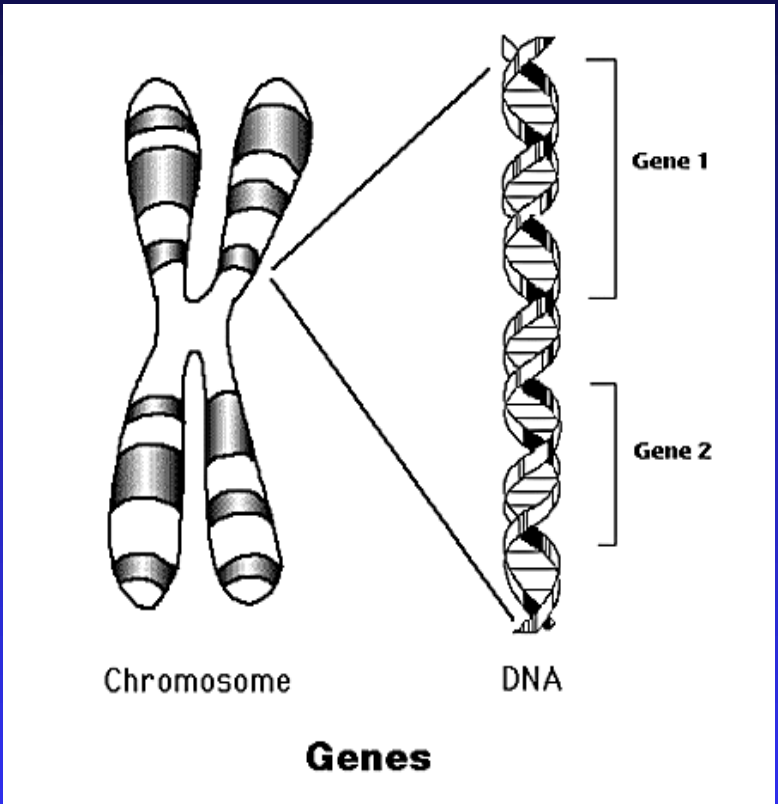
LA INVESTIGACIÓN GENÉTICA EN OSTEOPOROSIS



Dr. Xavier Nogués Solán
Unitat de Recerca Fisiopatología Òssia i Articular (URFOA)
Institut Municipal d'Investigació Mèdica. Universitat Autònoma de Barcelona
Hospital del Mar. Barcelona
Xnogues@hospitaldelmar.cat

URFOA

MASA ÓSEA

- FACTORES NUTRICIONALES
  DIETA, CALCIO, PROTEINAS, VITAMINAS, FIBRA ....

- FACTORES AMBIENTALES
  ACTIVIDAD FÍSICA, TABACO, ALCOHOL

- OTROS FACTORES
  PESO, AÑOS DE ESTROGENISMO, ALTERACIONES HORMONALES ...

MASA ÓSEA

FACTOR GENÉTICO

HEREDABILIDAD DE LA MASA ÓSEA

50%-70% INTERGENERACIONAL

80%-90% GEMELOS

46%-62% AJUSTE POR PESO, ALTURA Y FACTORES AMBIENTALES Y NUTRICIONALES

(Krall EA, Dawson-Hughes B. J Bone Miner Res 1993;8:1-9)

Heaney RP. *Bone* 33:457-465, 2003

Tipo de Herencia

GEN DE EFECTO PRINCIPAL

- Herencia mendeliana simple

GENES DE SUSCEPTIBILIDAD

- Herencia compleja
- Muchos genes (poligenia)
- Muchos factores ambientales
- Interacciones gen-gen y gen-ambiente

Planificación General

- Disponer estructura y personal
- Composición del equipo (Biólogo, genetista, epidemiólogo, estadístico..)
- Línea de investigación coherente
- Fomentar colaboraciones

Planificación Particular

- Tamaño muestral adecuado
- Caracterizar ampliamente el fenotipo
- Método de genotipación validado y fiable
- Estadística adecuada
- Publicación revista apropiada

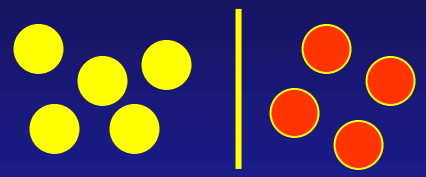
¿Cómo identificar los genes (variantes genéticas) que modifican la susceptibilidad de presentar osteoporosis?

ESTUDIO GENÉTICO DE ENFERMEDADES COMPLEJAS . HISTORIA

- Búsqueda a partir alteraciones monogénicas
- Polimorfismos
- Genoma humano
- SNPs
- Estudios funcionales
- Modelos animales knockout
- GWA
- Avances estadística

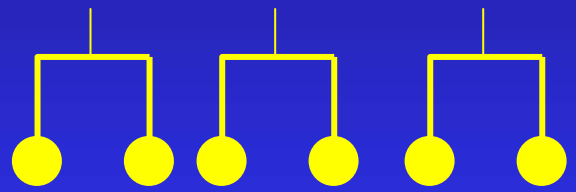
ESTUDIO GENÉTICO DE ENFERMEDADES COMPLEJAS

Estudios de asociación



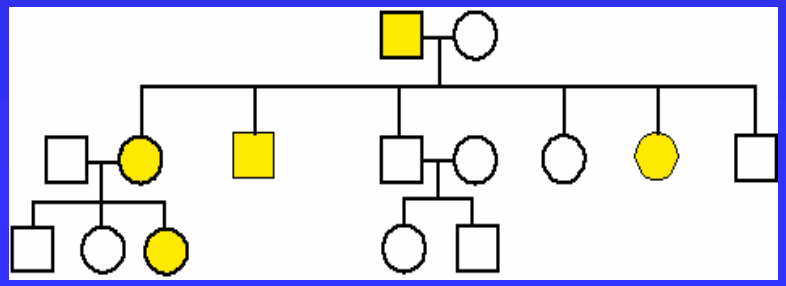
Casos Controles

Estudios de alelos compartidos en parejas de hermanos



hermanos afectos

Análisis de ligamiento en pedigris multigeneracionales.



Definir el fenotipo de osteoporosis

- Masa ósea medida mediante DXA
- Masa ósea medida mediante US
- TAC volumétrico
- Fracturas Vertebrales
- Fracturas No Vertebrales
- MRI
- Biopsia virtual
- Calidad ósea ????

