



Universidad de la República Uruguay
Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA)
Área Biología – sub-Área Genética

**Estudio de variantes alélicas asociadas a persistencia de lactasa,
ancestría y consumo de lácteos en población adulta de Uruguay**

Tesis para optar al grado de Magister en Ciencias Biológicas

Autor: Dr. (Vet) Raúl Germán Negro

Orientadora: Dra. Mónica Sans

Tribunal: Prof. Agreg. Dr. Bernardo Bertoni

Prof. Agreg. Dr. Julio da Luz

Prof. Adj. Dr. Gonzalo Figueiro

Agradecimientos

Quisiera empezar por agradecer a quienes integran los distintos órganos de PEDECIBA por la comprensión que mostraron ante las dificultades que fueron surgiendo a lo largo de este trabajo, que no fueron pocas.

Quisiera agradecer especialmente a mi Orientadora, Dra. Mónica Sans, por haberme dado el empujón inicial para embarcarme en este viaje y a haber estado siempre aportando ideas, críticas constructivas y entusiasmo.

Al Dr. Pedro Hidalgo por haber puesto a disposición los recursos del CUT para la realización de este trabajo y particularmente a Lorena Luna, Yasser Vega y Elizabeth Ackermann por su colaboración directa en el envío de materiales e información clave desde Tacuarembó.

Especialmente agradezco los invalorable consejos y orientaciones del Dr. Gonzalo Figueiro, tanto en las tareas de laboratorio como en el procesamiento de las secuencias y manejo de software. Incluyo en este agradecimiento a Patricia Mut y Sara Flores, quienes fueron de gran ayuda en las más diversas actividades de laboratorio, desde las desafiantes hasta las más tediosas.

Al Dr. Bernardo Bertoni por los comentarios enriquecedores que aportó durante la revisión del Proyecto de Tesis y por ser un gran entusiasta del tema que tiene por objeto este trabajo.

A la Dra. Mónica Larrechart y el equipo del Departamento Control Sanitario de Lácteos de MGAP, así como al Dr. Raúl Castro y el equipo del Departamento de Virología de

MGAP, por haberme permitido completar los cursos y la redacción de este trabajo, supliéndome en el desempeño de las tareas laborales cotidianas.

A Ramiro Pérez, Pablo Charbonnier y Cyntia Moreira por su colaboración en la utilización de diversos programas bioinformáticos aplicados a este estudio.

A todos quienes dieron su consentimiento aceptando participar en este trabajo integrando las muestras de Montevideo y Tacuarembó.

Finalmente, quiero agradecer muy especialmente a Victoria y Simón, por haberme acompañado desde el inicio en este trayecto y haber soportado con paciencia mis desazones, frustraciones y ausencias. A ellos, a los amores de mi vida, es que va dedicado este trabajo.

Índice:

| | |
|--|----|
| Resumen..... | 6 |
| Antecedentes..... | 8 |
| 1.1 Aspectos Generales..... | 8 |
| 1.2 Hipolactasia e Intolerancia a la Lactosa..... | 10 |
| 1.3 Variabilidad genética..... | 12 |
| 1.4 Mestizaje y Persistencia de Lactasa en América Latina..... | 19 |
| 1.5 Situación en Uruguay..... | 23 |
| Justificación..... | 24 |
| Objetivos..... | 26 |
| 3.1 Objetivo General..... | 26 |
| 3.2 Objetivos Específicos..... | 26 |
| Materiales y Métodos..... | 27 |
| 4.1 Muestra poblacional..... | 27 |
| 4.2 Muestra dirigida..... | 29 |
| 4.3 Muestra de referencia de Montevideo..... | 30 |
| 4.4 Obtención de la muestra y extracción de ADN..... | 31 |
| 4.5 Identificación de polimorfismos asociados a Lactasa Persistente..... | 32 |
| 4.6 Estimación de ancestría genética por ADNmt..... | 35 |
| 4.7 Estimación de ancestría genética biparental..... | 37 |
| 4.8 Análisis estadístico..... | 39 |
| Resultados..... | 40 |
| 5.1 Población de Tacuarembó..... | 40 |
| 5.1.1 Datos genealógicos, consumo de lácteos y síntomas digestivos..... | 40 |
| 5.1.2 Ancestría por ADNmt..... | 42 |
| 5.1.3 Ancestría por AIMs..... | 45 |
| 5.1.4 SNPs asociados a Persistencia de Lactasa..... | 50 |

| | |
|---|-----|
| 5.2 Muestra dirigida..... | 56 |
| 5.3 Población de referencia de Montevideo..... | 57 |
| 5.4 Fenotipo y consumo de lácteos..... | 61 |
| 5.5 Fenotipo y genotipo C/T-13910..... | 63 |
| 5.6 Genotipo, fenotipo inferido y consumo de leche..... | 66 |
| 5.7 Genotipo y ancestría biparental..... | 68 |
| 5.8 Genotipo y ancestría por ADNmt..... | 70 |
| 5.9 Ancestría biparental según ADNmt..... | 71 |
| Discusión..... | 73 |
| 6.1 Ancestría genética..... | 74 |
| 6.2 Polimorfismos asociados a LP..... | 78 |
| 6.3 Genotipo, fenotipo y consumo de lácteos..... | 81 |
| 6.4 Genotipo y ancestría genética..... | 87 |
| 6.5 Futuras líneas de investigación..... | 89 |
| Conclusiones..... | 92 |
| Bibliografía..... | 94 |
| Anexo 1: Encuesta..... | 105 |

Resumen

La lactasa es una enzima sintetizada en el intestino delgado de prácticamente todos los mamíferos, incluyendo al humano. En éste, se produce una reducción fisiológica de su actividad posterior al destete que afecta aproximadamente a dos tercios de la población mundial, condición denominada hipolactasia tipo adulto (AH). En población europea, así como en diversos pueblos del África y Medio Oriente, varios polimorfismos de un único nucleótido (SNPs) han sido asociados con la persistencia de lactasa (LP), condición caracterizada por el mantenimiento de un nivel suficiente de actividad enzimática para digerir importantes cantidades de lactosa durante toda la vida. La LP es heredada como un carácter mendeliano dominante, pudiendo predecirse la frecuencia de este fenotipo a partir de los genotipos observados en la población. En América, no se han identificado polimorfismos autóctonos asociados a LP, observándose variantes introducidas fundamentalmente por la inmigración europea, como C/T-13910, cuya frecuencia varía dependiendo de la historia demográfica de cada región. La población uruguaya se caracteriza por presentar un mestizaje moderado, con un predominio del aporte europeo, y un modesto aporte nativo americano o africano, en un marco de heterogeneidad biológica y predominio de uniones direccionales entre hombres europeos y mujeres no europeas.

En este trabajo se pretende aportar al conocimiento sobre la presencia de variantes alélicas asociadas a LP en el Uruguay y su relación con la ancestría, los hábitos de consumo de lácteos y la manifestación de trastornos digestivos atribuidos a su ingesta. Para ello, se determinaron los genotipos de los SNPs asociados a LP más frecuentes a nivel mundial, se relevaron datos sobre consumo de leche y síntomas digestivos asociados, y se estimó ancestría biparental y uniparental materna, en una muestra al azar de residentes en el Departamento de Tacuarembó (Noreste) y otra dirigida a presuntos intolerantes a la lactosa (PIL) tanto de Tacuarembó como de Montevideo.

Un 29,4% de la muestra al azar se clasificó como PIL, siendo los síntomas más frecuentes dolor, distensión abdominal y flatulencia. El alelo europeo asociado a LP, T-13910, tuvo una frecuencia de 33% en la muestra al azar, identificándose además otros dos SNPs asociados a LP, el polimorfismo árabe, T/G-13915 y la variante rara, C/T-14011, ambos en muy baja frecuencia. Se encontró asociación entre fenotipo (intolerante - no intolerante) y consumo de leche, entre genotipo C/T-13910 y fenotipo (incluyendo la muestra dirigida a PIL), entre genotipo y consumo de leche, pero no entre genotipo y ancestría. La frecuencia de T-13910 fue similar a la de otras poblaciones sudamericanas con predominio del aporte parental europeo así como a poblaciones de la Península Ibérica. Al igual que en otras poblaciones de la región, no existieron diferencias en ancestría entre quienes portaban este alelo y quiénes no. Las discrepancias registradas entre genotipo y fenotipo esperado podrían explicarse fundamentalmente en que no todo individuo AH presenta síntomas digestivos y a que otras intolerancias a mono, di y oligosacáridos alimentarios pueden resultar en síntomas similares.

Los resultados de este estudio sugieren que el único SNP que podría estar prediciendo el fenotipo en relación a la actividad de lactasa en la población uruguaya, e indirectamente el consumo de leche fresca, es C/T-13910. Para una mejor resolución sería necesario utilizar un diagnóstico más preciso de AH o LP, como el test de hidrógeno expirado. De todos modos, resulta claro que, tanto la percepción de intolerancia a la lactosa como el genotipo, afectaron significativamente los patrones de consumo de leche en la población estudiada.

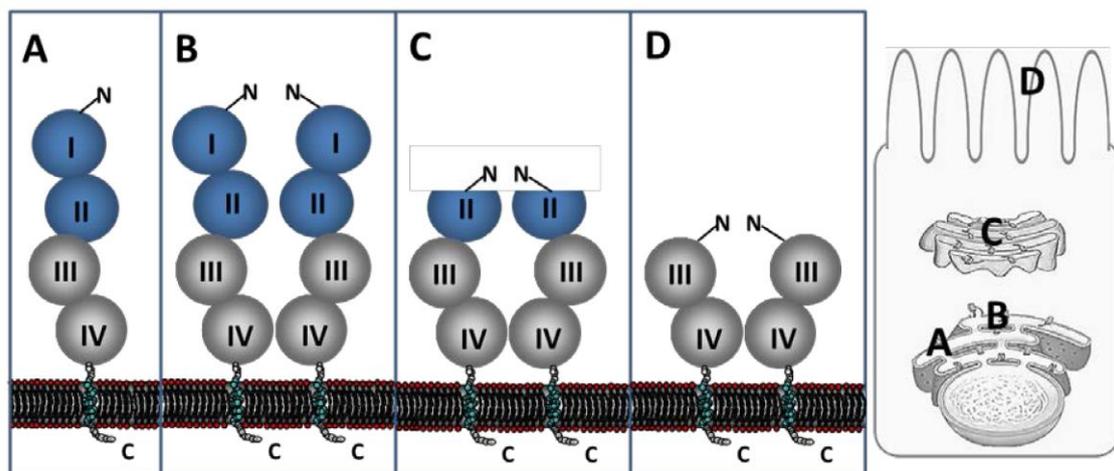
1 Antecedentes

1.1 Aspectos Generales

Los oligosacáridos y disacáridos son componentes esenciales en la dieta de los mamíferos, requiriendo para una adecuada absorción intestinal, que sus enlaces glucosídicos α y β sean hidrolizados por enzimas específicas denominadas disacaridasas. Las tres disacaridasas principales que actúan a nivel del lumen intestinal de los mamíferos son la sucrasa-isomaltasa, la maltasa-glucoamilasa y la lactasa-florizina-hidrolasa (LPH por sus nombre en inglés) permitiendo que los monosacáridos liberados por la hidrólisis de sucrosa, isomaltosa, maltosa y lactosa, atraviesen la membrana de las células del epitelio intestinal (Amiri et al. 2015). La LPH es una glicoproteína localizada en la membrana apical de los enterocitos maduros, a nivel de las microvellosidades del intestino delgado de, virtualmente, todos los mamíferos (Naim et al. 1991). Presenta dos sitios con actividad catalítica en una misma cadena polipeptídica, uno con actividad β -D-galactósido galactohidrolasa, que interviene en la hidrólisis de la lactosa, disacárido principal de la leche y otro con actividad glicosil-*N*-acilesfingosina glucohidrolasa, que hidroliza la florizina, un β -glucósido presente en diversos vegetales (Mantei et al. 1988; Naim et al. 1991; Zecca et al. 1998). La LPH humana es codificada por un gen (*LCT*) de 49340 pares de bases (pb) localizado en el brazo largo del cromosoma 2 (2q21.3), conteniendo 17 exones que codifican un transcrito de ARNm de 6274 pb y una preproteína de 1927 aminoácidos (aa). En ésta se reconocen cuatro regiones altamente conservadas estructural y funcionalmente (Dominios I – IV), que evidencian un elevado porcentaje de identidad entre sí lo que ha permitido sugerir un origen evolutivo a partir de dos eventos sucesivos de duplicación del gen de la β -glucosidasa procariótica (Naim 2001; Amiri et al. 2015).

La LPH es sintetizada como una molécula precursora de cadena única (pro-LPH) que en una etapa inicial presenta un patrón de glicosilación rica en manosa, ensamblándose en homodímeros antes de abandonar el retículo endoplásmico. Durante el transporte por el aparato de Golgi es adicionada con glucósidos complejos para finalmente sufrir un clivaje proteolítico intracelular, antes de ser transportada a la membrana apical (Figura 1). Un segundo clivaje, producido por la tripsina pancreática en el *lumen* intestinal, da lugar a la forma dimérica microvilar madura de LPH, que presenta un dominio C-terminal citosólico de 26 aa, un dominio hidrofóbico transmembrana de 19 aa y un dominio N-terminal extracelular en el que se localizan ambos sitios catalíticos (Naim 2001; Amiri et al. 2015).

Figura 1. Etapas en la maduración de la lactasa-florizín-hidrolasa (LPH)



A, B: Formas monoméricas y homodiméricas de pro-LPH a nivel del retículo endoplásmico. C: LPH β inicial por clivaje durante el transporte por el aparato de Golgi. D: LPH β final clivada por la tripsina pancreática en el *lumen* intestinal. Adaptado de Amiri et al 2015.

Estudios dirigidos a elucidar los mecanismos involucrados en la regulación de la LPH en diversas especies han encontrado un patrón similar en la actividad de esta disacaridasa intestinal, que se caracteriza por alcanzar su máximo en los días previos o posteriores al nacimiento, para luego experimentar una disminución marcada con posterioridad al destete. Corriente arriba del promotor basal de LPH porcino, se ha identificado un elemento *cis* denominado CE-LPH1, al que se unen factores de

transcripción expresados en células epiteliales intestinales diferenciadas de la línea Caco-2, como Cdx-2, capaz de incrementar *in vitro* la transcripción de genes reporteros, y HOXC11, que también es capaz de unirse a este elemento regulador (Troelsen et al. 1997). En efecto, se han identificado otros elementos *cis* con actividad reguladora a nivel del promotor de LPH porcino, CE-LPH2, CE-LPH3 y CE-LPH4, que interactúan con factores de transcripción ubicuos en las células del epitelio intestinal (Cdx-2, HOXC11, FREACs y HNF-1), modulando *in vitro* la transcripción de genes reporteros. Esto sugeriría un papel relevante de estos elementos en la regulación transcripcional de la actividad LPH durante la diferenciación celular, en la variación de su expresión intestinal en sentido cefalocaudal, en su especificidad de tejido y eventualmente, en la declinación post destete de la lactasa (Spodsberg et al 1999). En ratas se han reportado resultados conflictivos en torno a la variación de proteína LPH, actividad de lactasa y ARNm de LPH durante la transición del amamantamiento a la dieta adulta. Mientras que algunos estudios encontraron una limitada variación en la abundancia de ARNm de LPH en un período de importantes cambios en la actividad enzimática de lactasa, sugiriendo que serían mecanismos traduccionales o post traduccionales los que tendrían mayor relevancia en la regulación de la lactasa durante el desarrollo (Hecht et al. 1997), otros investigadores informaron una elevada correlación entre la concentración de ARNm, proteína y actividad de lactasa a lo largo del desarrollo, concluyendo que la regulación a la baja de la lactasa es mediada primariamente en el nivel transcripcional (Motohashi et al. 1997).

1.2 Hipolactasia e Intolerancia a la Lactosa

En humanos, se estima que alrededor de dos tercios de la población mundial presenta una regulación a la baja en la actividad de lactasa con posterioridad al destete, tal como se ha observado en otros mamíferos terrestres, siendo motivo de debate la naturaleza de los mecanismos involucrados en este proceso. Se ha reportado la correlación exacta entre los niveles de ARNm de LPH y la actividad enzimática

expresada a través del *ratio* sucrasa/lactasa, en muestras de biopsia de duodeno, indicando que el nivel de actividad de lactasa es resultado del nivel de expresión de ARNm de LPH y sugiriendo la regulación a nivel transcripcional de la LPH (Escher et al. 1992; Harvey et al. 1995). A su vez, se ha planteado la existencia de dos mecanismos principales que explicarían la reducción fisiológica de la actividad de lactasa post destete; por un lado, la disminución en la biosíntesis de pro-LPH relacionada con la reducción de la transcripción de ARNm de LPH, y por otro lado, la reducción en la tasa en que la LPH sintetizada es convertida en la forma madura de membrana, constituyendo un mecanismo de regulación post traduccional (Lloyd et al. 1992). En efecto, en adultos con hipolactasia fisiológica se ha descrito una amplia variación fenotípica a nivel de enterocitos, en lo que refiere a presencia de ARNm de LPH, proteína LPH y actividad de lactasa, lo que reflejaría una combinación de diferentes mecanismos de regulación que actuarían no solo sobre la tasa de transcripción, sino también en el procesamiento, transporte, estabilidad y mantenimiento de la actividad enzimática (Maiuri et al. 1994; Rossi et al. 1997; Escoboza et al. 2004).

Los estudios tempranos en humanos consideraban a la persistencia de altos niveles de lactasa en individuos adultos, con la consiguiente capacidad de hidrolizar grandes cantidades de lactosa, como el fenotipo más frecuente, denominándolo lactasa persistente (LP). Sin embargo, pronto se reconocería que la no persistencia de actividad de lactasa con posterioridad al destete, el fenotipo lactasa no persistente o hipolactasia tipo adulto (AH por su nombre en inglés), constituye el rasgo más frecuente a nivel mundial, asociándose usualmente, aunque no siempre, con la manifestación de síntomas de intolerancia a la lactosa (LI por su nombre en inglés) luego del consumo de leche (Swallow 2003). La malabsorción de lactosa a nivel del intestino delgado lleva al pasaje de esta molécula hacia el íleon distal y el colon, donde la microflora bacteriana, fundamentalmente ácido láctica, la fermenta produciendo lactato, hidrógeno, metano, dióxido de carbono y ácidos grasos de cadena corta. Los

síntomas típicos de LI se relacionan con el aumento de la presión intracolónica, el incremento de la motilidad y de la carga osmótica intestinal, manifestándose clínicamente como dolor abdominal, distensión, flatos, borborigmos y diarrea. Menos frecuente es la presentación de náuseas y vómito, mientras que la constipación aparece rara vez, estando asociada fundamentalmente con la producción de metano (Lomer, Parkes & Sanderson 2008). Si bien la malabsorción de lactosa, recién apreciable con una reducción del 50 por ciento en la actividad de lactasa, es condición necesaria para que se produzca LI, diversos factores como la dosis consumida, la expresión residual de lactasa, la ingestión de otros componentes dietarios, el sobrecrecimiento bacteriano en el intestino delgado, la composición del microbioma intestinal y la enfermedad inflamatoria intestinal (IBD por su nombre en inglés), suelen modificar el umbral para que se reporten o experimenten síntomas (Deng et al 2015). A su vez, otros elementos como la manifestación de síntomas sistémicos atribuidos a la lactosa (dolor de cabeza, fatiga, depresión), la pobre correlación entre LI auto reportada y desempeño en ensayos ciegos con placebo, el solapamiento con intolerancias alimentarias a otros oligo, di y monosacáridos, la influencia de algunas condiciones fisiológicas (gestación, híper e hipotiroidismo) y la mejora sintomática por el consumo continuado de lácteos en individuos AH, incluso en afectados por IBD, atribuido a la respuesta metabólica bacteriana, resaltan la complejidad de las relaciones entre sintomatología, fisiología, microbioma y metaboloma (Szilagyi 2015; Szilagyi, Galiatsatos & Xue 2016).

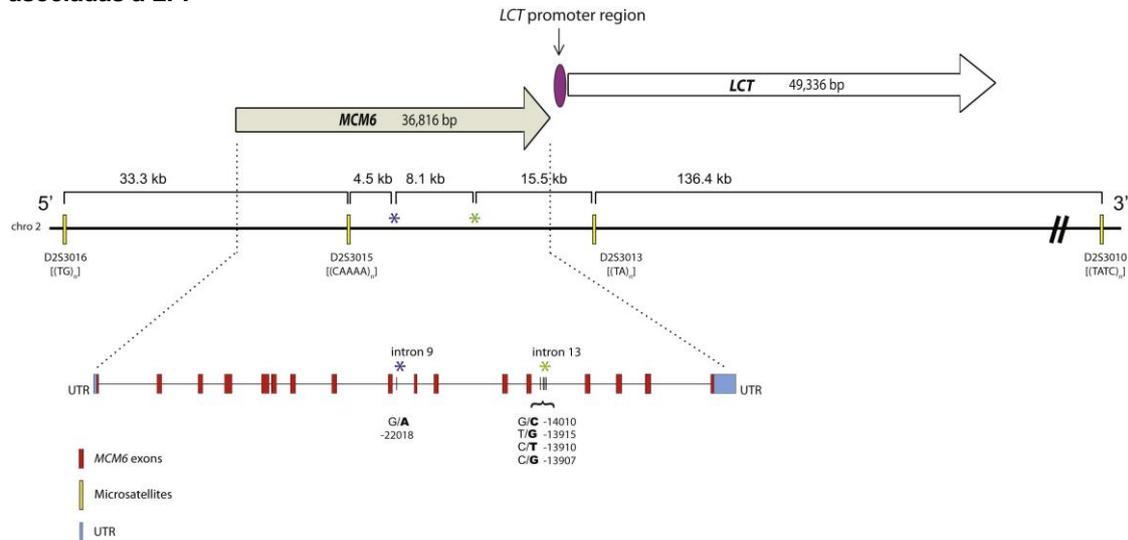
1.3 Variabilidad Genética

Si bien se había postulado que la AH se asocia a la homocigosis de un único gen autosómico, sustentando la hipótesis de que se trata de un rasgo fenotípico de herencia mendeliana recesiva simple (Sahi et al. 1973; Lisker, González & Daltabuit 1975), los análisis de secuencia de la región codificante y del promotor del gen *LCT* no revelaron variantes a nivel de ADN que se correlacionaran con esta condición (Wang

et al. 1995). Sin embargo, en un estudio realizado en nueve familias de Finlandia en el que se utilizó el desequilibrio de ligamiento y análisis de haplotipos, se logró restringir una región de 47 Kilobases (Kb) en la que subsecuentes análisis de asociación permitieron identificar 2 variantes asociadas con AH bioquímica o enzimáticamente confirmada. La transición C/T-13910 (rs4988235), localizada 13910 pb 5' al codón de inicio del gen *LCT* en el intrón 13 del gen del componente 6 del complejo de mantenimiento de mini cromosoma (*MCM6*)(Figura 2), presentó una co-segregación completa con el fenotipo AH, encontrándose que todos los individuos AH resultaron homocigotas CC mientras que los individuos con LP presentaron genotipos heterocigotas CT u homocigotas TT, en forma concordante con la condición autosómica recesiva de la AH previamente postulada (Enattah et al. 2002).

La variante T-13910 aparece con mayor frecuencia en Europa noroccidental, desde donde decrece en una clina hacia el sur y este del continente (Figura 3), evidenciándose una elevada asociación espacial entre la distribución de la tolerancia a la lactosa, predicha a partir de la frecuencia de esta variante, y la información publicada sobre persistencia de lactasa a nivel fenotípico (Ingram et al. 2008). A su vez, estudios *in vitro* han demostrado que la región donde se localiza esta variante tiene función potenciadora de la transcripción del gen *LCT* y presenta sitios de unión funcionales para diversos factores de transcripción importantes para la expresión génica intestinal. Asimismo, se informó que la variante T-13910 aumenta la afinidad de Oct-1 por este elemento de respuesta, incrementando la actividad potenciadora de ésta y sugiriendo su rol en el mantenimiento de la actividad lactásica post destete (Lewinsky et al. 2005).

Figura 2: Mapa en el que se muestra la región genómica en la que se localizan las variantes asociadas a LP.



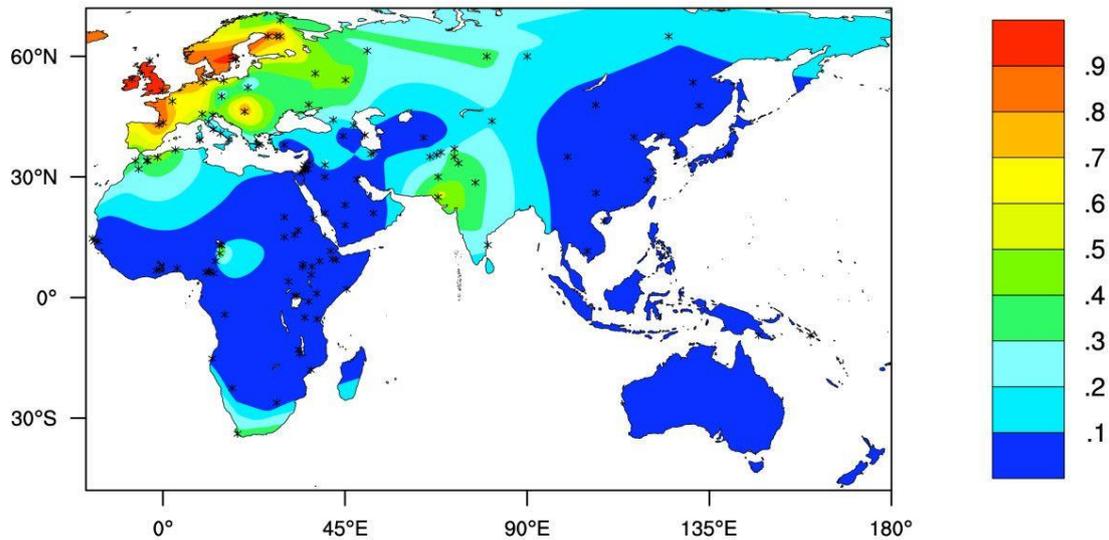
Tomado de Ranciaro et al. 2014.

En un estudio reciente en el que se determinó la expresión de ARNm de lactasa, la actividad enzimática de lactasa y la expresión de factores implicados en su regulación transcripcional (Cdx2, GATA 4/6, HNF1 α y Oct-1), en biopsias duodenales de individuos de 8 a 23 años, no se observaron diferencias significativas en la expresión de estos elementos reguladores entre fenotipos LP y AH. Por otro lado, mediante una aproximación epigenómica no sesgada, complementada con piro secuenciación dirigida, se identificó una posición (cg20242066) a nivel del promotor proximal de *LCT*, que, al igual que la región potenciadora donde se localiza el polimorfismo C/T-13910, presentó niveles de metilación diferenciados en biopsias de individuos AH y LP, estando el patrón de metilación ampliamente impactado por el genotipo y mostrando un mayor poder predictivo de actividad de lactasa y de fenotipo AH o LP, que el genotipado de C/T-13910 (Leseva et al. 2018).

La construcción y análisis de haplotipos de la región donde se ubica el gen *LCT*, flanqueando el polimorfismo C/T-13910, ha permitido sugerir el origen caucásico del alelo T-13910, que habría sido introducido en más de un evento independiente en los

últimos 12000 años, sustentando el concepto de adaptación convergente y aún en curso al consumo de leche en diversas poblaciones (Enattah et al. 2007). En tal sentido, el genotipado de C/T-13910 en ADN obtenido de restos óseos del neolítico europeo, indicaría que partiendo de frecuencias variables pero bajas de genotipos LP, rápidamente se habría llegado a las frecuencias elevadas observadas actualmente en Europa noroccidental y el norte de la Península Ibérica, reflejando la acción de la selección positiva sobre el fenotipo LP (Plantinga et al. 2012; Krüttli et al. 2014). En efecto, la identificación de residuos de grasas lácteas en tuestos arqueológicos, sitúa el inicio del consumo extensivo de leche y productos lácteos en Europa y Cercano Oriente en el entorno de los 8500 años antes del presente (AP) en Turquía, 7900 a 7100 años AP en Europa Central, 6100 años AP en Gran Bretaña y 5000 años AP en Escandinavia, constituyendo un rasgo temprano de la subsistencia Neolítica y sugiriendo que su práctica era común antes de que el fenotipo LP se extendiera en la población (Gerbault et al. 2013; Cramp et al. 2014). Asimismo, la identificación de la proteína láctea β lacto-globulina en cálculos dentales de especímenes datados en al menos 5000 años AP en Europa, constituye una evidencia directa de que el consumo de leche y derivados, obtenidos de animales domésticos, constituía una práctica habitual durante el neolítico en diversas regiones de aquel continente (Warinner et al. 2014). A pesar de que la evidencia a favor de una fuerte selección del alelo T-13910 es abrumadora, tanto la hipótesis de asimilación de calcio como las otras alternativas postuladas: disponibilidad de fluido no contaminado en climas áridos, protección contra la malaria de dietas ricas en lácteos, dispersión asociada a hábitos de consumo de lácteos por una elite o la atenuación del efecto de fluctuaciones en el suministro de alimentos vegetales, entre otras, no son capaces de explicar satisfactoriamente el notable incremento en la frecuencia de este alelo en las diversas regiones de Europa con posterioridad a la adopción de la lechería (Leonardi et al. 2012; Sverrisdóttir et al. 2014).

Figura 3. Frecuencia de fenotipos LP basada en la frecuencia del alelo T-13910 bajo el supuesto de equilibrio de Hardy-Weinberg y dominancia.



Tomado de Itan et al. 2010.

