

**Correlación entre la prueba de Hidrógeno en el aliento y los
SNPs C/T-13910 y G/A-22018 en una muestra de Caribeños
Colombianos.**

EVELYN MENDOZA TORRES

MICROBIÓLOGA

Director de Trabajo de Grado:

Carlos Arturo Silvera Redondo, Ph. D.

UNIVERSIDAD DEL NORTE

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS



BARRANQUILLA, COLOMBIA, 2010

**Correlación entre la prueba de Hidrógeno en el aliento y los
SNPs C/T-13910 y G/A-22018 en una muestra de Caribeños
Colombianos.**

Trabajo de grado, presentado como requisito para optar al título de:

Magister en Ciencias Básicas Biomédicas.

Director de Trabajo de Grado:

Carlos Arturo Silvera Redondo, Ph. D.

UNIVERSIDAD DEL NORTE

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS



BARRANQUILLA, COLOMBIA, 2010

Nota de aprobación

El trabajo de grado titulado: “Correlación entre la prueba de Hidrógeno en el aliento y los SNPs C/T-13910 y G/A-22018 en una muestra de Caribeños Colombianos”, presentado por la estudiante EVELYN MENDOZA TORRES como requisito parcial para optar al título Magister en Ciencias Básicas Biomédicas, fue evaluado y calificado por los evaluadores como:

Presidente del Jurado

Jurado

Jurado

Barranquilla, ____, ____ de 2010.

DEDICATORIA

A Dios que siempre ha iluminado mi camino

A mi familia, mi apoyo.

A Betsy, mi inocente y fiel compañera

A la pequeña ilusión que desapareció pero que no olvido

Al hijo que espero con amor

A Mauricio, mi compañero y ángel guardián

AGRADECIMIENTOS

El autor expresa su agradecimiento:

A **Carlos Silvera Redondo, Ph D.** Director del Trabajo de Grado. Director del Grupo de Investigación en Genética y Medicina Molecular. Universidad del Norte, Barranquilla, por su guía y acompañamiento.

A **Daniel Villanueva, Ph. D.** Director de Grupo De Investigación en Bioquímica Patológica (GRUBIOPAT), Docente Universidad Libre Seccional Barranquilla, por su constante consejo y apoyo incondicional. Por ser mí guía y ejemplo a seguir

A **Ruben Jaramillo, Ph. D.** Director de GIBIOM y coordinador del Laboratorio de Investigación de la Universidad Libre Seccional Barranquilla. Por brindarme un espacio para hacer investigación.

A **Lourdes Varela.** Docente del Programa de Medicina de la Universidad Libre Seccional Barranquilla. Por sus consejos y valiosos aportes.

A todas aquellas personas que de una u otra forma colaboraron con la realización del presente trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

	Páginas
RESUMEN	10
ABSTRACT	12
1. INTRODUCCIÓN	14
2. MARCO TEÓRICO	17
2.1. Generalidades de Lactasa	17
2.2. Deficiencia de Lactasa	18
2.3. Intolerancia a la lactosa	19
2.4. Hipolactasia y Persistencia de Lactasa	21
2.5. Regulación de la expresión de Lactasa	23
2.6. SNPs C/T-13910 y G/A-22018 en Europa	24
2.7. SNP C/T-13910 en poblaciones africanas	29
2.8. Métodos para el diagnóstico de Hipolactasia	30
2.8.1. Prueba de tolerancia a la lactosa	31
2.8.2. Prueba de Hidrógeno en el aliento	31
2.8.3. Determinación de lactasa <i>in vivo</i> mediante análogos de lactosa	32
2.8.4. Genotipificación de SNPs asociados con persistencia de lactasa	32
2.9. Población Caribeña Colombiana	32
2.9.1. Mestizaje en la región Caribe Colombiana	33.

OBJETIVOS	35
3.1. Objetivo general	35
3.2. Objetivos específico	35
4. METODOLOGÍA	36
4.1. Reactivos y equipos	36
4.2. Diseño metodológico	36
4.3. Muestras	37
4.4. Prueba de Hidrógeno en el aliento (PHA)	37
4.5. Genotipificación de los polimorfismos tipo SNP C/T-13910 y G/A-22018	39
4.5.1. PCR/RFLP para el SNP C/T-13910	40
4.5.2. PCR/RFLP para el SNP G/A-22018	41
4.5.3. Electroforesis	42
4.5.4. Análisis estadístico	44
5. RESULTADOS	46
5.1. Capacidad de digerir lactosa evaluada por la PHA	46
5.2. Genotipificación de los polimorfismos tipo SNP C/T-13910 y G/A-22018	47
5.3. Comparación entre la genotipificación de los SNPs y la digestión de Lactosa	52
5.3.1. Comparación entre el SNP C/T-13910 y la PHA	52
5.3.2. Comparación entre el SNP G/A-22018 y la PHA	54
6. DISCUSION	55

7. CONCLUSIONES	59
8. BIBLIOGRAFÍA	60

ÍNDICE DE TABLAS, FIGURAS Y FOTOGRAFÍAS

	Página
Tabla 1. Valoración del índice Kappa	45
Tabla 2. Frecuencias genotípicas para los SNPs C/T-13910 y G/A-22018	47
Tabla 3. Frecuencias alélicas para los SNPs C/T-13910 y G/A-22018	48
Tabla 4. Distribución de las frecuencias genotípicas observadas y esperadas para los SNPs C/T-13910 y G/A-22018	49
Tabla 5. Genotipificación del SNP C/T-13910 vs PHA	52
Figura 1. SNPs asociados con persistencia de lactasa en estudios hechos por Enattah <i>et al</i>	26
Figura 2. Ruta metodológica de la prueba genética e interpretación de los resultados	41
Figura 3. Patrón de bandas observado luego de electroforesis	43
Figura 4. Prueba de Hidrógeno en el aliento	46
Fotografía 1. Toma de muestra de aliento con accesorios Quintron®	38
Fotografía 2. Aspiración de la muestra en la bolsa colectora	38
Fotografía 3. Inyección de la muestra en el cromatógrafo de gases Microlyzer de Quintron®	39
Fotografía 4. Gel de poliacrilamida al 8% con los productos de la PCR/RFLP para C/T-13910	50
Fotografía 5. Gel de poliacrilamida al 8% con los productos de la PCR/RFLP para G/A-22018	51

RESUMEN

En poblaciones caucásicas, los polimorfismos C/T-13910 y G/A-22018, localizados corriente arriba del gen Lactasa, están asociados con el fenotipo persistencia de lactasa. La identificación de estos polimorfismos se utiliza como método diagnóstico de Hipolactasia Primaria tipo Adulto. Se realizó este trabajo de investigación con el objetivo de determinar la correlación entre los polimorfismos C/T-13910 y G/A-22018, identificados en caucásicos, y la prueba de Hidrógeno en el aliento, utilizada como prueba tamiz para el diagnóstico de mala digestión de lactasa, indicativo de Hipolactasia, en una muestra de Caribeños Colombianos. Para evaluar la capacidad de digerir lactosa se utilizó la prueba de Hidrógeno en el aliento y los polimorfismos fueron identificados mediante la metodología PCR/RFLP (Polymerase Chain Reaction/Restriction Fragment Length Polymorphism). Los fragmentos amplificados fueron digeridos con las enzimas *Hinf I* y *Hha I*. Las frecuencias alélicas y genotípicas así como el equilibrio de Hardy Weinberg y desequilibrio de ligamiento fueron determinados mediante el software Arlequin version 3,1 y el índice Kappa se utilizó para determinar la correlación entre las dos pruebas. Las frecuencias genotípicas para el polimorfismo C/T-13910 fueron CC (80%), CT (20%) y TT (0%), y para el polimorfismo G/A-22018 fueron AA (60%), GA (40%) and GG (0%). Solo el locus que contiene el SNP C/T-13910 estuvo en equilibrio de Hardy Weinberg y los loci están en equilibrio de ligamiento. La genotipificación del

SNP C/T-13910 presentó sensibilidad del 97% y especificidad del 46%. El índice Kappa= 0,473 indica moderada correlación entre la genotipificación del SNP C/T-13910 y prueba de Hidrógeno en el aliento. Las distribuciones alélicas y genotípicas indican un patrón de distribución diferente al encontrado en caucasianos. La moderada correlación encontrada entre el SNP C/T-13910 y la capacidad de digerir lactosa así como la distribución del SNP G/A-22018 indican que esos polimorfismos no son confiables para diagnosticar hipolactasia primaria tipo adulto en la población estudiada.

Palabras clave: polimorfismo genético, hipolactasia primaria tipo adulto, persistencia de lactasa, lactasa, lactosa, prueba de Hidrógeno en el aliento.

ABSTRACT

In Caucasian populations, C/T-13910 and G/A-22018 polymorphisms, located upstream of the lactase gene are associated with lactase persistence phenotype. The identification of these polymorphisms is used as a diagnostic method of primary adult-type hypolactasia. This study was done with the aim of determining the correlation between the polymorphisms C/T-13910 and G/A-22018 identified in Caucasians, and the hydrogen breath test, used as a screening test for the diagnosis of lactase maldigestion, indicating hypolactasia, in a sample of Colombian Caribbeans. The hydrogen breath test was used to assess the ability to digest lactose and the polymorphisms were identified through PCR / RFLP (Polymerase Chain Reaction / Restriction Fragment Length Polymorphism). The amplified fragments were digested with the enzymes *Hinf I* and *Hha I*. The allelic and genotypic frequencies, the Hardy Weinberg equilibrium and the linkage disequilibrium were determined using the software Arlequin Version 3.1 and the Kappa index was used to determine the correlation between the tests. The genotypic frequencies for the polymorphism C/T-13910 were CC (80%), CT (20%) and TT (0%), and G/A-22018 polymorphism were AA (60%), GA (40%) and GG (0%). Only the locus containing the SNP C/T-13910 was in Hardy Weinberg equilibrium and the loci are in linkage equilibrium. The genotyping of the SNP C/T-13910 showed 97% sensitivity and 46% specificity. The Kappa index = 0.473 indicates a moderate correlation between the genotyping of the SNP C/T-13910

and the hydrogen breath test. The allelic and genotypic distributions indicate a different distribution pattern from that of Caucasians. The moderate correlation found between the SNP C/T-13910 and the ability to digest lactose as well as the distribution of the SNP G/A-22018 indicate that these polymorphisms are not reliable for diagnosing primary adult type hypolactasia in the studied population.

Key words: genetic polymorphism, primary adult-type hypolactasia, lactase persistence, lactase, hydrogen breath test.

1. INTRODUCCIÓN

Lactasa-floricina hidrolasa (EC 3.2.1.23/62), generalmente conocida como lactasa, es la enzima que hidroliza la lactosa hasta sus respectivos monosacáridos: glucosa y galactosa. Esta enzima se encuentra en las microvellosidades a nivel del intestino delgado y su expresión es regulada durante las etapas de maduración y desarrollo intestinal (1-3). Se reconocen dos fenotipos lactasa en humanos: la Hipolactasia Primaria Tipo Adulto (HPTA) y la persistencia de Lactasa (PL) (4). El primero, también conocido como no persistencia de lactasa, es el fenotipo más común y consiste en la caída progresiva de la actividad lactasa después del destete hasta llegar a solo el 5-10% en la adultez (5-7) mientras que, el segundo, se caracteriza por el mantenimiento de la actividad de la enzima durante toda la vida (8). Solo un pequeño porcentaje de la población mundial expresa este fenotipo, generalmente poblaciones del Norte de Europa, del Norte de la India (9,10) y algunas tribus pastoriles de Africa (11).

El método estándar para el diagnóstico de HPTA consiste en la determinación de la actividad enzimática a partir de biopsia intestinal pero este método es invasivo y complicado (12). La Prueba de Hidrógeno en el Aliento, método indirecto, se utiliza ampliamente para diagnosticar mala digestión de lactosa, indicativo de HPTA, y cuenta con buena sensibilidad (80-92,3%) y especificidad

(100%) (13-15).

Debido a la continua búsqueda de un método diagnóstico confiable y no invasivo, Enattah *et al.*, en sujetos finlandeses no relacionados, iniciaron el estudio de marcadores genéticos tipo SNPs y como resultado, encontraron una correlación del 100% entre PL y la presencia del alelo T del SNP C/T, 13910 pb corriente arriba del gen Lactasa, en el intrón 13 del gen MCM6 (C/T-13910). Además, ellos encontraron alta correlación (96%) entre PL y la presencia del alelo A del SNP G/A, localizado en el intron 9 del gen MCM6, 22018 pb corriente arriba del gen Lactasa (G/A-22018) (16).

