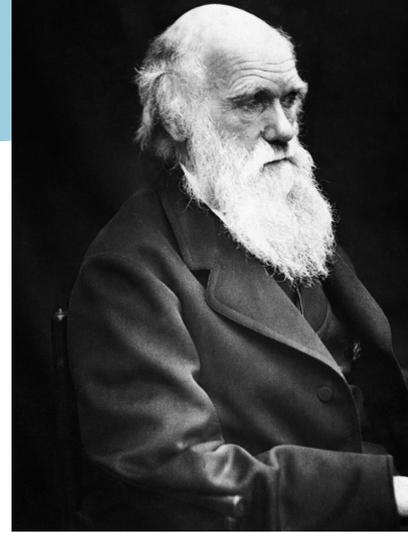


# Genética y evolución

**Digestión de lactosa asociada a actividades de nuestros  
ancestros**



Karely Vargas  
Valentina Simonazzi

# Introducción

## Contexto historico

- Periodo Neolítico: agricultura y sedentarismo.
- Pastoreo y ganadería en el norte de Europa.
- Agricultura en el Sur de Asia.

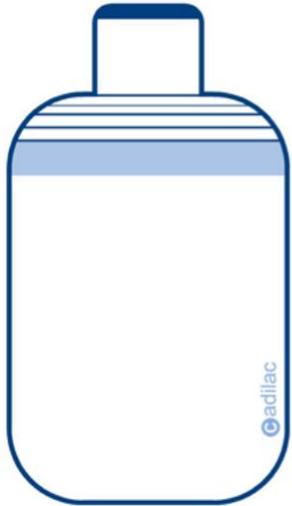




**Actividades económicas antepasadas...  
¿Repercusión en modos de digestión  
de alimentos en la actualidad?**

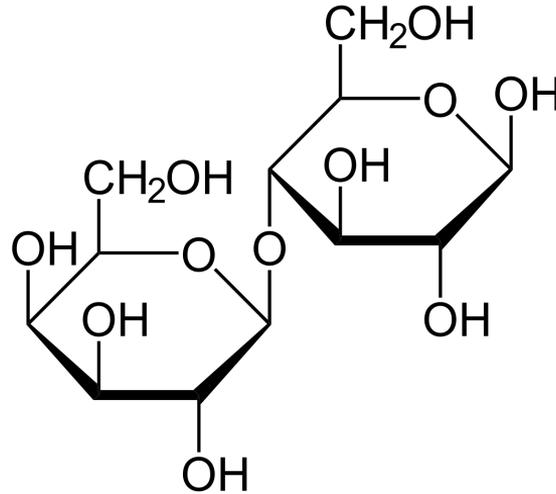
# Lactosa

- ¿Qué es?
- ¿Por qué estudiar esta sustancia?

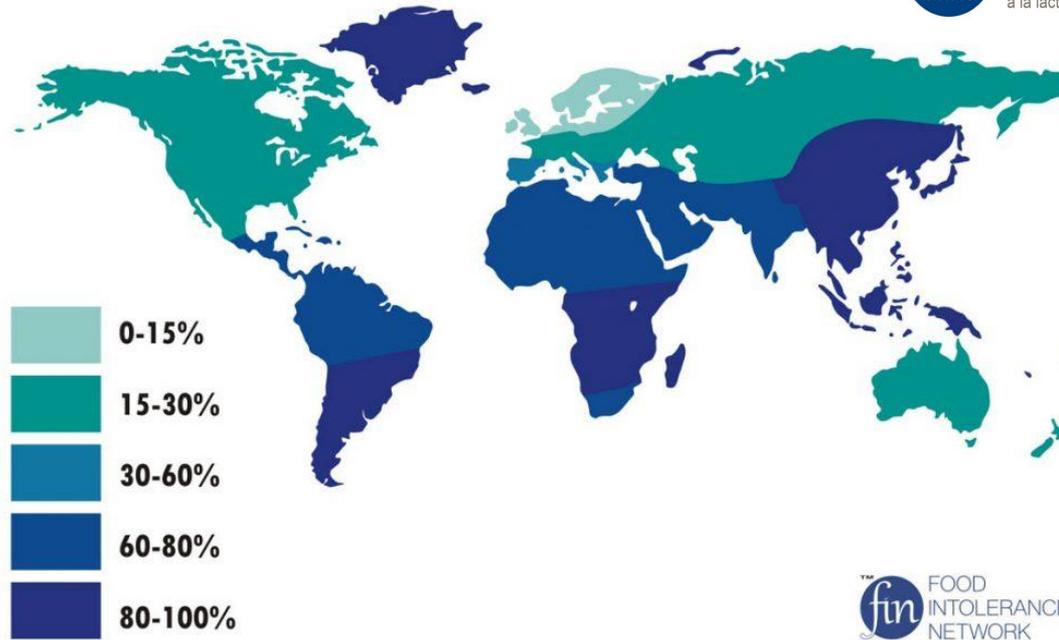


Vitaminas, ...1%  
Sales minerales 1%  
Proteínas 3%  
Grasa 3%  
**Lactosa 5%**

**Agua 87%**



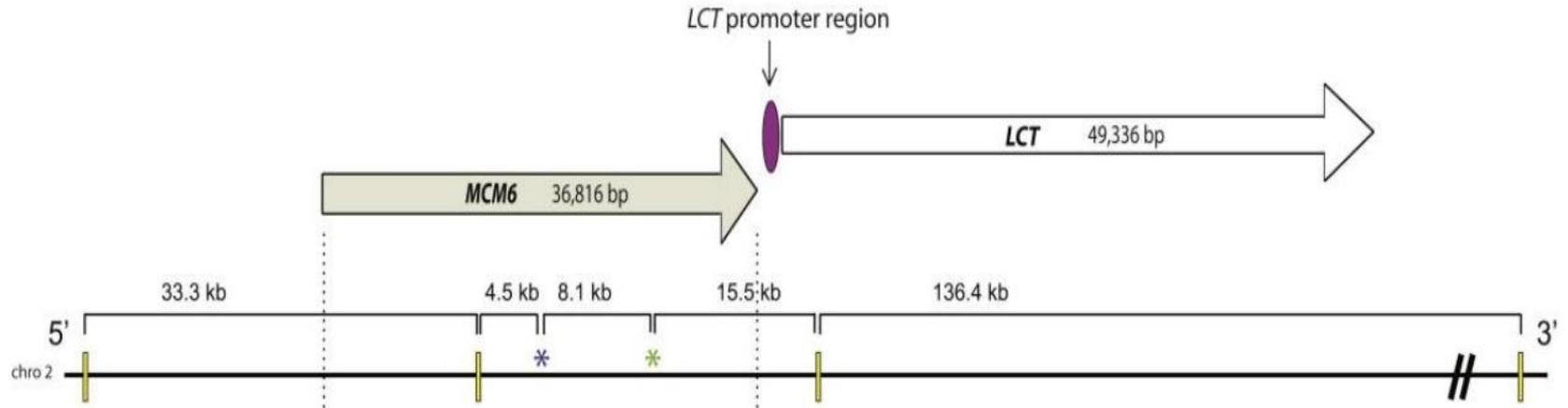
## Worldwide prevalence of lactose intolerance in recent populations (schematic)



Distribución geográfica de población con intolerancia a la lactosa.  
**Tonos azules oscuros** :población con poca tolerancia a la lactosa  
**Tonos verdes claros:** individuos con mucha tolerancia a este azúcar.  
**Tonos intermedios:** tolerancias o capacidad de digestión intermedia.