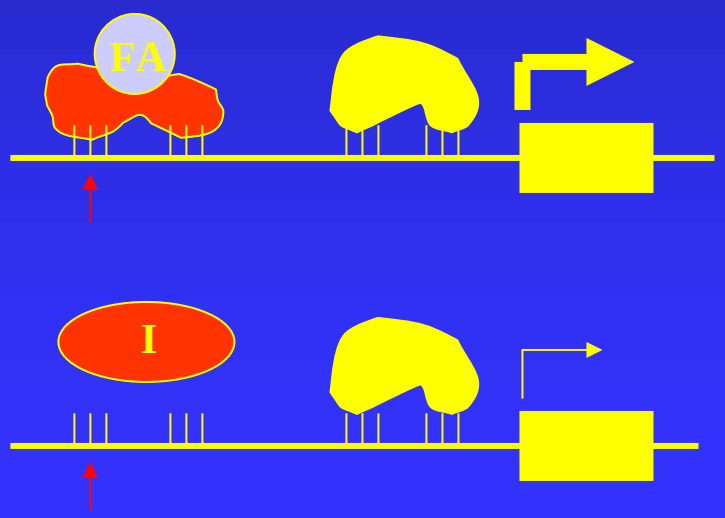
Estudios genéticos de asociación a nivel poblacional

- Definición fenotipo:
  - Factor de riesgo (masa ósea columna, fémur ...).
  - Manifestación clínica (Fractura vertebral, no vertebral, cadera …)

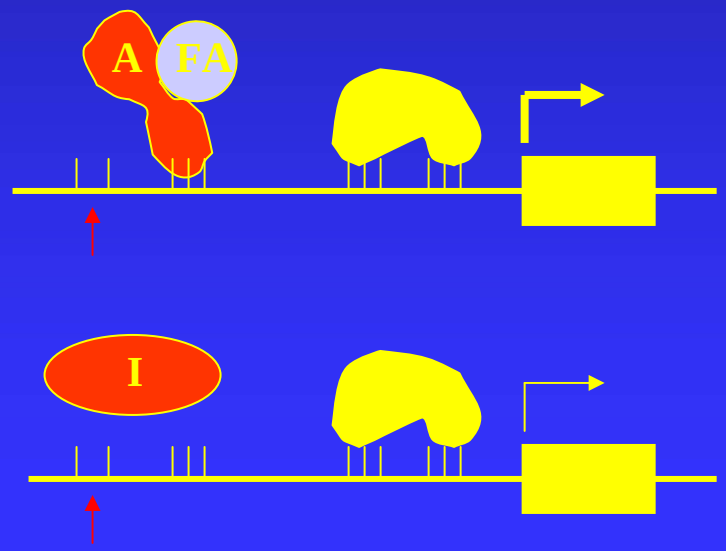
¡¡¡ Estos diferentes fenotipos pueden representar diferentes estadios de la misma enfermedad … los diferentes genes en estudio pueden ejercer un papel diferente en cada uno de estos estadios !!!