Se ha reportado alta correlación entre los alelos T-13910, A-22018 y PL en poblaciones brasileñas de origen caucásico (17) y en países europeos (18-22). Sin embargo, estudios realizados en poblaciones africanas no han mostrado el mismo resultado y, en estos mismos, se han encontrado nuevos SNPs (G/C - 14010, T/G-13915 y C/G-13907) en la proximidad del C/T-13910 que si están asociados con PL (23-25).

Las distribuciones alélicas y genotípicas de los SNPs C/T-13910 y G/A-22018 observadas en un estudio realizado a partir de una muestra de la población Caribeña Colombiana mostraron una distribución diferente a la encontrada en finlandeses (26). Sin embargo, para evaluar la aplicabilidad de esos SNPs en Caribeños Colombianos, es pertinente realizar un estudio de correlación entre estas variantes y el fenotipo, este último evaluado mediante un método

confiable. En este estudio, se genotipificaron los SNPs C/T-13910 y G/A-22018 y se compararon con la prueba de Hidrógeno en el aliento, utilizada para evaluar la capacidad de digerir lactosa, en una muestra de la población Caribeña Colombiana, que históricamente, es el producto de la mezcla de tres grupos étnicos: Africano, Amerindio y Caucásico (27).

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Generalidades de Lactasa

La lactosa, disacárido presente en la leche de los mamíferos, debe ser hidrolizado para lograr su absorción. La enzima encargada de esta función, la lactasa, se encuentra en las microvellosidades de las células de la mucosa intestinal y su actividad consiste en desdoblar la lactosa en sus respectivos monosacáridos mediante hidrólisis del enlace $\beta(1-4)$ glicosídico (1). La lactasa es una β -galactosidasa de 150 kDa sintetizada en los enterocitos a partir de una proteína precursora de 220 kDa (28). Esta enzima puede hidrolizar la floricina, la celobiosa, la celotriosa y, parcialmente, la celulosa (29). La expresión de lactasa difiere a lo largo del intestino delgado, encontrándose mayor actividad en el yeyuno medio que en el duodeno proximal y en el íleo terminal (30)

El patrón de desarrollo de la expresión de la lactasa en la etapa fetal es diferente al de otras disacaridasas (31). La actividad enzimática es baja antes de las 24 semanas de gestación, hasta cuando en el tercer trimestre se alcanzan niveles marcadamente altos, permaneciendo así hasta el momento del destete; en ese momento desciende a un 10 % de su actividad y se mantiene así el resto de la vida. Este declive está causado por una interrupción en el complejo proceso genético responsable de la síntesis de LPH (32). La digestión de la lactosa genera glucosa y galactosa, monosacáridos constituyentes, los cuales son absorbidos por las células de la mucosa intestinal y luego, a través

del torrente circulatorio, llegan a los tejidos. Cuando la lactosa no es digerida continúa su paso por el intestino y, al llegar al colon, las bacterias la utilizan como fuente de energía (33).

2.2. Deficiencia de Lactasa

La expresión “deficiencia de lactasa” aplica tanto para la disminución como para la ausencia de la actividad de esa enzima (34). La deficiencia de lactasa puede ser primaria o secundaria.

La deficiencia primaria puede ser total o parcial. La deficiencia total se conoce como deficiencia congénita de lactasa o alactasia. Es un error innato del metabolismo caracterizado por la actividad extremadamente baja o la ausencia absoluta de lactasa intestinal (0-10U/g), aunque sean normales las demás enzimas intestinales y las características morfológicas de la mucosa (35). Se manifiesta como un cuadro de diarrea acuosa, deshidratación severa y pérdida de peso, tan pronto como el recién nacido es amamantado. El diagnóstico se realiza antes de las 36 semanas de vida extrauterina mediante la determinación de la actividad de la lactasa a partir de biopsia intestinal y el tratamiento consiste en retirar de la dieta aquellos productos que contienen lactosa (36). La deficiencia primaria parcial se conoce como Hipolactasia Primaria Tipo Adulto (HPTA), corresponde a uno de los dos fenotipos que se pueden encontrar en la humanidad respecto a la lactasa y consiste en la disminución genéticamente programada después de la infancia hasta llegar a la adultez (5,6).

La deficiencia secundaria, comúnmente conocida como hipolactasia secundaria, consiste en la disminución de la actividad de la lactasa como consecuencia de estados patológicos que cursan con lesiones de las vellosidades intestinales, en las cuales, previamente, la actividad enzimática era normal. En este cuadro se puede ver afectada la actividad de las otras disacaridasas. Entre las patologías que pueden provocar este tipo de deficiencia están: la enfermedad inflamatoria intestinal, la enfermedad celíaca (37), la enteritis aguda (38) y las infecciones parasitarias causadas por *Giardia lamblia* y *Ascaris lumbricoides* (39,40).

La hipolactasia secundaria se diferencia de la hipolactasia primaria tipo adulto en que, generalmente, es susceptible de reversión en la medida en que se pueda eliminar la causa que la produce (37).

2.3. Intolerancia a la lactosa

Es la respuesta sintomática que se produce después de ingerir una dosis de lactosa o de leche entera cuando los niveles de lactasa intestinal no son suficientes para digerir el disacárido o cuando, a pesar que se produce digestión, no se da una buena absorción de los monosacáridos resultantes (glucosa y galactosa) (41). En cualquiera de los dos casos, el disacárido no digerido o los monosacáridos no absorbidos son aprovechados por la microflora colónica con la concomitante producción de ácidos grasos de cadena corta y gases como Hidrógeno y Metano, responsables de las manifestaciones propias

de la intolerancia a la lactosa, tales como flatulencia, diarrea y dolor abdominal (42). Estas manifestaciones también se producen en otras situaciones tales como: síndrome de intestino irritable, sobrecrecimiento bacteriano intestinal, deficiencia de disacaridasas diferentes a lactasa y mala absorción de monosacáridos (43,44). El grado de intolerancia depende no solamente de la actividad de la enzima sino también de la dosis de lactosa, del tiempo de tránsito intestinal, del vaciamiento gástrico y de la flora bacteriana intestinal (45). La única forma de establecer si un sujeto es intolerante a la lactosa es mediante la identificación de las manifestaciones después de la ingesta del disacárido. La intolerancia no es sinónimo de deficiencia de lactasa, debido a que esta puede resultar de otras patologías, no es un fenotipo y no debe confundirse con intolerancia a la leche de vaca, resultante de alergia a la caseína (46). Un sujeto hipolactásico puede ser tolerante o puede ser intolerante a lactosa. Cuando se dice que un individuo es intolerante a la lactosa se debe aclarar la cantidad de lactosa que origina dicha intolerancia (47-49).

La intolerancia a la lactosa genera aversión a la leche en el sujeto, quien al preferir no consumirla se priva de un alimento rico en proteínas de alto valor biológico, vitaminas y minerales, entre ellos el calcio, elemento clave en varios procesos fisiológicos como la formación y el mantenimiento de la densidad ósea (50-52).

2.4. Hipolactasia y Persistencia de Lactasa

La HPTA es un rasgo autosómico recesivo que se caracteriza por la disminución irreversible y progresiva de la actividad lactasa, de tal manera que durante la adultez, en los sujetos que presentan esa condición, no persiste la actividad alta característica de la infancia sino que solo se mantiene entre el 5-10 % de ella, causando una restricción en el consumo de leche (5,6). El fenotipo Hipolactásico es mayoritario, en la especie humana, y su frecuencia es mucho menor en las poblaciones del norte de Europa (5%), con respecto a las poblaciones que habitan el Centro y Sur de ese continente. Existen algunos grupos nómadas del Norte de África y Oriente en las que predominan frecuencias de Hipolactasia cercanas al 90% (53).

La capacidad para digerir la lactosa en la etapa adulta, condición conocida como PL, es un rasgo autosómico dominante que previene la disminución esperada en los niveles de lactasa (8,54). La frecuencia de PL varía considerablemente entre las diferentes poblaciones humanas, encontrándose una alta frecuencia en países europeos, como es el caso de Holanda y Suecia que presentan una frecuencia de 100% y 99% respectivamente (8).

Estudios previos demuestran una variación considerable en la frecuencia de persistencia de lactasa entre diferentes poblaciones africanas, así como un complejo patrón de distribución (55). Poblaciones pastoriles de Nigeria

presentan una mayor frecuencia de persistencia de lactasa en comparación con las no pastoriles situadas en el mismo país (56).

Durante milenios, el ser humano, tras el destete, al igual que el resto de los mamíferos dejó de ingerir productos lácteos. Fue después, tras la revolución mesoneolítica, cuando entró en la fase de producción con la agricultura y la ganadería, y comenzó a ingerir productos lácteos después del destete. En aquellas poblaciones que provenían de lugares donde era posible la cría segura y económica de rebaños lecheros, especialmente en Europa y África Central, se necesitó una variación genética que permitiera la tolerancia a la lactosa, lo cual explicaría, el aumento en la prevalencia de PL (57,58). Esta explicación es la base de la hipótesis histórica cultural del origen y auge del fenotipo PL en Europa. Otra hipótesis es la denominada causa reversa según la cual la ganadería se ejerció en poblaciones que ya poseían el fenotipo PL, es decir, que este no apareció bajo la presión cultural (59,60).

La diferencia entre la distribución de los dos fenotipos lactasa se debe al componente étnico, así: los caucásicos y sus descendientes usualmente tienen el fenotipo persistencia de lactasa, mientras que los negros, los indígenas americanos y los aborígenes australianos usualmente tienen HPTA (53, 61, 62). En Colombia, la prevalencia de HPTA, es del 70%, según Angel *et al* (63). En América Latina se plantea que la adquisición de la persistencia de lactasa en algunas poblaciones es resultado del mestizaje (27).

2.5. Regulación de la expresión de Lactasa

La lactasa es codificada por el gen LCT (MIM 603202) que está localizado en el cromosoma 2q21 (64). Este gen comprende 17 exones y cubre 49 kb aproximadamente, se expresa de manera específica en los enterocitos diferenciados del intestino delgado y su transcripción genera un mRNA de 6274 pb, el cual codifica para una proteína de 1927 aminoácidos (28, 65).

La estructura y secuencia exónica del gen LCT se conoce desde 1991 y no se encontraron variaciones a nivel del gen que estuvieran asociadas a LP o a HPTA (28).

La deficiencia congénita de lactasa se produce cuando mutaciones sobre el gen de la lactasa generan sustituciones de aminoácidos o enzimas de menor tamaño (35). A diferencia de estas mutaciones que afectan la estructura de la proteína, en el caso de la HPTA, la disminución de la actividad es causada por mecanismos de regulación de la expresión del gen y en raras ocasiones, por anomalías en la síntesis intracelular de la proteína (66-70).

La regulación de la expresión del gen LCT así como las bases moleculares que expliquen la existencia de dos fenotipos se han estudiado ampliamente. Sin embargo, la explicación para el declinamiento de la expresión de lactasa después de la infancia no es clara (54,70). Actualmente, existen pruebas de que el principal mecanismo de regulación de la expresión de lactasa puede ser a nivel transcripcional (66-71) en seres humanos (69,72) conejos (73), ovinos (3),

cerdos (74), y ratas (2,75,76). Sin embargo, se han observado discrepancias al comparar los niveles de ARNm de lactasa con la actividad enzimática (Lactasa persistentes e Hipolactásicos) (4). Esto sugiere la existencia de control de la expresión génica de lactasa tanto a nivel transcripcional como postranscripcional (15, 71-73).

La regulación transcripcional es el factor más importante que afecta los niveles de lactasa a nivel intestinal. Un conjunto de elementos *cis* con funciones en el proceso de transcripción de lactasa han sido identificados corriente arriba de la caja TATA del promotor del gen (72,80). Las regiones promotoras en humanos, ratas y cerdos muestran cierta homología en esa región; además, los sitios de unión para el factor de transcripción están agrupados dentro de los 100 pb corriente arriba de la caja TATA, como sucede con la mayoría de los genes (81-83).

2.6. SNPs C/T-13910 y G/A-22018 en Europa

En el 2002, Enattah *et al.*, mediante análisis de haplotipos y de desequilibrio de ligamiento, demostraron que el alelo T del polimorfismo C/T situado 13,9 kb corriente arriba del exón 1 del gen LCT y en intron 13 del gen MCM6 estaba asociado con el fenotipo PL. Este estudio se realizó en una muestra de 196 finlandeses no emparentados, a los cuales se les aplicó la prueba estándar, actividad lactasa a partir de biopsia intestinal, y análisis genético (16). A pesar que en ese momento no se conocía el mecanismo molecular que explicara la

asociación genotipo-fenotipo, el SNP C/T-13910 fue propuesto como marcador de PL en finlandeses (84-87).

