

# La genómica al servicio de la pediatría en el estudio de la enfermedad multifactorial

A. Salas<sup>1,2</sup>, S. Marcos-Alonso<sup>3,6</sup>, A. Vega<sup>2,4</sup>, L. Fachal<sup>1,2</sup>, F. Martinón-Torres<sup>5,6</sup>; Grupo de Investigación ESIGEM\*

<sup>1</sup>Unidade de Xenética. Departamento de Anatomía Patolóxica e Ciencias Forenses. Instituto de Medicina Legal. Facultade de Medicina. Universidade de Santiago de Compostela. <sup>2</sup>Grupo de Medicina Xenómica. Hospital Clínico Universitario. Santiago de Compostela. <sup>3</sup>Servicio de Pediatría. Hospital Universitario de A Coruña. <sup>4</sup>Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica. SERGAS. Hospital Clínico Universitario. Santiago de Compostela. <sup>5</sup>Servicio de Críticos, Intermedios y Urgencias Pediátricas. Hospital Clínico Universitario. Santiago de Compostela. <sup>6</sup>Grupo Gallego de Genética, Vacunas e Investigación Pediátricas. Instituto de Investigaciones Sanitarias de Compostela \*El Grupo ESIGEM (Estudio Sobre la Influencia Genética en la Enfermedad Meningocócica-[www.esigem.org](http://www.esigem.org)) es un grupo multicéntrico peninsular de trabajo e investigación, integrado por los siguientes miembros: J.M. Martinón Sánchez, Á Carracedo, B. Mosquera Pérez, F. Pardo Sánchez, N. Martinón-Torres y N. García Sánchez (Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela); J.M. Sánchez Granados (Hospital Universitario de Salamanca); M. Silveira Cancela (Hospital da Costa de Burela); J.L. García Rodríguez y S. Rey García (Complejo Hospitalario de Ourense); C. Calvo Monge (Hospital de Donostia); V. Pineda Solas (Hospital «Parc Taulí» de Sabadell); C. Pérez Caballero Macarrón (Hospital «Ramón y Cajal» de Madrid); J.A. Alonso Martín y D. Arjona Villanueva (Hospital «Virgen de la Salud» de Toledo); P. Azcón González de Aguilar (Hospital «Virgen de las Nieves» de Granada); X. Allué Martínez (Hospital «Juan XXIII» de Tarragona); A. Concha Torre (Hospital Universitario Central de Asturias); J.L. Ruibal Francisco (Hospital Clínico «San Carlos» de Madrid); M. González-Ripoll Garzón y F. Giménez Sánchez (Hospital Torrecárdenas de Almería); A. Reparaz Romero y M. Ortiz Pallares (Complejo Hospitalario Universitario de Vigo); M.L. Millán Millares y M.C. Martínez Padilla (Complejo Hospitalario de Jaén); R. Gómez Zafra (Hospital «La Fe» de Valencia); Á. Castellanos Ortega (Hospital «Marqués de Valdecillas» de Santander); J. Casado Flores (Hospital «Niño Jesús» de Madrid); Á. Ferrer Barba y A. Hurtado Doce (Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña), A. Bustinza Arriortua y M.L. Navarro Gómez (Hospital «Gregorio Marañón» de Madrid); E. Esteban Torné (Hospital «Sant Joan de Déu» de Barcelona); S. Cañadas Palazón (Hospital «Vall d'Hebron» de Barcelona); E. Morteruel Arizkuren y J. López Bayón (Hospital de Cruces de Bilbao); S. Martínez Regueira (Hospital Xeral Calde de Lugo); M.T. Alonso Salas (Hospital «Virgen del Rocío» de Sevilla); M.M. Ballesteros García (Hospital Universitario de Albacete); J.I. Muñoz Bonet (Hospital Clínico Universitario de Valencia); S. Pantoja Rosso (Hospital «Puerta del Mar» de Cádiz); E. Bernaola Iturbe y C. Goñi Orayen (Hospital «Virgen del Camino» de Navarra); F. Alvarado Ortega (Hospital «La Paz» de Madrid); N. Molini Menchón (Hospital «Rey Don Jaime» de Castellón); E. Ocete Hita (Hospital «San Cecilio» de Granada); M. Sánchez Fernández (Hospital «Josep Trueta» de Girona); I. Quintela Fernández (Hospital «Virxe da Xunqueira», Cee, A Coruña); R. López Peña (Hospital «9 de Octubre» de Valencia); A. Mosquera-Miguel y M. Fondevila (Facultade de Medicina, Universidade de Santiago de Compostela)