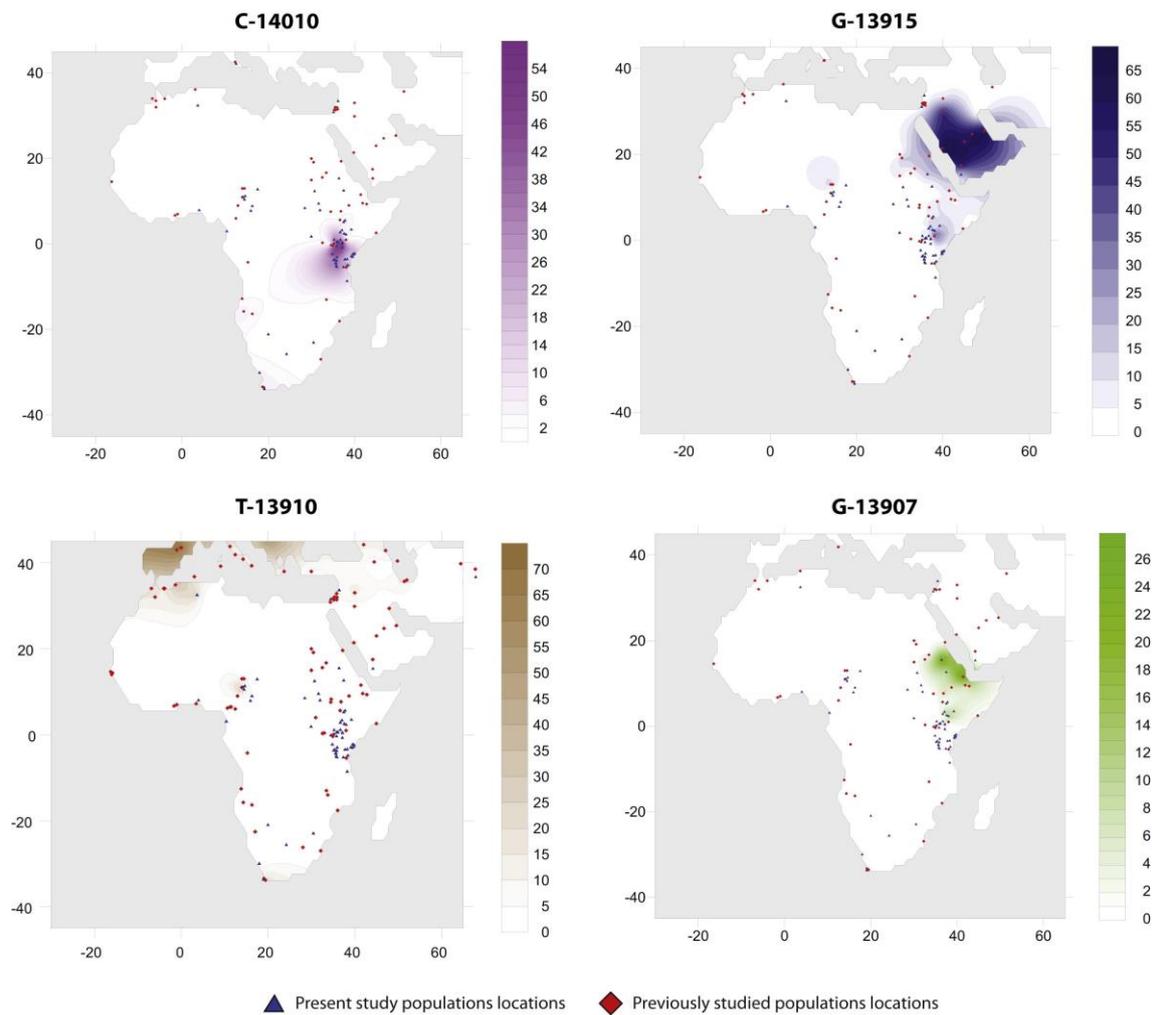
La existencia de poblaciones con una elevada proporción de fenotipos LP pero carentes de la variante T-13910 ha llevado a la búsqueda de nuevos SNP asociados a LP en la región genómica localizada 14 kb antes del inicio del gen *LCT*. En Arabia Saudita, el polimorfismo T/G-13915 (rs41380347) mostró una frecuencia de 57 por ciento, presentando una buena correlación con la frecuencia de fenotipos LP reportada para esa población y un co-ocurrencia completa con una mutación sinónima en el exón 17 del gen *MCM6*: T/C-3712 (ss79088029), localizada 3712 pb 5' al codón de inicio del gen *LCT*. El haplotipo G-13915, C-3712, que afecta la unión de elementos reguladores como Oct-1 y HNF1 α , fue sensiblemente más activo desde el punto de vista transcripcional que el haplotipo T-13915, T3712, estimándose su antigüedad en 4000 años, cuando se habría originado a partir de un haplotipo ancestral completamente diferente al europeo, revelando una muy fuerte presión de selección, y permitiendo sugerir su asociación con un evento independiente de domesticación del camello (Enattah et al. 2008).

En África, el polimorfismo C/T-13910 presentó una distribución limitada a algunas poblaciones pastoriles del norte y centro de África, como los Fulani de Camerún y los Mozabite de Argelia, mientras que la variante T/G-13915 se distribuyó en poblaciones nilo-saharianas y afro-asiáticas de Kenia y Sudán, especulándose que la introducción de estas se produjo por flujo génico desde Europa y la Península Arábiga (Ranciaro et al. 2014; Hassan et al. 2016). A su vez, el polimorfismo G/C-14010 (rs145946881) mostró una fuerte asociación con el fenotipo LP en poblaciones nilo-saharianas de Kenia y afro-asiáticas, nilo-saharianas y niger-kordofanianas de Tanzania, presentando el alelo derivado C-14010 un incremento en la expresión de *LCT in vitro*, en relación al alelo ancestral G-14010. Asimismo, a través de diversas aproximaciones metodológicas se identificaron señales de una fuerte selección positiva reciente del alelo derivado C-14010, aun superior a la observada en europeos noroccidentales para la variante T-13910, estimándose su antigüedad en 7000 a 3000 años, consistentemente con la evidencia arqueológica de diseminación del pastoralismo al sur del Sahara (Tishkoff et al. 2007; Schlebusch et al. 2013; Ranciaro et al. 2014). Por su parte, la variante C/G-13907 (rs41525747) presentó una distribución geográfica restringida al norte y este de África, evidenciándose su máxima frecuencia en la población Beja (afro-asiática) de Sudan del Norte (Figura 4), presentando también un incremento en la expresión *in vitro* de *LCT*, señales de selección positiva reciente y estando estadísticamente asociada con el fenotipo LP (Tishkoff et al. 2007; Ranciaro et al. 2014; Hassan et al. 2016).

En África del Sur, el alelo C-14010 se ha encontrado en frecuencias significativas en poblaciones pastoriles, siendo más elevada en grupos tradicionalmente pastoriles de lengua khoe como los Nama, en los que su frecuencia es de 36 por ciento, en comparación con grupos agro-pastoralistas de lengua bantú o cazadores-recolectores de lengua san. Estos hallazgos apoyan la interpretación de que el pastoralismo en esta región habría sido introducido por la migración de un pequeño grupo de pastoralistas afro-asiáticos, provenientes del este de África, que habrían sido

asimilados por cazadores-recolectores locales San, dando lugar a las poblaciones Khoe actuales, en las que se verifica la selección aun en curso de la variante C-14010, con una intensidad similar a la descrita para poblaciones pastoriles del este africano (Breton et al. 2014; Macholdt et al. 2014).

Figura 4. Distribución de las frecuencias alélicas de 4 variantes asociadas con LP en África y Medio Oriente.



Tomado de Ranciaro et al 2014.

Otras variantes como T/G-14009 (rs869051967), fuertemente asociada con LP en poblaciones de África del Este, C/T-14011 (rs4988233), distribuida en baja frecuencia en diversas regiones de Europa y Asia, G/C-13779 (rs527991977) relativamente común en algunos grupos de la India y T/C-14028, encontrada en muy baja frecuencia

en británicos, han mostrado un claro efecto incremental en la actividad promotora en ensayos de transfección (G-14009, T-14011 y C-13779) y diferencias notorias en la unión a factores de transcripción (G-14009, T-14011 y C-14028) en relación a los alelos ancestrales, evidenciando a su vez diferencias en los factores de transcripción implicados en la interacción con estas variantes (Liebert et al. 2016).

Otras regiones como el oeste africano, centro, sur y este de Asia y este de Europa, han sido señaladas como dianas potenciales para la identificación de nuevas variantes asociadas a LP en el viejo mundo (Itan et al. 2010). El análisis de polimorfismos localizados en una extensión de 70 Kb, comprendiendo la región donde se ubican los SNPs asociados a LP, ha permitido identificar 4 haplotipos distribuidos a nivel mundial con una frecuencia mayor a 5%. De estos, el haplotipo A es el más frecuente, alcanzado su mayor representación en población de Europa del Norte (86%), seguido por el B, cuya frecuencia máxima se observó en papúes (36%), el C, con frecuencias máximas en bantúes de Sudáfrica y pueblos del sur de la India (31%) y el U, común en asiáticos (Japón: 24%), verificándose la mayor variabilidad haplotípica en pueblos subsaharianos, en los que las frecuencias de A y B son las más bajas (Hollox et al. 2001). Sin embargo, recientemente se ha reportado que el haplotipo B, pese a no incluir ninguno de los alelos con importancia en la actividad potenciadora de *LCT*, presenta una región de elevado desequilibrio de ligamiento que se superpone exactamente con la homocigosis haplotípica extendida observada, especulándose que este bloque de no recombinación podría haberse originado a partir de un re-arreglo cromosómico, contribuyendo, por un mecanismo de distorsión de la transmisión, a llevar a los alelos causativos de LP a frecuencias elevadas, relativizando el efecto de la selección sobre estos (Liebert et al. 2017).

1.4 Mestizaje y Persistencia de Lactasa en América Latina

En América Latina, el proceso continuo de mestizaje, iniciado hace poco más de cinco siglos, ha dado forma a las poblaciones actuales en las que, pese a las marcadas

diferencias regionales y sub-regionales, es posible reconocer, a través de diversas aproximaciones genómicas y bioinformáticas, un aporte ancestral europeo, indígena americano y africano, que les confiere un carácter tri-híbrido definido. La antigüedad y magnitud del proceso de mestizaje, así como el origen sub-continental de las poblaciones ancestrales involucradas, revelados mediante la utilización de técnicas genómicas basadas en el genotipado de marcadores individuales de ancestría (AIM por su sigla en inglés), ha contribuido a explorar la estructura de las diversas poblaciones latinoamericanas, ampliando el conocimiento de la historia demográfica de estas y constituyendo un aporte clave para la realización de estudios antropológicos y epidemiológicos dirigidos a elucidar la base genética de rasgos de interés, mediante análisis de *loci* polimórficos y desequilibrio de ligamiento (Wang et al. 2008; Galanter et al. 2012; Salzano & Sans 2014; Homburger et al. 2015).

Considerando las particularidades genéticas de las poblaciones latinoamericanas, diversos estudios se han llevado a cabo en países de Sudamérica para investigar la frecuencia y distribución de variantes alélicas asociadas a LP, en poblaciones caracterizadas por distintos criterios como indígenas americanas, mestizas, europeas o afroamericanas. En Brasil, la variante europea T-13910 aparece en frecuencias que varían dependiendo del agrupamiento étnico, basado en el aspecto fenotípico y la ancestría auto-reportada, siendo de 24 a 33% en eurobrasileños, 65% en poblaciones menonitas de Paraná, 24% en “mulatos”, 12% en “negros” y estando ausente en población brasileñojaponesa (Mattar et al. 2009; Boschmann et al. 2016). También se reportaron diferencias en la frecuencia de esta variante en relación al origen geográfico, 17,5% en Belén (norte), 20,4% en Recife (nordeste) y 29,5% en Porto Alegre (sur) en población de ancestría europea y 18,4% en población de ancestría africana. A su vez, la variante africana C-14010 se identificó en un individuo y otras variantes raras como C-13779, T-14011 y A-13937 (rs4988234), previamente asociadas con LP, también fueron identificadas, en un marco de gran diversidad haplotípica vinculada al origen tri-étnico de la población y a procesos de

recombinación relacionados con el mestizaje (Friedrich, Santos, et al. 2012). En indígenas brasileños, la única mutación asociada a LP identificada fue la variante T-13910, en frecuencias de entre 4,9 y 7,6% en poblaciones con un significativo mestizaje (Guaraní y Kaingang) y de 0,5% en los Xavante, población con una mínima influencia no nativa, especulándose con una introducción por mestizaje en las primeras y una mutación *de novo* o recombinación para explicar su aparición en un individuo Xavante. Se destaca en este estudio la heterogeneidad en la distribución de los haplotipos de *LCT*, siendo A, B, C, E y U los únicos que superan el 5% y resultando llamativa la elevada frecuencia de C (41,2%) notablemente superior a la informada en poblaciones asiáticas con las que se presume comparten el ancestro común más reciente (Friedrich, Callegari-Jacques, et al. 2012).

En Ecuador, la frecuencia de la variante T-13910 varía significativamente entre los diversos grupos étnicos, siendo de 13,7% en mestizos, 8% en afroecuatorianos y 7,4% en indígenas americanos, estando directamente asociada a la proporción europea de cada grupo étnico, en consonancia con la hipótesis de introducción de este polimorfismo como resultado del proceso de mestizaje. Pese a no haberse encontrado diferencias significativas entre el diagnóstico molecular de LP, determinado por la presencia de al menos 1 alelo T-13910 y el diagnóstico fenotípico obtenido por el test de tolerancia a la lactosa (LTT por su sigla en inglés), la presencia, en frecuencias muy bajas, de otros SNP asociadas causativamente a LP, como G-13915 y C-13913 (rs41456145), podría estar sugiriendo que fenotipos LP carentes de la variante europea, podrían ser portadores de otras variantes moleculares asociadas a LP (Paz y Miño et al. 2016).

En población del Caribe colombiano, la frecuencia de la variante T-13910 fue del 10%, reportándose un moderado acuerdo entre la predicción genotípica de LP a partir de ésta y la capacidad de digerir lactosa, determinada mediante el test de hidrógeno expirado (H2BT por su sigla en inglés). En efecto, un 27% de los individuos con genotipo CC-13910, fueron clasificados como digestores de lactosa (LP), sugiriendo

que otros SNP asociados a LP en África podrían explicar esta discrepancia, en una población mestiza con una contribución relevante del África occidental (Mendoza-Torres et al. 2009).

En Chile, la única variante asociada a LP identificada fue T-13910, presentando frecuencias de 17,5, 22 y 22,8% en poblaciones mestizas de la IX región, la IV región y Santiago respectivamente, y frecuencias de 13 y 5% en poblaciones indígenas Rapanui (polinésicos) y Mapuche (americanos) respectivamente, estimándose que su introducción se produjo principalmente por migrantes españoles que arribaron a la región durante y *a posteriori* del proceso de colonización. Al estudiar la relación entre el fenotipo esperado, a partir del genotipado del polimorfismo C/T-13910, y el consumo de leche, solo se encontró asociación estadística significativa entre LP y mayor consumo de leche en Rapanui y Santiago, en un marco general de bajo consumo de leche en todas las poblaciones estudiadas, que no permite establecer si la evitación del consumo es consecuencia del fenotipo AH o hay otros factores biológicos, biosociales y culturales involucrados (Fernández & Flores-Carrasco 2014; Fernández et al. 2016). Utilizando como población modelo a comunidades de criadores de cabra de la región de Coquimbo en Chile, se reportó que el único SNP asociado a LP identificado fue la variante T-13910, con una frecuencia de 22%, apareciendo en un 90% de los casos en un haplotipo europeo A de *LCT* y estando altamente asociada al fenotipo digestor de lactosa, no encontrándose, sin embargo, diferencias significativas entre fenotipos inferidos LP y AH en relación a la proporción de ancestría europea y al consumo de leche y productos lácteos. Llamativamente, la ancestría continental europea estimada para la región *LCT* resultó ser en promedio 3% más elevada que la estimada para todo el genoma, sugiriendo que desde el mestizaje, la selección a favor de la variante europea T-13910 ha continuado su curso en estas poblaciones chilenas dedicadas a la cría de cabras, siendo el índice de masa corporal (BMI por su sigla en inglés) en hombres la única variable que mostró asociación estadística con el *status*

inferido de LP, sugiriendo que aquellos que portan esta variante obtienen mayores beneficios nutricionales (Montalvá et al. 2018).

1.5 Situación en Uruguay

Diversos estudios basados en marcadores de ancestría sugieren que la población de Uruguay presenta un moderado nivel de mestizaje, con un aporte parental predominantemente europeo, variando entre 77 y 84%, siendo más modesto el aporte indígena americano, 10-14% y africano, 6-9%, confirmando el carácter tri-híbrido de la población uruguaya y evidenciando diferencias en el aporte ancestral europeo al considerar el nivel educativo, el *status* socioeconómico y el tipo de prestador de salud (Hidalgo et al. 2005; Bonilla et al. 2015). Asimismo, se ha reportado en Uruguay una importante heterogeneidad biológica intrapoblacional, puesta de manifiesto al comparar el aporte parental europeo, africano e indígena entre Montevideo (92, 7 y 1% respectivamente) y Tacuarembó (65, 15 y 20% respectivamente), lo que indica claramente una mayor influencia africana y amerindia en la población de Tacuarembó, reflejando las diferencias en la evolución demográfica entre la capital del país y la región Noreste (Sans, Salzano, & Chakraborty 1997). Por otra parte, al considerar en conjunto el origen del linaje materno, a través del estudio de polimorfismos en el ADN mitocondrial (ADNmt), y la información aportada por marcadores autosómicos, se ha encontrado que la contribución indígena fue significativamente mayor por el lado materno que a nivel biparental. En efecto, el aporte indígena materno y biparental fue de 62 y 20% respectivamente en Tacuarembó, 32 y 8% respectivamente en Cerro Largo y 20 y 1% respectivamente en Montevideo, sugiriendo un predominio de uniones direccionales entre hombres europeos y mujeres indígenas, coincidentemente con lo reportado para otras poblaciones latinoamericanas (Bonilla et al. 2004; Gascue et al. 2005; Sans et al. 2006). Resultados similares se han reportado para poblaciones afrodescendientes de Uruguay, donde la contribución europea es notablemente mayor al considerar polimorfismos específicos en el cromosoma Y, que al considerar

marcadores autosómicos y marcadores específicos de ADNmt, resultado atribuido a la desproporción de uniones entre hombres europeos y mujeres africanas o indígenas (Bravi et al. 1997, Sans et al. 2002). En efecto, el análisis de marcadores específicos de cromosoma Y confirma un aporte indígena o africano bajo, casi nulo, en el origen de la población masculina de Tacuarembó, en un contexto microevolutivo de expansión demográfica (Bertoni et al. 2005).

Considerando específicamente la situación de Uruguay en relación a la intolerancia a la lactosa, aparece publicado un estudio de absorción de lactosa por H₂BT, en el que participaron 200 uruguayos de 0 a 86 años de edad, encontrándose ausencia de malabsorción en menores de 5 años y un aumento gradual de esta condición hasta llegar a valores de 65% de participantes adultos con malabsorción y 40% con síntomas digestivos de intolerancia. En este mismo estudio se reportaron diferencias significativas en los porcentajes de malabsorción e intolerancia al agrupar a los participantes por “raza”, definida por el aspecto fenotípico, siendo en “blancos” de 63 y 39% respectivamente, mientras que en “negros” se ubicaron en 82 y 55% respectivamente, sugiriendo una relación entre la ancestría y la prevalencia de malabsorción e intolerancia (Maggi et al. 1987). Sin embargo, a pesar de la existencia de estos antecedentes y de los avances alcanzados en el conocimiento de la variabilidad biológica de la población uruguaya, en la bibliografía revisada a la fecha no se han encontrado trabajos publicados referidos a la presencia y distribución en esta población de polimorfismos a nivel de la región reguladora de *LCT* y su eventual asociación con fenotipos LP, ancestría o hábitos de consumo de leche y productos lácteos.

2 Justificación

El hecho de que la variante C/T-13910 esté asociada a LP en forma dominante en europeos, más allá del efecto aditivo observado en su expresión, ha alentado su utilización como variable instrumental del consumo de leche en estudios mendelianos

aleatorizados a gran escala, para inferir su asociación causal con diversas variables de resultado. En este marco se ha informado un efecto causal en el incremento del BMI de 0,60 Kg/m² por porción diaria de leche consumida (Pires-Hartwig & Smith 2018), mientras que no se ha encontrado evidencia clara de asociación genética entre T-13910, consumo de leche y mortalidad por toda causa o causa específica (Bergholdt et al. 2017), riesgo ajustado de fractura de cadera (Bergholdt et al. 2018) o manifestación de acné (Juhl et al. 2018) en población adulta de Dinamarca y otros países del norte de Europa. Por otro lado, se ha establecido la asociación estadística entre AH, inferida a partir del genotipo CC del polimorfismo C/T-13910, y la presentación de distensión abdominal en pacientes previamente diagnosticados con dispepsia funcional (Wortmann et al. 2018). También se ha observado, en pacientes con depresión severa, la asociación entre el incremento significativo en los niveles séricos de homocisteína, acompañado de un descenso en los niveles séricos de ácido fólico, con el genotipo C/T-13910, sugiriendo un vínculo entre los niveles de estos biomarcadores, la malabsorción de lactosa y la depresión (Enko et al. 2018).

Si bien un número creciente de organizaciones ha venido planteando que el consumo de productos lácteos incrementa el riesgo de desarrollar enfermedades crónicas como diabetes tipo I y II, diversos tipos de cáncer o enfermedades cardiovasculares, los estudios de asociación muestran resultados opuestos, sugiriendo que el consumo de estos alimentos constituye un factor de protección para muchas de estas patologías (Thorning et al. 2016). En este contexto, la población de Uruguay presenta un elevado consumo estimado *per cápita* de productos lácteos si se la compara con las estimaciones realizadas en otros países de la región (Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca -Área Estadísticas Agropecuarias [MGAP-DIEA], 2016), por lo que aparentemente el impacto de estas corrientes de opinión no sería significativo. Sin embargo, conocer en qué medida este consumo puede verse afectado por el genotipo, puede constituir un aporte inicial a la hora de evaluar alternativas para una adecuada oferta de leche y productos lácteos reducidos en lactosa. Además, el avance en el

conocimiento de la distribución de variantes asociadas a LP, en una población biológicamente heterogénea como la uruguaya, puede abrir el camino a investigaciones biomédicas tendientes a evaluar eventuales asociaciones de aquellas con condiciones fisiológicas o patológicas de interés, como las mencionadas antes.

3 Objetivos

3.1 Objetivo General

Aportar al conocimiento sobre la presencia de variantes alélicas asociadas a la persistencia de lactasa en el Uruguay y su relación con la ancestría, los hábitos de consumo de lácteos y la manifestación de trastornos digestivos atribuidos a su ingesta.

3.2 Objetivos Específicos

- Relevar los polimorfismos C/G-13907 (rs41525747), C/T-13910 (rs4988235), T/C-13913 (rs41456145), T/G-13915 (rs41380347), T/G-14009 (rs869051967), G/C-14010 (rs145946881) y C/T-14011 (rs4988233), localizados en el intrón 13 del gen *MCM6*, en una muestra tomada al azar y otra dirigida a individuos que atribuyen el no consumo lácteo a trastornos digestivos, estimar frecuencia esperada de genotipos LP y evaluar equilibrio de Hardy-Weinberg.
- Identificar nuevos SNPs en la región potenciadora de *LCT* estudiada y evaluar su potencial asociación a LP.
- Analizar ancestría biparental por marcadores autosómicos y ancestría materna, por polimorfismos en el ADN mitocondrial, tanto en la muestra tomada al azar como en la dirigida.
- Estudiar la eventual asociación entre los SNPs asociados a LP identificados en este estudio, con la ancestría genética, el consumo lácteo y la manifestación de trastornos digestivos atribuidos a este.

- Comparar la frecuencia de SNPs asociados a LP obtenida de la muestra poblacional con resultados de estudios similares realizados en la región y el mundo.

4 Materiales y Métodos

4.1 Muestra poblacional

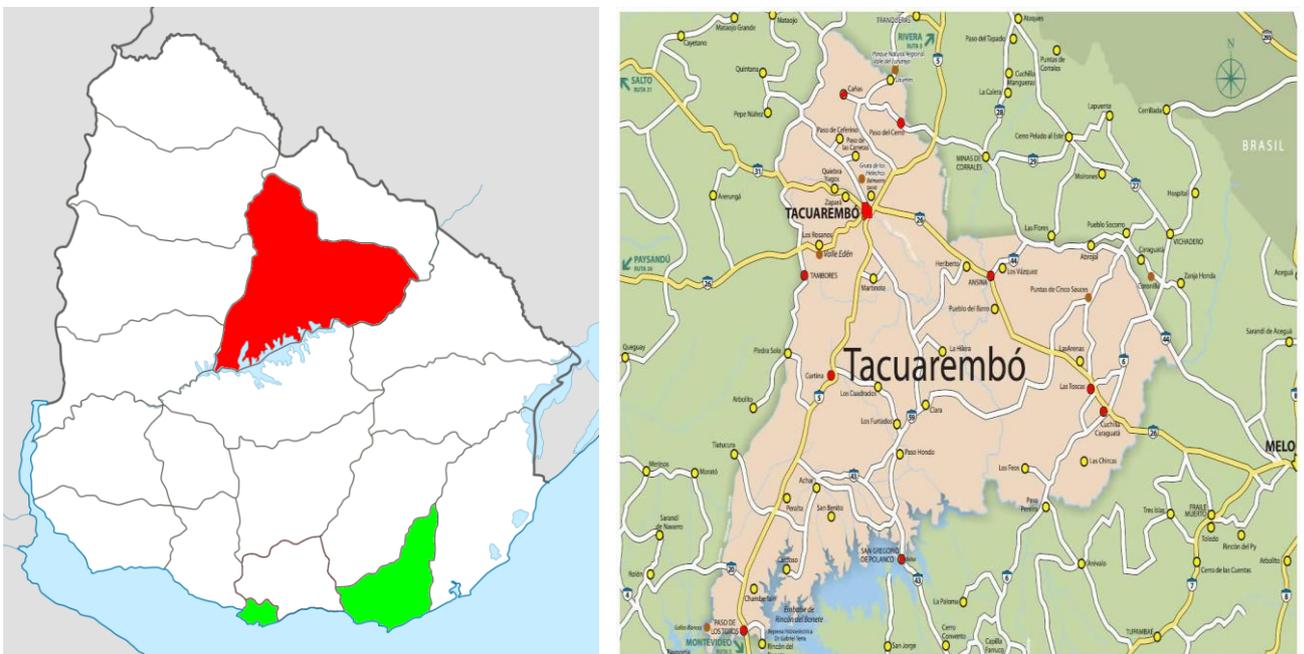
A los efectos de estudiar las variables planteadas en los objetivos, se definió como población de estudio a los habitantes del departamento de Tacuarembó, ubicado en la región Noreste del Uruguay, que cuenta actualmente con una población de 90.053 habitantes, de los que 54.757 viven en su capital, la ciudad de Tacuarembó (Instituto Nacional de Estadísticas de Uruguay [INE], 2011). La elección de esta población se fundamentó en la existencia de diversos estudios que describen su diversidad genética, caracterizada por un aporte indígena de 20%, superior al que se ha comunicado para otras regiones del Uruguay (Sans et al. 1997; Sans et al. 2006; Salzano & Sans 2015). El predominio de uniones direccionales entre hombres europeos y mujeres indígenas es otro rasgo destacable de esta población, manifestándose en la notable diferencia entre el aporte indígena a nivel de ADNmt (62%) y el aporte de entre 2,15 y 8,31% estimado para el cromosoma “Y” (Bonilla et al 2004; Bertoni et al 2005; Mut 2019). Por último, la posibilidad de incluir en este estudio muestras extraídas de población residente en el departamento de Tacuarembó, en el marco del PDU “Diversidad Genética Humana” del Centro Universitario de Tacuarembó (CUT), cortesía del Dr. P. C. Hidalgo, fue fundamental para la conformación de la muestra poblacional.

Los criterios establecidos inicialmente por el PDU de Diversidad Genética Humana para la inclusión de individuos en el estudio fueron los siguientes; que los participantes no tuvieran vínculos de parentesco biológico hasta el segundo grado y que tanto ellos como sus padres hubieran nacido en la región Noreste del país. A éstos se les solicitó

una muestra de saliva, que brindaran su consentimiento informado en base al formato aprobado oportunamente por la Comisión de Ética de la Investigación Científica de la Facultad de Humanidades y Ciencias de la Educación (FHCE) de la Universidad de la República (Expediente N° 121900-000087-14) y que respondieran a un cuestionario que recababa información para la base de datos del PDU.

Gracias a la colaboración del Dr. P. C. Hidalgo, a la encuesta que recababa información relativa al sexo, edad, nivel educativo, lugar de nacimiento, antecedentes familiares de enfermedades y ancestría, tanto de los participantes como de sus padres y abuelos, se le agregaron preguntas específicas relacionadas con el objetivo de este trabajo. En particular se buscó indagar sobre la frecuencia de consumo de leche fluida, consumo de productos derivados de la leche y la manifestación de síntomas digestivos atribuidos por el encuestado al consumo de estos alimentos (Anexo 1).

Figura 5. Mapa político del Uruguay en el que se señalan los departamentos en los que se obtuvieron muestras (izquierda) y mapa de Tacuarembó con localidades (derecha).



Izquierda: en verde los departamentos de Montevideo y Maldonado (muestra dirigida y de referencia) y en rojo el departamento de Tacuarembó (muestra poblacional). Derecha: en rojo se señalan las localidades de origen de los individuos incluidos en la muestra poblacional de Tacuarembó nacidos en este departamento.

Tanto las alícuotas del ADN extraído a partir de las muestras de saliva de 143 individuos, como la información tabulada extraída de las encuestas de 119 participantes fueron gentilmente enviadas desde el CUT para su procesamiento en el marco del presente trabajo.

4.2 Muestra Dirigida

A los efectos de aumentar el número de participantes presuntamente intolerantes a la lactosa, se obtuvieron muestras de saliva de 25 individuos residentes en la ciudad de Montevideo. Para ser incluidos en la muestra, los participantes debieron cumplir los siguientes criterios; haber nacido en Uruguay, no tener vínculos de parentesco hasta el segundo grado, ser mayores de 18 años y presentar al menos un síntoma digestivo asociado por ellos al consumo de leche o derivados lácteos, independientemente de la existencia de antecedentes de consulta médica al respecto. Es importante destacar que ninguno de estos individuos contaba con diagnóstico de AH por ensayo de H2BT o LTT. Al momento de la obtención de la muestra de saliva, todos los participantes brindaron su consentimiento informado y contestaron la misma encuesta que se utilizó por el PDU del CUT.

El ADN de otros 12 individuos incluidos en el grupo de hipertensos de una tesis de maestría (Flores 2019), que contestaron la misma encuesta del PDU y que manifestaron presentar síntomas digestivos asociados al consumo de leche, también fue incluido en la muestra dirigida. Para ser incluidos en el grupo de hipertensos, los participantes debieron cumplir con los siguientes requisitos; no estar emparentados biológicamente hasta el segundo grado, tanto ellos como sus padres y abuelos debieron haber nacido en la región Noreste y debieron tener diagnóstico de hipertensión arterial esencial. Para su inclusión en la muestra dirigida, se asumió que no existe asociación alguna entre la hipertensión arterial esencial y la presentación de síntomas digestivos asociados al consumo de leche y derivados lácteos.

4.3 Muestra de referencia de Montevideo

Con el fin de contar con una muestra poblacional de referencia para poder efectuar comparaciones con la muestra dirigida de residentes en Montevideo, se incluyeron en este estudio 38 muestras de ADN, previamente obtenido de controles y pacientes que participaron de un estudio de casos y controles sobre riesgo de cáncer de mama y ancestría, que se conservaban en el laboratorio de Antropología Biológica de FHCE. Las muestras seleccionadas provienen de residentes en Montevideo (N=28) y de residentes en Maldonado (N=10), siendo la mayor parte obtenidas de controles (N=32) y algunas de casos (N=6), ya que en el estudio referido no se encontraron diferencias significativas en la ancestría genética al comparar casos y controles (Bonilla et al 2015).

Los criterios considerados para la elección de las muestras a incluir fueron: que se tratara de usuarios de instituciones de asistencia médica colectiva (IAMC) privadas y que se contara con información sobre su ancestría genética, tanto a nivel uniparental (ADNmt) como biparental (AIMs). Para esto se tomó en consideración un estudio sobre ancestría genética y estratificación social en el Uruguay, en el que no se encontraron diferencias significativas a nivel estadístico en la ancestría uni y biparental entre residentes nacidas en Montevideo, residentes en Montevideo nacidas en otros departamentos y residentes en otros departamentos del sur del país (Sans et al, no publicado). Sin embargo, en este estudio sí se encontraron diferencias significativas, fundamentalmente en el aporte europeo e indígena, entre usuarias de IAMC y de los centros de atención públicos dependientes de la Administración de los Servicios de Salud del Estado (ASSE).

