

Aplicaciones del método de casos y controles en epidemiología genética¹

Muin J. Khoury² y Terri H. Beaty³

El método de casos y controles se está aplicando con creciente frecuencia en la epidemiología genética, una disciplina relativamente nueva que busca elucidar el papel de los factores genéticos y su interacción con factores ambientales en la etiología de la enfermedad humana (1, 2). Los rápidos avances en el campo de la tecnología molecular y el inicio del Proyecto Genoma Humano, una tarea diseñada a largo plazo para trazar el mapa y secuenciar el genoma humano (3-6), facilitarán cada vez más la búsqueda de genes de susceptibilidad a las enfermedades mediante el método de casos y controles tanto en el ámbito poblacional como en el familiar. El uso de marcadores genéticos para buscar susceptibilidad del huésped posee gran atractivo para los estudios de casos y controles sobre

enfermedades; ello se debe a que tales factores de riesgo, a diferencia de los marcadores biológicos o de otros tipos de exposiciones (por ej., ocupacionales, nutricionales), no cambian con el tiempo. Por consiguiente, en la evaluación retrospectiva de los factores de riesgo de los estudios de casos y controles los marcadores genéticos son indicadores estables de susceptibilidad del huésped.

En esta revisión, se abordan aplicaciones del método de casos y controles en el campo de la epidemiología genética. En primer lugar, se revisa el alcance de los estudios en epidemiología genética y luego se analiza el uso del método de casos y controles tanto en los estudios poblacionales como en los familiares.

ALCANCE DE LA EPIDEMIOLOGÍA GENÉTICA

Tradicionalmente, los epidemiólogos se han ocupado de la relación entre el ambiente (entendido en sentido amplio) y la aparición de enfermedades en el ser humano. Por otro lado, los investigadores del campo de la genética poblacional se han ocupado de evaluar los efectos de la estructura de la población y de las fuerzas de la selección sobre la frecuencia de los rasgos genéticos. La epidemiología genética combina el método genético con el epidemiológico para estudiar la variación genética en poblaciones humanas y su relación con las variacio-

¹ Este artículo se publicó en inglés en *Epidemiologic Reviews* (1994;16:134-150) con el título "Applications of the case-control method in genetic epidemiology". Traducción de Luis Carlos Silva Ayçaguer revisada por la redacción del *Boletín de la OSP*. Copyright © 1994, The Johns Hopkins University School of Hygiene and Public Health, Baltimore, MD, Estados Unidos de América. Véanse otros artículos de esta serie en números anteriores y en pp. 441-457 de este número del *Boletín de la OSP*.

² Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Environmental Health, Division of Birth Defects and Developmental Disabilities, Birth Defects and Genetic Diseases Branch, Mailstop F45, 1600 Clifton Road NE, Atlanta, GA 30333, Estados Unidos de América. (Las solicitudes del original deben hacerse al Dr. Khoury a esta dirección.)

³ The Johns Hopkins University, School of Hygiene and Public Health, Department of Epidemiology, Baltimore, MD, Estados Unidos de América.

nes fenotípicas normales y patológicas. En este contexto, los epidemiólogos genéticos evalúan la distribución y los determinantes de los rasgos genéticos en poblaciones humanas (por ej., anomalías cromosómicas y trastornos monogénicos) y abordan la función de los factores genéticos y su interacción con factores medioambientales en la etiología de enfermedades humanas (2, 7). Para alcanzar este objetivo, se emplea tanto el enfoque poblacional como el familiar (8). Como se comenta más adelante, el método de casos y controles se está perfilando como una herramienta poderosa en ambas circunstancias. No obstante, proceder a subrayar que el método de casos y controles puede no ser aplicable en todas las situaciones y siempre ha de complementarse con estudios de familias que se valgan de técnicas analíticas de la genética como los métodos de segregación y enlace (*linkage*).

EL MÉTODO DE CASOS Y CONTROLES EN LOS ESTUDIOS POBLACIONALES

En los estudios poblacionales los métodos de casos y controles se utilizan para 1) estudiar los determinantes de mutaciones humanas, 2) evaluar el papel que desempeñan los indicadores genéticos inespecíficos (como la consanguinidad y la mezcla de razas) en la etiología de las enfermedades, y 3) estimar el papel etiológico de los rasgos genéticos.

Estudios de casos y controles de mutaciones germinales

Esta sección se circunscribe a los conceptos y métodos para estudiar los rasgos genéticos como resultados, al margen de su posible asociación con un desenlace morboso. Definiéndolos en sentido general, los rasgos genéticos incluyen cualquier variación heredada detectable a nivel molecular, bioquímico o clínico. El estudio de la variación genética abarca la evaluación de nuevos cambios en la línea germinal genética

(o mutaciones), que comprenden desde alteraciones simples del gen (por ej., alteraciones autosómicas dominantes) hasta anomalías cromosómicas que pueden ser numéricas (por ej., trisomía 21 en el síndrome de Down (9)) o estructurales (por ej., deleción de parte del cromosoma 15 en el síndrome de Prader-Willi (10)). El estudio de la variación genética incluye también rasgos mendelianos (por ej., trastornos autosómicos recesivos) que están influidos por la estructura genética de las poblaciones en algún momento dado. La presente revisión se centra en los estudios de casos y controles de mutaciones germinales.

Los estudios de casos y controles son particularmente útiles para estudiar las mutaciones, porque la mayoría de ellas son individualmente raras y su comprobación supone una combinación de pruebas clínicas y de laboratorio que hacen prohibitivos los estudios de cohorte. Una de las mutaciones genéticas mejor estudiadas en el ser humano es el síndrome de Down (habitualmente debido a la trisomía 21) (9, 11, 12). El estudio epidemiológico del síndrome de Down ilustra varias cuestiones sobre la aplicación del método de casos y controles en el estudio de las mutaciones humanas.

