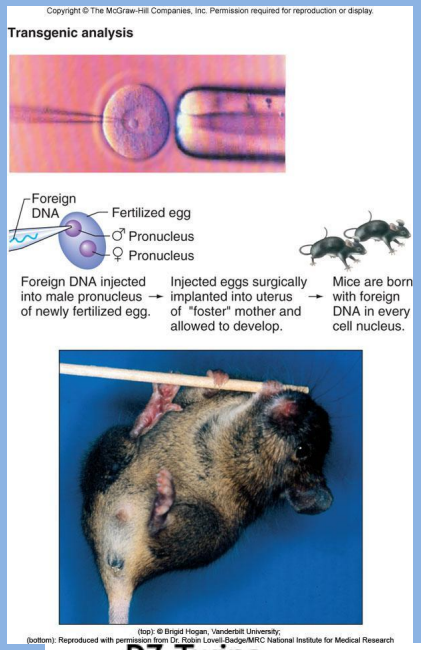
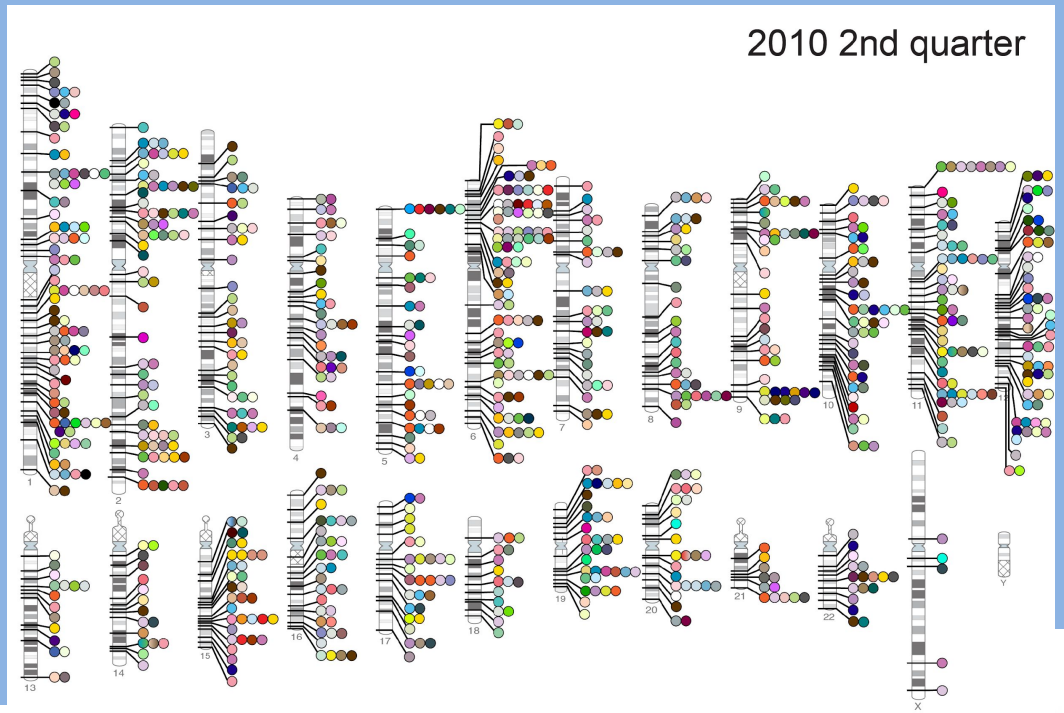
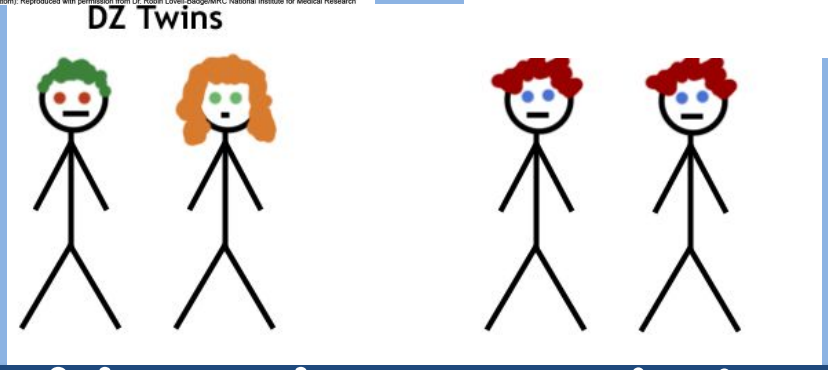
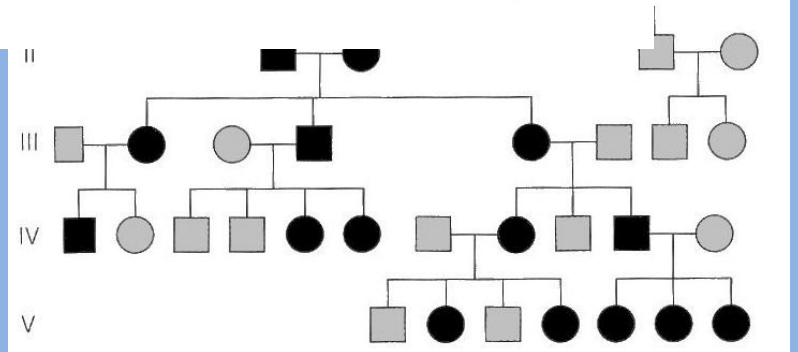


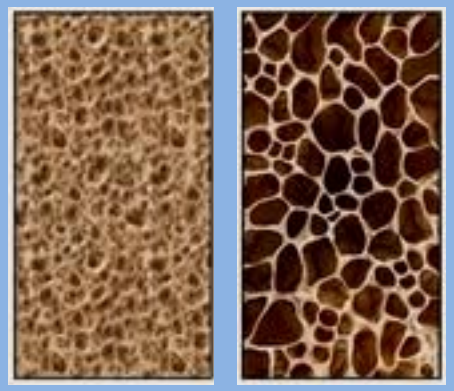




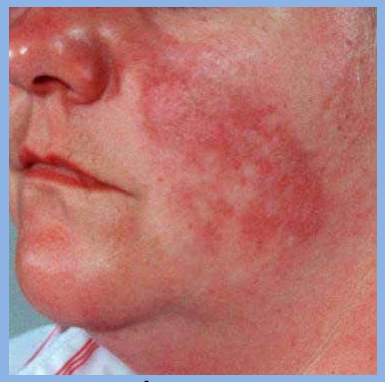


Abordagens integrativas para se estudar doencas complexas

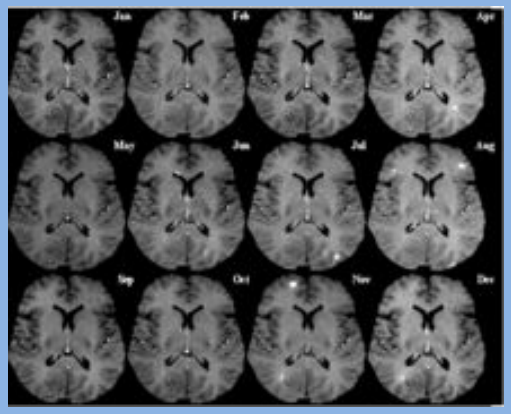
DOENÇAS COMPLEXA



osteoporose



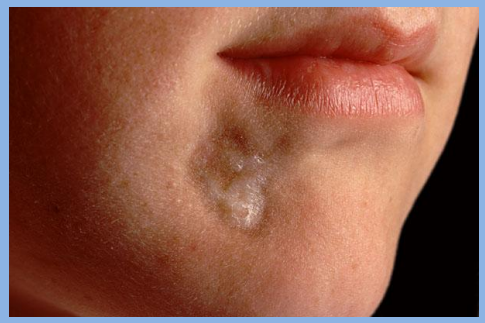
lupus



esclerose múltipla

Alzheimer's

asma



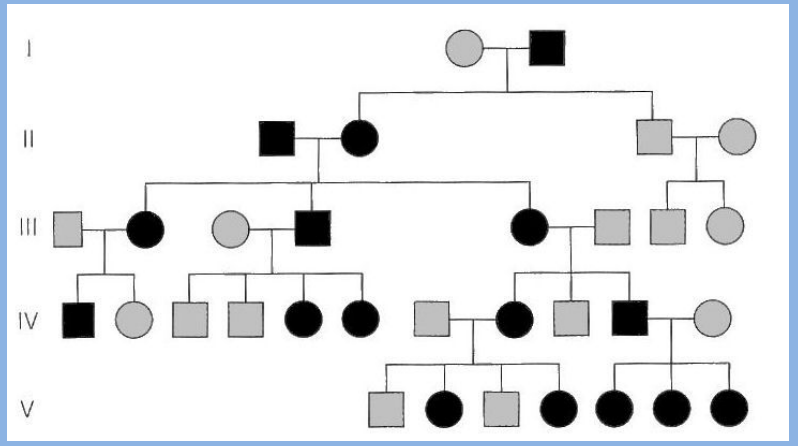
escleroderma

DOENÇAS COMPLEXA

Critério de diagnostico

-Individuo Afetado ou Não afetado

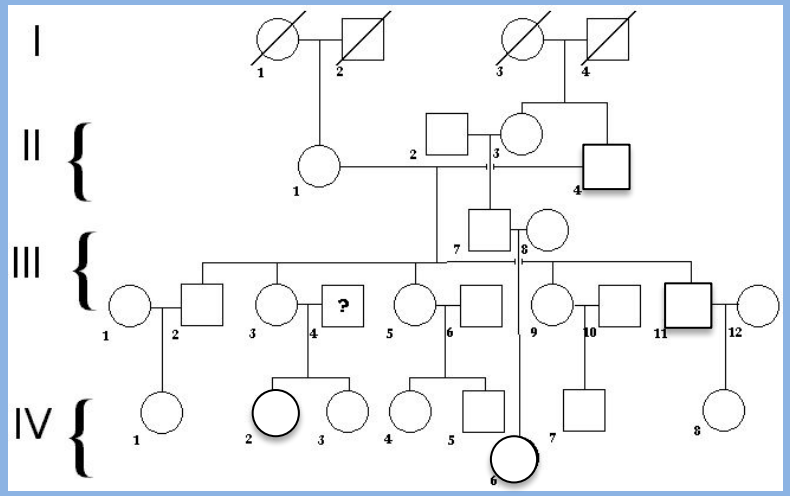
-Doenças psiquiátricas e do comportamento