# Lactasa

- Enzima que descompone a la lactosa.
- Codificada por el gen LCT, cromosoma 2. La secuencia está modulada por MCM6 (minicromosoma de mantenimiento del complejo).
- Dos sitios activos

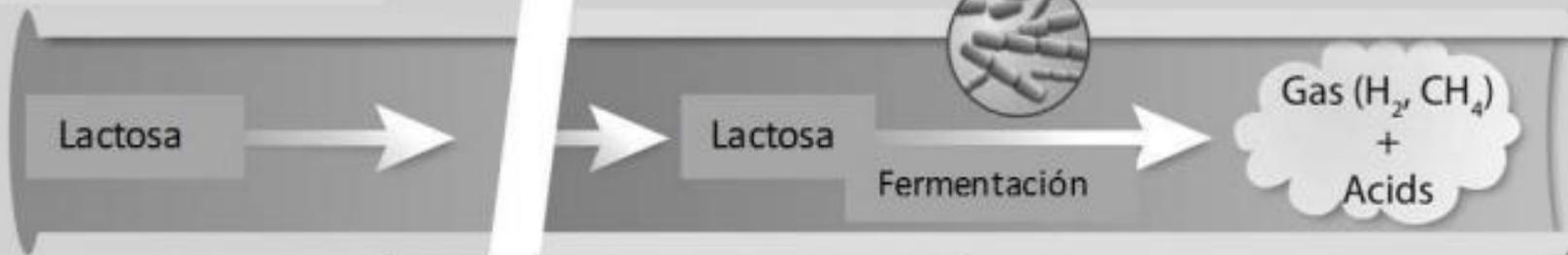


Con lactasa



Intestino delgado

Sin lactasa



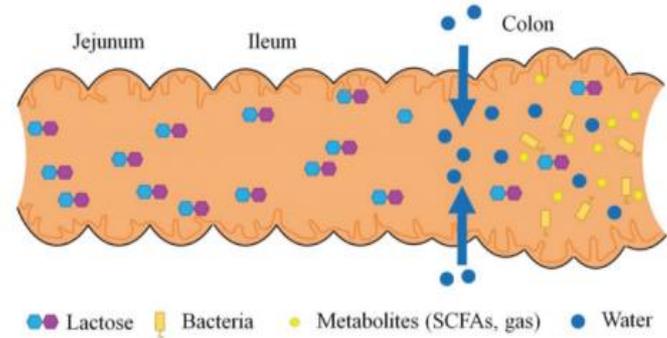
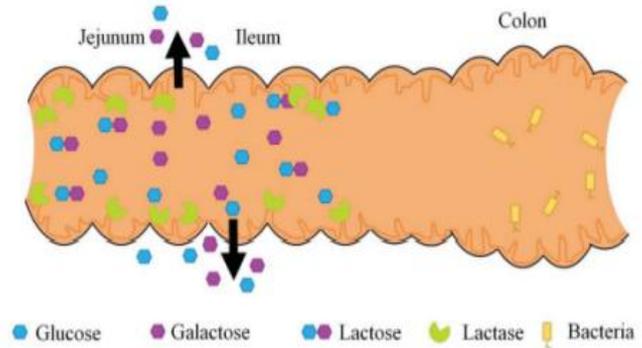
Intestino delgado

Intestino grueso

# ¿Problema?

- En mamíferos, disminuye su producción luego del destete.

## DEFICIENCIA (hipolactasia).



● **La alta o baja prevalencia de la enzima lactasa ¿podría estar relacionada a las actividades diarias de la población antepasada?**

**Lactasa persistente (LP):** ↑ lactasa (adulto)

**Lactasa no persistente (LNP):** ↓ lactasa (adulto) ---> IL: intolerante a lactosa

¿EVOLUCIÓN?

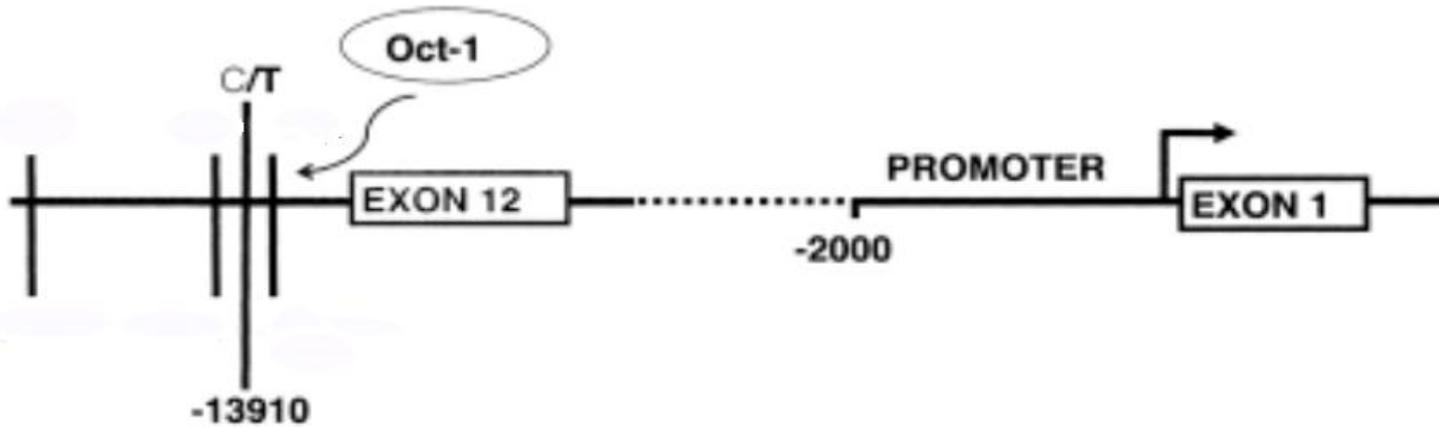
- Persistencia de la expresión de lactasa = polimorfismo puntual C/T 13910
- Nuevo sitio de unión para OCT-1