Interacción polimorfismos/ambiente

Individuo 1

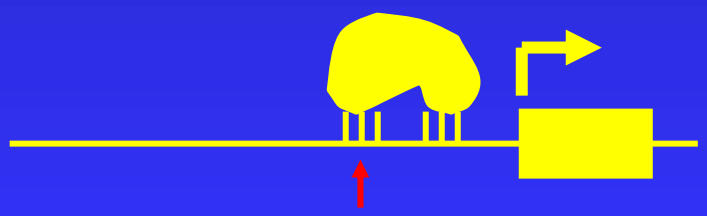


Individuo 2

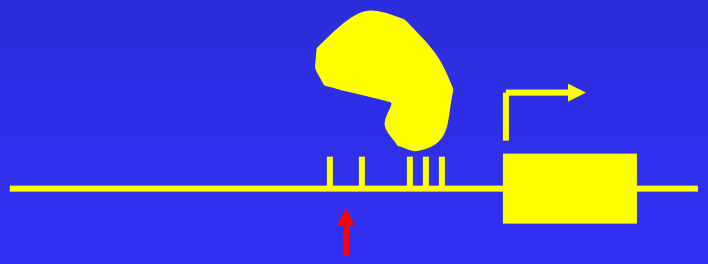


Posible efecto de un polimorfismo en una región reguladora

Individuo 1



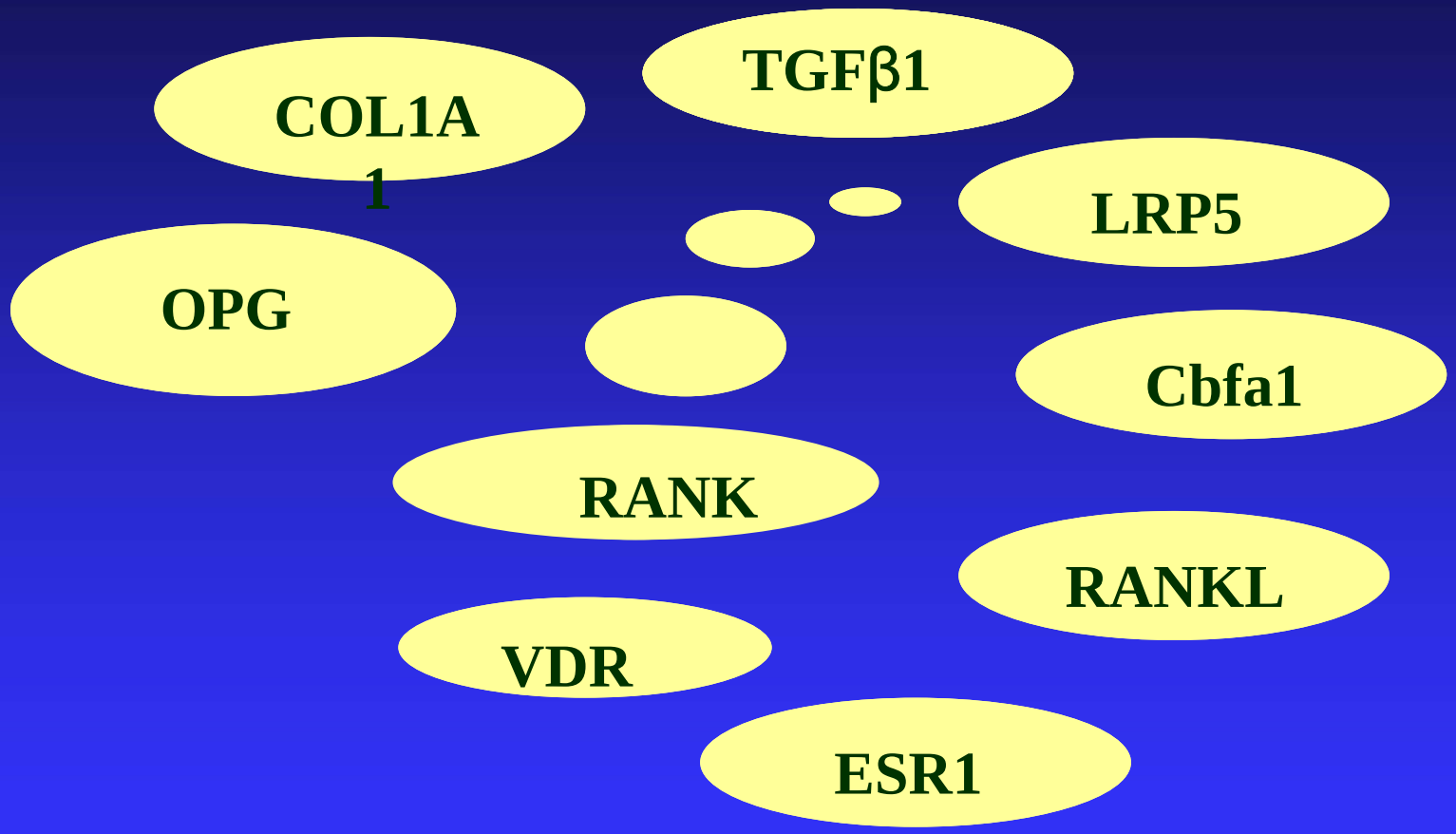
Individuo 2



Genes Candidatos

- Tienen una función endocrino-metabólica o estructural del hueso
- Intervienen en la diferenciación y/o proliferación de los osteoblastos
- Provocan una enfermedad monogénica que implica una disfunción del tejido óseo
- Se han detectado a partir de un Genome-Wide Association Study (GWA)

Genes estudiados



Langdahl, B.L., Carstens, M., Stenkjaer, L.et al. 2002. *Polymorphisms in the osteoprotegerin gene are associated with osteoporotic fractures*. J Bone Miner Res. 17(7):1245-55.
Wynne, F., Drummond, F., O'Sullivan, K.et al. 2002. *Investigation of the genetic influence of the OPG, VDR (Fok1), and COLIA1 Sp1 polymorphisms on BMD in the Irish population.* Calcif Tissue Int. 71(1):26-35

ARTICLE | Annals of Internal Medicine

Collaborative Meta-analysis: Associations of 150 Candidate Genes With Osteoporosis and Osteoporotic Fracture

J. Brent Richards, MD, MSc; Fotini K. Kavvoura, MD, PhD; Fernando Rivadeneira, MD, PhD; Unnur Styrkársdóttir, PhD; Karol Estrada, MSc; Bjarni V. Halldórsson, PhD; Yi-Hsiang Hsu, MD, ScD; M. Carola Zillikens, MD; Scott G. Wilson, PhD; Benjamin H. Mullin, BSc; Najaf Amin, MSc; Yurii S. Aulchenko, PhD; L. Adrienne Cupples, PhD; Panagiotis Deloukas, PhD; Serkalem Demissie, PhD; Albert Hofman, MD, PhD; Augustine Kong, PhD; David Karasik, PhD; Joyce B. van Meurs, PhD; Ben A. Oostra, PhD; Huibert A.P. Pols, MD, PhD; Gunnar Sigurdsson, MD, PhD; Unnur Thorsteinsdottir, PhD; Nicole Soranzo, PhD; Frances M.K. Williams, MD, PhD; Yanhua Zhou, MSc; Stuart H. Ralston, MD; Gudmar Thorleifsson, PhD; Cornelia M. van Duijn, PhD; Douglas P. Kiel, MD, MPH; Kari Stefansson, MD, PhD; André G. Uitterlinden, PhD; John P.A. Ioannidis, MD, PhD; and Tim D. Spector, MD, MSc, for the GEFOS (Genetic Factors for Osteoporosis) Consortium

Twenty bone-mineral-density loci identified by large-scale meta-analysis of genome-wide association studies

nature genetics

Fernando Rivadeneira[1,2,19,20], Unnur Styrkársdottir[3,20], Karol Estrada[1,19,20], Bjarni V Halldórsson[3,4,20], Yi-Hsiang Hsu[5,20], J Brent Richards[6–8,20], M Carola Zillikens[1,19,20], Fotini K Kavvoura[9,20], Najaf Amin[2], Yurii S Aulchenko[2,19], L Adrienne Cupples[10], Panagiotis Deloukas[11], Serkalem Demissie[10], Elin Grundberg[7,12], Albert Hofman[2,19], Augustine Kong[3], David Karasik[5], Joyce B van Meurs[1,2,19], Ben Oostra[13], Tomi Pastinen[7,12], Huibert A P Pols[1,2], Gunnar Sigurdsson[14,15], Nicole Soranzo[6,11], Gudmar Thorleifsson[3], Unnur Thorsteinsdottir[3,14], Frances M K Williams[8], Scott G Wilson[8,16], Yanhua Zhou[10], Stuart H Ralston[17], Cornelia M van Duijn[2,19,20], Timothy Spector[8,20], Douglas P Kiel[5,20], Kari Stefansson[3,14,20], John P A Ioannidis[9,18,20] & André G Uitterlinden[1,2,19,20] for the Genetic Factors for Osteoporosis (GEFOS) Consortium

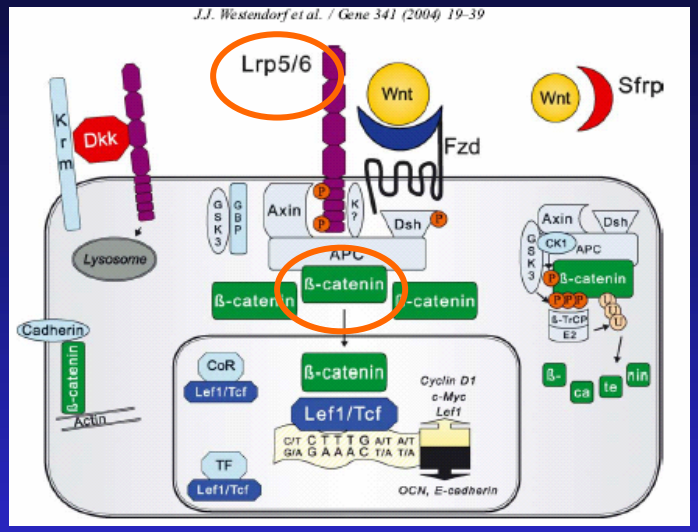
Meta-análisis de GENES CANDIDATOS

Collaborative meta-analysis: associations of 150 candidate genes with osteoporosis and osteoporotic fracture.