Origen paterno. La mayoría de los casos de trisomía 21 se originan en la no disyunción del cromosoma 21 durante la meiosis. Esos errores pueden producirse tanto en las células germinales maternas como en las paternas. A partir de estudios tempranos de los polimorfismos cromosómicos, se pensó que la ausencia de disyunción paterna podría explicar una proporción sustancial de los casos (más de 25%) (11, 12). Sin embargo, en estudios más recientes con marcadores moleculares se ha demostrado que más de 90% de los casos entrañan errores de no disyunción materna (13, 14). La identificación del origen de la no disyunción en los padres puede ayudar a orientar la búsqueda de factores de riesgo potenciales. Por ejemplo, en un estudio de casos y controles sobre el síndrome de Down, del Registro de Vigilancia en Salud de British Columbia

(Health Surveillance Registry), Olshan et al. (15) examinaron la ocupación paterna como factor de riesgo, comparando 1008 casos del síndrome de Down con 2016 controles apareados nacidos vivos. Luego de examinar 59 categorías de ocupación paterna, los autores hallaron que tres de ellas estaban asociadas con un aumento del riesgo del síndrome de Down (conserjes, mecánicos y trabajadores agrícolas). Ninguna de estas categorías ocupacionales, sin embargo, explicaba más de 3% de los casos del síndrome de Down (15). Este hallazgo no es inesperado, ya que la mayoría de los casos del síndrome de Down no se originan en un error meiótico del padre. Los estudios futuros sobre factores paternos en el síndrome de Down deberían centrarse solo en los casos de trisomía 21 derivados del padre antes que en la totalidad de los casos.

El origen paterno de las mutaciones genéticas también se está convirtiendo en un tema importante de los estudios epidemiológicos relacionados con otras anomalías cromosómicas. Por ejemplo, en el síndrome de Prader-Willi, la mayor parte de los casos tienen deleciones de fragmentos del cromosoma 15 paterno (10). Esto ha llevado a los investigadores a examinar el papel de las exposiciones ocupacionales paternas en la etiología del síndrome de Prader-Willi (16).

Confusión. La edad materna avanzada es el factor de riesgo conocido más importante del síndrome de Down (11, 12). Por lo tanto, al examinar la asociación potencial entre un factor de riesgo y el síndrome de Down, siempre debe considerarse la edad materna como posible factor de confusión. La confusión puede abordarse por medio del diseño del estudio (tal como el apareamiento de casos y controles según la edad materna) o mediante estratificación en el análisis (17, 18). El efecto independiente de la edad paterna sobre el riesgo del síndrome de Down, si existe, es débil. Esto no es sorprendente, puesto que la mayoría de los casos del síndrome de Down se originan en un error meiótico de la madre (13, 14).

Selección prenatal. Se han realizado estudios de casos y controles sobre el síndrome de Down en casos diagnosticados en el nacimiento (que pueden incluir nacidos muertos) (17, 18) y en series de abortos espontáneos (19). Un problema metodológico relacionado con la fertilización diferencial de gametos anormales o con la supervivencia prenatal diferencial puede introducir un sesgo al estimar la magnitud de una asociación entre un factor de riesgo y el síndrome de Down en estudios epidemiológicos (20–22). Buena parte de las concepciones con síndrome de Down se abortan espontáneamente (23). Si un factor de riesgo o una exposición se asocian con riesgo aumentado (o disminuido) de aborto espontáneo o con fertilización diferencial de gametos anormales, se pueden observar asociaciones espurias entre la exposición y el síndrome de Down en nacidos vivos. Por ejemplo, en un estudio de casos y controles del síndrome de Down llevado a cabo con nacidos vivos, Hook y Cross (24) comunicaron un efecto protector del hábito de fumar cigarrillos en el síndrome de Down (razón de posibilidades⁴ = 0,6). En ausencia de asociación entre el hábito de fumar y el riesgo de presentar síndrome de Down, este aparente efecto protector puede explicarse por los factores de selección prenatales si el hábito de fumar conduce a una pérdida preferente de concepciones trisómicas o a una fertilización reducida de gametos anormales. En general, los efectos del sesgo de selección prenatal producirán pequeñas distorsiones de la medición del riesgo relativo (excepto en situaciones extremas) (25). Si bien puede ser difícil de poner en práctica, lo ideal es que los estudios de casos y controles de mutaciones humanas con una probabilidad alta de pérdida prenatal deberían incluir casos diagnosticados en nacidos vivos, nacidos muertos y pérdidas prenatales tempranas. En un reciente estudio de casos y controles sobre la trisomía 21 y el hábito de fumar efectuado con material obtenido por amniocentesis no se encontra-

⁴ Odds ratio en el original (N del T).

ron pruebas de asociación entre el hábito de fumar y la trisomía 21 (26).

Estudios de casos y controles sobre enfermedad y factores genéticos inespecíficos

En esta sección se revisan los estudios de casos y controles de enfermedades que pueden ayudar a aclarar la importancia de los factores genéticos sin medirlos directamente. Se consideran dos clases de estudios: los de consanguinidad y los de mezclas de razas o etnias.

Estudios de consanguinidad. El impacto global de la consanguinidad consiste en un aumento de la probabilidad de homocigotismo en todo locus autosómico y, por tanto, en un aumento de la frecuencia de rasgos genéticos recesivos deletéreos en la población (27). Se espera que la consanguinidad aumente la frecuencia de trastornos autosómicos recesivos (tales como la fibrosis quística y la fenilcetonuria). Para las alteraciones de etiología y patogénesis complejas, los estudios de consanguinidad pueden utilizarse a fin de evaluar un componente genético recesivo de la enfermedad, aunque ese componente no se puede medir directamente ni en el producto génico ni a nivel del ADN. Aunque la prevalencia de matrimonios consanguíneos ha descendido en todo el mundo (27, 28), en algunas poblaciones sigue siendo relativamente alta (20 a 50%) (28-32), lo que las hace propicias para evaluar los efectos de la consanguinidad.