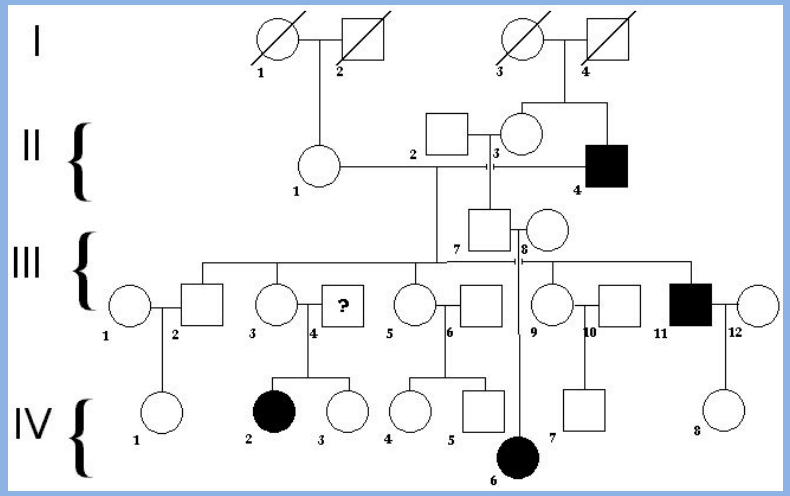
DOENÇAS COMPLEXA

Base Genética

Pessoas que compartilham DNA, tem mais chance de apresentar o mesmo fenótipo



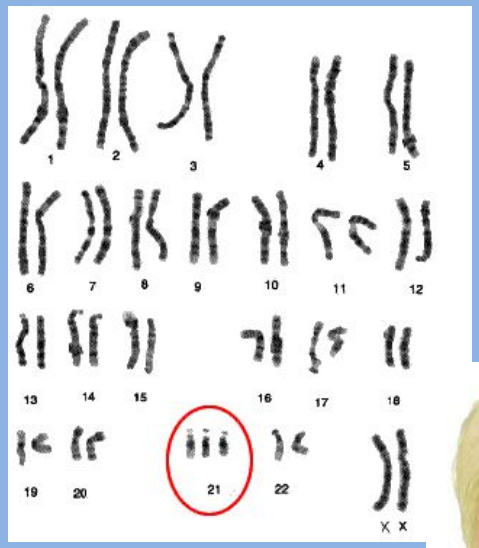
X

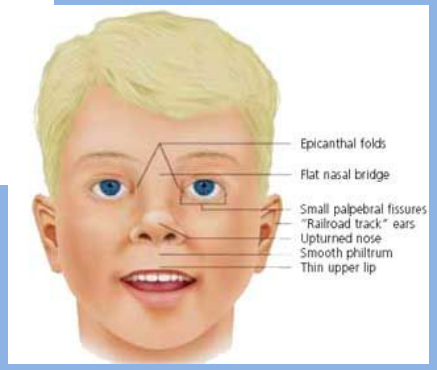


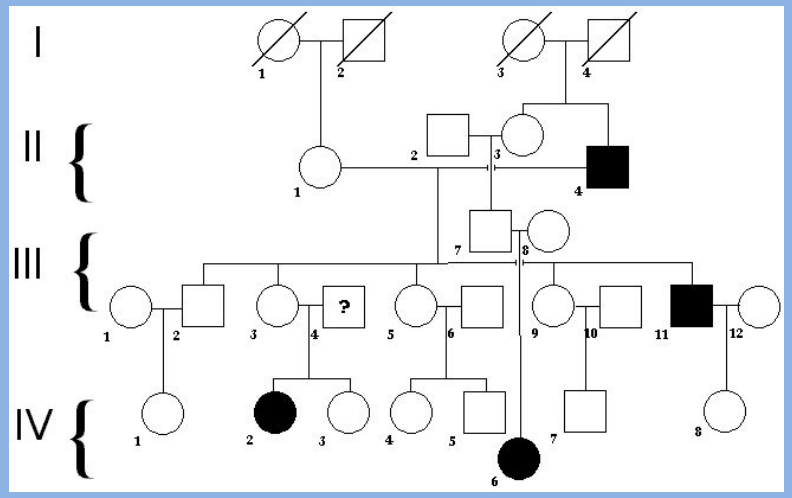
DOENÇAS COMPLEXA

Base Genética

Doenças com heranças mendelianas ou associadas com aberrações cromossômicas







DOENÇAS COMPLEXA

Razão de Risco

λ = risco do parente do afetado / risco na populacao geral

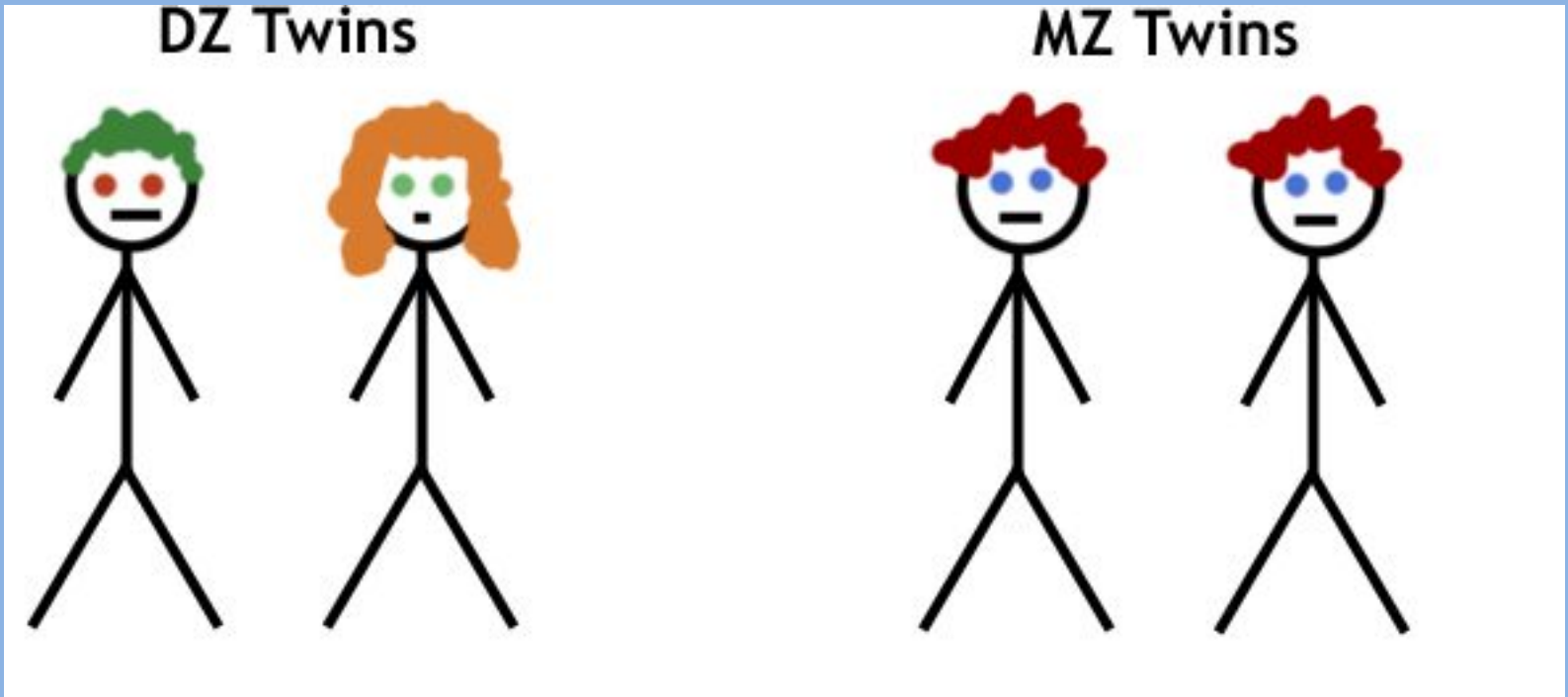
TABLE 15.1 RISK OF SCHIZOPHRENIA AMONG RELATIVES OF SCHIZOPHRENICS: POOLED RESULTS OF SEVERAL STUDIES

Relative	No. at risk	Risk (%)	λ
Parents	8020	5.6	7
Sibs	9920.7	10.1	12.6
Sibs, one parent affected	623.5	16.7	20.8
Offspring	1577.3	12.8	16
Offspring, both parents affected	134	46.3	58
Half-sib	499.5	4.2	5.2
Uncles, aunts, nephews, nieces	6386.5	2.8	3.5
Grandchildren	739.5	3.7	4.6
Cousins	1600.5	2.4	3

DOENÇAS COMPLEXA

Estudo de Gêmeos

Estudo de gêmeos dizigóticos e monozigóticos



50%

100%

DOENÇAS COMPLEXA

Estudo de Gêmeos

Estudo de gêmeos dizigóticos e monozigóticos

TABLE 15.2 TWIN STUDIES IN SCHIZOPHRENIA

Study	Country	Concordant pairs	
		MZ	DZ
Kringlen et al. (1968)	Norway	14/50 (0.28)	6/94 (0.06)
Fischer et al. (1969)	Denmark	5/21 (0.23)	4/41 (0.10)
Tienari et al. (1975)	Finland	3/20 (0.15)	3/42 (0.07)
Farmer et al. (1987)	UK	6/17 (0.35)	1/20 (0.05)
Onstad et al. (1991)	Norway	8/24 (0.33)	1/28 (0.04)

Problema

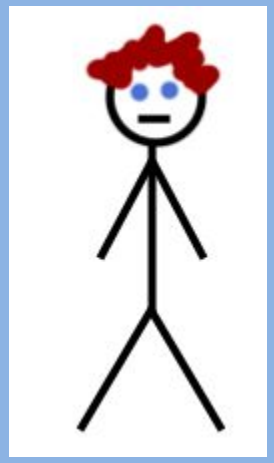
1) Monozigóticos tem mais chance de ter mesmo sexo

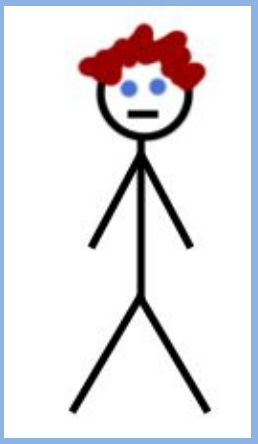
2) Monozigóticos são tratados mais igualmentes

DOENÇAS COMPLEXA

Estudo de Gêmeos

Estudo de gêmeos monozigóticos separados ao nascimento





Problema

1) Tamanho amostral (N) pequeno

2) Separação não total

3) Ambiente Intra-uterino

DOENÇAS COMPLEXA

Estudo de Adoção

Estudo com pessoas adotadas

1) Procurar pessoas adotadas com doenças complexas e investigar se os pais biológicos ou os adotivos apresentam a mesma doença

2) Procurar pais adotivos com doenças complexas e investigar se os filhos adotivos apresentam a mesma doença.

DOENÇAS COMPLEXA

Estudo de Adoção

TABLE 15.3 AN ADOPTION STUDY IN SCHIZOPHRENIA

Case types	Schizophrenia cases among biological relatives	Schizophrenia cases among adoptive relatives
Index cases (47 chronic schizophrenic adoptees)	44/279 (15.8%)	2/111 (1.8%)
Control adoptees (matched for age, sex, social status of adoptive family, and number of years in institutional care before adoption)	5/234 (2.1%)	2/117 (1.7%)

Problema

1) Falta de histórico familiar dos pais biológicos

2) Semelhança de características na adoção

DOENÇAS COMPLEXA

Identificação da região do genoma

Problema

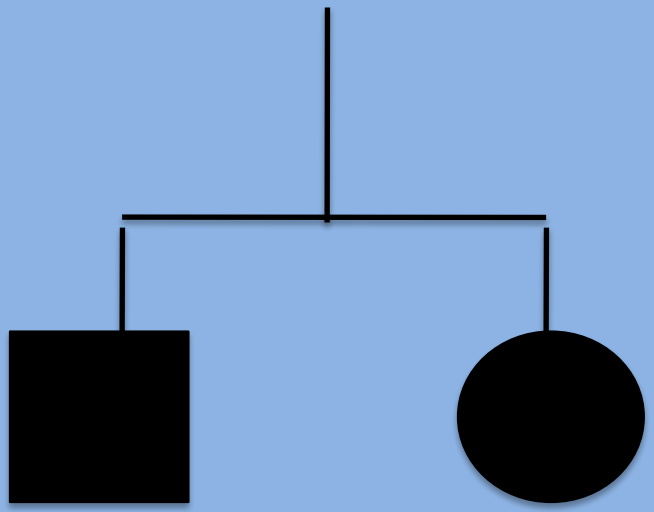
Como identificar a região do genoma responsável pelo fenótipo?