Considerando que todos los individuos incluidos en la muestra dirigida de Montevideo eran residentes en esta ciudad, que en su mayoría desempeñaban funciones en organismos públicos y que muchos contaban con estudios terciarios, se asume en

este trabajo que todos eran usuarios de IAMC y por ende comparables en ancestría genética con la muestra de referencia seleccionada.

4.4 Obtención de la muestra y extracción de ADN

Para la obtención de las muestras de saliva de los individuos incluidos en la muestra dirigida de Montevideo, se le solicitó a cada participante que salivara un volumen de aproximadamente 1 a 2 mL en tubos estériles para colecta y transporte de muestras microbiológicas “LIBO” (IVV Biomedical Tech, China). Una vez obtenidas las muestras, se mezclaron con el medio de transporte por inversión y se conservaron en refrigeración a $4^{\circ}\text{C} \pm 2$ hasta el momento de su procesamiento.

La extracción de ADN se realizó siguiendo un protocolo adaptado para saliva utilizado en el laboratorio de Antropología Biológica de FHCE que incluye lisis celular con solución de Tris-HCL, EDTA, SDS y proteinasa K, precipitación de proteínas con acetato de amonio, precipitación de ADN con isopropanol, lavado con etanol, secado y elución en agua destilada o buffer Tris-EDTA (Anexo 2). Se midió la concentración de ADN extraído en $\text{ng}/\mu\text{L}$ utilizando un fluorómetro Qubit® (Thermo Fisher Scientific) para luego ser almacenado a -20°C hasta el momento de su procesamiento.

La extracción de ADN a partir de saliva o sangre periférica de los individuos de la muestra poblacional de Tacuarembó fue realizada en el laboratorio de Diversidad Genética Humana del CUT. Para una descripción de los procedimientos utilizados se puede consultar al trabajo de Vega-Requena y colaboradores (Vega-Requena et al. 2019).

A los pacientes hipertensos incluidos en la muestra dirigida se les extrajo ADN a partir de sangre o saliva en los laboratorios de Diversidad Genética Humana del CUT y de Epidemiología Genética de Facultad de Medicina respectivamente, en base a los procedimientos y protocolos descritos por Flores en su tesis de maestría (Flores 2019).

4.5 Identificación de Polimorfismos asociados a Lactasa Persistente

La mayor parte de los polimorfismos asociados a lactasa persistente se localizan en la región potenciadora del gen *LCT*, ubicada en el intrón 13 del gen *MCM6*, comprendidas en una región no mayor a las 150pb, a nivel del brazo largo del cromosoma 2. Por tanto, se procedió a realizar una búsqueda de publicaciones que utilizaran como metodología la amplificación de un segmento en el que estuvieran comprendidos los SNPs mencionados arriba.

De este modo, se amplificó por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR por su sigla en inglés) un fragmento de 359 pb del intrón 13 del gen *MCM6* en el que se encuentran los SNP C/G-13907 (rs41525747), C/T-13910 (rs4988235), T/C-13913 (rs41456145), T/G-13915 (rs41380347), T/G-14009 (rs869051967), G/C-14010 (rs145946881) y C/T-14011 (rs4988233) utilizando los oligómeros descritos por Coelho y colaboradores (Coelho et al. 2009):

Forward (F): 5'- GCAGGGCTCAAAGAACAATC-3'

Reverse (R): 5'-TGTTGCATGTTTTTAATCTTTGG-3'

La mezcla utilizada para la reacción de PCR, para un volumen final de 50µL fue la siguiente:

| | |
|-----------------------------|-------|
| Buffer 10X..... | 5µL |
| MgCl ₂ 50mM..... | 3µL |
| BSA 20mg/mL..... | 0,5µL |
| dNTP 2mM c/u..... | 1,3µL |
| Oligómero F 0,25uM..... | 0,4µL |
| Oligómero R 0,25uM..... | 0,4µL |

Taq Polimerasa.....0,2µL
H₂O.....36,7µL
ADN.....1-2,5µL

La reacción se llevó a cabo utilizando un termociclador marca Labnet, modelo MultiGene TC020-24, estableciéndose las siguientes condiciones de ciclado; desnaturalización inicial a 95°C durante 5 minutos, 35 ciclos incluyendo desnaturalización a 95°C por 30 segundos, hibridación a 52°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 30 segundos, y una etapa final de extensión a 72°C por 4 minutos.

La verificación de la integridad y tamaño (359pb) del producto amplificado se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, durante 30 minutos a voltaje constante (120V), tinción con bromuro de etidio o GoodView™ (SBS Genetech Co., Ltd, China) y visualización en transiluminador con luz ultravioleta.

Debido a dificultades surgidas en el decurso de las actividades de amplificación del fragmento de 359pb, tanto las muestras poblacionales de Tacuarembó como las de hipertensos (dirigidas), se procesaron utilizando nuevos oligómeros. El diseño de estos oligómeros se realizó mediante el programa PRIMER 3PLUS (<https://primer3plus.com/>) buscando reducir el tamaño del fragmento a amplificar sin perder los polimorfismos ya descritos. Dos pares de oligómeros fueron evaluados utilizando el algoritmo Primer-BLAST de la NCBI y la herramienta OligoAnalyzer (Integrated DNA Technologies, IDT). Finalmente, se seleccionaron para su utilización los siguientes oligómeros:

Forward (F): 5'- GGAGAGTTCCTTTGAGGCCA-3'

Reverse (R): 5'-GCATTTGAGTGTAGTTGTTAGACGG-3'

La preparación de la mezcla para la reacción de PCR se realizó para 50µL, de igual forma que con los oligómeros anteriores, utilizándose el mismo termociclador e idénticas condiciones de ciclado, con la excepción de la temperatura de hibridación, que se aumentó a 58°C. La verificación del producto de amplificación, un fragmento de 186pb, se realizó por electroforesis bajo las mismas condiciones descritas arriba.

Una vez obtenido el producto de PCR, se limpió y purificó mediante extracción en fase sólida, utilizando columnas de sílice, lavado con etanol y elución en agua destilada. También se utilizó un protocolo de purificación que incluye el agregado de 2µL de exonucleasa I, 4µL de fosfatasa alcalina, una primera incubación a 37°C por 30 minutos, seguida de un paso de inactivación de ambas enzimas a 85°C por 15 minutos. Una vez purificados, los productos de PCR se enviaron al Servicio de Secuenciación del Instituto Pasteur de Montevideo para su secuenciación. Este proceso se aplicó para los fragmentos obtenidos con los dos juegos de oligómeros descritos arriba y el procesamiento posterior fue el mismo para ambos.

Las secuencias obtenidas se editaron utilizando los programas CHROMAS 2.6.6 (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>) y BioEdit versión 7.2.5 (Hall 1999). Finalmente, para la alineación de las secuencias se utilizó el programa CLUSTALW en MEGA versión 6 (Tamura et al. 2013), utilizando como referencia la secuencia NC_000002.12 de NCBI, que posee las variantes ancestrales de los polimorfismos asociados a LP.

Las frecuencias alélicas de los diversos polimorfismos se obtuvieron por conteo directo de los genotipos resultantes y a partir de estos se evaluó el ajuste al Equilibrio de Hardy-Weinberg para cada uno de ellos, utilizando el programa ARLEQUIN versión 3.5.2.2 (Excoffier & Lischer 2010). A partir de las frecuencias alélicas obtenidas y de las publicadas para otras poblaciones, se calcularon las matrices de distancias D_A y F_{st}

y se construyeron los árboles filogenéticos neighbor joining (NJ) correspondientes, utilizando el programa POPTREE2 (Takezaki, Nei & Tamura 2010).

4.6 Estimación de ancestría genética por ADNmt

Para estimar la ancestría genética uniparental por vía materna se utilizó la técnica de PCR con el objetivo de amplificar un segmento del genoma mitocondrial en el que está comprendida la mayor parte de la Región Hipervariable I (HVR-I por su sigla en inglés). HVR-I se localiza en la región de control del genoma mitocondrial, involucrada en la replicación del ADNmt pero carente de secuencias codificantes, por lo que presenta altas tasas de mutación que originan diversos polimorfismos. Esta peculiaridad, sumada a la ausencia de recombinación y a la herencia exclusiva por vía materna del ADNmt, es utilizada para la construcción de arboles filogenéticos que permiten inferir relaciones genealógicas entre secuencias individuales y clasificarlas en haplogrupos con una distribución geográfica característica (Richards et al 1998, van Oven y Kayser 2008). Los oligómeros utilizados en este trabajo fueron los siguientes:

Forward: 15997F 5'-CAC CAT TAG CAC CCA AAG CT-3' (Sans et al. 2011)

Reverse: 0111R 5'-GCT GAG TGG TTA ATA GGG TGA TAG-3' (Sans et al. 2012)

La mezcla para la reacción de amplificación se preparó de la siguiente manera considerando un volumen final por reacción de 50µL:

| | |
|-----------------------------|-------|
| Buffer 10X..... | 5µL |
| MgCl ₂ 50mM..... | 3µL |
| BSA 20mg/mL..... | 0,5µL |
| dNTP 2mM c/u..... | 1,3µL |
| Oligómero F 0,25uM..... | 0,4µL |

| | |
|-------------------------|---------|
| Oligómero R 0,25uM..... | 0,4µL |
| Taq Polimerasa..... | 0,2µL |
| H ₂ O..... | 36,7µL |
| ADN..... | 1-2,5µL |

La reacción se llevó a cabo utilizando un termociclador marca Labnet, modelo MultiGene TC020-24, estableciéndose las siguientes condiciones de ciclado; desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos, 35 ciclos incluyendo desnaturalización a 94°C por 30 segundos, hibridación a 58°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 40 segundos, y una etapa final de extensión a 72°C por 5 minutos (Sans et al. 2012).

La verificación del producto amplificado se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, durante 45 minutos a voltaje constante (120V), tinción con bromuro de etidio o GoodView™ (SBS Genetech Co., Ltd, China) y visualización en transiluminador con luz ultravioleta. El fragmento obtenido con este juego de oligómeros posee 629pb, extendiéndose el fragmento secuenciado entre las posiciones 15.996 y 00011 del genoma mitocondrial.

Una vez obtenido el producto de PCR, se purificó mediante agregado de 2µL de exonucleasa I, 4µL de fosfatasa alcalina, una primera incubación a 37°C por 30 minutos, seguida de un paso de inactivación de ambas enzimas a 85°C por 15 minutos. Una vez purificados, los productos de PCR se enviaron al Servicio de Secuenciación del Instituto Pasteur de Montevideo para su secuenciación.

Las secuencias obtenidas se editaron utilizando los programas CHROMAS 2.6.6 (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>) y BioEdit versión 7.2.5 (Hall 1999). Finalmente, para la alineación de las secuencias se utilizó el programa CLUSTALW en MEGA versión 6 (Tamura et al. 2013), utilizando como referencia la secuencia de

Cambridge (Anderson et al 1981) en base a la revisión realizada por Andrews y colaboradores (Andrews et al. 1999).

La definición de haplogrupo a partir de la secuencias se realizó en concordancia con los criterios establecidos en el árbol filogenético global del ADNmt humano (Phylotree Build 17)(van Oven 2015) utilizando la Plataforma Foswiki MITOMASTER (Center for Mitochondrial and Epigenomic Medicine, Children's Hospital, Philadelphia) y verificando los resultados con el programa Haplogrep2 (V2.1.13) (Weissensteiner et al. 2016). Finalmente, las frecuencias haplotípicas fueron obtenidas por conteo directo.

La muestra de referencia de Montevideo ya contaba con asignación de haplogrupo de ADNmt. La metodología y criterios utilizados se pueden consultar en el artículo de Bonilla y colaboradores (Bonilla et al. 2015).

4.7 Estimación de ancestría genética biparental

Para estimar la ancestría biparental individual se realizó el genotipado de un panel de 79 AIMs seleccionados del panel utilizado previamente en un estudio sobre mestizaje en América Latina (Galanter et al. 2012). Los AIMs son polimorfismos en el ADN genómico que distinguen, de forma relativamente discreta, a grupos poblacionales continentales y sub continentales, en base a las diferencias en las frecuencias alélicas que estas presentan. Esto permite examinar la contribución de las diversas poblaciones parentales putativas a la conformación de las poblaciones mezcladas estudiadas (Yang et al. 2005).

Para el genotipado de los 79 AIMs se utilizó la plataforma de Sequenom MassArray (iPLEX® Gold, Pro Sample ID Panel, Agena Bioscience) que permite el análisis de variantes puntuales y pequeñas inserciones/deleciones en el ADN genómico. La reacción consiste en la amplificación, mediante PCR Multiplex, de los fragmentos de ADN que contienen las variantes de interés, seguida de una reacción de discriminación alélica por extensión de una única base e identificación de la base

añadida por diferencia de masas, utilizando la espectrometría de masas (MALDI-TOF). La reacción se realiza en placas de 384 pocillos, siendo un robot el encargado de transferir el producto a la superficie del Spectrochip, para su lectura en el espectrómetro de masa, permitiendo identificar hasta 30 SNP por ensayo.

Estos ensayos se realizaron en el Centro Nacional de Genotipado del Instituto de Salud Carlos III (CeGen-ISCIII) de la Universidad de Santiago de Compostela, España. Para su envío, las muestras se cargaron en una placa especialmente diseñada para ajustarse al formato del secuenciador, se evaporaron *ex profeso*, sellándose *a posteriori* con film adhesivo. Todas las muestras enviadas fueron previamente purificadas por pasaje en columnas de sílice y tuvieron una concentración de ADN de 10 a 20ng/ μ L previo a su evaporación.

El procesamiento de las frecuencias genotípicas obtenidas para los 79 AIMs en los individuos de la muestra de Uruguay, conjuntamente con las frecuencias de los individuos incluidos en las poblaciones parentales europea (España, Italia, CEPH-residentes de Utah con ancestría europea), africana (Luhya, Yoruba) e indígena americana (Quechua, Tepehuanos, Zapoteca, Maya, Naymara y Nahua), se realizó utilizando el programa STRUCTURE 2.3 (Pritchard, Stephens & Donnelly 2000). Las frecuencias genotípicas de las poblaciones parentales se tomaron del Proyecto 1000 Genomas (<http://www.internationalgenome.org/data>), a excepción de las poblaciones indígenas americanas, y algunos individuos de España, que fueron cedidas por la Dra. Raquel Cruz, proviniendo de la base de datos de la Universidad de Compostela.

La muestra de referencia de Montevideo ya poseía información de ancestría individual europea, indígena y africana, obtenida a partir del genotipado de 160 AIMs y procesada mediante el Programa STRUCTURE, ajustando en 3 el número de parentales (K=3), dado el carácter trihíbrido de la contribución parental a la población uruguaya (Bonilla et al 2015).

4.8 Análisis estadístico

La comparación de las frecuencias de haplogrupos de ADNmt entre presuntos intolerantes a la lactosa de la población de Tacuarembó y el resto de esta población se realizó utilizando las pruebas de Chi Cuadrado (X^2) y V de Cramer. Estas mismas pruebas se utilizaron para comparar la frecuencia de haplogrupos de ADNmt entre los individuos con genotipos asociados a lactasa persistente (asumiendo dominancia de las variantes derivadas) y los asociados a AH, tanto para la población de Tacuarembó como para la de Montevideo (incluyendo la muestra de referencia). De igual forma se procedió para evaluar la asociación entre fenotipo, genotipo, consumo de leche y consumo de derivados lácteos.

Para comparar el aporte biparental europeo, indígena americano y africano, entre presuntos intolerantes y genotipos asociados a LP), con el resto de la población de Tacuarembó se utilizó la prueba no paramétrica de suma de rangos de Mann-Whitney para muestras independientes. De igual modo se procedió para comparar el grupo de genotipos asociados a LP con el resto de la población de Montevideo.

Finalmente, para evaluar la asociación entre genotipo LP o HA y el fenotipo no intolerante a la lactosa (NIL) o presunto intolerante a lactosa (PIL) se usaron las pruebas de Chi Cuadrado y Odds Ratio. Para analizar la concordancia en la clasificación de los individuos por fenotipo observado y genotipo C/T-13910 se utilizó el Índice Kappa no ponderado de Cohen. La clasificación fenotípica se basó en la encuesta, asumiendo a quienes declaraban presentar al menos 1 síntoma asociado al consumo de leche o derivados lácteos como PIL y al resto como NIL, independientemente de la frecuencia en el consumo de estos alimentos.

Para el procesamiento analítico de estos datos se utilizó el programa Stata® (Stata Corp. LLC) en su versión 14.

5 Resultados

5.1 Población de Tacuarembó

5.1.1 *Datos genealógicos, consumo de lácteos y síntomas digestivos*

Se procesaron finalmente 119 encuestas de residentes en el departamento de Tacuarembó, de los que 96 nacieron en este departamento, 6 nacieron en departamentos limítrofes de la región Noreste (Rivera y Cerro Largo), 10 nacieron en otros 4 departamentos y en los 7 restantes no se registró el lugar de nacimiento. Las madres de 92 individuos nacieron en Tacuarembó mientras que los padres de 77 participantes también nacieron en este departamento, siendo 75 los individuos cuyos 2 progenitores nacieron en el departamento de Tacuarembó. En la Tabla 1 se resume la información relacionada con el origen de los participantes y sus progenitores.

Tabla 1. Lugar de nacimiento de los participantes y sus progenitores incluidos en la muestra poblacional de Tacuarembó.

| Nacim. Participantes | N | Nacim. Padres | N | Nacim. Madres | N |
|-----------------------------|------------|----------------------|------------|----------------------|------------|
| Tacuarembó | 76 | Tacuarembó | 57 | Tacuarembó | 63 |
| Ciudad | | Ciudad | | Ciudad | |
| Tacuarembó | 19 | Tacuarembó | 20 | Tacuarembó | 29 |
| Depto. | | Depto. | | Depto. | |
| Rivera | 5 | Rivera | 4 | Rivera | 5 |
| Montevideo | 5 | Montevideo | 3 | Paysandú | 2 |
| Cerro Largo | 2 | Paysandú | 2 | Flores | 2 |
| Paysandú | 2 | Durazno | 2 | Rio Negro | 1 |
| Flores | 2 | Flores | 1 | Durazno | 1 |
| Artigas | 1 | Salto | 1 | Salto | 1 |
| Sin Datos | 7 | Rio Negro | 1 | Sin Datos | 15 |
| | | Treinta y Tres | 1 | | |
| | | Argentina | 1 | | |
| | | Brasil | 1 | | |
| | | Sin datos | 25 | | |
| Total | 119 | Total | 119 | Total | 119 |

N: número de individuos.

Respecto al consumo de leche, un 45% (N=54) declaró consumir leche diariamente, un 13% (N=16) manifestó consumir semanalmente este producto, mientras que un 39% (N=46) informó no consumir nunca o consumir raramente leche. En relación al consumo de derivados lácteos como quesos, yogures y postres lácteos, un 28% de los

participantes (N=33) reportó una frecuencia diaria, siendo consumidos semanalmente por un 34% (N=40). A su vez, un 32,5% (N=38) declaró consumir raramente derivados lácteos y tan solo un 2,6% (N=3) respondió no consumir nunca estos productos. Si bien en el cuestionario se desglosaba la frecuencia dentro de las categorías diaria, semanal y mensual, debido a que no en todas las encuestas se logró capturar esta información y a los efectos de simplificar el procesamiento de los datos, se optó por manejar únicamente estas categorías de frecuencia de consumo. En la Tabla 2 se presentan los datos relativos a frecuencia de consumo de leche y derivados lácteos.

Un 29,4% (N=35) de los encuestados declaró presentar síntomas digestivos asociados al consumo de leche o derivados lácteos, mientras que el 70,6% restante (N=84) no manifestó presentar tales síntomas, siendo 22 los individuos que reportaron consumir raramente o nunca leche, sin que esto fuera asociado por ellos a problemas digestivos. Los síntomas digestivos más frecuentemente asociados al consumo de leche fueron; dolor abdominal (45,7%), distensión abdominal (37,1%) y flatulencia (28,6%), mientras que náuseas y/o vómitos resultaron los síntomas reportados con menor frecuencia (11,4%). Asimismo, en el cuestionario se indagaba sobre otros síntomas digestivos no comprendidos en las categorías establecidas, siendo 7 (20%) los individuos que indicaron presentar síntomas variados, yendo desde acidez y reflujo hasta problemas intestinales no especificados. Solo un participante declaró presentar síntomas no relacionados con el sistema digestivo, asociando el consumo de leche a la manifestación de baja presión.

Finalmente, un 51,4% de los presuntos intolerantes a la lactosa declaró presentar un único síntoma asociado al consumo de leche, un 25,7% manifestó presentar 2 síntomas digestivos, mientras que el restante 22,9% indicó que experimentaba 3 o más síntomas al consumir leche (ver Tabla 3).

Tabla 2. Frecuencias de consumo de leche y derivados lácteos correspondiente a la muestra poblacional de Tacuarembó.

| Frecuencia Consumo | Leche Nº Indiv. (%) | Derivados Nº Indiv. (%) |
|---------------------------|----------------------------|--------------------------------|
| Diaria | 54 (45,4) | 33 (28,2) |
| Semanal | 16 (13,4) | 40 (34,2) |
| Mensual | 3 (2,5) | 3 (2,6) |
| Raramente | 23 (19,3) | 38 (32,5) |
| Nunca | 23 (19,3) | 3 (2,6) |
| Total | 119 (100) | 117 (100) |

Tabla 3. Frecuencias declaradas de síntomas digestivos asociados al consumo de leche y cantidad de síntomas experimentados por individuo, entre aquellos que reportaron síntomas compatibles con Intolerancia a la Lactosa en la muestra poblacional de Tacuarembó.

| Síntomas | N (%) | Nº Síntomas/Individuo | N (%) |
|----------------------|--------------|------------------------------|-----------------|
| Dolor Abdominal | 16 (45,7) | 1 | 18 (51,4) |
| Distensión Abdominal | 13 (37,1) | 2 | 9 (25,7) |
| Flatos | 10 (28,6) | 3 | 4 (11,4) |
| Diarrea | 7 (20,0) | 4 | 3 (8,6) |
| Nausea/Vómito | 4 (11,4) | 5 | 1 (2,9) |
| Constipación | 8 (22,9) | 6 | 0 (0,0) |
| Otros | 7 (20,0) | 7 | 0 (0,0) |
| | | Total | 35 (100) |

5.1.2 Ancestría por ADNmt

La ancestría materna a partir de marcadores de ADNmt se logró determinar en 102 individuos de la muestra poblacional de Tacuarembó, a los que se les asignó un haplogrupo en base a los criterios establecidos en Phylotree 2017 (van Oven 2015). De estos, 48% (N=49) se clasificaron dentro de los cuatro haplogrupos fundadores

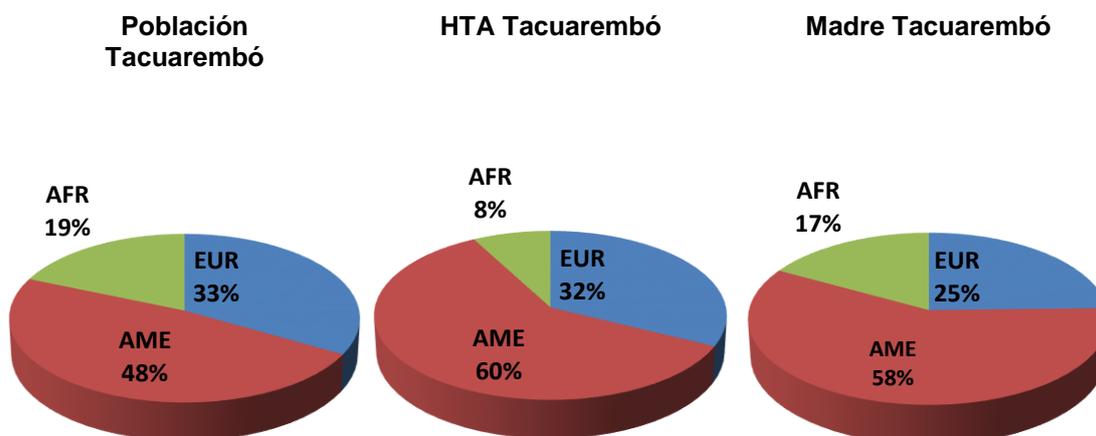
indígena americanos (A, B, C, D), 33,3% (N=34) se asignaron a haplogrupos europeos y 18,6% (N=19) fueron catalogados como haplogrupos africanos. En la Tabla 4 se resumen los resultados obtenidos a partir del análisis de los marcadores de ADNmt.

Tabla 4. Frecuencia de haplogrupos de ADNmt correspondiente a la muestra poblacional de Tacuarembó, agrupados por origen continental.

| ORIGEN CONTINENTAL | HAPLOGRUPO ADNMT | FRECUENCIA (%) |
|--------------------|------------------|------------------|
| AMÉRICA | A | 10 (9,8) |
| | B | 14 (13,7) |
| | C | 16 (15,7) |
| | D | 9 (8,8) |
| | TOTAL | 49 (48,0) |
| EUROPA | H | 15 (14,7) |
| | HV0 | 3 (2,9) |
| | J | 2 (2) |
| | K | 1 (1) |
| | M | 1 (1) |
| | N | 1 (1) |
| | T | 2 (2) |
| | U5 | 4 (4) |
| | U6 | 4 (4) |
| | W | 1 (1) |
| | TOTAL | 34 (33,3) |
| ASIA | L0 | 4 (4) |
| | L1 | 3 (2,9) |
| | L2 | 5 (4,9) |
| | L3 | 7 (6,9) |
| | TOTAL | 19 (18,7) |

Con el fin de evaluar la posible inclusión de los hipertensos de Tacuarembó que integran la muestra dirigida, dentro de la muestra poblacional de Tacuarembó, para el análisis de asociación entre ancestría determinada por ADNmt y genotipo C/T-13910, se realizó la prueba Chi cuadrado comparando el número de haplotipos asignados a haplogrupos europeos, africanos e indígenas en ambas muestras. En la muestra de hipertensos, la proporción de haplogrupos indígenas resultó mayor que la observada en la muestra poblacional (60%), mientras que esta última presentó una mayor proporción de haplogrupos africanos, siendo similar la proporción de haplogrupos europeos en ambas muestras (ver Figura 6). Esto se vio reflejado en el resultado de la prueba, que arrojó un valor de p de 0,055, apenas por encima del umbral de significación estadística.

Figura 6. Proporciones de ancestría genética materna según origen continental.



Muestra poblacional de Tacuarembó (izquierda), muestra de hipertensos de Tacuarembó (centro) y sub muestra poblacional de individuos con madres nacidas en Tacuarembó (derecha). EUR: europeo, AFR: africano, AME: indígena americano.

Teniendo en cuenta que la tendencia observada al comparar ambas muestras podría estar asociada a los diferentes criterios utilizados para la inclusión de los individuos en cada una, en relación al lugar de nacimiento de ellos y sus progenitores, se realizó una nueva comparación a partir de una sub muestra de la población de Tacuarembó. Esta se integró únicamente por individuos cuyas madres hubieran nacido en el departamento de Tacuarembó, en concordancia con los requisitos establecidos por Flores para la inclusión de pacientes con hipertensión arterial en su estudio (Flores 2019). Al comparar la submuestra poblacional con la muestra de hipertensos, las proporciones de haplogrupos indígena americanos fueron similares, manteniéndose la tendencia de un mayor aporte africano en la sub muestra de la población de Tacuarembó, en relación a la de hipertensos. Como era de esperar, la prueba de Chi cuadrado mostró un valor de p más elevado ($p=0,16$) dando cuenta de la mayor similitud entre ambas muestras. En la Tabla 5 se resumen los resultados de las dos pruebas comparativas.

Tabla 5. Comparación de la ancestría genética materna según origen continental.

| Origen ADNmt | Pobl. Tbó N (%) | HTA Tbó N (%) | Valor χ^2 | gl | p |
|---------------------|----------------------------|--------------------------|----------------------------------|-----------|----------|
| Euro | 34 (33,3) | 33 (32,4) | | | |
| I. Amer. | 49 (48) | 61 (59,8) | 5,81 | 2 | 0,055 |
| Afro | 19 (18,7) | 8 (7,8) | | | |

| Origen ADNmt | Madre Tbó N (%) | HTA Tbó N (%) | Valor χ^2 | gl | p |
|---------------------|----------------------------|--------------------------|----------------------------------|-----------|----------|
| Euro | 16 (24,6) | 33 (32,4) | | | |
| I. Amer. | 38 (58,5) | 61 (59,8) | 3,7 | 2 | 0,16 |
| Afro | 11 (16,9) | 8 (7,8) | | | |

Parte superior de la tabla: comparación entre la muestra poblacional y la muestra de hipertensos de Tacuarembó. Parte inferior de la tabla: comparación entre la submuestra de madres nacidas en Tacuarembó e hipertensos de ese departamento.

Finalmente, para evaluar asociación entre genotipo y ancestría por ADNmt se optó por utilizar la muestra poblacional de Tacuarembó completa, incluyendo además los hipertensos presuntamente intolerantes de Tacuarembó. Esta decisión se tomó considerando que las diferencias en las frecuencias de haplogrupos observadas al comparar la muestra poblacional con la de hipertensos de Tacuarembó no resultaron significativas, más allá de la tendencia registrada, y a que el número de individuos incluidos en esta comparación era mayor.

5.1.3 Ancestría por AIMs

Se obtuvieron los genotipos de los AIMs referidos en materiales y métodos para un subconjunto de 69 individuos incluidos en la muestra poblacional de Tacuarembó. A partir de estos, se calculó el aporte biparental proporcional a cada individuo, fijando el número de poblaciones parentales putativas en 3, en concordancia con el origen trihíbrido de la población uruguaya. En suma, los parámetros de la corrida fueron los siguientes: 637 individuos, 79 *loci*, 3 poblaciones parentales ($K=3$), período burn-in fijado en 100.000 y 10.000 repeticiones. Los parámetros de los resultados obtenidos

reflejan un buen ajuste del modelo a los datos analizados y se resumen a continuación en la Tabla 6.

Tabla 6 Principales parámetros de los resultados obtenidos con STRUCTURE para un supuesto de 3 poblaciones parentales (K=3).

| PARÁMETRO | VALOR OBTENIDO |
|---|-----------------------|
| Div. alélica entre poblaciones 1 y 2 | 0,3905 |
| Div. alélica entre poblaciones 1 y 3 | 0,3210 |
| Div. alélica entre poblaciones 2 y 3 | 0,3210 |
| Distancia promedio entre individuos clúster 1 | 0.1645 |
| Distancia promedio entre individuos clúster 2 | 0.1420 |
| Distancia promedio entre individuos clúster 3 | 0.3290 |
| Ln estimado de probabilidad de los datos | -43538,9 |
| Valor medio del Ln de verosimilitud | -43251.8 |
| Varianza del Ln de verosimilitud | 574 |
| Valor medio de alfa | 0,0452 |
| Valor medio de Fst_1 | 0.5243 |
| Valor medio de Fst_2 | 0,5388 |
| Valor medio de Fst_3 | 0.3269 |

Poblaciones/clústeres 1: europeos, 2: indígenas americanos, 3: africanos. Período burn-in: 100.000, repeticiones:10.000.

En promedio, el aporte europeo a la muestra poblacional de Tacuarembó resultó predominante, con un 80,4%, seguido del aporte indígena americano, con un 12,7%, mientras que la contribución africana se ubicó en el 6,9%. Se evidenció asimismo una importante variación entre los individuos, oscilando el aporte europeo entre 0,7 y 99,2%, el indígena entre 0,3 y 44,6% y el africano entre 0,1 y 57,1%. En la Figura 7 se presentan los resultados de estimación de ancestría por AIMs.

