

Miniconferência:

Investigação da Etiologia Genética de Doenças Adrenais



Dr. Guilherme Asmar Alencar, PhD
Médico Endocrinologista
Professor da UNISUL

6 de julho de 2018

Declaração de Conflitos de Interesse

Inexistência de conflitos de interesse.

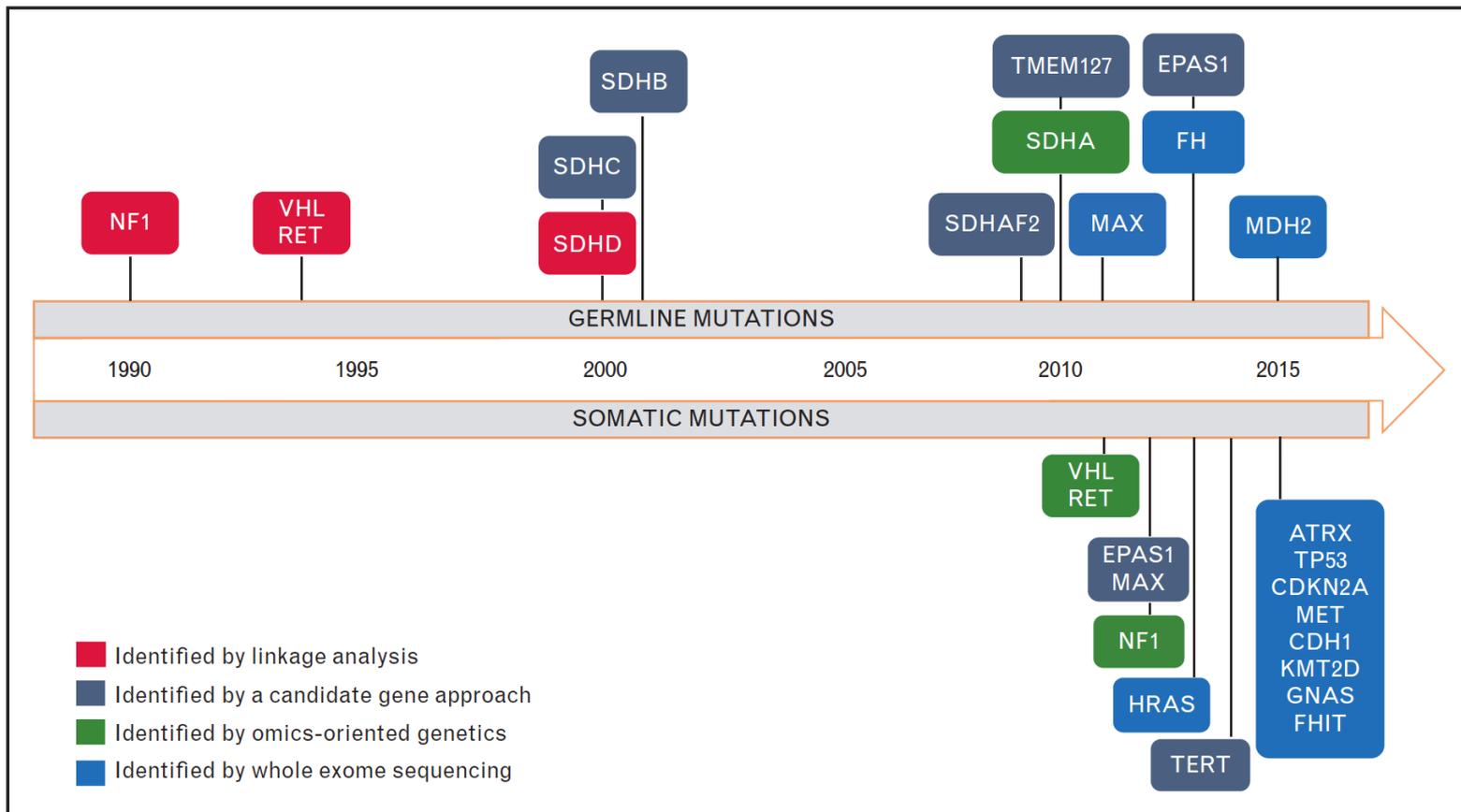
Roteiro

- Introdução
- Investigação da etiologia genética da uma doença:
 1. Suspeita Clínica
 2. Revisão da literatura
 3. Casuística
 4. Sequenciamento de genes candidatos
 5. Estudo de ligação genética utilizando microssatélites
 6. Estudo de ligação genética utilizando SNPs
 7. Sequenciamento de nova geração (NGS)
 8. Validação das mutações encontradas

Roteiro

- **Introdução**
- Investigação da etiologia genética da uma doença:
 1. Suspeita Clínica
 2. Revisão da literatura
 3. Casuística
 4. Sequenciamento de genes candidatos
 5. Estudo de ligação genética utilizando microssatélites
 6. Estudo de ligação genética utilizando SNPs
 7. Sequenciamento de nova geração (NGS)
 8. Validação das mutações encontradas

Introdução



Identificação da etiologia genética dos feocromocitomas e paragangliomas.

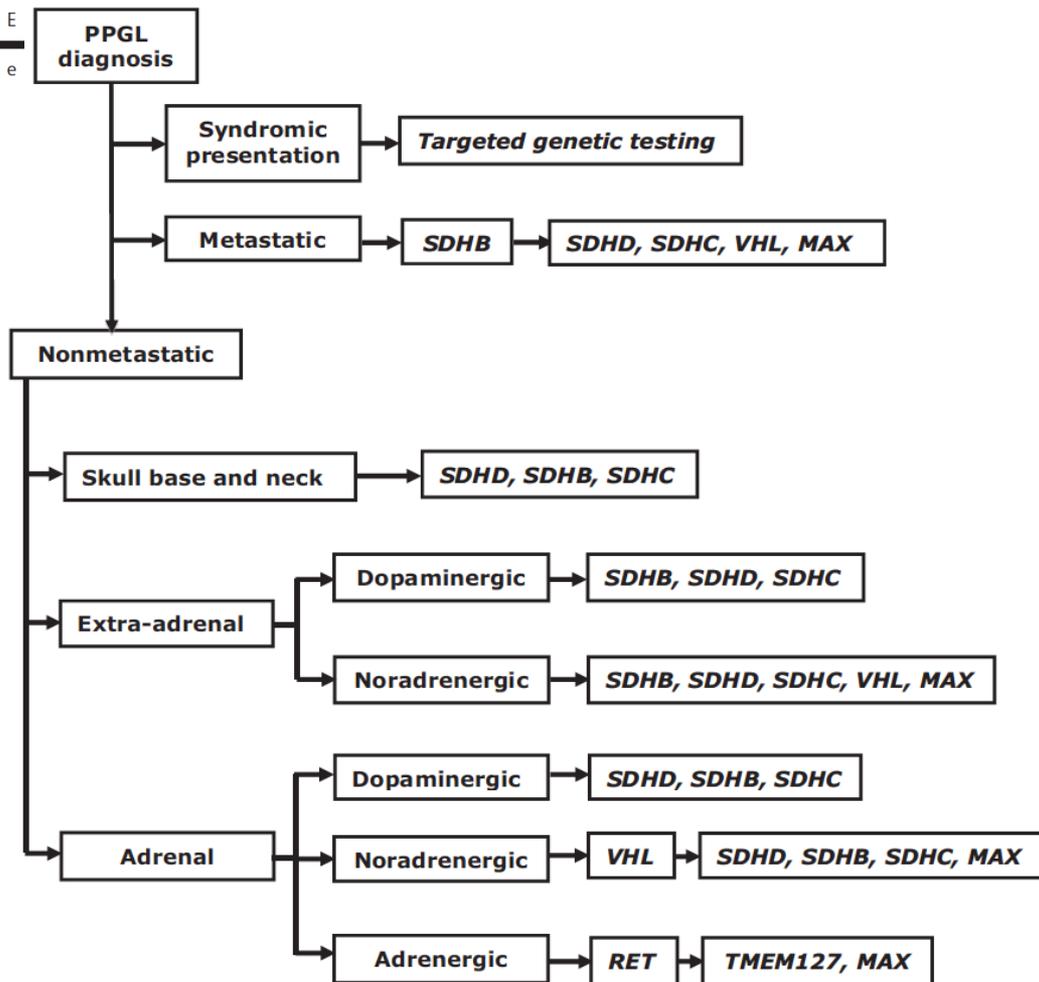
Introdução

SPECIAL FEATURE
Clinical Practice Guideline

Pheochromocytoma and Paraganglioma: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline



Fluxograma para o estudo genético de pacientes com feocromocitoma.



Introdução

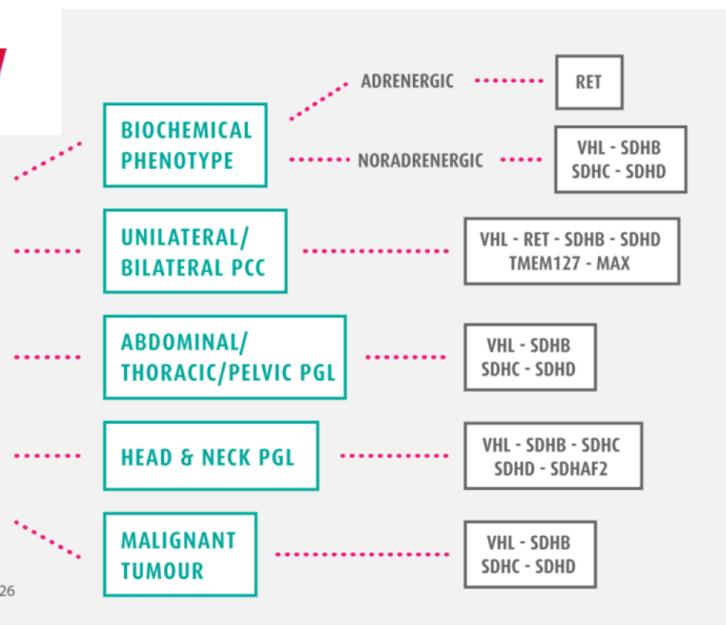
Testing strategy

Genetic testing for pheochromocytomas (PCC)/ paragangliomas (PGL)



Positive family history?
Multiple tumours?
Previous or current PGL?
Malignancy?
Bilateralism?
Age <45?

Modified from Costa et al. 2015 Front Endocrinol (Lausanne); 6:126



Painel de genes de doenças

Step 1: Whole genome sequencing from a single filter card. The sequencing covers the entire genic region (coding region, exon/intron boundaries, intronic and promoter) for all the genes included in the Pheochromocytoma panel. Copy Number Variants analysis derived from NGS data is also included.

Step 2: If no mutation is identified after analysis of the Pheochromocytoma panel, based on the approval and consent, we further recommend to continue the bioinformatics analysis of the data obtained by whole genome sequencing to cover genes that are either implicated in an overlapping phenotype or could be involved in a similar pathway but not strongly clinically implicated based on the current information in literature.

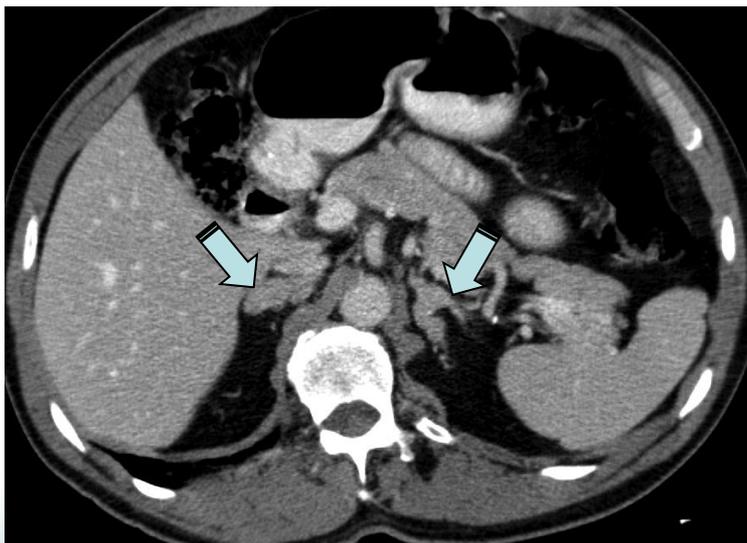
Introdução

Caso clínico

Paciente do sexo masculino, 45 anos, natural de Patos de Minas/MG, residente em São Paulo/SP, foi diagnosticado de forma incidental com nódulos adrenais bilaterais.