**Genotipo CC (WILDE TYPE):** hipolactasia (LNP)

**Genotipo TT o CT (MUTACIÓN):** persistencia de actividad de la enzima (LP).

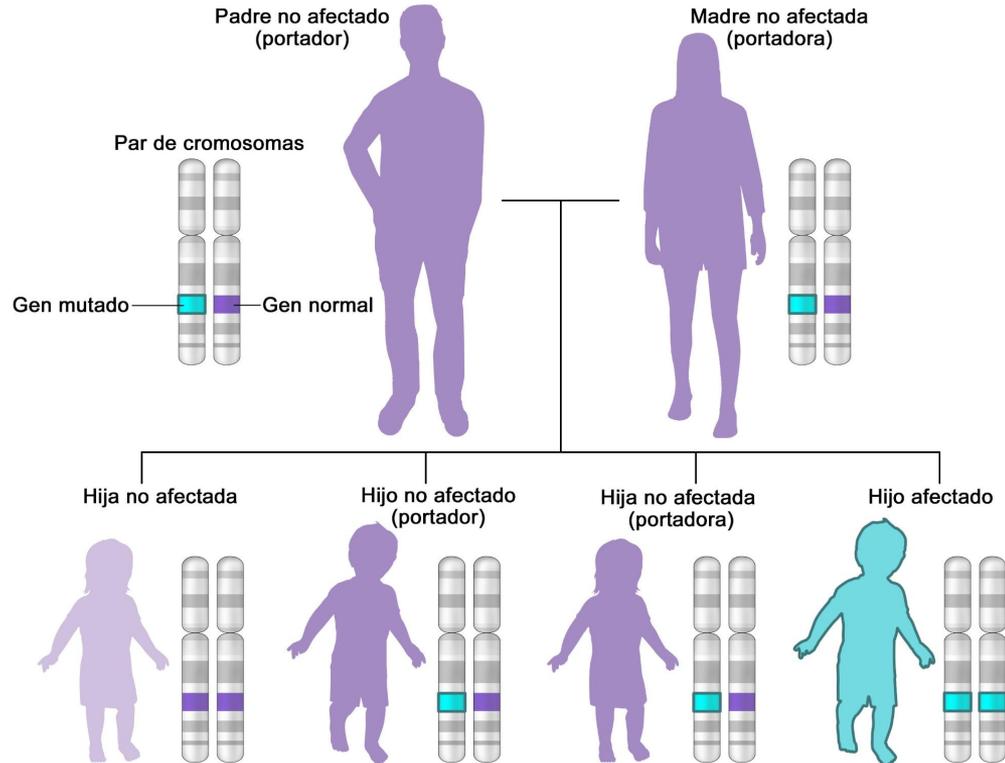
**3' MCM6 Gene**

**5' Lactase Gene**



# Fenotipo de intolerancia a la lactosa (LNP) es heredable como rasgo autosómico recesivo

## Herencia autosómica recesiva



# Observación

Existe una mayor frecuencia de personas con intolerancia a la lactosa en el sur de Asia en comparación con el Norte de Europa y de EEUU.

**PREGUNTA:** ¿Hay diferencias en las frecuencias genotípicas del gen que regula la producción de lactasa entre poblaciones del sur de Asia en comparación con personas locales de Estados Unidos?

# ¿Qué se espera?

- Individuos del sur de Asia (Israel) presentan con mayor frecuencia un genotipo CC, indicador de la no persistencia a la lactasa, en comparación con personas pertenecientes al norte de América.
- Ciertos individuos con genotipo CC no presenten intolerancia a la lactosa, debido a otras mutaciones en un sitio del gen LCT diferente del regulador

# Hipótesis

- Existen diferencias en las frecuencias genotípicas del gen que regula la lactasa en poblaciones de dos sitios distintos (cuyos antepasados diferían en dieta y actividades económicas).

# Objetivos

1- Determinar cómo son las frecuencias genotípicas actuales, del gen que regula la producción de lactasa, de dos poblaciones cuyos antepasados diferían en dieta y actividades económicas, y ver sus diferencias.

2- Observar cómo son las actividades enzimáticas, derivadas de cada uno de los tres genotipos distintos y compararlas.

3- Evaluar la existencia de:

--Silenciamiento del gen LCT por metilaciones en el ADN (individuos TT con IL)

4- Comparar cómo repercute un cambio de base en el sitio regulador MCM6 para otro mamífero distinto del humano (ratón), y registrar los síntomas.

# Metodología

## OBJETIVO 1:

- ★ Obtención de la secuencia del gen MCM6 para observar cuál se considera “estándar” (TT, CC, CT)

## Homo sapiens cromosoma 2, ensamblaje primario GRCh38.p14

Secuencia de referencia NCBI: NC\_000002.12

[GenBank](#) [FASTA](#)

[Enlace a esta vista](#) | [Comer](#)

NC\_000002.12 ▾ Encontrar:         Herramientas ▾ Pistas ▾ Descargar ▾

|13,920 **Secuencia** |13,900

A G A C G G C A T A C G T A T C A A G T T T G T G T G T T T C T A C T C  
T C T G C C G T A T G C A T A G T T C A A A C A C A C A A A G A T G A G

Genes, MANE Project (release v1.1)      
Warning: No track data found in this range  
NCBI RefSeq Annotation GCF\_000001405.40-RS\_2023\_03      
Warning: No track data found in this range  
Biological regions, aggregate, NCBI RefSeq Annotation GCF\_...      
Warning: No track data found in this range  
Genes, Ensembl release 109      
Warning: No track data found in this range  
Cited Variations, dbSNP b156 v2      
Warning: No track data found in this range  
Live RefSNPs, dbSNP b156 v2

- ★ Muestras de sangre de 150 individuos de Estados Unidos y 150 individuos de Israel.
- ★ Aislamiento, purificación, amplificación del ADN.

## PCR

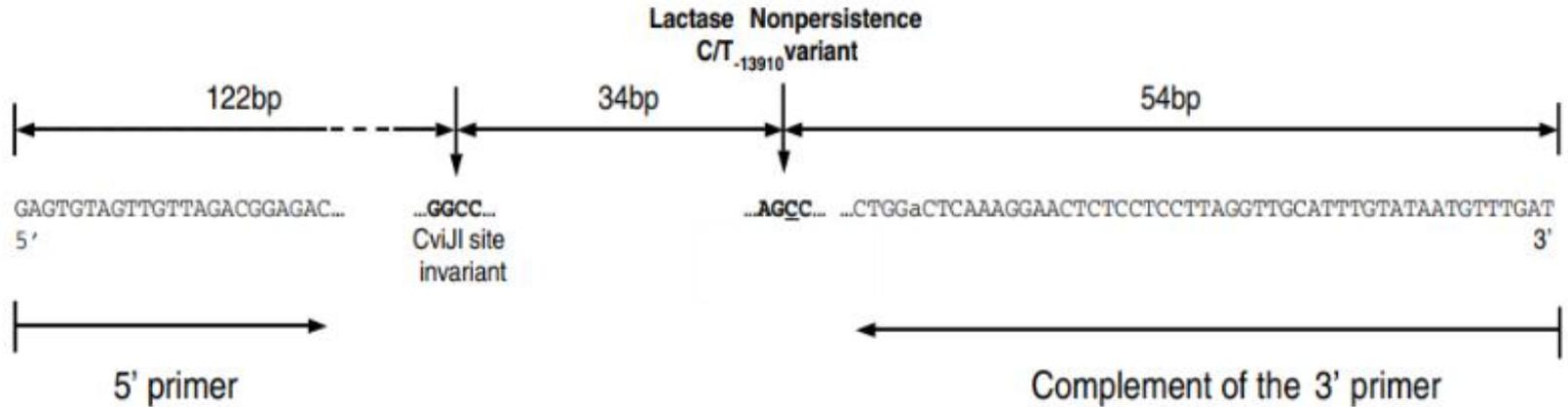
Para amplificar la porción reguladora de 220 pb del gen de interés, usando un primer forward y un primer reverse.