## Resumen

En estos últimos años hemos asistido al enorme desarrollo de la genómica y sus aplicaciones en diversos campos de la biomedicina. Esto ha sido en gran parte posible gracias al gran empuje tecnológico que han experimentado las nuevas técnicas de genotipado y de ultrasecuenciación. Sin duda, el estudio de la enfermedad compleja ha sido uno de los grandes beneficiados de este gran desarrollo. Asimismo, existen muchas enfermedades pediátricas que pueden abordarse siguiendo las estrategias que, hoy por hoy, se emplean en la genómica de la enfermedad multifactorial. Esta revisión pretende acercar a la pediatría las posibilidades que ofrece la genómica de hoy en día en este campo. Para ello, se discuten los distintos modelos de estudios, así como los problemas que a menudo surgen cuando los diseños experimentales son deficientes.

## Palabras clave

Estudios de asociación, pediatría, enfermedad compleja, polimorfismo genético, polimorfismo de nucleótido simple (SNP), ADN mitocondrial

## Abstract

*Title:* The genomics serving pediatrics in the investigation of the multifactorial disease

The last few years have experienced an important growth of genomics and its different applications in biomedicine. In part, this has been possible due to the sudden development of the new genotyping technology and ultra-sequencing. The study of the genetic basis of the complex disease has been the main beneficiary of such technological development. There are a good number of pediatric diseases that can be approached following the same strategies employed in the genomic study of the multi-factorial disease. Thus, the present article aims to review the different applications of genomics to Pediatrics as well as to discuss the different strategies available and the preventions needed to avoid false positive associations.

## Keywords

Association studies, pediatrics, complex disease, genetic polymorphism, single nucleotide polymorphism (SNP), mitochondrial DNA

*“... But the link between historical genetic demography and medically important risk is complex. Disease susceptibility may be genetic but not geographically clustered, or geographically clustered but not genetic, or neither, or both.”*

Mary-Claire King, Arno G. Motulsky (*Science*. 2002)

En las últimas décadas, la genética y los estudios de asociación han contribuido significativamente al avance del conocimiento de la fisiopatología de múltiples enfermedades y, de forma particular, también dentro del campo de la pediatría. Esto ha supuesto una revolución en las estrategias de investigación, un desafío en el desarrollo de nuevas terapias, pero también exige una adaptación y una actualización por parte del pediatra que quiere conocer los pros y los contras de estas nuevas metodologías e integrarlas en su trabajo cotidiano o de investigación. En este artículo se revisan y discuten las bases conceptuales necesarias para la utilización y la interpretación de estas nuevas herramientas aplicadas a la pediatría.

El término de «enfermedad compleja» se aplica a las patologías de causa multifactorial, es decir, aquellas en cuyo origen interaccionan factores ambientales y factores genéticos. Algunos ejemplos de este tipo de enfermedades complejas, muchas de ellas de gran importancia en la infancia, son: diabetes mellitus, algunos tipos de cáncer, enfermedades infecciosas (enfermedad neumocócica, enfermedad meningocócica), enfermedad de Crohn, enfermedad celiaca, obesidad, trastorno por déficit de atención e hiperactividad, etc. El conocimiento de los genes implicados en el desarrollo de estas enfermedades nos permite predecir el riesgo, la susceptibilidad, el pronóstico o la resistencia a desarrollarlas.

¿Cuándo se sabe que una enfermedad multifactorial tiene un fondo genético? Una enfermedad compleja tiene un fondo genético cuando existe una agregación familiar, es decir, cuando ocurre con mayor incidencia dentro del ámbito familiar que lo que cabría esperar por azar entre individuos no relacionados en la población general.

Tras la secuenciación del genoma humano, el estudio y la comparación entre las pequeñas variaciones genéticas existentes entre individuos, conocidas como SNP (*single nucleotide polymorphisms* [polimorfismos de nucleótido simple]), ha supuesto un gran avance en el conocimiento de las causas genéticas de algunas enfermedades. El número de SNP identificados se ha visto enormemente incrementado en estos últimos años gracias al esfuerzo internacional en proyectos de genotipado masivo, como el HapMap (<http://www.hapmap.org/>).