Diagnóstico:

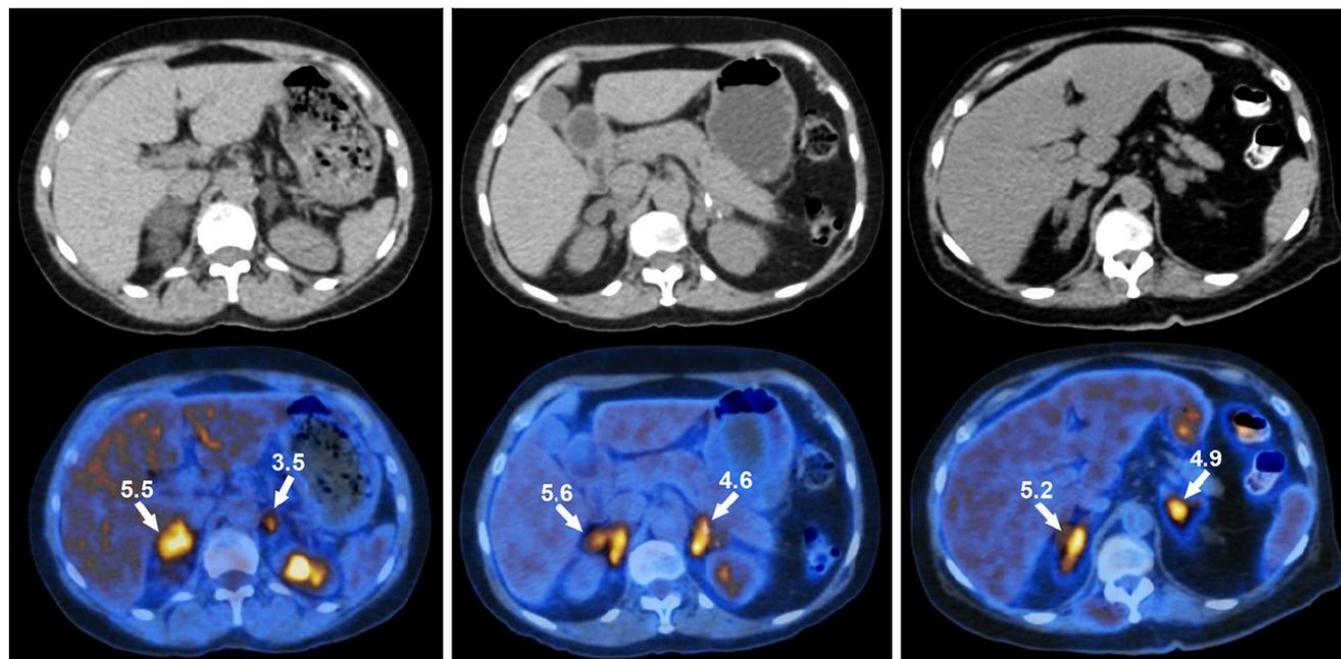
- Hiperplasia adrenal macronodular primária (PMAH) → síndrome de Cushing.



| | |
|---|----------------|
| Cortisol pós-1mg de dexametasona (< 1,8 mg/dL) | 15,0 mg/dL (↑) |
| Cortisol em urina de 24 horas (30-300 µg/24h) | 374 µg/24h (↑) |
| ACTH (10-46 pg/mL) | < 10 pg/mL (↓) |
| DHEAS (800-5.600 ng/mL) | 163 ng/mL (↓) |

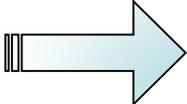
Introdução

- Hiperplasia adrenal macronodular primária (PMAH): presença de macronódulos funcionantes → cortisol → síndrome de Cushing independente do ACTH circulante.



PMAH: exame de ^{18}F -FDG-PET/CT mostrando nódulos adrenais bilaterais hipercaptantes.

Introdução

➤ PMAH  entidade clínica conhecida há mais de 50 anos!

Alterações genéticas ?

Roteiro

- Introdução
- Investigação da etiologia genética da uma doença:
 1. Suspeita Clínica
 2. Revisão da literatura
 3. Casuística
 4. Sequenciamento de genes candidatos
 5. Estudo de ligação genética utilizando microssatélites
 6. Estudo de ligação genética utilizando SNPs
 7. Sequenciamento de nova geração (NGS)
 8. Validação das mutações encontradas

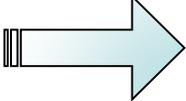
Roteiro

- Introdução
- **Investigação da etiologia genética da uma doença:**
 1. Suspeita Clínica
 2. Revisão da literatura
 3. Casuística
 4. Sequenciamento de genes candidatos
 5. Estudo de ligação genética utilizando microssatélites
 6. Estudo de ligação genética utilizando SNPs
 7. Sequenciamento de nova geração (NGS)
 8. Validação das mutações encontradas

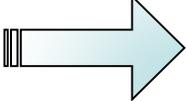
Roteiro

- Introdução
- **Investigação da etiologia genética da uma doença:**
 - 1. Suspeita Clínica**
 2. Revisão da literatura
 3. Casuística
 4. Sequenciamento de genes candidatos
 5. Estudo de ligação genética utilizando microssatélites
 6. Estudo de ligação genética utilizando SNPs
 7. Sequenciamento de nova geração (NGS)
 8. Validação das mutações encontradas

1. Suspeita Clínica

➤ *Observação clínica*  *suspeitar da origem genética da doença*

1. Suspeita Clínica

➤ *Observação clínica*  *suspeitar da origem genética da doença*

- História familiar
- Contexto clínico
- Época de manifestação da doença
- Epidemiologia

1. Suspeita Clínica

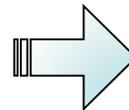
Como um tropeiro do século 18 espalhou mutação genética rara que causa câncer no Brasil

Da BBC Brasil em São Paulo

23 abril 2018



Alta prevalência de carcinoma adrenal no sul/sudeste do Brasil



Mutação inativadora R337H no gene supressor tumoral *TP53*

Ribeiro RC *et al.*, PNAS 2001.

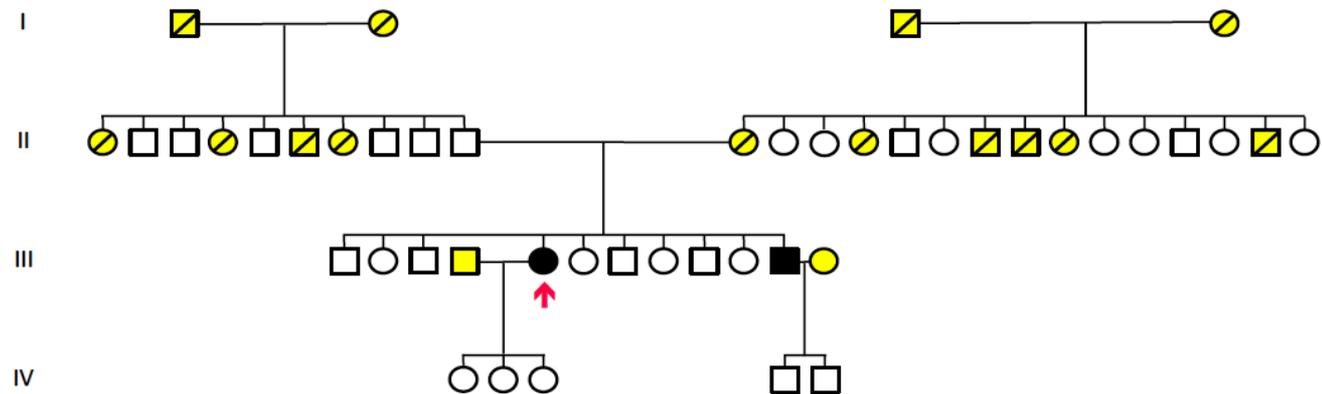
Pinto EM *et al.*, Arq Bras Endocrinol Metab 2004.

www.bbc.com/portuguese/brasil-43791027.

1. Suspeita Clínica

Caso clínico

- PMAH



□ Indivíduos inicialmente avaliados

■ Indivíduos não avaliados

■ Indivíduos inicialmente diagnosticados com AIMAH

↑ Caso-índice

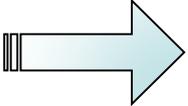
Roteiro

- Introdução
- **Investigação da etiologia genética da uma doença:**
 1. Suspeita Clínica
 2. Revisão da literatura
 3. Casuística
 4. Sequenciamento de genes candidatos
 5. Estudo de ligação genética utilizando microssatélites
 6. Estudo de ligação genética utilizando SNPs
 7. Sequenciamento de nova geração (NGS)
 8. Validação das mutações encontradas

Roteiro

- Introdução
- **Investigação da etiologia genética da uma doença:**
 1. Suspeita Clínica
 2. **Revisão da literatura**
 3. Casuística
 4. Sequenciamento de genes candidatos
 5. Estudo de ligação genética utilizando microssatélites
 6. Estudo de ligação genética utilizando SNPs
 7. Sequenciamento de nova geração (NGS)
 8. Validação das mutações encontradas

2. Revisão da Literatura

➤ *Evidências*  *etiologia genética?*

2. Revisão da Literatura

➤ *Evidências* → *etiologia genética?*

- OMIM (www.omim.org)



OMIM[®]

Online Mendelian Inheritance in Man[®]

An Online Catalog of Human Genes and Genetic Disorders

Updated September 22, 2017

Search OMIM for clinical features, phenotypes, genes, and more.



Advanced Search : OMIM (</search/advanced/entry>), Clinical Synopses (</search/advanced/clinicalSynopsis>), Gene Map (</search/advanced/geneMap>)

Need help? : Example Searches, OMIM Search Help (</help/search>), OMIM Tutorial (<http://www.openhelix.com/OMIM>)

Mirror site : mirror.omim.org (<https://mirror.omim.org/>)

OMIM is supported by a grant from NHGRI, licensing fees, and generous contributions from people like you (/donors).

Make a donation! (<https://secure.jhu.edu/form/OMIM>)



2. Revisão da Literatura

Caso clínico

- PMAH: 2 formas de apresentação

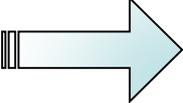
Esporádica
(mais frequente)

Familiar
(herdada)



7 famílias

2. Revisão da Literatura

➤ *Aspectos clínicos*  *relevantes para o estudo genético?*

2. Revisão da Literatura

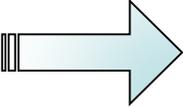
Caso clínico

- PMAH
 - Distribuição entre os sexos – 1:1
 - Clinicamente manifesta – quinta e sexta décadas
 - Manifestação clínica:

SC clássica (manifesta)

SC subclínica

2. Revisão da Literatura

➤ *Fisiopatologia da doença*  *potenciais genes candidatos?*

2. Revisão da Literatura

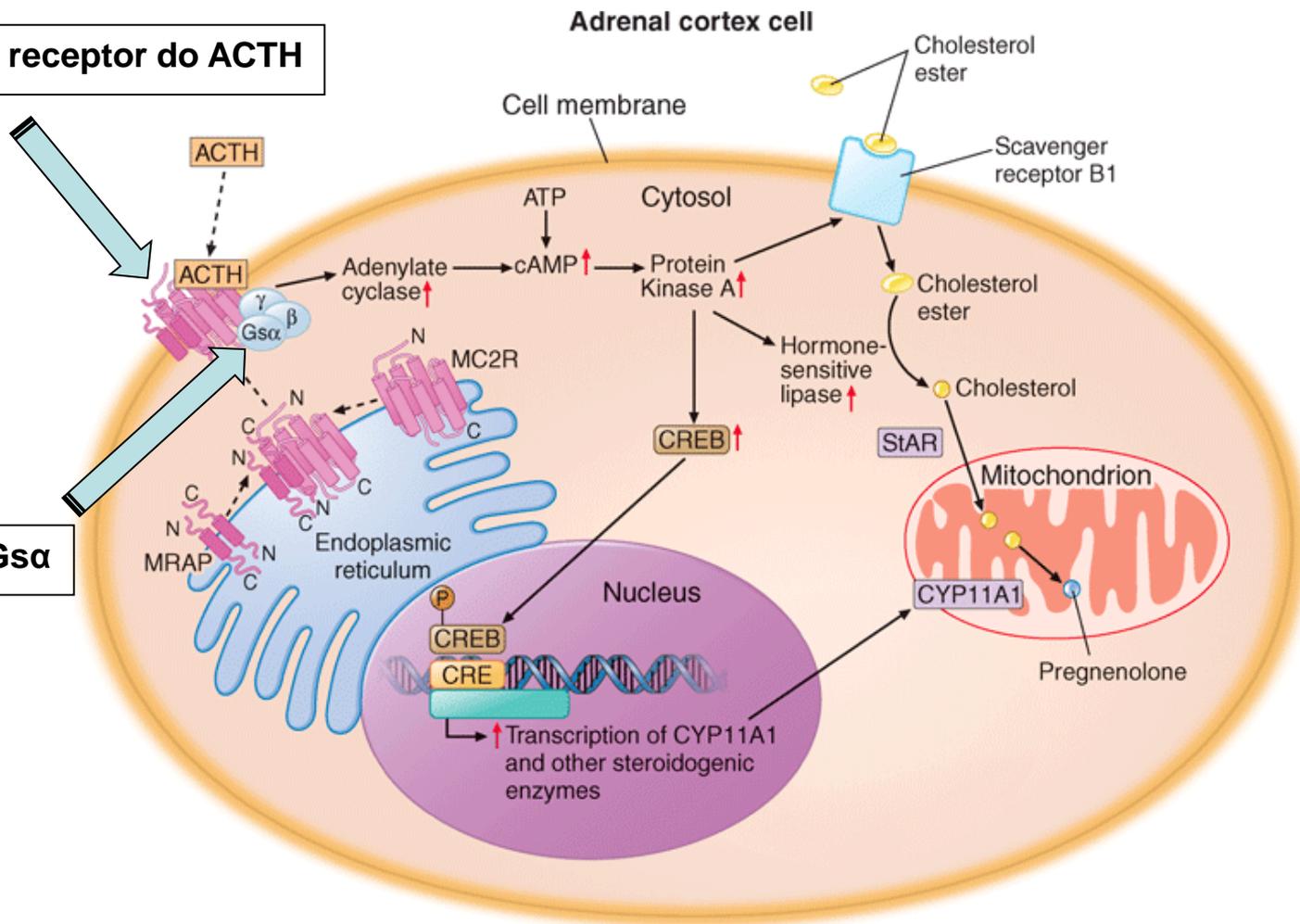
Caso clínico

- PMAH:
 - Presença de uma mutação ativadora do receptor do ACTH.
Swords et al., Mol Endocrinol 2002.
 - Mutações pós-zigóticas ativadoras da subunidade α da proteína Gs.
Fragoso et al., J Clin Endocrinol Metab 2003.

