, Newman A, Blendis LM. Breath hydrogen as a diagnostic method for hypolactasia. *Lancet* 1976;1:1155-8.
- ¹⁰¹ Newcomer AD, McGill DB, Thomas PJ, Hofman AF. Prospective comparison of indirect methods for detecting lactase deficiency. *N Engl J Med* 1975;293:1232-6.
- ¹⁰² KURT, Ü., M. W. A. GHOSH, A. HASÜMÜ, M. A. SERDAR and T. KUTLUAY, 2003 Comparison of Indirect Methods for Lactose Malabsorption. *Turk J Med Sci* 33: 103-110
- ¹⁰³ Sahi T (1974). Lactose malabsorption in Finnish-speaking and Swedish-speaking populations in Finland. *Scand J Gastroenterol* 9:303-8.
- ¹⁰⁴ Maya GC. Pruebas de aliento basadas en hidrógeno. *Medicina & laboratorio*, 2009; Vol 15, No. 19-10
- ¹⁰⁵ Krawczyk Marcin, Wolska Malgorzata, Schwartz Stephanie, Gruenhagen Frank, Terjung Birgit, Portincasa Piero, Sauerbruch Tilman, Lammert Frank. Concordance of Genetic and Breath Tests for Lactose Intolerance in a Tertiary Referral Centre. *J Gastrointest Liver Dis.* June 2008 Vol.17 No 2, 135-139
- ¹⁰⁶ Kerber M, Oberkanins C, Kriegshauser G, Kollerits B, Senbach-Glaninger A, Fuchs D, Ledochowski M (2007) Hydrogen breath testing versus LCT genotyping for the diagnosis of lactose intolerance: a matter of age? *Clin Chim Acta* 383:91-96.
- ¹⁰⁷ Walker-Smith JA, Murch SH. Mechanisms of malabsorption and secretion. In: *Diseases of the Small Intestine in Childhood*, 4th Edn. Isis Medical Media, Oxford 1999: 63-86.
- ¹⁰⁸ Budowle, B. 2004. SNP typing strategies. *Forensic. Sci. Int.* 146:S139-S142.
- ¹⁰⁹ International HapMap Consortium. A haplotype map of the human genome. *Nature* 2005;437:1299-1320
- ¹¹⁰ Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, Kakol JM, Stein LD, Marth G, et al. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature.* 2001 Feb 15;409(6822):928-33.
- ¹¹¹ Brookes AJ. The essence of SNPs. *Gene.* 1999 Jul 8;234(2):177-86.
- ¹¹² Iniesta R, Guinó E, Moreno V. Análisis estadístico de polimorfismos genéticos en estudios epidemiológicos. *Gac Sanit.* 2005; 19 (4): 333-341.
- ¹¹³ Lorenzano P. Bas Van Fraassen y la Ley de Hardy-Weinberg. *Principia*, 12(2) (2008), pp. 121-54. Published by NEL—Epistemology and Logic Research Group, Federal University of Santa Catarina (UFSC), Brazil.
- ¹¹⁴ Christensen K. Genética de poblaciones. Disponible en: www.husdyr.kvl.dk/html/kc/popgen/genetica/genetik.pdf. Citado el 24 de noviembre de 2008.
- ¹¹⁵ Kalmes R, Huret JL. Modelo de Hardy-Weinberg. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.* February 2001. URL : <http://AtlasGeneticsOncology.org/Educ/HardySp.html>
- ¹¹⁶ Pierce BA (2006). Genética. Un enfoque Conceptual 2ª Edición en español. Editorial Médica Panamericana.
- ¹¹⁷ Virgili RO. Genética médica. Edicions de la Universitat de Barcelona; 2004. 350 p.
- ¹¹⁸ Peña JA, Alfonso-Sánchez MA, García-Obregón S, Pérez-Miranda A. Persistencia de actividad lactasa en población residente en el País Vasco. *Antropo.* 2002;3:51-60.
- ¹¹⁹ Tishkoff SA, Reed FA, Ranciaro A, Voight BF, Babbitt CC, Silverman JS, et al. Convergent adaptation of human lactase persistence in Africa and Europe. *Nature genetics.* 2006;39(1):31-40

- ¹²⁰ Hollox EJ, Poulter M, Zvarik M, Ferak V, Krause A, Jenkins T, Saha N, Kozlov AI, Swallow DM (2001) Lactase haplotype diversity in the Old World. *Am J Hum Genet* 68:160-172
- ¹²¹ Ingram CJE, Elamin MF, Mulcare CA, Weale ME, Tarekegn A, Raga TO *et al.* A novel polymorphism associated with lactose tolerance in Africa: multiple causes for lactase persistence?. *Hum Genet.* 2007 Feb;120 (6): 779-88. Epub 2006 Nov 21.
