

Identificación de genes causales y de susceptibilidad para enfermedades de herencia Mendeliana y compleja

(Identification of Susceptibility and Causing Genes for Mendelian and Complex Diseases)

Luis Rodríguez-Porras, Henriette Raventós-Vorst

Resumen

Los factores genéticos participan en la etiología de la mayoría de las enfermedades comunes en la población. Las enfermedades en las que participan factores genéticos pueden ser clasificadas en varias categorías y de acuerdo con las características que presenten, se pueden utilizar distintas estrategias metodológicas para identificar los genes participantes. En la mayoría de las enfermedades con un patrón de herencia mendeliana, se han podido identificar las mutaciones causales de la enfermedad. En las enfermedades complejas, esta búsqueda ha sido menos exitosa a pesar de ser las más frecuentes en la población. Encontrar genes de susceptibilidad es importante no solo para entender el mecanismo de acción de la enfermedad, sino que podría contribuir en el desarrollo de medicamentos más eficaces para el tratamiento, conocer los factores ambientales y desarrollar intervenciones preventivas y, en algunos casos, la aplicación de terapia génica.

Descriptor: desequilibrio de ligamiento, enfermedades multifactoriales, herencia mendeliana, heterogeneidad genética, penetrancia, tamizaje genómico

Abstract

Genetic factors are involved in the etiology of most common diseases and traits present in populations. Different methodological approaches can be utilized to determine genes involved according to their genetic features in diseases. In the majority of conditions that follow a simple Mendelian pattern culprit genetic mutations have been identified. Conversely complex traits that are most common in the population are also the most difficult to identify. Finding these genes is crucial not just to clarify the pathophysiology of these common diseases but also to identify environmental factors involved and to improve their treatment, including in some specific cases gene therapy.

Key words: linkage disequilibrium, complex diseases, mendelian inheritance, genetic heterogeneity, genetic penetrance, genomic screening.

Recibido: 5 de noviembre de 2007 **Aceptado:** 22 de abril de 2008

Las enfermedades genéticas pueden ser clasificadas como: (a) cromosómicas, (b) monogénicas y (c) complejas (también conocidas como multifactoriales).

Universidad de Costa Rica,
Centro de Investigación en
Biología Celular y Molecular.

Correspondencia: Luis
Rodríguez-Porras. Centro de
Investigación en Biología Celular
y Molecular, Ciudad de la
Investigación (2060) Universidad
de Costa Rica.

E-mail: lurobep@gmail.com
hravento@racsa.co.cr

En las enfermedades cromosómicas el número y la estructura de los cromosomas es anormal. Tal es el caso del síndrome de Down 47 (+ 21), Turner 45 (X0) y Klinefelter (XXY). El diagnóstico de estas patologías es relativamente sencillo y bastante exacto con la utilización de los métodos citogenéticos tradicionales.

La herencia monogénica es causada por mutaciones en un locus específico y presenta un patrón de herencia mendeliano clásico, en el que la expresión del fenotipo obedece a la presencia de un genotipo particular. De acuerdo con su localización cromosómica, estas mutaciones se clasifican como autosómicas (en cualquier cromosoma no sexual) o ligadas al X. Con base en su mecanismo de acción, se pueden clasificar como dominantes si el alelo se expresa en estado heterocigoto, o recesivas si se requieren dos copias del alelo para que se exprese el fenotipo (estado homocigoto). Algunos ejemplos son la fibrosis quística (autosómica recesiva), varias colagenopatías (autosómica dominante) y la distrofia muscular de Duchenne (ligada al X).^{1,2}

Las enfermedades de herencia mendeliana son la excepción más que la regla. La mayoría de las características humanas como la estatura, el peso y el comportamiento, además de las patologías más comunes en la población como la diabetes, la esclerosis múltiple, la esquizofrenia, la migraña, el desorden bipolar y las enfermedades cardiovasculares, no presentan un patrón de herencia mendeliano. Estas características han sido clasificadas como “multifactoriales” o “de herencia compleja”. Es decir, son rasgos fenotípicos que no se ajustan a un patrón de herencia clásico atribuido a mutaciones en un único *locus*. Se explican por el efecto aditivo de varios genes de susceptibilidad, la influencia de factores ambientales múltiples y la interacción entre los genes y el ambiente.^{3,4}

Desarrollo de la enfermedad: ¿Susceptibilidad genética o ambiental?