En los estudios de casos y controles sobre consanguinidad, la "exposición" de interés es el coeficiente de consanguinidad del individuo. El coeficiente de consanguinidad es la probabilidad de que un individuo sea portador en cada locus autosómico de dos alelos que sean idénticos por descendencia. Para los patrones comunes, los coeficientes de consanguinidad son conocidos (por ej., 1/16 para matrimonios entre primos hermanos, 1/32 para matrimonios entre sobrinos y tíos segundos, y 1/64 para matrimonios entre

primos segundos) (33). En general, los coeficientes de consanguinidad pueden calcularse a partir de los pedigríes extendidos utilizando métodos de trayectoria (*path methods*) o cómputos iterativos (34, 35). Al diseñar estudios de casos y controles sobre la consanguinidad, deben obtenerse grupos de control adecuados, porque la consanguinidad se asocia con numerosos factores demográficos, culturales, religiosos y geográficos que podrían estar relacionados con la enfermedad de interés (y ser, por consiguiente, factores de confusión potenciales) (36). En estos estudios puede no ser siempre necesario aparear según dichos factores demográficos, pero siempre debe garantizarse que la estratificación y el ajuste son apropiados.

Los estudios de casos y controles sobre consanguinidad se han realizado generalmente para analizar resultados inespecíficos como la mortalidad (36) o los patrones de morbilidad (37). En dichos estudios se han detectado efectos modestos de la consanguinidad sobre esos indicadores de salud. Por ejemplo, en un estudio de casos y controles de mortalidad en edades prerreproductivas (muerte antes de los 20 años) dentro de la Vieja Orden Amish (Old Order Amish) en el condado de Lancaster, Pennsylvania, Khoyry et al. (38) encontraron un aumento en el coeficiente de consanguinidad en los casos respecto de sus controles apareados ($n = 213$). Debido al alto grado de consanguinidad en dicha población, se estimó que los hijos de matrimonios que eran primos segundos o parientes más cercanos (coeficiente $> 1/64$) tenían un riesgo relativo de 1,6 de morir antes de los 20 años, comparados con los hijos de matrimonios formados por parientes más lejanos que primos segundos. El efecto de la consanguinidad se observó en varias causas de muerte.

En algunas poblaciones se dispone de información genealógica completa o casi completa, lo cual permite calcular los coeficientes de la relación genética para casos y controles. Estos índices genealógicos pueden ser útiles para identificar factores genéticos mediante estudios de casos y controles. Por ejemplo, Jorde et al. (39) notificaron que el

coeficiente medio de parentesco entre 249 casos de defectos del tubo neural en la base de datos genealógica de Utah era mayor que el de una serie de controles extraídos de la misma base de datos (que comprendía 1,2 millones de individuos). Al examinarse más detalladamente, la distribución de coeficientes de parentesco mostró que la mayor parte de las diferencias podían atribuirse a un número relativamente bajo de pares de hermanos afectados entre los casos, lo cual aumenta la posibilidad de que un factor ambiental común a los hermanos pueda estar contribuyendo a la aparente agregación familiar. En otro estudio de casos y controles, Roberts (40) encontró que 12% de los pacientes con esclerosis múltiple en las Islas Orkney tenían cierto grado de consanguinidad. Mientras que este era mucho más alto que el de la población general de las Islas Británicas, solo excedía ligeramente al porcentaje de los controles procedentes de la misma población de las Islas Orkney (40).

Estudios de mezclas. Cuando una enfermedad manifiesta diferencias raciales o étnicas, los estudios de mezclas raciales (de cruzamientos entre razas) proveen una herramienta epidemiológica útil que puede adaptarse a estudios de casos y controles para evaluar la importancia relativa de los factores genéticos. Si dos poblaciones difieren en cuanto a la frecuencia de ciertos rasgos genéticos, la formación de parejas integradas por sujetos procedentes de distintos grupos conducirá a un aumento de la probabilidad de heterocigotismo en los hijos y, como resultado, a la ruptura de genotipos adaptados o a resultados positivos (llamados "vigor híbrido" en plantas y animales). Entre los humanos no existen pruebas de efecto deletéreo alguno debido a mezclas de razas o etnias. No obstante, los estudios de mezclas pueden ser útiles para señalar determinantes genéticos importantes. Por ejemplo, se ha propuesto que la mezcla genética puede haber desempeñado un papel importante en la incidencia aumentada de diabetes mellitus insulino dependiente (DMID) en las personas de raza negra de los Estados Unidos de Amé-

rica respecto de las de África. Para evaluar esta hipótesis, Reitnauer et al. (41) realizaron un estudio de casos y controles sobre la DMID en el cual estimaron el grado de mezcla genética por medio de nueve marcadores genéticos polimórficos (grupos sanguíneos, proteínas séricas). Estos autores estimaron que en 65 casos de DMID en personas de raza negra había un grado más alto de mezcla genética con personas de raza blanca que en 183 controles de raza negra (21,4% frente a 17,9%). Estos resultados respaldan la hipótesis de que la mezcla con blancos puede explicar en parte las tasas más altas de DMID observadas en personas de raza negra de los Estados Unidos.