- ¹²² Ingram CJE, Mulcare CA, Itan Y, Thomas MG, Swallow DM. Lactose digestion and the evolutionary genetics of lactase persistence. *Human genetics.* 2009;124(6):579-91
- ¹²³ Bodlaj G, Stöcher M, Hufnagl P. Genotyping of the lactase-phlorizin hydrolase -13910 polymorphism by LightCycler PCR and implications for the diagnosis of lactose intolerance. *Clin Chem* 2006; 52: 148-151
- ¹²⁴ Hai-ming S, Yuan-dong Q, Feng C, Li-dan X, Jing B, Song-bin F. The lactase gene -13910*T allele can not predict the lactase-persistence phenotype in north China. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition.* 2007; 16 (4): 598-601.
- ¹²⁵ Allende F, others. Intolerancia a la lactosa y otros disacáridos. *Gastr Latinoam.* 2007;18(supl 2):152-6.
- ¹²⁶ Rossi M, Maiuri L, Fusco MI, Salvati V, Fuccio A, Auricchio S, *et al.* Lactase persistence versus decline in human adults: Multi-factorial events are involved in down-regulation after weaning. *Gastroenterology.* 1997;112:1506-14.
- ¹²⁷ Schirru E, Corona V, Usai-Satta P, Scarpa M, Oppia F, Loriga F *et al.* Genetic testing improves the diagnosis of adult type hypolactasia in the Mediterranean population of Sardinia. *EUR J CLIN NUTR.* 2007; 1038: 1602-38.
- ¹²⁸ Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci. Am.* 1990 Abr;262(4):56-61, 64-5
- ¹²⁹ Mullis K, Faloona F.: (1987) *Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction.* *Methods Enzymol.* 155: 335-350.
- ¹³⁰ Sánchez IPR, Saldaña HAB. La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. *Ciencia UANL.* 2004;(003):323-35
- ¹³¹ Spuny MJF. Introducción a la tecnología del ADN aplicada en el laboratorio forense. Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses. Departamento de Sevilla. 2005.;3934-56
- ¹³² avid E. G. [33] One-dimensional gel electrophoresis [Internet]. En: *Guide to Protein Purification.* Academic Press; 1990 [citado 2011 Nov 13]. p. 425-41. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/007668799082035>
- ¹³³ Ronagui M., Uhlén M., Nyren P. 1998. *Real-Time Pyrophosphate Detection for DNA Sequencing.* *Science* vol. 281: 363-364.
- ¹³⁴ Syvanen AC, Sajantila A, Lukka M (1993) Identification of individuals by analysis of biallelic DNA markers, using PCR and solid-phase minisequencing. *Am J Hum Genet* 52:46-59.
- ¹³⁵ Palenque de San Basilio: Obra Maestra del Patrimonio Intangible de la Humanidad:[Internet].[Citado el 26 de Noviembre de 2010]; Disponible en: <http://palenquedesanbasilio.masterimpresores.com/secciones/ubicacion.htm>
- ¹³⁶ Canavate DL. San Basilio de Palenque siglo XXI: Lengua ri palenque y Proyecto Etnoeducativo. *Reflexión Política.* 2010;(24):86-99
- ¹³⁷ Fals Borda, Orlando (1976), *Capitalismo, Hacienda y Poblamiento en la Costa Atlántica.* Punta de Lanza, Bogotá. p.22-25.
- ¹³⁸ UNESCO (2006), *Obras Maestras del Patrimonio Oral e Inmaterial de la Humanidad. Proclamaciones 2001, 2003 y 2005.* Disponible en: <http://unesdoc.unesco.org/image/0014/001473/147344s.pdf>. [Citado el 16 de Octubre de 2010];
- ¹³⁹ Dussán CP, Rodríguez GA. Comunidades étnicas en Colombia: cultura y jurisprudencia. Universidad del Rosario; 2005. 266 p.
- ¹⁴⁰ Mathieu C, others. El léxico negro-africano de San Basilio de Palenque. *Thesaurus.* 1984;39(1):80-169.
- ¹⁴¹ Restrepo E. Hacia los Estudios de las Colombias Negras1. *Estudios afrocolombianos: aportes para un estado del arte.* 2004.;:19
- ¹⁴² Büning C, Genschel J, Jurga J, Fiedler T, Voderholzer W, Fiedler EM. Introducing genetic test for adult-type hypolactasia. *Digestion* 2005;71:245-50.