Los estudios en familias completas, en gemelos y en familias con adopciones son las herramientas más utilizadas para determinar si una característica tiene un componente genético, ambiental o ambos.

Estudios familiares

La agregación familiar sugiere que los factores genéticos desempeñan un papel en la etiología de la enfermedad. En estos estudios, el objetivo es comparar el riesgo de tener la enfermedad entre los familiares de un probando con el de los familiares de un sujeto sin la enfermedad. El método estadístico más común para cuantificar ese riesgo se conoce como “riesgo relativo” y se obtiene al calcular la prevalencia de la enfermedad en la familia comparada con la de un grupo control. Un riesgo relativo mayor que uno significa que existe más riesgo de padecer la enfermedad en parientes de personas afectadas que en la población general. Cuanto más bajo sea el riesgo relativo, la complejidad genética de la enfermedad suele incrementarse.³

Una de las desventajas de los estudios familiares es que las familias no solo comparten genes, sino también factores ambientales, los cuales en el caso de enfermedades complejas, pueden ser tanto o más importantes para el desarrollo de la enfermedad. Como un intento por controlar el ambiente, se han utilizado estudios de concordancia en gemelos.

Estudios de gemelos

En el siglo XIX, Francis Galton introduce el concepto genes-ambiente con el estudio de gemelos. Mediante tales estudios es posible evaluar cuánto influyen los factores genéticos en el desarrollo de alguna característica. En estos estudios, se calcula la tasa de concordancia en gemelos monocigóticos (comparten 100% del ADN) vs. dicigóticos (comparten 50% del ADN).⁵ La heredabilidad de una característica se puede definir como la varianza fenotípica entre parejas de gemelos monocigóticos y dicigóticos atribuible a factores genéticos. Un carácter con una heredabilidad de 1 está totalmente determinado por un efecto genético, así como una heredabilidad de 0 implica que las causas ambientales determinan la expresión de ese carácter.

Cuando la concordancia de gemelos monocigóticos es mayor que en dicigóticos (pero no 100%), se considera que los factores genéticos son importantes en la etiopatogenia, pero no son suficientes para determinar la característica por sí solos; se requiere la presencia de factores ambientales que predisponen o evitan su desarrollo.⁶

Estudios de adopciones

Otra de las estrategias empleadas para determinar si una característica tiene origen ambiental o genético está constituida por los estudios de adopciones, los cuales pueden clasificarse en dos categorías, dependiendo de si es el padre adoptivo o su hijo quienes poseen la característica por estudiar. La concordancia en las características del niño adoptado con sus padres biológicos es atribuida a efectos genéticos. La concordancia de la característica con sus padres adoptivos suele interpretarse como influencia de factores ambientales en la característica.

Es posible que por azar se establezcan ciertas asociaciones para el carácter analizado, por lo que se requieren muestras de gran tamaño para obtener resultados confiables.⁷

Estrategias de mapeo

Con el mapeo de genes de susceptibilidad, se pretende demostrar que un *locus* en particular está asociado con un fenotipo específico, independientemente de que sea una característica compleja o de herencia mendeliana simple. Sin embargo, por distinciones en su etiología se han tenido que plantear ciertas diferencias metodológicas.⁸ Una forma de abordar el estudio genético de las enfermedades es mediante métodos paramétricos tradicionales, como estudios de ligamiento genético familiar.

Estudios de ligamiento

De acuerdo con la tercera ley de Mendel, la segregación de los caracteres en la formación de gametos es independiente. En la actualidad se conoce que este postulado se cumple cuando los genes se localizan en cromosomas diferentes, o a mucha distancia en el mismo cromosoma.