## ★ Observar si existe o no dicha mutación

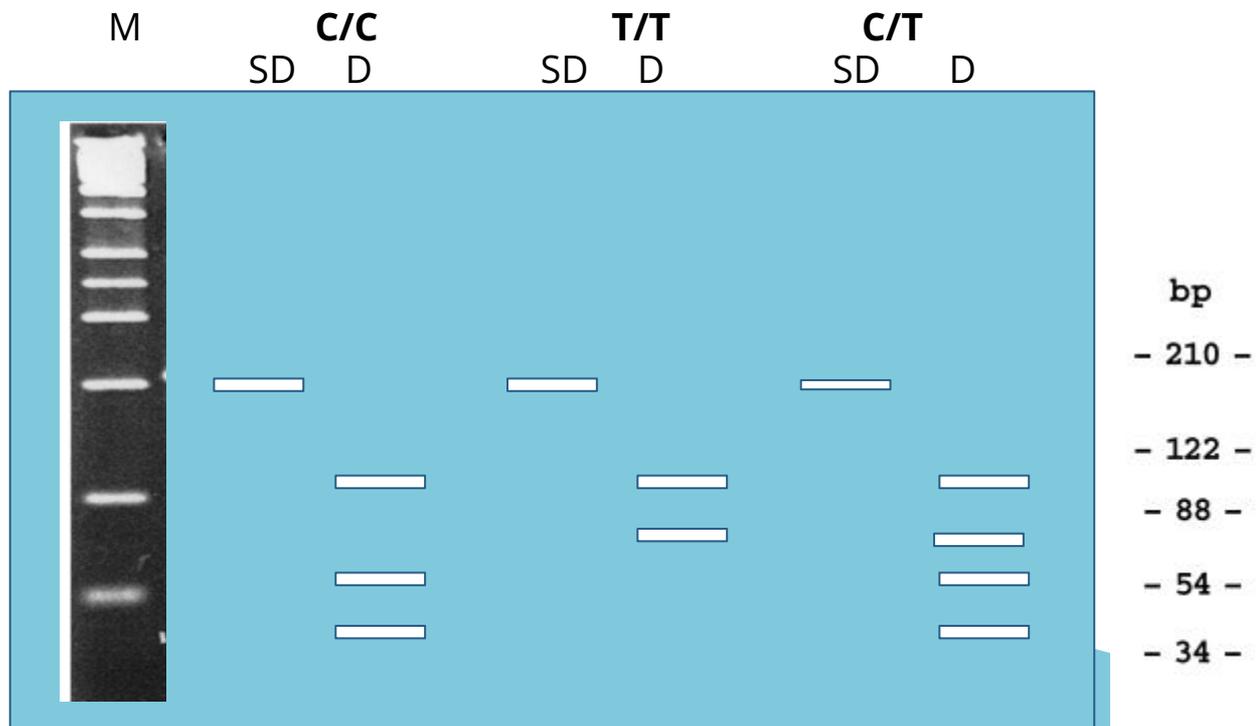
### TECNICA RFLP

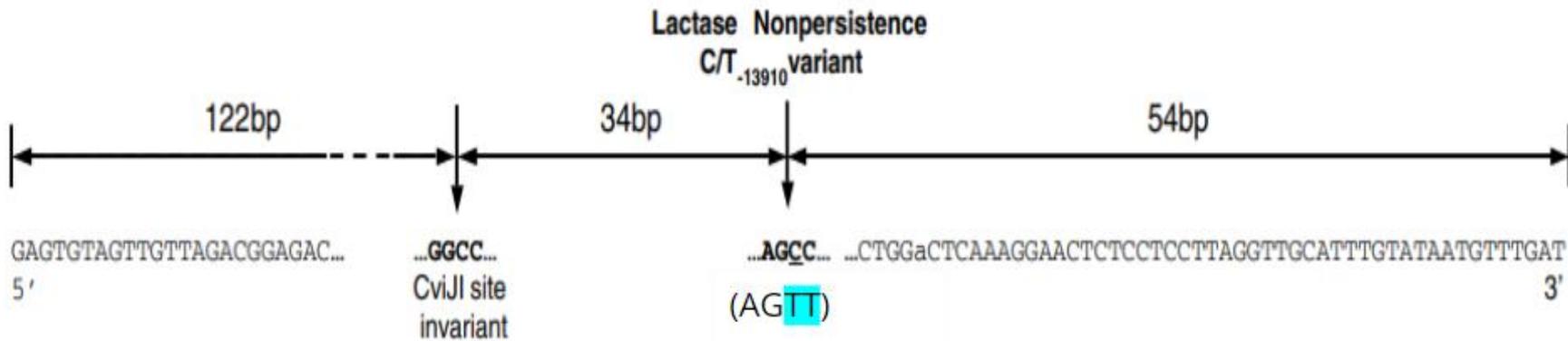
- ❖ CviJI
- ❖ Análisis de fragmentos en gel de poliacrilamida