Además, Enattah *et al.*, encontraron un segundo polimorfismo asociado con persistencia de lactasa (G/A-22018) situado corriente arriba del exón 1 del gen LCT en intrón 9 del mismo gen MCM6, que a pesar de no presentar una asociación del 100% con el fenotipo persistencia de lactasa, puede desempeñar un papel importante en la regulación de la expresión de la enzima. Enattah *et al.* fueron los primeros en asociar polimorfismos de un solo nucleótido o SNPs, sigla proveniente de su definición en inglés, single nucleotide polymorphism, con el fenotipo persistencia de lactasa (16). En la figura 1 se muestra la posición de los SNPs identificados por Enattah *et al.*

Para el SNP C/T-13910, la correspondencia homocigota en los alelos de las bases pirimidínicas C/C es lo "normal" y su presencia es indicativa de HPTA. Una alteración en la secuencia con sustitución, en uno o en los dos alelos, de la citosina por la timina, daría lugar a las secuencias de nucleótidos C/T y T/T lo cual sería indicativo de persistencia de lactasa. Para el polimorfismo G/A-22018 del mismo gen, la correspondencia homocigota en los alelos de la base guanina (G/G) indicaría HPTA, mientras que su sustitución por adenina, en uno o en los dos alelos, con secuencias G/A y A/A, daría lugar a la persistencia de lactasa (88).

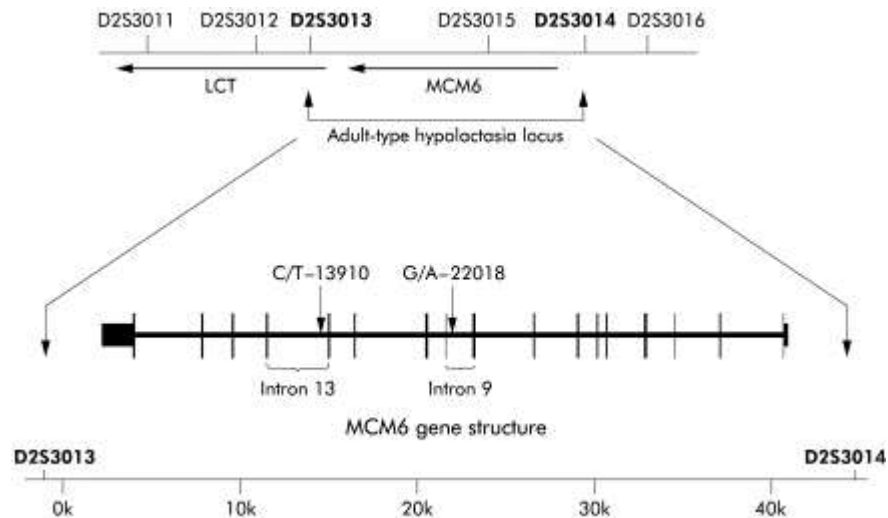


Figura 1. SNPs asociados con persistencia de lactasa en estudios hechos por Enattah *et al* (16). Representación esquemática de la región entre los dos SNPs asociados con persistencia de lactasa. Se observa que los SNPs se encuentran en los intrones 13 y 9 del gen MCM6, el cual está hacia el extremo 5' del gen LCT. Las flechas en la parte superior del esquema indican la dirección de transcripción del gen. LCT: lactasa, MCM6: minichromosome maintenance complex component 6. Esquema tomado de Enattah *et al* (16).

Olds y Sibley al igual que Troelsen *et al.* (2003) sugirieron que el SNP C/T-13910 está localizado en un elemento activador de la transcripción y que los dos alelos C-13910 y T-13910 muestran alguna diferencia funcional. Estos autores reportaron que ese polimorfismo, localizado en una región con alto desequilibrio de ligamiento, actúa como un elemento *cis* capaz de dirigir la activación transcripcional diferencial del promotor de lactasa (80,89). En estudios

realizados por Kuokkanen *et al.* los alelos T para C/T-13910 y A para G/A-22018 estuvieron asociados con niveles incrementados de mRNA en comparación con los alelos C-13910 y A-22018 de los respectivos SNPs (69). Lewinsky *et al.* demostraron que un factor de transcripción (Oct-1) a nivel nuclear se une más fuertemente a la variante T-13910 que a la variante C-13910 (90). Esta interacción entre proteína (factor de transcripción) y ADN ya fue descrito anteriormente por Hollox *et al* (91).

El alelo T-13910 es de origen reciente y se ha sugerido que ha sido sujeto de fuerte selección positiva (24,58,92,93). Estudios realizados a partir de ADN de restos arqueológicos mostraron que el alelo T-13910 estaba ausente en Europeos del Neolítico (59). Los resultados de Itan *et al.* sugieren una coevolución del fenotipo persistencia de lactasa y las conductas pastoriles en Europa (94). Este resultado no concuerda con la teoría que contempla que la aparición del fenotipo PL no fue impulsada por el consumo de leche (60).

Luego del descubrimiento de los SNPs C/T-13910 y G/A-22018, y de descubrir excelente correlación genotipo-fenotipo en países Europeos (18-22), han sido utilizados como método diagnóstico de HPTA o de PL. En Rusia, Borinskaia *et al.* demostraron que la genotipificación del SNP C/T-13910 es método confiable para el diagnóstico de HPTA en esa población (95). Lindan *et al.* obtuvieron un resultado similar, con el SNP G/A-22018, en población al Norte de China (96).

En Brasil, se ha encontrado buena correlación entre los SNPs C/T-13910 y G/A-

22018 y la PL. Bulhøes *et al.* estudiaron descendientes caucásicos (17) y Mattar *et al.* realizaron un trabajo en diferentes grupos étnicos (97). Mientras que Bernardes-Silva *et al.*, estudiaron la asociación entre intolerancia a la lactosa, utilizando como indicador la genotipificación, y el síndrome de intestino irritable (98).

Poulter *et al.* (2003) mostraron que la expresión de lactasa a nivel intestinal persiste en la adultez en algunas personas debido a un polimorfismo regulatorio que actúa en posición *cis*. Ellos reportaron la existencia de una región con estrecho desequilibrio de ligamiento localizada corriente arriba del gen LCT. A pesar de encontrar fuerte correlación entre la digestión de lactosa y la presencia del alelo T-13910 en sujetos Finlandeses, Poulter *et al.* indicaron que ese alelo no explica por sí solo toda la variación en la expresión de LCT, esto sugiere la posibilidad de heterogeneidad genética (99).

Di Stefano *et al.*, en Italia, compararon la prueba genética con el SNP C/T-13910 y la prueba de Hidrógeno en el aliento, y encontraron buena correspondencia. Sin embargo, ellos no consideran que la prueba genética pueda ser un nuevo estándar de oro para el diagnóstico de HPTA y que para un diagnóstico más confiable, debería acompañarse por la prueba de Hidrógeno en el aliento (100). Igualmente, Nagy *et al.* concluyeron que el acompañamiento de esas dos pruebas facilitaría un diagnóstico clínico perfecto después que ellos realizaron un estudio en Húngaros utilizando esas pruebas (101). Se necesitan más

estudios para encontrar la correlación entre la prueba genética con el SNP C/T-13910 y la prueba de Hidrógeno en el aliento.

El SNP C/T-13910 ha sido motivo de investigación por su posible relación con algunos estados patológicos. Rasinpera *et al.* estudiaron la correlación entre este SNP y la frecuencia de cancer colorectal en Finlandeses, Británicos y Españoles. Ellos encontraron que el genotipo CC-13910 estaba asociado significativamente al riesgo de padecer cáncer colorectal en sujetos Finlandeses (84). Kettunen *et al.*, mediante la genotipificación del SNP C/T-13910 encontraron evidencia que relaciona el fenotipo PL con el incremento del índice de masa corporal en Finlandeses (102). Almon *et al.* demostraron que el alelo T-13910 puede constituir un factor nutrigenético que incrementa la susceptibilidad de desarrollar síndrome metabólico en sujetos con PL en las Islas Canarias (103).

2.7. SNP C/T-13910 en poblaciones africanas

Estudios previos muestran considerable variación en la frecuencia de persistencia de lactasa entre diferentes poblaciones africanas, así como un complejo patrón de distribución (32, 55).

Mulcare *et al.* estudiaron 1671 sujetos de 20 grupos diferentes en siete países africanos y encontraron que el alelo T-13910 es escaso y que no explica el fenotipo LP (23). Tishkoff *et al.* encontraron tres nuevos SNPs en poblaciones africanas y del Medio Este africano, cercanos al SNP C/T-13910 en intron 13 del

gen MCM6 (C/G-13907, G/C-14010 and T/G-13915). Estos SNPs mostraron un origen reciente y fuerte selección positiva (24). Ingram *et al.* ratificaron la asociación entre el SNP T/G-13915 y PL en sujetos Sudaneses (25).

En grupos nómadas del Sur del Sahara y del Medio Este en los cuales se ha reportado alta prevalencia de PL, el alelo T-13910 no es predictor confiable de ese fenotipo. Además, uno de los SNPs identificado por Tishkoff *et al.* e Ingram *et al.* (T/G-13915) (24,25) mostro alta correlación con PL (104).

Myles *et al.* genotipificaron el SNP C/T-13910 en tres poblaciones Berber del Norte de Africa; observaron que la frecuencia del alelo T-13910 predice tolerancia a la lactosa en poblaciones Berber provenientes de Europa y del Norte de Africa, pero no en poblaciones europeas al sur del Sahara y concluyeron que las poblaciones Berber contemporáneas poseen la habilidad genética debido a una migración pasada de tribus pastoriles del medio este y a la conservación de la cultura pastoril derivada de los europeos y asiáticos, lo cual no sucedió en poblaciones Surafricanas (105).

2.8. Métodos para el diagnóstico de Hipolactasia

Existe un método directo y varios indirectos para el diagnóstico de Hipolactasia. El método directo, considerado el estándar de oro, consiste en la determinación de la actividad de la lactasa a partir de biopsia de mucosa intestinal. Una actividad específica igual o superior a 10 Unidades/mg de proteína indica

persistencia mientras que valores inferiores a 7 Unidades indican hipolactasia, sin discriminar si es primaria o secundaria (12). Los métodos indirectos se mencionan a continuación.

2.8.1. Prueba de tolerancia a la lactosa.

Consiste en la determinación de la glicemia, antes y después de la administración oral de una sobrecarga de leche entera o de una solución que contiene lactosa. La prueba debe iniciarse después de un ayuno de 8-12 horas para facilitar la detección del cambio en los niveles de glucosa en sangre. Aumentos superiores a 20 mg/mL, en cualquier tiempo, por encima del nivel basal, indican que el individuo es buen digestor frente a la cantidad de lactosa recibida y que, además, es absorbe los monosacáridos constituyentes (106).

2.8.2. Prueba de Hidrógeno en el aliento.

Este método consiste en determinar el Hidrógeno en el aliento del sujeto, antes y después de la administración de una carga de leche entera o de una solución que contiene lactosa. Se fundamenta en la formación de Hidrógeno en el colon, por acción de la flora bacteriana colónica sobre la lactosa no digerida en el yeyuno; el Hidrógeno pasa del intestino a la sangre, esta lo lleva al pulmón que finalmente lo elimina durante la espiración. Un aumento en la concentración de Hidrógeno superior a 20 ppm, con respecto a la muestra basal, en cualquiera de

las muestras posteriores a la sobrecarga con leche entera o con lactosa puede indicar que el sujeto es mal digesor de la cantidad de lactosa ingerida o que si fue digerida pero los monosacáridos resultantes de la digestión no fueron absorbidos. Para descartar esta última posibilidad es necesario realizar otra prueba en la cual se suministran solo los monosacáridos (13-15).

2.8.3. Determinación de lactasa *in vivo* mediante análogos de lactosa

Este método consiste en administrar, por vía oral, un análogo de lactosa, Galactosil-xilosa por ejemplo, y determinar xilosa en orina. La cantidad de xilosa eliminada refleja el nivel de actividad enzimática en la mucosa intestinal. Los sujetos lactasa persistentes eliminarán mayor cantidad de xilosa en comparación con los hipolactásicos. Sin embargo, esta prueba no permite discriminar entre HPTA e hipolactasia secundaria (107-109).

2.8.4. Genotipificación de SNPs asociados con persistencia de lactasa.

Este método es de aparición reciente y se fundamenta en la genotipificación de los SNPs C/T-13910 y G/A-22018, identificados por Enattah et al. en población caucásica al Norte de Europa (16). Se han realizado estudios de correlación genotipo-fenotipo alrededor del mundo con el fin de determinar la confiabilidad de esta técnica (17-19,21). De hallarse perfecta correlación en todas partes del mundo, el método podría aplicarse a la población general (110,111). Sin embargo, algunos estudios, de aparición reciente, realizados en otras

poblaciones presentan resultados controversiales (23-25).