Al igual que ocurre en los controles de los estudios de consanguinidad, los controles en los estudios de mezclas deben seleccionarse de manera que reflejen la población de donde provienen los casos. Estos estudios también están sujetos al efecto potencial de las variables de confusión. La confusión puede surgir si diferentes grados de mezclas están asociados a distintos factores socioeconómicos, culturales o de exposición asociados asimismo con la enfermedad. Los aspectos metodológicos relacionados con la selección de casos y controles se abordan más adelante en mayor detalle.

El grado de mezcla racial (la variable de "exposición" en los estudios de casos y controles) se ha medido de diversas maneras, por ejemplo según la mezcla o lugar de origen notificados (42, 43), el uso de apellidos (44), y el empleo de marcadores genéticos polimórficos (41, 45, 46). El aumento del número de marcadores del ADN disponibles puede mejorar las estimaciones de mezclas raciales y aumentar la popularidad de este método en estudios de casos y controles (47).

Estudios de casos y controles de enfermedad y factores genéticos medidos

A medida que los marcadores genéticos continúen proliferando, los estudios

de casos y controles se utilizarán más para evaluar el papel de genes específicos en la etiología y la patogénesis de enfermedades comunes como el cáncer, la cardiopatía isquémica y las malformaciones congénitas. En genética humana, los estudios que buscan correlaciones entre alelos específicos y enfermedades se han denominado "estudios de asociación". Estos contrastan con los "estudios de enlace" (*linkage studies*), en los cuales se buscan pruebas de cosegregación entre un locus marcador y el gen de una enfermedad en familias (48). Recientemente, se mantuvo una polémica sobre los méritos relativos y las desventajas de los estudios de enlace (tradicionalmente del dominio de los genetistas) frente a los estudios de asociación (tradicionalmente bajo el dominio del epidemiólogo) (49, 50). Es posible hacer una distinción entre genes de enfermedades (o, generalmente, loci de enfermedad (49)) y los loci de susceptibilidad a enfermedades, que no son ni necesarios ni suficientes para el desarrollo de enfermedad (es decir, factores de riesgo genéticos (49)). Utilizando técnicas de simulación por computadora, Greenberg (49) demostró recientemente que si la probabilidad de enfermar de personas con el alelo de susceptibilidad es menos de 10 veces mayor que la probabilidad de enfermar de las que carecen de este alelo, puede ser muy difícil detectar el enlace, incluso en conjuntos de datos formados por 30 núcleos familiares con dos individuos afectados o más. En estas condiciones, los métodos de enlace tradicionales pueden carecer de la potencia estadística adecuada para detectar el enlace o conducir a un rechazo erróneo de la hipótesis de enlace y adolecer del problema de las pruebas múltiples (49). Por consiguiente, se dispone de espacio para aumentar la utilidad de los enfoques de asociación en estudios de casos y controles realizados para buscar factores de riesgo genéticos. La incorporación del método de enlace a los estudios epidemiológicos se abordará más adelante en la sección sobre estudios familiares.

A medida que se han encontrado más formas de aplicar los marcadores biológicos de susceptibilidad del huésped en estudios epidemiológicos (51, 52), se han utilizado dos tipos de marcadores genéticos en los estudios de casos y controles: 1) marcadores basados en productos génicos tales como grupos sanguíneos específicos, antígenos leucocitarios humanos (ALH), proteínas séricas o sistemas de enzimas y 2) marcadores basados en el análisis directo del ADN para identificar las diferencias entre casos y controles en cuanto a las secuencias de ciertos genes (53).

La evaluación mediante casos y controles de los rasgos genéticos en la etiología de las enfermedades se guía generalmente por el enfoque de un "gen candidato". Este enfoque consiste en examinar las variaciones en los alelos (medidos al nivel de la proteína o del ADN) en loci ya conocidos o de los cuales existe la sospecha de que ejercen algún papel en la patogénesis de la enfermedad. Por ejemplo, en un estudio de casos y controles sobre labio leporino, Ardinger et al. (54) examinaron las diferencias de los alelos en fragmentos de restricción de longitud variable (polimorfismo) en los sitios de varios genes candidatos seleccionados debido a la función que se les atribuye en la formación del paladar en ratones. Al comparar 80 casos no sindrómicos de labio leporino con 102 controles, los autores encontraron una asociación entre la hendidura y la variación genética del gen del factor de crecimiento transformador alfa. Aunque la asociación es de poca magnitud (razón de posibilidades entre 2 y 3), ya se ha notificado en varias poblaciones (55-58), lo que sugiere que dicho gen desempeña un papel importante en la etiología de las hendiduras orales en los humanos.

Otro ejemplo es la asociación entre la DMID y los genes en la región del sistema ALH. Mientras que numerosos estudios han demostrado una asociación entre el riesgo de DMID y algunos alelos del sistema de ALH (*DR3* y *DR4*), en los estudios más recientes se ha encontrado una asociación aun más fuerte entre la DMID y la variación

genética en la cadena *DQ*-beta, específicamente la ausencia del ácido aspártico en la posición 57 de esa cadena. El hallazgo parece constituir un nuevo conocimiento biológico sobre la patogénesis de la DMID (59–61).

Como tercer ejemplo cabe mencionar un estudio de casos y controles sobre la diabetes mellitus no insulinodependiente relacionado con polimorfismos de ADN en el gen de la sintetasa del glucógeno (62). Este gen se examinó porque la resistencia del hígado y del músculo a la insulina conforman un patrón característico de la enfermedad y porque los trastornos de la síntesis de glucógeno se observan en los estadios tempranos de la enfermedad (62). Un polimorfismo genético específico en este gen se observó en el 30% de 107 casos, pero solo en 8% de 164 controles, lo cual sugiere que este gen podría tener algún papel en la patogénesis de la diabetes mellitus no insulinodependiente.