2. Revisão da Literatura

Mutação do receptor do ACTH

Mutação da Gs α



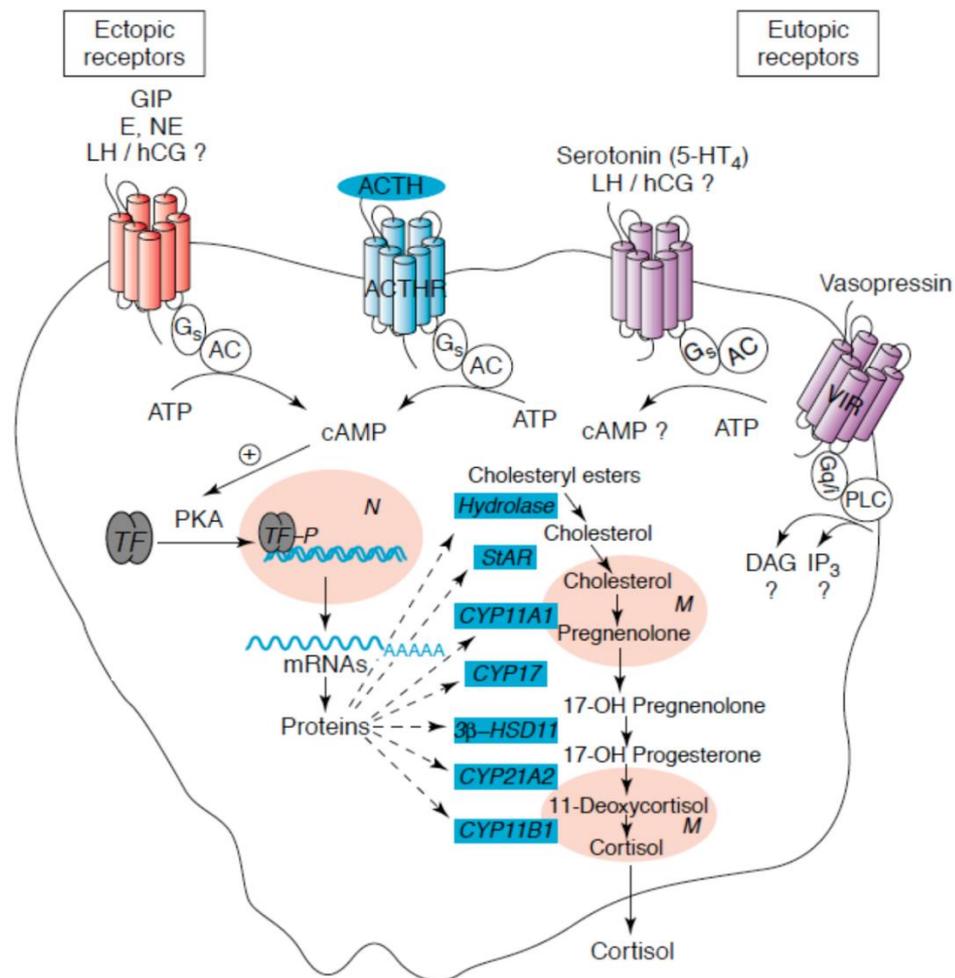
2. Revisão da Literatura

Caso clínico

- PMAH:
 - Presença de uma mutação ativadora do receptor do ACTH.
Swords et al., Mol Endocrinol 2002.
 - Mutações pós-zigóticas ativadoras da subunidade α da proteína Gs.
Fragoso et al., J Clin Endocrinol Metab 2003.
 - Esteroidogênese pode ser estimulada por receptores hormonais aberrantes (ilícitos), acoplados à proteína G, no córtex adrenal.
Lacroix et al., N Engl J Med 1992.
Reznik et al., N Engl J Med 1992.

2. Revisão da Literatura

Receptores hormonais aberrantes (ilícitos):



2. Revisão da Literatura

Protocolo de testes *in vivo*, para a pesquisa de receptores hormonais aberrantes

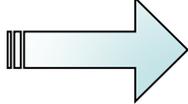
| Ind. | Metoclopramida | Terlipressina | Glucagon | LHRH | TRH | Refeição | T. Postural | ACTH |
|----------|----------------|---------------|----------|------|-------------|----------|--------------|-------------|
| III – 29 | +19% | # | # | # | # | # | # | # |
| III – 32 | +19% | +41% | +1% | +11% | +31% | +20% | +67% | 251% |
| IV – 04 | +14% | # | -10% | -12% | +43% | +12% | +22% | 166% |
| IV – 07 | +92% | +45% | -1% | -20% | +5% | -6% | +21% | 131% |
| IV – 10 | +41% | +102% | +3% | +7% | -11% | +14% | +64% | # |
| IV – 13 | +48% | # | # | # | # | # | # | # |
| IV – 18 | +67% | # | -6% | -3% | -2% | -5% | # | 205% |
| IV – 30 | -4% | +49% | -19% | +6% | +8% | 0% | +102% | 335% |
| IV – 32 | -15% | +49% | -14% | -17% | +48% | -5% | +91% | 416% |
| V – 06 | +17% | +5,3% | +12% | -3% | +41% | +14% | +69% | 370% |

O incremento do cortisol sérico $\geq 50\%$, em relação ao seu valor basal, está representando em vermelho e $\geq 25\%$ em azul. Indivíduo (Ind.); gonadorrelina (LHRH); hormônio liberador de tirotrofina (TRH); refeição mista (refeição); teste postural (T. postural); tetracosactida (ACTH sintético); e valor não disponível.

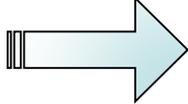


Receptores hormonais aberrantes seriam um fenômeno secundário ou um epifenômeno

2. Revisão da Literatura

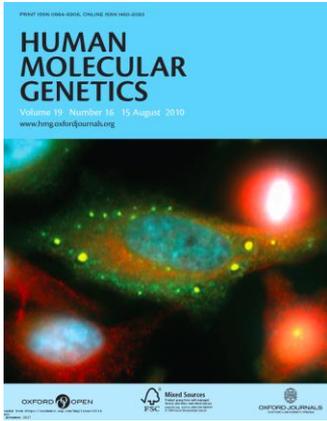
➤ *Estudos de larga escala (ômicas)*  *na doença em questão?*

2. Revisão da Literatura

➤ *Estudos de larga escala (ômicas)*  *na doença em questão?*

- Genômica (DNA) → genoma
- Transcriptômica (mRNA e miRNAs) → transcriptoma
- Proteômica (proteínas) → proteoma

2. Revisão da Literatura



Human Molecular Genetics, 2010, Vol. 19, No. 15
doi:10.1093/hmg/ddq206
Advance Access published on May 18, 2010

***SDHA* is a tumor suppressor gene causing paraganglioma**

Nelly Burnichon^{1,2,3,*}, Jean-Jacques Brière⁴, Rossella Libé^{3,5,6,7}, Laure Vescovo⁸, Julie Rivière^{2,3}, Frédérique Tissier^{3,5,7,9}, Elodie Jouanno¹, Xavier Jeunemaitre^{1,2,3}, Paule Bénit^{10,11}, Alexander Tzagoloff⁴, Pierre Rustin^{10,11}, Jérôme Bertherat^{3,5,6,7}, Judith Favier^{2,3} and Anne-Paule Gimenez-Roqueplo^{1,2,3,7}

Transcriptoma (mRNA) → via da SDH potencialmente relacionada



Mutação germinativa do *SDHA*

2. Revisão da Literatura

Caso clínico

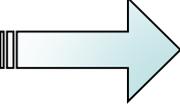
- PMAH (transcriptômica) → vias de sinalização potencialmente envolvidas:
 - Ativação da via de sinalização dos fatores de transcrição induzidos por hipóxia.

Bourdeau I *et al.*, *Oncogene* 2004.
Bimpaki EI, *et al.*, *Clinical Endocrinology* 2010.
 - Ativação da via de sinalização Wnt.

Bourdeau I *et al.*, *Oncogene* 2004.
Almeida MQ *et al.*, *J Clin Endocrinol Metab* 2011.
 - Ativação da via de sinalização da proteína cinase A?!

Bourdeau I *et al.*, *Oncogene* 2004.
Antonini SR *et al.*, *Clinical Endocrinology* 2006.
Bourdeau I *et al.*, *J Clin Endocrinol Metab* 2006.
Almeida MQ *et al.*, *J Clin Endocrinol Metab* 2011.

2. Revisão da Literatura

- *Doença*  *ocorre no contexto de outras síndromes genéticas?*

2. Revisão da Literatura

Caso clínico

- PMAH:

- **Neoplasia endócrina múltipla do tipo1 (NEM1)** - mutação do gene supressor de tumor *MEN1* (11q13.1) e transmissão autossômica dominante.

Skogseid B *et al.*, J Clin Endocrinol Metab 1992.

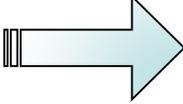
- **Polipose Adenomatosa Familiar** - mutação do gene supressor de tumor *APC* (5q22.2) e transmissão autossômica dominante.

Gaujoux S *et al.*, Clinical Cancer Research 2010.

- **Leiomiomatose hereditária e carcinoma de células renais** - mutação do gene supressor de tumor *FH* (1q43) e transmissão autossômica dominante.

Matyakhina L *et al.*, J Clin Endocrinol Metab 2005.

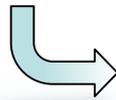
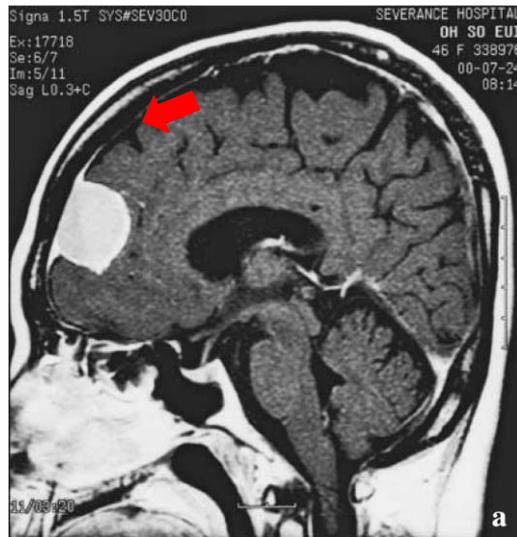
2. Revisão da Literatura

➤ *Doença em questão*  *associada a alguma outra doença?*

2. Revisão da Literatura

Caso clínico

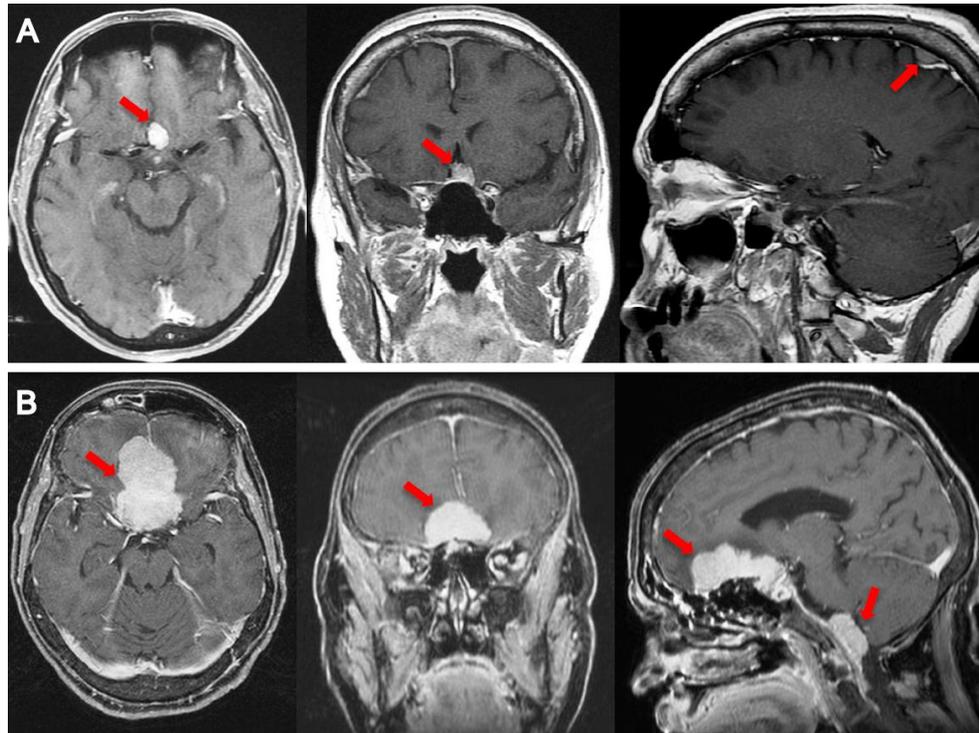
- PMAH
 - Meningiomas intracranianos. Lee *et al.*, Clin Endocrinol 2005.