2.9. Población Caribeña Colombiana

Los sujetos nacidos en la región Caribe Colombiana se conocen como Caribeños Colombianos en el contexto nacional. La región Caribe es un área continental y marítima que comprende la zona Norte del país, desde la península de la Guajira al golfo de Urabá, y desde el mar hasta las últimas estribaciones de las cordilleras. Está conformada por los departamentos de Atlántico, Bolívar, Cesar, Córdoba, La Guajira, Magdalena y Sucre (112).

La mayoría de la población se encuentra en las principales ciudades, que son: Barranquilla, Cartagena, Santa Marta, Valledupar y Montería. Barranquilla presenta la mayor parte de la población del Caribe Colombiano con 2 millones de habitantes en su área metropolitana; seguida por Cartagena con 1.200.000 habitantes aproximadamente (113).

Los grupos étnicos predominantes en esta población son el mulato (nacido de la unión interracial entre una persona blanca y una persona negra) y el mestizo (nacido de la unión entre una persona blanca y una persona amerindia). Sin embargo, existen núcleos indígenas como el Wayúu en La Guajira y el Chimila en el Cesar. En la Sierra Nevada sobreviven grupos como los Arwakos, los Wiwa y los Koguis (112,113).

2.9.1. Mestizaje en la región Caribe Colombiana

La población caribeña colombiana es el producto del mestizaje entre los nativos americanos, los colonos europeos (Españoles y Portugueses), que llegaron durante la conquista entre los siglos XV y XIX, y los africanos que fueron traídos a Colombia como consecuencia del proceso de esclavitud que predominó en esa época (114). La colonización Europea sobre el continente Americano disminuyó la población nativa generando uno de los más grandes colapsos poblaciones en la historia de la humanidad (115).

La contribución de cada población parental y el grado de mezcla varían según las regiones en Colombia dependiendo del patrón de interacción entre los diferentes grupos étnicos (nativo, europeo y africano). Los reportes históricos concuerdan con los estudios genéticos que describen las proporciones en el mestizaje en diferentes subpoblaciones Colombianas, resaltando la gran influencia de los grupos étnicos amerindio y blanco en la región Caribe (27,116,117).

La ciudad de Barranquilla, eje principal del desarrollo en la región, es una ciudad cosmopolita y multicultural con presencia de grupos de inmigrantes árabes, judíos, alemanes, italianos, ingleses y asiáticos que han contribuido en el desarrollo de la región (116).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Determinar la correlación entre los SNPs C/T-13910 y G/A-22018 y la capacidad de digerir lactosa, evaluada mediante la prueba de Hidrógeno en el aliento, en una muestra de la población del Caribe Colombiano.

3.2. Objetivos específicos

- Conocer las frecuencias genotípicas y alélicas para los polimorfismos C/T-13910 y G/A-22018 en la población estudiada.
- Determinar la capacidad de digerir lactosa mediante la prueba de Hidrógeno en el aliento.
- Establecer la sensibilidad y especificidad de la prueba genética con el SNP C/T-13910 al compararla con la prueba de Hidrógeno en el aliento.
- Establecer la sensibilidad y especificidad de la prueba genética con el SNP G/A-22018 al compararla con la prueba de Hidrógeno en el aliento

4. METODOLOGÍA

4.1. Reactivos y equipos

Para la extracción de ADN se utilizó el kit Wizard® Genomic (Promega®, USA). Otros reactivos utilizados fueron: *Taq* DNA polimerasa recombinante (5U/μL), dNTPs (2,5 mM) y primers LAC-C-M-U y LAC-C-L2 (Invitrogen®, USA), enzimas de restricción *Hinf I* (10000 U/mL) y *Hha I* (20000 U/mL), BSA acetilado y buffers de reacción (New England Biolabs® Inc, USA).

Para la prueba de Hidrógeno en el aliento se utilizó el cromatógrafo de gases Microlyzer modelo 12i, Quintron Instruments Company® (Milwaukee, USA.) y para los procedimientos moleculares se emplearon: Termociclador PTC-100™, MJ Research® Inc; Microcentrífuga refrigerada 5415R, Eppendorf®; Sistema de fotodocumentación DIGI-DOC, Ultra-Violet Products® y fuente de poder modelo 3000P Thermo Electron Corporation®.

4.2. Diseño Metodológico

Este estudio de correlación consistió en seleccionar una muestra de la población del Caribe colombiano para practicarle prueba de Hidrógeno en el aliento y genotipificación de los SNPs C/T-13910 y G/A-22018, con el objetivo de conocer si esos polimorfismos estaban presentes en esa población y en caso de encontrarse, establecer su asociación con la capacidad de digerir lactosa evaluada por la prueba de Hidrógeno en el aliento.

Este estudio fue aprobado por el comité de Ética de la Universidad Libre Seccional Barranquilla y se obtuvo el consentimiento informado de todos los sujetos en estudio.

4.3. Muestras

En este estudio participaron 128 sujetos (edad promedio: 35 años \pm 1), 67 mujeres y 61 hombres, no emparentados, nacidos en cualquiera de los departamentos que conforman la región Caribe Colombiana, descendientes de padres y abuelos nacidos en la misma región, y que cumplieran con los siguientes criterios de inclusión: ausencia, durante las dos últimas semanas, de tratamiento con antimicrobianos; ausencia de enfermedad digestiva actual; no presentar antecedentes de cirugía gastrointestinal y haber expresado consentimiento.

4.4. Prueba de Hidrógeno en el aliento (PHA)

A todos los sujetos, previo ayuno de 10 horas, se les realizó la PHA luego de la administración oral de 25 gramos de lactosa diluidos en 250 mL de agua. El nivel de Hidrógeno en el aliento, expresado en ppm, se determinó con el cromatógrafo de gases Microlyzer Quintron Modelo 12i (Quintron Instruments Company[®] Inc., Milwaukee, USA) en una muestra basal y en muestras colectadas cada hora durante 3 horas. Se consideraba mal digestor de lactosa

(MDL) al sujeto que presentará un nivel de Hidrógeno espirado igual o mayor a 20 ppm en cualquiera de las mediciones realizadas durante las tres horas posteriores a la ingestión de lactosa, en caso contrario era considerado digesor de lactosas (DL). En las fotografías 1-3 se presenta la toma y procesamiento de la muestra de aliento.



Fotografía 1. Toma de muestra de aliento mediante accesorios Quintron®



Fotografía 2. Aspiración de la muestra en la bolsa colectora mediante jeringa



Fotografía 3. Inyección de la muestra en el cromatógrafo de gases Microlyzer de Quintron®

4.5. Genotipificación de los polimorfismos tipo SNP C/T-¹³⁹¹⁰ y G/A-²²⁰¹⁸

Se utilizó DNA genómico obtenido a partir de sangre venosa. Para su extracción y purificación se utilizó el kit Wizard® Genomic (Promega®, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. La identificación de los polimorfismos se hizo mediante la técnica de PCR/RFLP (Polymerase Chain Reaction / Restriction Fragment Length Polymorphism) que consiste en la amplificación de los fragmentos que contienen a los SNPs C/T-¹³⁹¹⁰ y G/A-²²⁰¹⁸ y la siguiente digestión con endonucleasas de restricción. En la figura 2 se muestra la ruta metodológica de la prueba genética y la interpretación de los resultados.

4.5.1. PCR/RFLP para el SNP C/T-13910

La región que contiene el SNP C/T-13910 fue amplificada por PCR con los primers: 5'-GCTGGCAATACAGATAAGATAATGGA-3' y 5'-CTGCTTTGGTTGAAGCGAAGAT-3'. de acuerdo con el protocolo de Mulcare *et al.* modificado (23).

La reacción de PCR se llevó a cabo en un Termociclador PTC-100, MJ Research®, con un volumen total de 20 µL, los cuales contenían tampón de PCR 1X (Tris-HCl [pH 9] 20 mM), MgCl₂ 1,5 mM, dNTPs 0,2 mM, 1,5U de Taq polimerasa y primers 1 µM, todos de Invitrogen®, USA. Las condiciones de PCR fueron: una etapa de desnaturalización inicial a 95°C por 10 min seguida de 35 ciclos de 95°C por 1 min, anillamiento a 59°C por 1 min, elongación a 72°C por 1 min, y una elongación final a 72°C por 8 min.

El producto de PCR fue digerido con la enzima *Hinf* I de acuerdo con las instrucciones del fabricante (New England Biolabs®, USA). Cuando en el sitio de restricción estaba el alelo T-13910, en la digestión se obtenían dos productos: uno de 201 pb y otro de 177 pb, pero si estaba presente el alelo C-13910 en lugar de T-13910, solo se obtenía un producto de 201 pb.

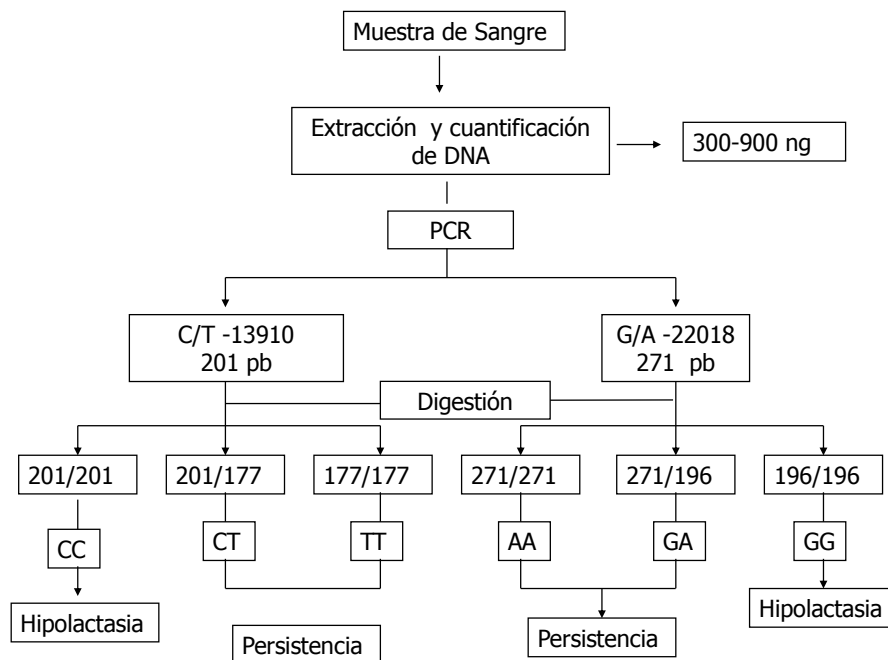


Figura 2. Ruta metodológica de la genotipificación e interpretación de los resultados.

4.5.2. PCR/RFLP para el SNP G/A-22018

La región que contiene el SNP G/A-22018 fue amplificada con los primers 5'-CTCAGTGATCCTCCACCTC-3' y 5'-CCCCTACCCTATCAGTAAAGGC-3' de acuerdo con el protocolo de Coelho *et al.* modificado (118).

La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen total de 20 µL, los cuales contenían buffer Tris HCl 1X pH 9,0, MgCl₂ 1,5 mM, dNTPs 0,2 mM, 1,5U de Taq polimerasa y primers 1 µM, todos de Invitrogen®, USA. Las condiciones de PCR fueron: una desnaturalización inicial a 95°C por 10 min seguida de 34

ciclos de 95°C por 1 min, anillamiento a 62°C por 1 min, elongación a 72°C por 1 min, y una elongación final a 72°C por 8 min.

El producto de PCR fue digerido con la enzima *Hha I* de acuerdo con las instrucciones del fabricante (New England Biolabs®, USA). Cuando el sitio de restricción estaba el alelo G-22018, en la digestión se obtenían dos productos, uno de 271 pb y otro de 196 pb, pero si estaba presente el alelo A-22018 en lugar de G-22018, solo se obtenía un producto de 271 pb.

4.5.3. Electroforesis

Tanto los productos de PCR como los de digestión fueron sometidos a electroforesis en gel de poliacrilamida siguiendo las recomendaciones de Sambrook & Russell (119). Las bandas de DNA fueron visualizadas con un fotodocumentador DIGI-DOC luego de la tinción del gel con bromuro de etidio.