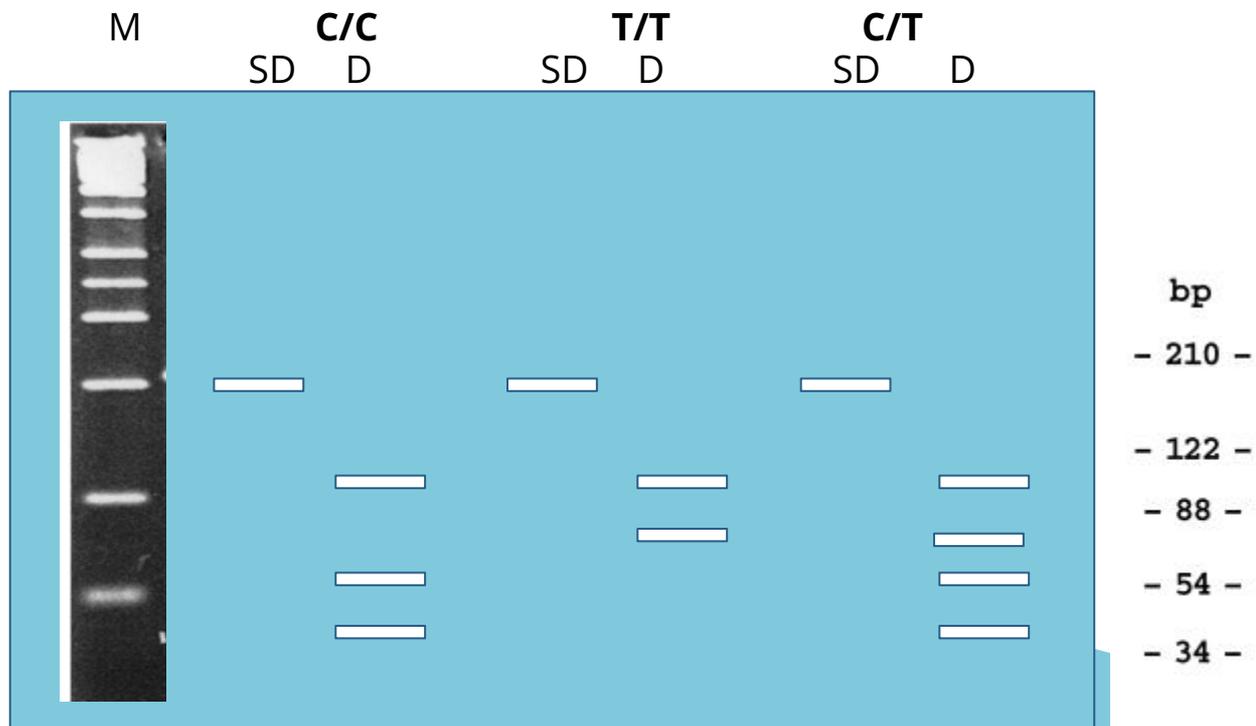
(Fitzgerald *et al.* 1992)

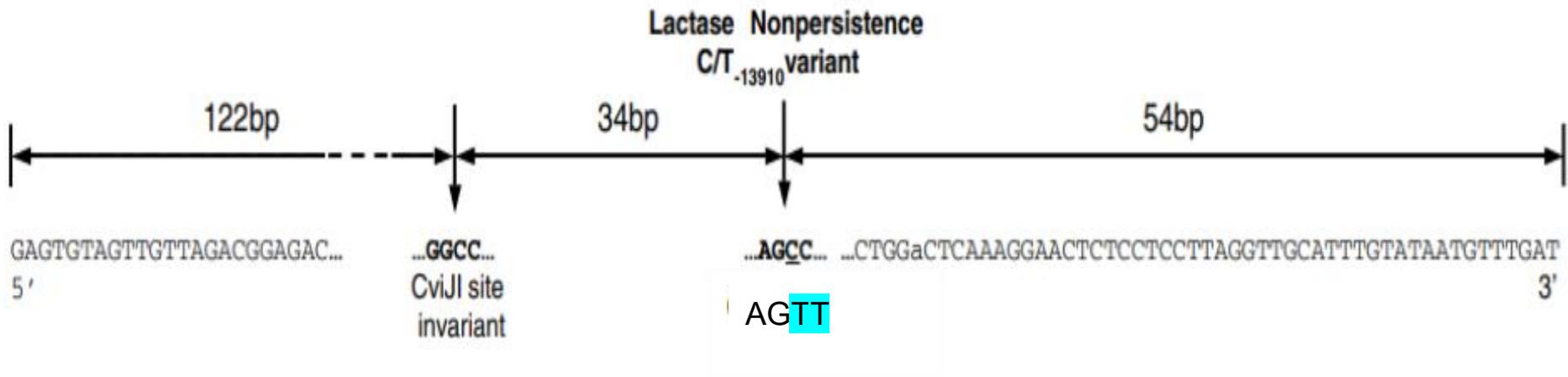
Dos bandas indica TT, tres bandas indica CC, cuatro bandas indica C/T).





Dos bandas indica TT, tres bandas indica CC, cuatro bandas indica C/T).





## Determinación de frecuencias genotípicas

*RESULTADO ESPERADO:*

### ESTADOS UNIDOS:

- Mayor proporción de genotipo TT (110/150)
- Baja proporción de genotipo CT(10/150)
- Baja proporción de genotipo CC (30/150)
- De estos 30 CC, 10 no serán IL
- De estos 110 TT, 3 serán IL

¿Qué  
podría  
ocurrir?

### ISRAEL:

- Mayor proporción de genotipo CC (120/150)
- De estos 120 CC, 20 no serán IL

¿Qué  
podría  
ocurrir?

**Dentro de unas diapositivas  
lo sabremos...**



## OBJETIVO 2

# Medición enzimática: ensayo bioquímico de los tres tipos de actividad enzimática

## Preparación de inserto de ADN

- Muestras de un individuo tipo CC, otro TT y otro CT ---> PCR
- Primers que flanqueen el gen LCT. Agregar secuencias que incluyan sitios de corte para BamHI y HindIII y un codón para una etiqueta GST.
- Gel de agarosa y purificación

Primer3web version 4.1.0 - Pick primers from a DNA sequence. [disclaimer](#) [code](#)  
[cautions](#)

Select the [Task](#) for primer selection

[Template masking](#) before primer design ([available species](#))

Select species  [Nucleotides to mask in 5' direction](#)   
[Primer failure rate cutoff](#)  [Nucleotides to mask in 3' direction](#)