- ¹⁴³ Chao CK, Sibley E. PCR/RFLP genotyping assay for a lactase persistence polymorphism upstream of the lactase-phlorizin hydrolase gene. *Genet Test.* 2004; 8(2): 190-3
- ¹⁴⁴ Coelho, M., D. Luiselli, G. Bertorelle, A Lopes, S Seixas *et al.*, 2005. Microsatellite variation and evolution of human lactase persistence. *Hum.Genet* 117: 329-339.
- ¹⁴⁵ Sambrook, J., and Russell, D. (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual.* Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- ¹⁴⁶ Miller, M.P. 1997. Tools for Population Genetic Analysis (TFPGA), 1.3: A Windows Program for the Analysis of Allozyme and Molecular Population Genetic Data. Distribuido por el autor.
- ¹⁴⁷ Kuokkanen M, Kokkonen J, Enattah NS, Ylisaukko-oja T, Komu H, Varilo T, *et al.* Mutations in the Translated Region of the Lactase Gene (LCT) Underlie Congenital Lactase Deficiency. *Am J Hum Genet.* 2006 Feb;78(2):339-44.
- ¹⁴⁸ Mendoza E., Hernández A., Wilches R., Varellarreal, J., Barrera L., Villanueva, D. Genotype frequencies of C/T-13910 and G/A-22018 polymorphisms in a Colombian Caribbean population do not correspond with lactase persistence prevalence reported in the region. *Colombia Médica,* 2010; Vol.41 No. 3 : 290-294.
- ¹⁴⁹ Mendoza E, Arévalo E, Porto E, Villarreal JL, Varela L, Hernández E, Silvera C, Villanueva D. Distribución del SNP C/T-13910, asociados con Lactasa persistencia en caucásicos, en sendas muestras de las poblaciones indígenas Wiwa y Chimila. En: *Colombia Revista De La Asociación Colombiana De Ciencias Biológicas /ISSN: 0120-4173 ed: Asociacion Colombiana De Ciencias Biológicas v.22 fasc.1 p.140 - 141 ,2010.*
- ¹⁵⁰ Mulcare CA, Weale ME, Jones AL, Connell B, Zeitlyn D, Tarekegn A *et al.* The *T allele of a Single Nucleotide Polymorphism 13,9 kb upstream of the lactase gene (LCT) (C-13,9kb T) does not predict or cause the lactase-persistence phenotype in Africans. *Am. J. Hum. Genet.* 2004; 74: 1102-10.
- ¹⁵¹ Sahi T. Genetics and epidemiology of adult-type hypolactasia with emphasis on the situation in Europe. *Food & Nutrition Research.* 2001; 45(0):161-2.
- ¹⁵² Del Castillo Matthews, Nicolas. Esclavos negros en Cartagena y su aportes léxicos. Bogotá publicaciones del Instituto caro y cuervo. Tomo LXII, 1982.
- ¹⁵³ Ver Mapa # 1: Orígenes étnicos de los africanos llegados a Cartagena de Indias entre 1533 y 1580. *Ibid,* Del Castillo Mathieu, 1982, pp:8.
- ¹⁵⁴ Bulhoes AC, Goldani H.A.S, Oliveira F.S, Matte U.S, Mazzuca R.B. Correlation between lactose absorption and the C/T -13910 and G/A -22018 mutations of the lactase-phlorizin hydrolase (LCT) gene in adult-type hypolactasia. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* (2007) 40: 1441-6.
- ¹⁵⁵ Enattah NS, Jensen TG, Nielsen M, Lewinski R, Kuokkanen M, Rasinpera H, El-Shanti H, Seo JK, Alifrangis M, Khalil IF, Natah A, Ali A, Natah S, Comas D, Mehdi SQ, Groop L, Vestergaard EM, Imtiaz F, Rashed MS, Meyer B, Troelsen J, Peltonen L. Independent introduction of two lactase-persistence alleles into human populations reXpects diVerent history of adaptation to milk culture. 2008: *Am J Hum Genet* 82:57-72
- ¹⁵⁶ Imtiaz F, Savilahti E, Sarnesto A, Trabzuni D, Al-Kahtani K, Kagevi I, *et al.* T/G-13915 variant upstream of the lactase gene (LCT) is the founder allele of adult-type hypolactasia in an Arab population(s). *J Med Genet.* 2007; 44: e89.
- ¹⁵⁷ Bedoya G, Montoya P, García J, Soto I, Bourgeois S, Carvajal, *et al.* Admixture dynamics in Hispanics: A shift in the nucleargenetic ancestry of a South American population isolate. *PNAS.* 2006; 103: 7234-9.