Para el SNP C/T-13910, aquellas muestras que presentaban una sola banda de 201 pb (indicativa del alelo C-13910) fueron identificadas como genotipo CC-13910 (homocigoto), las que mostraban una sola banda de 177 pb (indicativa del alelo T-13910) como genotipo TT-13910 (homocigoto). Las muestras que presentaban dos bandas, una de 201 pb y otra de 177 pb, fueron interpretadas como genotipo: CT-13910 (heterocigoto).

Para el SNP G/A-22018, las muestras que presentaban una sola banda de 271 pb (indicativa del alelo A-22018) fueron identificadas como genotipo AA-22018

(homocigoto), las muestras que presentaban una sola banda de 196 pb (indicativa del alelo G-22018) como genotipo GG-22018 (homocigoto). Aquellas muestras que presentaban dos bandas, una de 271 pb y otra de 196 pb, fueron interpretadas como genotipo GA-22018 (heterocigoto).

El corrido electroforético se realizó con voltaje de 40V y 60 mA durante 4 horas en una cámara de electroforesis horizontal: SIGMA modelo 237, 240-1, con capacidad para dos geles, el buffer de corrido utilizado fue TBE 1X, el marcador de peso molecular usado fue el Φ X174 DNA HaeIII Digest de New England Biolabs® y el buffer de carga Tipo III recomendado por Sambrook & Russell (113).

En la figura 3 se muestran los diferentes resultados que pueden obtenerse luego de la electroforesis de los productos de la PCR/RFLP tanto para C/T-13910 como para G/A-22018.

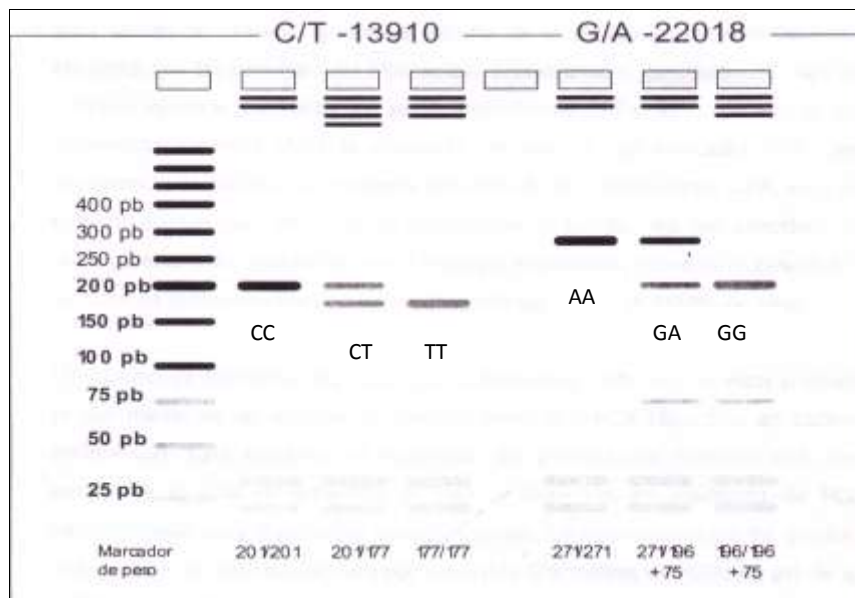


Figura 3. Posibles bandas a observarse luego de la electroforesis de los productos de PCR/RFLP.

4.5.4. Análisis estadístico

Las frecuencias alélicas y genotípicas, el equilibrio de Hardy Weinberg y el desequilibrio de ligamiento se determinaron con la ayuda del programa Arlequin versión 3,1, en inglés, con un intervalo de confianza de 95% (120).

Se aplicó la prueba de Mann-Whitney (Wilcoxon) en la comparación de las medianas de los datos en ppm (partes por millón) de Hidrógeno entre DL y MDL (121).

Para determinar la sensibilidad y la especificidad de la genotipificación con respecto a la PHA se aplicaron las siguientes formulas (122):

$$\text{Sensibilidad} = \frac{\text{Verdaderos Positivos (VP)}}{\text{Verdaderos Positivos (VP)} + \text{Falsos Negativos (FN)}}$$

$$\text{Especificidad} = \frac{\text{Verdaderos Negativos (VN)}}{\text{Verdaderos Negativos (VN)} + \text{Falsos Positivos (FP)}}$$

Se determinó el índice Kappa (k), con un intervalo de confianza de 95%, para conocer la correlación entre la genotipificación (C/T-13910 y G/A-22018) y la PHA (123). Este cálculo se hizo con la ayuda del software SPSS versión 11,5; en inglés. El valor de k se interpretó de acuerdo con la escala que se presenta en

la tabla 1.

Tabla 1. Valoración del índice Kappa

Valor de k	Fuerza de concordancia
<0,20	Pobre
0,21-0,40	Débil
0,41-0,60	Moderada
0,61-0,80	Buena
0,81-1,00	Muy buena

5. RESULTADOS

5.1. Capacidad de digerir lactosa evaluada por la PHA

Entre los 128 sujetos que fueron sometidos a la PHA, 76 (59%) resultaron MDL y 52 (41%) resultaron DL. En la figura 4 se muestran los promedios de Hidrógeno en el aliento en ppm durante el tiempo de prueba, correspondientes a los dos grupos (MDL y DL). Al aplicar la prueba de Mann-Whitney (Wilcoxon) en la comparación de las medianas de los datos, se encontró diferencia estadística significativa entre MDL y DL ($p < 0,05$).

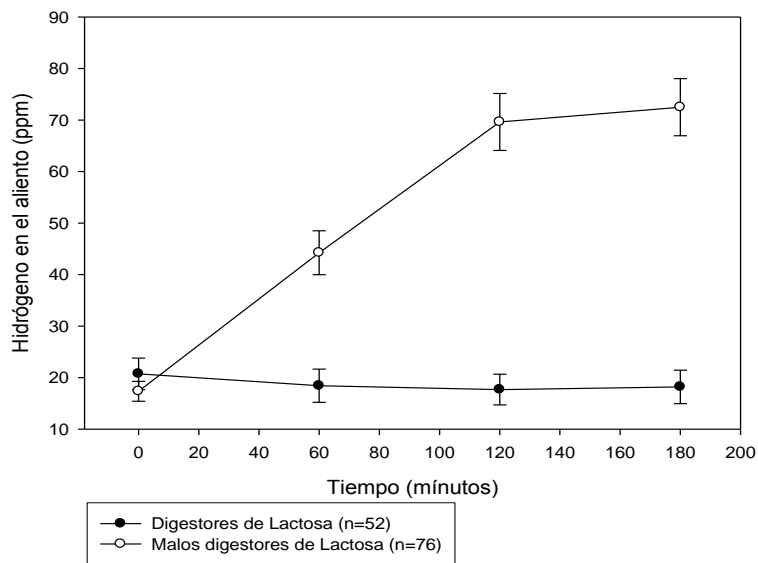


Figura 4. Prueba de Hidrógeno en el aliento. Se observa que los malos digestores de lactosa presentan un aumento de Hidrógeno mayor de 20 ppm con respecto al valor basal en las mediciones realizadas durante las 3 horas después de la ingestión de lactosa. Mientras que en los sujetos digestores de lactosa, no se observó aumento y contrario a los malos digestores, los valores tienden a disminuir o a permanecer constantes.

5.2. Genotipificación de los polimorfismos tipo SNP C/T-13910 y G/A-22018

El genotipo CC-13910 estuvo presente en 102 sujetos (80%) y el genotipo CT-13910 en 26 (20%). Ninguno de los sujetos presentó el genotipo TT-13910. El genotipo AA-22018 estuvo presente en 77 sujetos (60%) y el genotipo GA-22018 en 51 (40%). Ninguno de los sujetos presentó el genotipo GG-22018 (tabla 2).

La frecuencia del alelo C-13910 fue de 90% y la del alelo T-13910 (PL) fue de 10%. Por otro lado, la frecuencia del alelo A-22018 (PL) fue de 80% y la del alelo G-22018 fue de 20% (tabla 3).

Tabla 2. Frecuencias genotípicas para los SNPs C/T-13910 y G/A-22018. Se observa que los genotipos TT y GG no se encontraron en la población estudiada.

Genotipo	Frecuencia (n=128)	Porcentaje
C/T-13910		
CC-13910	102	80%
CT-13910	26	20%
TT-13910	-	-
G/A-22018		
AA-22018	77	60%
GA-22018	51	40%
GG-22018	-	-

Tabla 3. Frecuencias alélicas para los SNPs C/T-13910 y G/A-22018.

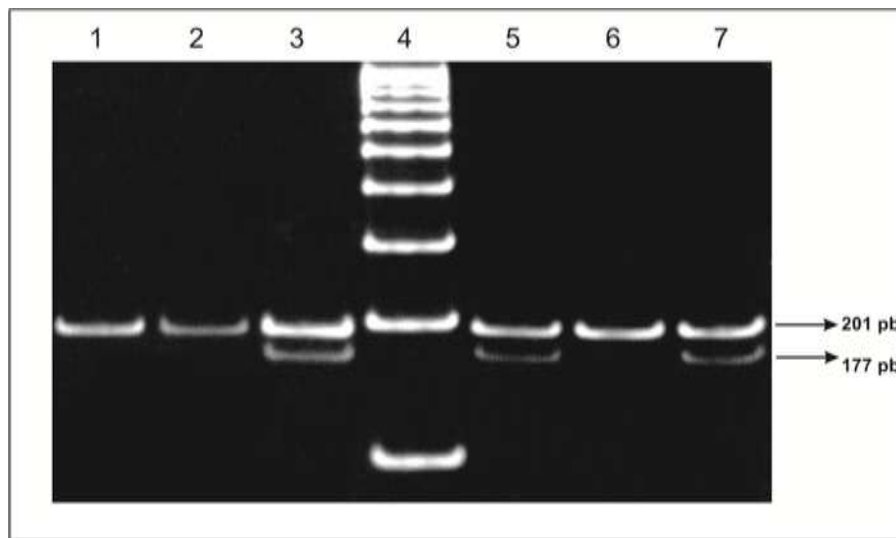
Alelo	Frecuencia (n=256)	Porcentaje
C/T-13910		
C-13910	230	90%
T-13910	26	10%
G/A-22018		
A-22018	205	80%
G-22018	51	20%

Mediante el software Arlequín, se determinó el equilibrio de Hardy-Weinberg a partir de la distribución de los genotipos para cada locus (C/T-13910 y G/A-22018) y se encontró que solo el C/T-13910 está en equilibrio de Hardy Weinberg en la muestra estudiada ($p > 0,05$). Los dos polimorfismos no presentaron desequilibrio de ligamiento ($p > 0,05$). En la tabla 4 se presentan las frecuencias genotípicas observadas y esperadas según Hardy-Weinberg así como la interpretación fenotípica de acuerdo con lo descrito por Enattah *et al* (16).

Tabla 4. Distribución de las frecuencias genotípicas observadas y esperadas para los SNPs C/T-13910 y G/A-22018. Se observa que los genotipos TT y GG no se encontraron en la población estudiada.

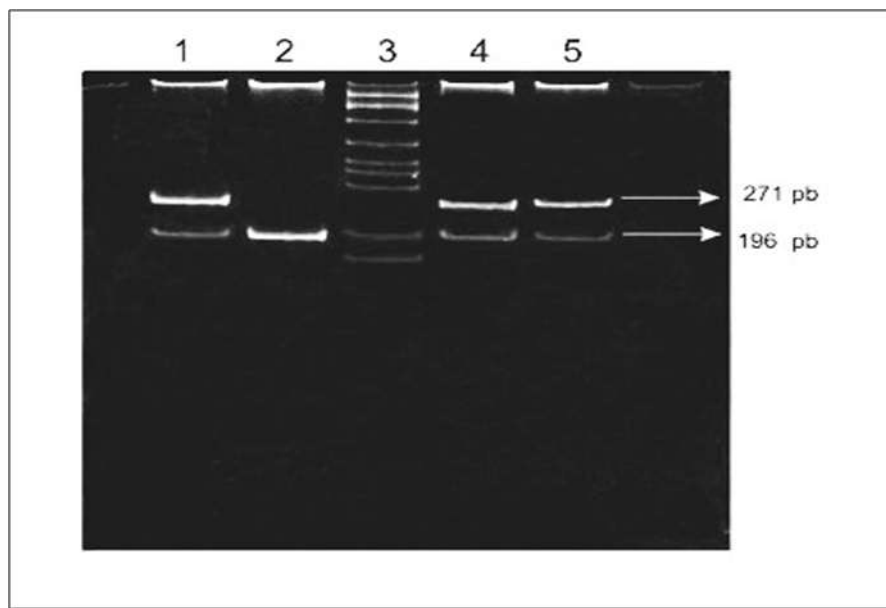
Polimorfismo	Fenotipo según Enattah et al.(16)	Genotipo	Frecuencias genotípicas (absolutas y relativas)	
			Observada (n= 128)	Esperada (n=128)
C/T-13910	HPTA	CC	102 (0.8)	104 (0.81)
	PL	CT	26 (0.2)	23 (0.18)
	PL	TT	0	1 (0.01)
G/A-22018	PL	AA	77 (0.6)	82 (0.64)
	PL	GA	51 (0.4)	41 (0.32)
	HPTA	GG	0	5 (0.03)

En la fotografía 4 se muestran los resultados de 6 muestras procesadas mediante la metodología PCR/RFLP con el fin de identificar el genotipo para el SNP C/T-13910. En esta se pueden observar las dos bandas posibles luego de la digestión con *Hinf* I: la indicativa del alelo C-13910 (201 pb) y la indicativa del alelo T-13910 (177 pb).