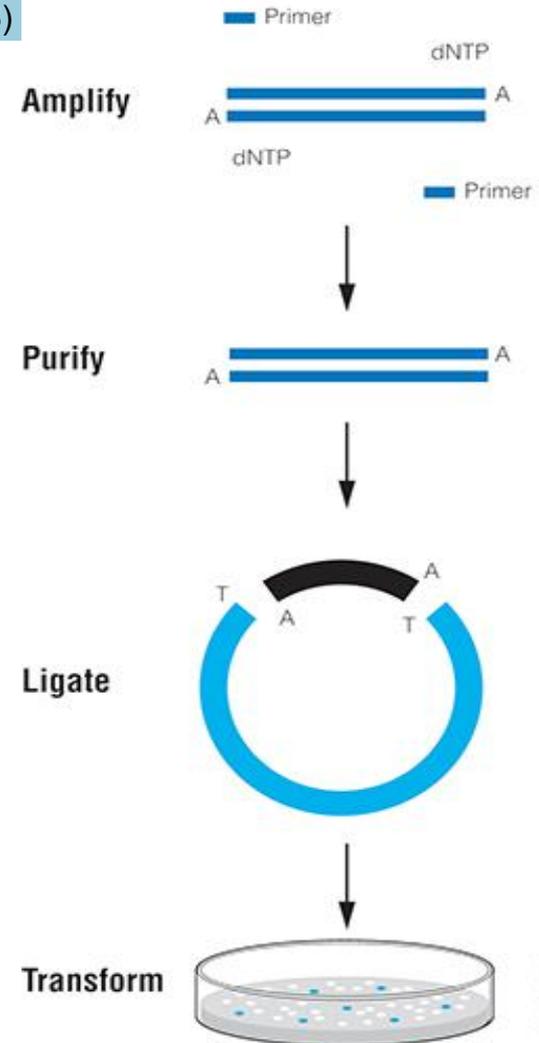
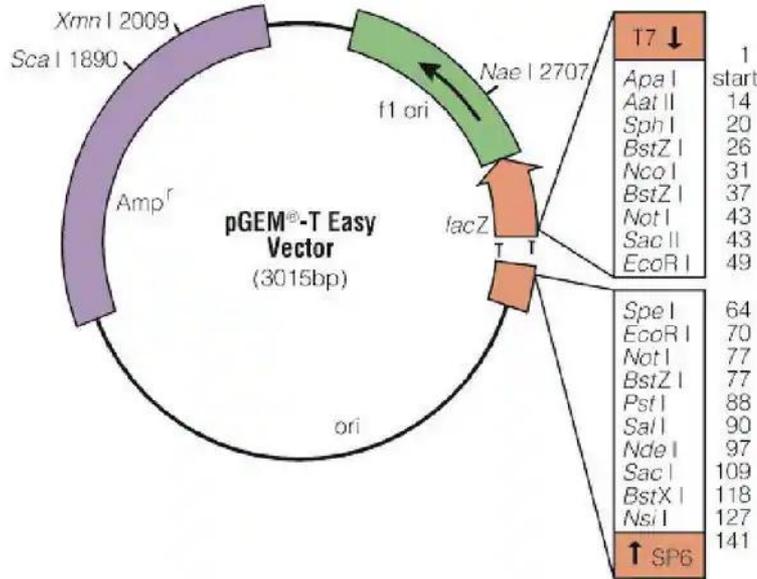
Paste source sequence below (5'->3', string of ACGTNacgtm -- other letters treated as N -- numbers and blanks ignored). FASTA format ok. Please N-out undesirable sequence (vector, ALUs, LINEs, etc.) or use a [Mismatching Library](#) ([repeat library](#))

Pick left primer, or use left primer below  Pick hybridization probe (internal oligo), or use oligo below  Pick right primer, or use right primer below (5' to 3' on opposite strand)

[Pick Primers](#) [Download Settings](#) [Reset Form](#)

[Sequence Id](#)  A string to identify your output.  
[Targets](#)  E.g. 50,2 requires primers to surround the 2 bases at positions 50 and 51. Or mark the [source sequence](#) with [ and ]: e.g. ...ATCT[CCCC]TCAT... means that primers must flank the central CCCC.  
[Overlap Junction List](#)  E.g. 27 requires one primer to overlap the junction between positions 27 and 28. Or mark the [source sequence](#) with -: e.g. ...ATCTAC-TGTCAT... means that primers must overlap the junction between the C and T.

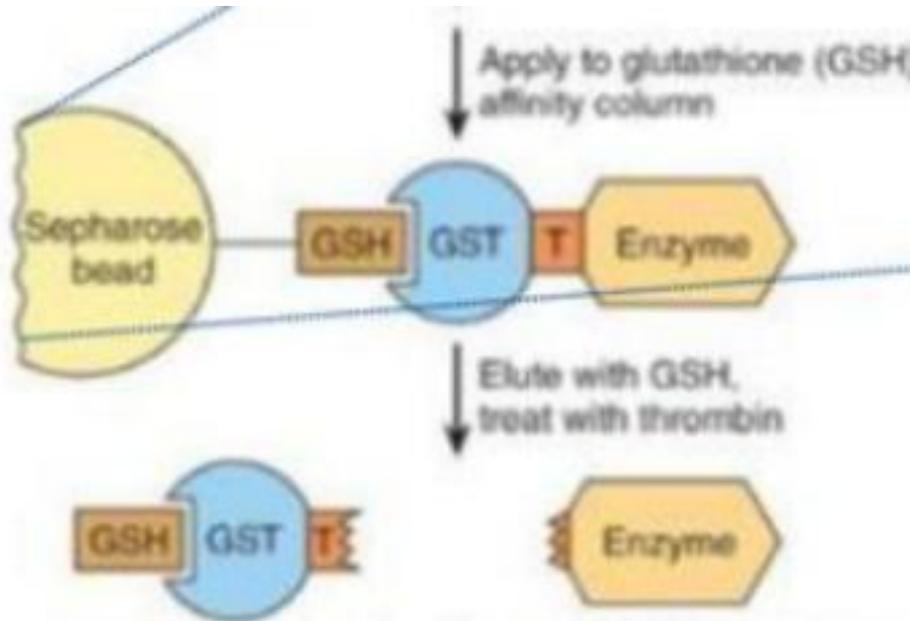
- Producto se clona en vector pGEM-TEasy.
- Análisis de integridad del inserto.
- Transformación, purificación plásmidos.
- Obtención del inserto, purificación .



1473VA05\_GE

4310411\_3A

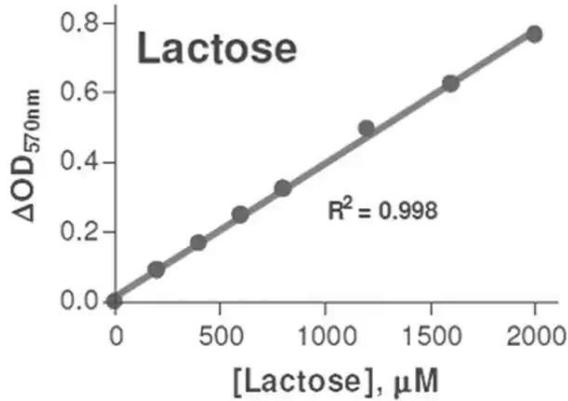
- Ligación a pET28a
- Transformación
- Inducción de la expresión de la proteína de fusión GST/mLCT
- Purificación (columna glutatión)
- Chequeo



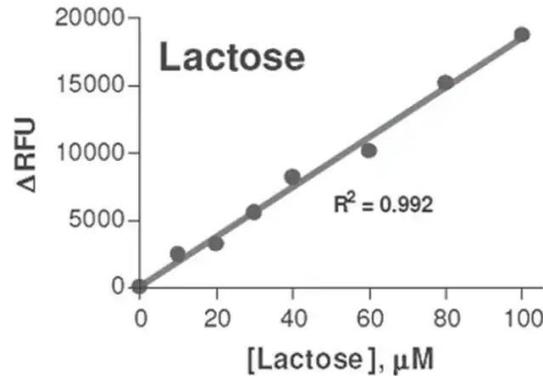
(“CONICET\_Digital\_Nro.ff1dc9bc-1437-43df-be1a-34e0a4a02671\_A.pdf” 2023)