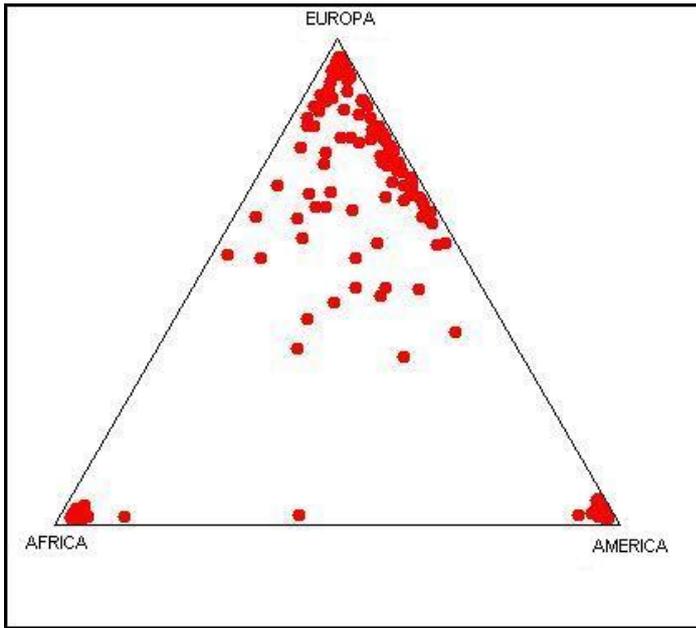
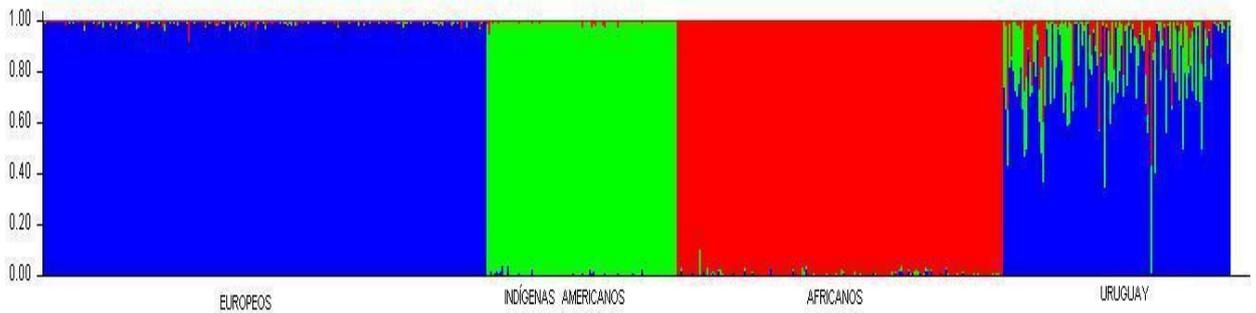
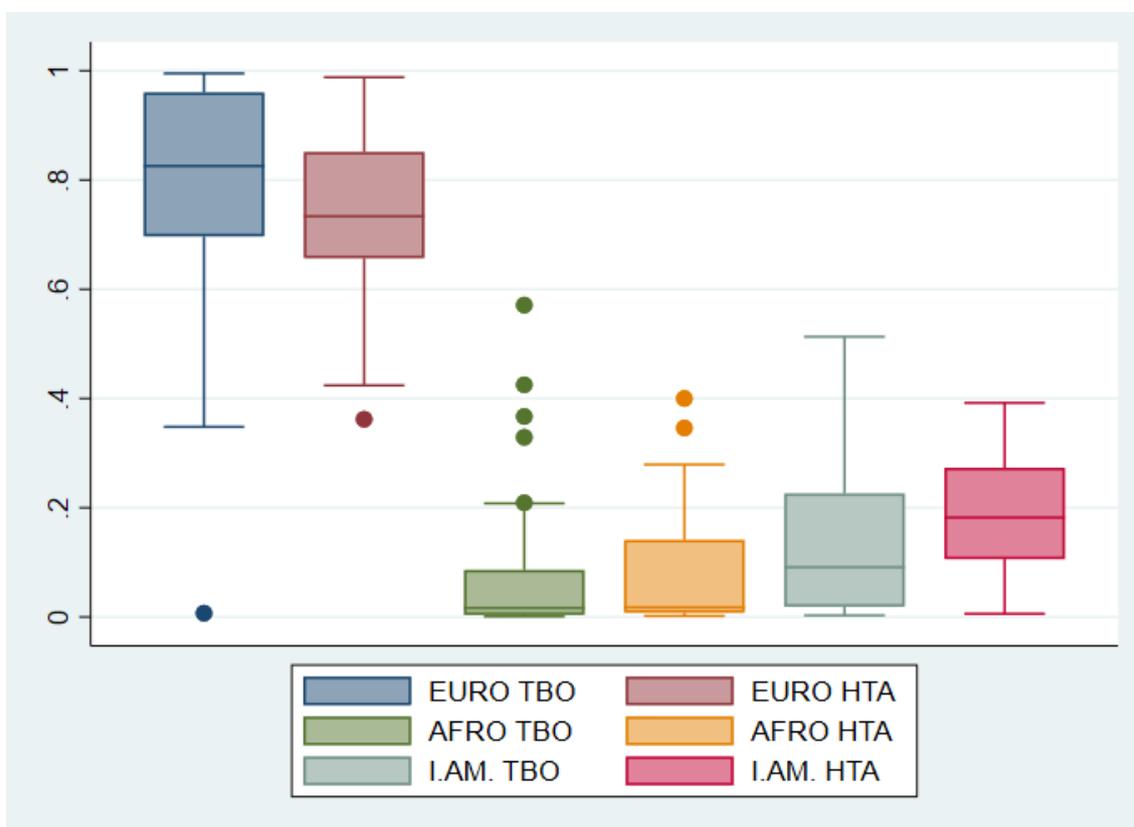


Figura 7. Agrupamiento de los individuos de las 3 parentales (vértices) y distribución de los individuos de la muestra de Uruguay (izquierda). Diagrama de barras (cada una corresponde a un individuo) identificándose las poblaciones parentales putativas y la población muestreada de Uruguay (debajo).



Con el fin de evaluar la utilización de los individuos incluidos en la muestra dirigida provenientes de la población de hipertensos de Tacuarembó (Flores 2019), para estudiar la eventual asociación entre el genotipo C/T-13910 y la ancestría obtenida por AIMS, se compararon las proporciones parentales de europeos, africanos e indígenas americanos de 69 participantes de la muestra poblacional y 38 de la muestra de hipertensos (Figura 8).

Figura 8. Comparación del aporte biparental (AIMs) europeo, africano e indígena americano entre la muestra poblacional de Tacuarembó y la muestra de hipertensos de Tacuarembó.



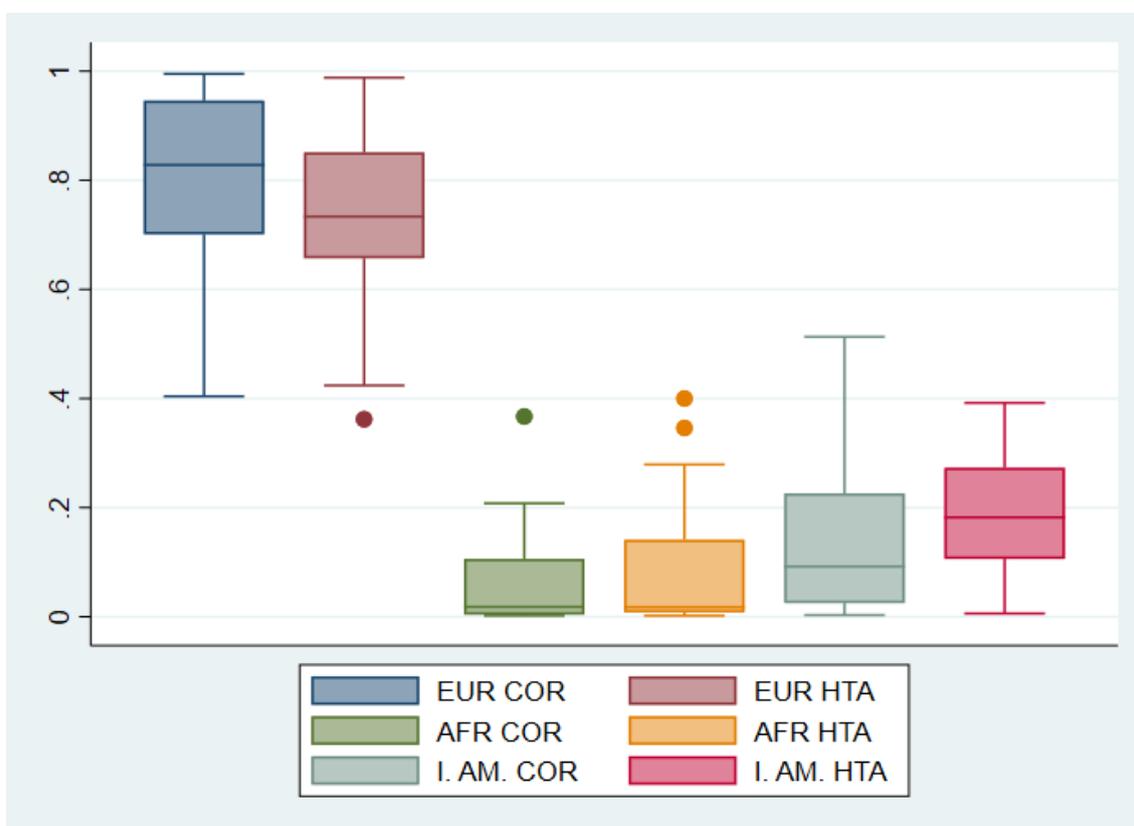
TBO: muestra poblacional de Tacuarembó. HTA: muestra de hipertensos de Tacuarembó.

Como se visualiza en el gráfico, la muestra de hipertensos de Tacuarembó posee un menor aporte europeo y un mayor aporte indígena que la muestra poblacional, siendo la proporción de origen africano similar en ambos grupos. Para evaluar si estas diferencias resultaban estadísticamente significativas, se utilizó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney para muestras independientes, ajustando el valor de p-crítico ($\alpha/3$) para incorporar el efecto de las comparaciones múltiples en el error de Tipo 1. Se observaron diferencias estadísticamente significativas en la proporción de aporte europeo y nativo americano entre la población de Tacuarembó y la de hipertensos de Tacuarembó, con valores de p de 0,011 y 0,012 para ambas proporciones (Tabla 7).

Considerando que para varios de los 69 individuos de la muestra poblacional no se contaba con datos sobre nacimiento de sus padres y que en otros casos, uno o ambos

progenitores no habían nacido en Tacuarembó, las diferencias observadas en las proporciones de aporte europeo e indígena en relación a la muestra de hipertensos, podrían estar relacionadas con los criterios de inclusión disímiles utilizados. Para evaluar esta hipótesis, se seleccionó una submuestra de 35 individuos de la muestra poblacional de Tacuarembó cuyos dos progenitores habían nacido en el departamento de Tacuarembó, para ser comparada con la misma muestra de hipertensos referida arriba (Figura 9). En este caso, pese a que se continuaba visualizando un aporte proporcional europeo menor en hipertensos, así como una mayor proporción del

Figura 9. Comparación del aporte biparental (AIMs) europeo, africano e indígena americano entre la submuestra poblacional de Tacuarembó y la muestra de hipertensos de Tacuarembó.



COR: submuestra poblacional de Tacuarembó integrada por individuos con ambos progenitores nacidos en este departamento. HTA: muestra de hipertensos de Tacuarembó.

componente indígena en esta muestra, las diferencias aparecían más atenuadas. Se realizó la prueba de Mann-Whitney en las mismas condiciones antes descritas, arrojando valores de p de 0,037 y 0,045 para las proporciones de europeos e

indígenas respectivamente. Considerando que estos valores fueron superiores al límite de significación ajustado (Tabla 7), no se encontró en este caso evidencia estadística que sugiera que las diferencias observadas fueran significativas. A pesar de estos resultados, para la evaluación de la asociación entre ancestría biparental y genotipo se decidió utilizar únicamente la muestra poblacional de Tacuarembó, sin la inclusión de los hipertensos de la muestra dirigida.

Tabla 7. Comparación en la proporción de aporte biparental europeo, africano e indígena americano entre la muestra poblacional de Tacuarembó, hipertensos y la submuestra poblacional de Tacuarembó

| Comp. 1 | Muestra población Tacuarembó | N | Muestra hipertensos Tacuarembó | N | p |
|---------------------|---------------------------------------|----------|--|----------|--------------|
| Prop. Euro | 80,4 | | 73,4 | | 0,011 |
| Prop. I. Am. | 12,7 | 69 | 18,6 | 38 | 0,012 |
| Prop. Afro | 6,9 | | 7,9 | | 0,423 |
| Comp. 2 | Muestra hipertensos Tacuarembó | | Muestra progenitores Tacuarembó | | |
| Prop. Euro | 73,4 | | 80,4 | | 0,037 |
| Prop. I. Am. | 18,6 | 38 | 13,4 | 35 | 0,045 |
| Prop. Afro | 7,9 | | 6,2 | | 0,522 |

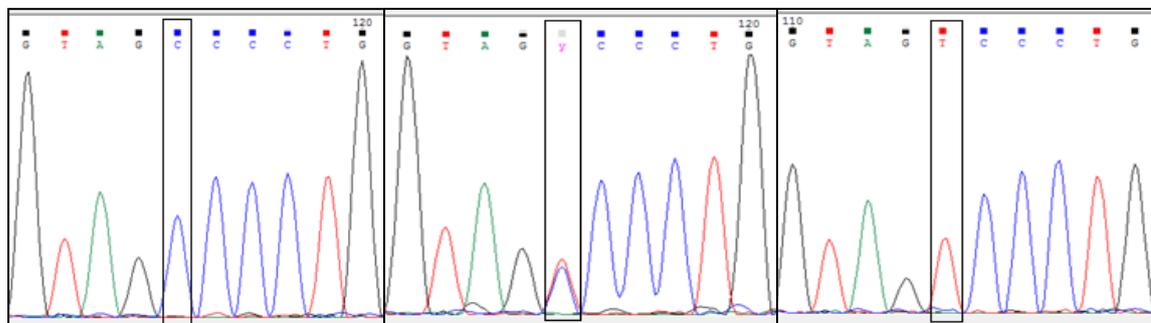
Prueba no paramétrica de Mann-Whitney para muestras independientes, límite de significación ($\alpha/3$): 0,0167. En negrita se marcan los valores de p significativos.

5.1.4 SNPs asociados a persistencia de lactasa

Se obtuvieron las secuencias de 116 individuos de la muestra poblacional de Tacuarembó, las que se editaron, alinearon y procesaron para identificar variantes en relación a la secuencia de referencia utilizada. El principal polimorfismo identificado fue C/T-13910 (rs4988235) encontrándose 52 homocigotas CC (44,8%), 51 heterocigotas CT (44%) y 13 homocigotas TT(11,2%), con una frecuencia del alelo derivado T-13910 de 33% (ver Figura 10). Al analizar el ajuste de las proporciones observadas de los 3 genotipos a las proporciones esperadas a partir de la frecuencia de ambos alelos, no

se encontró evidencia de apartamiento del equilibrio de Hardy-Weinberg para el polimorfismo C/T-13910 ($p=1,000$).

Figura 10. Electroferogramas de individuos homocigotas para C-13910 (izquierda), heterocigotas (medio) y homocigotas para T-13910 (derecha).



Un individuo de la muestra poblacional resultó heterocigota para el polimorfismo T/G-13915 (rs41380347) mientras que otro individuo presentó un genotipo heterocigota para el polimorfismo C/T-14011 (rs4988233), en ambos casos siendo homocigotas para el alelo C-13910. Las frecuencias resultantes para los alelos derivados G-13915 y T-14011 fueron ambas de 0,4 por ciento, no encontrándose en esta muestra ningún otro SNP asociado previamente a persistencia de lactasa, ni otras variantes en relación a la secuencia de referencia. Las frecuencias genotípicas observadas en ambos *loci* no mostraron apartamiento de las frecuencias esperadas asumiendo Equilibrio de Hardy-Weinberg. En la Tabla 8 se resumen los resultados genotípicos obtenidos.

Partiendo de las frecuencias alélicas obtenidas para los SNPs asociados a LP estudiados en la muestra poblacional de Tacuarembó, así como de las frecuencias publicadas de estos en diversos estudios, se construyó un árbol filogenético neighbor joining (NJ) utilizando el programa POPTREE2 (Takezaki, Nei & Tamura 2010). Para ello se utilizaron datos de frecuencia alélicas de poblaciones de Europa, África, Medio Oriente, China y América del Sur. En la Tabla 9 se detallan los datos de las poblaciones incluidas, frecuencias de SNPs y publicaciones de donde fueron obtenidas.

Tabla 8. Polimorfismos asociados a LP identificados, genotipos observados, frecuencia de los alelos derivados y ajuste al equilibrio de Hardy-Weinberg

| SNPs | Genotipos Observados (%) | | | Frecuencia Alelo | Ajuste |
|------------------|--------------------------|----------|-----------|------------------|---------------------|
| | | | | Derivado (%) | HW ¹ (p) |
| C/T-13910 | CC | CT | TT | T | 1,000 |
| | 52 (44,8) | 51 (44) | 13 (11,2) | 33 | |
| T/G-13915 | TT | TG | GG | G | 1,000 |
| | 115 (99,13) | 1 (0,87) | 0 (0) | 0,43 | |
| C/T-14011 | CC | CT | TT | T | 1,000 |
| | 115 (99,13) | 1 (0,87) | 0 (0) | 0,43 | |

1: Prueba Exacta usando cadena de Markov en el programa ARLEQUIN.

Como se puede apreciar en la Figura 11, en general los nodos tuvieron valores de Bootstrap bajos, lo que refleja un no muy buen soporte estadístico de los clústeres formados. Pese a esto, puede observarse que la población de Tacuarembó forma un clúster con las poblaciones de Europa y Sudamérica, en las que el principal polimorfismo es C/T-13910, estando los nodos relacionados con las similitudes de frecuencia de T-13910. Un segundo clúster incluye a las poblaciones africanas en las que el único polimorfismo es G/C-14010, con frecuencias relativamente bajas del alelo derivado C-14010, así como a otras poblaciones que no presentan ningún SNP asociado a LP.

Más distantes aparecen las poblaciones de Arabia Saudita y árabes de Medio Oriente, caracterizadas por presentar el polimorfismo T/G-13915, siendo notoria la distancia que separa a la primera del resto de las poblaciones, lo que se explica por la elevada frecuencia del alelo G-13915 que presenta esta población.

Tabla 9. Frecuencias de los alelos derivados de los SNPs analizados en el presente trabajo, en diversas poblaciones de Europa, África, Asia, Sudamérica y Uruguay.

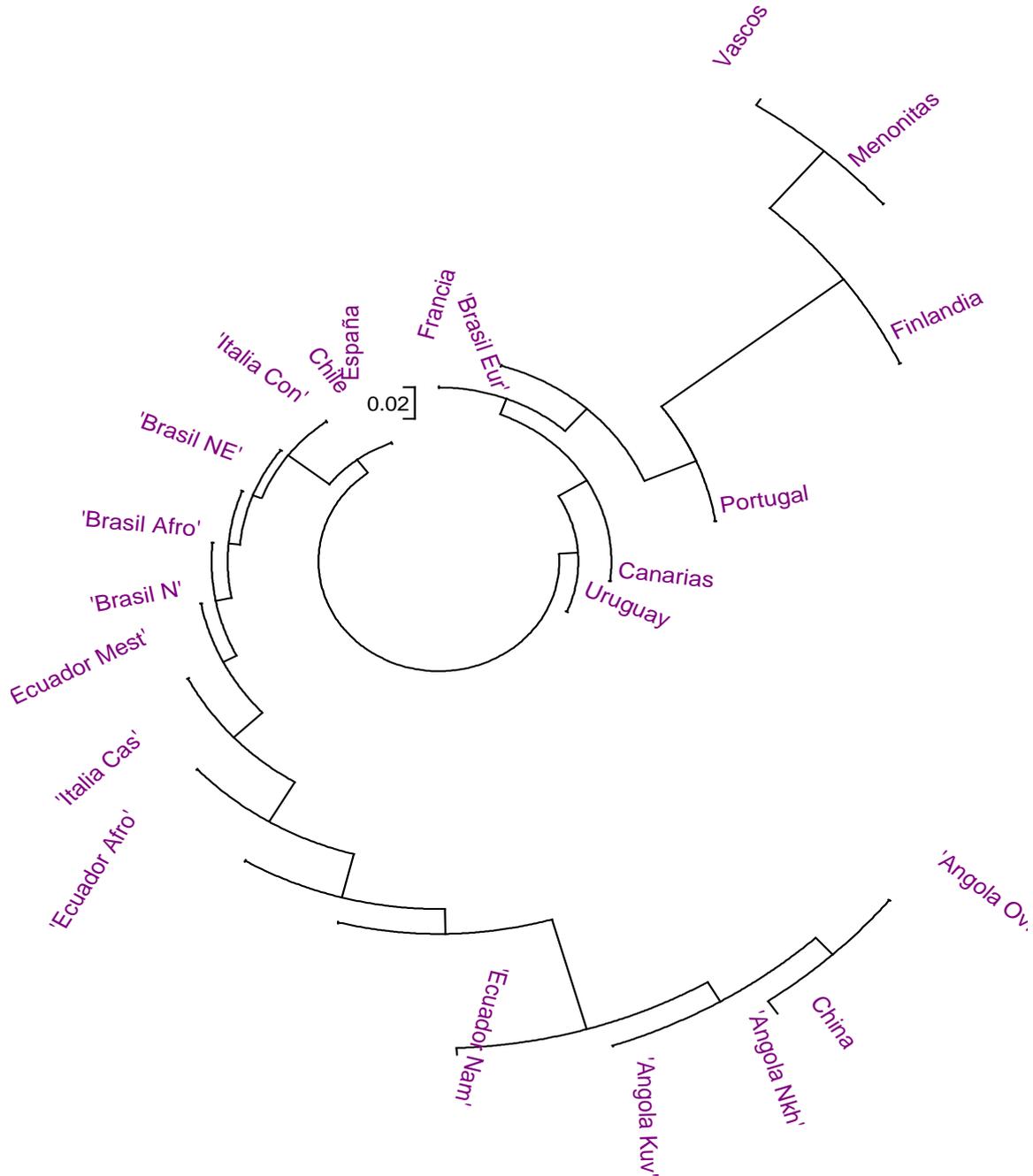
| Población | N | T- 13910 | G- 13907 | C- 13913 | G- 13915 | C- 14010 | T- 14011 | G- 14009 |
|--|------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Arabia Saudita ¹ | 248 | 0,004 | 0,008 | 0 | 0,57 | 0 | 0 | 0 |
| Árabes ^{1,10} | 40 | 0,13 | 0 | 0 | 0,105 | 0 | 0 | 0 |
| Congo/Bantú/Manyanga ² | 11 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Mozambique/Bantu ³ | 111 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Angola/Ovimbundu ³ | 96 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,01 | 0 | 0 |
| Angola/Nyaneka Nkhumbi ³ | 153 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,03 | 0 | 0 |
| Angola/Kuvale ³ | 54 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,06 | 0 | 0 |
| Italia/Cerdeña-Casos ⁴ | 120 | 0,108 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Italia/Cerdeña-Control ⁴ | 120 | 0,217 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Portugal ¹¹ | 447 | 0,402 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Islas Canarias ¹² | 551 | 0,365 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| España ⁵ | 221 | 0,37 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Vascos ⁶ | 85 | 0,66 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| China/Han ⁶ | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Finlandia ¹ | 1876 | 0,575 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Francia ⁶ | 17 | 0,383 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Brasil/Sur/Africano ⁷ | 182 | 0,184 | 0 | 0 | 0 | 0,005 | 0 | 0 |
| Brasil/Sur/Europeo ⁷ | 337 | 0,295 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Brasil/Sur/Menonitas | 151 | 0,65 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Brasil/Nordeste ⁷ | 262 | 0,204 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,011 | 0 |
| Brasil/Norte ⁷ | 200 | 0,175 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,005 | 0 |
| Chile/IV Región/Mestizos ⁸ | 437 | 0,22 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Ecuador/Mestizos ⁹ | 488 | 0,137 | 0 | 0,002 | 0,005 | 0 | 0 | 0 |
| Ecuador/Nat. Americanos ⁹ | 128 | 0,074 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Ecuador/Afro- ecuatorianos ⁹ | 125 | 0,08 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Uruguay/ Tacuarembó | 116 | 0,33 | 0 | 0 | 0,004 | 0 | 0,004 | 0 |

1: Enattah et al 2008, 2: Breton et al 2014, 3: Coelho et al 2009, 4: Obinu et al 2010, 5: Rasinpera et al 2005, 6: Enattah et al 2007, 7: Friedrich, Santos et al 2012, 8: Fernández et al 2016, 9: Paz y Miño et al 2016, 10: árabes de Iraq, Líbano, Palestina y Siria, 11: Manco et al 2017, 12: Almon et al 2012.

Un segundo árbol filogenético NJ se construyó a partir de la matriz de distancias F_{st} obtenida de las frecuencias génicas de C/T-13910 y G/C-14010, eliminando las poblaciones que no tenían ninguno de estos 2 polimorfismos, con la excepción de

africanas que carecen de T-13910 se agrupan en base a sus similitudes en la frecuencia de C-14010, que varía entre 1 y 6%, siendo cercanas a China, que no presenta ninguno de estos dos polimorfismos.

Figura 12. Árbol filogenético neighbor joining (NJ) construido a partir de una matriz de distancias F_{st} de las frecuencias alélicas de los polimorfismos C/T-13910 y G/C-14010



Árbol obtenido con el programa POPTREE2

Una mejor resolución del Árbol NJ se podría obtener con un mayor número de *loci*, si varios de los polimorfismos estuvieran presentes en la mayor parte de las poblaciones o si se utilizaran micro satélites con múltiples alelos. Pese a estas limitantes, en general los árboles obtenidos con POPTREE2 reflejan las similitudes entre las poblaciones comparadas, en relación a las frecuencias alélicas de los polimorfismos asociados a LP que estas presentan.

5.2 Muestra dirigida

A partir de la muestra dirigida a presuntos intolerantes a la lactosa (LI) se lograron genotipar los SNPs asociados a persistencia de lactasa en 10 hipertensos de Tacuarembó y 23 residentes en Montevideo. El principal polimorfismo identificado fue el SNP C/T-13910, registrándose 21 genotipos homocigotas CC, 10 heterocigotas CT y 2 homocigotas para el alelo derivado T-13910, siendo la frecuencia de este alelo en la muestra dirigida 21,2%. Un individuo hipertenso de Tacuarembó resultó a su vez heterocigota para el SNP C/T-14011, presentando un genotipo CC-13910. No se identificaron otros SNPs en la región estudiada en esta muestra.

Para 21 de estos individuos, 7 hipertensos de Tacuarembó y 14 residentes en Montevideo, se obtuvo información sobre ancestría individual por AIMS, mientras que en 33 participantes, 10 hipertensos de Tacuarembó y 23 residentes en Montevideo, se determinaron los haplogrupos de ADNmt y se asignaron a una población continental de origen. Los datos sobre origen de los participantes, consumo de leche, síntomas digestivos y genotipos CT-13910 se resumen en la Tabla 10.

Tabla 10. Resumen de datos de nacimiento, consumo de leche, síntomas digestivos y genotipo del SNP C/T-13910, de la muestra dirigida de residentes en Montevideo e hipertensos de Tacuarembó.

| Variables | Residentes Montevideo | Residentes Tacuarembó |
|------------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Nacimiento en Depto. | 12 | 10 |
| Nacimiento fuera del Depto. | 9 | 0 |
| Consumo Diario | 7 | 0 |
| Consumo Semanal | 3 | 0 |
| Consumo Mensual | 2 | 0 |
| Consumo Raramente/Nunca | 10 | 10 |
| Dolor | 13 | 7 |
| Distensión | 17 | 5 |
| Diarrea | 11 | 3 |
| Otros | 16 | 4 |
| Genotipo CC | 13 | 8 |
| Genotipo CT+TT | 10 | 2 |

5.3 Población de referencia de Montevideo

Se analizaron las secuencias de 38 individuos elegidos al azar de la población de referencia de Montevideo, encontrándose únicamente el polimorfismo europeo C/T-13910. Los porcentajes de los genotipos homocigota CC, heterocigota CT y homocigota TT fueron 52,6, 39,5 y 7,9 respectivamente (Tabla 11), resultando la frecuencia del alelo derivado T-13910 en 27,6%, algo menor a la obtenida en la muestra poblacional de Tacuarembó, aunque estas diferencias no resultaron estadísticamente significativas ($\chi^2 = 0,81$, gl = 2, p = 0,667).

A efectos de evaluar si las diferencias observadas en las proporciones de ancestría, tanto biparental como por línea materna, entre la muestra dirigida de residentes en Montevideo y la muestra de referencia, resultaban significativas desde el punto de vista estadístico, se realizaron las pruebas de Mann-Whitney y de la probabilidad exacta de Fisher. Esta última se utilizó por no alcanzarse los requisitos mínimos de frecuencia esperada para aplicar Chi cuadrado.

Tabla 11. Polimorfismos asociados a LP identificados, genotipos observados y frecuencia de los alelos derivados en la muestra dirigida y la muestra de referencia de Montevideo.

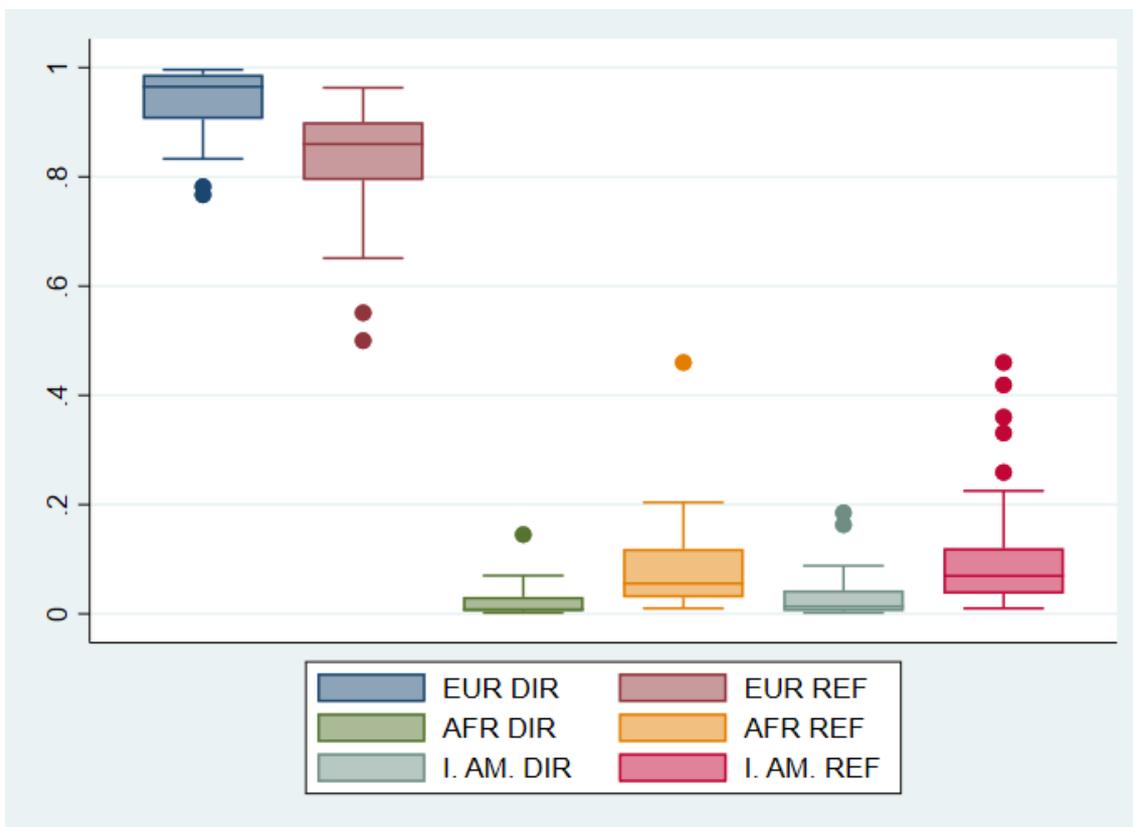
| Muestra | SNPs | Genotipos Observados (%) | | | Frec. Alelo Derivado (%) |
|-----------------|------------------|---------------------------------|---------------------|-------------------|---------------------------------|
| | C/T-13910 | CC 8 (80) | CT 1 (10) | TT 1 (10) | 15 |
| HTA TBÓ | C/T-14011 | CC 9 (90) | CT 1 (10) | TT 0 (0) | 0,5 |
| DIR MDEO | C/T-13910 | CC 13 (56,5) | CT 9 (39,1) | TT 1 (4,4) | 24 |
| REF MDEO | C/T-13910 | CC 20 (52,6) | CT 15 (39,5) | TT 3 (7,9) | 28 |

HTA: Hipertensos de Tacuarembó presuntamente intolerantes a la lactosa. DIR MDEO: Muestra dirigida a presuntos intolerantes a la lactosa residentes en Montevideo. REF MDEO: Muestra de referencia de residentes en Montevideo y Maldonado.