Un cuarto ejemplo proviene de un estudio de casos y controles del cáncer de pulmón relacionado con la variación fenotípica del metabolismo de la debrisoquina. Se seleccionó este polimorfismo genético porque controla un sistema enzimático que probablemente interviene en el metabolismo oxidativo de los carcinógenos (63, 64). En este estudio de 245 casos de cáncer de pulmón y 234 controles con otras enfermedades, los autores encontraron una fuerte asociación entre el riesgo de cáncer de pulmón y un metabolismo intenso de esta enzima, especialmente en casos con exposición ocupacional al asbesto y a los hidrocarburos aromáticos policíclicos (64).

Al diseñar, analizar, e interpretar estudios de casos y controles sobre asociaciones entre rasgos genéticos y enfermedades, es importante considerar varios aspectos metodológicos.

Interacción gen-ambiente. Un tema central de la epidemiología genética es que las causas de la mayor parte de las enfermedades están relacionadas con interacciones complejas entre la susceptibilidad genética

y los factores ambientales. El término “ecogenética”, una extensión del campo de la farmacogenética, fue acuñado para reflejar este concepto más amplio (65, 66). En este contexto, los estudios de casos y controles ofrecen una herramienta valiosa para buscar factores de susceptibilidad genética junto con exposiciones ambientales. Los patrones de interacción entre gen y ambiente ya se han comentado (67–69) y pueden ser encarados en un marco epidemiológico (68, 69). Aunque existen notables dificultades en la definición, la medición y la detección de la interacción en los estudios de epidemiología general, es relativamente simple demostrar cómo los estudios de asociaciones entre genes y enfermedad, que no logran examinar el papel de las exposiciones ambientales junto a los rasgos genéticos de interés, pueden conducir a un considerable debilitamiento en las medidas de asociación (por ej., de la razón de posibilidades) si el factor genético confiere susceptibilidad a la enfermedad solo en presencia de otros genes o de determinantes ambientales (69). Por tanto, al diseñar estudios de casos y controles en epidemiología genética, los factores de riesgo ambientales deben examinarse junto con los marcadores genéticos de interés como predictores independientes de enfermedad y como factores que interactúan con el factor genético de interés.

Un ejemplo de interacción gen-ambiente es el que ilustra el estudio de casos y controles sobre cáncer de pulmón y su relación con los fenotipos metabólicos de la debrisoquina ya comentados (63). En este estudio, el riesgo de cáncer de pulmón de las personas que metabolizan intensamente la debrisoquina, definidas mediante la razón metabólica entre la debrisoquina y sus metabolitos hidroxilos obtenidos de la orina, fue cuatro veces mayor en ausencia de exposiciones al asbesto y a los hidrocarburos aromáticos policíclicos. No obstante, en presencia de exposiciones ocupacionales, el riesgo de este cáncer en esas personas fue 18 veces más elevado, lo que sugiere posibles efectos biológicos de naturaleza sinérgica (64).

Otro ejemplo lo constituye un estudio de casos y controles de cáncer de vejiga en relación con el fenotipo acetilador (70). Aquí se encontró que los acetiladores lentos tenían un riesgo ligeramente elevado de cáncer de vejiga (razón de posibilidades = 1,6). Sin embargo, en el subgrupo de casos que habían tenido una posible exposición a los compuestos de arilnitrito, la asociación resultó ser mucho más fuerte (razón de posibilidades = 17), lo que sugiere la existencia de interacción biológica entre un rasgo genético y una exposición ocupacional en la etiología del cáncer de vejiga.

Confusión. En los estudios de casos y controles de factores genéticos, los factores de confusión podrían ser otros determinantes genéticos no medidos o factores ambientales capaces de producir diferencias espurias en las frecuencias de alelos entre casos y controles. Los aspectos raciales, étnicos y otras fuentes de estratificación poblacional son importantes fuentes de confusión en cualquier estudio de asociación entre rasgos genéticos y enfermedad. Un ejemplo claro de confusión lo aportó la asociación entre el marcador genético *Gm3;5;13;14* y la diabetes mellitus no insulino dependiente en los indios Pima (43). En ese estudio transversal, la prevalencia de diabetes en los individuos con el haplotipo *Gm* fue más alta que los que tenían el marcador (29% frente 8%). Sin embargo, este marcador genético particular resultó ser un marcador de mezcla con personas de raza blanca. Cuando el análisis se estratificó según el grado de mezcla con personas de raza blanca, la asociación observada desapareció, lo cual sugiere la presencia de confusión debida a otros factores no medidos. Para minimizar la confusión en estudios de casos y controles, los investigadores necesitan seleccionar los controles cuidadosamente del mismo entorno racial o étnico del que proceden los casos. En un intento de aparear según antecedentes genéticos, se han empleado familiares como controles (71). Existe inquietud, sin embargo, acerca del posible sobrepareamiento según factores de riesgo genéticos y ambien-

tales (71). Goldstein et al. (72) han demostrado que, aunque exista correlación en la exposición entre los familiares, esto no introduce sesgo en la estimación de los efectos de exposición en estudios familiares, suponiendo que los riesgos de enfermedad específicos de la exposición se mantengan constantes con el tiempo. Como ocurre en otras áreas de la epidemiología, el diseño de estudios de casos y controles para problemas genéticos no necesariamente exige apareamiento. Sin embargo, el análisis siempre debería ser estratificado en relación con variables de confusión potenciales.