Cuando los genes se localizan muy cerca en el mismo cromosoma, tienden a cosegregarse en bloque (haplotipos) dentro de las familias, y se dice que estos *loci* están genéticamente ligados.

En un estudio de ligamiento se busca encontrar marcadores genéticos que sean coheredados con el fenotipo en estudio (indirectamente con el gen que causa la enfermedad). Cuando un marcador genético y el gen causal del fenotipo están muy separados en el mismo cromosoma o están en cromosomas diferentes, estos se segregarán en forma independiente. No se presentarán diferencias en cuanto a la frecuencia alélicas del marcador en los familiares afectados y no afectados. Sin embargo, si el marcador se encuentra muy cerca del gen causal, el marcador y la enfermedad se heredarán juntos (ligados) en la familia. Cuanto más cerca se encuentre el marcador genético del gen causal del fenotipo, menor es la probabilidad de que sean separados durante el proceso meiótico.

Se ha estimado el parámetro θ (theta) denominado fracción de recombinación, que determina la probabilidad de recombinación entre 2 *loci* y va de 0 a 0.5. Cuando θ es cercano a 0 significa que los *loci* son muy cercanos (no hay prácticamente recombinación entre ellos) y cuando θ es cercano a 0.5 significa que los *loci* se heredan juntos en el 50% de los casos y separados en el 50% restante (tercera ley de Mendel de segregación independiente). De esta forma, la recombinación está en función de la distancia, aunque no es una función lineal simple. La fracción de recombinación depende: (a) del segmento del cromosoma donde se encuentran los *loci* y (b) del sexo del individuo. Generalmente, la recombinación es mayor en mujeres que en hombres.⁹

El método estadístico tradicional para determinar ligamiento (puntaje lod) fue desarrollado por Newton Morton en 1955 y permite estimar el ligamiento entre *loci*, así como la fracción de recombinación entre estos. En un análisis de ligamiento, la hipótesis nula es que los *loci* no están ligados, es decir que los genes están muy separados dentro del mismo cromosoma o bien que se encuentran en cromosomas distintos ($\theta = 1/2$). La hipótesis alternativa es que los *loci* están genéticamente ligados ($\theta < 1/2$).

Para una familia dada, el puntaje lod para un valor candidato de θ se define como el logaritmo decimal de la razón de estas dos posibilidades, de la siguiente manera¹⁰:

$$Z = \log_{10} \frac{P(F/\theta)}{P(F/\theta = 1/2)}$$

Se acepta que hay ligamiento cuando este valor Z es mayor o igual a 3 para enfermedades mendelianas y 3.6 para enfermedades de herencia compleja.

Los estudios de ligamiento continúan siendo importantes herramientas para la localización e identificación de genes causales de enfermedades. Sin embargo, debido a que es un método paramétrico, su aplicación en la identificación de genes de susceptibilidad a enfermedades complejas se dificulta. Algunos parámetros que se deben definir en un estudio de ligamiento son forma de herencia (y en las enfermedades complejas la forma de herencia es desconocida por definición), frecuencia poblacional y penetrancia del gen. Si se especifican parámetros falsos, como la frecuencia alélica poblacional o un patrón de herencia incorrecto, se pueden generar falsos negativos producto de una mala estimación de la fracción de recombinación. Otra desventaja de los estudios de ligamiento genético, incluso en el caso de enfermedades mendelianas, es que la ubicación del *locus* se realiza en un bloque de gran tamaño (en el orden de millones de pares de bases) que podría contener cientos de genes. Finalmente, genes de efecto menor podrían no ser detectados por ligamiento, sin importar cómo ha sido diseñado el estudio.^{10,11}

En algunas enfermedades complejas se han encontrado unas pocas familias que presentan variantes raras de herencia mendeliana. Una vez que se localiza e identifica el gen en estas familias mediante un análisis de ligamiento tradicional, se estudia que tan importante es este gen en las formas más comunes de la enfermedad.¹² Un caso típico es el de la migraña hemipléjica familiar, un subtipo raro de migraña con aura que presenta un patrón de herencia autosómico dominante. Por estudios de ligamiento, se determinó que al menos de 50% de las familias presentaban ligamiento con la región 19p13, en la que posteriormente se identificó el gen *CACNA1A*. Este gen codifica para un canal de calcio voltaje dependiente del tipo p/q relacionado con la descarga neuronal de neurotransmisores.