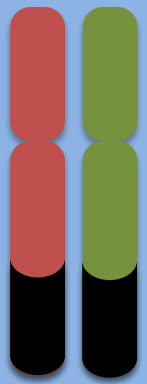
DOENÇAS COMPLEXA

Identificação da região do genoma

Analise de Ligação

Procura encontrar segmentos dos cromossomos que são compartilhados por membros afetados nas famílias

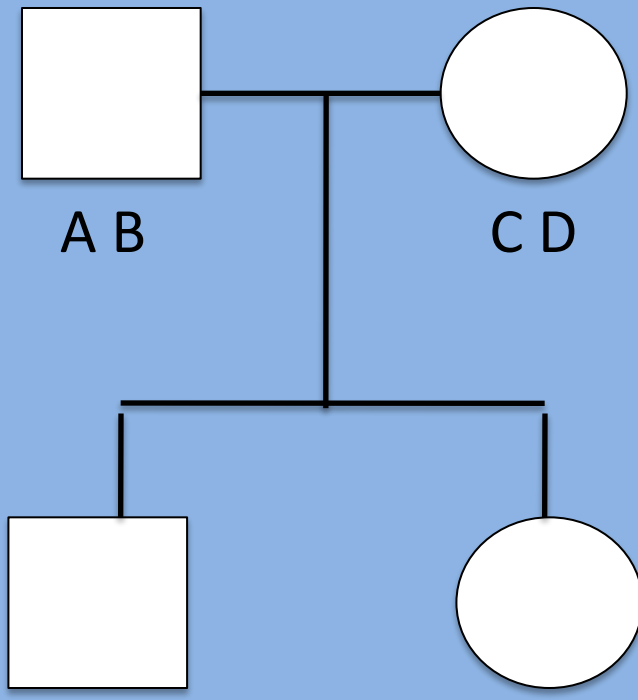




DOENÇAS COMPLEXA

Identificação da região do genoma

Analise de Ligação



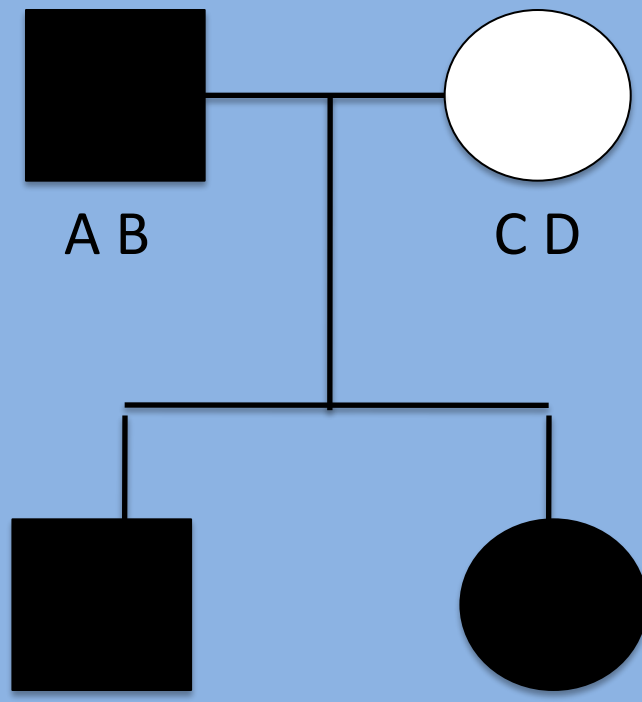
A C	1/4 (Ambos)
A D B C	1/2 (Pelo menos um)
B D	¼ (Nenhum)

DOENÇAS COMPLEXA

Identificação da região do genoma

Analise de Ligação

Dominância



1/2

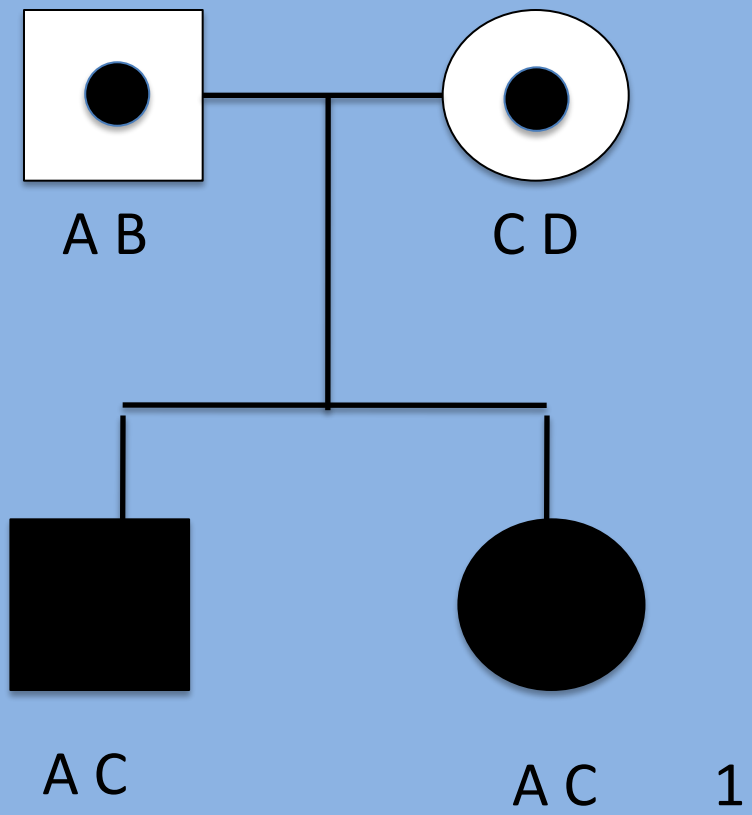
1/2

DOENÇAS COMPLEXA

Identificação da região do genoma

Analise de Ligação

Recessividade



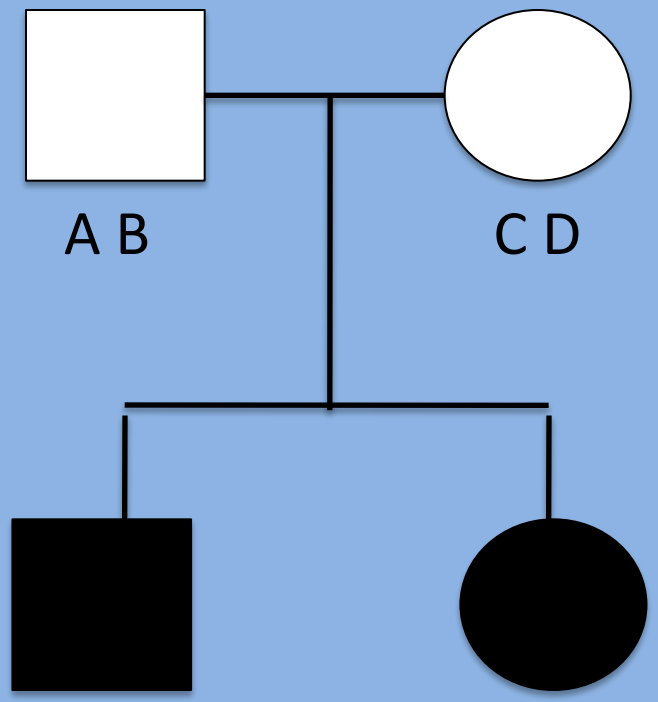
1

DOENÇAS COMPLEXA

Identificação da região do genoma

Analise de Ligação

Condição complexa



A C	>1/4
A D B C	>1/2
B D	<1/4

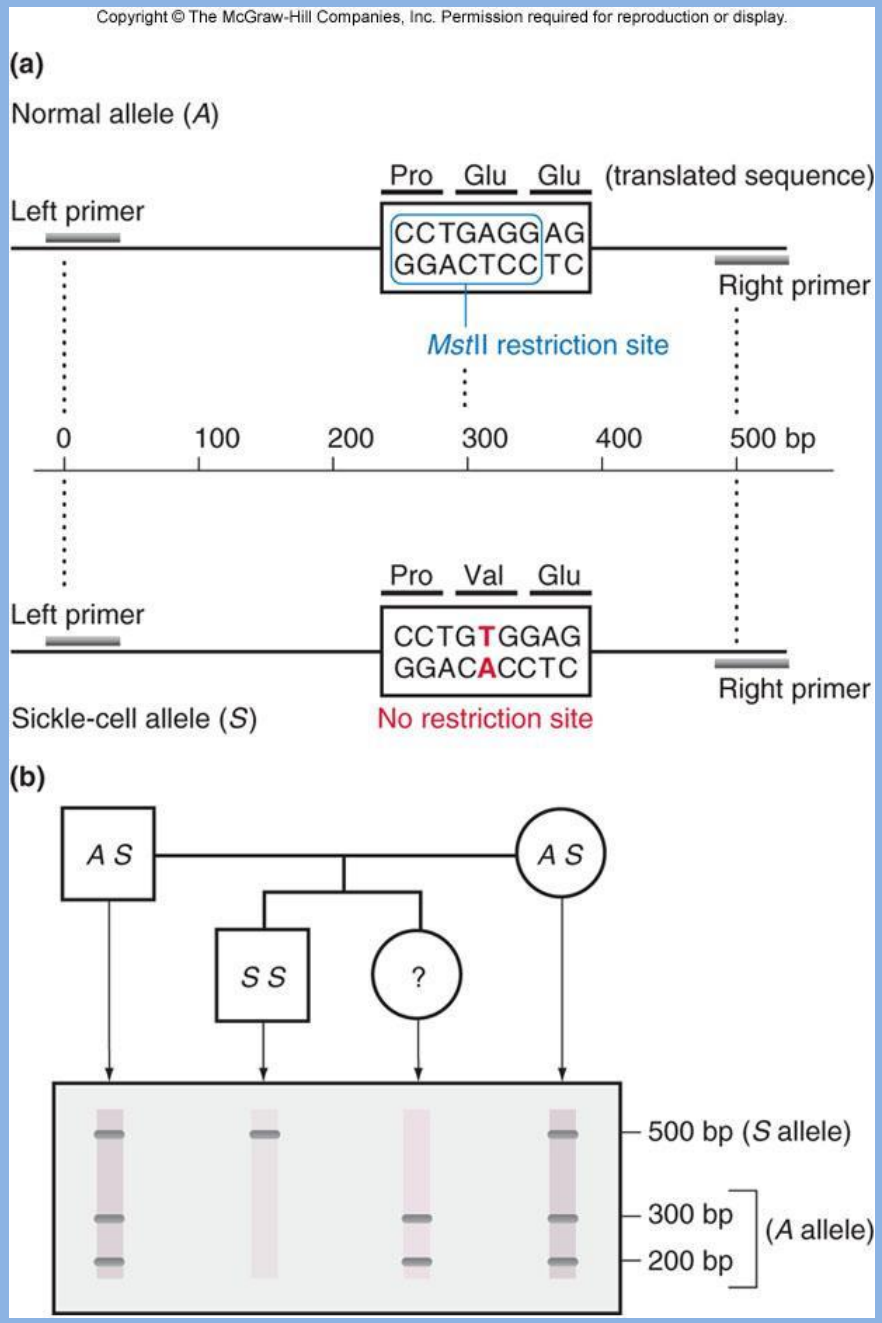
4 classes de polimorfismo de DNA

TABLE 11.1 Classes of DNA Polymorphisms

Class	Size of Locus	Number of Alleles	Number of Loci in Population	Rate of Mutation	Use	Method of Detection
SNP	Single base pair	2	100 million	10^{-9}	Linkage mapping	PCR followed by ASO hybridization or primer extension
Microsatellite	30–300 bp	2–10	200,000	10^{-3}	Linkage mapping	PCR and gel electrophoresis
Multilocus Minisatellite	1–20 kb	2–10	30,000	10^{-3}	DNA fingerprinting	Southern blot and hybridization
Small Changes in DNA Content (deletions and duplications)	1–100 bp	2	N/A	$<10^{-9}$	Linkage mapping	PCR and gel electrophoresis

Single nucleotide polymorphism (SNP)