Fotografía 4. Gel de poliacrilamida al 8%, teñido con Bromuro de Etidio, con los productos de la PCR/RFLP para C/T-13910. **1.** Muestra con genotipo CC, **2.** Muestra con genotipo CC, **3.** Muestra con genotipo CT, **4.** Marcador de peso molecular, **5.** Muestra con genotipo CT, **6.** Muestra con genotipo CC, **7.** Muestra con genotipo CT.

En la fotografía 5 se muestran los resultados de 4 muestras procesadas mediante la metodología PCR/RFLP con el fin de identificar el genotipo para el SNP G/A-22018. En esta se pueden observar las dos bandas posibles luego de la digestión con *Hha* I: la indicativa del alelo G-22018 (196 pb) y la indicativa del alelo A-22018 (271 pb).



Fotografía 5. Gel de poliacrilamida al 8%, teñido con Bromuro de Etidio, con los productos de la PCR/RFLP para G/A-22018. **1.** Muestra con genotipo GA, **2.** Muestra con genotipo GG, **3.** Marcador de peso molecular, **4.** Muestra con genotipo GA, **5.** Muestra con genotipo GA.

5.3. Comparación entre la genotipificación de los SNPs y la PHA

5.3.1. Comparación entre el SNP C/T-13910 y la PHA

En la tabla de 5 se comparan los datos obtenidos mediante la genotipificación del SNP C/T-13910 y la PHA, esta última utilizada para evaluar la capacidad de digerir lactosa. Al lado de cada genotipo se registra el fenotipo correspondiente (PL o HPTA) según Enattah *et al.* (16) y de acuerdo con ese fenotipo, el equivalente con respecto a capacidad de digerir lactosa (DL o MDL, respectivamente)

Tabla 5. Genotipificación del SNP C/T-13910 vs PHA.

Genotipificación de C/T-13910	PHA		Total
	DL (n=52)	MDL (n=76)	
CT (PL/DL) n= 26	24 (VN)	2 (FN)	26
CC (HPTA/MDL) n= 102	28 (FP)	74 (VP)	102
	52	76	128

VN: Verdadero Negativo, VP: Verdadero Positivo, FN: Falso Negativo, FP: Falso Positivo

En la comparación que se presenta en la tabla 5 se observa que entre los 52 sujetos DL, 46% presentaron el genotipo CT-13910 (PL), coincidiendo las dos pruebas, en contraste, el 54% presentaron el genotipo CC-13910. Entre los 76 sujetos MDL, 97% presentaron el genotipo CC-13910 y el 3% presentaron el genotipo CT-13910. Teniendo en cuenta que en este estudio se utilizó la PHA como método estándar y la genotipificación como prueba para validar, esta última resultó con una sensibilidad de 97% (capacidad de identificar HPTA) y una especificidad de 46% (capacidad de identificar PL) para el diagnóstico de HPTA.

$$\text{Sensibilidad} = \frac{VP}{VP + FN} = \frac{74}{74+2} = \frac{74}{76} = 0,97 \times 100 = 97\%$$

$$\text{Especificidad} = \frac{VN}{VN + FP} = \frac{24}{24 + 28} = \frac{24}{52} = 0,46 \times 100 = 46\%$$

El índice Kappa calculado para conocer la concordancia entre la genotipificación del C/T-13910 y la PHA fue de 0,473; al ubicar este valor en la tabla 1 se obtuvo una moderada concordancia entre los dos métodos.

5.3.2. Comparación entre el SNP G/A-22018 y la digestión de lactosa

Para el SNP G/A-22018 no se hizo tabla de comparación o de contingencia debido a que todos los sujetos, tanto DL como MDL, presentaron el alelo A-22018 (indicativo de PL). No es posible comparar los resultados de dos pruebas cuando para una de las dos todos los sujetos presentaron igual resultado.

6. DISCUSION

El análisis de los resultados demuestra que los alelos de los SNPs C/T-13910 y G/A-22018 están en equilibrio de ligamiento. Esto puede significar que en la muestra genotipada la asociación toma lugar al azar, de este modo, la selección natural no ha tomado lugar sobre estos marcadores como presumiblemente si sucedió en poblaciones caucásicas, en las cuales, los alelos están en desequilibrio y el fenotipo PL constituye un factor evolutivo que confiere ventaja competitiva para la supervivencia (57-59,92).

Al analizar la distribución del SNP G/A-22018, presentada en la tabla 1, se observa que la totalidad de los sujetos son portadores del alelo dominante A, indicador de PL en poblaciones del Norte de Europa (16). Si ese alelo estuviera asociado al fenotipo en la población estudiada, el 100% de los sujetos serían lactasa persistente lo cual no es concordante con la frecuencia de PL reportada en la literatura para la población caribeña (60%) (26,124). Tampoco se observa concordancia entre este dato y la frecuencia del alelo T, también indicador de PL en Europeos.

La baja frecuencia del alelo T-13910 y la alta frecuencia del alelo A-22018 no puede ser explicada como consecuencia de un sesgo en la selección de la población debido a que los criterios de inclusión fueron estrictos. Los resultados pueden deberse a las diferencias étnicas; en el estudio de Enattah *et al* (2002) (16), la homogeneidad del grupo étnico finlandés pudo haber favorecido un incremento en el alelo T-13910, responsable de la persistencia de lactasa,

derivado de la selección natural. Además, el efecto Hitch-hiking del alelo T-13910 sobre el alelo A-22018 pudo haber influido en el alto grado de desequilibrio de ligamiento entre los loci estudiados (125). Por otro lado, la población estudiada se caracteriza por la heterogeneidad étnica resultado del cruzamiento de amerindios, europeos y africanos donde se puede observar que el efecto Hitch-hiking no tomó lugar, por tal razón no se encontró desequilibrio de ligamiento (26,27,116).

La distribución de los SNPs C/T-13910 y G/A-22018 en el presente estudio es muy semejante a la reportada en un estudio de genotipificación realizado en una muestra de la población Caribeña Colombiana, en el cual se encontró escasa aplicabilidad de esos SNPs en el diagnóstico de HPTA/PL. Sin embargo, esto debía ser confirmado con un estudio de correlación genotipo-fenotipo (26).

En comparación con estudios hechos en otras poblaciones, los resultados con respecto al SNP C/T-13910 son concordantes con lo encontrado por Mulcare *et al.* en poblaciones africanas, escasez del alelo T-13910 (23). Ese hallazgo impulsó a Ingram *et al.* y Tishkoff *et al.* a sospechar que la causa de persistencia de lactasa en africanos residía en SNPs diferentes a los finlandeses (24,25). Recientemente, Hai-ming *et al.* estudiaron el SNP C/T-13910 en chinos y no encontraron concordancia con la frecuencia del fenotipo PL reportado para esa población, por este hallazgo, concluyeron que el alelo T-13910, con tan baja frecuencia (1.88%) no podía ser usado como predictor de PL en la población estudiada (126). Sin embargo, Bulhoes *et al.*, en Brasil,

encontraron perfecta concordancia entre los polimorfismos C/T-13910, G/A-22018 y alta absorción de lactosa, indicativa de PL, aunque es importante destacar que de los 20 sujetos genotipados, 19 eran caucásicos (17).

Con respecto al análisis de la correlación, los resultados de este estudio concuerdan con los hallazgos de Di Stefano *et al.*, Nagy *et al.* y Krawczyk *et al.* quienes no encontraron perfecta correlación entre la prueba genética y la prueba de Hidrógeno en el aliento, por esta razón, ellos sugieren el uso de los dos métodos para hacer un diagnóstico confiable (100,101,127).

La población estudiada está en equilibrio de Hardy-Weinberg con respecto al SNP C/T-13910 pero se encontró alta diferencia al comparar la frecuencia del alelo T-13910 (19%) con la de digestión de lactosa (41%). La baja frecuencia del alelo T-13910, se relaciona con lo reportado por Swallow y Hollox quienes afirmaron que las poblaciones cuyos ancestros son afrocaribeños, nativos americanos africanos presentan más baja frecuencia del alelo de persistencia (9%, 3% y 19%, respectivamente) que las poblaciones al Norte de Europa (75%) que fueron favorecidas por la selección natural (8,128).

Tishkoff *et al.* encontraron tres nuevos polimorfismos (G/C -14010, T/G-13915 y C/G-13907) asociados con PL en varias tribus africanas de Tanzania, Kenya y Sudan (24). Esto demuestra que existen otros polimorfismos diferentes al C/T -13910 en poblaciones no europeas y confirma que la genotipificación de ese polimorfismo no es aplicable como recurso diagnóstico a nivel mundial debido a que no es la única causa de PL (24,129,130).

El estudio de un panel de SNPs que cubra porciones funcionales y no funcionales del gen MCM6 corriente arriba del gen LCT podría llevar al descubrimiento de otras variantes asociadas que no han sido reportadas y que sean autóctonas de una población en particular como la Caribeña Colombiana (92). Esto es válido si se tiene en cuenta que el factor demográfico fue clave en la evolución y extensión del fenotipo PL en Europa (62). Eso implica que los descendientes de diferentes partes de Europa presenten diversidad en el comportamiento de los SNPs y la expresión genética.

Debido a que las poblaciones Europeas influyeron en mayor grado en población Andina Colombiana que en la población Caribeña y teniendo en cuenta que esta última ha recibido la influencia de otros grupos como los sefarditas y los turcos, se esperaría que los Caribeños presentarán un patrón genético diferente al de los europeos (116).

Este es el primer estudio que compara la genotipificación de los SNPs C/T -13910 y G/A-22018 con la capacidad de digerir lactosa, indicativa de PL, en población mestiza a nivel de Latinoamérica. En el futuro, sería interesante verificar si los polimorfismos que fueron encontrados en población Africana y en el Medio Este están asociados con PL en la población caribeña colombiana, teniendo en cuenta el componente ancestral africano que caracteriza a esa población (131).

7. CONCLUSIONES

- La distribución de los SNPs C/T-13910 y G/A-22018 en población Caribeña Colombiana muestra un patrón diferente al encontrado en poblaciones al Norte de Europa.
- La moderada concordancia entre el SNP C/T-13910 y la prueba de Hidrógeno en el aliento encontrada en este estudio difiere de lo encontrado al Norte de Europa y en otros estudios realizados en Suramérica.
- El alelo A-22018 no es agente causal de persistencia de lactasa en la población Caribeña Colombiana estudiada.
- El alelo T-13910 no es la causa o no es la única causa de persistencia de lactasa en población Caribeña Colombiana.
- La genotipificación de los SNPs C/T-13910 y G/A-22018 no es un método confiable para el diagnóstico de HPTA en la población estudiada.
- Otros SNPs situados cerca del SNP C/T-13910 podrían estar asociados con persistencia de lactasa en Caribeños Colombianos.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Swallow, DM. Genetics of lactase persistence and lactose intolerance. *Annu Rev Genet* 2003; 37: 197-219.
2. Buller HA, Kothe MJC, Goldman DA, Grubman SA, Sasak WV, Matsudaira PT, *et al.* Coordinate expression of lactase-phlorizin hydrolase mRNA and enzyme levels in rat intestine during development. *J Biol Chem.* 1990; 265: 6978–83.
3. 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: 929–35.
4. Rossi M, Maiuri L, Fusco MI, Salvati VM, Fuccio A, Auricchio S, *et al.* Lactase persistence versus decline in human adults: multifactorial events are involved in downregulation after weaning. *Gastroenterology.* 1997; 112: 1506-14.
5. Auricchio S, Rubino A, Semenza G, Landolt M, Prader A. Isolated intestinal lactase deficiency in the adult. *Lancet.* 1963; 2: 324-6.
6. Dahlqvist A, Hammond B, Crane R, Dunphy J, Littman A. Intestinal lactase deficiency and lactose intolerance in adults: preliminary report. *Gastroenterology.* 1963; 45: 488–91.
7. Wang Y, Harvey CB, Hollox EJ, Phillips AD, Poulter M, Clay P, *et al.* The genetically programmed down-regulation of lactase in children. *Gastroenterology.* 1998; 114: 1230-6.
8. 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.* McGraw-Hill, New York, 2000; 1651–62.
9. Simoons FJ. Primary lactose intolerance and the milking habit: a problem in biological and cultural interrelations, II. A culture historical hypothesis. *Am J Dig Dis.* 1970; 15: 695–710.
10. Simoons FJ. The geographic hypothesis and lactose malabsorption—a weighing of the evidence. *Am J Dig Dis.* 1978; 23: 963–80.