Ciertos estudios han reportado asociación del gen con tipos más comunes de migraña,^{13,14} pero no han podido replicarse en otras poblaciones.¹⁵⁻¹⁷

Otro ejemplo es la identificación de los genes *BRAC 1* y *BRAC 2* que se heredan en forma autosómica dominante, pero con una penetrancia incompleta. Esto quiere decir que no todas las mujeres que heredan una copia mutada del gen presentarán el cáncer, pero su riesgo sí es mucho mayor al de la población general y aumenta a medida que lo hace la edad de la mujer. Sin embargo, estos genes explican menos del 10% de los casos de cáncer de mama.^{18,19}

Estudio de las enfermedades complejas

Desde 1920 Alterburg y Muller demostraron cómo utilizar los instrumentos y conceptos mendelianos para la disección de rasgos de herencia compleja. No obstante, la mayoría de los genetistas se han dedicado a trabajar con características mendelianas en las que el análisis es menos

complejo. Hasta la fecha, la gran mayoría de las enfermedades genéticas de herencia mendeliana simple han sido descritas y gran parte de los genes mutados han sido exitosamente identificados y clonados.^{4,8}

Los genes de susceptibilidad para enfermedades complejas han sido muy difíciles de identificar.²⁰ En un análisis de 101 tamizajes completos del genoma para estudios de ligamiento de diferentes enfermedades complejas, solo un tercio del total de estudios encontraron regiones cromosómicas con valores relativamente significativos de ligamiento y solo unos pocos pudieron ser replicados en otras poblaciones.²¹ Algunas complicaciones en el mapeo de enfermedades de herencia compleja son²²:

(a) Fenocopias y penetrancia incompleta: En una enfermedad compleja, la presencia de un alelo de susceptibilidad en un *locus* determinado puede influir, pero no siempre determinar el desarrollo de la enfermedad, a diferencia de la mayoría de enfermedades mendelianas.

Se conoce como penetrancia incompleta si hay individuos que heredan alelos de susceptibilidad para una enfermedad, pero no la presentan. Por otra parte, si se describen individuos que presentan la enfermedad, a pesar de no ser portadores de los alelos de susceptibilidad, se les llama fenocopias.²³

Es decir, que los genes de susceptibilidad podrían estar presentes tanto en (a) personas sanas, que por penetrancia incompleta (por ausencia de uno o varios factores ambientales o genéticos adicionales necesarios) no desarrollaron la enfermedad, o bien, (b) podrían estar ausentes en ciertos individuos afectados en los que las causas genéticas no son las de la enfermedad (fenocopias).

Para evitar mezclar fenocopias con los casos de susceptibilidad genética, se ha propuesto utilizar solo aquellos probandos: en los que la enfermedad inicie a edades tempranas y en los que la enfermedad sea más severa (frecuencia de ataques o descompensaciones).

Estos requisitos pueden ser útiles en ciertos casos para identificar los “más genéticos”. Sin embargo, es importante tomar en consideración que tanto el inicio como la frecuencia y la severidad de la enfermedad podrían estar determinados por la sobreexposición del individuo a factores de riesgo ambiental para la enfermedad.