Relação: PIMAH e meningioma?

2. Revisão da Literatura

- PMAH
 - Prevalência de 33% (7/21) de meningiomas.



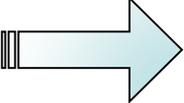
Roteiro

- Introdução
- **Investigação da etiologia genética da uma doença:**
 1. Suspeita Clínica
 2. Revisão da literatura
 3. Casuística
 4. Sequenciamento de genes candidatos
 5. Estudo de ligação genética utilizando microssatélites
 6. Estudo de ligação genética utilizando SNPs
 7. Sequenciamento de nova geração (NGS)
 8. Validação das mutações encontradas

Roteiro

- Introdução
- **Investigação da etiologia genética da uma doença:**
 1. Suspeita Clínica
 2. Revisão da literatura
 - 3. Casuística**
 4. Sequenciamento de genes candidatos
 5. Estudo de ligação genética utilizando microssatélites
 6. Estudo de ligação genética utilizando SNPs
 7. Sequenciamento de nova geração (NGS)
 8. Validação das mutações encontradas

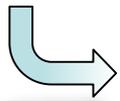
3. Casuística

➤ *Qualidade*  *distinguir doentes de saudáveis com exatidão?*

3. Casuística

Caso clínico

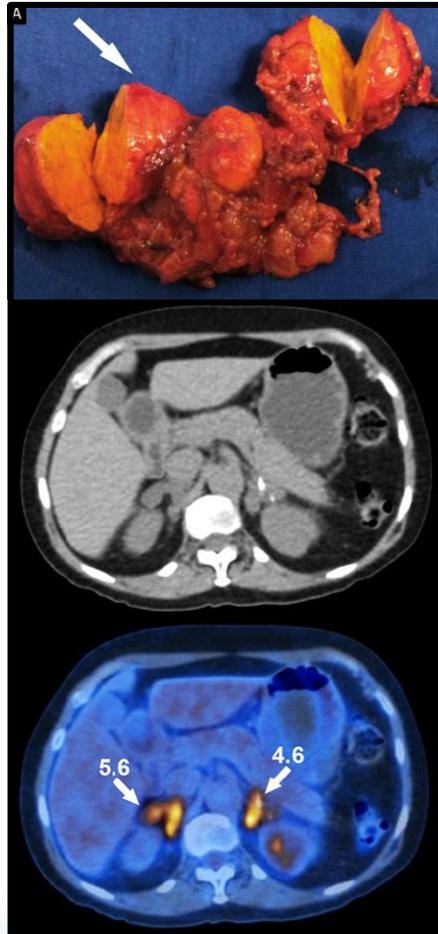
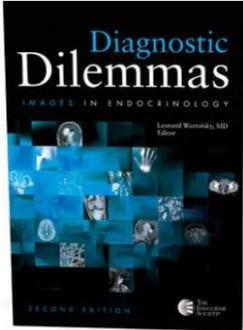
- PMAH → SC independente de ACTH
 - Alteração do ritmo circadiano do cortisol: ↑ cortisol sérico e salivar à meia-noite
 - Perda da supressão normal do cortisol durante o TSDexa
 - ↑ do cortisol urinário
 - ACTH ↓



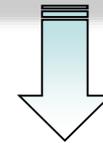
Propedêutica de escolha?

3. Casuística

- PMAH → achados radiológicos (CT e ^{18}F -FDG-PET/CT):

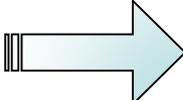


Aumentos das adrenais
+
Nódulos bilaterais



Outros achados radiológicos?

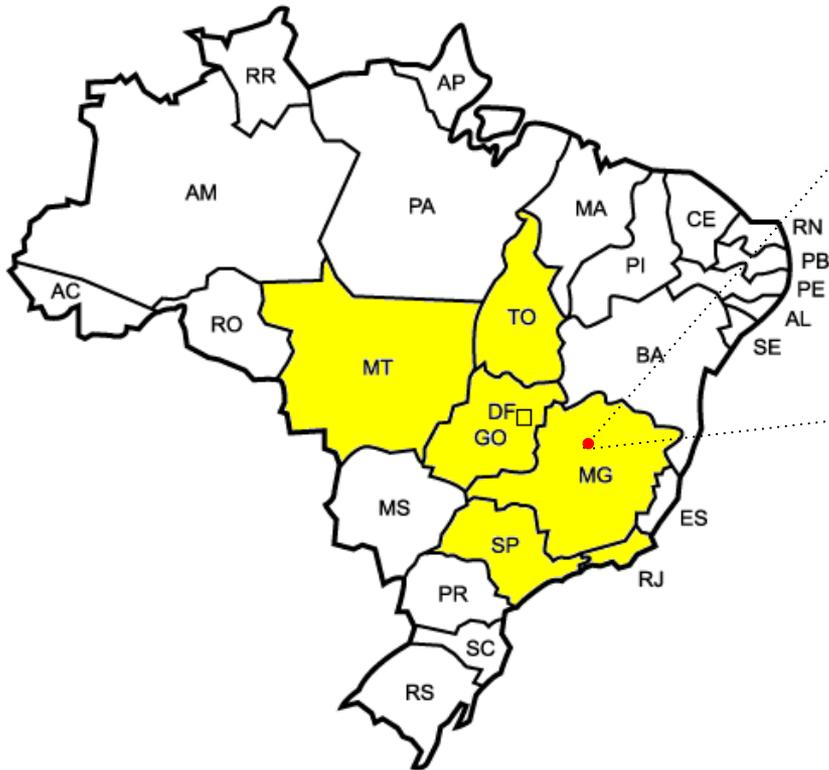
3. Casuística

➤ *Quantidade de indivíduos*  *doentes e saudáveis é suficiente?*

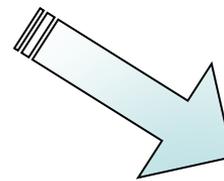
3. Casuística

Caso clínico

- PMAH:



Fazenda na zona rural do município de Patos de Minas/MG

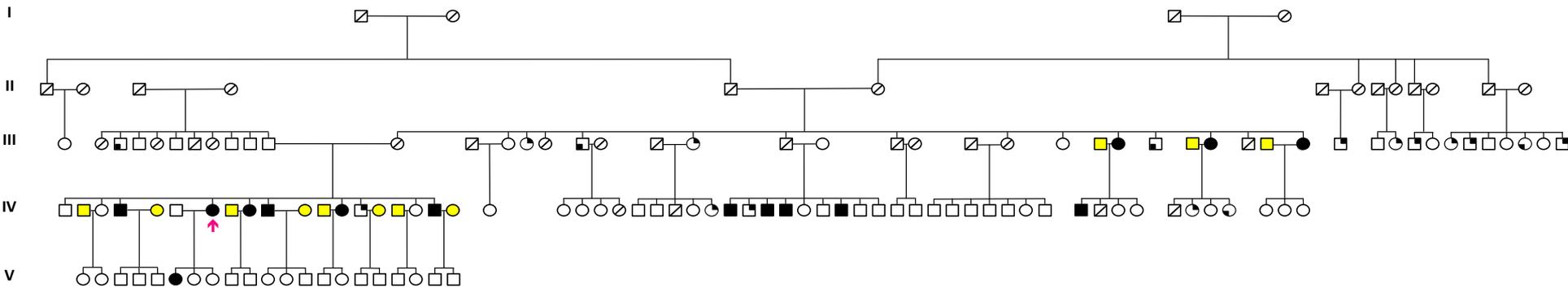


96 indivíduos

Distribuição geográfica dos integrantes da família estudada (em amarelo).

3. Casuística

- 15 indivíduos com PMAH (8 M e 7 F) → $52,8 \pm 11,3$ anos (32-74 anos)



□ Indivíduos sem doença

■ Indivíduos diagnosticados com PMAH

■ Indivíduos não avaliados

↑ Caso-índice

□ Indivíduos com cortisol sérico $\geq 1,8$ mcg/dL após teste de supressão com 1 mg de dexametasona

■ Indivíduos com alguma alteração na tomografia das glândulas suprarrenais

Hereditograma da família brasileira diagnosticada com PMAH.



Herança autossômica dominante

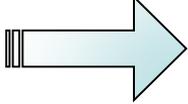
Roteiro

- Introdução
- **Investigação da etiologia genética da uma doença:**
 1. Suspeita Clínica
 2. Revisão da literatura
 3. Casuística
 4. Sequenciamento de genes candidatos
 5. Estudo de ligação genética utilizando microssatélites
 6. Estudo de ligação genética utilizando SNPs
 7. Sequenciamento de nova geração (NGS)
 8. Validação das mutações encontradas

Roteiro

- Introdução
- **Investigação da etiologia genética da uma doença:**
 1. Suspeita Clínica
 2. Revisão da literatura
 3. Casuística
 - 4. Sequenciamento de genes candidatos**
 5. Estudo de ligação genética utilizando microssatélites
 6. Estudo de ligação genética utilizando SNPs
 7. Sequenciamento de nova geração (NGS)
 8. Validação das mutações encontradas

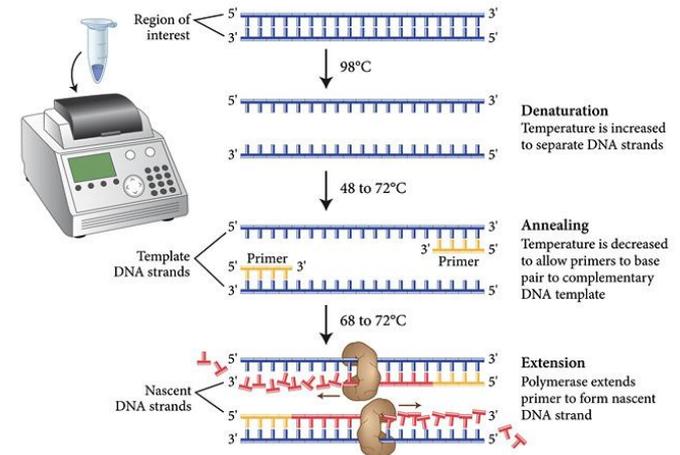
4. Sequenciamento de Genes Candidatos

➤ *Sequenciamento*  *método de Sanger automatizado.*

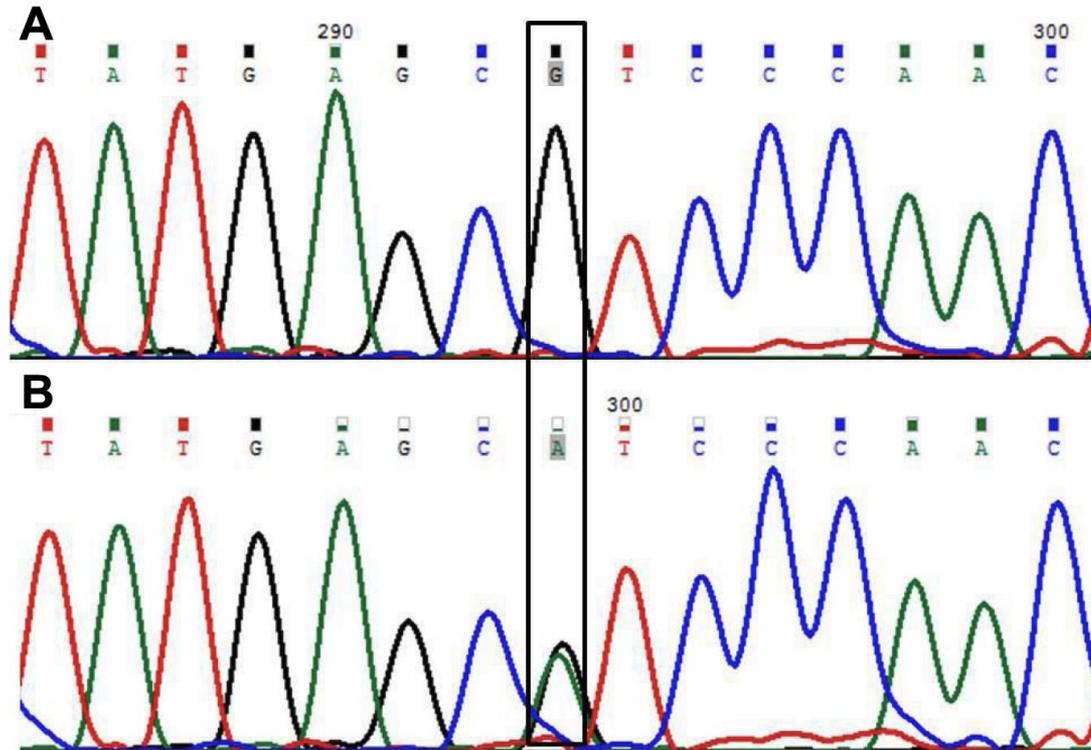
4. Sequenciamento de Genes Candidatos

➤ *Sequenciamento* ➡ *método de Sanger automatizado.*

- Extração do DNA genômico
- Reação de amplificação – PCR
 - Ciclos: Desnaturação do DNA (95-98 °C)
Anelamento dos primers (48-72 °C)
Extensão (68-72 °C)
- Avaliar qualidade da PCR e quantificar DNA amplificado
- Purificação do DNA amplificado
- Reação de sequenciamento (ddNTPs acoplado a um cromóforo fluorescente)
- Eletroforese capilar em um sequenciador automático
- Análise do eletroferograma gerado, utilizando-se um *software*