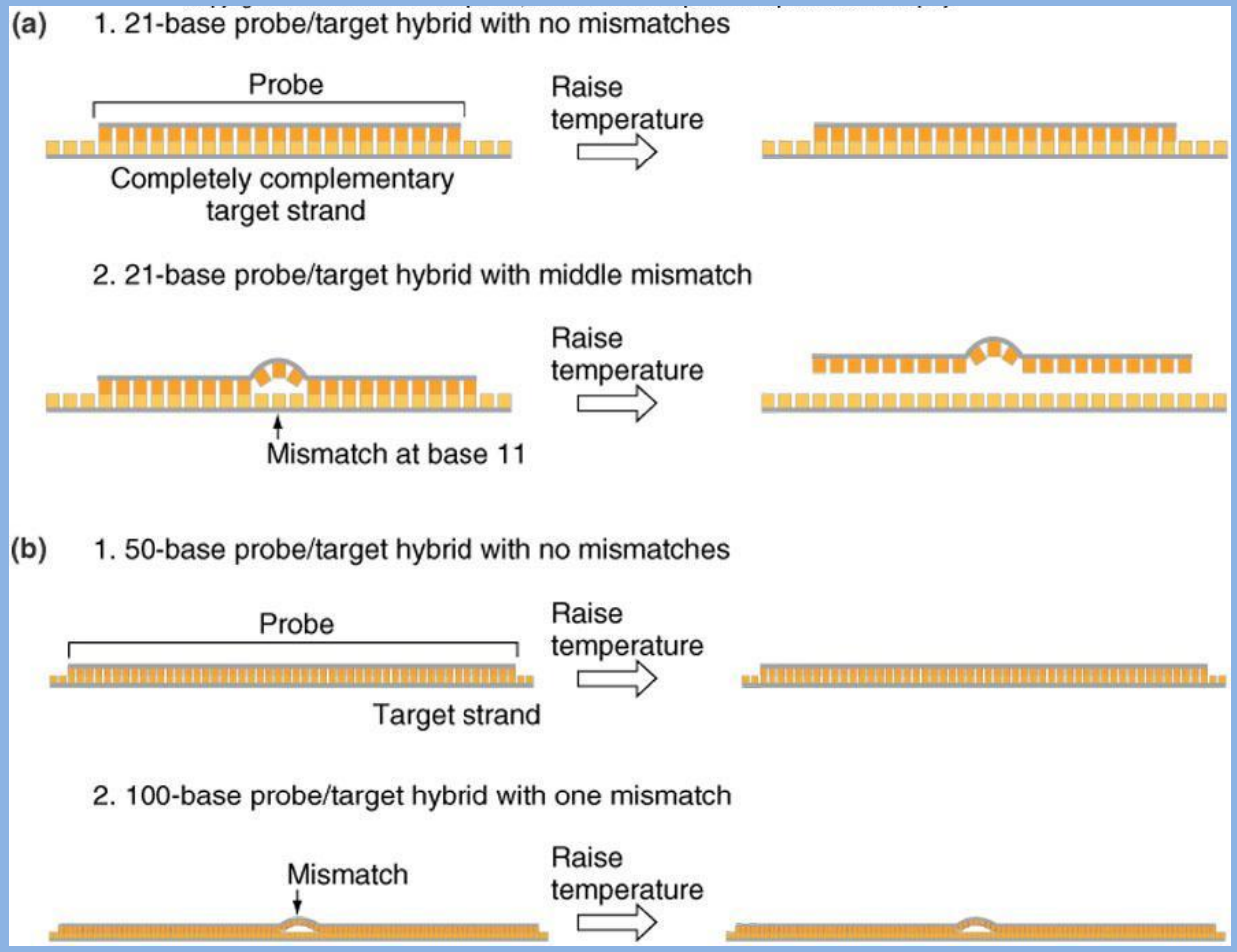
- Single base-pair substitutions
- Arise by mutagenic chemicals or mistakes in replication
- Biallelic – only two alleles
- Ratio of alleles ranges from 1:100 to 50:50.
- 2001 – over 5 million human SNPs identified
- Most occur at anonymous loci.
- Mutation rate of 1×10^{-9} per locus per generation
- Very few are thus new mutation in the species.
- Useful as DNA markers



SNP detection by PCR

- Must have sequence on either side of polymorphism
  - Amplify fragment
  - Expose to restriction enzyme
  - Gel electrophoresis
- e.g., sickle-cell genotyping with a PCR based protocol

SNP detection by ASO



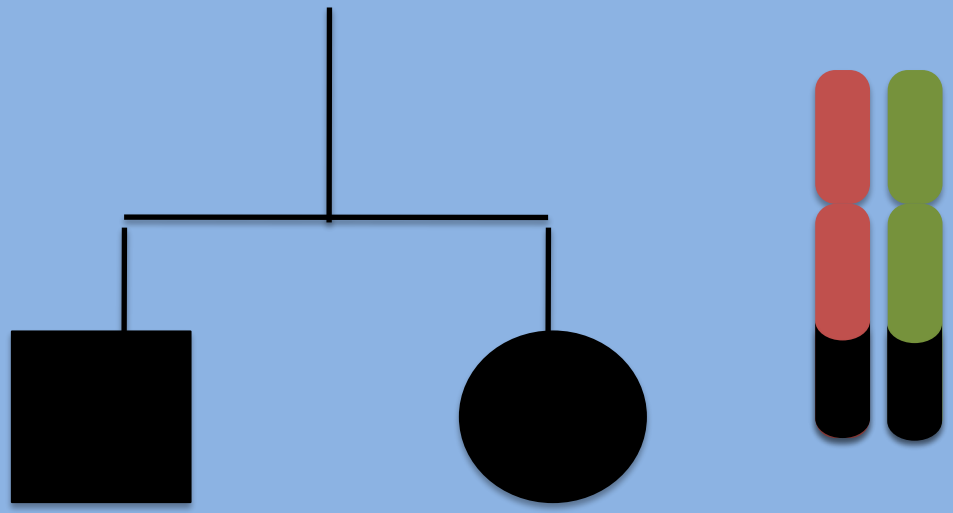
- Very short probes (<21 bp) specific which hybridize to one allele or other
- Such probes are allele-specific oligonucleotides (ASOs).

DOENÇAS COMPLEXA

Identificação da região do genoma

Analise de Ligação

Problemas: regiões muito grandes, pouco recombinantes.



Estudos de associação e desequilíbrio de ligação

Gene

AGTCCTCGTCTCAGCTCGTGAAATTTGTGCCCC
AGTCGTCGTCTCAGCTCGTGAAATTTGGGCCCC

Gene Mutado

AGTCCTCGTCTCAGCCCGTGAAATTTGTGCCCC
AGTCGTCGTCTCAGCTCGTGAAATTTGGGCCCC

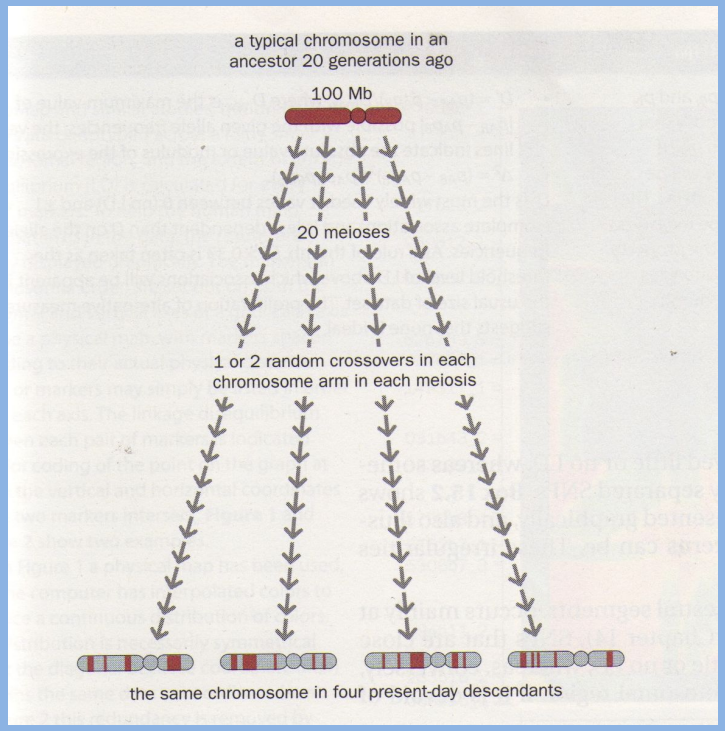
Estudos de associação e desequilíbrio de ligação

Gene Mutado

AGTCCTCGTCTCAGCCCGTGAAATTTGTGCCCC
AGTCGTCGTCTCAGCTCGTGAAATTTGGGCCCC

F1 … F2…
F3….Fn

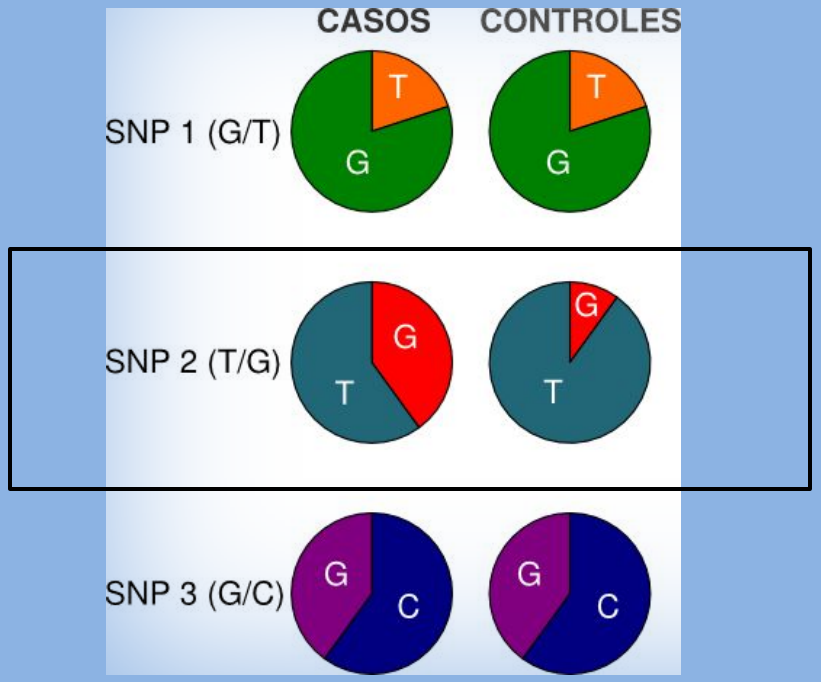
Estudos de associação e desequilíbrio de ligação