El ser portador de una o varias de estas variantes podría crear cierta susceptibilidad genética a presentar una enfermedad, ya sea porque dicha variante altera algún proceso funcional relacionado con la regulación genética del gen (su expresión) o simplemente porque altera el funcionamiento de la proteína o proteínas que son codificadas por los genes involucrados. Por ejemplo, una variante genética podría provocar algún cambio conformacional en la proteína y afectar a su función.

En ocasiones, los SNP que estamos analizando (SNP marcadores) no son los verdaderos causantes de la enfermedad, sino que éstos se encuentran cercanos en el genoma a los verdaderos SNP que directamente causan, o predisponen a presentar, la enfermedad (SNP causales). Cuando los SNP causales se coheredan con los SNP marcadores, se dice que estos SNP están en desequilibrio de ligamiento (*linkage disequilibrium* [LD]).

Por tanto, en ocasiones, el SNP marcador nos puede proporcionar información sobre un SNP causal cercano, aunque este último no sea genotipificado directamente. Las variantes genéticas que se coheredan (tienden a transmitirse como un «bloque» a la descendencia) se denominan «haplotipos».

## Los estudios de asociación

Los estudios de asociación genética intentan responder a la pregunta siguiente: ¿qué papel desempeña el componente genético de los individuos en el desarrollo, la forma de presentación y el pronóstico de las enfermedades?

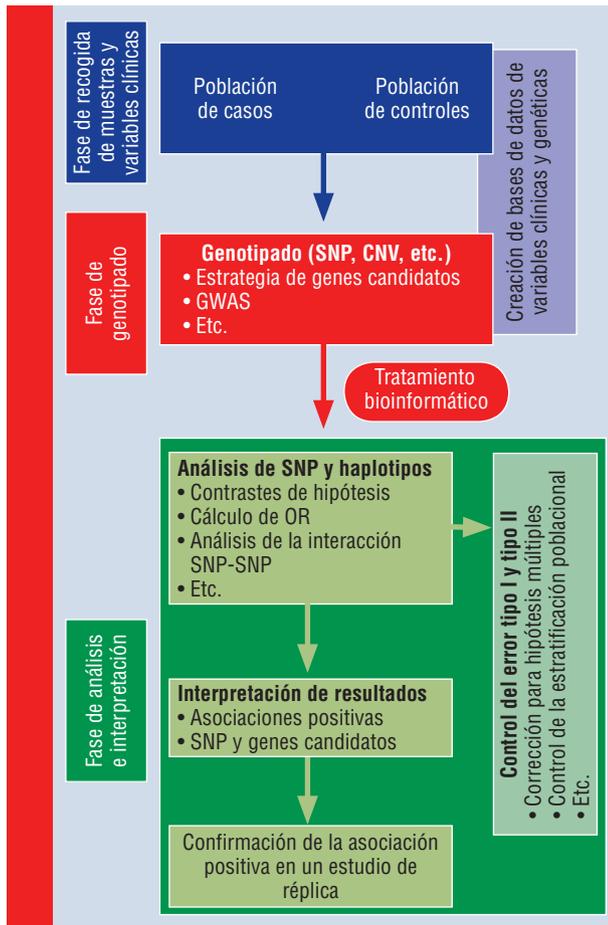
Los estudios de asociación de casos y controles son conceptualmente sencillos: las variantes genéticas de riesgo tenderán a presentarse con mayor frecuencia en una muestra de casos (individuos afectados) que en una muestra de controles (individuos sanos). Lo contrario ocurriría para una variante genética protectora. Existen varios pasos que se deben seguir a la hora de diseñar un estudio de asociación de casos y controles (figura 1):

- Recogida de un número suficiente de casos y controles que permita detectar la presunta asociación de la variante genética que estamos analizando con la enfermedad.
- Selección de las variantes genéticas (SNP) que van a ser analizadas.
- Genotipado de los SNP.
- Análisis estadístico de los resultados con el fin de valorar si las variantes genéticas estudiadas están o no relacionadas con la enfermedad o algún aspecto de su evolución.