11. Bayoumi RA, Saha N, Salih AS, Bakkar AE, Flatz G. Distribution of the lactase phenotypes in the population of the Democratic Republic of the Sudan. *Hum Genet.* 1981; 57: 279-81.
12. Dahlqvist A. Method for Assay of Intestinal Disaccharidases. *Anal Biochem.* 1964; 57: 18-25.
13. Newcomer AD, McGill DB, Thomas PJ, Hofmann AF. Prospective comparison of indirect methods for detecting lactase deficiency. *N Engl J Med.* 1975; 293: 1232-6.
14. Romagnuolo J, Schiller D, Bailey R.J. Using breath tests wisely in a gastroenterology practice: an evidence-based review of indications and pitfalls in interpretation. *Am J Gastroenterol.* 2002; 97: 1113-26.
15. Arola H, Koivula T, Jokela H, Jauhiainen M, Keyrilainen O, Ahola T, *et al.* Comparison of indirect diagnostic methods for hypolactasia. *Scand J Gastroenterol Suppl.* 1988; 23: 351-7.
16. 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: 233-37.
17. Bulhøes AC, Goldani HAS, Oliveira FS, Matte US, Mazzuca RB. Correlation between lactose absorption and the C/T -13910 and G/A -22018 mutations of the lactase-phlorizin hydrolase (LCT) gene in adult-type hypolactasia. *Braz J Med Biol Res.* 2007; 40: 1441-6.
18. 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: 371-6.
19. Kerber M, Oberkanins C, Kriegshauser G, Kollerits B, Senbach-Glaninger A, Fuchs D, *et al.* Hydrogen breath testing versus LCT genotyping for the diagnosis of lactose intolerance: a matter of age? *Clin Chim Acta.* 2007; 383: 91-6.
20. Tag CG, Oberkanins C, Kriegshauser G, Ingram CJ, Swallow DM, Gressner AM, *et al.* Evaluation of a novel reverse-hybridization StripAssay for typing DNA variants useful in diagnosis of adult-type hypolactasia. *Clin Chim Acta.* 2008; 392: 58-62.

21. Rasinpera H, Savilahti E, Enattah NS, Kuokkanen M, Totterman N, Lindahl H, *et al.* A genetic test which can be used to diagnose adult-type hypolactasia in children. *Gut.* 2004; 53: 1571–6.
22. 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.
23. 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-13.9kbT) does not predict or cause the lactase-persistence phenotype in Africans. *Am J Hum Genet.* 2004; 74: 1102–10.
24. Tishkoff SA, Reed FA, Ranciaro A, Voight BF, Babbitt CC, Silverman JS, *et al.* Convergent adaptation of human lactase persistence in Africa and Europe. *Nat Genet.* 2007; 39: 31–40.
25. 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.
26. Mendoza E, Hernandez AC, Wilches R, Varela LL, Villarreal JL, Barrera LA, *et al.* 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. *Colomb Med.* 2010; 41: 290-4.
27. Bedoya G, Montoya P, García J, Soto I, Bourgeois S, Carvajal L, *et al.* Admixture dynamics in Hispanics: A shift in the nuclear genetic ancestry of a South American population isolate. *PNAS.* 2006; 103 (19): 7234-9.
28. 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.
29. Nemeth K, Plumb GW, Berrin JG, Juge N, Jacob R, Naim HY, *et al.* Deglycosylation by small intestinal epithelial α -D-glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans. *Eur. J. Nutr.* 2003; 42: 29-42.

30. Newcomer AD, McGill DB. Distribution of disaccharidases activity in the small bowel of normal and lactase-deficient subjects. *Gastroenterology*. 1966; 51: 481-8.
31. Grand RJ, Walkins JB, Torti FM. Development of the human gastrointestinal tract. A review. *Gastroenterology*. 1976; 70: 790-810.
32. Flatz G. Genetics of lactose digestion in humans. In: Harris H, Hirschhorn K (eds) *Advances in human genetics*, vol 16. Plenum Press, New York, 1987; 1–77.
33. Scrimshaw NS, Murray EB. The acceptability of milk and milk products in populations with a high prevalence of lactose intolerance. *Am J Clin Nutr*. 1988; 48:1079–1159.
34. Flatz G, Rotthauwe HW. The human lactase polymorphism: physiology and genetics of lactose absorption and malabsorption. *Prog Med Genet* 1977; 2: 205-49.
35. Savilahti E, Launiala K, Kuitunen P. Congenital lactase deficiency. A clinical study on 16 patients. *Arch. Dis. Child*. 1983; 58: 246-52.
36. Holzel, A, Schwarz, V And Sutcliffe, K.W. Defective lactose absorption causing malnutrition in infancy. *Lancet I*. 1959; 1126 – 1128.
37. Kosnai I, Kuitunen P, Savilahti E, Rapola J, Kohegyi J. Cell kinetics in the jejunal crypt epithelium in malabsorption syndrome with cow's milk protein intolerance and in celiac disease of childhood. *Gut*. 1980; 21: 1041-6.
38. Ulshen MH, Rollo JL. Pathogenesis of *Escherichia coli* gastroenteritis in man-another mechanism. *N Engl J Med*. 1980; 302: 99-101.
39. Carrera E, Nesheim MC, Crompton DW. Lactose maldigestion in Ascaris-infected preschool children. *Am J Clin Nutr*. 1984; 39: 255-64.
40. Brunser O, Castillo C, Araya M. Fine structure of the small intestinal mucosa in infantile marasmic malnutrition. *Gastroenterology*. 1976; 70: 495-507.
41. Ferguson A, Maxwell J. Genetic etiology of lactose intolerance. *Lancet*. 1967; 2: 188–90.

42. Hertzler SR, Savaiano DA, Levitt MD. Fecal hydrogen production and consumption measurements—response to daily lactose ingestion by lactose maldigesters. *Dig Dis Sci.* 1997; 42: 348–53.
43. Peuhkuri. Lactose, lactase, and bowel disorders, Ph.D. thesis, University of Helsinki, Finland. 2000.
44. Mendoza E, Crismatt C, Matos R, Sabagh O, Campo M, Cepeda J, Villanueva D. Diagnóstico de proliferación bacteriana intestinal en niños: evidencia experimental para sustentar el empleo de lactulosa en la prueba de Hidrógeno y su validación como prueba tamiz. *Biomédica.* 2007; 27: 325-32.
45. Briet F, Pochart P, Marteau P, Flourie B, Arrigoni E, Rambaud JC. Improved clinical tolerance to chronic lactose ingestion in subjects with lactose intolerance: a placebo effect? *Gut.* 1997; 41: 632-5.
46. Crittenden RG, Bennett LE. Cow's milk allergy: a complex disorder. *J Am Coll Nutr.* 2005 24: 582S–91S.
47. Suarez FL, Savaiano D, Arbisi P, Levitt MD. Tolerance to the daily ingestion of two cups of milk by individuals claiming lactose intolerance. *Am J Clin Nutr.* 1997; 65: 1502–6.
48. Vesa TH, Marteau P, Korpela R. Lactose intolerance. *J Am Coll Nutr.* 2000; 19: 165S–75S.
49. Matthews SB, Waud JP, Roberts AG, Campbell AK. Systemic lactose intolerance: a new perspective on an old problem. *Postgrad Med.* 2005; J 81: 167–73.
50. Di Stefano M, Veneto G, Malservisi S, Cecchetti L, Minguzzi L, et al. Lactose malabsorption and intolerance and peak bone mass. *Gastroenterology.* 2002; 122: 1793-9.
51. Obermayer-Pietsch BM, Bonelli CM, Walter DE, Kuhn RJ, Fahrleitner-Pammer A, Berghold A, et al. Genetic predisposition for adult lactose intolerance and relation to diet, bone density, and bone fractures. *J Bone Miner Res.* 2004; 19: 42–7.
52. Gueguen L, Pointillart A. The bioavailability of dietary calcium. *J Am Coll Nutr.* 2000; 19: 119S–36S.

53. Hollox EJ, Poulter M, Zvarik M, Ferak V, Krause A, Jenkins T, *et al.* Lactase haplotype diversity in the Old World. *Am J Hum Genet.* 2001; 68: 160–72.
54. Swallow DM. Genetics of lactase persistence and lactose intolerance. *Annu. Rev. Genet.* 2003; 37: 197-219.
55. Holden C, Mace R. Phylogenetic analysis of the evolution of lactose digestion in adults. *Hum Biol.* 1997; 69: 605–28.
56. Kretchmer N, Ransome-Kuti O, Hurwitz R, Dungy C, Alakija W. Intestinal absorption of lactose in Nigerian ethnic groups. *Lancet.* 1971; 2: 392-5.
57. Beja-Pereira A, Luikart G, England PR, Bradley DG, Jann OC, Bertorelle G, *et al.* Gene culture coevolution between cattle milk protein genes and human lactase genes. *Nat Genet.* 2003; 35: 311-3.
58. Mehdi SQ, Terwilliger JD, Sahi T, Savilahti E, Perola M, Sajantila A, *et al.* Evidence of still-ongoing convergence evolution of the lactase persistence T-13910 alleles in humans. *Am J Hum Genet.* 2007; 81: 615–25.
59. Burger J, Kirchner M, Bramanti B, Haak W, Thomas MG. Absence of the lactase-persistence-associated allele in early Neolithic Europeans. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007; 104: 3736–41.
60. Enattah NS, Jensen TG, Nielsen M, Lewinski R, Kuokkanen M, Rasinpera H, *et al.* Independent introduction of two lactase-persistence alleles into human populations rejects different history of adaptation to milk culture. *Am J Hum Genet.* 2008; 82: 57–72.
61. Mulcare. The evolution of the lactase persistence phenotype. Ph.D. thesis University of London, London, UK. 2006.
62. Gerbault P, Moret C, Currat M, Sanchez-Mazas A. Impact of selection and demography on the diffusion of lactase persistence. *PLoS One* 2009; 4(7): e6369.
63. 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.

64. 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.
65. Mantei N, Villa M, Enzler T, Wacker H, Boll W, James P, et al. Complete primary structure of human and rabbit lactase-phlorizin hydrolase: implications for biosynthesis, membrane anchoring and evolution of the enzyme. *EMBO J.* 1988; 7: 2705-13.
66. Escher JC, De Koning ND, Van Engen CG, Arora S, Buller HA, Montgomery RK, et al. Molecular basis of lactase levels in adult humans. *J Clin Invest.* 1992; 89: 480-3.
67. Fajardo O, Naim HY, Lacey SW. The polymorphic expression of lactase in adults is regulated at the messenger RNA level. *Gastroenterology* 1994; 106: 1233-41.
68. Robayo-Torres C and Buford N. Molecular differentiation of congenital lactase deficiency from adult-type hypolactasia. *Nutr Rev.* 2007; 65: 95-8.
69. Kuokkanen M, Enattah NS, Oksanen A, Savilahti E, Orpana A, Jarvela I. Transcriptional regulation of the lactase-phlorizin hydrolase gene by polymorphisms associated with adult-type hypolactasia. *Gut.* 2003; 52(5): 647-52.
70. Sahi T. The inheritance of selective adult-type lactose malabsorption. *Scand J Gastroenterol.* 1974; 9: 1-73.
71. Lloyd M, Mevissen G, Fischer M, Olsen W, Goodspeed D, Genini M, et al. Regulation of intestinal lactase in adult hypolactasia. *J Clin Invest.* 1992; 89: 524-29.
72. Wang Y, Harvey CB, Pratt WS, Sams VR, Sarnar M, Rossi M, et al. The lactase persistence/non-persistence polymorphism is controlled by a *cis*-acting element. *Hum Mol Genet.* 1995; 4: 657-62.
73. Keller P, Zwicker E, Mantei N, Semenza G. The levels of lactase and of sucrase-isomaltase along the rabbit small intestine are regulated both at the mRNA level and post-translationally. *FEBS Lett.* 1992; 313: 265-9.
74. Torp N, Rossi M, Troelsen JT, Olsen J, Danielsen EM. Lactase-phlorizin hydrolase and aminopeptidase N are differentially regulated in the small intestine of the pig. *Biochem J.* 1993; 295 (1):177-82.