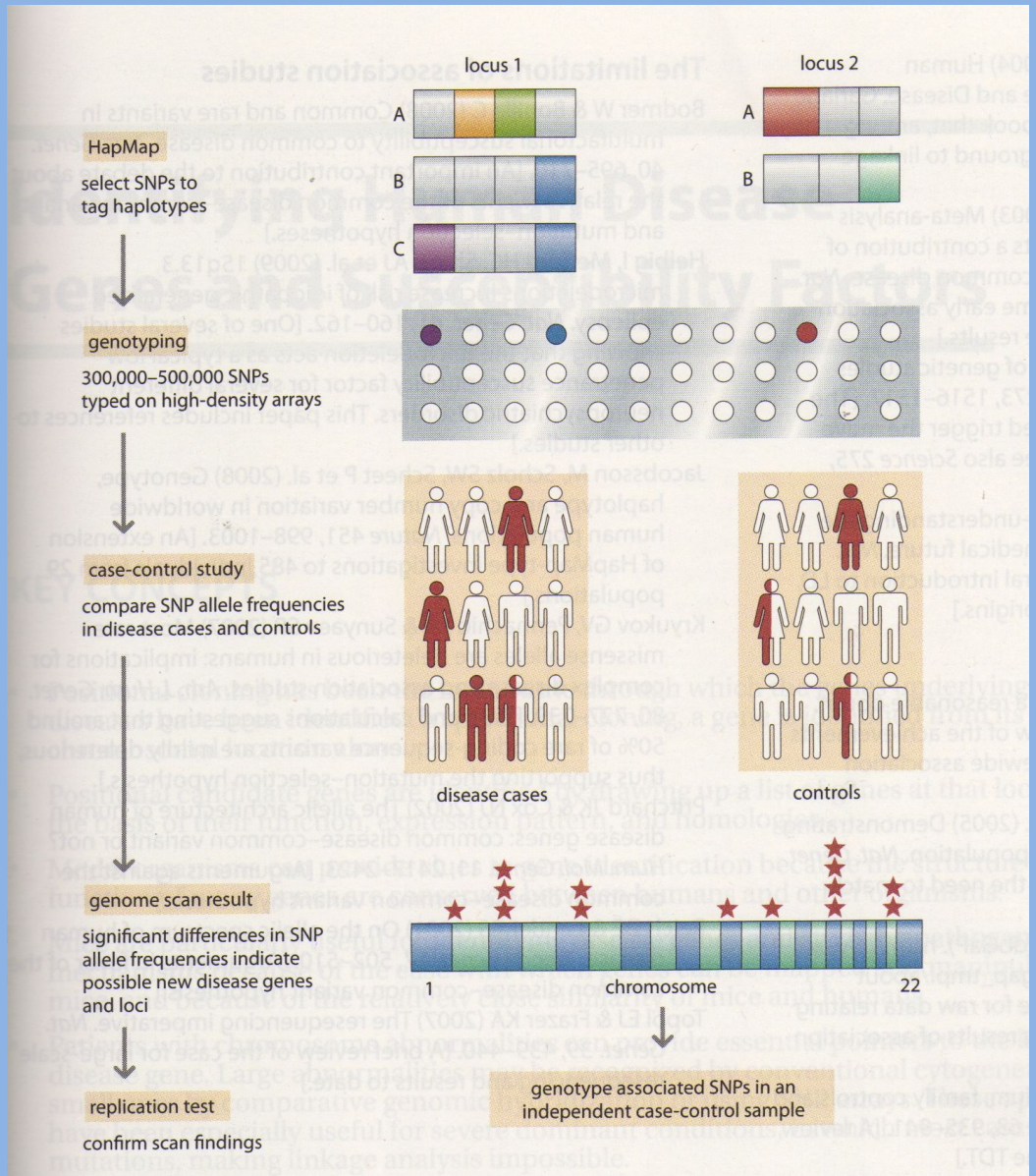
Todos humanos são relacionados em um ancestral em comum. No reino unido, por exemplo, duas pessoas não relacionadas tem um ancestral em comum não mais que 22 gerações atrás.

Estudos de associação genomica em larga escala

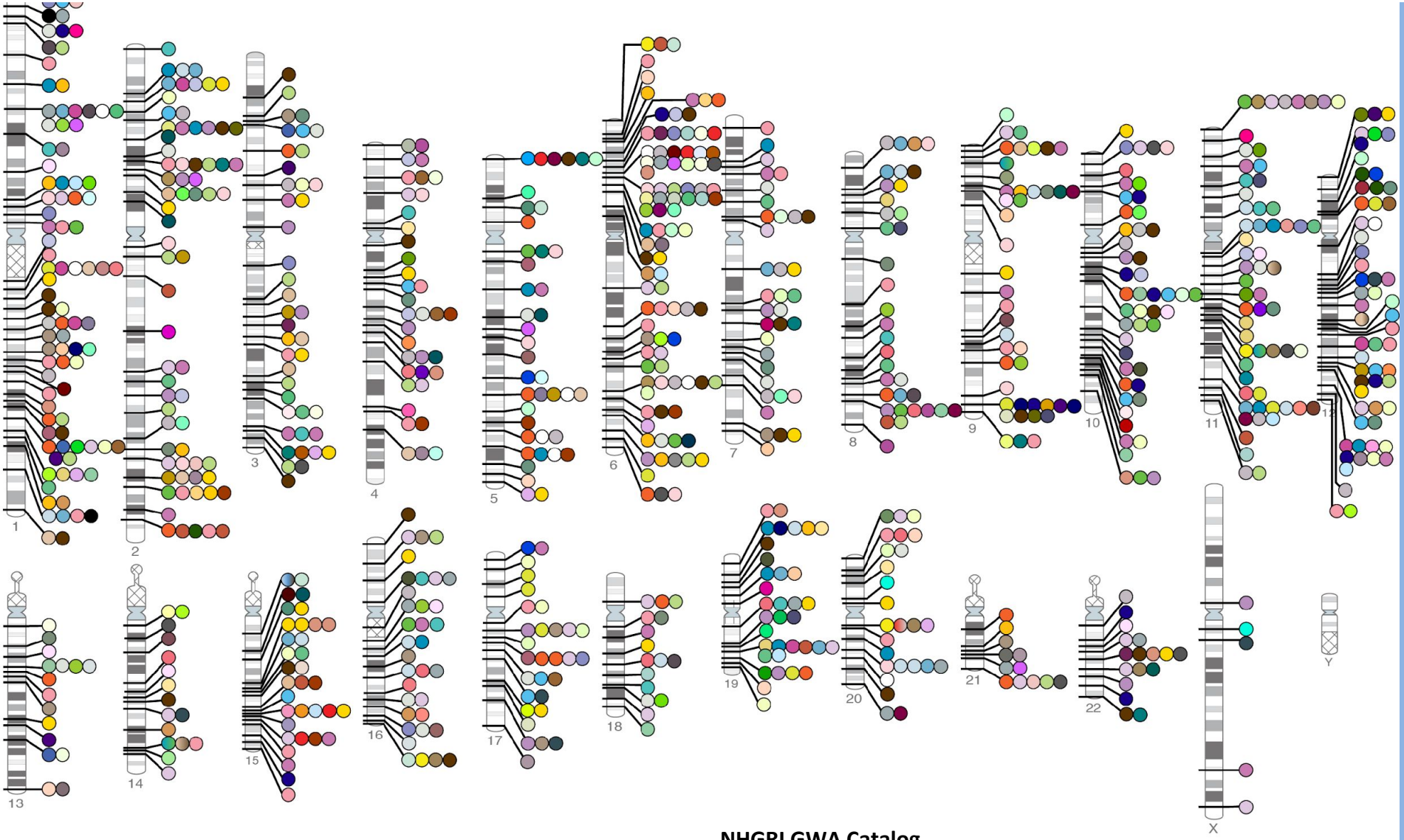
Associação



Estudos de associação genomica em larga escala (GWA)

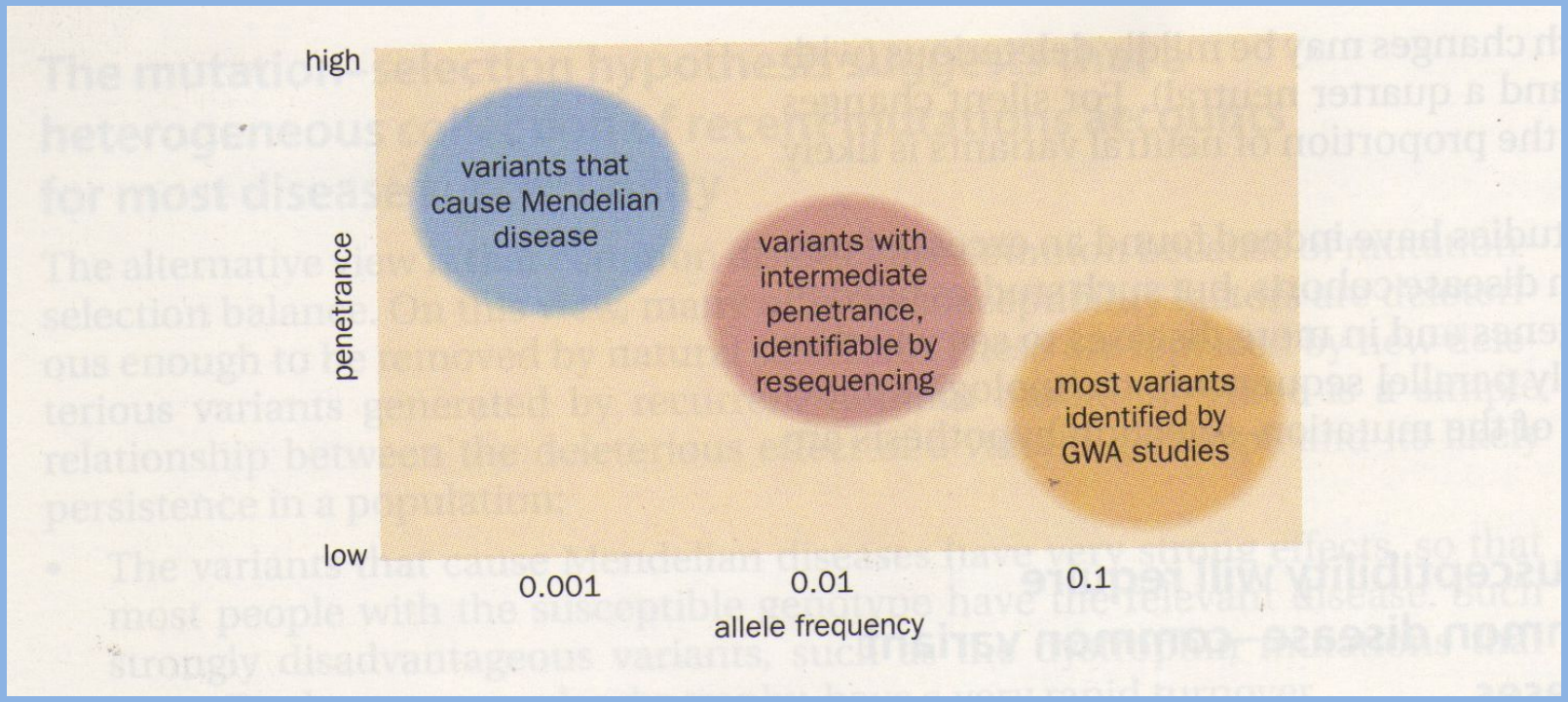


Associacoes genomica em larga escala publicadas
165 tracos



NHGRI GWA Catalog
www.genome.gov/GWAStudies

Estudos de associação genomica em larga escala



Abordagens integrativas

- Após uma região cromossômica ser identificada, os genes dentro da região devem ser investigados
- Genes candidatos
  - Usualmente existem 10 genes por fragmentos de 1kb
  - Identificar regiões codificantes
    - Análises computacionais para identificar regiões conservadas entre espécies
    - Análises computacionais para identificar seqüência que se parecem com exons, (ORFs, sítios de splice, uso de determinado de codons)
    - Aparecimento de um ou mais clones de ESTs