## Comparación de actividades enzimáticas

- “Kit de ensayo de lactosa comercial”: Determinación colorimétrica de lactosa. (Determinación indirecta de la actividad enzimática)



*96-well colorimetric assay*



*96-well fluorimetric assay*

*RESULTADO ESPERADO:*

**Lactasa tipo CC** = mucha coloración

**Lactasa tipo CT** = coloración intermedia

**Lactasa tipo TT** = poca coloración

# Retomando...

## *RESULTADO ESPERADO:*

### ESTADOS UNIDOS:

- Mayor proporción de genotipo TT (110/150)
- Baja proporción de genotipo CT(10/150)
- Baja proporción de genotipo CC (30/150)
  - De estos 30 CC, 10 no serán IL
  - De estos 110 TT, 3 serán IL **¿Epigenética?**

### ISRAEL:

- Mayor proporción de genotipo CC (120/150)
  - De estos 120 CC, 20 no serán IL

Amplificación de ADN de esas tres personas (TT)

Aplicación de técnica MS-HRM para evaluar metilaciones en promotor LCT, con un kit comercial: EpiMelt Methylated test assay specific control



# METHYLDetect

DNA METHYLATION ASSAYS

("Forside - Methyldetect.com" 2023)

**TÉCNICA: MS-HRM, se basa en un método de detección de metilación por PCR.**

- N° citosinas en un producto de PCR depende del estado de metilación de las citosinas en la plantilla no modificada.
- Bisulfito de sodio conserva citosinas metiladas y modifica las citosinas no metiladas

**Locus metilado**= producto de PCR rico en C

**Locus no estaba metilado**= producto de PCR rico en T

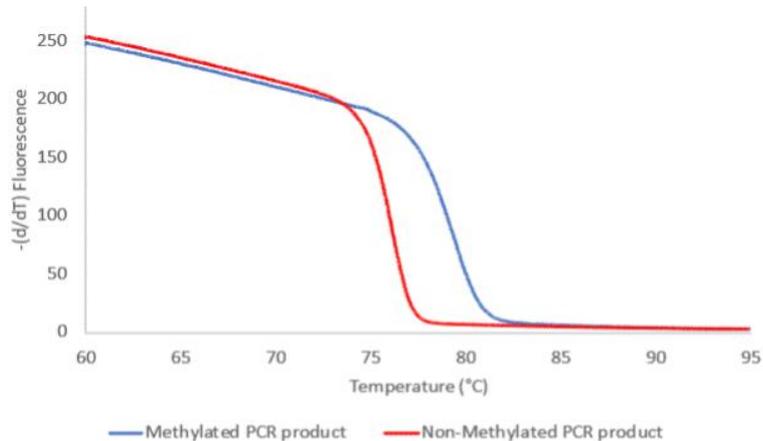
A: producto de PCR obtenido de la versión metilada del locus:

5'— Tt**cG**TTAAtt**cGGGcGcG**TTT**cGcG**ATtttTGG —3'  
3'— Aag**CAAT**Taa**gCCCgCgC**AAA**gCgC**TAaaaACC —5'

B: producto de PCR obtenido de la versión no metilada del locus:

5'— Ttt**tG**TTAAtt**tGGGtGtG**TTT**tGtG**ATtttTGG —3'  
3'— Aaa**CAAT**Taaa**CCaCaC**AAA**CaC**TAaaaACC —5'

Figura 1:



- versión no metilada: temperatura de fusión relativamente baja y se derrite antes en el gradiente de temperatura (**curva roja**)
- versión metilada: funde a temperatura más alta (**curva azul**) .
- *POSIBLES RESULTADOS:* Silenciamiento del gen LCT por metilaciones

## OBJETIVO 4

### Comparación humano y ratón

Un ratón adulto WT será LNP, y otro tendrá el ADN mutado, tal como presentan los individuos LP.

- Presentar proyecto a un bioterio para la obtención de dos ratones adultos.
- Aislar ADN, amplificar (PCR) y secuenciar.
- Analizar si presentan la misma secuencia entre los especímenes.

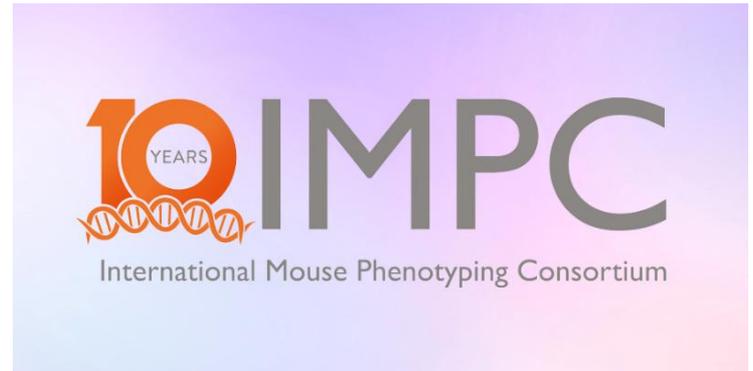


# Modificación genética

- A un ratón:

Mutación dirigida en la región reguladora del gen codificante para la lactasa.

- Dieta rica en lactosa a ambos ratones por 15 días. Registro



(“About the IMPC | IMPC | International Mouse Phenotyping Consortium” 2023)

# Posibles resultados

- Ratón mutado:

- ENZIMA

- Malestares con la dieta rica en lactosa

- Ratón mutado

- ENZIMA

- Malestares con la dieta rica en lactosa

→ Se adaptan a la dieta rica en lactosa luego de un tiempo

# Cierre

→ Existiría una diferencia en las frecuencias genotípicas del gen que regula la lactasa en ambas poblaciones, y podría deberse a las actividades de sus antepasados.

¿Por qué ocurrió la mutación en latitudes altas?



→ Existiría un cambio de base, fuera del sitio regulador de lactasa ,que podría asociarse a un fenotipo LP, aún siendo genotipo CC

# Estudios a futuro

1. Investigar si existen otros cambios de basea asociados a la intolerancia a la lactosa, dentro del sitio regulador, distintos del cambio C por T