75. Duluc I, Jost B, Freund JN. Multiple levels of control of the stage- and region-specific expression of rat intestinal lactase. *J Cell Biol.* 1993; 123: 1577-86.
76. Krasinski SD, Estrada G, Yeh KY, Yeh M, Traber PG, Rings EH, *et al.* Transcriptional regulation of intestinal hydrolase biosynthesis during postnatal development in rats. *Am J Physiol.* 1994; 267: G584-94.
77. Sebastio G, Villa M, Sartorio R, Guzzetta V, Poggi V, Auricchio S, *et al.* Control of lactase in human adult-type hypolactasia and in weaning rabbits and rats. *Am J Hum Genet.* 1989; 45: 489-97.
78. Freund JN, Duluc I, Raul F. Lactase expression is controlled differently in the jejunum and ileum during development in rats. *Gastroenterology.* 1991; 100: 388-94.
79. Maiuri L, Rossi M, Raia V, Garipoli V, Hughes LA, Swallow D, *et al.* Mosaic regulation of lactase in human adult-type hypolactasia. *Gastroenterology.* 1994; 107: 54-60.
80. 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: 2333-40.
81. Wang Z, Maravelias C, Sibley E. Lactase gene promoter fragments mediate differential spatial and temporal expression patterns in transgenic mice. *DNA Cell Biol.* 2006; 25: 215-22.
82. Van Wering HM, Bosse T, Musters A, De Jong E, De Jong N, Hogen Esch CE, *et al.* Complex regulation of the lactase-phlorizin hydrolase promoter by GATA-4. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2004; 287(4): G899-909.
83. Troelsen JT, Mehlum A, Olsen J, Spodsberg N, Hansen GH, Prydz H, *et al.* 1 kb of the lactase-phlorizin hydrolase promoter directs post-weaning decline and small intestinal specific expression in transgenic mice. *FEBS Lett.* 1994; 342: 291-6.
84. Rasinpera H, Forsblom C, Enattah NS, Halonen P, Salo K, Victorzon M, *et al.* The C/C-13910 genotype of adult-type hypolactasia is associated with an increased risk of colorectal cancer in the Finnish population. *Gut.* 2005; 54: 643-7.

85. Enattah N, Pekkarinen T, Valimaki MJ, Loyttyneimi E, Jarvela I. Genetically defined adult-type hypolactasia and self-reported lactose intolerance as risk factors of osteoporosis in Finnish postmenopausal women. *Eur J Clin Nutr.* 2005; 59: 1105–11.
86. Enattah NS, Sulkava R, Halonen P, Kontula K, Jarvela I. Genetic variant of lactase-persistence C/T-13910 is associated with bone fractures in very old age. *J Am Geriatr Soc.* 2005; 53: 79–82.
87. Enattah NS, Forsblom C, Rasinpera H, Tuomi T, Groop PH, Jarvela I. The genetic variant of lactase persistence C/T-13910 as a risk factor for type I and II diabete. *Eur J Clin Nutr.* 2004; 58: 1319–22.
88. 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.
89. Troelsen JT, Olsen J, Moller J, Sjostrom H. An upstream polymorphism associated with lactase persistence has increased enhancer activity. *Gastroenterology.* 2003; 125: 1686–94.
90. 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: 3945–53.
91. Hollox EJ, Poulter M, Wang Y, Krause A, Swallow DM. Common polymorphism in a highly variable region upstream of the human lactase gene affects DNA–protein interactions. *Eur J Hum Genet.* 1999; 7: 791–800.
92. Bersaglieri T, Sabeti PC, Patterson N, Vanderploeg T, Schavner SF, Drake JA, *et al.* Genetic signatures of strong recent positive selection at the lactase gene. *Am J Hum Genet.* 2004; 74:1111–20.
93. Sabeti PC, Schavner SF, Fry B, Lohmueller J, Varilly P, Shamovsky O, Palma A, Mikkelsen TS, Altshuler D, Lander ES. Positive natural selection in the human lineage. *Science.* 2006; 312:1614–20.
94. Itan Y, Powell A, Beaumont MA, Burger J, Thomas MG. The origins of lactase persistence in Europe. *PLoS Comput Biol.* 2009; 5(8): e1000491.
95. Borinskaia SA, Rebrikova DV, Nefedova VV, Kofiadi IA, Sokolova MV, Kolchina EV. Molecular diagnosis and frequencies of primary

- hypolactasia in populations of Russia and neighboring countries. *Mol Biol (Mosk)*. 2007; 40(6): 1031-6.
96. Lindan X, Haiming S, Xuelong Z, Jingwei W, Donglin S, Feng C *et al*. The -22018A allele matches the lactase persistence phenotype in northern Chinese populations. *Scand J Gastroenterol*. 2010; 45 (2): 168-74.
97. Mattar R, Monteiro MS, Villares CA, Santos AF, Silva JMK, Carrilho FJ. Frequency of LCT -13910C>T single nucleotide polymorphism associated with adult-type hypolactasia/lactase persistence among Brazilians of different ethnic groups. *Nutr J*. 2009; 8: 46.
98. Bernardes-Silva CF, Pereira AC, de Fatima Alves da Mota, Krieger JE, Laudanna AA. Lactase persistence/non-persistence variants, C/T-13910 and G/A-22018, as a diagnostic tool for lactose intolerance in IBS patients. *Clin Chim Acta* 2007; 386: 7-11.
99. Poulter M, Hollox E, Harvey CB, Mulcare C, Peuhkuri K, Kajander K, *et al*. 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.
100. Di Stefano M, Missanelli A, Miceli E, Strocchi A, Corazza GR. Hydrogen breath test in the diagnosis of lactose malabsorption: accuracy of new versus conventional criteria. *J Lab Clin Med*. 2004; 144: 313-8.
101. Nagy D, Bogacsi-Szabo E, Varkonyi A, Csanyi B, Czibula A, Bede O, *et al*. Prevalence of adult-type hypolactasia as diagnosed with genetic and lactose hydrogen breath tests in Hungarians. *Eur J Clin Nutr*. 2009; 63: 909-12.
102. Kettunen J, Silander K, Saarela O, Amin N, Muller M, Timpson N *et al*. European lactase persistence genotype shows evidence of association with increase in body mass index. *Hum Mol Genet*. 2010; doi:10.1093/hmg/ddp561.
103. Almon R, Alvarez-Leon EE, Engfeldt P, Serra-Majem L, Magnuson A, Nilsson TK. Associations between lactase persistence and the metabolic syndrome in a cross-sectional study in the Canary Islands. *Eur J Nutr*. 2010; 49(3): 141-6.
104. Imtiaz F, Savilahti E, Sarnesto A, Trabzuni D, Al-Kahtani K, Kagevi I, *et al*. The T/G 13915 variant upstream of the lactase gene (LCT) is the

- founder allele of lactase persistence in an urban Saudi population. *J Med Genet.* 2007; 44:e89.
105. Myles S, Bouzekri N, Haverfield E, Cherkaoui M, Dugoujon JM, Ward R. Genetic evidence in support of a shared Eurasian-North African dairying origin. *Hum Genet.* 2005; 117(1): 34-42.
106. Arola H. Diagnosis of hypolactasia and lactose malabsorption. *Scand J Gastroenterol Suppl.* 1994; 202:26-35.
107. Peuhkuri K, Vapaatalo H, Korpela R, Teuri U. Lactose intolerance— a confusing clinical diagnosis. *Am J Clin Nutr.* 2000; 71: 600–2.
108. Aragón JJ, Cañada FJ, Fernández-Mayoralas A, López R, Martín-Lomas M, Villanueva D. A direct enzymatic synthesis of D Galactopyranoyl-D-xylopyranoside and their use to evaluate rat intestinal lactase activity in vivo. *Carbohydrate Research.* 1996; 290: 209-16.
109. Hermida C, Corrales G, Martínez-Costa OH, Fernández-Mayoralas A, Aragón JJ. Noninvasive Evaluation of Intestinal Lactase with 4-Galactosylxylose: Comparison with 3- and 2-Galactosylxylose and Optimization of the Method in Rats. *Clin. Chem.* 2006; 52: 270-7.
110. Büning C, Genschel J, Jurga J, Fiedler T, Voderholzer W, Fiedler EM, *et al.* Introducing Genetic Testing for Adult-Type Hypolactasia. *Digestion.* 2005; 71:245-50.
111. Büning C, Jurga J, Fiedler T, Kupferling S, Worm M, Weltrich R *et al.* Genetic background of lactose intolerance and implications for diagnosis. *Gastroenterology Suppl.* 2003; 124: A144.
112. Meisel A, Pérez GJ. Geografía física y poblamiento en la Costa Caribe Colombiana. Banco de la República. Centro de Estudios Económicos Regionales. Cartagena. 2006. [Consultado: 3 de septiembre de 2010]. Disponible en: <http://www.banrep.gov.co/documentos/publicaciones/regional/ documentos/ DTSER-73.pdf>.
113. Sánchez F, Núñez J. Geography and Economic Development: A Municipal Approach for Colombia”. *Archivos de Macroeconomía.* Bogotá. 2000. [Consultado: 3 de septiembre de 2010] Disponible en: <http://www.iadb.org/res/laresnetwork /files/pr70finaldraft.pdf>.

114. Curtin P. The Atlantic Slave Trade: a Census. University of Wisconsin press. Madison, WI. 1969: 70-90.
115. Anstey R. Numbers and the Slave Trade. The Journal of African history 1970; 11(3): 457-9.
116. Carvajal-Carmona LG, Soto ID, Pineda N, Ortiz-Barrientos D, Duque C, Ospina-Duque JH, *et al.* "Strong Amerind/Caucasoid Gender Bioa and Evidence of a Sepharadic Contribution among the Founders of a Population in North West Colombia". The American Journal of Human Genetics. 2000; 67: 1287-95.
117. Wang S, Ray N, Rojas W, Parra MV, Bedoya G, Gallo C, *et al.* 2008 Geographic Patterns of Genome Admixture in Latin American Mestizos. PLoS Genet 2008; 4(3): e1000037. doi:10.1371/journal.pgen.1000037.
118. Coelho M, Luiselli D, Bertorelle G, Lopes AI, Seixas S, Stro-Bisol G, *et al.* Microsatellite variation and evolution of human lactase persistence. Hum Genet. 2005; 117: 329–39.
119. Sambrook, J. & Russell, D. Molecular Cloning a Laboratory Manual. 2001.
120. Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. Evol Bioinform Online. 2005; 1: 47-50.
121. Corder GW & Foreman DI. Nonparametric Statistics for Non-Statisticians: A Step-by-Step Approach. New Jersey, Wiley. 2009
122. Altman DG, Bland J.M. Statistics Notes: Diagnostic tests 3: receiver operating characteristic plots. BMJ 1994; 309: 188.
123. Altman DG. Practical statistics for medical research. New York. Chapman and Hall. 1991.
124. American Society for Clinical Nutrition. The acceptability of milk and milks products in populations with a high prevalence of lactose intolerance. Am J Clin Nutr. 1988; 48: 1086-98.
125. Fay JC, Wu C. Hitch-hiking under positive Darwinian selection. Genetics. 2000; 155: 1405-13.

126. Hai-ming S, Yuan-dong Q, Feng C, Li-dan X, Jing B, Song-bin F. The lactase gene -13910T allele cannot predict the lactase-persistence phenotype in north China. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*. 2007; 16 (4): 598-601.
127. Krawczyk M, Wolska M, Schwartz S, Gruenhage F, Terjung B, Portincasa P *et al.* Concordance of genetic and breath tests for lactose intolerance in a tertiary referral centre. *J Gastrointest Liver Dis*. 2008; 17(2): 135-9.
128. Itan Y, Powell A, Beaumont MA, Burger J, Thomas MG. The Origins of Lactase Persistence in Europe. *PLoS Comput Biol*. 2009; 5(8): e1000491. doi:10.1371/journal.pcbi.1000491.
129. Itan Y, Jones BL, Ingram CJE, Swallow DM, Thomas MG. A worldwide correlation of lactase persistence phenotype and genotypes, *BMC Evol Biol*. 2010; 10: 36.
130. Ingram CJE, Mulcare CA, Itan Y, Thomas MG, Swallow DM. Lactose digestion and the evolutionary genetics of lactase persistence. *Hum Genet*. 2009; 124(6): 579-91.
131. Ingram CJE. The evolutionary genetics of lactase persistence in Africa and the Middle East. Ph.D. thesis University of London 2008.