Disclasificación del genotipo. Al estudiar las asociaciones entre rasgos genéticos y enfermedad, se utilizan a menudo métodos indirectos para asignar genotipos a individuos. Por ejemplo, en el estudio de casos y controles sobre cáncer de vejiga, la carga de dapsona se utilizó para clasificar a los individuos en grupos de acetiladores lentos y acetiladores rápidos (70), y en el estudio de casos y controles sobre cáncer de pulmón se empleó una prueba de carga de debrisoquina con medición subsecuente de metabolitos en la orina, para clasificar a los individuos en grupos de metabolizadores intensos y metabolizadores pobres (63, 64). Estas mediciones indirectas del genotipo subyacente pueden conducir a errores de clasificación no diferencial del genotipo y, por tanto, se diluiría la magnitud de los riesgos relativos estimados (73). No obstante, estos estudios deben contemplarse con cautela por la posibilidad de incurrir en un error diferencial en la clasificación del genotipo que puede surgir cuando la enfermedad por sí misma interfiere con la clasificación del genotipo (por ej., la prueba de carga).

Cuando los genotipos se miden a nivel del ADN, puede aparecer otra fuente de disclasificación: la debida al desequilibrio en el enlace (53). En condiciones ideales, si se ha completado la secuencia del gen de interés, la presencia y localización de una o más mutaciones en el gen podrían estar correlacionadas con un producto génico al-

terado y, a partir de ahí, con la condición de caso o control en estudios epidemiológicos. Sin embargo, en muchos estudios de asociaciones entre marcadores del ADN y enfermedades, los investigadores solo disponen de marcadores de la región general del gen candidato o de una porción no expresada del gen. A menos que se tenga como objetivo el sitio real de la mutación deletérea involucrada en la enfermedad, cualquier variación del ADN entre casos y controles en la región de un gen candidato podría reflejar variaciones del ADN en el desequilibrio del enlace con las mutaciones reales asociadas con la enfermedad (53). El desequilibrio de enlace puede producirse cuando la mutación es relativamente reciente o cuando hay ventaja selectiva para haplotipos específicos, de manera que se mantienen preferentemente en la población. En completo equilibrio, no habría asociación entre ningún alelo marcador y la susceptibilidad a la enfermedad (es decir, la razón de posibilidades debería ser 1 en un estudio de casos y controles). Con desequilibrio de enlace, un alelo marcador podría aparecer más frecuentemente con el alelo de susceptibilidad a la enfermedad. Sin embargo, puede que la asociación entre el alelo marcador y el alelo de susceptibilidad a la enfermedad no sea perfecta y, por consiguiente, si el primero se emplea como sustituto del segundo para estudiar el riesgo de enfermedad, fácilmente podría producirse algún error de clasificación no diferencial. Esto atenuaría la magnitud de la razón de posibilidades entre el alelo marcador y la enfermedad hacia la hipótesis nula y subestimaría el efecto del locus genético en la etiología de la enfermedad.

Un enfoque analítico para abordar el aspecto de desequilibrio de enlace en los estudios de casos y controles consiste en construir haplotipos específicos compuestos por alelos en loci estrechamente enlazados dentro del área del gen candidato. Por ejemplo, en el estudio de casos y controles de Ardinger et al. (54) sobre labio leporino ya mencionado, los autores utilizaron tres enzimas de restricción para un gen candi-

dato único (el locus del factor alfa de transformación del crecimiento (FATC)) para construir un haplotipo de marcadores de ADN estrechamente unidos. Estos investigadores encontraron que los individuos con un haplotipo particular en el locus FATC (denotado C2A2B2) tenían un riesgo mayor de padecer de labio leporino no sindrómico. Esto fortalece la hipótesis según la cual el locus FATC desempeña un papel en la etiología de esta malformación.

Errores de tipo I y tipo II. En los estudios de casos y controles que barajan muchos rasgos genéticos y otros factores de riesgo pueden detectarse asociaciones estadísticamente significativas que se deben al azar. Por ejemplo, en estudios de asociación entre el sistema de ALH y alguna enfermedad, suelen evaluarse numerosos alelos de ALH en varios loci y pueden esperarse algunas asociaciones significativas aunque la hipótesis nula sea verdadera (74). Estos errores de tipo I serán cada vez más importantes en estudios de casos y controles en los que se analizan múltiples marcadores del ADN y muchos loci candidatos. A medida que los investigadores secuencien más genes y que los polimorfismos del ADN se delinee por medio del genoma, el mayor reto de la epidemiología genética será discriminar las asociaciones con sentido biológico de la multitud de asociaciones espurias que pueden aparecer (75). Como en otras áreas de la epidemiología, el establecimiento de una relación causa-efecto depende de muchos aspectos, incluso de la coherencia de las asociaciones en distintos estudios y la existencia de un modelo biológico plausible que fundamente tales asociaciones (76). Finalmente, para abordar los aspectos relacionados con la potencia estadística (errores de tipo II), los investigadores deben garantizar la obtención de muestras de tamaño adecuado al diseñar los estudios de casos y controles con objeto de buscar factores genéticos causales y, especialmente, obtener pruebas de interacciones entre los genes y el ambiente.

EL MÉTODO DE CASOS Y CONTROLES EN ESTUDIOS DE FAMILIAS

El estudio de la agregación familiar es un tema central de la epidemiología genética en el que se han producido importantes avances metodológicos y estadísticos en el último decenio. La importancia de los estudios de familias para elucidar la etiología de las enfermedades se debate cada vez más (77-80) en la literatura epidemiológica. Por tradición, los estudios de familias procuran dar respuesta a tres preguntas importantes (8): 1) ¿existe alguna agregación familiar de la enfermedad? 2) ¿se relaciona la agregación familiar con factores genéticos o ambientales, o con ambos? y 3) ¿cuáles son los mecanismos genéticos que participan específicamente en la agregación familiar? Las respuestas a estos interrogantes combinan métodos epidemiológicos y genéticos, junto con investigaciones de laboratorio apropiadas. El diseño epidemiológico tradicional de estudios de casos y controles también es aplicable en el contexto familiar, si bien requiere modificaciones conceptuales y metodológicas. En esta sección se revisan las aplicaciones del método de casos y controles en estudios de familias que se desarrollan para evaluar: 1) la presencia de agregación familiar, 2) las causas de la agregación familiar, y 3) los mecanismos genéticos específicos mediante análisis de enlaces en estudios epidemiológicos.