# Retomando...

## *RESULTADO ESPERADO:*

### ESTADOS UNIDOS:

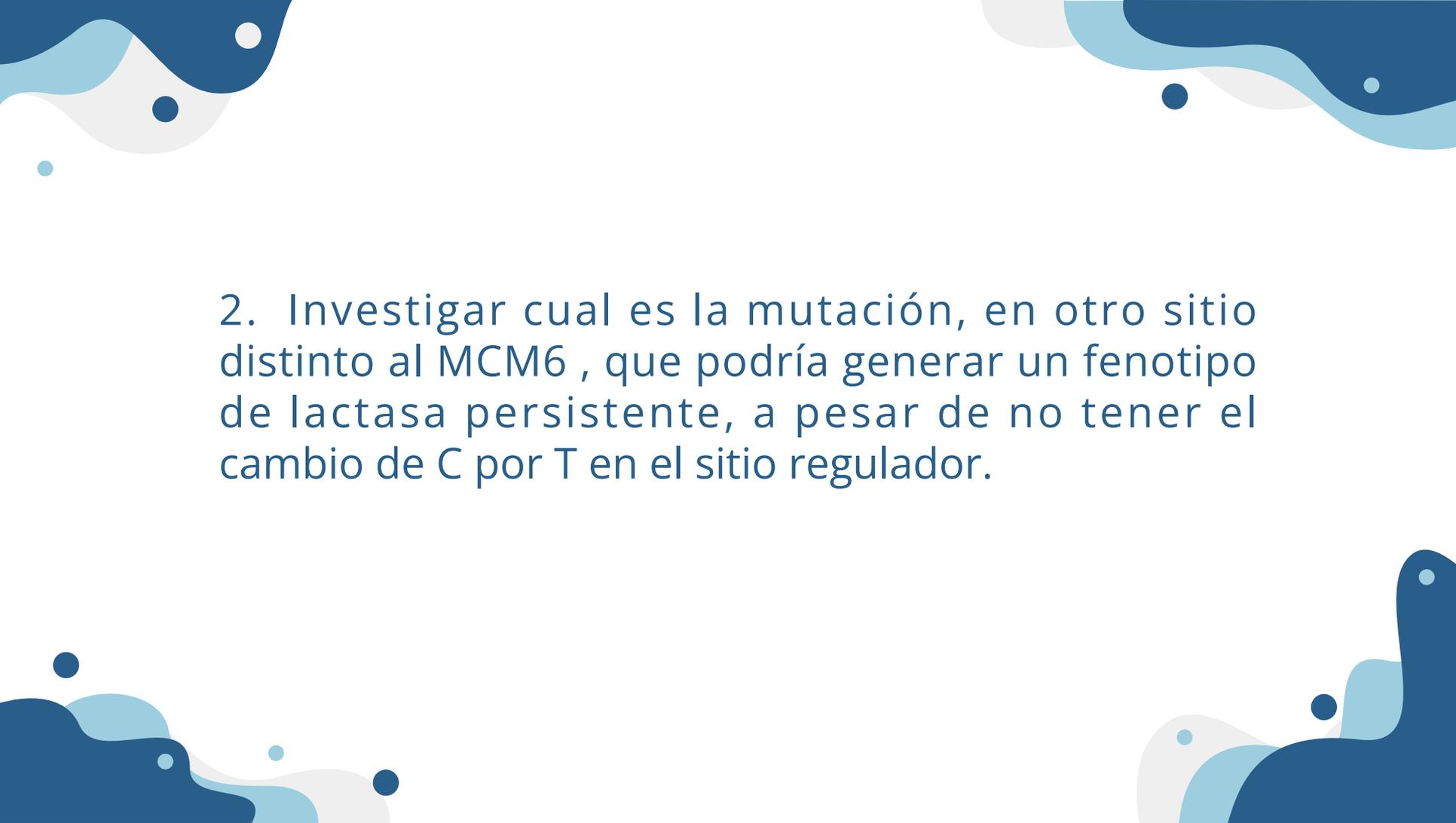
- Mayor proporción de genotipo TT (110/150)
- Baja proporción de genotipo CT(10/150)
- Baja proporción de genotipo CC (30/150)
  - De estos 30 CC, 10 no serán IL
  - De estos 110 TT, 3 serán IL

### ISRAEL:

- Mayor proporción de genotipo CC (120/150)
  - De estos 120 CC, 20 no serán IL

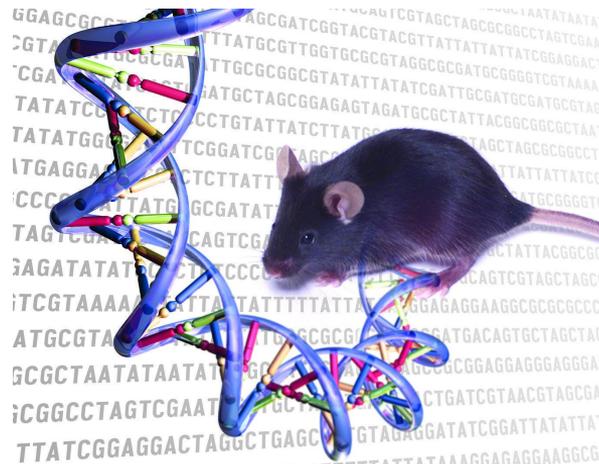
**¿Qué podría ocurrir? ¿Existe otra variante en la secuencia no reguladora del gen LCT que permita la digestión de lactosa?**





2. Investigar cual es la mutación, en otro sitio distinto al MCM6 , que podría generar un fenotipo de lactasa persistente, a pesar de no tener el cambio de C por T en el sitio regulador.

3. Insertar en ratón el mismo cambio de base (fuera del sitio regulador) que se encontró en los individuos que no presentaban intolerancia a la lactosa con el genotipo CC y evaluar sus síntomas.



# Bibliografía

- Enattah NS, Sahi T, Savilahti E, Terwilliger JD, Peltonen L, Jarvela I (2002) Identificación de una variante asociada con hipolactasia de tipo adulto. Nat Genet 30:233–237
- Intolerancia a la lactosa: mitos y realidades. Una actualización - PubMed. (2023). . Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35068123/>. Last accessed 3 June 2023.
- Romero Velarde E, Delgado Franco D, García Gutiérrez M, Gurrola Díaz C, et al. The importance of lactose in the human diet: Outcomes of a Mexican Consensus Meeting. Nutrients. 2019; 11(11):2737.
- Forsgard RA. Lactose digestion in humans: intestinal lactase appears to be constitutive whereas the colonic microbiome is adaptable. Am J Clin Nutr. 2019; 110(2):273-9.
- Gomez, F., Hirbo, J. & Tishkoff, S.A. (2014). Genetic Variation and Adaptation in Africa: Implications for Human Evolution and Disease. Cold Spring Harb Perspect Biol, 6, a008524.
- Fitzgerald, M.C., Skowron, P., Van Etten, J.L., Smith, L.M. & Maed, D.A. (1992). Rapid shotgun cloning utilizing the two base recognition endonuclease CviJI. Nucl Acids Res, 20, 3753–3762.
- What is bisulfite modification? (n.d.). MethylDetect.com.
- Forside - MethylDetect.com. (2023). . Available at: <https://www.methylDetect.com/>. Last accessed 8 June 2023.
- About the IMPC | IMPC | International Mouse Phenotyping Consortium. (2023). . Available at: <https://www.mousephenotype.org/about-impc/>. Last accessed 8 June 2023.
- Neolítico: sociedad, arte, arquitectura y características. (2023). . Available at: <https://humanidades.com/neolitico/>. Last accessed 9 June 2023.

**GRACIAS POR SU ATENCIÓN**



**CUALQUIER DUDA CONSULTEN GOOGLE**