(b) Heterogeneidad genética y alelos de alta frecuencia

Un fenotipo idéntico puede ser el producto de mutaciones en distintos genes (heterogeneidad de *locus*) o diferentes mutaciones en el mismo gen (heterogeneidad alélica). Un ejemplo claro son las vías metabólicas, en las que la interrupción de alguno de los pasos podría causar fenotipos clínicamente indistinguibles. El síndrome de Zellweger presenta un patrón de herencia autosómico recesivo, caracterizado por el ensamblaje defectuoso de peroxisomas, y puede ser provocado por mutaciones en más de 10 loci

distintos.²⁴ Otros ejemplos de enfermedades con heterogeneidad genética de locus son el riñón poliústico, la displasia múltiple epifiseal,²⁵ el Alzheimer,²⁶ entre otras. En estos casos, debido a que no es posible distinguir los fenotipos causados por uno u otro gen, la localización de los *loci* mutados en una región cromosómica específica es difícil. Aunque los ejemplos que conocemos provienen principalmente de los estudios con enfermedades mendelianas (ya que en las complejas aún no conocemos muchos de los genes), la hipótesis de trabajo es que la heterogeneidad de *locus* va a ser mayor en las complejas por su mayor prevalencia en la población general.

Para disminuir la posibilidad de heterogeneidad genética, se ha propuesto el mapeo de enfermedades complejas en comunidades con cierto aislamiento genético, bajo la suposición de encontrar efectos de fundador.

Es importante diferenciar la heterogeneidad de *locus*, de la heterogeneidad alélica. Esta se refiere a la presencia de diferentes mutaciones causantes del fenotipo en el mismo gen. Un ejemplo es la fibrosis quística del páncreas, en la que se han encontrado más de 300 mutaciones en el gen que causan el mismo fenotipo.²⁷ A diferencia de la heterogeneidad genética, la heterogeneidad alélica generalmente no interfiere con los métodos paramétricos de mapeo genético.³

e) Definición de fenotipos

La definición del fenotipo para una enfermedad compleja es una tarea difícil, incluso en los miembros de una misma familia, por la expresión clínica variable de la enfermedad y edad de inicio distinta entre individuos.²² Para ello ha sido necesario desarrollar criterios diagnósticos estandarizados con el fin de determinar el estado fenotípico del paciente, como la cuarta edición del manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales, la clasificación internacional de enfermedades y la guía diagnóstica de la sociedad internacional de cefaleas.

Estos criterios han sido útiles en el estudio de enfermedades neuropsiquiátricas, en las que distinguir entre uno u otro fenotipo es muy difícil por la presencia de síndromes con síntomas comunes, además de que el diagnóstico se basa únicamente en la clínica. Además de facilitar el diagnóstico, estas guías han permitido comparar resultados entre poblaciones.

Estrategias no paramétricas para el análisis de características complejas

Por las dificultades mencionadas, métodos no paramétricos tales como análisis de hermandades y estudios de asociación, pueden ser una mejor opción para el mapeo de genes de susceptibilidad en las enfermedades complejas.

Análisis de hermandades

Los hermanos comparten en promedio el 50% del material genético. La probabilidad de que compartan dos

marcadores, uno o ninguno, es del 25%, el 50% y el 25%, respectivamente. Este tipo de análisis se basa en cuántos segmentos cromosómicos son compartidos por dos o más hermanos afectados.²⁸ Ciertos métodos permiten el uso de otros familiares, como primos, tíos, etc., que también presenten la enfermedad.

Este tipo de análisis pretende encontrar un marcador compartido por los afectados en una frecuencia mayor al 50% esperado por azar.

Estudios de asociación

El objetivo de un estudio de asociación es encontrar un marcador alélico sobrerrepresentado en una muestra de pacientes en relación con una muestra control (casos y controles). Para determinar si el marcador está asociado con la enfermedad, es necesario comparar las frecuencias del marcador con un grupo control.

A diferencia de los métodos paramétricos, en los estudios de asociación: (a) no es necesario conocer la forma de herencia, (b) se pretende identificar variantes particulares asociadas al fenotipo en el nivel poblacional y no exclusivamente para una familia, (c) se sabe que se pueden utilizar aún cuando la penetrancia de la enfermedad sea desconocida.^{29,30} Sin embargo, los estudios de asociación permiten identificar posteriormente el gen de susceptibilidad solo cuando está en desequilibrio de ligamiento con el marcador, y además esta mutación es compartida por una porción considerable de la muestra de pacientes. Se ha sugerido que los estudios de asociación tienen un mejor desempeño en poblaciones con menos heterogeneidad genética, como aislados genéticos, por la posibilidad de tener un evento de fundador. Además, si la población es de origen reciente, los bloques genómicos compartidos debieran ser de mayor tamaño y así se podría encontrar una asociación, utilizando un número menor de marcadores genéticos.