Analises computacionais de seqüência genomicas para identificar genes candidatos

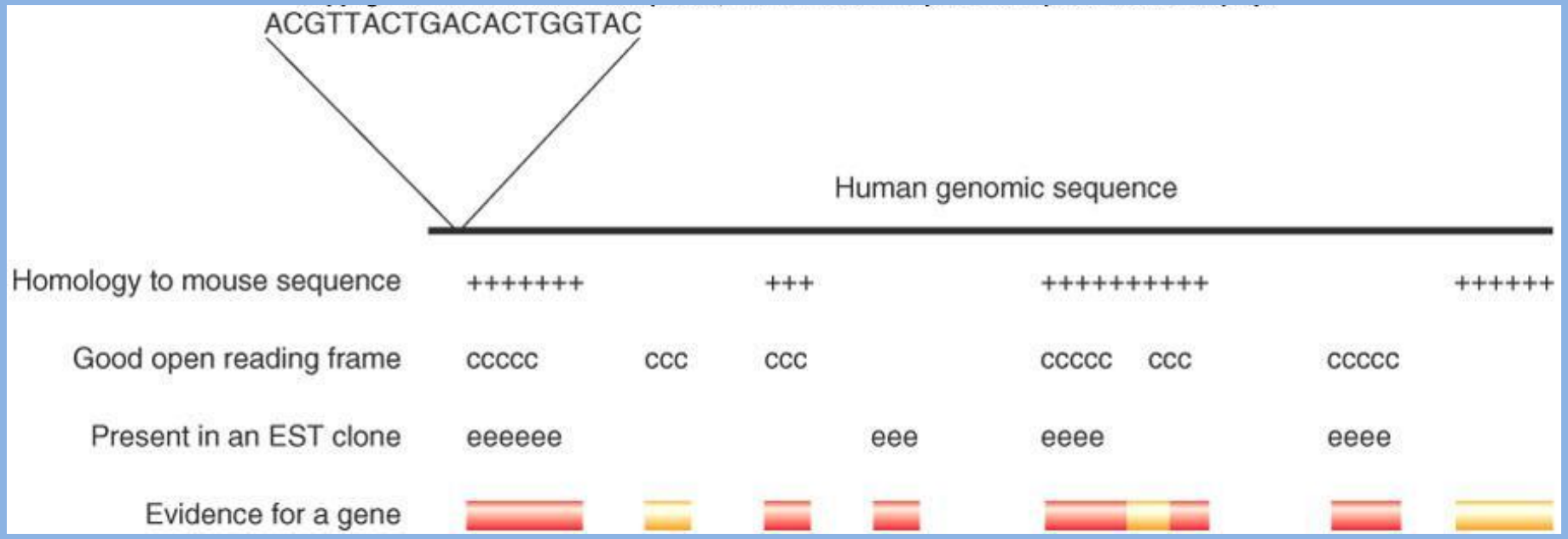
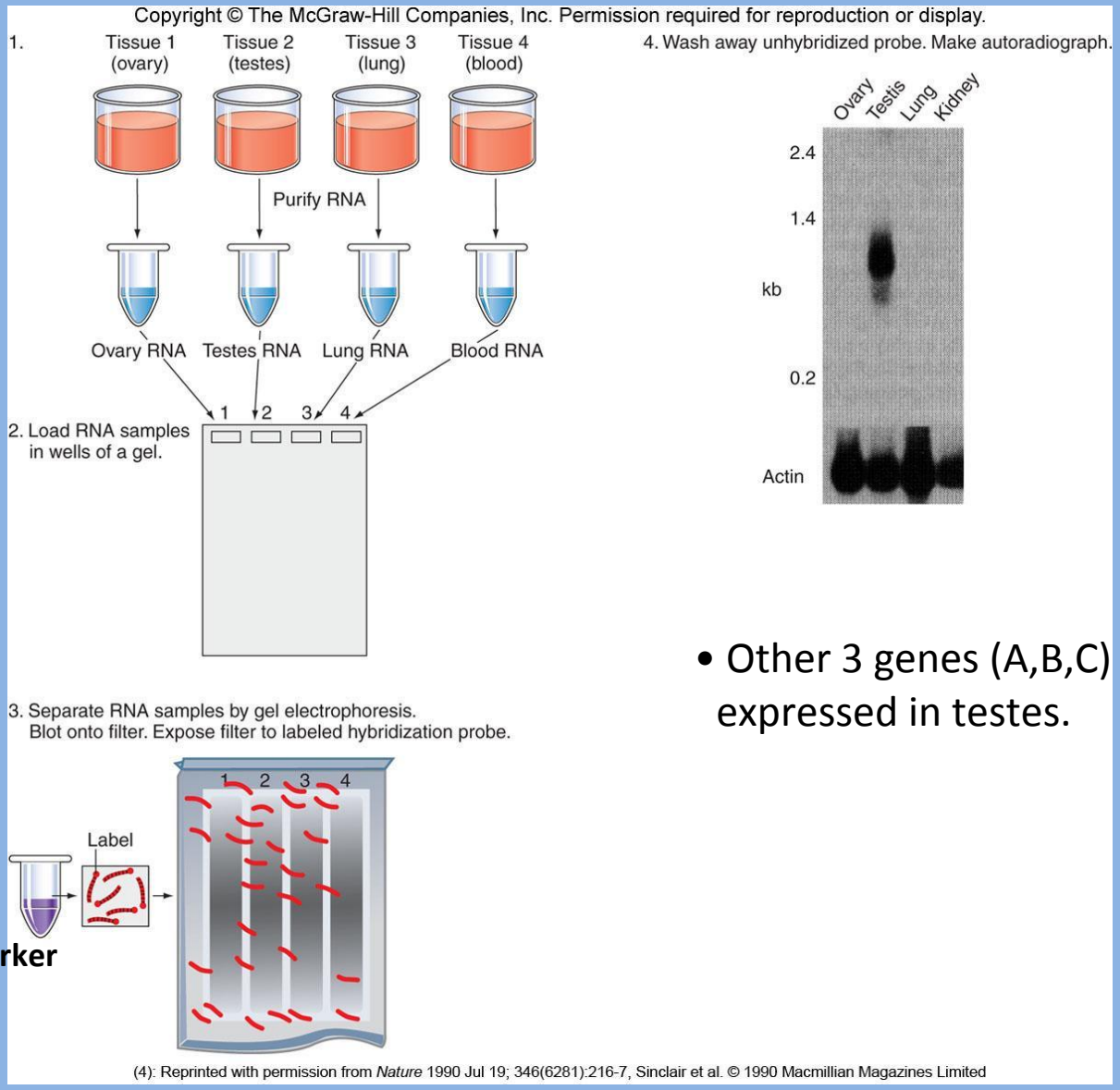


Fig. 11.19

Padrões de expressão gênica podem apontar para genes candidatos

- Sequencias publicas de banco de dados de EST especificos de certos tecidos
- Northern blot
  - Transcritos de RNA de celulas de um tecido em particular (e.g. com doenca) separados por eletroforese e a sonda do gene candidato

Northern blot example showing *SRY* candidate for testes determining factor is expressed in testes, but not lung, ovary, or kidney.



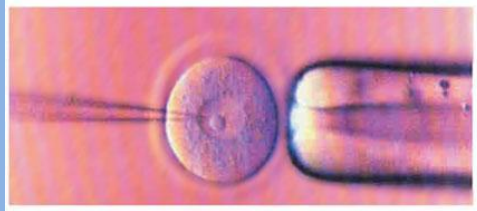
- Other 3 genes (A,B,C) are not expressed in testes.

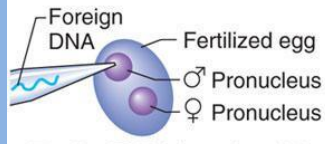
***SRY* RNA Labelled with Radioactive marker**

- Procurar os genes responsáveis pelo fenótipo.
  - Padrões de expressão
    - Ensaio de expressão de RNA por Northern blot ou amplificação de PCR de cDNA com primers específicos do gene candidato
    - Procurar por “misexpression” (no expression, underexpression, overexpression).
  - Diferenças nas seqüências
    - Identificar mutações sem sentido ao seqüenciar gene candidato em indivíduos afetados e não afetados
  - Modificações transgênicas do fenótipo
    - Inserir gene mutante em organismos modelos.

Transgenic analysis can prove candidate gene is disease locus.

Transgenic analysis





Foreign DNA injected into male pronucleus of newly fertilized egg. → Injected eggs surgically implanted into uterus of "foster" mother and allowed to develop. → Mice are born with foreign DNA in every cell nucleus.

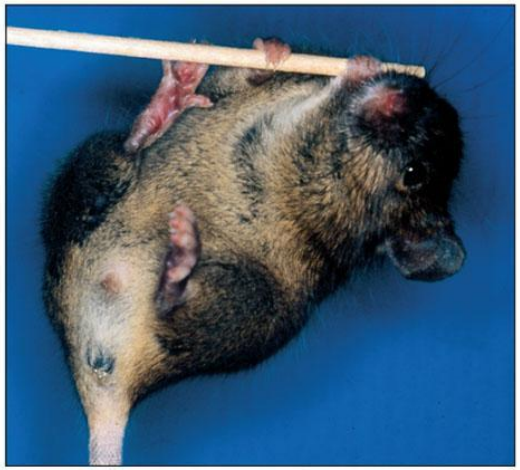


Fig. 11.21

Variantes em 8q24 sao associados com cancer de prostata

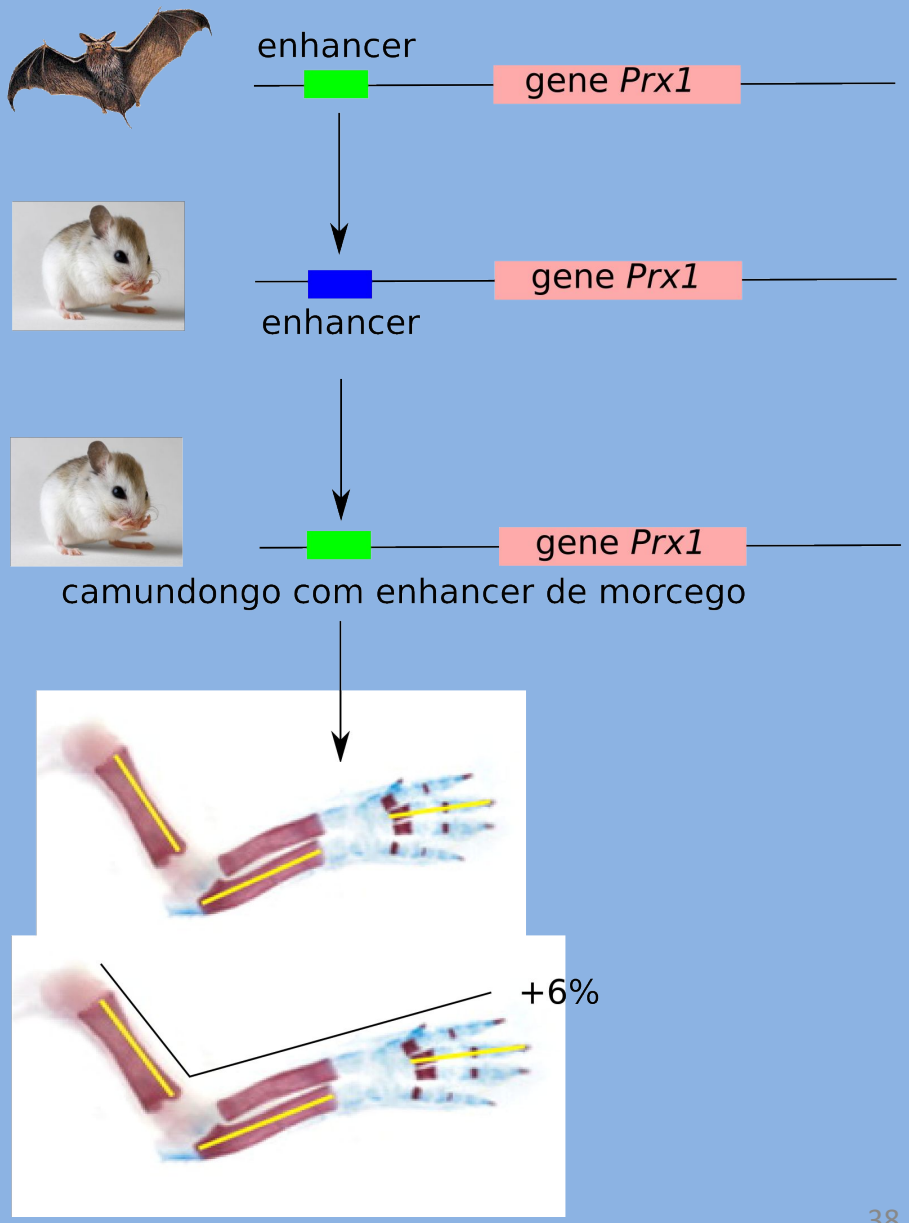
Multiple regions within 8q24 independently affect risk