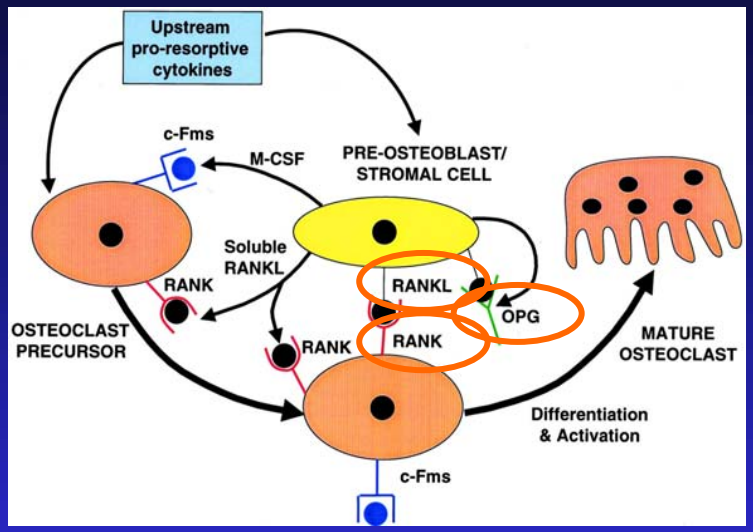
ESR1, LRP4, ITGA1, LRP5, SOST, SPP1, TNFRSF11A, TNFRSF11B, and TNFSF11

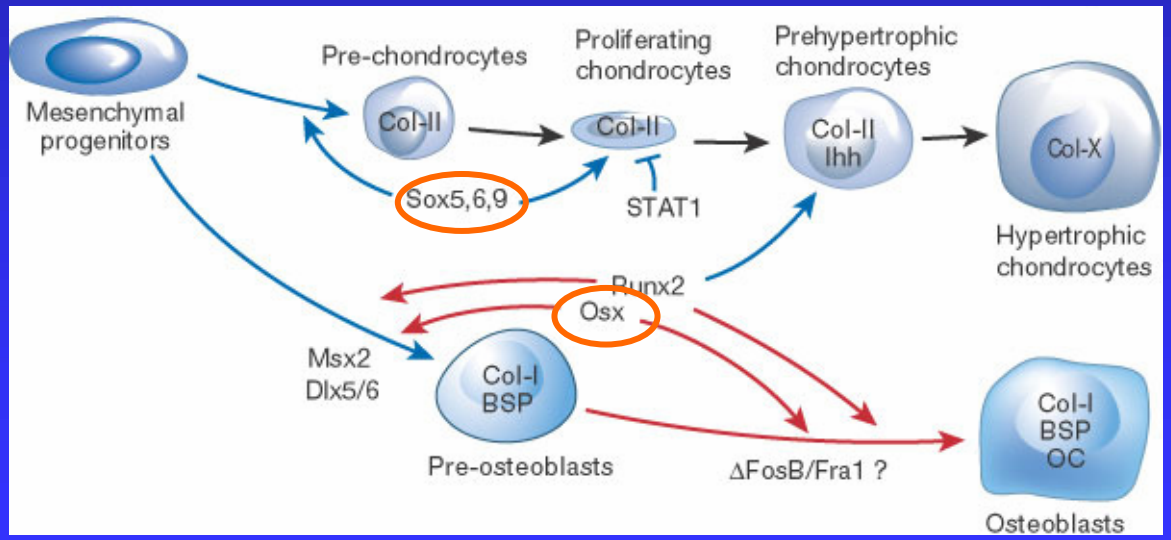
Richards et al., *Ann Intern Med* 151:528-37, 2009 (GEFOS)

Via de Wnt (LRP5 and β-catenin)



Sistema RANKL-RANK-OPG





Factores de transcripción importantes para la diferenciación (Osx, Sox6)

NUEVOS MARCADORES GENETICOS EN INVESTIGACION

Table 1

List of the most prominent genes associated with osteoporosis phenotypes confirmed by multiple study designs

Gene	Signaling pathway	Study design	References
LRP5	Wnt/β-catenin	Human family linkage, GWAS, CGS, mouse genetics	[25-27,70,77,107-109]
SOST	Wnt/β-catenin	Human family linkage, GWAS	[43,44,46,75]
sFRP4	Wnt/β-catenin	GWAS, CGS, mouse genomics and genetics	[57,110,111]
ALOX 12/15	Arachidonic acid metabolism	Mouse genomics and genetics, GWAS, CGS	[52-54]
BMP2	Bone morphogenetic protein signaling	GWAS, CGS, mouse genomics and genetics	[33,112,113]
VDR	Transcriptional regulation	CGS, GWAS	[5,32,107]
ESR1/ESR2	Transcriptional regulation	CGS, GWAS	[4,72,107]
STAT1	Transcriptional regulation	GEP, CGS, mouse genetics	[73,74]
Col1A1	Extracellular matrix	CGS, GWAS	[3,32]

CGS, candidate gene study; GEP, gene expression profiling; GWAS, genome-wide association study. For additional references see article and reviews cited therein.

Johnson ML et al Genome Medicine 2009

IMIM hospitaldelmar

red envejecimiento y fragilidad

Genotipado

- Centro de Genotipado Nacional (CEGEN) Sedes Barcelona, Santiago de Compostela y Madrid - Ilumina y Sequenom

- Diferentes metodologías

- SNPlex, VERACODE ,TAQMAN

Estudios genéticos de asociación a nivel poblacional

- Definición “marcadores genéticos” de interés
  - Selección de genes a estudiar:
    - candidatos (fisiopatología de la enfermedad)
    - *g*enome wide scan
  - Selección de variantes genéticas a estudiar:
    - variantes frecuentes (>10% población)
    - localizadas en intrones, exones o promotor
    - alteración funcional de la proteína codificada
    - ....
  - Tipos de variantes genéticas:
    - SNPs
    - Haplotipos

- Putativos SNPs funcionales se escogen utilizando las bases de datos de HapMap (www.hapmap.org), ENSEMBL (www.ensembl.org), Entrez SNP (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez), y UCSC genome browser (http://genome.ucsc.edu/).

- Los SNPs tambien se pueden seleccionar segun su conservación en la evolución.