Una de las mayores dificultades al elaborar los estudios de asociación, ha sido encontrar un grupo control adecuado. Para un estudio genético, lo más importante es que los controles sean del mismo *pool* genético. Una estrategia alterna es reclutar tríos (sujeto afectado con sus dos padres) y utilizar la información genotípica del cromosoma no transmitido de los padres como control. Esto reduce la posibilidad de encontrar falsos positivos por estratificación poblacional, además de que facilita la obtención de la muestra.³

Cuando se encuentra ligamiento con un estudio familiar o de hermandades, o asociación mediante un estudio poblacional, se inicia la fase de mapeo fino. Se satura la región con más marcadores genéticos y se analiza si los resultados siguen siendo positivos. Si es así, se identifican los posibles genes candidatos en la región, para su secuenciación y análisis.

Desequilibrio de ligamiento

Eventos demográficos como las migraciones o simples cambios en el tamaño de la población, tienen un impacto en

la estructura genómica de estas poblaciones³¹, no solamente en el cambio de las frecuencias génicas, sino también en la estructura, distribución y extensión de las regiones que se encuentran en desequilibrio de ligamiento.³²

El desequilibrio de ligamiento se refiere específicamente a una asociación no al azar entre estos marcadores alélicos heredados. La extensión de estas regiones cromosómicas en desequilibrio de ligamiento disminuye en cada generación, producto de recombinación y conversión génica, además de la historia poblacional de la muestra por analizar.⁹

Los aislados genéticos han permitido identificar genes causales de enfermedades monogénicas. Tal es el caso de Finlandia, en donde muchos de estos trastornos tiene una incidencia mayor y han facilitado el mapeo de enfermedades recesivas raras. El concepto de “población aislada” o aislado genético es meramente práctico. En algún momento, todas las poblaciones están conectadas, ya sea por subdivisión poblacional o algún grado de entrecruzamiento activo con miembros de poblaciones vecinas.³³

Escamilla propone que “una población aislada es aquella en la que sus miembros no han tenido un alto grado de entrecruzamiento (encuentros sexuales con producción de hijos) con poblaciones vecinas, producto de barreras geográficas o sociopolíticas en un lapso de tiempo determinado”. Se ha propuesto que estas poblaciones podrían presentar menos heterogeneidad genética y ambiental, debido a una forma de vida más homogénea, que en poblaciones con mayor mezcla racial.²⁸

Se han llevado a cabo estudios para determinar la distribución de regiones en desequilibrio de ligamiento del genoma humano. Los aislados genéticos muy antiguos (>100 generaciones) no presentan gran ventaja al compararlos con poblaciones muy heterogéneas.²² Pero, en aislados muy jóvenes (<20 generaciones) como el caso de la población del Valle Central de Costa Rica, Cerdeña y Antioquia (Colombia), estas regiones en desequilibrio de ligamiento se extienden por distancias genéticas considerables (más de 1 cM).³⁴⁻³⁵

Con base en estas características y sumado a la disponibilidad actual de múltiples marcadores genéticos, se considera que el mapeo de todo el genoma, mediante la estrategia de desequilibrio de ligamiento es suficientemente robusta para localizar genes de susceptibilidad en enfermedades complejas³⁶ y no solo para restringir la localización de cierto locus, como inicialmente se había sugerido.^{32, 34}

Pasos siguientes

Una vez identificada la región o el *locus* que contiene un gen causal o de susceptibilidad para una enfermedad, se estudian los genes contenidos en esta región. Con los mapas e información generados en el Proyecto del Genoma Humano, este paso es relativamente sencillo. Sin embargo, identificar cuál de los genes es el causante y cuál de los polimorfismos o mutaciones encontradas en ese gen son los

funcionales, es aun una difícil tarea. Se han propuesto algoritmos para priorizar cuales genes estudiar primero. Algunos criterios son los estudios de expresión en el tejido enfermo, conservación de las secuencias a través de la evolución y estudios funcionales en animales genéticamente modificados.