## Recogida de muestras

Aunque conceptualmente sencillos, los estudios de asociación basados en poblaciones no están exentos de dificultades, algunas de las cuales se comentan brevemente a continuación.

Si los casos y los controles no están bien recogidos y el número de ellos no es el adecuado, tendremos que enfrentarnos a serios problemas de interpretación. Por ejemplo, los casos y controles deben pertenecer al mismo grupo poblacional ya que, de no ser así, es posible que determinadas variantes genéticas aparezcan como factores de riesgo cuando en realidad no tienen que ver con la enfermedad (falsos positivos), sino con las características propias de la población. Por otro lado, la probabilidad de determinar con éxito una relación causal entre una variante genética y una enfermedad depende en gran medida



**Figura 1.** Un estudio de asociación comienza con la recolección de las muestras de individuos afectados (casos) e individuos sanos (controles) (fase 1). Posteriormente, las muestras se genotifican para distintos marcadores genéticos; el investigador debe decidir la estrategia que cabe seguir, que en parte vendrá determinada por el modelo de patología y el presupuesto para el genotipado. Por ejemplo, se puede llevar a cabo un diseño basado en genes candidatos o, si el presupuesto es lo suficientemente grande, el investigador puede decantarse por una estrategia de búsqueda (cribado) genómica de marcadores genéticos (SNP, CNV, etc.) a lo largo de todo el genoma (fase 2). Todo ello requiere la creación de bases de datos perfectamente diseñadas y un desarrollo informático adecuado para el manejo de todos estos datos que, en ocasiones, podría implicar cientos de millones de genotipos. Una vez se han obtenido los resultados, interesa saber si las diferencias que se detectan en el grupo de casos con respecto al grupo control son estadísticamente significativas (usando por ejemplo un test de contraste de hipótesis), o conocer el riesgo que implica ser portador de una determinada variante (fase 3). Los estudios de interacción entre variantes genéticas (SNP-SNP), o de éstas con variables ambientales o clínicas, plantean grandes retos en cuanto al análisis estadístico, debido a la enorme dimensión que genera todo el universo posible de comparaciones (análisis) apareadas (combinaciones), lo que técnicamente se conoce como the curse of dimensionality. El resultado final de los análisis genómicos en un estudio de asociación está relacionado generalmente con la detección de uno o varios SNP (o la interacción entre ellos) asociados a la patología o con alguna de las variables clinicopatológicas recogidas en el estudio. Idealmente, dicha asociación debe replicarse en un estudio independiente usando otra muestra de casos. En muchas ocasiones, la asociación positiva detectada se debe a la presencia de algún artefacto relacionado con el diseño o el análisis estadístico (error tipo I), o simplemente a que la potencia de nuestro estudio no es lo suficientemente grande (p. ej., tamaño muestral pequeño) como para detectar la asociación (error tipo II); así, para reducir al mínimo la posibilidad de que surjan estos problemas, existen determinadas variables que se deberían controlar en un estudio de asociación, como las correcciones adecuadas para hipótesis múltiples o el control de estratificación poblacional, etc.

del tamaño muestral: si la presunta asociación genética es débil, para poder identificarla necesitaremos tamaños muestrales más grandes (del orden de varios cientos o miles de casos y controles).

No sólo es el tamaño muestral lo que determina la capacidad de nuestro estudio para detectar la asociación; de hecho, hay otros muchos parámetros que deberían tenerse en cuenta, como la frecuencia de la variante genética en el grupo poblacional. Por ejemplo, un estudio será más sensible (tendrá más «potencia» para detectar la asociación) cuanto más frecuente sea la variante genética de interés.

La selección de las variables clínicas de la enfermedad que se deben recoger en un estudio de casos y controles es importante, ya que se podría encontrar una asociación entre una variante genética y un aspecto concreto del comportamiento y la evolución de la enfermedad (p. ej., en el caso de la enfermedad meningocócica, una variante genética podría explicar el riesgo de ser infectado por un serogrupo concreto u otro).

## Selección de SNP y genotipado

Existen varias maneras de abordar el estudio genético de una enfermedad. En el caso más sencillo, el investigador, usando sus casos y controles, puede desear replicar una asociación previamente descrita en la bibliografía de un SNP concreto. Esto sucede a menudo en los estudios de asociación, ya que existen muchos factores (algunos de ellos mencionados previamente) que generan falsos positivos de asociación.