Se comparan las secuencias genómicas de *Mus musculus*, *Rattus norvigicus*, *Canis familiaris*, *Bos tauros* and *Homo sapiens* (ratón, rata, perro, vaca y humano, respectivamente). Los SNPs que caen en regiones conservadas se validan en población caucásica

- Otros SNPs se pueden seleccionar por ser:

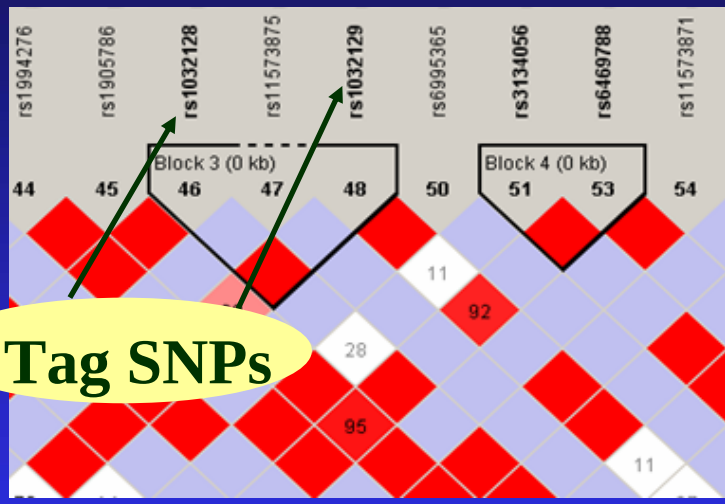
- Cambios Non-synonymous.
- Estudios previos de asociación con la DMO o el riesgo a fractura.
- Localizados en regiones relevantes para la regulación de la transcripción

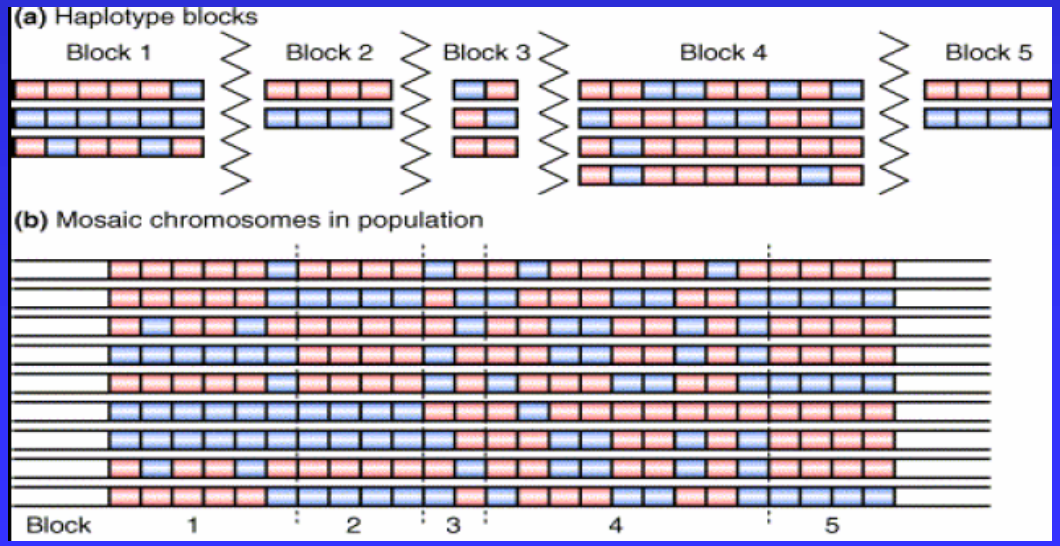
International HapMap Project

Home | About the Project | Data | Publications | Tutorial

www.hapmap.org

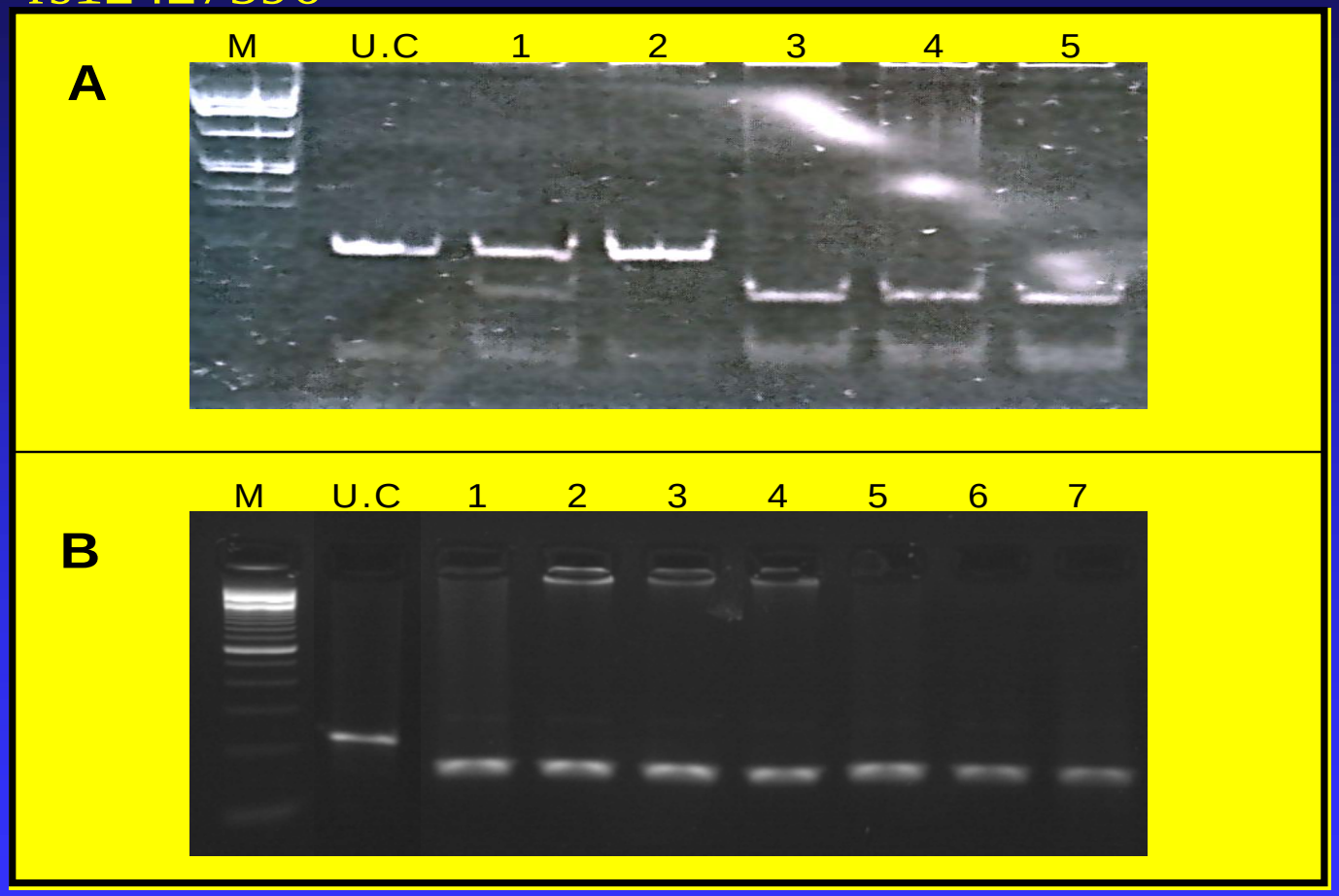
- ✓ Bloque haplotípico: región con alto LD.
- ✓ SNPs próximos → bloque haplotípico.
- ✓ *Hotspots*.
- ✓ Diversidad de haplotipos limitada.
- ✓ Tag SNPs