El mapeo genético de enfermedades complejas ha sido más frustrante de lo que se pensaba. Uno de los mayores retos que enfrentan los investigadores en biomedicina es la identificación de genes de susceptibilidad para enfermedades complejas, así como la determinación de las vías mediante las que interactúan los múltiples productos génicos con los factores ambientales, para la expresión de fenotipos complejos.

Identificar genes de susceptibilidad genética en enfermedades complejas incrementará el uso rutinario de análisis genotípicos con fines diagnósticos y terapéuticos. Esto podría permitir el desarrollo de estrategias preventivas más eficaces, identificando individuos genéticamente susceptibles al padecimiento de una enfermedad, antes de que se comiencen a presentar los síntomas, así como el desarrollo de técnicas como la terapia génica.³⁷⁻³⁹

Referencias

- Kiberstis P, Roberts L. The puzzle of complex diseases. *Science* 2002; 296: 685-703.
- Zlotogora J. Recessive or dominant? Reclassification in the molecular age. *Clin Genet* 1998; 53: 423-425.
- Lander E, Schork N. Genetic dissection of complex traits. *Science* 1994; 265: 2037-2048.
- Zwick M, Cutler D, Chakravarti C. Patterns of genetic variation in Mendelian and complex traits. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2000; 1:387-407.
- Spector T, Mac Gregor A, Snieder H. Uses of twins in studying the genetics of complex traits. *Gene Screen* 2000; 1: 93-95.
- Boomsma D, Busjahn A, Peltonen L. Classical twin studies and beyond. *Nat Genet* 2002; 3: 872-892.
- Prichard J. Are rare variants responsible for susceptibility to complex diseases? *Am J Hum Genet* 2001; 69: 124-137.
- Conneally M. The complexity of complex diseases. *Am J Hum Genet* 2003; 72:228-232.
- Reich D, Schaffner S, Daly M, McVean G, Mullikin J, Higgins J. Human genome sequence variation and the influence of gene history, mutation and recombination. *Nat Genet* 2002; 32: 135-142.
- Clerget-Darpoux F. Overview of strategies for complex genetic diseases. *Kidney Int* 1998; 53: 1441-1445.
- Rao D. Genetic dissection of complex traits: An overview. *Genetic dissection of complex traits advances. Adv Genet* 2001; 42:13-34.
- Kors E, Van den Maagdenberg A, Plomp J, Frants R, Ferrari M. Calcium channel mutations and migraine. *Curr Opin Neurol* 2002; 15: 311-316.
- May A, Ophoff R, Terwindt G, Urban C, Van Eijk R, Haan J. Familial hemiplegic migraine locus on 19p13 is involved in the common forms of migraine with and without aura. *Hum Genet* 1995; 96: 604-608.
- Nyholt D, Lea R, Goadsby P, Brimage P, Griffiths L. Familial typical migraine: linkage to chromosome 19p13 and evidence for genetic heterogeneity. *Neurology* 1998; 50:1428-1432.
- Hovatta I, Kallela M, Farkkila M, Peltonen L. Familial migraine: exclusion of the susceptibility gene from the reported locus of familial hemiplegic migraine on 19p. *Genomics* 1994; 23: 707-709.
- Monari L, Mochi M, Valentino M, Arnaldi C, Cortelli P, De Monte A. et al. Searching for migraine genes: exclusion of 290 cM out of the whole human genome. *Ital J Neurol Sci* 1997; 18:277-282.
- Kim J, Yue Q, Jen J, Nelson S, Baloh R. Familial migraine with vertigo: no mutations found in CACNA1A. *Am J Med Genet* 1998; 79:148-151.
- Schrag D, Kuntz K, Garber J, Weeks J. Decision analysis--effects of prophylactic mastectomy and oophorectomy on life expectancy among women with BRCA1 or BRCA2 mutations. *N Engl J Med* 1997; 337:434.