El investigador podría plantearse la hipótesis de que algún grupo de genes pueda estar relacionado con una determinada patología (genes candidatos). Para estudiar la presunta asociación de estos genes con la enfermedad, se deberán seleccionar las variantes genéticas (SNP) dentro de estos genes para posteriormente ser genotipificadas en su muestra de casos y controles (e.j. <sup>1</sup>). Además de HapMap, existen otras muchas fuentes de información (bases de datos públicas accesibles por cualquier investigador en Internet), así como herramientas bioinformáticas para seleccionar los SNP de interés.

En el estudio genético de la enfermedad compleja, existe otra alternativa cada vez más demandada en la comunidad científica. Se trata del «barrido genómico», técnica hoy en día más conocida como *genome-wide association studies* (GWAS). En este tipo de estudio no existe una hipótesis preconcebida (como es el caso del «gen candidato»), sino que se trata de estudiar muchos miles de SNP distribuidos a lo largo de todo el genoma en busca de algún gen que pudiera estar asociado a la patología. Actualmente, hay un gran número de compañías que comercializan este tipo de análisis de genotipado, lo cual facilita la labor del investigador. La gran desventaja de estos estudios es su alto coste; además, el análisis de los datos de un GWAS presenta importantes retos desde el punto de vista estadístico y de interpretación de resultados.

Por otro lado, un proyecto de asociación mínimamente ambicioso requiere un gran esfuerzo de genotipado. Por ejemplo, genotipificar tan sólo 100 SNP en 400 casos y 400 controles supone realizar en total 80.000 genotipos. Afortunadamente, hoy en día existen métodos y «plataformas» de genotipado que permiten obtener miles de genotipos en pocos días a un precio razonable, lo que hace cada vez más accesible este proceso a un mayor número de investigadores y laboratorios. Dependiendo del número total de genotipos y muestras para la genotipación, se puede determinar cuál es la plataforma más adecuada.

## Tratamiento estadístico e interpretación de los resultados en los estudios de asociación

Un hecho contrastado es que, a pesar de los muchos esfuerzos de genotipado, son muy pocas las variantes polimórficas de riesgo que se han podido replicar en estudios independientes. Son muchos los motivos por los que un estudio de asociación no se replica<sup>1</sup>. A continuación, se describen los aspectos más conflictivos a la hora de interpretar un estudio de asociación.

### Estratificación poblacional

La estratificación poblacional es probablemente el mayor problema al que se enfrentan los estudios de asociación. Se ha mencionado anteriormente la necesidad de que los casos y los controles sean recogidos en el mismo grupo poblacional. La estratificación poblacional se refiere a la existencia de grupos poblacionales con distintas características genéticas que presente a la muestra de casos y de controles. Cuando se lleva a cabo el análisis estadístico de los datos, a menudo estas diferencias poblacionales entre casos y controles aparecen como asociadas a la enfermedad, sin tener ninguna relación con la patología, dando lugar a falsos positivos de asociación. Por ejemplo, imaginemos un caso extremo en que el grupo de casos se recoge en la población A (p. ej., población europea), y el grupo de controles se recoge en la población B (p. ej., población asiática). Debido a que estas dos poblaciones han tenido distinta historia demográfica, algunos de los SNP analizados en nuestro estudio podrían tener distintas frecuencias en las

poblaciones A y B. Cuando se hace el estudio de asociación entre casos y controles, dichas variantes aparecen estadísticamente asociadas con la enfermedad, cuando en realidad estos SNP no están relacionados con ella. Esto es, la variante genética aparece sobrerrepresentada en los casos con respecto a los controles, porque esta variante es más frecuente en la población A que en la población B, y no porque esté asociada con la enfermedad.

Una de las mejores maneras de prevenir la estratificación poblacional es recoger los casos y los controles sobre una población genéticamente «homogénea». Sin embargo, es muy difícil determinar hasta qué punto una población es lo suficientemente homogénea como para evitar el efecto negativo de la estratificación poblacional. De hecho, puede haber estratificación dentro de, por ejemplo, la población española, incluso dentro de regiones en el mismo país. Por dicho motivo se han desarrollado diversos métodos para detectar y hacer un seguimiento de este problema<sup>2-4</sup>.