Identification of a new prostate cancer susceptibility locus on chromosome 8q24

- Cinco independentes 8q24 loci associados ao cancer de prostata
- Nenhum gene conhecido nessa regiao

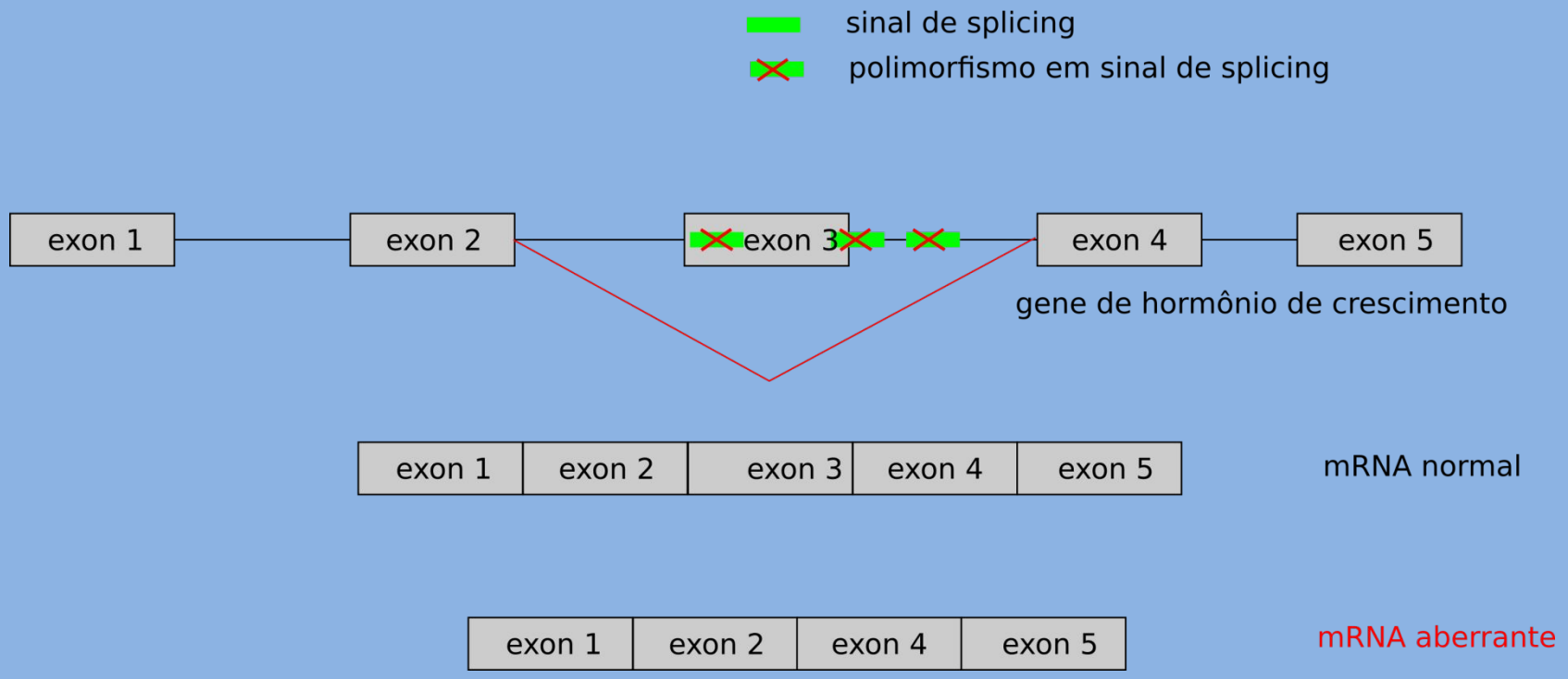
Fenótipos nem sempre são produto da alteração de genes codificadores de proteínas.

Elementos reguladores



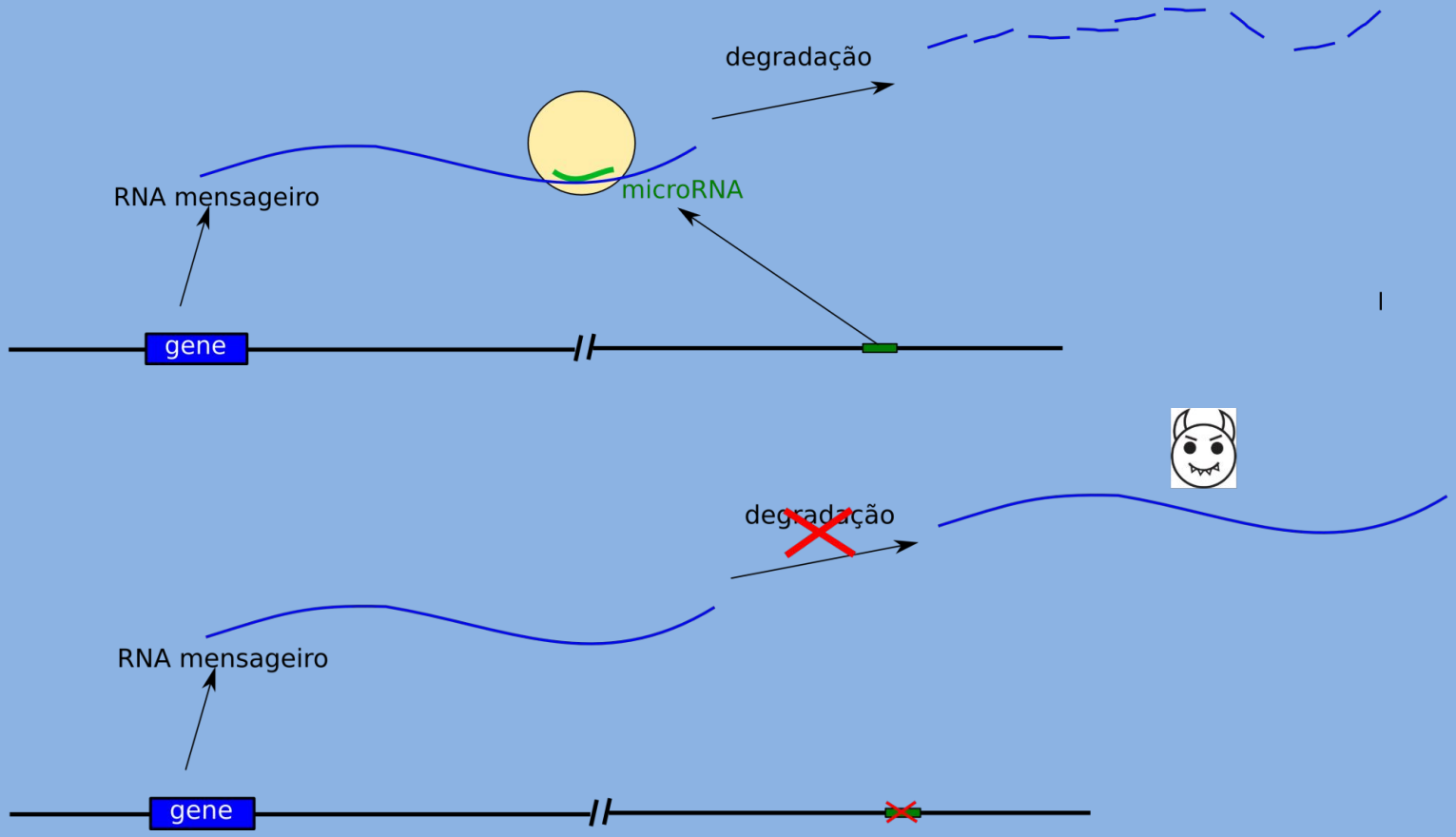
Splicing Alternativo

Polimorfismos em sinais de splicing resultam em
deficiência de hormônio de crescimento familial tipo II