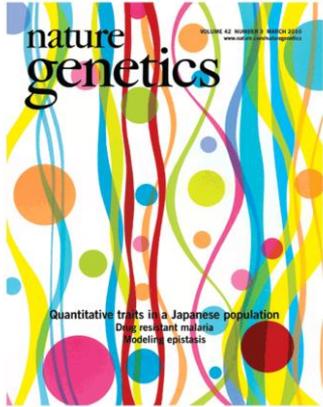


4. Sequenciamento de Genes Candidatos



Análise do eletroferograma gerado, utilizando-se o programa *Sequencher 5.0.1*.

4. Sequenciamento de Genes Candidatos



Germline mutations in *TMEM127* confer susceptibility to pheochromocytoma

Yuejuan Qin¹, Li Yao¹, Elizabeth E King¹, Kalyan Buddavarapu¹, Romina E Lenci¹, E Sandra Chocron^{2,3}, James D Lechleiter^{2,3}, Meghan Sass⁴, Neil Aronin⁴, Francesca Schiavi⁵, Francesca Boaretto⁵, Giuseppe Opocher⁵, Rodrigo A Toledo⁶, Sergio P A Toledo⁶, Charles Stiles⁷, Ricardo C T Aguiar^{1,8} & Patricia L M Dahia^{1,2,8}

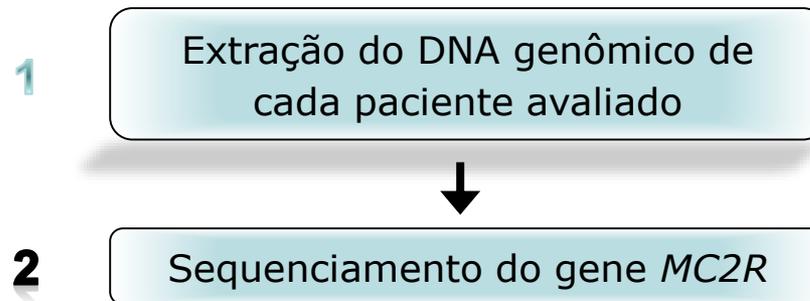
Locus no cromossomo 2q11 → contendo 205 genes candidatos



Mutação germinativa do *TMEM127*

4. Sequenciamento de Genes Candidatos

Caso clínico



Primers utilizados para a amplificação da região codificadora do *MC2R*.

| Éxon | <i>Primers</i> senso | <i>Primers</i> antissenso |
|------|---|---|
| 1 | 5' TAAGCGAGTGTGGCTGGTTT 3' 5' TCGACTCCCTGTTTGTCTC 3' | 5' ATGGTCACGATGCTGTGGTA 3' 5' CACTGGCATTGTTGGAATG 3' |

Utilizou-se o programa *Primer3Plus* (versão 2007) para o desenho dos *primers*. Adenina (A); citosina (C); guanina (G); e timina (T).

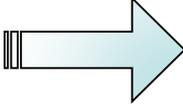
Roteiro

- Introdução
- **Investigação da etiologia genética da uma doença:**
 1. Suspeita Clínica
 2. Revisão da literatura
 3. Casuística
 4. Sequenciamento de genes candidatos
 5. Estudo de ligação genética utilizando microssatélites
 6. Estudo de ligação genética utilizando SNPs
 7. Sequenciamento de nova geração (NGS)
 8. Validação das mutações encontradas

Roteiro

- Introdução
- **Investigação da etiologia genética da uma doença:**
 1. Suspeita Clínica
 2. Revisão da literatura
 3. Casuística
 4. Sequenciamento de genes candidatos
 - 5. Estudo de ligação genética utilizando microssatélites**
 6. Estudo de ligação genética utilizando SNPs
 7. Sequenciamento de nova geração (NGS)
 8. Validação das mutações encontradas

5. Estudo de Ligação Genética Utilizando Microssatélites

➤ *Ligação genética (linkage studies)*  *microssatélites*

5. Estudo de Ligação Genética Utilizando Microssatélites

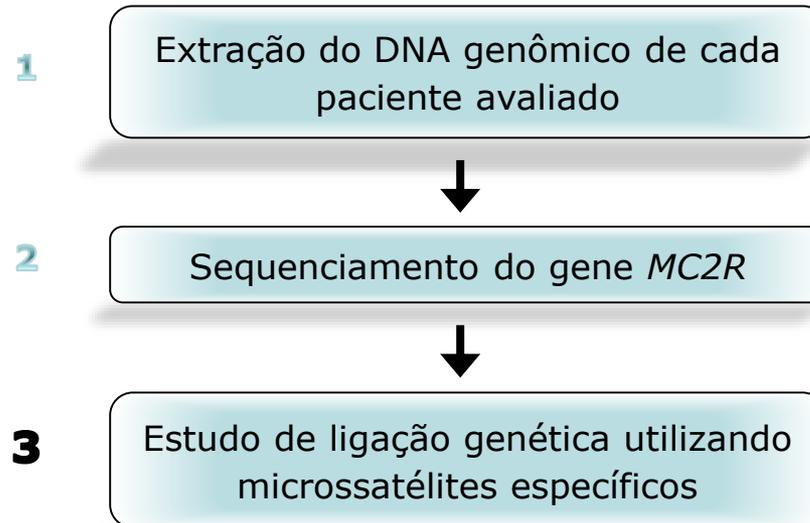
➤ *Ligação genética (linkage studies)*  *microssatélites*

- Microssatélites: regiões do DNA compostas por unidades de repetição de 1-9 nucleotídeos em tandem que se repetem 5-50 vezes.
 - Ex.: **GTCGTCGTCGTCGTCGTC** (trinucleotídeos e 6 repetições)
 - Marcadores muito polimórficos (diferentes alelos em um mesmo *locus*):
 - Alelo 1: **CACACACACACACACA** (dinucleotídeos e 9 repetições)
 - Alelo 2: **CACACACACA** (dinucleotídeos e 5 repetições)
 - Alelo 3, alelo 4...
- Estudos de ligação genética → um determinado alelo do microssatélite acompanha o fenótipo da doença ao longo das gerações.

5. Estudo de Ligação Genética Utilizando Microssatélites

Caso clínico

- PMAH:



5. Estudo de Ligação Genética Utilizando Microssatélites

- PMAH:

Genes candidatos selecionados.

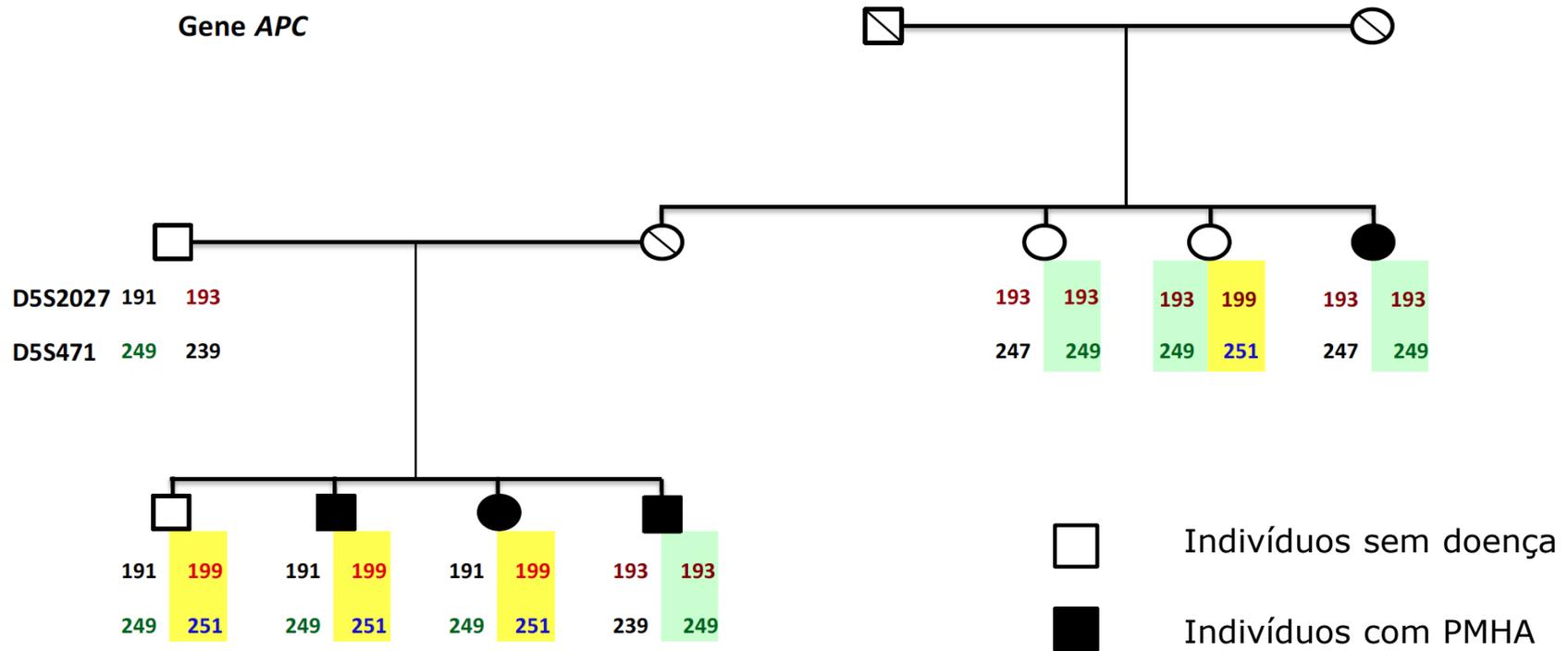
| Gene | Localização citogenética do gene (OMIM) | Microssatélites | Distância do microssatélite em relação ao gene em megabases (Mb) |
|----------------|---|-----------------|--|
| <i>MC2R</i> | 18p11.21 | D18S53 | 2,39 Mb |
| | | D18S478 | 8,11 Mb |
| <i>PRKARIA</i> | 17q24.2 | D17S944 | 5,07 Mb |
| | | D17S949 | 1,93 Mb |
| <i>GNAS</i> | 20q13.32 | D20S100 | 3,1 Mb |
| | | D20S171 | 0,32 Mb |
| | | D20S173 | 1,39 Mb |
| <i>MEN1</i> | 11q13.1 | D11S4191 | 4,57 Mb |
| <i>APC</i> | 5q22.2 | D5S2027 | 0,90 Mb |
| | | D5S471 | 6,87 Mb |
| <i>FH</i> | 1q43 | D1S2785 | 0,78 Mb |
| | | D1S2842 | 1,19 Mb |

(ABI Prism Linkage Mapping Set Version 2.5)

5. Estudo de Ligação Genética Utilizando Microssatélites

- PMAH:

- Estudo de ligação genética utilizando microssatélites próximos ao gene *APC*.