Medición de la agregación familiar

Muchos estudios de casos y controles de asociaciones entre factores de riesgo y enfermedad incluyen un componente de historia familiar en el cual se busca información sobre la presencia o ausencia de la enfermedad en los familiares (típicamente solo familiares de primer grado). Durante los últimos 20 años ha aumentado constantemente la proporción de trabajos epidemiológicos con algún componente familiar que se publica en revistas epidemiológicas

estándar (81). Una revisión de los estudios de casos y controles sobre cáncer publicados reveló que alrededor de 25% de esos estudios incluyeron un componente familiar (82). Mientras que muchos estudios de casos y controles incluyen una evaluación de la historia de la familia, en el análisis típico esa información se resume en uno o dos apartados de datos, a menudo con la historia familiar dicotomizada en una variable sí/no y tratada como cualquier otro factor (83, 84). Es importante subrayar que la historia familiar no es un atributo de casos y controles por sí mismos sino que depende de numerosos factores, incluidos el tamaño familiar, la fertilidad diferencial, la prevalencia de la enfermedad en la población, la distribución de la edad de los familiares, la heterogeneidad etiológica de la enfermedad y los tipos de relaciones biológicas con los casos índices y con los controles. Incluso en ausencia de agregación familiar de la enfermedad, la proporción de casos con una "historia familiar positiva" debería aumentar con el número de familiares. Esto puede ser un problema si hay una diferencia entre los tamaños de las familias de casos y controles. Por otro lado, incluso para las enfermedades genéticas puras (tales como los trastornos totalmente penetrantes de gen único con un riesgo de recurrencia entre hermanos del 25%), la proporción de casos con una historia positiva en los hermanos es probablemente baja, sobre todo con la tendencia creciente hacia tamaños familiares pequeños en muchas poblaciones (de 1 a 2 hijos por familia).

En lugar de tratar a la historia familiar como una "exposición" en los estudios de casos y controles, se ha adoptado un enfoque analítico que consiste en transformar el diseño de casos y controles en un diseño de cohorte. En este caso, en cohortes de diferentes tipos de familiares de casos y controles se evalúa la presencia o ausencia de la enfermedad en relación a su propia información sobre el factor de riesgo, distribución por edad y relación a un caso o un control (que se convierte en la variable de "exposición"). Por ejemplo, un estudio de

casos y controles sobre cáncer de próstata mostró que los hermanos y padres de los casos tenían tasas de cáncer prostático significativamente mayores que los hermanos y padres de las esposas controles (85). Específicamente, en los padres de los casos la prevalencia de la enfermedad era 14,1%, mientras que en los padres de los controles era 7,5%; en los hermanos de los casos era 3,1% y en los hermanos de los controles, 1%. Estos estudios familiares de cohorte pueden basarse exclusivamente en la información sobre la historia familiar de los parientes de los casos y los controles obtenida de ellos mismos o de sus sustitutos. En este contexto es importante considerar la exactitud de la historia familiar comunicada (86, 87) y el posible papel del recuerdo diferencial entre casos y controles, que puede producir medidas espurias de agregación familiar. Por ejemplo, en un estudio de casos y controles sobre malformaciones congénitas, Rasmussen et al. (87) encontraron que la sensibilidad y el posible valor predictivo positivo del recuerdo de la madre sobre defectos al nacer de sus hijos eran 61 y 47%, respectivamente, y variaban de acuerdo con el tipo y la gravedad de los defectos.

Además, los estudios de historia familiar podrían incluir un componente de estudio de familia separado y potencialmente costoso, en el cual los familiares de casos y controles se evalúan directamente en busca de información sobre factores de riesgo y resultados, ya sea en estudios transversales o en seguimientos longitudinales de morbilidad y mortalidad. Un ejemplo de este tipo de investigación es el estudio de casos y controles sobre enfermedad pulmonar obstructiva crónica realizado por Cohen et al. (7, 88), en el cual se empleó un diseño de casos y controles como punto de partida para incluir familiares de casos y controles en evaluaciones sobre datos de exposición, pruebas funcionales respiratorias y medidas de ciertos marcadores genéticos. Los familiares de los casos y los controles también se siguieron con el fin de evaluar el empeoramiento de la función pulmonar y la mortalidad (89).

Cabe mencionar que un simple cálculo de la frecuencia de una historia de enfermedad en los familiares de los casos y los controles puede ser inapropiada para enfermedades de inicio tardío, donde hay un truncamiento sustancial de los datos (es decir, donde muchos individuos aún no sobrepasan la edad de riesgo). Lo ideal sería usar estimaciones de riesgo de por vida a partir de tablas de vida (90) u otros modelos de supervivencia (91). El examen de la distribución de la edad de inicio de la enfermedad en familiares de los casos también ofrece la oportunidad de probar los efectos de factores de riesgo en el momento de inicio. En los familiares de los casos con cáncer de próstata antes mencionados se obtuvieron pruebas de que la edad del caso en el momento de inicio de la enfermedad influía sustancialmente sobre el riesgo específico de enfermar según la edad (92).

Evaluación de causas de agregación familiar

La evaluación de causas de agregación familiar en los estudios de casos y controles puede llevarse a cabo en el diseño, el análisis o en ambas etapas de la investigación.