### Errores de genotipado

Las técnicas de genotipado y los procesos de manejo de datos no están exentos de posibles errores<sup>5</sup>. Supongamos un caso relativamente habitual, en que se establezca el genotipo de los pacientes en un laboratorio y los controles en otro. En un caso extremo, podría suceder que en un laboratorio se genotipifique erróneamente un SNP, dando lugar a una variante genética sobrerrepresentada en uno de los dos grupos (casos o controles), lo que automáticamente generaría una asociación estadística espuria. El efecto de los errores de genotipado es bastante común en los estudios de asociación<sup>6,7</sup>.

### Correcciones estadísticas para hipótesis múltiples

Cuando se desea saber si un SNP está o no asociado a una enfermedad, es común llevar a cabo un contraste de hipótesis basado, por ejemplo, en una prueba de ji al cuadrado. Cuando se obtienen un valor de significancia (p) por debajo de un umbral preestablecido (generalmente,  $\alpha=0,05$ ), se asume que hay evidencias de que ese SNP está asociado a la enfermedad. El problema es que, cuando se estudian varios SNP, la probabilidad de que alguno de ellos aparezca como «estadísticamente» asociado al azar se incrementa; como promedio, uno de cada 20 SNP estudiados aparecerá como estadísticamente asociado solamente por azar con un valor  $\alpha=0,05$ .

La realidad es que los valores de significación detectados en los estudios de asociación no siempre se corrigen para el número de contrastes de hipótesis realizados (p. ej., número de SNP genotipificados y/o número de variables clinicopatológicas analizadas, etc.). A menudo un investigador analiza varios cientos de SNP, pero el valor de significación que mantiene en su estudio sigue siendo de 0,05, cuando en realidad dicho umbral debería ajustarse en función del número total de hipótesis planteadas. Esto hace que el investigador determine erróneamente que todos los SNP con valores por debajo de este umbral preestablecido de 0,05 estén asociados a la enfermedad.

Existen varios métodos para ajustar los umbrales de significación y corregir el efecto de las hipótesis múltiples. Uno de los métodos más utilizados en biomedicina es la corrección de Bonferroni, si bien hoy en día existen otros muchos métodos que podrían ser más apropiados en función de la naturaleza de los datos (p. ej., test de permutación, *bootstrapping*, etc.).

En resumen, entre los criterios razonables para declarar como verdadera la existencia de una asociación entre una variante genética y una enfermedad, habría que incluir los siguientes: a) debe haber garantías de que los resultados de asociación son genuinos y no están afectados por la estratificación poblacional; b) los valores de significación deben estar correctamente ajustados por test múltiple, y c) la asociación observada debe replicarse de manera consistente en otra muestra recogida de manera independiente (que represente al mismo grupo poblacional).

## Estudios de asociación en pediatría

Existe un interés creciente en el campo de la pediatría por los estudios de asociación de enfermedades multifactoriales. Dicho interés viene incentivado, en gran medida, por las facilidades cada vez mayores de genotipado en los hospitales y centros de investigación, el conocimiento cada vez más exhaustivo del genoma humano y sus variantes genéticas, y la accesibilidad libre a las principales bases de datos genéticas. Actualmente ya se han publicado varios estudios de asociación genética en enfermedades importantes, dada su elevada prevalencia en la población infantil (otitis media, asma, diabetes mellitus tipo 1, celiaquía, etc.), y otras de especial interés por su alta mortalidad y/o morbilidad en este grupo de edad (enfermedad meningocócica, enfermedad neumocócica). La genética también puede contribuir a elucidar las causas que podrían estar involucradas en otras entidades de gran relevancia, como el síndrome de muerte súbita<sup>8</sup>. Finalmente, se sospecha que existen factores genéticos involucrados en otros aspectos de gran interés en pediatría, como la posibilidad de predecir problemas relacionados con los trasplantes de órganos en niños o de pronosticar su evolución a medio y largo plazo<sup>8</sup>.