En relación a los porcentajes de ancestría por AIMs, la muestra dirigida de residentes en Montevideo presentó en promedio un 93,3% de aporte europeo, mientras que la contribución africana e indígena americana se situaron en 2,5 y 4,2% respectivamente. La muestra de referencia ya contaba con información sobre ancestría individual (Bonilla et al. 2015), obtenida a partir de un conjunto diferente de SNPs procesados con el programa STRUCTURE, siendo los aportes europeo, africano e indígena de 83,5, 7,8 y 9,4% respectivamente (Figura 13).

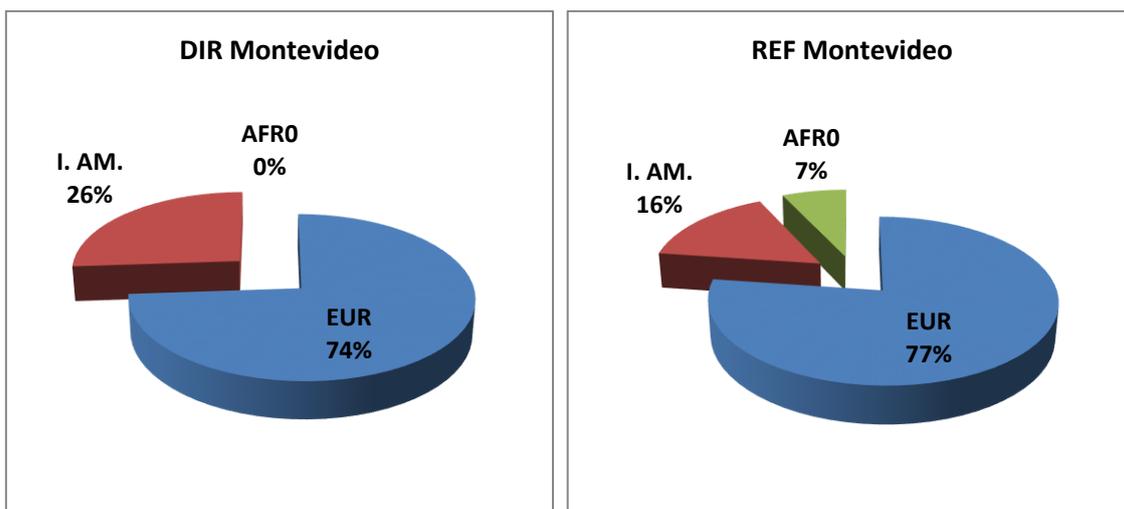
La prueba no paramétrica de Mann-Whitney arrojó valores de p muy inferiores al límite de significación, calculado como $\alpha/3$, para las comparaciones del aporte proporcional europeo, africano e indígena entre la muestra dirigida de residentes en Montevideo y la muestra de referencia, siendo estos 0,0001, <0,0001 y 0,0007 respectivamente. Por esta razón se consideró improcedente utilizar estas muestras en conjunto, para evaluar la asociación eventual entre genotipo y ancestría biparental.

Figura 13. Aporte biparental europeo, africano e indígena de residentes en Montevideo de la muestra dirigida (DIR) y la muestra de referencia de residentes en Montevideo (REF).



En lo relativo a la comparación de la frecuencia de haplogrupos de ADNmt entre ambas muestras, se observó una mayor frecuencia de haplogrupos europeos (77%) en la muestra de referencia, que en la muestra dirigida (74%). A su vez, se verificó una mayor representación de haplogrupos indígena americanos (26%) en la muestra dirigida, en comparación con el 16% observado en la muestra de referencia (Figura 14). Por último, no se identificaron haplogrupos africanos en la muestra dirigida, mientras que un 7% de los haplogrupos de la muestra de referencia se asignaron a este origen continental.

Figura 14. Proporción de haplogrupos agrupados por origen continental de residentes en Montevideo.



DIR: Residentes en Montevideo de la muestra dirigida. REF: Población de referencia residentes en Montevideo y Maldonado.

La prueba de probabilidad exacta de Fisher arrojó valores idénticos de p de 0,33, por lo que no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las dos muestras, pudiéndose utilizar en conjunto para evaluar asociación entre genotipo C/T-13910 y ancestría uniparental por vía materna (Tabla 12).

Tabla 12. Comparación de ancestría por AIMs y ADNmt entre residentes en Montevideo de la muestra dirigida (DIR) y residentes en Montevideo y Maldonado de la muestra de referencia (REF).

| Ancestría | DIR Mdeo. | REF Mdeo. | Estadístico | p |
|--------------|-----------|-----------|-------------------------|---------|
| Euro AIMs | 93,3 | 83,5 | Mann-Whitney | 0,0001 |
| Afro AIMs | 2,5 | 7,8 | Mann-Whitney | <0,0001 |
| I. Am. AIMs | 4,2 | 9,4 | Mann-Whitney | 0,0007 |
| Euro ADNmt | 73,9 | 77,2 | | |
| Afro ADNmt | 26,1 | 15,8 | Prueba Exacta de Fisher | 0,33 |
| I. Am. ADNmt | 0 | 7 | | |

Límite de significación para Mann-Whitney: 0,0167 ($\alpha/3$).

5.4 Fenotipo y consumo de lácteos

Para definir el fenotipo presunto intolerante a la lactosa (PIL) se utilizó como aproximación la respuesta de cada participante a las preguntas de la encuesta en las que se indagaba sobre la asociación percibida entre el consumo de leche y la manifestación de síntomas digestivos u otros. En base a este criterio, se dividió la muestra poblacional de Tacuarembó en PIL y no intolerantes a la lactosa (NIL), quedando conformado cada grupo por 35 (29,4%) y 84 (70,6%) individuos respectivamente.

Como se puede apreciar en la Figura 15 mientras que más de la mitad de NIL consumieron leche diariamente y solo un 26% lo hizo raramente o nunca, el consumo diario de leche se redujo a un 6% en PIL, predominando en este grupo quienes consumían raramente o nunca este alimento, con un 70 %. Estas diferencias se vieron reflejadas tanto en el resultado de la prueba de Chi cuadrado, donde se obtuvo un valor de p muy inferior al límite de significación, como en el valor obtenido para la V de Cramer ($V = 0,53$) que sugiere una fuerte asociación entre estas dos variables. En la Tabla 13 se resumen los resultados de esta comparación.

Figura 15. Comparación de frecuencia de consumo de leche (%) entre presuntos intolerantes a la lactosa (PIL) y no intolerantes a la lactosa (NIL).

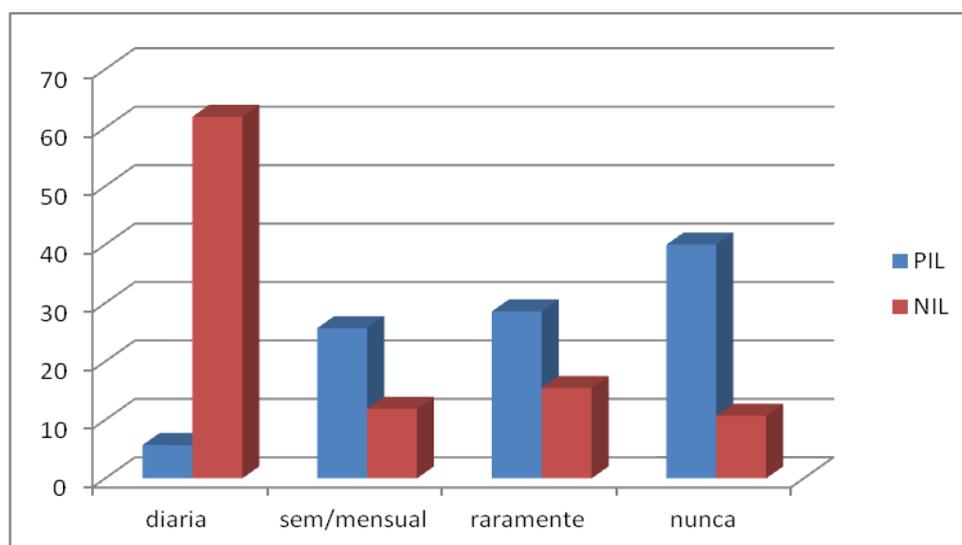


Tabla 13. Comparación de frecuencias de consumo de leche entre PIL y NIL.

| Frecuencia | PIL | NIL | Valor χ^2 | V | gl | p |
|-----------------|-----|-----|----------------|------|----|---------|
| Diaria | 2 | 52 | | | | |
| Semanal/Mensual | 9 | 10 | 33,3 | 0,53 | 3 | <0,0001 |
| Raramente | 10 | 13 | | | | |
| Nunca | 14 | 9 | | | | |

Pruebas de Chi Cuadrado y V de Cramer.

Como se observa en la Figura 16 las frecuencias de consumo de derivados lácteos tienden a ser similares entre PIL y NIL, aunque se visualiza un mayor porcentaje de individuos NIL que consumen diaria o semanalmente estos productos y una mayor proporción de PIL que los consumen raramente. En efecto, al realizar la prueba de Chi cuadrado no se encontró evidencia estadísticamente significativa que sustente la asociación entre el consumo de derivados lácteos y el fenotipo (ver Tabla 14), lo que se condice con el valor bajo obtenido de la V de Cramer ($V = 0,15$).

Figura 16. Comparación de frecuencia de consumo de derivados lácteos (%) entre presuntos intolerantes a la lactosa (PIL) y no intolerantes a la lactosa (NIL).

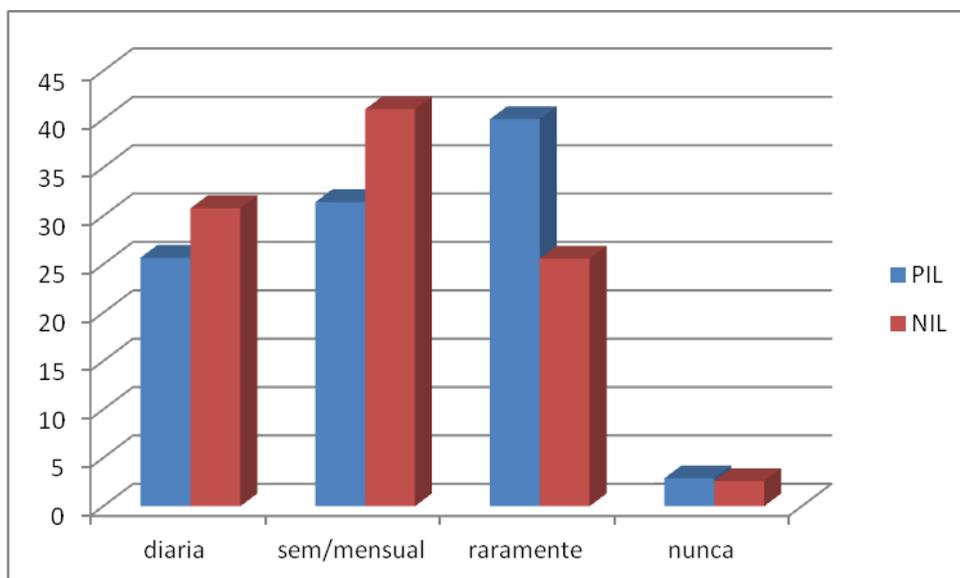


Tabla 14. Comparación de frecuencias de consumo de derivados lácteos entre PIL y NIL.

| Frecuencia | PIL | NIL | Valor χ^2 | V | gl | p |
|------------------------|------------|------------|----------------------------------|----------|-----------|----------|
| Diaria | 9 | 24 | | | | |
| Semanal/Mensual | 11 | 32 | 2,38 | 0,15 | 2 | 0,30 |
| Raramente/Nunca | 15 | 22 | | | | |

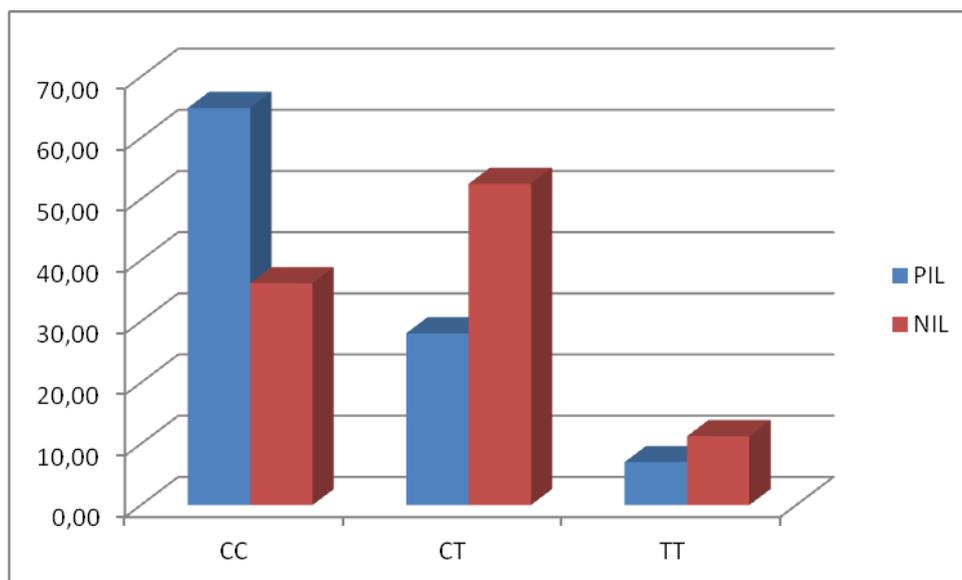
Pruebas de Chi Cuadrado y V de Cramer.

En suma, la percepción de que el consumo de leche fluida está asociado a la aparición de diversos síntomas, fundamentalmente digestivos, llevó a que los individuos PIL mostraran una frecuencia de consumo de este producto significativamente menor a la de aquellos no afectados por tal condición. Pese a esto, es importante remarcar que algo más de un quinto del grupo de no intolerantes declaró consumir leche raramente o nunca, pese a no asociar esto a la presentación de manifestaciones clínicas compatibles con intolerancia a la lactosa.

5.5 Fenotipo y genotipo C/T-13910

Para evaluar la asociación entre fenotipo PIL o NIL y el genotipo del polimorfismo C/T-13910, se conformaron dos grupos, uno integrado por NIL de la muestra poblacional de Tacuarembó (N=80) y otro constituido por la totalidad de PIL (N=57), incluyendo la muestra poblacional de Tacuarembó y la muestra dirigida. Para cada grupo se contabilizaron los genotipos CC, CT y TT a efectos de poder comparar las frecuencias de cada uno entre estos grupos (Figura 17).

Figura 17. Frecuencia porcentual de los genotipos CC, CT y TT del polimorfismo C/T-13910 en presuntos intolerantes a la lactosa (PIL) y no intolerantes a la lactosa (NIL).



Mientras que en el grupo PIL prácticamente dos tercios resultaron homocigotas para el alelo C-13910, en NIL la frecuencia conjunta de heterocigotas CT más homocigotas TT llegó al 63 por ciento. Considerando que el modelo de herencia propuesto para la Persistencia de Lactasa (LP) es de dominancia del alelo derivado T-13910, se destaca que un 36,25 por ciento de NIL presentaron un genotipo asociado a hipolactasia tipo adulto (AH) y eventualmente a intolerancia a la lactosa. Por otro lado, un 35 por ciento de PIL presentaron genotipos asociados a LP (CT y TT) lo que resulta llamativo si se considera que estos individuos deberían ser capaces de producir lactasa en cantidad suficiente para no experimentar síntomas digestivos al consumir leche.

Para evaluar la existencia de sustento estadístico para la asociación entre el genotipo C/T-13910 y el fenotipo en relación a la tolerancia a la lactosa, se llevaron a cabo las pruebas de Chi cuadrado y V de Cramer, obteniéndose evidencia estadísticamente significativa de esta asociación ($p = 0,0041$) con una fuerza apreciable ($V = 0,28$) (Tabla 15).

Tabla 15. Comparación de frecuencia de genotipos CC, CT y TT del polimorfismo C/T-13910 entre presuntos intolerantes a la lactosa (PIL) y no intolerantes a la lactosa (NIL)

| Fenotipo | CC | CT | TT | Valor χ^2 | V | gl | p |
|----------|----|----|----|----------------|------|----|--------|
| PIL | 37 | 16 | 4 | 11 | 0,28 | 2 | 0,0041 |
| NIL | 29 | 42 | 9 | | | | |

Pruebas de Chi cuadrado y V de Cramer.

Con el fin de evaluar la naturaleza de la asociación entre fenotipo y genotipo, se construyó una tabla de contingencia de 2 x 2, incluyendo los 2 fenotipos, PIL y NIL y los genotipos CC por un lado y CT+TT por el otro, asumiendo la dominancia del alelo derivado T-13910. En base al resultado de *Odds Ratio* obtenido (OR=3,25), existe evidencia estadística que sustenta que, para las condiciones de este estudio, los individuos que presentan un genotipo CC tienen una probabilidad de presentar un fenotipo PIL 3 veces mayor que los que presentan un genotipo CT o TT. Sin embargo, tanto el Kappa no ponderado de Cohen obtenido (0,28) como la proporción entre el Kappa observado y el máximo posible (0,32) sugieren una pobre concordancia entre fenotipo PIL y genotipo CC, o entre fenotipo NIL y genotipo CT más TT (Tabla 16).

Tabla 16. Análisis de asociación y concordancia entre el genotipo C/T-13910 y el fenotipo en relación a tolerancia a la lactosa, asumiendo dominancia del alelo T-13910.

| Geno/Feno | NIL | PIL | Valor χ^2 | p | OR (IC ⁹⁵) ¹ | Kappa (IC ⁹⁵) ² | Kappa Obs /Kappa Máx |
|-----------|-----|-----|----------------|--------|-------------------------------------|--|----------------------|
| CC | 29 | 37 | 9,83 | 0,0017 | 3,25 | 0,28 (0,12 – 0,44) | 0,32 |
| CT+TT | 51 | 20 | | | (1,6 – 6,62) | | |

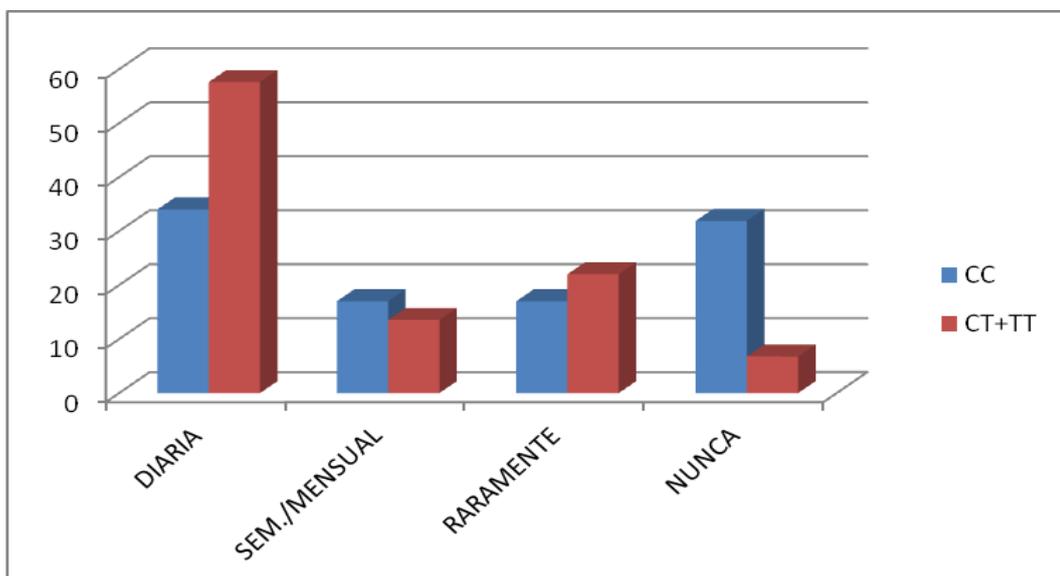
NIL: no intolerantes a la lactosa, PIL: presuntos intolerantes a la lactosa. Valor de Chi cuadrado corregido por Yates. 1: *Odds Ratio* e intervalo de confianza 95%. 2: Índice Kappa no ponderado de Cohen e intervalo de confianza 95%.

Interesantemente, tanto los 2 individuos que resultaron heterocigotas para el polimorfismo C/T-14011, como el que presentó un genotipo heterocigota para el SNP T/G-13915, estaban incluidos en el grupo PIL, pese a que ambas variantes han sido asociadas a persistencia de lactasa. Como se señaló anteriormente, estos 3 individuos fueron todos genotipados como CC para el polimorfismo C/T-13910, evidenciándose concordancia en este caso con el fenotipo observado.

5.6 Genotipo, fenotipo inferido y consumo de leche

Considerando las discrepancias observadas entre el genotipo para la variante C/T-13910 y el fenotipo (PIL o NIL), bajo el supuesto de dominancia del alelo derivado T-13910, se conformaron dos grupos basados en el genotipo observado. Por un lado, se agruparon los individuos que presentaron el genotipo homocigota CC, mientras que por el otro se conformó un grupo que incluyó individuos heterocigotas CT y homocigotas TT. Para evaluar la relación entre el fenotipo, inferido a partir del genotipo observado, y la frecuencia de consumo de leche fluida, dentro de cada grupo se contabilizaron las distintas frecuencias declaradas (ver Figura 18).

Figura 18. Comparación de frecuencia de consumo de leche fluida entre el grupo CC (fenotipo inferido AH) y el grupo CC+CT (fenotipo inferido LP).



El grupo de fenotipo inferido AH (genotipo CC) presentó un 34% de individuos que declararon consumir leche diariamente, mientras que en el grupo de fenotipo inferido LP (genotipo CT más TT) esta frecuencia fue informada por un 58% de los participantes. A la inversa, un 32% de los individuos de fenotipo inferido AH declararon que nunca consumieron leche fluida durante el último año, ubicándose en 7% quienes declararon esto en el grupo de fenotipo inferido LP. Se realizó la prueba de Chi cuadrado a partir de estas frecuencias observadas, obteniéndose evidencia significativa ($p=0,005$) de que la frecuencia de consumo de leche fluida está asociada al fenotipo inferido a partir del genotipo C/T-13910 (ver Tabla 17). A su vez, el valor obtenido de la V de Cramer ($V = 0,35$) sugiere una asociación relativamente fuerte entre estas variables, aunque de menor magnitud que la obtenida al comparar fenotipo y consumo de leche ($V = 0,53$), hecho atribuible a la pobre concordancia entre fenotipo y genotipo C/T-13910 comentada arriba.

En síntesis, pese a las discrepancias entre fenotipo observado (PIL y NIL) y genotipo C/T-13910, bajo el supuesto de dominancia del alelo derivado T-13910, en este trabajo se puso de manifiesto que el genotipo, y por ende el fenotipo inferido, están

Tabla 17. Evaluación de la asociación entre fenotipo, inferido a partir del genotipo C/T-13910, y la frecuencia de consumo de leche fluida en la muestra poblacional de Tacuarembó.

| Cons. Leche | Genotipo | | Valor χ^2 | V | gl | p |
|---------------------|----------|-------|----------------|------|----|-------|
| | CC | CC+CT | | | | |
| Diario | 16 | 34 | | | | |
| Sem./Mensual | 8 | 8 | 12,85 | 0,35 | 3 | 0,005 |
| Raramente | 8 | 13 | | | | |
| Nunca | 15 | 4 | | | | |

Prueba de Chi cuadrado y V de Cramer

significativamente asociados al patrón de consumo de leche en la muestra poblacional de Tacuarembó. De este modo, aquellos individuos de fenotipo inferido AH tendieron a tener una menor frecuencia de consumo de leche que los individuos que presentan un fenotipo inferido LP.

5.7 Genotipo y ancestría biparental

Buscando analizar la asociación entre genotipo C/T-13910 y ancestría biparental por AIMS, se conformaron dos grupos a partir de la muestra poblacional de Tacuarembó, uno integrado por individuos con genotipo CC (N=31) y otro compuesto por heterocigotas CT y homocigotas TT (N=28). Para esta decisión se consideró el origen europeo del alelo derivado T-13910, así como la asociación entre genotipo CC y PIL y entre genotipos CT más TT y NIL.

En promedio, el grupo CC tuvo un menor aporte porcentual europeo que el grupo CT más TT, ubicándose los valores en 77,7 y 83,6% respectivamente, mientras que la contribución africana fue sensiblemente mayor en el grupo CC (9,4%) que en el grupo CT más TT (4,6%). La proporción indígena americana resultó similar en ambos grupos, arrojando valores de 12,9% para CC y 11,8% CT más TT. En la Figura 19 se presenta un gráfico de cajas para ilustrar esta comparación.

Para analizar si estas diferencias en el aporte biparental resultaban significativas desde el punto de vista estadístico, se realizó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney para comparar en forma pareada cada aporte continental, ajustando el límite de significación para dar cuenta de la multiplicidad de comparaciones. Los resultados de esta prueba indicaron la no existencia de diferencias estadísticamente significativas en la contribución proporcional europea, africana e indígena entre los grupos CC y CT más TT (ver Tabla 18).

Figura 19. Comparación del aporte biparental europeo, africano e indígena americano del grupo CC con el grupo CT+TT de la muestra poblacional de Tacuarembó.

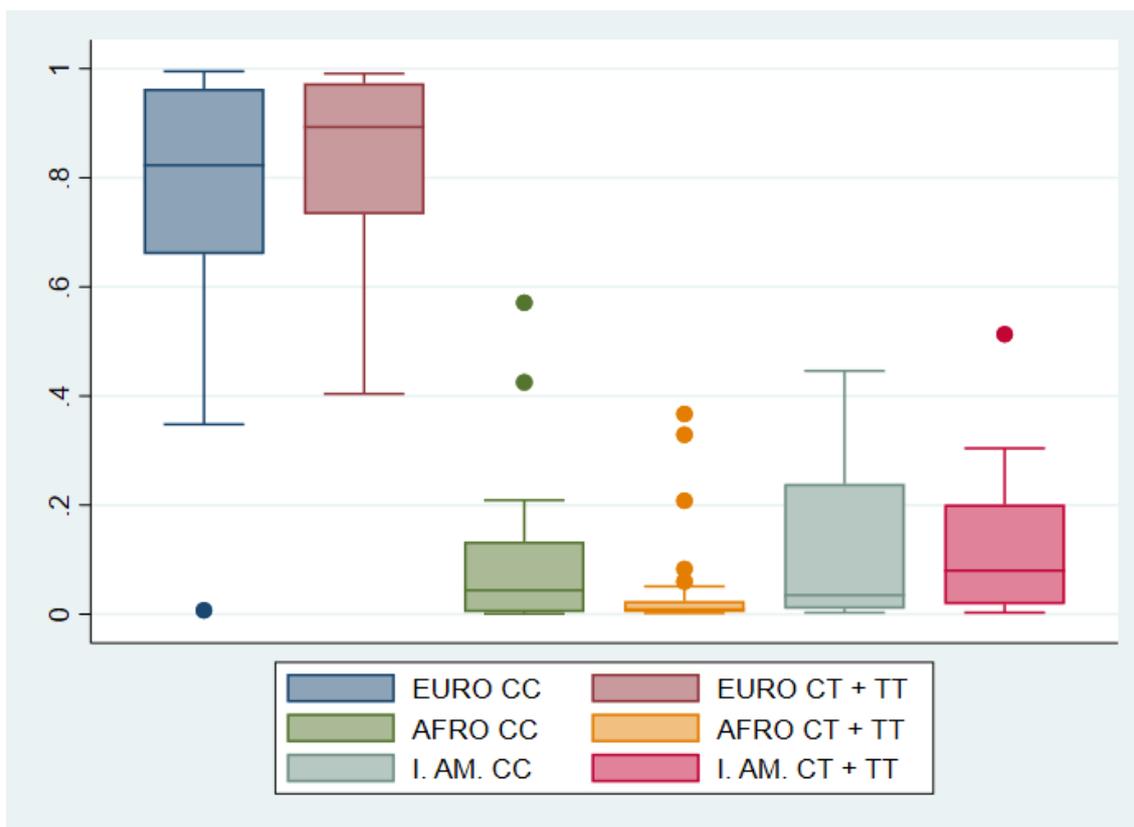


Tabla 18. Comparación de la proporción de aporte biparental europeo, africano e indígena americano entre los grupos CC y CT+TT de la muestra poblacional de Tacuarembó.

| AIMs | CC Tacuarembó | N | CT+TT Tacuarembó | N | p |
|--------------|---------------|----|------------------|----|-------|
| Prop. Euro | 77,7 | | 83,6 | | 0,539 |
| Prop. I. Am. | 12,9 | 31 | 11,8 | 28 | 0,779 |
| Prop. Afro | 9,4 | | 4,6 | | 0,121 |

Prueba no paramétrica de Mann-Whitney para muestras independientes. Límite de significación ($\alpha/3$): 0,0167.