- Healy B. . BRCA genes--bookmaking, fortunetelling, and medical care. *N Engl J Med* 1997; 336: 1448-1449.
- Schlielkelman P, Slatkin M. Multiplex relative risk and estimation of the number of loci underlying an inherited disease. *Am J of Hum Genet* 2002; 71:1369-1385.
- Altmuller J, Palmer L, Fischer G, Scherb H, Wjst M. Genomewide scans of complex human diseases: true linkage is hard to find. *Am J Hum Genet* 2001; 69:936-950.
- Heutink P, Oostra B. Gene finding in genetically isolated populations. *Hum Molec Genet* 2002; 11: 2507-2515.
- Fugazzola L, Cerutti N, Mannavola D, Ghilardi G, Alberti L, Romoli R. et al. Multigenerational familial medullary thyroid cancer (FMTC): evidence for FMTC phenocopies and association with papillary thyroid cancer. *Clinical Endocrinology* 2002; 56: 53-56.
- Honsho M, Tamura S, Shimozawa N, Suzuki Y, Kondo N, Fujiki, Y. Mutation in PEX16 is causal in the peroxisome-deficient Zellweger Syndrome of complementation group D. *Am J Hum Genet* 1998; 63:1622-1630.
- Czarny-Ratajczak M, Lohiniva J, Rogala P, Kozlowski K, Carter L, Spector, T. et al. A Mutation in COL9A1 causes multiple epiphyseal dysplasia: further evidence for locus heterogeneity *Am J Hum Genet* 2001; 69:969-980.
- Daw E, Payami H, Nemens E, Nochlin D, Bird T, Schellenberg G. The Number of trait loci in late-onset alzheimer disease. *Am J Hum Genet* 2000; 66:196-204.
- Risch N, Merikangas K. The future of genetic studies of complex human diseases. *Science* 1996; 273: 1516- 1517.
- Escamilla M. Population isolates: their special value for locating genes for bipolar disorder. *Bipolar Disord* 2001; 3: 299-317.
- Knapp M. A note on power approximations for the transmission-disequilibrium test. *Am J Hum Genet* 1999; 64:1177-1185.
- Schulze T, McMahon F. Genetic association mapping at the crossroads: which test and why? Overview and practical guidelines. *Am J Med Genet* 2002; 114: 1-11.
- Pritchard J, Przeworski M. Linkage disequilibrium in humans: models and data. *Am J Hum Genet* 2001; 69:1-14.
- Service S, Ophoff R, Freimer N. The genome-wide distribution of background linkage disequilibrium in a population isolate. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 545-51.
- Peltonen L, Palotie A, Lange, K. Use of population isolates for mapping complex traits. *Nat Rev Genet* 2000; 1:182-90.
- Carvajal-Carmona L, Ophoff R, Service S, Hartiala J, Molina J, Leon P. et al. Genetic demography of Antioquia (Colombia) and the Central Valley of Costa Rica. *Hum Genet* 2003; 112:534-41.
- Mathews C, Reus V, Bejarano J, Escamilla M, Fournier E, Herrera, L. et al. Genetic studies of neuropsychiatric disorders in Costa Rica: a model for the use of isolated populations. *Psychiatr Genet* 2004; 14:13-23.
- Escamilla M, Spesny M, Reus V, Gallegos A, Molina J, et al. Use of linkage disequilibrium approaches to map genes for bipolar disorder in the Costa Rican population. *Am J Med Genet* 1996; 67:244-53.
- Beaudet A. Making genomic medicine a reality. *Am J Hum Genet* 1999; 64:1-13.
- Evans J, Skrzynia C, Burke W. The complexities of predictive genetic testing; *BMJ* 2001; 322:1052-1056.
- Martin E, Lai E, Gilbert J, Rogala A, Afshari A, Riley J. et al. SNPing away at Complex Diseases: Analysis of Single-Nucleotide Polymorphisms around APOE in Alzheimer Disease *Am. J. Hum. Genet* 2000; 67:383-394.