Binder, et al.<sup>9</sup> han estudiado la presunta asociación de variantes genéticas localizadas en la región promotora (encargada de regular la función de uno o varios genes) del gen de la proteína C con la sepsis meningocócica. Entre otros hallazgos, estos autores defienden la presunta asociación de una variante genética con un mayor riesgo de infección meningocócica; los individuos afectados tienen además un riesgo incrementado de desarrollar sepsis. También en relación con la infección meningocócica, Bunker-Wiersma et al.<sup>10</sup> defienden que los portadores de una variante genética localizada en el receptor beta-1-adrenérgico tendrían un menor riesgo de mortalidad al ingreso. Nuestro grupo de investigación ESIGEM trabaja precisamente en estudios de asociación genética en la enfermedad meningocócica pediátrica. Recientemente identificamos una asociación estadística entre el riesgo de padecer dicha enfer-

medad y una variante localizada en el genoma mitocondrial; sin embargo, dicha asociación se demostró que en realidad era debida a un problema de estratificación poblacional<sup>11</sup>. Esto indicaría que el factor genético de riesgo podría estar localizado en otras partes del genoma, y no necesariamente en el genoma mitocondrial. La sobrerrepresentación de población inmigrante en la muestra de casos indicaría que este grupo poblacional presenta un factor genético de riesgo (pero no necesariamente mitocondrial) en relación con la población local que lo hace más susceptible a padecer la enfermedad. El grupo ESIGEM sigue trabajando intensamente en esta línea de investigación, así como en proyectos de genotipado a gran escala (GWAS, véase [www.esigem.org](http://www.esigem.org)).

En estos últimos años, la enfermedad de Kawasaki ha sido objeto de estudio en varios ensayos genéticos. Cheung et al.<sup>12</sup> han propuesto que determinados SNP localizados en el gen de la proteína C reactiva (*CRP*) y el gen del factor de necrosis tumoral (*TNF*) estarían relacionados con una mayor predisposición genética a presentar la enfermedad. Algunos estudios previos<sup>13,14</sup> ya habían sugerido la existencia de otros factores genéticos involucrados en la modulación de la susceptibilidad a padecer la enfermedad, así como en su pronóstico, su progresión y sus posibles complicaciones.

También recientemente, Velázquez-Cruz et al.<sup>15</sup> han propuesto que varios polimorfismos localizados en el gen 1 de la muerte celular programada (*PDCD1*) podrían estar involucrados en la presentación precoz del lupus eritematoso sistémico, cuyo pronóstico es peor en la población pediátrica que en los adultos.

Entre las enfermedades altamente prevalentes, el asma es una de las que ha suscitado un interés especial de los investigadores. En un editorial reciente, Nieto-García<sup>16</sup> hace una revisión sobre el estado actual de la investigación genética en el asma, así como de las dificultades que existen para entender el comportamiento de la enfermedad como resultado de su naturaleza multifactorial (poligénica y ambiental).

Es importante reseñar que la mayoría de los estudios de asociación genética necesitan ser replicados en muestras de casos y controles independientes y en distintos grupos poblacionales. Sin embargo, algunos de los resultados de estos estudios no han podido ser validados, lo cual se podría explicar por muy diversos factores. Entre los más importantes habría que destacar todos los relacionados con un diseño inadecuado del estudio de asociación (tamaños muestrales pequeños de casos y controles, estratificación poblacional, etc.), o por una interpretación estadística deficiente que deriva frecuentemente en un incremento de falsos positivos de asociación.

Por primera vez en la historia de la genética se nos presenta la gran oportunidad de descubrir los agentes responsables de la enfermedad compleja. Como pediatras, es esencial actualizar nuestra base de conocimiento genético y aunar nuestro esfuerzo con el de todos los profesionales implicados en las ciencias de la salud, ya que sólo de esta manera se puede in-

tegrar esta herramienta de forma útil en la práctica clínica diaria, y se posibilita el diseño de los estudios de asociación con las garantías necesarias para esclarecer definitivamente la etiología multifactorial de la enfermedad pediátrica.