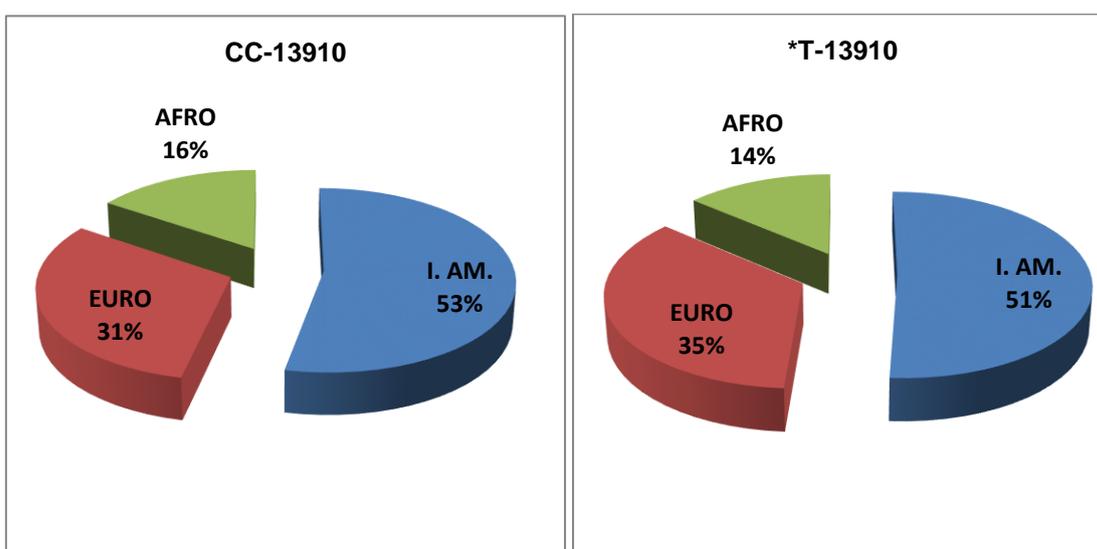
En suma, pese a que se observó cierta tendencia a que los grupos conformados por individuos con genotipo CC tuvieran un menor aporte europeo y una mayor contribución africana e indígena, en comparación con los grupos integrados por individuos de genotipos CT y TT, este hallazgo no tuvo sustento estadístico para que tales diferencias puedan ser consideradas significativas.

5.8 Genotipo y ancestría por ADNmt

Con el objetivo de evaluar la asociación entre el genotipo para el polimorfismo C/T-13910 y la ancestría uniparental obtenida a partir del análisis del ADNmt, se conformaron dos grupos a partir de la muestra poblacional de Tacuarembó integrada también por hipertensos genotipados, siguiendo los mismos criterios detallados antes. Para cada grupo se determinó la frecuencia de haplogrupos europeos, africanos e indígena americanos, a efectos de poder comparar sus proporciones.

Tanto el grupo CC (N=45) como el CT más TT (N=51) presentaron proporciones de haplogrupos indígenas, europeos y africanos muy similares, siendo sus porcentajes de 53, 31 y 16 respectivamente para el primero, y de 51, 35 y 14 respectivamente para el segundo (Figura 20). Pese a esta similitud, se examinaron estas frecuencias utilizando las pruebas de Chi cuadrado y V de Cramer en una tabla de 3 x 2, para evaluar su significancia estadística.

Figura 20. Comparación del aporte materno indígena americano, europeo y africano entre el grupo con genotipo CC-13910 y el grupo con genotipo *T-13910 de la muestra poblacional integrada con hipertensos de Tacuarembó.



Como era dable esperar, los resultados de las pruebas estadísticas reflejaron la similitud observada en las proporciones ancestrales, no encontrándose evidencia

estadísticamente significativa que sugiera asociación entre genotipo C/T-13910 y ancestría uniparental materna. En la Tabla 19 se resumen los resultados de esta comparación.

De igual manera se compararon las proporciones parentales europea, africana e indígena entre los grupos CC (N=33) y CT más TT (N=26) de la muestra combinada de residentes en Montevideo y Maldonado (PIL más muestra de referencia) obteniéndose 79, 3 y 18% respectivamente en el primero y 77, 8 y 15 respectivamente en el segundo. Al igual que ocurrió con la muestra de Tacuarembó, dada la similitud de estas proporciones en ambos grupos, tanto la prueba de Chi cuadrado (europeo/no europeo) como la prueba exacta de Fisher para las 3 parentales, arrojaron resultados no significativos ($p = 0,89$ y $0,78$ respectivamente), sugiriendo también la no asociación entre genotipo C/T-13910 y ancestría uniparental materna.

Tabla 19. Comparación de la frecuencia de haplogrupos indígena americanos, europeos y africanos entre los grupos CC y CT más TT en las muestras de Tacuarembó y Montevideo.

| ADNmt | Muestra | CC | CT+TT | Valor χ^2 | V | gl | p |
|--------|------------|----|-------|-------------------------|-------------|----------|-------------|
| I. Am. | Tacuarembó | 24 | 26 | 0,21 | 0,05 | 2 | 0,90 |
| Euro. | | 14 | 18 | | | | |
| Afro. | | 7 | 7 | | | | |
| I. Am. | Montevideo | 6 | 4 | 0,02¹ | 0,02 | 1 | 0,89 |
| Euro | | 26 | 20 | | | | |
| Afro. | | 1 | 2 | | | | |

Pruebas de Chi cuadrado y V de Cramer. 1: Comparación entre N° haplogrupos europeos y no europeos corregido por Yates.

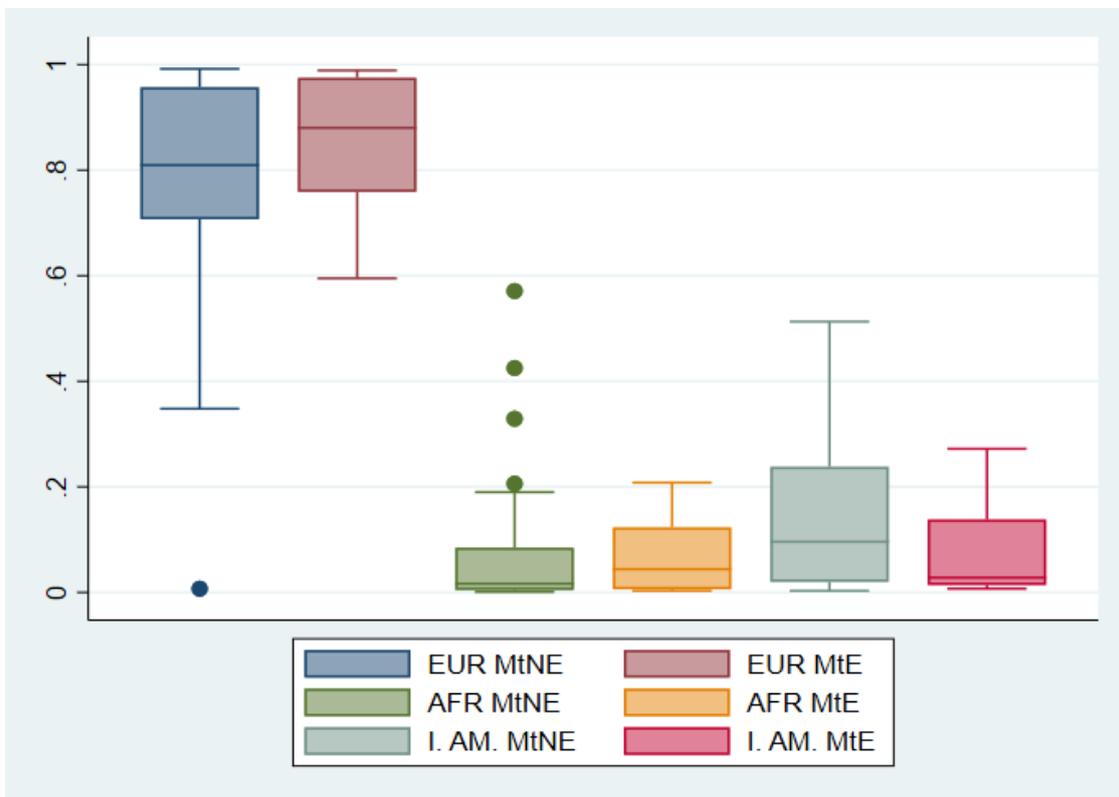
5.9 Ancestría biparental según ADNmt

Con el fin de analizar la relación entre la ancestría estimada por AIMs y la obtenida a partir del ADNmt, se conformaron 2 grupos a partir de la muestra poblacional de Tacuarembó. En el primero se incluyeron los individuos que presentaron haplogrupos

no europeos (N=36) mientras que en el segundo se agruparon únicamente individuos de ascendencia mitocondrial europea (N=19). Las proporciones promedio de aporte biparental europeo, africano e indígena americano fueron 78, 8 y 15% respectivamente en el grupo no europeo y 85, 6 y 8% en el grupo europeo (ver Figura 21).

Pese a que se observó cierta tendencia a una mayor proporción del aporte parental europeo, acompañada de una menor contribución porcentual del componente indígena, en el grupo de individuos con ascendencia materna europea, se analizó su significancia estadística a través de la prueba de Mann-Whitney. Las diferencias registradas entre ambos grupos en las proporciones europea, africana e indígena no resultaron estadísticamente significativas, siendo los valores de p 0,27, 0,50 y 0,17 respectivamente (ver Tabla 20).

Figura 21. Comparación del aporte biparental europeo, africano e indígena americano según la ascendencia materna en la muestra poblacional de Tacuarembó.



MtNE: ascendencia materna no europea. MtE: ascendencia materna europea.

En base a estos resultados, se puede concluir que no existe evidencia de asociación entre la ancestría materna obtenida del análisis de los polimorfismos del ADNmt y la ancestría biparental estimada a partir del genotipado del panel de AIMs, en la muestra poblacional de Tacuarembó. De todos modos se requiere cautela considerando el tamaño pequeño de los grupos comparados.

Tabla 20. Comparación de las proporciones biparentales entre grupos con ancestría materna no europea y europea, dentro de la muestra poblacional de Tacuarembó.

| Ancestría AIMs | Haplo. No Eur. | Haplo. Eur. | p |
|-----------------------|-----------------------|--------------------|----------|
| Europea | 0,78 | 0,85 | 0,269 |
| Africana | 0,08 | 0,06 | 0,495 |
| I. Americana | 0,15 | 0,08 | 0,167 |

Prueba no paramétrica de Mann-Whitney, límite de significación ($\alpha/3$): 0,0167.

6 Discusión

En el presente trabajo se estudió por primera vez en una población de Uruguay la región genómica que comprende el intrón 13 del gen *MCM6*, con demostrada actividad potenciadora de la expresión del gen *LCT*, en la que se ubican la mayor parte de los polimorfismos asociados al fenotipo lactasa persistente (LP). Teniendo en cuenta los antecedentes que describían a la población uruguaya en general y a la de Tacuarembó en particular, como moderadamente mestizada, con una contribución europea predominante y modestos aportes de africanos e indígena americanos a nivel autosómico (Sans et al. 1997; Bonilla et al 2004; Hidalgo et al 2005), resultaba esperable que el principal polimorfismo observado fuera C/T-13910 (rs4988235) que presenta su máxima frecuencia en poblaciones europeas.

6.1 Ancestría genética

Estudios realizados en el departamento de Tacuarembó habían estimado el aporte parental autosómico utilizando marcadores clásicos (grupos sanguíneos, enzimas eritrocitarias y proteínas séricas) y diferentes aproximaciones metodológicas (identidad génica, y máxima verosimilitud), encontrando porcentajes de aporte europeo, africano e indígena de 65, 15 y 20% respectivamente (Sans, Salzano & Chakraborty 1997). Si se compara con los resultados obtenidos en el presente estudio, se puede evidenciar un mayor aporte europeo promedio (80,4%) mientras que las proporciones ancestrales africana e indígena fueron menores, 6,9 y 12,7% respectivamente. Si bien se mantiene la relación entre los aportes continentales, se aprecia una estimación mayor del componente europeo en detrimento del componente no europeo. Estas diferencias podrían estar relacionadas fundamentalmente con el método utilizado para estimar ancestría (marcadores clásicos vs AIMs), aunque diferencias en el perfil socioeconómico de los individuos muestreados o en sus características genealógicas podrían también estar influenciando los resultados. Además, se debe tener en mente que entre ambos estudios ha transcurrido prácticamente una generación. Los porcentajes promedio de aporte europeo, africano e indígena, obtenidos con el mismo set de AIMs y utilizando también el programa STRUCTURE, a partir de una muestra de hipertensos de Tacuarembó (Flores 2019), fueron 73,4, 7,9 y 18,6% respectivamente. Si bien las proporciones de ancestría continental tendieron a ser más similares, el menor porcentaje de aporte europeo y el mayor porcentaje de aporte nativo americano, se vieron reflejados en los resultados de las pruebas de Mann-Whitney, con valores p de 0,011 y 0,012 respectivamente, ambos inferiores a $\alpha/3$. Una posible explicación para estas discrepancias podría radicar en los diferentes criterios utilizados para la selección de los individuos que integraron estas muestras. Mientras que para integrar la muestra de hipertensos, los individuos y sus padres debían haber nacido en la región Nordeste (Flores 2019), los

individuos de la muestra poblacional de Tacuarembó, así como sus progenitores, podían haber nacido fuera de la región. En efecto, al comparar la muestra de hipertensos con la sub-muestra de 35 individuos de la muestra poblacional de Tacuarembó cuyos dos progenitores habían nacido en este departamento, las diferencias aparecían algo más atenuadas, siendo los porcentajes de aporte promedio europeo, africano e indígena de 80,4, 6,2 y 13,4 respectivamente. Los resultados de la prueba de Mann-Whitney en este caso arrojaron valores-p de 0,038 y 0,046 para las proporciones de europeos e indígenas respectivamente, estando estos por encima del límite de significancia $\alpha/3$ (0,0167).

La muestra dirigida a PIL residentes en Montevideo resultó ser significativamente diferente a la muestra de referencia de residentes en Montevideo y Maldonado, usuarios de IAMC (Bonilla et al. 2015), en las contribuciones biparentales europea, africana e indígena americana: 93,3 y 83,5% ($p=0,0001$), 2,5 y 7,8% ($p<0,0001$) y 4,2 y 9,4% ($p=0,0007$) respectivamente. Si bien el tamaño pequeño de esta muestra ($N=14$) requiere que estos resultados se analicen con cautela, se puede observar que el aporte europeo resultó similar al comunicado por Sans y cols., (1997) (92%) quienes a su vez encontraron una mayor contribución africana (7%) y una muy baja proporción indígena (1%) en una muestra de Montevideo (Sans, Salzano & Chakraborty 1997). Por su lado, los resultados de la estimación de ancestría biparental de usuarios de IAMC de Montevideo y Maldonado, fueron muy similares a los reportados por Hidalgo y cols., (2005) en una muestra obtenida en Montevideo, quienes encontraron aportes europeo, africano e indígena de 84,1, 5,6 y 10,4% respectivamente (Hidalgo et al. 2005).

En lo referente a la ancestría por ADNmt, las proporciones de haplogrupos europeos, africanos e indígena americanos se habían estimado en 21, 17 y 62% respectivamente, a partir de una muestra de individuos que se atendieron en el Hospital Regional de Tacuarembó en el período 1991-1992 (Bonilla et al. 2004). Estos

valores difieren de los obtenidos en este trabajo para la muestra poblacional de Tacuarembó, evidenciándose un menor aporte materno indígena (48%), una mayor contribución europea (33%) y similar proporción de haplogrupos africanos (19%). La muestra de hipertensos de Tacuarembó (Flores 2019) presentó porcentajes de haplogrupos europeos, africanos e indígenas de 32, 8 y 60% respectivamente, y al ser comparada con la muestra poblacional presentó un valor-p de 0,055, apenas superior al umbral de significancia (0,05). La menor proporción de haplogrupos indígenas observados en este trabajo podría explicarse quizás por los criterios más laxos, en torno al lugar de nacimiento de los individuos y sus progenitores, aplicados para la conformación de la muestra poblacional de Tacuarembó. De hecho, al excluir aquellos individuos hijos de madres no nacidas en este departamento, la contribución materna indígena ascendió a 58%, fundamentalmente a expensas de una disminución del aporte europeo (25%), manteniéndose relativamente constante la proporción de haplogrupos africanos (17%). Llamativamente, estas proporciones resultaron muy similares a las observadas en el estudio de Bonilla y cols., (2004) realizado a partir de muestras obtenidas en el Hospital Regional de Tacuarembó una generación atrás (Bonilla et al. 2004). En 2011, un 13,9% de los residentes en el Departamento de Tacuarembó habían nacido en otros Departamentos del Uruguay (95,4%) o en otro país (4,6%), constituyendo los inmigrantes recientes (de 2006 en adelante) un 4,6% del total de la población, siendo mayoritariamente uruguayos provenientes de otros Departamentos (92,2%) o del exterior (4%) (Instituto Nacional de Estadística INE 2013). Por tanto, una posible explicación a las diferencias observadas, tanto en la ancestría biparental como en la materna, entre la muestra poblacional de Tacuarembó y las muestras utilizadas en estudios anteriores podría ser la inmigración reciente hacia el departamento, aunque se requerirían más datos para probar tal hipótesis.

En residentes en Montevideo, se había estimado la frecuencia de haplogrupos indígena americanos en 20%, mientras que el restante 80% correspondió a

haplogrupos no nativo americanos sin discriminar (Gascue et al. 2005). Bonilla y cols., (2015) a su vez, encontraron contribuciones parentales europea, africana e indígena de 56, 8 y 37% respectivamente, en una muestra obtenida de hospitales públicos y clínicas privadas localizadas en distintas regiones del Uruguay (Bonilla et al. 2015). Considerando específicamente la muestra de residentes en Montevideo, los aportes fueron 53% europeo, 9% africano y 35% indígena, no encontrándose diferencias significativas al comparar con la muestra de mujeres nacidas en Montevideo (Sans et al. No publicado). En este mismo trabajo, se encontraron diferencias significativas en la proporciones de aporte europeo, africano e indígena, entre usuarias de Servicios de Salud del Estado (ASSE) y usuarias de IAMC, siendo los aportes 52, 8 y 40% respectivamente para las primeras, y 69, 12 y 20% respectivamente para las segundas. Al ponderar por el porcentaje de la población montevideana que se atiende en ASSE, Sans y cols., ajustaron la estimación del aporte europeo, africano e indígena para Montevideo en 64, 11 y 25% (Sans et al. No publicado). Tomando en consideración lo anterior, para comparar las proporciones de ancestría por línea materna obtenidas en el presente trabajo en la muestra dirigida a PIL residentes en Montevideo, se tomó como referencia una muestra de residentes en Montevideo y Maldonado, usuarios de IAMC, que presentaron proporciones de haplogrupos europeos, africanos e indígenas de 77, 7 y 16% respectivamente. De los 23 individuos PIL de Montevideo, un 74% se asignaron a haplogrupos europeos y un 26% a haplogrupos indígenas, no encontrándose haplogrupos de origen africano. No se evidenciaron diferencias significativas en la ancestría materna entre PIL de Montevideo y la muestra de referencia de Montevideo, lo que permitió analizar la asociación entre ancestría por ADNmt y genotipo C/T-13910 combinando ambas muestras. Sin embargo, no se puede descartar un posible efecto aleatorio asociado al tamaño pequeño de la muestra de PIL en el resultado obtenido.

6.2 Polimorfismos asociados a LP

En la muestra poblacional de Tacuarembó, que presentó un aporte europeo promedio de 80,4% a nivel autosómico, la frecuencia de la variante asociada a LP: T-13910 se ubicó en el 33%. La comparación con otras poblaciones sudamericanas muestra que Tacuarembó presentó una frecuencia de T-13910 muy similar a la de otras poblaciones de origen predominantemente europeo, como eurobrasileños, que presentaron una frecuencia de 33% para esta variante en Curitiba (Boschmann et al. 2016) y de 29,5 % en Porto Alegre (Friedrich, Santos, et al. 2012). Por otro lado, la frecuencia de T-13910 obtenida en este trabajo resultó mayor que la informada para otras poblaciones mestizas del continente, caracterizadas por presentar una menor contribución europea: 22% en el centro de Chile (Fernández et al. 2016), 20,4 % en el nordeste de Brasil, 17,5% en el norte de Brasil (Friedrich, Santos, et al. 2012) y 10% en el Caribe colombiano (Mendoza-Torres et al. 2009). Estos resultados refuerzan la hipótesis de que la variante T-13910 fue introducida por los inmigrantes europeos que han estado arribando al continente americano desde el inicio del proceso de colonización, por lo que su frecuencia está fuertemente influenciada por la proporción de ancestría europea de la población estudiada (Paz y Miño et al. 2016).

Fundada en 1832 como una avanzada para controlar la frontera con Brasil, la ciudad de Tacuarembó recibió mayormente a pobladores de origen brasileño portugués, aunque algunas familias de ancestría española e italiana se trasladaron desde Montevideo para radicarse en la zona *a posteriori* de su fundación (Bonilla et al. 2004). Considerando la historia demográfica de Tacuarembó y el predominio del aporte biparental europeo encontrado en el presente trabajo, se podría especular con que la frecuencia del alelo derivado T-13910 sea similar, quizás algo menor, a la observada en la península ibérica. En efecto, se han informado frecuencias de T-13910 de 40,2% en el centro-norte de Portugal (Manco et al. 2017), de 37% en España (Rasinperä et al. 2005) y de 36,5% en Islas Canarias (Almon, Álvarez-León & Serra-Majem 2012)

ajustándose aceptablemente a lo esperado considerando la información demográfica disponible. De hecho, la frecuencia de T-13910 observada en las poblaciones sudamericanas no depende solo de la proporción del aporte parental europeo, sino también de la frecuencia de este alelo en la población de origen. De este modo, la diferencia observada en las frecuencias del alelo derivado europeo entre menonitas de Paraná, al sur de Brasil, (65%) y eurobrasileños de ese mismo Estado (33%) refleja este fenómeno, atribuible en parte al efecto fundador de estas poblaciones (Boschmann et al. 2016). Como se planteó en los antecedentes, la frecuencia del alelo T-13910 en Europa varía notablemente, siendo de 73 a 87% en las Islas Británicas, 66% en vascos, 52% en alemanes, 45 a 58% en austríacos, 54 a 62% en Finlandeses, 40% en portugueses, 37% en españoles, 38% en franceses, 15 a 28% en pueblos fino-úgricos del noreste de Europa, llegando a su frecuencia mínima en el sur de Italia, con un 6% (Mulcare et al. 2004; Rasinperä et al. 2005; Enattah et al. 2007; 2008; Kruttli et al. 2014; Manco et al. 2017). Por tanto, la composición del aporte parental europeo tiene influencia en la frecuencia de este alelo en poblaciones del nuevo mundo. Así, poblaciones de origen predominantemente británico, como eurodescendientes de Utah (Estados Unidos) y Nueva Zelanda, presentan frecuencias de T-13910 de 74 y 72% respectivamente (Enattah et al. 2007; Nolan et al. 2010).

Las otras variantes asociadas a LP halladas en este trabajo ya habían sido previamente encontradas, también en muy bajas frecuencias, en otros estudios realizados en Sudamérica. La variante G-13915 (rs41380347) que en Tacuarembó presentó una frecuencia de 0,4%, apareció en un 0,5% de mestizos de Ecuador (Paz y Miño et al. 2016). Por su parte, el alelo derivado T-14011 (rs4988233), cuya frecuencia en Tacuarembó fue de 0,4%, había sido encontrado en poblaciones del nordeste y norte de Brasil, presentando frecuencias de 1,1 y 0,5% respectivamente (Friedrich, Santos, et al. 2012). El alelo G-13915 presenta su máxima frecuencia en Arabia Saudita, donde llega al 57%, exhibiendo frecuencias de 10% en otras poblaciones

árabes de Cercano Oriente, mientras que en el norte y este de África, su frecuencia es de 9,4 y 3,9% respectivamente (Enattah et al. 2008; Ranciaro et al. 2014). El alelo derivado T-14011 aparece en muy bajas frecuencias en diversas poblaciones de Europa, India e Irán, variando entre 1,5% en suecos y 0,4% en rusos e italianos. Pese a la evidencia que sugiere su funcionalidad *in vitro* incrementando la expresión de genes reporteros, y a que tiende a aparecer en contextos haplotípicos iguales o muy similares, T-14011 es un alelo muy raro y de distribución geográfica dispersa, como para que pueda sugerirse un eventual efecto de la selección sobre este (Liebert et al. 2016). La variante G-13915 apareció en un individuo homocigota para el alelo ancestral C-13910, coincidentemente con lo informado previamente en Ecuador (Paz y Miño et al. 2016), mientras que T-14011 también aparece en un individuo de genotipo CC-13910. Estos hallazgos estarían en consonancia con la hipótesis del origen independiente de estos alelos, incluso apareciendo en contextos haplotípicos diferentes (G-13915), tal como ha sido propuesto por diversos autores (Enattah et al. 2008; Liebert et al. 2016).

En este trabajo no se encontró el alelo derivado C-14010 (rs145946881), también asociado a persistencia de lactasa, el que sí había sido identificado previamente en un individuo heterocigota de ancestría africana en Porto Alegre, al sur de Brasil (Friedrich, Santos et al. 2012). Esta variante es relativamente común en algunos pueblos del este africano, donde alcanza frecuencias de entre 15 y 46% en Tanzania y 21 a 58% en Kenia (Tishkoff et al. 2007; Schlebusch et al. 2013; Ranciaro et al. 2014). También se ha encontrado en menor frecuencia en el sur de África, variando de 2 a 36 % en diversos pueblos de la región del Kalahari (Namibia, Botswana) y de 3 a 13% en pueblos de Sudáfrica (Macholdt et al. 2014, Breton et al. 2014; Ranciaro et al. 2014). La población afro descendiente de Tacuarembó tiene su origen fundamentalmente en los esclavos que llegaron acompañando a familias Brasileñas que se radicaron en esta región durante el siglo XIX, o aquellos que directamente escapaban del Brasil (Pi &

Vidart 1969). Si se toma en consideración que la mayor parte de los esclavos africanos que arribaban al Brasil eran embarcados en África Central Occidental (Loango y Angola) o en la ensenada de Benín (Borucki 2011), no sería esperable que la frecuencia de C-14010 fuera significativa. De hecho, en diversos pueblos bantúes de Congo y Angola, la frecuencia de este alelo derivado es baja, variando entre 0 y 6% (Coelho et al. 2009; Breton et al. 2014).

6.3 Genotipo, fenotipo y consumo de lácteos

Considerando los antecedentes disponibles sobre intolerancia a la lactosa (LI) en Uruguay, la frecuencia poblacional de presuntos intolerantes a la lactosa (PIL) resultó algo menor (29,6%) que la informada previamente (40%) en un estudio clínico aleatorio (Maggi et al. 1987). Es importante tener en cuenta que en el citado estudio se les administró a los participantes una solución de lactosa equivalente a 1 litro de leche, mientras que el consumo de leche fluida en la muestra estudiada probablemente se limitara a pequeñas cantidades, lo que por sí solo puede hacer que individuos con hipolactasia tipo adulto (AH) no experimenten síntomas de LI (Lomer, Parkes & Sanderson 2008). Volviendo al estudio de Maggi y col., (1987) un 38,5% de los individuos clasificados como hipolactásicos resultaron asintomáticos, pese a haber consumido una importante dosis de lactosa (Maggi et al. 1987). Si se traslada este fenómeno a la muestra poblacional de Tacuarembó, cabría esperar que el porcentaje de AH en ésta fuera de 48%. En efecto, si se asume que todos los individuos con genotipo CC para el polimorfismo C/T-13910 son AH, y la frecuencia de este genotipo fue de 44,8%, se estaría evidenciando un buen ajuste entre la frecuencia genotípica observada y la frecuencia proyectada del fenotipo AH bajo estos supuestos.

Sin embargo, no todos los PIL de la muestra poblacional de Tacuarembó presentaron un genotipo CC, encontrándose un 30% que presentaron al menos una copia del alelo derivado T-13910, por lo que asumiendo dominancia, deberían haber presentado un

fenotipo LP. Este fenómeno ya había sido puesto de manifiesto mediante ensayos clínicos ciegos en los que se encontró una débil asociación entre LI auto reportada y el desempeño en las pruebas diagnósticas. En efecto, se ha reportado que 40% de intolerantes autodeclarados no presentaron síntomas luego del consumo de una solución de lactosa (Deng et al. 2015). Asimismo, se ha informado una pobre correlación entre los resultados obtenidos con el test de hidrógeno expirado (H2BT) para el diagnóstico de malabsorción de lactosa y la LI auto reportada (Yang et al. 2013), poniendo de manifiesto que una proporción de LI autodeclarados no son hipolactásicos y que solo una parte de los individuos con deficiencia de lactasa desarrollan síntomas luego de ingerir lactosa. El primer fenómeno se ha relacionado con diversos factores como la intolerancia a polioles, mono, di y oligosacáridos fermentables presentes en la dieta, enfermedades que afectan el tracto digestivo superior provocando malabsorción secundaria (giardiasis, sobrecrecimiento bacteriano, celiaquía) o la enfermedad inflamatoria intestinal (Szilagyi 2015). El segundo fenómeno se ha asociado con la adaptación del microbioma de individuos AH al consumo continuado de lactosa, que lleva a modificaciones en el metaboloma y reduce los efectos de la malabsorción de este disacárido (Deng 2015; Szilagyi, Galiatsatos & Xue 2016). De hecho, de un total de 29 individuos NIL que presentaron el genotipo asociado a AH (CC-13910) en la muestra poblacional de Tacuarembó, 15 declararon consumir leche diariamente. En base a lo discutido antes, resulta plausible que en estos individuos se haya generado un proceso adaptativo en su microbioma intestinal, inducido por el consumo continuo de lactosa, que condujo a la no percepción de síntomas asociados a la ingesta de leche fluida, pese a ser presuntamente hipolactásicos.

Recientemente se ha propuesto el término sensibilidad a la lactosa (SL) incorporando otros síntomas no digestivos asociados a la ingesta de lactosa, como dolor de cabeza, fatiga, dolor muscular y articular, pérdida de concentración, eczema y rash cutáneo,

rinitis, asma, dolor de garganta y palpitaciones, entre otros, observándose una marcada variación individual dentro de un mismo grupo genotípico, en el umbral de consumo de lactosa necesario para desencadenar la sensibilidad (Waud, Matthews & Campbell 2008). Por otro lado, cada vez adquiere mayor relevancia la intolerancia a la caseína (IC), condición mediada por el opioide β -casomorfina bovina 7 (BCM7 por su sigla en inglés), que es liberado por la proteólisis de la β caseína A1, variante de la β caseína A2 de la que difiere en una posición aminoacídica y que aparece exclusivamente en razas bovinas europeas (Pal et al. 2015). Se han atribuido a BCM7 efectos proinflamatorios, inmunomoduladores y sobre la motilidad gastrointestinal, asociándose con síntomas como dolor abdominal, heces fecales blandas, diarrea, constipación o incremento en el tiempo de respuesta y la tasa de error ante estímulos visuales (Pal et al. 2015; Sun et al. 2016). A su vez, se ha informado que en individuos con intolerancia a la lactosa autoreportada, los síntomas característicos, como borborismos, flatulencia, distensión, dolor abdominal, heces blandas y diarrea, muestran una exacerbación cuando se consume leche con una composición mixta de β caseína A1 y A2, en relación con la ingesta de leche conteniendo únicamente β caseína A2 (Sun et al. 2016; Mei et al. 2017). Por último, se debe considerar la alergia a la leche de vaca, que es la alergia más frecuente en infantes y niños jóvenes, siendo provocada por una respuesta del sistema inmune, generalmente mediada por anticuerpos IgE dirigidos contra determinados epítopes conformacionales o secuenciales presentes en las proteínas de la leche (Skripak et al 2007; Nowak-Wegrzyn et al. 2008). Los síntomas varían dependiendo del mecanismo inmunopatológico predominante: IgE dependiente (agudo), IgE dependiente mediado por células o exclusivamente mediado por células (crónico), pudiendo aparecer urticaria, angiedema, rinitis, asma, anafilaxia, dermatitis atópica, disfagia esofágica, reflujo, vómito, disconfort abdominal, emesis, diarrea y heces con mucus y sangre (Benhamou et al. 2009; Sicherer & Sampson 2010).