Validación de SNPs (RFLP)

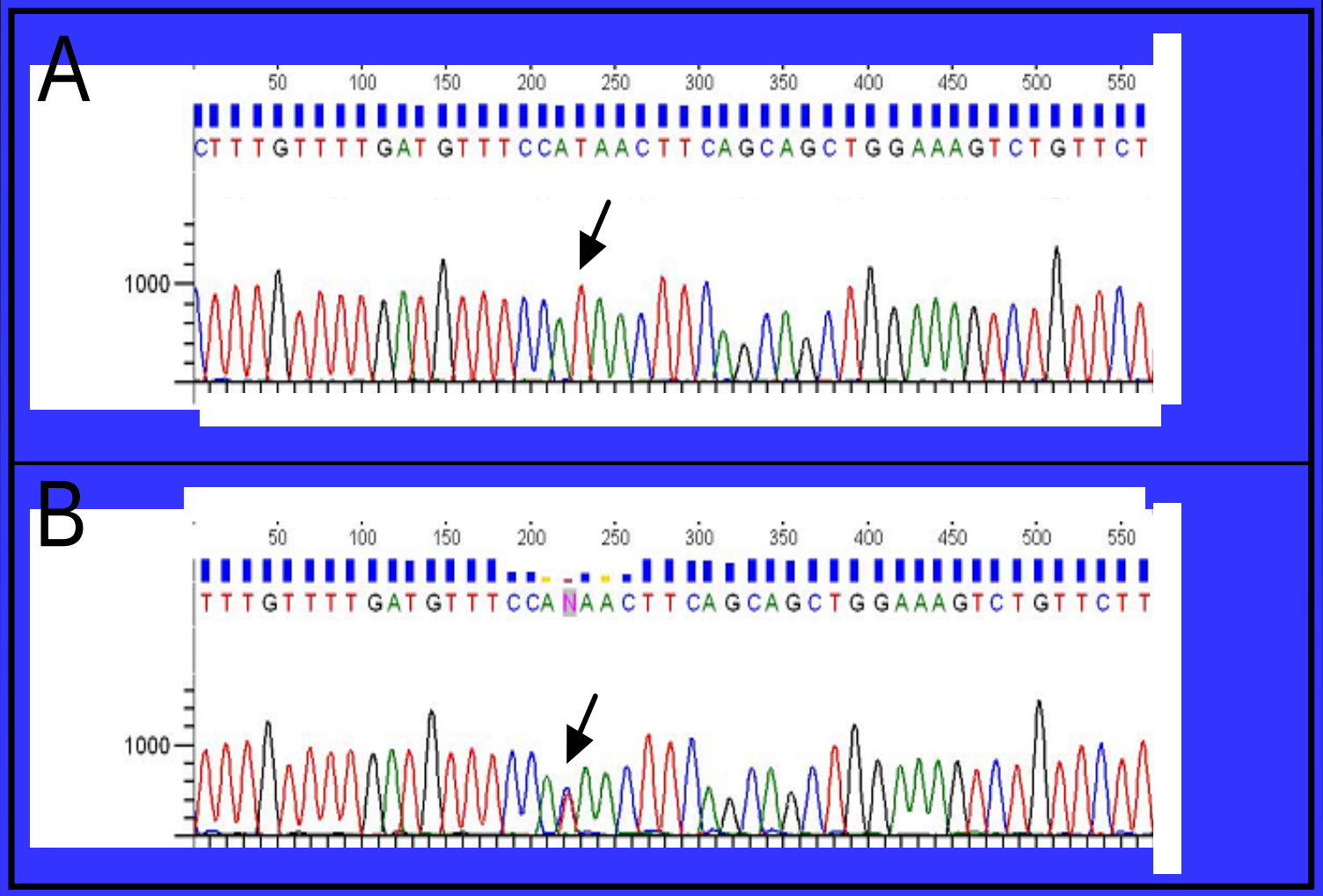
rs12427596



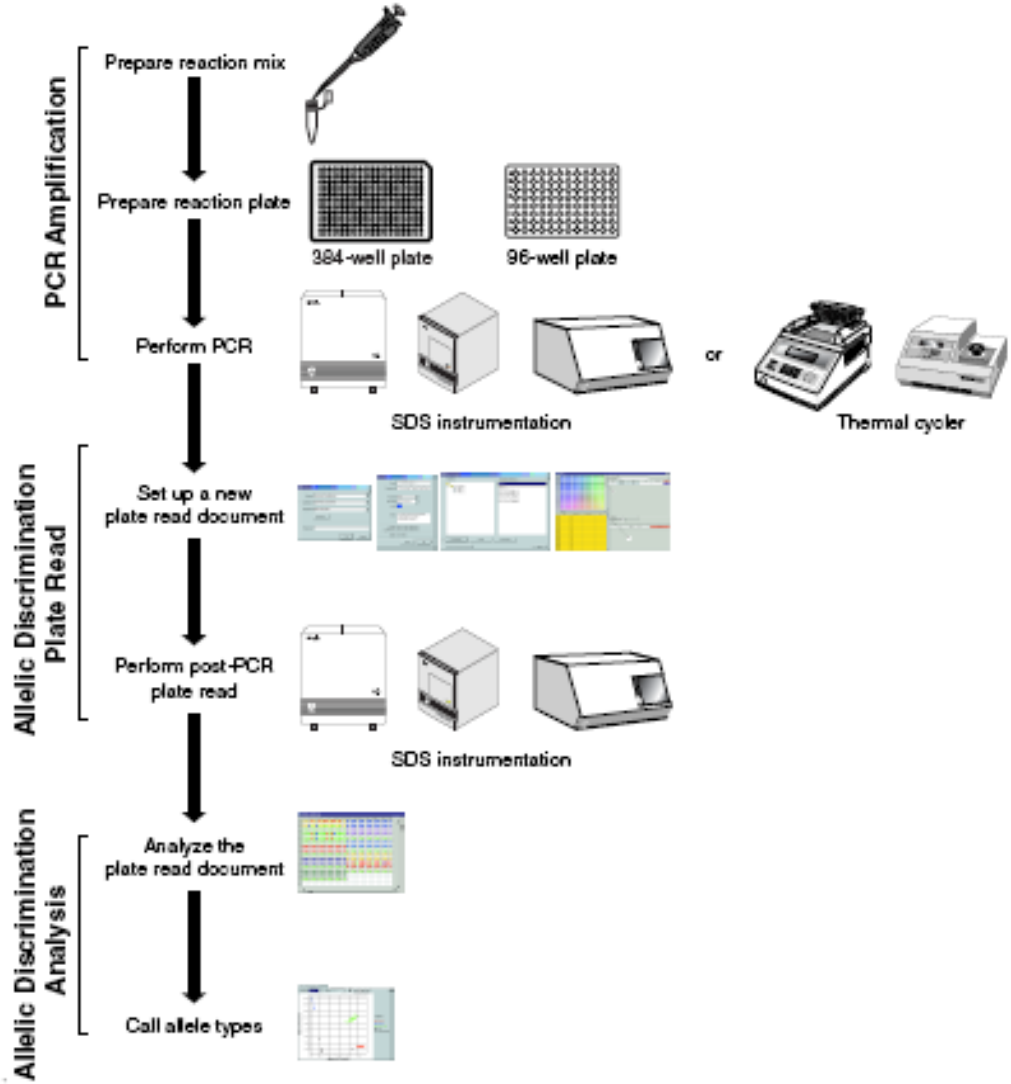
rs11557725

Validación de SNPs (secuencia)

rs7844577 (C/T)



Genotipaje del DNA genómico dispuesto en placas



Estadística

- Variable cuantitativa (DMO)
  - ANOVA
    - Modelo general
    - Modeol recesivo (AA + AB, BB)
    - Modelo dominante (AA, AB + BB)
  - ANCOVA (ANOVA ajustada por covariables)
    - Modelo general
    - Modelo recesivo (AA + AB, BB)
    - Modelo dominante (AA, AB + BB)