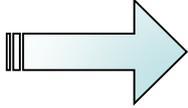
Roteiro

- Introdução
- **Investigação da etiologia genética da uma doença:**
 1. Suspeita Clínica
 2. Revisão da literatura
 3. Casuística
 4. Sequenciamento de genes candidatos
 5. Estudo de ligação genética utilizando microssatélites
 6. Estudo de ligação genética utilizando SNPs
 7. Sequenciamento de nova geração (NGS)
 8. Validação das mutações encontradas

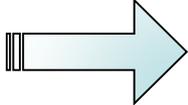
Roteiro

- Introdução
- **Investigação da etiologia genética da uma doença:**
 1. Suspeita Clínica
 2. Revisão da literatura
 3. Casuística
 4. Sequenciamento de genes candidatos
 5. Estudo de ligação genética utilizando microssatélites
 - 6. Estudo de ligação genética utilizando SNPs**
 7. Sequenciamento de nova geração (NGS)
 8. Validação das mutações encontradas

6. Estudo de Ligação Genética Utilizando SNPs

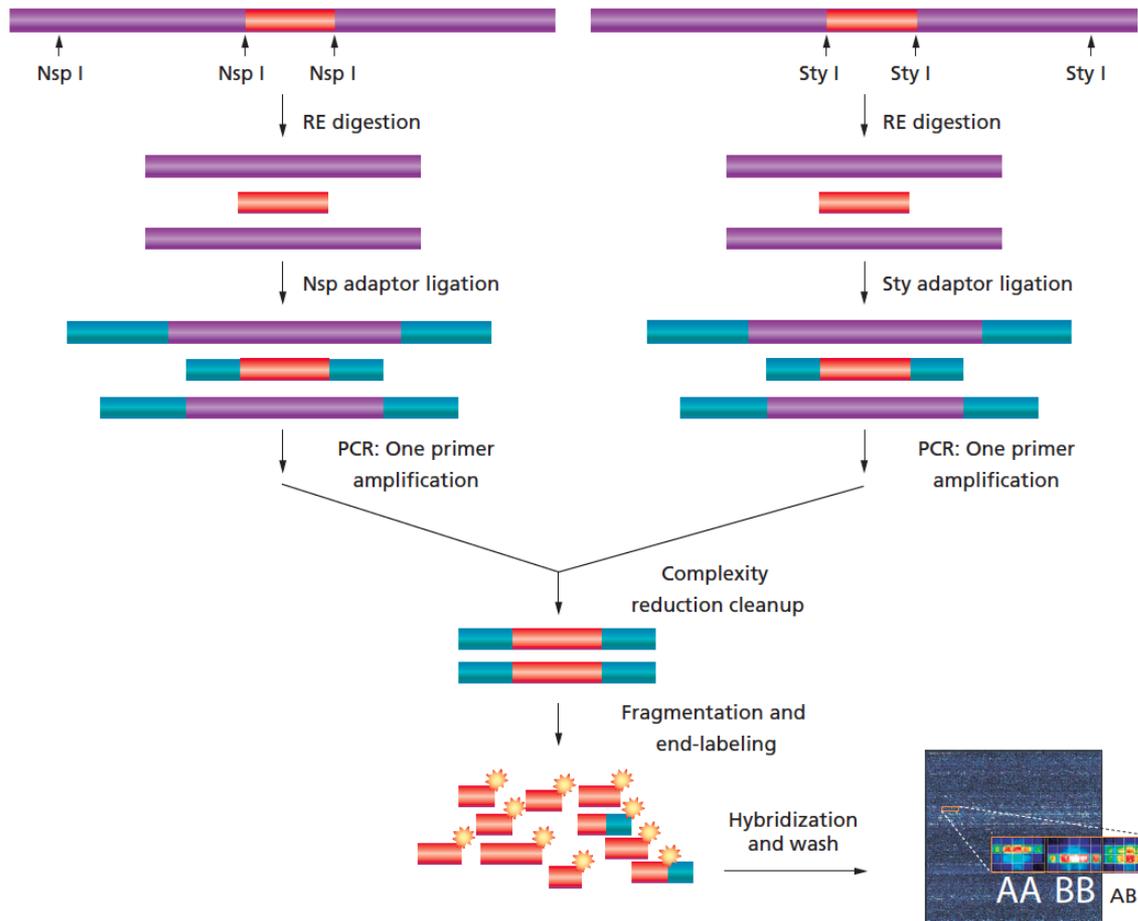
➤ *Ligação genética (linkage studies)*  *SNPs*

6. Estudo de Ligação Genética Utilizando SNPs

➤ *Ligação genética (linkage studies)*  *SNPs*

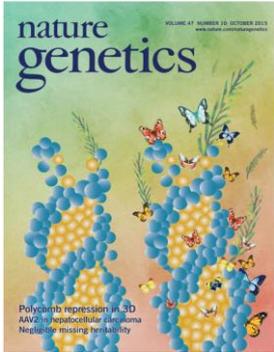
- SNP (*single nucleotide polymorphism*): variação frequente na sequência do DNA, envolvendo um único nucleotídeo (presente em pelo menos 1% da população)
 - Ex.: **GTATTGGCATATTGCCCGTATTGGCATATTGCC**
GTATTGGCATATCGCCCGTATTGGCATATTGCC
- Tecnologia de GeneChip (Genome-Wide Human SNP Array) → genotipagem concomitante mais de 900 mil SNPs, por meio de hibridização e detecção de fluorescência → estudo de ligação genética em escala genômica.
- Análise de bioinformática e utilização de diferentes algoritmos.

6. Estudo de Ligação Genética Utilizando SNPs



Principais etapas do processo de genotipagem dos SNPs. Enzima de restrição (RE); reação em cadeia da polimerase (PCR).

6. Estudo de Ligação Genética Utilizando SNPs



nature
genetics

A comprehensive 1000 Genomes–based genome-wide association meta-analysis of coronary artery disease

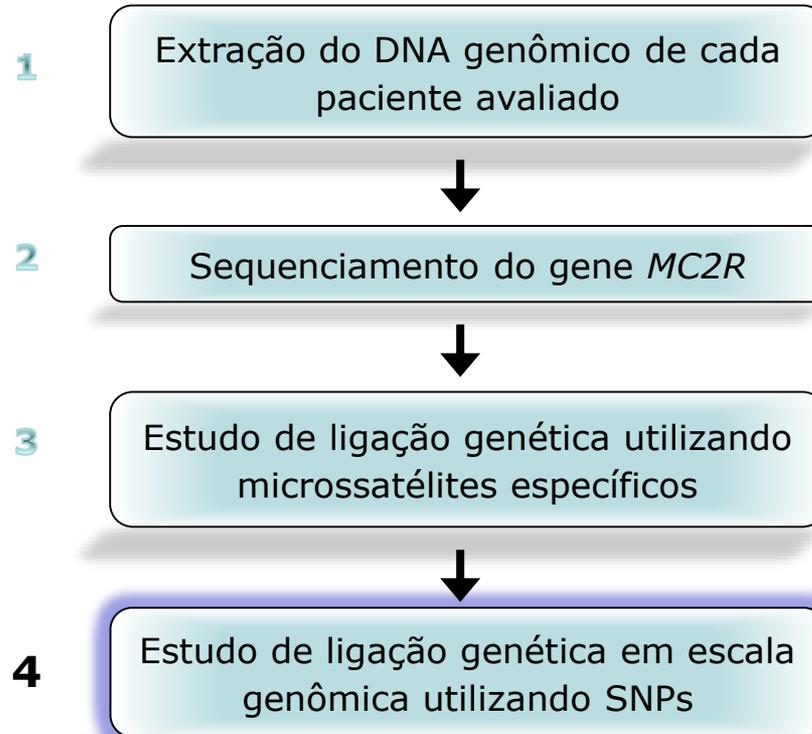
| Lead variant | Locus name | Chr. | Effect allele (A1/A2) | Imputation quality | Effect allele freq. | I^2 | Heterogeneity P | n studies ^a | Association model | | | |
|--------------|--------------------------|------|-----------------------|--------------------|---------------------|-------|-----------------------|--------------------------|-------------------------|--|-------------------------|--|
| | | | | | | | | | Additive | | Recessive | |
| | | | | | | | | | OR (95% CI) | P | OR (95% CI) | P |
| rs17087335 | <i>REST-NOA1</i> | 4 | T/G | 0.21 | 0.99 | 0.20 | 0.11 | 48 | 1.06 (1.04–1.09) | 4.60×10^{-8} | 1.11 (1.05–1.17) | 3.30×10^{-4} |
| rs3918226 | <i>NOS3</i> | 7 | T/C | 0.06 | 0.78 | 0.15 | 0.19 | 45 | 1.14 (1.09–1.19) | 1.70×10^{-9} | 1.26 (0.99–1.60) | 5.96×10^{-2} |
| rs10840293 | <i>SWAP70</i> | 11 | A/G | 0.55 | 0.94 | 0.17 | 0.16 | 47 | 1.06 (1.04–1.08) | 1.30×10^{-8} | 1.05 (1.02–1.09) | 1.51×10^{-3} |
| rs56062135 | <i>SMAD3</i> | 15 | C/T | 0.79 | 0.98 | 0.00 | 0.67 | 46 | 1.07 (1.05–1.10) | 4.50×10^{-9} | 1.17 (1.10–1.25) | 8.88×10^{-7} |
| rs8042271 | <i>MFGE8-ABHD2</i> | 15 | G/A | 0.9 | 0.93 | 0.16 | 0.19 | 46 | 1.10 (1.06–1.14) | 3.70×10^{-8} | 1.25 (1.13–1.37) | 7.27×10^{-6} |
| rs7212798 | <i>BCAS3</i> | 17 | C/T | 0.15 | 0.95 | 0.14 | 0.21 | 48 | 1.08 (1.05–1.11) | 1.90×10^{-8} | 1.17 (1.07–1.28) | 6.12×10^{-4} |
| rs663129 | <i>PMAIP1-MC4R</i> | 18 | A/G | 0.26 | 1.00 | 0.00 | 0.6 | 47 | 1.06 (1.04–1.08) | 3.20×10^{-8} | 1.11 (1.06–1.17) | 7.15×10^{-6} |
| rs180803 | <i>POM121L9P-ADORA2A</i> | 22 | G/T | 0.97 | 0.86 | 0.00 | 0.67 | 41 | 1.20 (1.13–1.27) | 1.60×10^{-10} | NA | NA |
| rs11830157 | <i>KSR2</i> | 12 | G/T | 0.36 | 0.99 | 0.14 | 0.22 | 42 | 1.04 (1.02–1.06) | 3.90×10^{-4} | 1.12 (1.08–1.16) | 2.12×10^{-9} |
| rs12976411 | <i>ZNF507-LOC400684</i> | 19 | T/A | 0.09 | 0.93 | 0.50 | 5.09×10^{-4} | 34 | 0.95 (0.92–0.99) | 9.10×10^{-3} | 0.67 (0.60–0.74) | 1.18×10^{-14} |

Associação do risco de doença arterial coronariana e determinadas variantes alélicas (SNPs) a partir genome-wide association study (GWAS).

6. Estudo de Ligação Genética Utilizando SNPs

Caso clínico

- PMAH



6. Estudo de Ligação Genética Utilizando SNPs

Estudo de ligação genética em escala genômica utilizando SNPs

(Affymetrix Genome-Wide Human SNP Array 6.0)



15 casos de PMAH + 9 controles sem a doença

Statistical Analysis for Genetic Epidemiology (S.A.G.E.), *Western Reserve University, Cleveland, USA*

SIPBAL

(FREQ ----- GENIBD ----- SIPBAL)

Método não paramétrico:

Avaliou-se quais eram os SNPs compartilhados pelos irmãos com PMAH e que estavam ausentes nos irmãos saudios.

Cálculo do p-valor

LODPAL

(FREQ ----- GENIBD ----- LODPAL)

Método não paramétrico:

Avaliou-se quais eram os SNPs compartilhados por todos os indivíduos com PMAH.