Aun existiendo la posibilidad de descartar las otras condiciones descritas antes, de todos modos cabría esperar que cierta proporción de individuos con genotipo asociado a LP presentaran un fenotipo AH. Como informaron recientemente Leseva y cols., (2018) el valor predictivo del genotipo C/T-13910 en relación al fenotipo LP, determinado por la actividad de lactasa en biopsias intestinales, disminuye notablemente cuando se trata de individuos heterocigotas. Estos autores identificaron dos posiciones diferencialmente metiladas, una a nivel del promotor de *LCT* y otra en la región potenciadora de *LCT*, donde se ubican los polimorfismos asociados a LP, cuyo estado de metilación mostró un valor predictivo del fenotipo mayor que el obtenido con el propio genotipo (Leseva et al. 2018). Es importante tener en cuenta que la mayor parte de los individuos con genotipo asociado a LP en la muestra analizada en Uruguay son en efecto heterocigotas. Por tanto, otra posible explicación de la no concordancia observada entre genotipo y fenotipo podría relacionarse con diferencias en el patrón de metilación que llevan a la reducción de la expresión de *LCT* y de la actividad de LPH en algunos individuos, pese a ser portadores de una copia del alelo T-13910. En suma, tomando en consideración lo discutido arriba, resulta altamente difícil establecer el fenotipo en relación al *status* digesor/no digesor de lactosa en base a los síntomas autodeclarados por los individuos al completar la encuesta clínica.

Resultados muchos más precisos para el diagnóstico indirecto de AH se han obtenido a partir del desarrollo de métodos como la medición de hidrógeno expirado (H₂BT) permitiendo un diagnóstico simple, sensible, específico y no invasivo de AH (Metz et al. 1975; Newcomer et al. 1975). Más allá de los falsos positivos, digestores de lactosa que son diagnosticados como AH, o de los falsos negativos, no digestores de lactosa diagnosticados como LP, en poblaciones europeas se ha comunicado una excelente correlación entre las frecuencias de LP predichas a partir del genotipo C/T-13910 y las observadas a partir del resultado de estas pruebas (Enattah et al. 2002; Mulcare et al.

2004). En Sudamérica, en un estudio realizado en poblaciones de la región chilena de Coquimbo, se informó una fuerte asociación entre el *status* digestor de lactosa obtenido con el H2BT y el fenotipo LP predicho a partir del genotipo C/T-13910 (Montalvá et al. 2018). Sin embargo, en el Caribe colombiano, la correlación entre el resultado del H2BT y el genotipo C/T-13910 resultó más débil que la reportada en Europa noroccidental, sugiriéndose una concordancia moderada entre los resultados de ambas pruebas, en una población en la que el alelo T-13910 aparece con una frecuencia de 10% (Mendoza-Torres et al. 2009). De hecho, en algunas regiones de Europa caracterizadas por presentar frecuencias de T-13910 menores al 20%, como ocurre en el centro-sur de Italia o en Cerdeña, se ha informado una correlación más débil entre el genotipo CC-13910 y el resultado del H2BT. En efecto, la proporción de falsos negativos en estas regiones se ubicó entre el 13 y el 36%, reflejando una mayor prevalencia del genotipo CC-13910 que la obtenida a nivel fenotípico como positivos a H2BT (Obinu et al. 2009; Santonocito et al. 2015). Tomando en consideración la frecuencia del alelo derivado T-13910 en la población uruguaya, y la prácticamente ausencia de otros SNPs asociados a LP, cabría esperar una buena correlación entre el genotipo C/T-13910 y el fenotipo determinado a partir del H2BT.

La asociación significativa entre el fenotipo (PIL o NIL) y la frecuencia de consumo de leche, tal como se observó en este trabajo, resulta predecible considerando que la respuesta ante la manifestación de síntomas asociados al consumo de un alimento es con frecuencia la disminución o supresión de su ingesta. Sin embargo, también quedó de manifiesto la asociación entre el fenotipo inferido a partir del genotipo C/T-13910 y la frecuencia de consumo de leche en la muestra poblacional de Tacuarembó. Los resultados de este trabajo mostraron un consumo de leche significativamente menor en individuos AH (genotipo CC) que en LP (genotipos CT más TT). La mayor frecuencia de consumo de leche no fermentada en individuos con genotipo inferido LP en relación al consumo exhibido por individuos de genotipo inferido AH, considerando

la variante C/T-13910, ha sido reportada en diversos estudios realizados en Europa (Bergholdt et al. 2017; Bergholdt et al. 2018; Juhl et al. 2018; Pires-Hartwig & Smith 2018). Menos claros fueron los resultados comunicados por Fernández y cols., (2016) quienes si bien encontraron asociación estadísticamente significativa entre fenotipo LP esperado y mayor consumo de leche en poblaciones de Rapanui y Santiago, no encontraron esta tendencia en población de la IV región de Chile, especulando con que otros podrían ser los factores que estén afectando el patrón de consumo de leche en la población chilena (Fernández et al. 2016). En esta misma línea, Montalvá y cols., (2018) no encontraron asociación significativa entre el genotipo C/T-13910, el fenotipo inferido o el fenotipo obtenido a partir del H2BT y el consumo de leche fresca en poblaciones agro pastorales de la región de Coquimbo, Chile (Montalvá et al. 2018).

Distintos fueron los resultados obtenidos al comparar la frecuencia de consumo de derivados lácteos entre PIL y NIL, no encontrándose diferencias significativas en el patrón de consumo de estos alimentos entre los dos fenotipos observados. Este hallazgo podría explicarse en parte por el menor contenido de lactosa por porción que tienen algunos derivados lácteos (quesos crema, madurados, mozzarella, azules), o por el aporte de bacterias ácido lácticas viables (yogures), lo que mejora la tolerancia de estos alimentos en individuos AH (Lomer Parkes & Sanderson 2008, Szilagyi 2015). También la forma en que se consumen los alimentos que contienen lactosa tiene efecto en el umbral para que aparezcan síntomas de LI, observándose que mientras un individuo AH puede tolerar sin mayores inconvenientes una dosis única de lactosa de 12g en ausencia de otros nutrientes, el umbral de tolerancia parece aumentar a 15 – 18g cuando esta dosis única es acompañada por la ingesta de otros nutrientes (Shaukat et al. 2010; Wilt et al. 2010).

6.4 Genotipo y ancestría genética

Diversos trabajos realizados en Sudamérica habían encontrado diferencias significativas en la frecuencia del alelo derivado T-13910 al comparar poblaciones con diferente porcentaje de aporte europeo dentro de un mismo país, sugiriendo que la frecuencia de esta variable estaba asociada a la ancestría (Mattar et al. 2009; Friedrich Santos et al. 2012; Friedrich, Callegari-Jacques et al. 2012; Paz y Miño et al. 2016). Si bien no era un objetivo del presente trabajo comparar la frecuencia de este alelo entre dos poblaciones de Uruguay, al contar con una muestra de referencia de residentes en Montevideo y Maldonado, que podía ser considerada al azar en relación al fenotipo PIL o NIL, se podía comparar tanto ancestría biparental como frecuencias genóticas C/T-13910. Esta muestra estaba integrada exclusivamente por usuarios de instituciones de atención médica colectivas (IAMC) por lo que cabía esperar una mayor proporción de aporte europeo y una menor proporción de contribución indígena americana, sustentado esto en los hallazgos obtenidos en un estudio de Sans y cols., sobre ancestría genética y estratificación social, no publicado. Aunque dicha tendencia se verificó al comparar esta muestra con la muestra poblacional de Tacuarembó, siendo las contribuciones porcentuales europeas e indígenas en la primera de 83,5 y 9,4 respectivamente, la frecuencia del alelo derivado T-13910 en esta muestra fue menor (27,8%) que la observada en la muestra poblacional de Tacuarembó (33,%). En principio, pese a que resulta llamativa la menor frecuencia de T-13910 en una muestra que tuvo un mayor aporte europeo, no existió evidencia estadística para sustentar que las diferencias observadas fueran significativas ($p = 0,667$), lo que sugeriría la no asociación entre ancestría y genotipo en Uruguay. Una posible explicación a la menor frecuencia del alelo derivado T-13910 obtenida en la muestra de referencia podría radicar en las diferencias en la conformación de la poblaciones del sur del Uruguay y la región Noreste. En particular, los inmigrantes italianos, que arribaron al Uruguay en diversas oleadas, se radicaron fundamentalmente en las

regiones agrícolas y en los centros urbanos ubicados al sur del río Negro o en el litoral noroeste (Pi & Vidart 1969; Bresciano 2010). Teniendo en cuenta que la frecuencia de T-13910 varía entre 12% en el centro-sur de Italia, 11 a 22% en Cerdeña y 18% en el norte de Italia (Sacerdote et al. 2007; Obinu et al. 2010; Santonocito et al. 2014), la menor frecuencia de este alelo observada en residentes de Montevideo y Maldonado, al sur del Uruguay, podría explicarse por un mayor aporte parental italiano en esta región. De todos modos, se requieren nuevos estudios para poder elucidar si esta hipótesis tiene validez.

La estrategia basada en evaluar diferencias en la ancestría biparental al comparar individuos de genotipo CC (fenotipo inferido AH) con individuos CT más TT (fenotipo inferido LP) en la muestra poblacional de Tacuarembó tampoco sugirió asociación estadísticamente significativa entre estas variables. Pese a esto, se pudo observar una tendencia caracterizada por un mayor aporte europeo en individuos con fenotipo inferido LP y una mayor contribución africana en individuos AH, siendo similar el aporte indígena americano en ambos grupos. Resultados similares fueron comunicados por Montalvá y cols., (2018) quienes no encontraron diferencias significativas en la proporción de ancestría europea estimada por AIMs entre los grupos inferidos como AH o LP (Montalvá et al. 2018). En suma, la variabilidad en el aporte proporcional europeo observada entre los individuos de una misma población y el predominio marcado de este aporte parental, también se ven reflejados al agruparlos según su fenotipo inferido AH o LP, por lo que las tendencias observadas no llegan al nivel de significancia estadística definido. Un enfoque diferente, basado en agrupar a los individuos que contaban con estimación de ancestría por AIMs de todas las muestras utilizadas en este trabajo, en un grupo con ancestría europea mayor a 90% y otro con aporte europeo menor a 76%, tampoco mostró diferencias significativas en las proporciones genotípicas de C/T-13910. Por otro lado, el hecho de que la muestra de PIL residentes en Montevideo tenga mayor aporte europeo que la

muestra de referencia de residentes en Montevideo y Maldonado, constituye otra señal sugestiva de la falta de asociación entre ancestría biparental y genotipo C/T-13910. En resumen, por ninguna de las aproximaciones descritas arriba se pudo establecer la existencia de asociación entre ancestría por AIMs y genotipo C/T-13910 en las poblaciones estudiadas de Uruguay.

Al igual que se evidenció al analizar la asociación entre ancestría biparental y genotipo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la proporción de haplogrupos europeos, africanos e indígena americanos entre los dos grupos genotípicos, tanto en la muestra de Tacuarembó como en la de Montevideo. De hecho, a diferencia de lo ocurrido con los AIMs, en este caso ni siquiera se pudo registrar una tendencia de mayor proporción parental en un grupo en relación al otro. Se debe tener en cuenta que las proporciones biparentales europea, africana e indígena no mostraron diferencias significativas al ser agrupados los individuos de la muestra poblacional de Tacuarembó por origen del ADNmt, en no europeos y europeos, siendo en ambos grupos predominante la contribución europea. Como se ha planteado previamente, la elevada frecuencia de haplogrupos indígenas observados en la población de Tacuarembó podrían ser explicados por un evento inicial de interacción direccional entre europeos e indígenas, seguido de una rápida expansión demográfica de esta población por inmigración extra regional, fundamentalmente masculina (Bonilla et al. 2004; Bertoni et al. 2005).

6.5 Futuras líneas de investigación

Cerca de un 70% de los europeos presentan el haplogrupo R1B M412 del cromosoma "Y", cuya frecuencia disminuye en clina de noroeste a sureste del continente, habiéndose sugerido un efecto fundador de este clado, relacionado con la expansión periférica de pueblos agricultores durante el neolítico temprano (Myres et al. 2011). Considerando que la variación de la frecuencia de este haplogrupo es muy similar al

patrón observado en la frecuencia del alelo derivado asociado a LP, T-13910, sería interesante evaluar si existe algún tipo de asociación entre este haplogrupo y el genotipo C/T-13910. En la población de Tacuarembó, la contribución masculina apenas muestra un patrón tri-híbrido, presentando un predominio neto del aporte europeo (Bertoni et al. 2005). En efecto, recientemente Mut encontró que la proporción de haplogrupos de origen europeo en Tacuarembó y Montevideo fue de 93 y 99% respectivamente, siendo el haplogrupo R1b el que presentó mayor frecuencia, apareciendo en porcentajes de 49,2 y 44,9 respectivamente en estas poblaciones (Mut 2019). Por otra parte, la inclusión en futuros estudios de un mayor número de individuos, incorporando otras regiones del Uruguay y eventualmente, colectivos identificados con un determinado origen continental, como afrodescendientes o indígenas americanos, podría permitir obtener una mejor resolución de la relación entre genotipos LP y ancestría genética.

El diseño de estudios en los que se incorpore el genotipado de *loci* polimórficos en la región genómica circundante al intrón 13 del gen *MCM6*, donde se localizan la mayor parte de los polimorfismos asociados a LP, podría permitir la construcción de haplotipos *LCT* y la evaluación de los posibles efectos del mestizaje y otros procesos microevolutivos sobre esta región potenciadora en la población Uruguaya. Por otro lado, la posibilidad de incluir una determinación fenotípica más precisa, como el H2BT, permitiría evaluar con mayor refinamiento la asociación del genotipo C/T-13910 y el *status* digester de lactosa, así como la concordancia entre ambas aproximaciones. Máxime considerando los resultados de este trabajo en relación a la frecuencia del alelo derivado T-13910 (33%) y a la muy baja frecuencia de otras variantes asociadas a LP en la población estudiada, lo que debería tender a favorecer un buen ajuste entre el fenotipo inferido a partir del genotipo, y el fenotipo observado al aplicar el H2BT.

A partir del reconocimiento de la asociación causal del alelo derivado T-13910 con la persistencia de lactasa e indirectamente con un mayor consumo de leches no

fermentadas, fundamentalmente en poblaciones europeas, diversos estudios han evaluado la asociación de esta variable con una variedad de condiciones y patologías, a veces con resultados contradictorios. El genotipo CC-13910 ha sido identificado como un factor de riesgo asociado a la aparición de fracturas de cadera o muñeca en población adulta de Finlandia (Enattah et al. 2005), mientras que en otro estudio realizado en Dinamarca no se encontró evidencia de asociación entre genotipo C/T-13910 y riesgo de fractura de cadera (Bergholdt et al. 2018). Si bien no se han obtenido resultados que sugieran asociación entre genotipo C/T-13910 y diabetes tipo I y II (Enattah et al. 2004; Bergholdt et al. 2018), sí parece haber evidencia a favor de una asociación causal entre el alelo T-13910, el incremento en el índice de masa corporal y el riesgo de desarrollar obesidad en poblaciones de Europa (Almon, Álvarez-León & Serra-Majem 2012; Pires-Hartwig & Smith 2018). Rasinperä y cols., (2005) informaron que el genotipo CC-13910 se asoció significativamente con el riesgo de desarrollar cáncer colorrectal en Finlandia, pero no encontraron evidencia de asociación con esta patología en población británica o española (Rasinperä et al. 2005). A su vez, se ha reportado la asociación entre el alelo T-13910 y el riesgo de desarrollar la enfermedad de Crohn, un tipo específico de enfermedad inflamatoria intestinal, en población adulta de Nueva Zelanda (Nolan et al. 2010). Por otro lado, no se ha encontrado evidencia de asociación significativa entre genotipo C/T-13910 y mortalidad por causas cardiovasculares, por cáncer o por otras causas (Bergholdt et al. 2017), o con el desarrollo de acné adulto (Juhl et al. 2018) en la población de Dinamarca. En otros casos, se observó asociación entre el genotipo CC-13910 y factores relacionados con el desarrollo de una patología o la intensidad de sus síntomas, como el nivel de homocisteína en pacientes diagnosticados con depresión mayor (Enko et al. 2018), o un mayor score sintomático en pacientes con dispepsia funcional (Wortmann et al. 2018). Considerando que en el presente trabajo el genotipo C/T-13910 mostró estar asociado significativamente a la frecuencia de consumo de leche fresca, podría constituir un punto de partida para el diseño de estudios

mendelianos aleatorizados en los que se analice la asociación del genotipo, como variable instrumental, con diversas patologías prevalentes en la población Uruguaya.

7 Conclusiones

El principal polimorfismo asociado a persistencia de lactasa identificado en la población uruguaya fue la transición C/T-13910 (rs4988235), presentando el alelo derivado T-13910 una frecuencia en la población de Tacuarembó de 33%. Esta frecuencia resultó muy similar a la observada en otras poblaciones sudamericanas de origen predominantemente europeo y algo menor a la informada para la península ibérica, de donde son originarios mayoritariamente los inmigrantes europeos que arribaron a esta región del país.

Se encontró evidencia estadísticamente significativa de asociación entre el genotipo CC por un lado, y los genotipos CT más TT por el otro, con los fenotipos observados presuntamente intolerante a la lactosa (PIL) y no intolerante a la lactosa (NIL) respectivamente. También quedó de manifiesto la pobre concordancia entre fenotipos observados y genotipos C/T-13910, atribuible fundamentalmente a las dificultades relacionadas con la definición del fenotipo a partir de los síntomas autoreportados por los participantes, lo que oscureció la dominancia previamente postulada del alelo T-13910.

También el genotipo C/T-13910 y la frecuencia de consumo de leche fresca resultaron estar asociados, de modo tal que los individuos que portaban una o dos copias del alelo derivado T-13910 declararon una frecuencia significativamente mayor de consumo de este alimento que aquellos que presentaron un genotipo CC. Por otro lado, el consumo de derivados lácteos, como quesos y yogures, no se vio afectado por el genotipo, hallazgo presumiblemente relacionado con el menor tenor de lactosa, con

el aporte de bacterias ácido lácticas viables o con diferencias en el patrón de consumo de estos productos.

En la muestra poblacional de Tacuarembó se identificaron además otros 2 polimorfismos asociados a LP, C/T-14011 (rs4988233) y T/G-13915 (rs41380347), ambos en heterocigocis y con una frecuencia de los alelos derivados de 0,4%. Mientras que el primero presenta una distribución dispersa, apareciendo en diversas poblaciones de Europa y Asia en frecuencias bajas, el segundo es muy frecuente en Arabia Saudita y otras poblaciones árabes de cercano oriente. Llamativamente, ambos individuos informaron ser PIL, teniendo un genotipo CC-13910 concordante con tal condición.

Las estimaciones de ancestría biparental por AIMS y de ancestría uniparental materna por polimorfismos en el ADNmt, resultaron similares a las informadas en publicaciones anteriores para Montevideo, aunque en el caso de Tacuarembó se verificaron algunas diferencias significativas. En general, la muestra poblacional de Tacuarembó presentó proporciones mayores de aporte europeo y africano y contribuciones menores del componente indígena americano, que las informadas previamente en otros estudios, pudiendo atribuirse este hallazgo a diferencias en los criterios usados para el enrolamiento de los participantes.

No se encontró evidencia de asociación significativa entre la ancestría uni o biparental y el genotipo C/T-13910, tanto en la muestra de Tacuarembó como en la de Montevideo, o en la comparación entre ambas muestras. Si bien resultados similares habían sido informados en otras poblaciones sudamericanas con una contribución europea menor, considerando el tamaño reducido de las muestras utilizadas en este trabajo, estudiar esta asociación con muestras más grandes, incluyendo poblaciones de otras regiones del Uruguay, podría aumentar el poder estadístico de las pruebas utilizadas y así contribuir a la elucidación del carácter de esta asociación.

Finalmente, se considera que este trabajo intenta contribuir a la comprensión de la variabilidad genética de la población uruguaya pudiendo eventualmente servir de punto de partida para el diseño de otros estudios tendientes mejorar el conocimiento sobre la relación entre el genotipo, la ancestría y los procesos microevolutivos en diversas poblaciones del Uruguay. Asimismo, considerando la asociación observada en este estudio entre el genotipo C/T-13910 y el consumo de leche fresca, otras investigaciones podrían evaluar la asociación del polimorfismo C/T-13910 con diversas patologías o condiciones prevalentes en el país.

8 Bibliografía

- Almon, Ricardo, Elisa Álvarez-León, & Lluís Serra-Majem. 2012. "Association of the European Lactase Persistence Variant (LCT-13910 C>T Polymorphism) with Obesity in the Canary Islands". *Plos One*, e43978.
- Amiri, Mehdi, Lena Diekmann, Maren von Köckritz-Blickwede & Hassan Y. Naim. 2015. "The Diverse Forms of Lactose Intolerance and the Putative Linkage to Several Cancers." *Nutrients*, 7:7209-7230.
- Anderson S., A. T. Bankier, B. G. Barrell, M. H. L. de Bruijn, A. R. Coulson, J. Drouin, I. C. Eperon, D. P. Nierlich, B. A. Roe et al. 1981. "Sequence and organization of the human mitochondrial genome". *Nature*, 290:457-465.
- Andrews, Richard M., Iwona Kubacka, Patrick F. Chinnery, Robert N. Lightowers, Douglass M. Turnbull, & Neil Howell. 1999. "Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA". *Nature Genetics*, 23:147.
- Benhamou, Avigael H., Michela.G. Schäppi-Tempia, Dominique.C. Belli, & Philippe A. Eigenmann. 2009. "An overview of cow's milk allergy in children". *Swiss Medical Weekly*, 139:300-307.
- Bergholdt, Helle K. M., Børge G. Nordestgaard, Anette Varbo & Christina Ellervik. 2017. "Lactase persistence, milk intake, and mortality in the Danish general population: a Mendelian randomization study". *Eur J Epidemiol*, 33:171-181.
- Bergholdt, Helle K. M., M. K. Larsen, Anette Varbo, Børge G. Nordestgaard, & Christina Ellervik. 2018. "Lactase persistence, milk intake, hip fracture and bone mineral density: a study of 97 811 Danish individuals and a meta-analysis". *J Intern Med*, 284: 254-269.
- Bertoni, Bernardo, Li Jin, Ranajit Chakraborty, & Mónica Sans. 2005. "Directional Mating and a Rapid Male Population Expansion in a Hybrid Uruguayan Population." *American Journal of Human Biology*, 17:801-808.
- Borucki, Alex. 2011. "The Slave Trade to the Río de la Plata, 1777-1812: Trans-Imperial Networks and Atlantic Warfare". *Colonial Latin American Review*, 20:81-

- Bresciano, Juan A. 2010. La inmigración italiana al Uruguay en perspectiva historiográfica, en: C.M Rita (ed.): *.Un paese chi cambia. Saggi antropologici sull'Uruguay tra memoria e attualità*, 111-136, Roma, Centro de Informazione e Stampa Universitaria.
- Breton, Gwenna, Carina M. Schlebusch, Marlize Lombard, Per Sjödin, Himla Soodyall, & Mattias Jakobsson. 2014. "Lactase Persistence Alleles Reveal Partial East African Ancestry of Southern African Khoe Pastoralists." *Current Biology*. 24:852-858.
- Bonilla, Carolina, Bernardo Bertoni, Horacio Cardoso, Susana González, Nadir Brum Zorrilla & Mónica Sans. 2004. "Substantial Native American Female Contribution to the Uruguay Reveals Past Population of Tacuarembó Episodes of Sex-Biased Gene Flow". *American Journal of Human Biology* 16:289-297.
- Bonilla, Carolina, Bernardo Bertoni, Pedro C. Hidalgo, Nora Artagaveytia, Elizabeth Ackermann, Isabel Barreto, Paula Cancela, et al. 2015. "Breast cancer risk and genetic ancestry: a case–control study in Uruguay". *BMC Women's Health*, 15:11.
- Boschmann, Stefanie E., Angelica B. Boldt, Iliada R. de Souza, Maria L. Petzl-Erler & Lara J. Messias-Reason. 2016. "The Frequency of the *LCT** –13910C>T Polymorphism Associated with Lactase Persistence Diverges among Euro-Descendant Groups from Brazil". *Med Princ Pract*, 25:18-20.
- Bravi, Claudio M., Mónica Sans, Graciela Bailliet, Verónica L. Martínez-Marignac, Mónica Portas, Isabel Barreto, Carolina Bonilla & Nestor O. Bianchi. 1997. "Characterization of mitochondrial DNA and Y-chromosome haplotypes in a Uruguayan Population of African Ancestry." *Human Biology*, 69:641-652.
- Coelho, Margarida, Fernando Sequeira, Donata Luiselli, Sandra Beleza, & Jorge Rocha. 2009. "On the Edge of Bantu Expansions: mtDNA, Y Chromosome and Lactase Persistence Genetic Variation in Southwestern Angola." *BMC Evolutionary Biology* 9:1471-2148.
- Cramp, Lucy J. E., Richard P. Evershed, Mika Lavento, Petri Halinen, Kristiina Mannermaa, Markku Oinonen, Johannes Kettunen, et. al. 2014. "Neolithic dairy farming at the extreme of agriculture in northern Europe". *Proc. R. Soc.*, 281: 20140819.
- Deng, Yanyong, Benjamin Misselwitz, Ning Dai & Mark Fox. 2015. "Lactose Intolerance in Adults: Biological Mechanism and Dietary Management". *Nutrients*, 8020-8035.
- Enattah, Nabil S., Timo Sahi, Erkki Savilahti, Joseph D. Terwilliger, Leena Peltonen, & Irma Järvelä. 2002. "Identification of a Variant Associated with Adult-Type Hypolactasia." *Nature Genetics*, 20:233-237.
- Enattah, Nabil S., Carol Forsblom, Heli Rasinperä, Tiinamaija Tuomi, Per H. Groop, Irma Järvelä, & the FinnDiane Study Group. 2004. "The genetic variant of lactase persistence C (-13910) T as a risk factor for type I and II diabetes in the Finnish population". *European Journal of Clinical Nutrition*, 58:1319-1322.
- Enattah, Nabil S., Raimo Sulkava, Pirjo Halonen, Kimmo Kontula, & Irma Järvelä. 2005. "Genetic Variant of Lactase-Persistent C/T-13910 Is Associated with Bone Fractures in Very Old Age". *JAGS*, 53:79-82.
- Enattah, Nabil S., Aimée Trudeau, Ville Pimenoff, Luigi Maiuri, Salvatore Auricchio,

- Luigi Greco, Mauro Rossi, et al. 2007. "REPORT Evidence of Still-Ongoing Convergence Evolution of the Lactase Persistence T -1 3 9 1 0 Alleles in Humans." *Am. J. Hum. Genet*, 8181:615-625.
- Enattah, Nabil S., Tine G. K. Jensen, Mette Nielsen, Rikke Lewinski, Mikko Kuokkanen, Heli Rasinpera, Hatem El Shanti, et al. 2008. "Independent Introduction of Two Lactase-Persistence Alleles into Human Populations Reflects Different History of Adaptation to Milk Culture." *Am. J. Hum. Genet*, 82:57-72.
- Enko, Dietmar, Andreas Meinitzer, Wolfgang Brandmayr, Gabriele Halwachs-Baumann, Wolfgang J. Schnedl, & Gernot Kriegshäuser. 2018. "Association between increased plasma levels of homocysteine and depression observed in individuals with primary lactose malabsorption". *PLoS ONE* 13:e0202567
- Escoboza, Patrícia Martins Luizari, Maria I. Machado-Fernandes, Luiz C. Peres, Alexandra W. C. Einerhand, Lívia Carvalho-Galvão, et al. 2004. "Adult-Type Hypolactasia: Clinical, Morphologic and Functional Characteristics in Brazilian Patients at a University Hospital." *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 39:361-65.
- Escher, Johanna C., Nellie D. de Koning, Carla G. J. van Engen, Sanjeev Arora, Hans A. Büller, Robert K. Montgomery, & Richard J. Grand. 1992. "Molecular Basis of Lactase Levels in Adult Humans". *J. Clin. Invest.*, 89:480-483.
- Excoffier, Laurent & Heidi E. L. Lischer. 2010. "Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows". *Mol Ecol Resour.* 10:564-567.
- Fernández, Catalina I., & Sergio V. Flores-Carrasco. 2014. "Brief Communication: Lactase Persistence and Dairy Intake in Mapuche and Mestizo Populations from Southern Chile." *American Journal of Physical Anthropology*, 155:482-487.
- Fernández, Catalina I., Nicolás Montalvá, Macarena Arias, Macarena Hevia & Sergio V. Flores-Carrasco. 2016. "Lactase Non-Persistence and General Patterns of Dairy Intake in Indigenous and Mestizo Chilean Populations." *Am. J. Hum. Biol.*, 28:213-219.
- Flores, Sara. 2019. Tesis de Maestría: "Genes relacionados con la metabolización de medicamentos en pacientes hipertensos y población general, y su relación con el mestizaje poblacional en Tacuarembó". *PEDECIBA, UdelaR, Uruguay*.
- Friedrich, Deise C., Sidia M. Callegari-Jacques, M. Luiza Petzl-Erler, Luiza Tsuneto, Francisco M. Salzano, & Mara H. Hutz. 2012. "Stability or Variation? Patterns of Lactase Gene and Its Enhancer Region Distributions in Brazilian Amerindians." *American Journal of Physical Anthropology* 147:427-32.
- Friedrich, Deise C., Sidney E. B. Santos, Ândrea K. C. Ribeiro-dos-Santos, & Mara H. Hutz. 2012. "Several Different Lactase Persistence Associated Alleles and High Diversity of the Lactase Gene in the Admixed Brazilian Population." *PLoS ONE*, 7:e46520.
- Galanter Joshua M, Juan C. Fernandez-Lopez, Christopher R. Gignoux, Jill Barnholtz-Sloan, Ceres Fernandez-Rozadilla, Marc Via, Alfredo Hidalgo-Miranda, Alejandra V. Contreras, Laura Uribe et al. 2012. Development of a Panel of Genome-Wide Ancestry Informative Markers to Study Admixture Throughout the Americas. *PLoS Genet*, 8:e1002554.