  - Regresión lineal (ajustada o no) Modelo aditivo

Estadística

- Variable cualitativa (fractura)
  - Chi cuadrado
    - Modelo general
    - Modeol recesivo (AA + AB, BB)
    - Modelo dominante (AA, AB + BB)
  - Regresión logística (ajustada por covariables)

Estudios de asociación

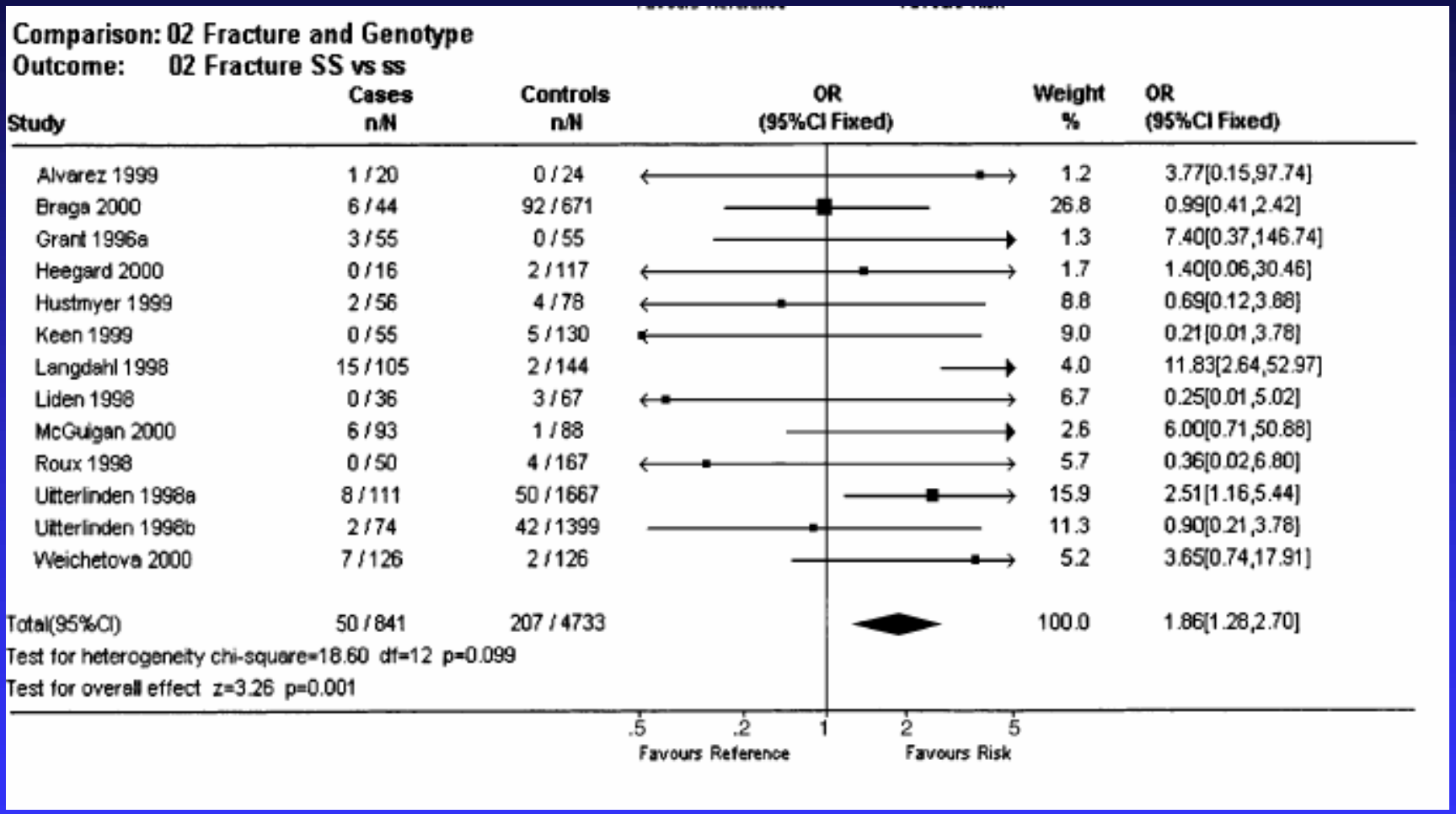
- Bajo poder de reproducibilidad
- Afectados por multiples factores
- Afectados por desequilibrio de ligamiento
- Explican variaciones del DMO < 5%
- Tamaños muestrales pequeños