Cálculo do *LOD score* e do p-valor

LODLINK

(SEGREG ----- LODLINK)

Método paramétrico (herança autossômica dominante e penetrância de 90%):

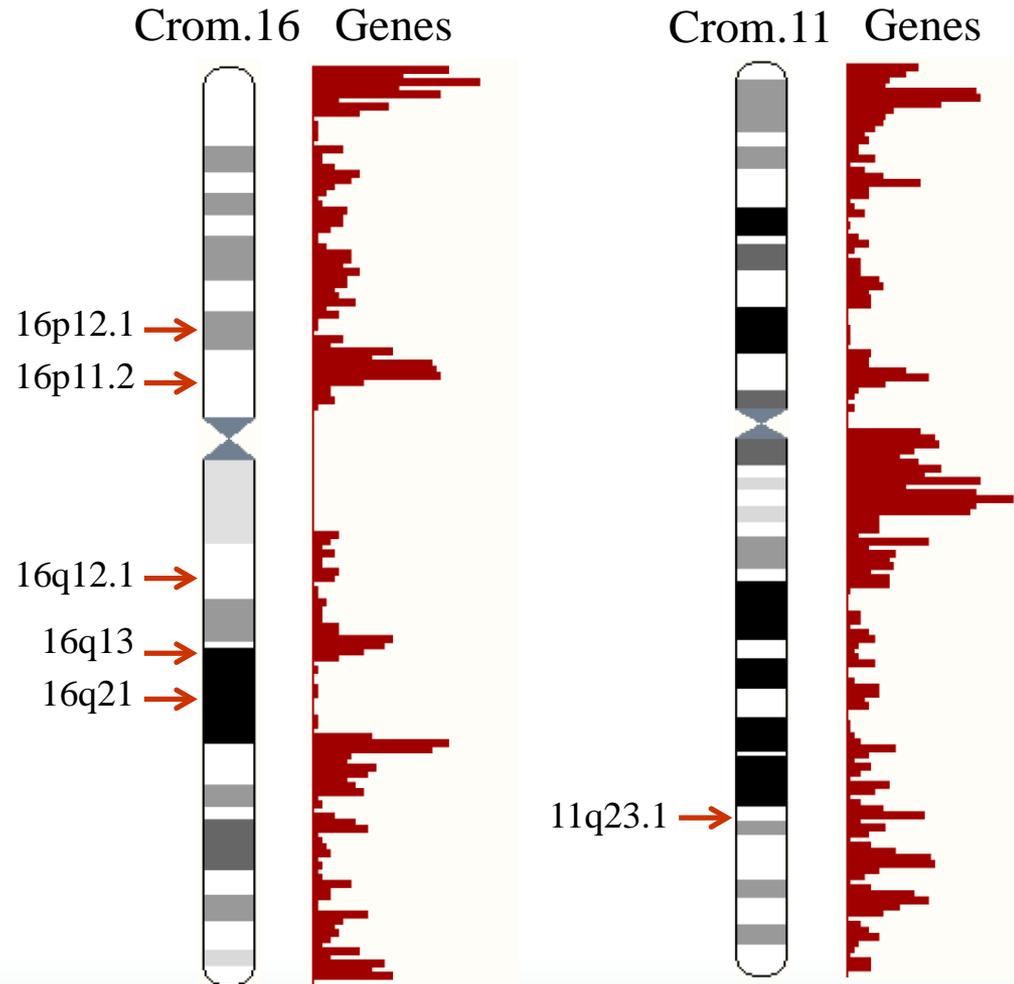
Avaliou-se quais eram os SNPs presentes nos indivíduos com PMAH e que estavam ausentes nos indivíduos sem a doença.

Cálculo do *LOD score* e do p-valor

6. Estudo de Ligação Genética Utilizando SNPs

- PMAH

Estudo de ligação genética em escala genômica utilizando SNPs



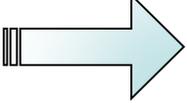
Roteiro

- Introdução
- **Investigação da etiologia genética da uma doença:**
 1. Suspeita Clínica
 2. Revisão da literatura
 3. Casuística
 4. Sequenciamento de genes candidatos
 5. Estudo de ligação genética utilizando microssatélites
 6. Estudo de ligação genética utilizando SNPs
 7. Sequenciamento de nova geração (NGS)
 8. Validação das mutações encontradas

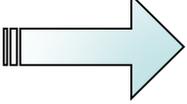
Roteiro

- Introdução
- **Investigação da etiologia genética da uma doença:**
 1. Suspeita Clínica
 2. Revisão da literatura
 3. Casuística
 4. Sequenciamento de genes candidatos
 5. Estudo de ligação genética utilizando microssatélites
 6. Estudo de ligação genética utilizando SNPs
 7. **Sequenciamento de nova geração (NGS)**
 8. Validação das mutações encontradas

7. Sequenciamento de Nova Geração (NGS)

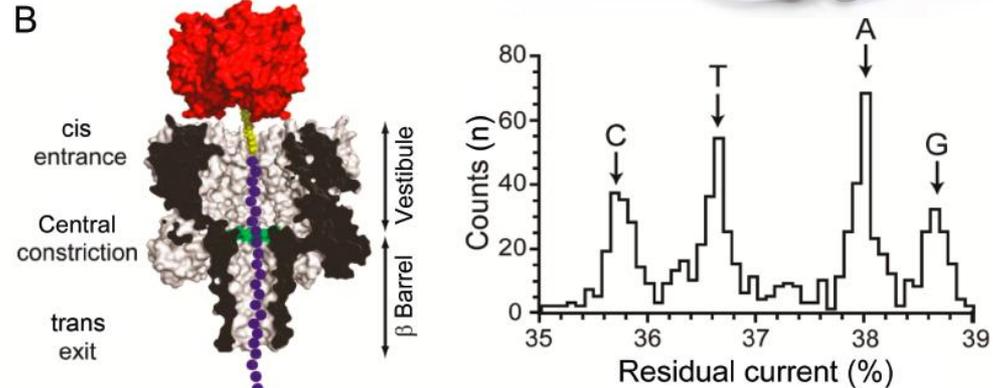
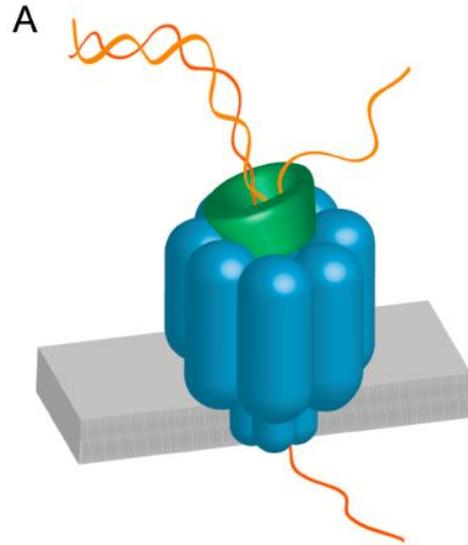
➤ NGS  *whole-exome sequencing e whole-genome sequencing*

7. Sequenciamento de Nova Geração (NGS)

➤ NGS  *whole-exome sequencing e whole-genome sequencing*

- Sequenciamento de nova geração: diferentes metodologias → processamento paralelo massivo de fragmentos de DNA (até bilhões de fragmentos) ou leitura direta
- Plataformas:
 - **Roche (2004): 454**
 - **Illumina: MiSeq, NextSeq e HiSeq**
 - **Applied Biosystems: Solid**
 - **Thermo Fisher Scientific: Ion Torrent**
 - **Pacific Biosciences: PacBio Sequencing Systems**
 - **Oxford Nanopore Technologies: Nanopore DNA analysis**

7. Sequenciamento de Nova Geração (NGS)



5' -ACTACCTAGTTTACGTAATCCATCTGCACAATGCAGCATTBtn-3'

5' -ACTACCTAGTTTACGTAATCCATCTGTACAATGCAGCATTBtn-3'

5' -ACTACCTAGTTTACGTAATCCATCTGAAACAATGCAGCATTBtn-3'

5' -ACTACCTAGTTTACGTAATCCATCTGGACAATGCAGCATTBtn-3'

Sequenciamento pela tecnologia do Nanopore. Uma fita simples de DNA atravessa um poro proteico (A); a sequência do DNA é determinada pela flutuação da corrente iônica (B). Cada base nitrogenada diferente (G, A, C e T) determina uma corrente iônica residual diferente.

7. Sequenciamento de Nova Geração (NGS)



The NEW ENGLAND
JOURNAL of MEDICINE

ORIGINAL ARTICLE

Central Precocious Puberty Caused by Mutations in the Imprinted Gene *MKRN3*

Ana Paula Abreu, M.D., Ph.D., Andrew Dauber, M.D., Delanie B. Macedo, M.D.,
Sekoni D. Noel, Ph.D., Vinicius N. Brito, M.D., Ph.D., John C. Gill, Ph.D.,
Priscilla Cukier, M.D., Iain R. Thompson, Ph.D., Victor M. Navarro, Ph.D.,
Priscila C. Gagliardi, M.D., Tânia Rodrigues, M.D., Cristiane Kochi, M.D.,
Carlos Alberto Longui, M.D., Dominique Beckers, M.D., Francis de Zegher, M.D., Ph.D.,
Luciana R. Montenegro, Ph.D., Berenice B. Mendonca, M.D., Ph.D.,
Rona S. Carroll, Ph.D., Joel N. Hirschhorn, M.D., Ph.D.,
Ana Claudia Latronico, M.D., Ph.D., and Ursula B. Kaiser, M.D.

Sequenciamento completo do genoma de 40 indivíduos de 15 famílias com puberdade precoce.

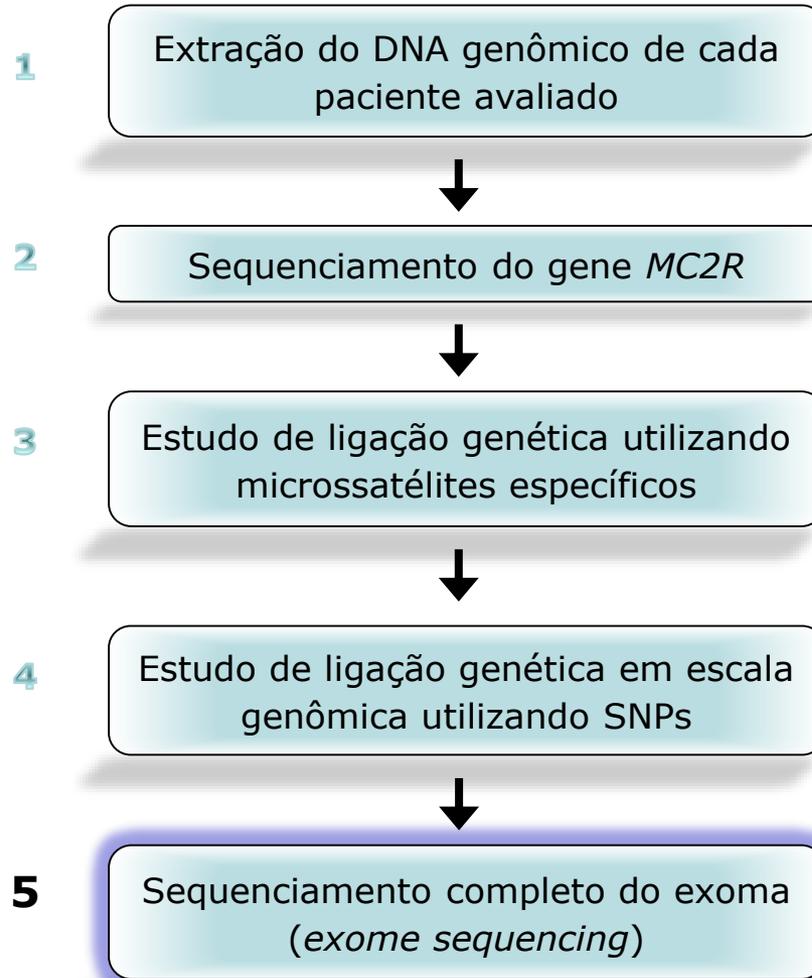


Mutação *MKRN3*

7. Sequenciamento de Nova Geração (NGS)

Caso clínico

- PMAH



6 indivíduos com PMAH (casos) e 4 controles
(Illumina HiSeq 2000 platform)

7. Sequenciamento de Nova Geração (NGS)

Sequenciamento completo do exoma (*exome sequencing*)

24.104 variantes alélicas

82 variantes alélicas

Presentes nos indivíduos com PMAH e ausentes na maioria dos controles.