- Gascue, Cecilia, Adriana Mimbacas, Mónica Sans, Juan P. Gallino, Bernardo Bertoni, Pedro Hidalgo, & Horacio Cardoso. 2005. "Frequencies of the Four Major Amerindian mtDNA Haplogroups in the Population of Montevideo, Uruguay." *Human Biology*, 77:873-878.
- Gerbault, Pascale, Mélanie Roffet-Salque, Richard P. Evershed & Mark G. Thomas. 2013. "How Long Have Adult Humans Been Consuming Milk?". *IUBMB Life*, 65: 983-990.
- Hall, Thomas A. 1999. "BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT". *Nucleic Acids Symposium Series*, 41:95-98.
- Harvey, Claire B., Yangxi Wang, L A Hughes, Dallas M. Swallow, W P Thurrell, Virginia R. Sams, R Barton, S Lanzon-Miller & Martin Sarner. 1995. "Studies on the expression of intestinal lactase in different individuals". *Gut*, 36:28-33.
- Hassan, Hisham Y., Anke van Erp, Martin Jaeger, Hanan Tahir, Marije Oosting, Leo A. B. Joosten, & Mihai Netea. 2016. "Genetic diversity of lactase persistence in East African populations". *BMC Research Notes*, 9:8.
- Hecht, Anthony, Camille F. Torbey, Helen A. Korsmo, & Ward A. Olsen. 1997. "Regulation of Sucrase and Lactase in Developing Rats: Role of Nuclear Factors That Bind to Two Gene Regulatory Elements". *Gastroenterology*, 112:803-812.
- Homburger, Julian R., Andrés Moreno-Estrada, Christopher R. Gignoux, Dominic Nelson, Elena Sanchez, Patricia Ortiz-Tello et al. 2015. "Genomic Insights into the Ancestry and Demographic History of South America". *PLoS Genet*, 11: e1005602.
- Hidalgo, Pedro C., Milka Bengochea, Doris Abilleira, Adriana Cabrera, & Inés Alvarez. 2005. "Genetic Admixture Estimate in the Uruguayan Population Based on the Loci LDLR , GYPA , HBGG , GC and D7S8" *Int J Hum Genet*, 5:217-222.
- Hollox, Edward J., Mark Poulter, Marek Zvarik, Vladimir Ferak, Amanda Krause, Trefor Jenkins, Nilmani Saha, Andrew I. Kozlov, & Dallas M. Swallow. 2001. "Lactase Haplotype Diversity in the Old World". *Am. J. Hum. Genet.*, 68:160-172.
- Ingram, Catherine J. E., Charlotte A. Mulcare, Yuval Itan, Mark G. Thomas & Dallas M. Swallow. 2008. "Lactose digestion and the evolutionary genetics of lactase persistence". *Hum Genet*, 124:579-591.
- Instituto Nacional de Estadística. 2011. Censos 2011: Resultados finales, Tacuarembó. [www5.ine.gub.uy > censos2011 > resultadosfinales > tacuarembo](http://www5.ine.gub.uy/censos2011/resultadosfinales/tacuarembo).
- Instituto Nacional de Estadística. 2013. Indicadores sociodemográficos seleccionados por Sección Censal, Localidades Censales y áreas gestionadas por municipios a partir de la información del censo 2011. [https://uruguay.unfpa.org > sites > default > files > pub-pdf > 147_file1](https://uruguay.unfpa.org/sites/default/files/pub-pdf/147_file1)
- Itan, Yuval, Bryony L. Jones, Catherine J. E. Ingram, Dallas M. Swallow, & Mark G. Thomas. 2010. "A Worldwide Correlation of Lactase Persistence Phenotype and Genotypes." *BMC Evolutionary Biology*, 10:36.
- Juhl, Christian R., Helle K. M. Bergholdt, Iben M. Miller, Gregor B. E. Jemec, Jørgen K. Kanters & Christina Ellervik. 2018. "Lactase Persistence, Milk Intake, and Adult Acne: A Mendelian Randomization Study of 20,416 Danish Adults". *Nutrients*, 10:1041.

- Krüttli, Annina, Abigail Bouwman, Gülfirde Akgül, Philippe Della Casa, Frank Rühli, & Christina Warinner. 2014. "Ancient DNA Analysis Reveals High Frequency of European Lactase Persistence Allele (T-13910) in Medieval Central Europe." *PLoS ONE*, 9:e86251.
- Leonardi, Michela, Pascale Gerbault, Mark G. Thomas & Joachim Burger. 2012. "The evolution of lactase persistence in Europe. A synthesis of archaeological and genetic evidence". *International Dairy Journal*, 22:88-97.
- Leseva, Milena N., Richard J. Grand, Hagen Klett, Melanie Boerries, Hauke Busch, Alexandra M. Binder & Karin B. Michels. 2018. "Differences in DNA Methylation and Functional Expression in Lactase Persistent and Non-persistent Individuals". *Scientific Reports*, 8:5649.
- Lewinsky, Rikke H., Tina G. K. Jensen, Jette Møller, Allan Stensballe, Jørgen Olsen, & Jesper T. Troelsen. 2005. "T-13910 DNA Variant Associated with Lactase Persistence Interacts with Oct-1 and Stimulates Lactase Promoter Activity in Vitro." *Human Molecular Genetics* 14:3945-3953.
- Liebert, Anke, Bryony L. Jones, Erik T. Danielsen, Anders Krüger-Olsen, Dallas M. Swallow & Jesper T. Troelsen. 2016. "In Vitro Functional Analyses of Infrequent Nucleotide Variants in the Lactase Enhancer Reveal Different Molecular Routes to Increased Lactase Promoter Activity and Lactase Persistence". *Annals of Human Genetics*, 80:307-318.
- Liebert, Anke, Saioa López, Bryony L. Jones, Nicolas Montalva, Pascale Gerbault, Winston Lau, Mark G. Thomas, Neil Bradman, Nikolas Maniatis & Dallas M. Swallow. 2017. "World-wide distributions of lactase persistence alleles and the complex effects of recombination and selection". *Hum Genet*, 136:1445-1453.
- Lisker, Rubén, Beatriz González, & Magalí Daltabuit. 1975. "Recessive inheritance of the adult type of intestinal lactase deficiency". *Am J Hum Genet.*, 27:662-664.
- Lloyd, Mark, Gregory Mevissen, Michael Fischer, Ward Olsen, David Goodspeed, Michele Genini, Werner Boll, Giorgio Semenza, & Ned Mantei. 1992. "Regulation of Intestinal Lactase in Adult Hypolactasia". *The Journal of Clinical Investigation*, 99:524-529.
- Lomer, Miranda C. E., Gareth. C. Parkes, & Jeremy D. Sanderson. 2008. "Review Article: Lactose Intolerance in Clinical Practice - Myths and Realities." *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 27:93-103.
- Macholdt, Enrico, Vera Lede, Chiara Barbieri, Sununguko W. Mpoloka, Hua Chen, Montgomery Slatkin, Brigitte Pakendorf, & Mark Stoneking. 2014. "Tracing Pastoralist Migrations to Southern Africa with Lactase Persistence Alleles." *Current Biology*, 24:875-879.
- Maggi, Rodolfo, Beatriz Sayagués, Alicia Fernández, Beatriz Romero, Patricia Barusso, Carmen Hernández, Mabel Magariños et al. 1987. "Lactose Malabsorption and Intolerance in Uruguayan Population by Breath Hydrogen Test (H2)". *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 6:373-376.
- Maiuri, Luigi, Mauro Rossi, Valeria Raia, Francesco Paparo, Salvatore Coletta, Francesco Mazzeo, Andrea Breglia, & Salvatore Auricchio. 1994. "Morphological Method for the Diagnosis of Human Adult Type Hypolactasia." *Gut*, 35:1042-1046.
- Manco, L, H. Dias, M. Muc, & C. Padez. 2017. "The lactase -13910C>T polymorphism

- (rs4988235) is associated with overweight/obesity and obesity-related variables in a population sample of Portuguese young adults". *European Journal of Clinical Nutrition*, 71:21-24.
- Mantei, Ned, M.Villa, Thomas Enzler, Hans Wacker, Werner Boll, P.James, W.Hunziker & Giorgio Semenza. 1988. "Complete primary structure of human and rabbit lactase-phlorizin hydrolase: implications for biosynthesis, membrane anchoring and evolution of the enzyme". *The EMBO Journal*, 7:2705-2713.
- Mattar, Rejane, Maria S. Monteiro, Cibele A. Villares, Aníbal F. Santos, Joyce M. K. Silva, & Flair J. Carrilho. 2009. "Frequency of LCT -13910C>T Single Nucleotide Polymorphism Associated with Adult-Type Hypolactasia/lactase Persistence among Brazilians of Different Ethnic Groups." *Nutrition Journal*, 8:46.
- Mei, He, Jianqin Sun, Zhuo Qin Jiang, & Yue Xin Yang. 2017. "Effects of cow's milk beta-casein variants on symptoms of milk intolerance in Chinese adults: a multicentre, randomised controlled study". *Nutrition Journal*, 16:72.
- Mendoza-Torres, Evelyn, Lourdes L. Varela-Prieto, José L. Villarreal-Camacho, & Daniel A. Villanueva-Torregroza. 2012. "Diagnosis of Adult-Type Hypolactasia/Lactase Persistence: Genotyping of Single Nucleotide Polymorphism (SNP C/T -13910) Is Not Consistent with Breath Test in Colombian Caribbean Population." *Arq Gastroenterol* 49:5-8.
- Metz, Geoffrey, Timothy J. Peters, David J. A. Jenkins, Alvin Newman & Laurence M. Blendis. 1975. "Breath Hydrogen as a Diagnostic Method for Hypolactasia". *The Lancet*, 305:1155-1157.
- Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca- Área de Estadísticas Agropecuarias. 2016. Anuario estadístico agropecuario 2016. <http://www.mgap.gub.uy/unidad-ejecutora/oficina-de-programacion-y-politicas-agropecuarias/publicaciones/anuarios-diea/anuario2016>
- Montalvá, Nicolas, Kaustubh Adhikari, Anke Liebert, Javier Mendoza-Revilla, Sergio V. Flores, Ruth Mace & Dallas M. Swallow. 2018. "Adaptation to milking agropastoralism in Chilean goat herders and nutritional benefit of lactase persistence." *Ann Hum Genet.*,1-12.
- Motohashi, Yasuko, Akiko Fukushima, Takashi Kondo & Keiko Sakuma. 1997. "Lactase Decline in Weaning Rats Is Regulated at the Transcriptional Level and Not Caused by Termination of Milk Ingestion". *The Journal of Nutrition*, 127:1737-1743.
- Mut, Patricia. 2019. Tesis de Maestría: "Estudio de ancestría y linajes paternos en la población uruguaya a través del análisis de marcadores moleculares del cromosoma Y". *PEDECIBA, UdelaR, Uruguay*.
- Myres Natalie M., Siiri Rootsi, Alice A. Lin, Mari Järve, Roy J. King, Ildus Kutuev, Vicente M. Cabrera, Elza K. Khusnutdinova, Andrey Pshenichnov, et al. 2011. "A major Y-chromosome haplogroup R1b Holocene era founder effect in Central and Western Europe". *Eur J Hum Genet.*, 19:95-101.
- Naim, Hassan Y., Stephen W. Lacey, Joseph F. Sambrook & Mary-Jane H. Gething. 1991. "Expression of a Full-length cDNA Coding for Human Intestinal Lactase-Phlorizin-Hydrolase Reveals an Uncleaved, Enzymatically Active and Transport-competent Protein". *The Journal of Biological Chemistry*, 266:12313-12320.

- Naim, Hassan Y. 2001. "Molecular and Cellular Aspects and Regulation of Intestinal Lactase-Phlorizin Hydrolase". *Histol Histopathol*, 16:553-561.
- Newcomer, Albert, Douglas B. McGill, Paul J. Thomas, & Alan F. Hofmann. 1975. "Prospective Comparison of Indirect Methods for Detecting Lactase Deficiency". *N Engl J Med*, 293:1232-1236.
- Nolan, Deborah J., Dug Y. Han, Wen J. Lam, Angharad R. Morgan, Alan G. Fraser, Linda C. Tapsell, & Lynnette R. Ferguson. 2010. "Genetic adult lactase persistence is associated with risk of Crohn's Disease in a New Zealand population". *BMC Research Notes*, 3:339.
- Nowak-Wegrzyn, Anna, Katherine A. Bloom, Scott H. Sicherer, Wayne Shreffler, Sally Noone, Niya Wanich, & Hugh A. Sampson. 2008. "Tolerance to extensively heated milk in children with cow's milk allergy". *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 122:342-347.
- Obinu, Domenica A., Nabil S. Enattah, Antonietta Pedroni, Leena Peltonen, Luca L. Cavalli-Sforza, & Maria P. Dore. 2009. "Prevalence of lactase persistence and the performance of a non-invasive genetic test in adult Sardinian patients". *the European e-Journal of Clinical Nutrition and Metabolism*, 5:e1-e5.
- Pal, Sebely, Keith Woodford, Sonja Kukuljan, & Suleen Ho. 2015. "Milk Intolerance, Beta-Casein and Lactose". *Nutrients*, 7:7285-7297.
- Paz y Miño, Cesar, Germán Burgos, Andrés López-Cortés, Camilo Herrera, Anibal Gaviria, Eduardo Tejera & Alejandro Cabrera-Andrade. 2016. "A Study of the Molecular Variants Associated with Lactase Persistence in Different Ecuadorian Ethnic Groups". *Am. J. Hum. Biol.*, 28:774-781.
- Pi, Renzo & Daniel Vidart. 1969. "El Legado de los Inmigrantes I y II". Ed. Nuestra Tierra, Montevideo, Uruguay.
- Pires-Hartwig, Fernando & George D. Smith. 2018. "Lactase Persistence and Body Mass Index: The Contribution of Mendelian Randomization". *Clinical Chemistry*, 64:4-6.
- Plantinga, Theo S., Santos Alonso, Neskuts Izagirre, Montserrat Hervella, Rosa Fregel, Jos W. M. Van Der Meer, Mihai G. Netea, & Concepcion De La Rúa. 2012. "Low Prevalence of Lactase Persistence in Neolithic South-West Europe." *European Journal of Human Genetics* 20:778-82.
- Pritchard, Jonathan K., Matthew Stephens & Peter Donnelly. 2000. "Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data". *Genetics*, 155:945-959.
- Ranciaro, Alessia, Michael C. Campbell, Jibril B. Hirbo, Wen Ya Ko, Alain Froment, Paolo Anagnostou, Maritha J. Kotze, et al. 2014. "Genetic Origins of Lactase Persistence and the Spread of Pastoralism in Africa." *American Journal of Human Genetics*, 94:496-510.
- Rasinperä, Heli., Carol Forsblom, Nabil S. Enattah, Pirjo Halonen, K. Salo, Mikael Victorzon, Jukka P. Mecklin, Heikki Järvinen, Susa Enholm, et al. 2005. "The C/C-13910 genotype of adult-type hypolactasia is associated with an increased risk of colorectal cancer in the Finnish population". *Gut*, 54:643-647.
- Richards, M.B., V.A. Macauley, H.J. Bandelt & B.C. Sykes. 1998. "Phylogeography of mitochondrial DNA in western Europe". *Ann. Hum. Genet.*, 62:241-260.

- Rossi, Mauro, Luigi Maiuri, M. Isabella Fusco, Virginia M. Salvati, Antonella Fuccio, Salvatore Auricchio, Ned Mantei, Laura Zecca, Sergio M. Gloor & Giorgio Semenza. 1997. "Lactase Persistence Versus Decline in Human Adults: Multifactorial Events Are Involved in Down-regulation After Weaning". *Gastroenterology*, 112:1506-1514.
- Sacerdote, Carlotta, Simonetta Guarrera, George Davey-Smith, Sara Grioni, Vittorio Krogh, Giovanna Masala, Amalia Mattiello, Domenico Palli, Salvatore Panico, et al. 2007. "Lactase Persistence and Bitter Taste Response: Instrumental Variables and Mendelian Randomization in Epidemiologic Studies of Dietary Factors and Cancer Risk". *American Journal of Epidemiology*, 166:576-581.
- Sahi, T., M. Isokoski, J. Jussila, K. Launiala & K. Pyörälä. 1973. "Recessive inheritance of adult-type lactose malabsorption". *Lancet*, 2:823-826.
- Salzano, Francisco M. & Mónica Sans. 2014. "Interethnic admixture and the evolution of Latin American populations". *Genetics and Molecular Biology*, 37:151-170.
- Sans, Mónica, Francisco M. Salzano, & Ranajit Chakraborty. 1997. "Historical Genetics in Uruguay: Estimates of Biological Origins and Their Problems." *Human Biology*, 69:161-170.
- Sans, Mónica, Tania A. Weimer, Maria H.L.P. Franco, Francisco M. Salzano, Nilo Bentancor, Inés Alvarez, Néstor O. Bianchi, & Ranajit Chakraborty. 2002. "Unequal Contributions of Male and Female Gene Pools from Parental Populations in the African Descendants of the City of Melo, Uruguay." *American Journal of Physical Anthropology*, 118:33-44.
- Sans, Mónica, Andrew Merriwether, Pedro C. Hidalgo, Nilo Bentancor, Tania A. Weimer, María H.L.P. Franco, Inés Alvarez, Brian M. Kemp & Francisco M. Salzano. 2006. "Population Structure and Admixture in Cerro Largo, Uruguay, Based on Blood Markers and Mitochondrial DNA Polymorphisms." *Am. J. Hum. Biol.*, 18:513-524.
- Sans, Mónica, Gonzalo Figueiro, Elizabeth Ackermann, Isabel Barreto, Ana Egaña, Bernardo Bertoni, E. Poittevin-Gilmet, D. Maytia, & Pedro C. Hidalgo. 2011. "Mitochondrial DNA in Basque Descendants from the City of Trinidad, Uruguay: Uruguayan- or Basque-like Population?". *Human Biology*, 83:55-70.
- Sans, Mónica, Gonzalo Figueiro & Pedro C. Hidalgo. 2012. "A New Mitochondrial C1 Lineage from the Prehistory of Uruguay: Population Genocide, Ethnocide, and Continuity". *Human Biology*, 84:287-305.
- Santonocito, Concetta, Margherita Scapatucci, Donatella Guarino, Eleonora B. Annicchiarico, Rosalia Lisci, Romina Penitente, Antonio Gasbarrini, Cecilia Zuppi, & Ettore Capoluongo. 2015. "Lactose intolerance genetic testing: Is it useful as routine screening? Results on 1426 south-central Italy patients". *Clinica Chimica Acta*, 439:14-17.
- Schlebusch, Carina M., Per Sjödin, Pontus Skoglund, & Mattias Jakobsson. 2013. "Stronger Signal of Recent Selection for Lactase Persistence in Maasai than in Europeans." *European Journal of Human Genetics*, 21:550-553.
- Shaukat, Aasma, Michael D. Levitt, Brent C. Taylor, Roderick MacDonald, Tatyana A. Shamliyan, Robert L. Kane, & Timothy J. Wilt. 2010. "Systematic Review: Effective Management Strategies for Lactose Intolerance". *Ann Intern Med.*, 152:797-803.

- Sicherer, Scott H., & Hugh A. Sampson. 2010. "Food Allergy". *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125:116-125.
- Skripak, Justin M., Elizabeth C. Matsui, Kim Mudd, & Robert A. Wood. 2007. "The natural history of IgE-mediated cow's milk allergy". *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 120:1172-1177.
- Spodsberg, Nikolaj, Jesper T. Troelsen, Peter Carlsson, Sven Enerbäck, Hans Sjöström & Ove Norén. 1999. "Transcriptional regulation of pig lactase-phlorizin hydrolase: Involvement of HNF-1 and FREACs." *Gastroenterology* 116:842-854.
- Sun, Jianqin, Leiming Xu, Lu Xia, Gregory W. Yelland, Jiayi Ni, & Andrew J. Clarke. 2016. "Effects of milk containing only A2 beta casein versus milk containing both A1 and A2 beta casein proteins on gastrointestinal physiology, symptoms of discomfort, and cognitive behavior of people with self-reported intolerance to traditional cows' milk". *Nutrition Journal*, 15:35.
- Sverrisdóttir, Oddný Ósk, Adrian Timpson, Jamie Toombs, Cecile Lecoeur, Philippe Froguel, Jose M. Carretero, Juan L. Arsuaga Ferreras, Anders Götherström, & Mark G. Thomas. 2014. "Direct Estimates of Natural Selection in Iberia Indicate Calcium Absorption Was Not the Only Driver of Lactase Persistence in Europe." *Molecular Biology and Evolution*, 31:975-983.
- Swallow, Dallas M. 2003. "Genetics of Lactase Persistence and Lactose Intolerance." *Annu. Rev. Genet*, 37:197-219.
- Szilagi, Andrew. 2015. "Adaptation to Lactose in Lactase Non Persistent People: Effects on Intolerance and the Relationship between Dairy Food Consumption and Evaluation of Diseases". *Nutrients*, 7:6751-6779.
- Szilagi, Andrew, Polymnia Galiatsatos & Xiaoqing Xue. 2016. "Systematic Review and Meta-Analysis of Lactose Digestion, its Impact on Intolerance and Nutritional Effects of Dairy Food Restriction in Inflammatory Bowel Disease". *Nutrition Journal*, 15:67.
- Takezaki, Naoko, Masatoshi Nei & Koichiro Tamura. 2010. "POPTREE2 : Software for constructing population trees from allele frequency data and computing other population statistics with Windows-interface". *Molecular Biology and Evolution*, 27:747-752.
- Tamura, Koichiro, Glen Stecher, Daniel Peterson, Alan Filipki, & Sudhir Kumar. 2013. "MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0". *Molecular Biology and Evolution*. 30:2725-2729.
- Thorning, Tanja K., Anne Raben, Tine Tholstrup, Sabita S. Soedamah-Muthu, Ian Givens, & Arne Astrup. 2016. "Milk and dairy products: good or bad for human health? An assessment of the totality of scientific evidence". *Food & Nutrition Research*, 60:32527.
- Tishkoff, Sarah A., Floyd A. Reed, Alessia Ranciaro, Benjamin F. Voight, Courtney C. Babbitt, Jesse S. Silverman, Kweli Powell et al. 2007. "Convergent Adaptation of Human Lactase Persistence in Africa and Europe". *Nature Genetics*, 39:31-40.
- Troelsen, Jesper, Cathy Mitchelmore, Nikolaj Spodsberg, Anette M. Jensen, Ove Norén & Hans Sjöström. 1997. "Regulation of lactase-phlorizin hydrolase gene expression by the caudal-related homoeodomain protein Cdx-2". *Biochem. J.*, 322:833-838.

- van Oven, Mannis & Manfred Kayser. 2008. "Updated Comprehensive Phylogenetic Tree of Global Human Mitochondrial DNA Variation". *Human Mutation.*, 30:E386-E394.
- van Oven, Mannis. 2015. "PhyloTree Build 17: Growing the human mitochondrial DNA tree". *Forensic Science International: Genetics Supplement Series* 5:9-11.
- Vega-Requena, Yasser, Pedro C. Hidalgo, Elizabeth Ackermann, Sara Flores-Gutierrez & Mónica Sans. 2019. "Genetic Admixture Analysis in the Population of Tacuarembó-Uruguay Using Alu Insertions". *Human Biology*, en prensa.
- Wang, Sijia, Nicolas Ray, Winston Rojas, Maria V. Parra, Gabriel Bedoya, Carla Gallo, Giovanni Poletti, Guido Mazzotti, Kim Hill, et al. 2008. Geographic Patterns of Genome Admixture in Latin American Mestizos. *PLoS Genet* 4:e1000037.
- Wang, Yangxi, Clare B. Harvey, Wandy S. Pratt, Virginia Sams, Martin Sarner, Mauro Rossi, Salvatore Auricchio & Dallas M. Swallow. 1995. "The lactase persistence/non-persistence polymorphism is controlled by a *cis*-acting element". *Human Molecular Genetics*, 4:657-662.
- Warinner, C., J. Hendy, C. Speller, E. Cappellini, R. Fischer, C. Trachsel, J. Arneborg, et al. 2014. "Direct evidence of milk consumption from ancient human dental calculus". *Scientific Reports*, 4:7104.
- Waud, Jonathan, Stephanie B. Matthews, & Anthony K. Campbell. 2008. "Measurement of breath hydrogen and methane, together with lactase genotype, defines the current best practice for investigation of lactose sensitivity". *Ann Clin Biochem*, 45:50-58.
- Weissensteiner, Hansi, Dominic Pacher, Anita Kloss-Brandstätter, Lukas Forer, Günther Specht, Hans-Jürgen Bandelt, Florian Kronenberg, Antonio Salas, & Sebastian Schönherr. 2016. "HaploGrep 2: mitochondrial haplogroup classification in the era of high-throughput sequencing". *Nucleic Acids Research*, 44:58-63.
- Wilt Timothy J., Aasma Shaukat, Tatyana Shamliyan, Brent C. Taylor, Roderick MacDonald, James Tacklind, Indulis Rutks, Sarah J. Schwarzenberg, Robert L. Kane, & Michael Levitt. 2010. "Lactose Intolerance and Health." *Evid. Rep. Technol. Assess.*, 192:1-410.
- Wortmann, André Castagna, Daniel Simon, Luiz E. Mazzoleni, Guilherme Becker Sander, Carlos F. de Magalhães Francesconi, Débora Dreher Nabinger, Camila Schultz Grott, et al. 2018. "The association between adult-type hypolactasia and symptoms of functional dyspepsia". *Genetics and Molecular Biology*, 41:92-97.
- Yang J., Y. Deng, H. Chu, Y. Cong, J. Zhao, D. Pohl, B. Misselwitz, M. Fried, N. Dai, & M. Fox. 2013. "Prevalence and presentation of lactose intolerance and effects on dairy product intake in healthy subjects and patients with irritable bowel syndrome". *Clin Gastroenterol Hepatol*, 11:262-268.
- Yang, Nan, Hongzhe Li, Lindsey A. Criswell, Peter K. Gregersen, Marta E. Alarcon-Riquelme, Rick Kittles, Russell Shigeta, Gabriel Silva, Pragna I. Patel et al. 2005. "Examination of ancestry and ethnic affiliation using highly informative diallelic DNA markers: application to diverse and admixed populations and implications for clinical epidemiology and forensic medicine". *Hum Genet*, 118:382-392.
- Zecca Laura, José E. Mesonero, Alfred Stutza, Jean-Claude Poirée, Jean Giudicelli,

Raffaele Cursio, Sergio M. Gloor, & Giorgio Semenza. 1998. "Intestinal lactase-phlorizin hydrolase (LPH): the two catalytic sites; the role of the pancreas in pro-LPH maturation". *FEBS letters*, 435:225-228.

ANEXO 1

No: _____ No. Laboratorio: _____

DATOS PERSONALES:

Apellido Paterno: _____

Apellido Materno: _____

Nombre: _____ Sexo: M ___ F ___

CI: _____ / _____.

Edad Cumplida. ___ Fecha Nac. dd ___ / ___ /año _____

Lugar Nac. _____ Rural: _____

Urbano: _____

Ciudad o Localidad: _____

Dpto: _____.

Escolaridad (terminada): Primaria: _____. Secundaria: _____.

Terciaria: _____.

No. Hermanos (Incluido el encuestado): _____ M: _____

F: _____.

No. Hijos: _____ M: _____ F: _____. Gemelos: ___ MZ: _____

DZ: _____. Abortos: Si: ___ No: _____ Espontáneos: _____.

Inducidos: _____.

HPT: _____. Antecedentes: Maternos: _____ o

Paternos: _____.

Eclampsia: _____. Antecedentes: Maternos: _____ o

Paternos: _____.

Diabetes: _____. Antecedentes: Maternos: _____ o

Paternos: _____.

Obesidad: _____. Antecedentes : Maternos: _____ o

Paternos: _____.

Cáncer: _____. Donde: _____. Antecedentes:

Maternos: _____ o Paternos: _____.

FUMA: si ____ no _____. FUMÓ: si ____ no:_____.

Grupo Sanguíneo: ABO:_____ Rh:_____

Su Padre y su Madre son Familiares: si no. Grado:_____.

MUESTRA: Sangre:____. Saliva:____. Frotis Bucal: ____ Pelo:_____

Madre:

RECONOCE ANCESTRÍA: Africana: si ____ no _____. Indígena: si
_____ no _____.

Apellido Paterno:_____

Apellido Materno:_____

Nombre:_____

Lugar Nac._____ Rural:_____

Urbano:_____

Ciudad o Localidad: _____

Dpto:_____.

Viva:_____

Fallecida:_____. Edad:_____. Causa:_____. No
sabe:_____.

Padre:

RECONOCE ANCESTRÍA: Africana: si ____ no ____ Indígena: si
_____ no _____.

Apellido Paterno:_____ Apellido

Materno:_____

Nombre:_____

Lugar Nac._____ Rural:_____

Urbano:_____

Ciudad o Localidad:

_____ Dpto: _____.

Vivo: _____.

Fallecido: _____ Edad: _____ Causa: _____.

No sabe: _____.

ABUELOS MATERNOS:

Abuela Materna:

RECONOCE ANCESTRÍA: Africana: si _____ no _____ Indígena: si
_____ no _____.

Apellido Paterno: _____ Apellido
Materno: _____

Nombre: _____

Lugar Nac. _____ Rural: _____
Urbano: _____

Ciudad o Localidad: _____

Dpto: _____.

VIVA: _____ FALLECIDA: _____ Causa: _____.

No sabe: _____.

Su abuelo y su abuela son Familiares: No: _____ Si: _____.
Grado. _____

Abuelo Materno:

RECONOCE ANCESTRÍA: Africana: si _____ no _____ Indígena:
si _____ no _____.

Apellido Paterno: _____

Apellido Materno: _____

Nombre: _____

Lugar Nac. _____ Rural: _____
Urbano: _____

Ciudad o Localidad: _____

Dpto: _____.

Vivo: _____ Fallecido: _____ . Causa: _____.

No sabe: _____.

Su abuelo y su abuela son Familiares: No: _____ . Si: _____ .
Grado: _____.

Conoce antepasados más atrás de sus abuelos maternos; si _____
no _____

Cuales: _____

Lugar de origen: _____

Tenían Ancestría Africana: si _____ no _____.

ABUELOS PTERNOS:

Abuela Paterna:

RECONOCE ANCESTRIA: Africana: si _____ no _____ Indígena: si _____
no _____.

Apellido Paterno: _____

Apellido Materno: _____

Nombre: _____

Lugar Nac. _____ Rural: _____
Urbano: _____

Ciudad o Localidad: _____

Dpto: _____.

VIVA: _____ FALLECIDA: _____ . Causa: _____.

No sabe: _____.

Abuelo Paterno:

RECONOCE ANCESTRÍA: Africana: si _____ no _____ Indígena:
si _____ no _____.

Apellido Paterno: _____

Apellido Materno: _____

Nombre: _____

Lugar Nac. _____ Rural: _____
Urbano: _____

Ciudad o Localidad: _____

Dpto: _____.

Vivo: _____ Fallecido: _____ Causa: _____.

No sabe: _____.

Su abuelo y su abuela paternos son Familiares: No: _____.
Si: _____ Grado: _____.

Conoce antepasados más atrás de sus abuelos paternos:

si _____ no _____ Cuales: _____.

Lugar de origen: _____.

Tenían Ancestría Africana: si _____ no _____.

EN EL ÚLTIMO AÑO:

1) ¿ Qué tan seguido tomó leche como bebida:

Nunca: _____ Pasar a la pregunta 2.

Diaria: _____ Semanal: _____ Raramente _____ 2-3 veces
al mes: ____ 3-4 veces a la semana: 1 vez al día: ____ más de
una vez al día: _____.

2) Si **NO** tomó leche esto se debió a manifestaciones del
estomago:

si _____ no _____.

Si es NO pasar a la pregunta 3. En caso de ser SI indicar cuales:

Dolor abdominal _____. 2) Gases: _____. 3) Flatos: _____.
4) Diarrea: _____. 5) Nauseas y/o vómitos: _____. 6)
Constipación: _____. 7) Otros
(aclarar):_____.

3) ¿Qué tan frecuente comió queso? (untables y fetas). Postres lácteos (pudding) o bebió yogurt (Otras bebidas lácteas fermentadas)?

Diaria:_____ Semanal:_____. Raramente:_____. 2-3
veces al mes:____. 3-4 veces a la semana: 1 vez al día:
____. más de una vez al día: _____.

OBSERVACIONES (& Enfermedades Hermanos):

Fecha: ____ / ____ / ____.

Nombre Encuestador:_____.

FIRMA:_____.