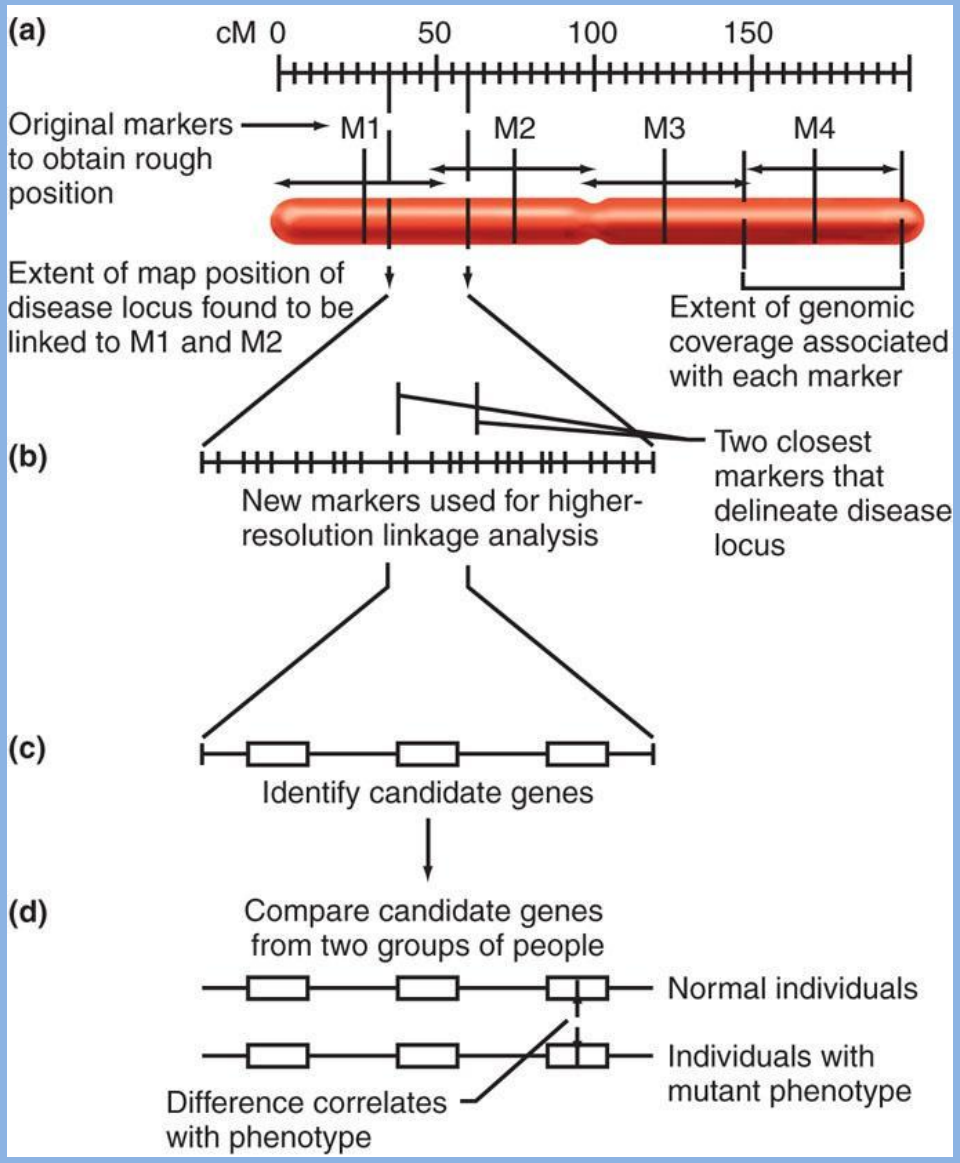


RNA nao codificante

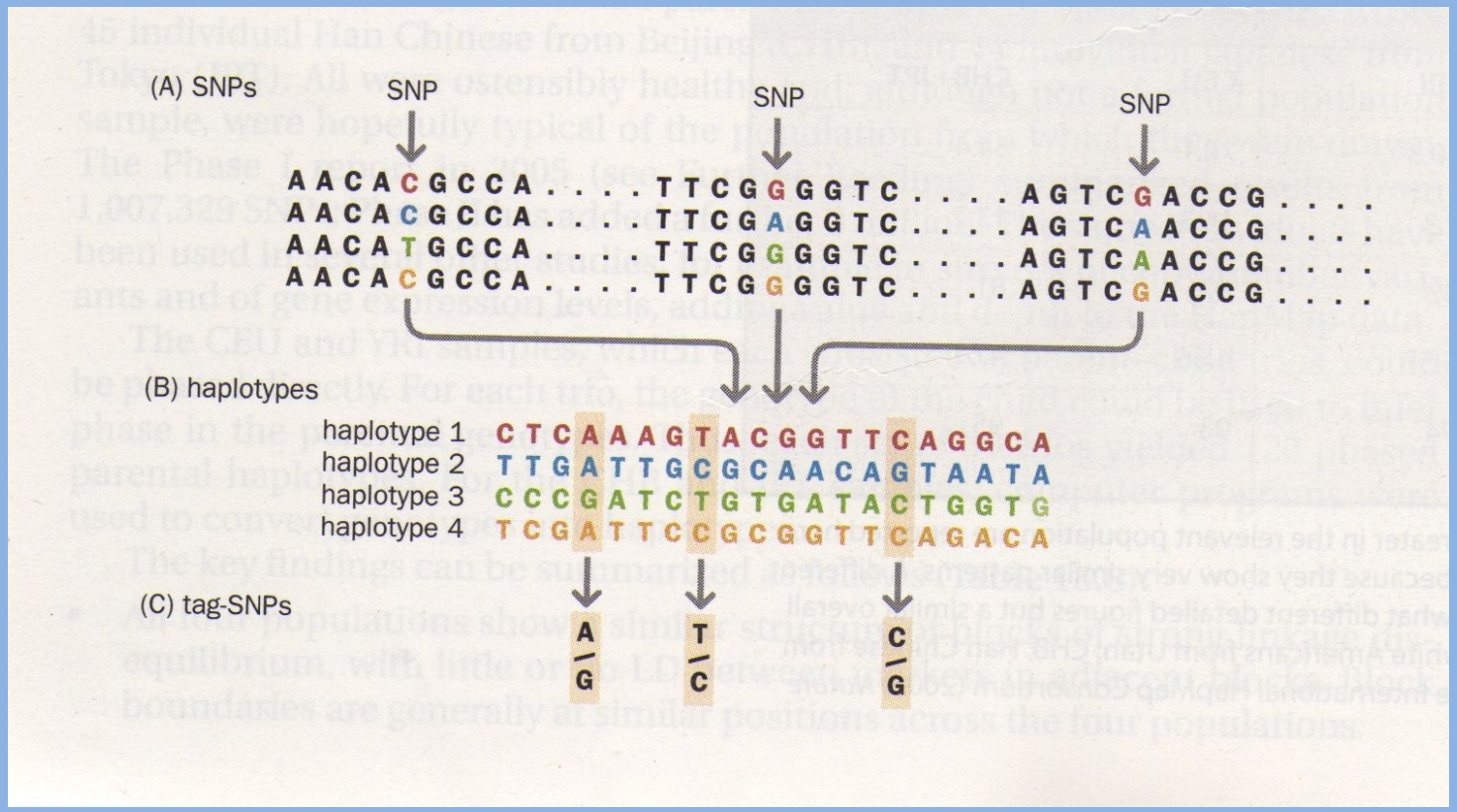
microRNAs, siRNAs (small interfering), lncRNAs (long non-coding), soRNAs (small nucleolar).



Positional Cloning

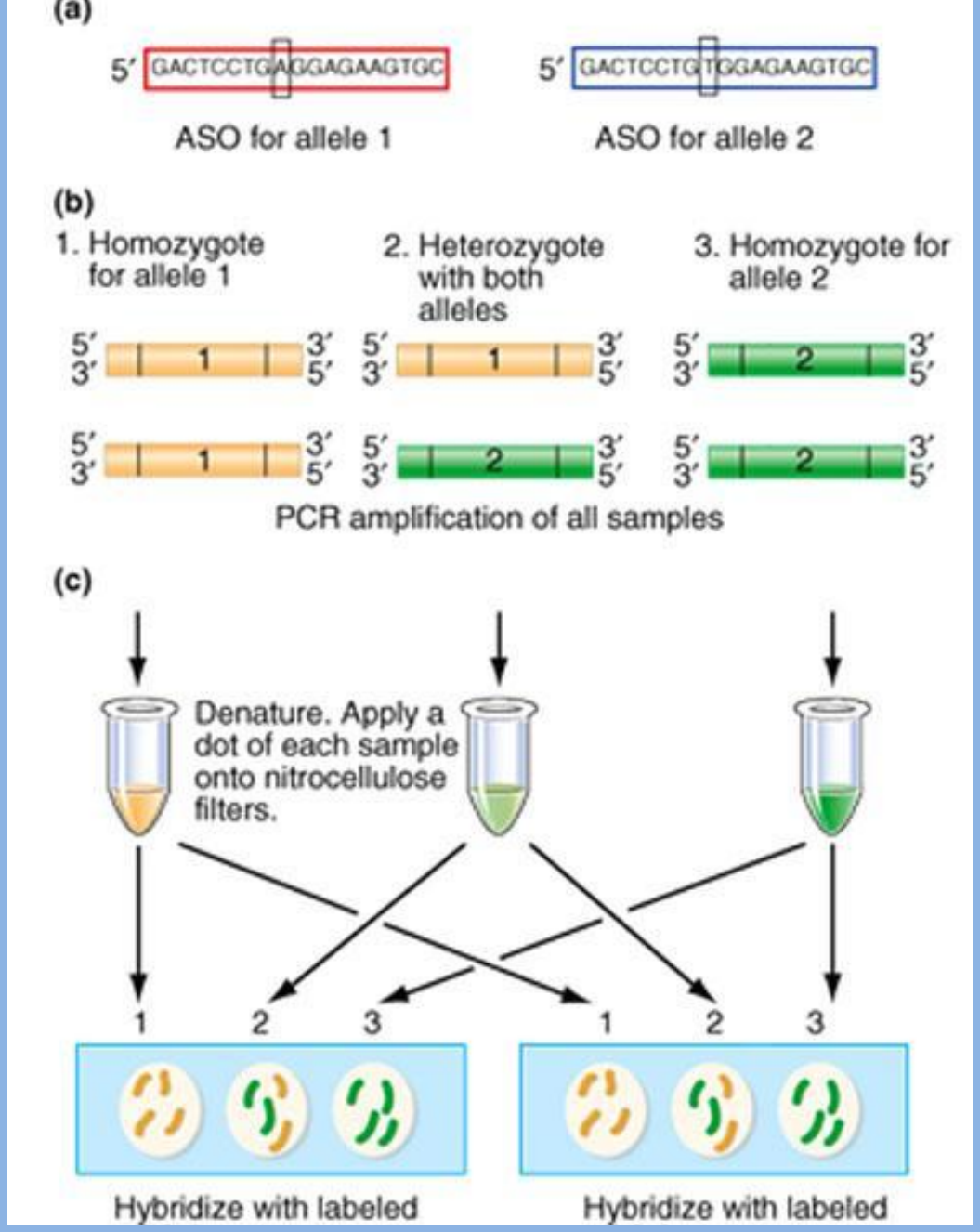


Estudos de associação genomica em larga escala



Positional Cloning – Step 1

- Find extended families in which disease is segregating.
- Use panel of polymorphic markers spaced at 10 cM intervals across all chromosomes.
  - 300 markers total
- Determine genotype for all individuals in families for each DNA marker.
- Look for linkage between a marker and disease phenotype.



ASOs can determine genotype at any SNP locus.

Fig. 11.9 a-c

Hybridized and labeled with ASO for allele 1

Hybridized and labeled with ASO for allele 2

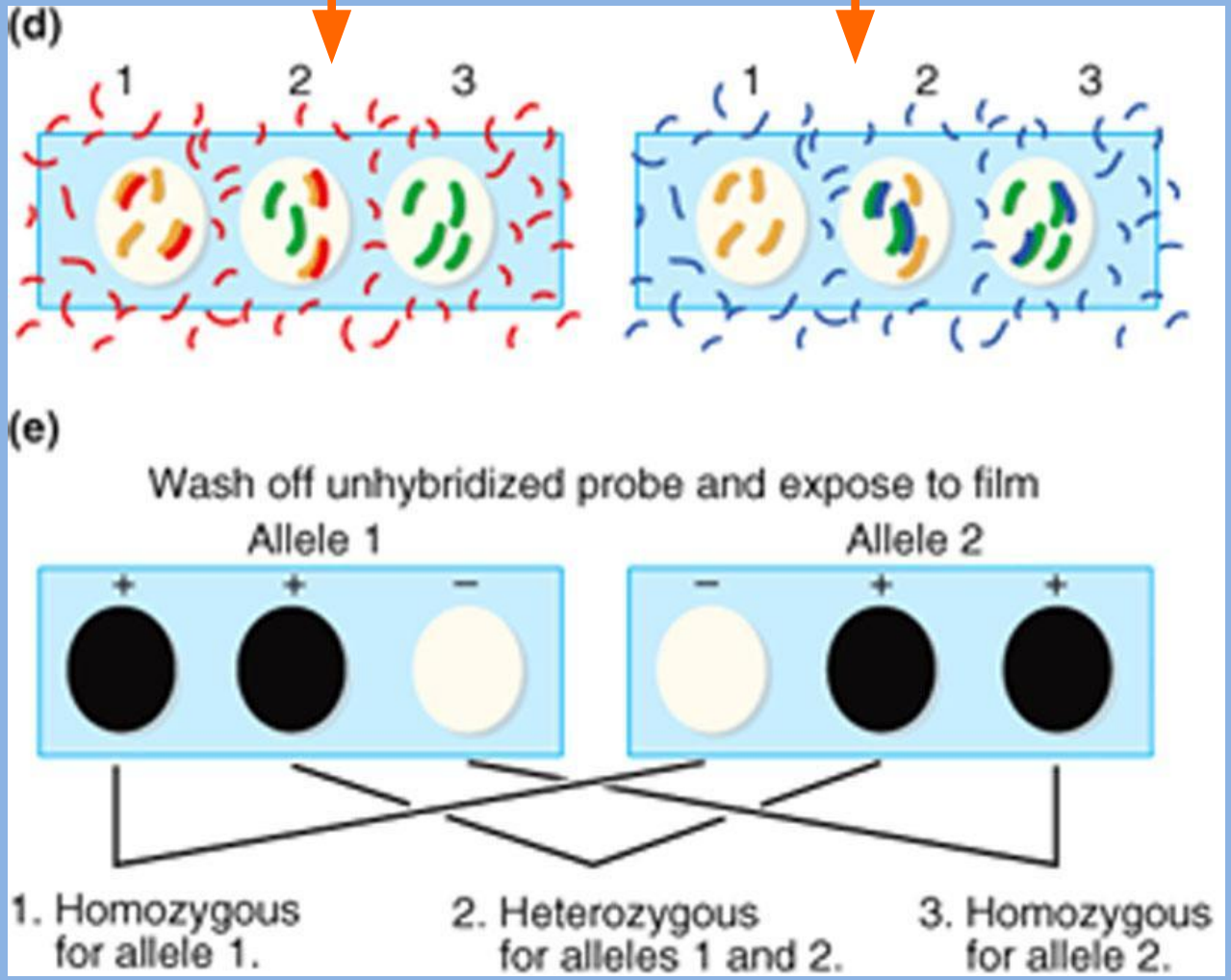


Fig. 11.9 d, e