## Agradecimientos

Este proyecto y la línea de investigación del grupo de investigación ESIGEM han sido financiados por: Xunta de Galicia (PGIDIT06PXIB208079PR), Fundación de Investigación Médica Mutua Madrileña, Instituto Carlos III y Consellería de Sanidade-Xunta de Galicia RHI07/2 (Intensificación de la actividad investigadora F. Martín-Torres), Instituto Carlos III (Intensificación de la actividad investigadora Ana Vega Gliemmo), Convenio de colaboración de investigación Wyeth España-Fundación IDICHUS, y el Fondo de Investigación Sanitaria (FIS; PI070069 del Plan Nacional de I+D+I y «fondos FEDER» concedidos a F. Martín-Torres). Las entidades financiadoras no han influido en el concepto o redacción del manuscrito. ■

## Bibliografía

1. Hilgendorff A, Heidinger K, Bohnert A, Kleinsteiber A, König IR, Ziegler A, et al. Association of polymorphisms in the human surfactant protein-D (SFTPD) gene and postnatal pulmonary adaptation in the preterm infant. *Acta Paediatr.* 2009; 98: 112-117.
2. Devlin B, Roeder K. Genomic control for association studies. *Biometrics.* 1999; 55: 997-1004.
3. Pritchard JK, Rosenberg NA. Use of unlinked genetic markers to detect population stratification in association studies. *Am J Hum Genet.* 1999; 65: 220-228.
4. Pritchard JK, Donnelly P. Case-control studies of association in structured or admixed populations. *Theor Popul Biol.* 2001; 60: 227-237.
5. Pompanon F, Bonin A, Bellemain E, Taberlet P. Genotyping errors: causes, consequences and solutions. *Nat Rev Genet.* 2005; 6: 847-859.
6. Abecasis GR, Cherny SS, Cardon LR. The impact of genotyping error on family-based analysis of quantitative traits. *Eur J Hum Genet.* 2001; 9: 130-134.
7. Gordon D, Finch SJ, Nothnagel M, Ott J. Power and sample size calculations for case-control genetic association tests when errors are present: application to single nucleotide polymorphisms. *Hum Hered.* 2002; 54: 22-33.
8. Arnestad M, Opdal SH, Vege A, Rognum TO. A mitochondrial DNA polymorphism associated with cardiac arrhythmia investigated in sudden infant death syndrome. *Acta Paediatr.* 2007; 96: 206-210.
9. Binder A, Endler G, Rieger S, Geishofer G, Resch B, Mannhalter C, et al. Protein C promoter polymorphisms associate with sepsis in children with systemic meningococemia. *Hum Genet.* 2007; 122: 183-190.
10. Bunker-Wiersma HE, Koopmans RP, Kuipers TW, Knoester H, Bos AP. Single nucleotide polymorphisms in genes of circulatory homeostasis in surviving pediatric intensive care patients with meningococcal infection. *Pediatr Crit Care Med.* 2008; 9: 517-523.
11. Salas A, Fachal L, Marcos-Alonso S, Vega A, Martín-Torres F; Grupo de investigación ESIGEM (Estudio Sobre la Influencia Genética en la Enfermedad Meningocócica). Investigating the role of mitochondrial haplogroups in genetic predisposition to meningococcal disease. *Plos One.* 2009; 4: e8347.
12. Cheung YF, Huang GY, Chen SB, Liu XQ, Xi L, Liang XC, et al. Inflammatory gene polymorphisms and susceptibility to kawasaki disease and its arterial sequelae. *Pediatrics.* 2008; 122: e608-e614.
13. Biezeveld MH, Kuipers IM, Geissler J, Lam J, Ottenkamp JJ, Hack CE, et al. Association of mannose-binding lectin genotype with cardiovascular abnormalities in Kawasaki disease. *Lancet.* 2003; 361: 1.268-1.270.
14. Quasney MW, Bronstein DE, Cantor RM, Zhang Q, Stroupe C, Shike H, et al. Increased frequency of alleles associated with elevated tumor necrosis factor-alpha levels in children with Kawasaki disease. *Pediatr Res.* 2001; 49: 686-690.
15. Velázquez-Cruz R, Orozco L, Espinosa-Rosales F, Carreno-Manjarrez R, Solís-Vallejo E, López-Lara ND, et al. Association of PDCD1 polymorphisms with childhood-onset systemic lupus erythematosus. *Eur J Hum Genet.* 2007; 15: 336-341.
16. Nieto-García A. Fenotipos, genotipos y tratamiento del asma. *An Pediatr.* 2008; 69: 293-299.