15 cromossomos

48 variantes alélicas

Após a exclusão das variantes sinônimas

13 cromossomos

1 variante alélica

Após excluir os SNPs (1000 Genomes database)

1 cromossomo

Gene *ARMC5*
(armadillo repeat containing 5):

- c.1094T>C
- p.Leu365Pro
- Cromossomo 16
- Região 16p11.2

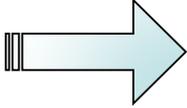
Roteiro

- Introdução
- **Investigação da etiologia genética da uma doença:**
 1. Suspeita Clínica
 2. Revisão da literatura
 3. Casuística
 4. Sequenciamento de genes candidatos
 5. Estudo de ligação genética utilizando microssatélites
 6. Estudo de ligação genética utilizando SNPs
 7. Sequenciamento de nova geração (NGS)
 8. Validação das mutações encontradas

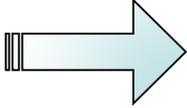
Roteiro

- Introdução
- **Investigação da etiologia genética da uma doença:**
 1. Suspeita Clínica
 2. Revisão da literatura
 3. Casuística
 4. Sequenciamento de genes candidatos
 5. Estudo de ligação genética utilizando microssatélites
 6. Estudo de ligação genética utilizando SNPs
 7. Sequenciamento de nova geração (NGS)
 8. **Validação das mutações encontradas**

8. Validação das Mutações Encontradas

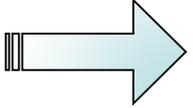
➤ *Validação*  *relação causal entre a mutação e a doença*

8. Validação das Mutações Encontradas

➤ *Validação*  *relação causal entre a mutação e a doença*

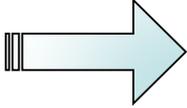
- Indagações em relação à variante alélica (possível mutação):

8. Validação das Mutações Encontradas

➤ *Validação*  *relação causal entre a mutação e a doença*

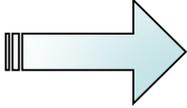
- Indagações em relação à variante alélica (possível mutação):
 - **Já fora descrita previamente?**
 - ✧ Artigos científicos
 - ✧ OMIM – www.omim.org/
 - ✧ The International Genome Sample Resource – www.internationalgenome.org/
 - ✧ The Human Gene Mutation Database – www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php

8. Validação das Mutações Encontradas

➤ Validação  *relação causal entre a mutação e a doença*

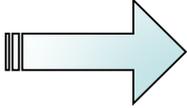
- Indagações em relação à variante alélica (possível mutação):
 - Já fora descrita previamente?
 - **É encontrada em indivíduos normais?**
 - ✧ Genotipagem em um grupo de indivíduos sem a doença (sem o fenótipo)

8. Validação das Mutações Encontradas

➤ *Validação*  *relação causal entre a mutação e a doença*

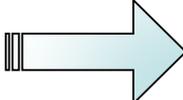
- Indagações em relação à variante alélica (possível mutação):
 - Já fora descrita previamente?
 - É encontrada em indivíduos normais?
 - **Segrega na família estudada?**

8. Validação das Mutações Encontradas

➤ *Validação*  *relação causal entre a mutação e a doença*

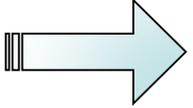
- Indagações em relação à variante alélica (possível mutação):
 - Já fora descrita previamente?
 - É encontrada em indivíduos normais?
 - Segrega na família estudada?
 - **Está presente em outros indivíduos doentes não participantes do estudo?**

8. Validação das Mutações Encontradas

➤ Validação  relação causal entre a mutação e a doença

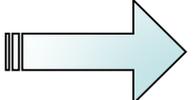
- Indagações em relação à variante alélica (possível mutação):
 - Já fora descrita previamente?
 - É encontrada em indivíduos normais?
 - Segrega na família estudada?
 - Está presente em outros indivíduos doentes não participantes do estudo?
 - **Interfere na transcrição do RNA e/ou tradução da proteína?**
 - ✧ Missense, nonsense, splicing-site, insertions e deletions
 - ✧ Predição das alterações *in silico*:
 - MutationTaster (www.mutationtaster.org)
 - Polyphen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2>)
 - SIFT (<http://sift.jcvi.org>)
 - SNAP (<https://roslab.org/services/snap2web>)

8. Validação das Mutações Encontradas

➤ *Validação*  *relação causal entre a mutação e a doença*

- Indagações em relação à variante alélica (possível mutação):
 - Já fora descrita previamente?
 - É encontrada em indivíduos normais?
 - Segrega na família estudada?
 - Está presente em outros indivíduos doentes não participantes do estudo?
 - Interfere na transcrição do RNA e/ou tradução da proteína?
 - **Alteração somática (segundo evento) associada?**

8. Validação das Mutações Encontradas

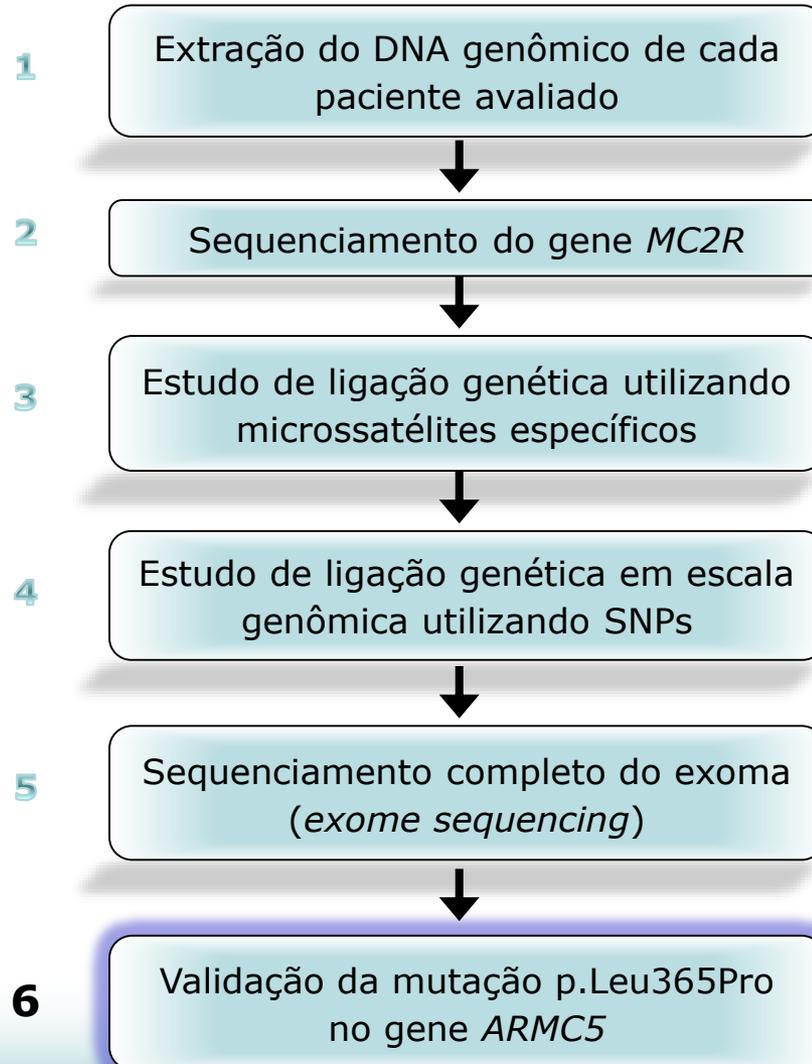
➤ *Validação*  *relação causal entre a mutação e a doença*

- Indagações em relação à variante alélica (possível mutação):
 - Já fora descrita previamente?
 - É encontrada em indivíduos normais?
 - Segrega na família estudada?
 - Está presente em outros indivíduos doentes não participantes do estudo?
 - Interfere na transcrição do RNA e/ou tradução da proteína?
 - Alteração somática (segundo evento) associada?
 - **Estudos funcionais ou modelos animais demonstrando o efeito da mutação?**

8. Validação das Mutações Encontradas

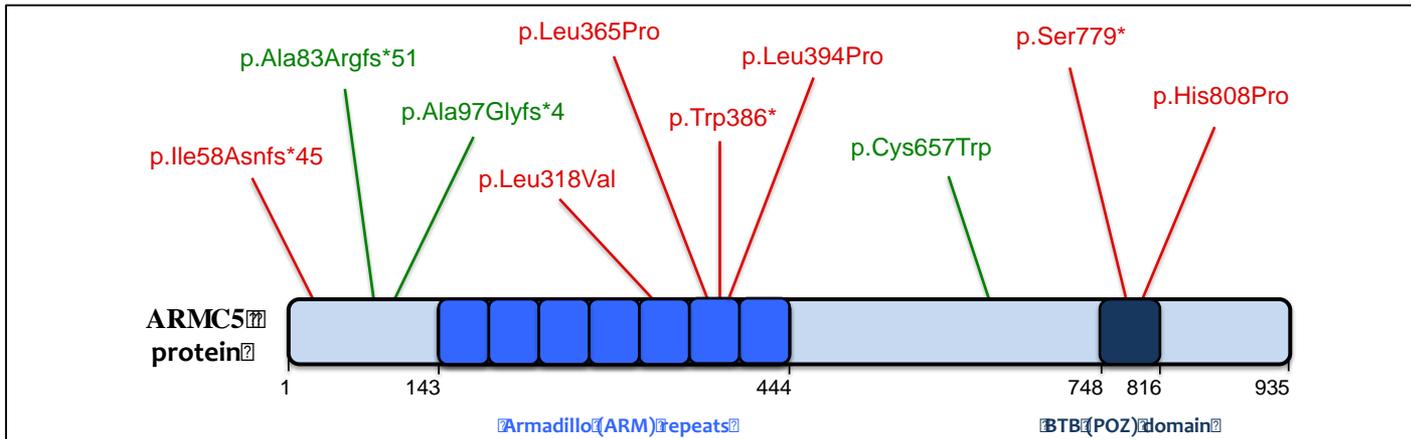
Caso clínico

- PMAH



8. Validação das Mutações Encontradas

- Estudo Funcional → 



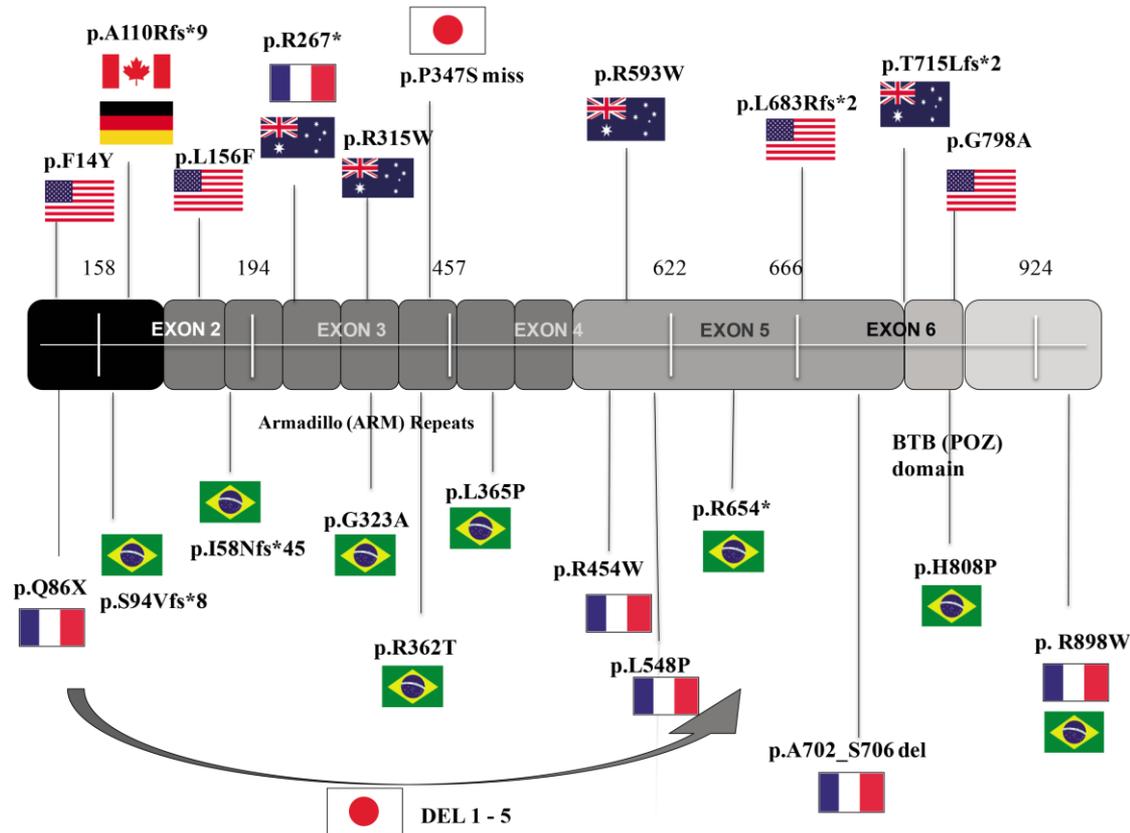
Proteína ARMC5 (mutações germinativas em vermelho e somáticas em verde). Alencar GA *et al.*, J Clin Endocrinol Metab 99:1501, 2014.

- Estudo funcional →  Assié G *et al.*, NEJM 369:2105, 2013

- ARMC5 induz a apoptose de linhagens celulares de tecido adrenal.
- Inativação da proteína ARMC5 – processo lento de desdiferenciação das células do córtex adrenal.

8. Validação das Mutações Encontradas

- PMAH:



Mutações germinativas no gene *ARMC5*, descritas em pacientes com a forma familiar da doença, publicados na literatura desde 2013.

Comentários Finais:

- Estudos de larga escala (genômica) e NGS → revolução do estudo genético.
- Suspeita clínica é uma etapa fundamental → etiologia genética
- Estruturação de bancos de DNA (bancos de material genético) → ponto de partida.
 - Assistência (diagnóstico e aconselhamento)
 - Pesquisa
- Parcerias e colaborações (nacionais e internacionais) → casuística e *know-how*.

Agradecimentos

 **Unidade de Suprarrenal e Laboratório de Hormônios e Genética Molecular (LIM/42) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (HCFMUSP), São Paulo, Brasil**

- ❖ *Profa. Dra. Maria Candida B V Fragoso*
- ❖ *Profa. Dra. Berenice B de Mendonça*
- ❖ *Dr. Antônio Marcondes Lerário*

 **Département de Médecine du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM), Montreal, Canadá**

- ❖ *Prof. Dr. André Lacroix*
- ❖ *Prof. Dr. Pavel Hamet*
- ❖ *Dra. Johanna Sandoval*

 **Personal Genome Diagnostics (PGDx), Baltimore, EUA**