Liu et al .J Endocrinol 2003

Análisis estadístico: comparaciones múltiples

- Falso positivo (error tipo I)
  - En estudios de ligamiento, por consenso, se ha acordado definir el nivel de significación estadística como $p < 0{,}001$.
  - En estudios de asociación, no hay consenso
    - Corrección Bonferroni
    - Metaanálisis de estudios previos
    - Proporción falsos positivos

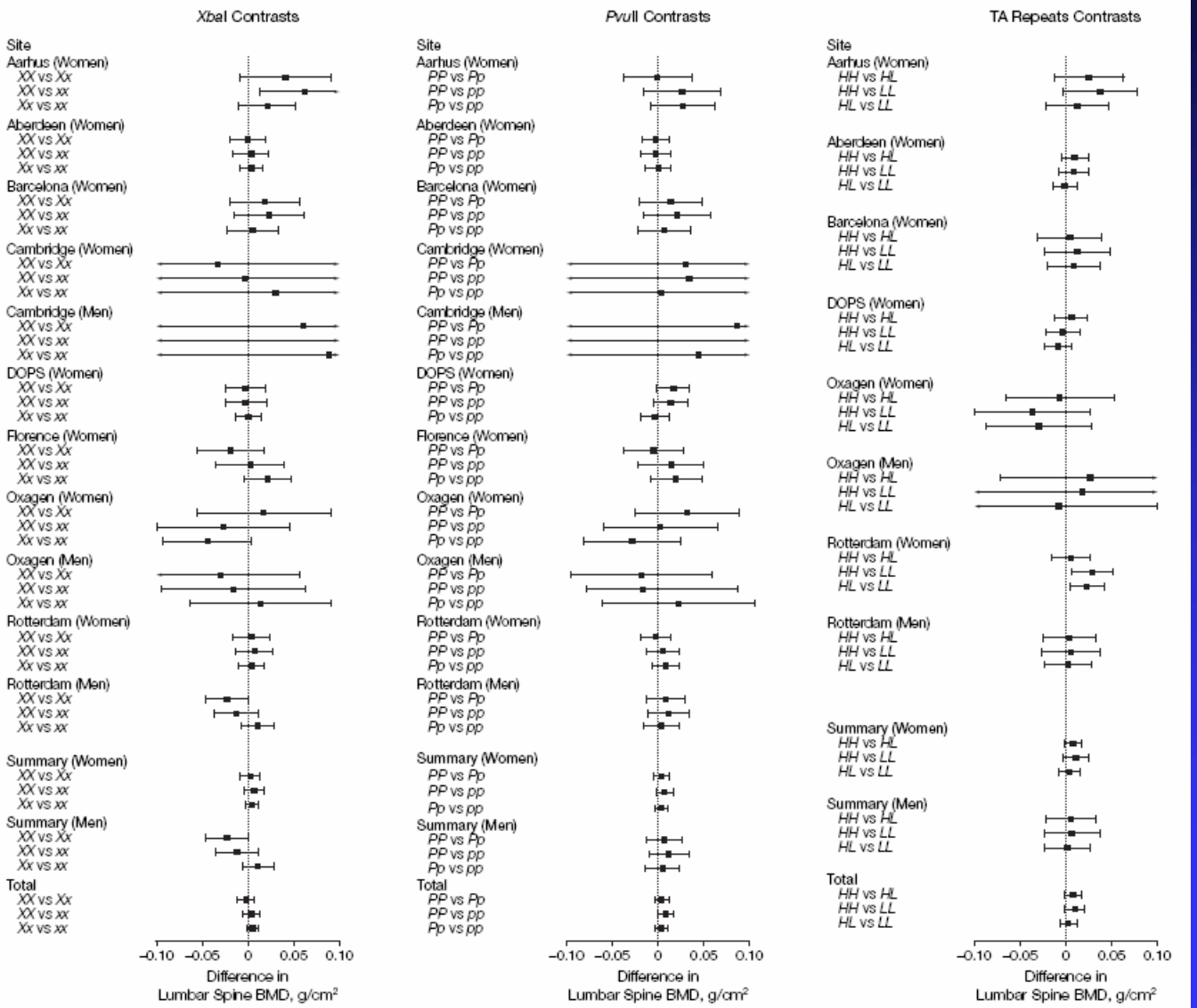
META-ANALISIS



Mann V et al . J ClinInvest 2001;107;899-907

META-ANALISIS

Figure 2. Differences in Lumbar Spine Bone Mineral Density (BMD) for the Contrasts of *Xba*I, *Pvu*II, and TA Repeat Genotypes



Ioannidis JPA 2004;292:2105-14

Estudios de asociación

- ESTADÍSTICA CON HAPLOTIPS Y HAPLOGENOTIPOS
  - Para cada individio decir cuantas copias tiene de cada haplotipo
    - Ex. Haplotipo **ACC** 0-1-2 copias
    - Además hacer el modelo dominante y recesivo
      - Dominante 0, 1+2 copias
      - Recesivo 0+1, 2 copias
  - estadística con haplogenotipos.
    - Suelen salir muchos y se han de agrupar

CONCLUSIONES

- Necesidad de estructura, equipo y línea de investigación
- Selección adecuada de fenotipo
- Planificar estrategia de estudio
- Utilización de plataformas adecuadas
- Análisis estadístico adecuado
- Suerte ....!!!!!!!

IMIM hospitaldelmar

red envejecimiento y fragilidad

El grupo URFOA(IMIM)-GMH (UB):

Lídia Águeda
Patricia Sarrión
Mònica Cozar
Roser Urreizti
Susana Balcells
Daniel Grinberg

UNIVERSITAT DE BARCELONA

IMIM hospitaldelmar
Fundació IMIM

UAB Universitat Autònoma de Barcelona

red envejecimiento y fragilidad

Susana Jurado
Guy Yoskovitz
Natàlia Garcia
Roberto Guerri
Leo Mellibovsky
Xavier Nogués
Adolfo Díez-Pérez