Diseño del estudio. Los estudios de casos y controles pueden diseñarse con grupos específicos de familiares con el fin de maximizar las inferencias etiológicas relativas a factores genéticos y ambientales. El ejemplo clásico de este tipo de estudios es el de los gemelos. En un estudio de casos y controles típico se puede restringir el estudio solamente a gemelos y comparar la tasa de enfermedad en los gemelos de los casos con la de los gemelos de los controles. Lo esencial es que se podría estratificar a los gemelos de acuerdo con el cigotismo y comparar las tasas de concordancia entre gemelos monocigotos y gemelos dicigotos. Una concordancia mayor de las tasas de enfermedad en los gemelos monocigotos que en los dicigotos sugiere la presencia de factores genéticos en la etiología de la enferme-

dad. La utilidad y las limitaciones de los estudios sobre gemelos para inferir causas genéticas y ambientales de enfermedad se comentan en varios trabajos (93, 94).

Otro tipo de diseño es el que se emplea en los estudios de separación o de adopción. En estos tipos de estudios de casos y controles los sujetos se seleccionan entre individuos que fueron adoptados al nacer o a temprana edad. Los investigadores comparan las tasas de enfermedad en los padres naturales de los casos y los padres naturales de los controles, así como entre padres adoptivos de los casos y de los controles. Una tasa mayor de enfermedad en los padres naturales de los casos que en los padres naturales de los controles sugiere la importancia etiológica de los factores genéticos, mientras que una tasa mayor en padres adoptivos de casos que en padres adoptivos de controles subraya el papel de determinantes ambientales. Los estudios de adopción se han empleado en varias investigaciones sobre trastornos psiquiátricos (95), obesidad (96) y mortalidad prematura (97). Su éxito depende marcadamente de la capacidad de los investigadores para construir relaciones biológicas de los registros disponibles: una tarea difícil, especialmente en Norteamérica.

En raras circunstancias los estudios de adopción y los de gemelos pueden combinarse en un diseño híbrido: el estudio de gemelos criados por separado. Este tipo de estudio brinda un método potente para ilustrar la importancia de los factores genéticos en la etiología de las enfermedades. Por ejemplo, Stunkard et al. (98) evaluaron las correlaciones del índice de masa corporal en 93 pares de gemelos monocigotos que fueron criados por separado, 154 pares de gemelos monocigotos criados juntos, 218 pares de gemelos dicigotos criados por separado, y 208 pares de gemelos dicigotos criados juntos. Los autores encontraron influencias genéticas importantes sobre el índice de masa corporal y escasa influencia de los factores ambientales de la niñez.

Métodos analíticos. La mayor parte de las veces los estudios de casos y controles so-

bre enfermedades no están restringidos por el diseño, y los investigadores intentan evaluar las causas de la agregación familiar ajustando factores de riesgo en los probandos o casos índice y sus familiares con el fin de determinar si existe agregación familiar residual (es decir, un exceso de riesgo de enfermar en los familiares de casos en relación con los familiares de los controles).

Aunque, como se señaló anteriormente, con frecuencia el apareamiento no es necesario en estudios de casos y controles, si los casos y los controles están individualmente apareados se puede construir una tabla de 2×2 para cada par y comparar la tasa de enfermedad en familiares del caso con la correspondiente tasa en familiares del control. Como el investigador no controla el número de familiares que tiene cada caso o control, muchos pares serán poco informativos, ya que tendrán muy pocos familiares o faltará la mezcla de los dos tipos de familiares, afectados y no afectados, en algunas tablas. Para que este tipo de tabla de 2×2 contribuya a proporcionar el estimador de la razón de posibilidades global, debe disponerse de familiares afectados y no afectados para cada uno de los pares. Sin embargo, si se tienen tablas informativas de cada uno de los $i = 1, \dots, I$ pares, los modelos de regresión de la razón de posibilidades pueden escribirse del modo siguiente:

$$\ln(\text{RP}) = a + bZ_i,$$

donde el Z_i representa un vector de covariables en el estrato i -ésimo (por ej., variables de apareamiento) y el intercepto, el valor basal o común de la razón de posibilidades. El logaritmo de la razón de posibilidades ($\exp(a)$) corresponde al estimador habitual de Mantel-Haenszel cuando las covariables (por ej., variables de apareamiento) no tienen efecto, es decir, cuando $b = 0$. Liang et al. (99) han demostrado cómo puede obtenerse un estimador insesgado de la razón de posibilidades para datos aislados sin suponer la independencia completa entre los familiares que contribuyen a cada fila de las tablas. La importancia de obtener

estimadores insesgados de b surge cuando la razón de posibilidades (una medida de agregación familiar en esta situación) puede variar con características observables del caso o del control (por ej., raza o sexo).

Una parametrización ligeramente distinta del mismo modelo estadístico básico permite realizar un análisis más detallado, que toma en cuenta las covariables observadas en los propios familiares. Aquí el logaritmo de la razón de posibilidades de que un familiar esté afectado se expresa como una función lineal de sus propias covariables, mientras que el estado del índice (caso frente a control) se trata como una variable predictora adicional, es decir,

$$\ln \frac{P(Y_{ij} = 1)}{1 - P(Y_{ij} = 1)} = a + bX_{ij} + \gamma\delta_{ij}$$

donde Y_{ij} es el resultado del j -ésimo familiar del i -ésimo estrato (el i -ésimo par de casos y controles), X_{ij} es el vector de covariables de esta persona, y δ_{ij} representa un indicador que es igual a 1 si la persona ij -ésima es familiar de un caso y 0 si no lo es. Este coeficiente γ refleja el aumento del riesgo asociado sin haber sido diagnosticado por medio de un caso, y $\exp(\gamma)$ es la razón de posibilidades que compara el riesgo en los familiares de los casos con el de los familiares de los controles. Mientras que esto tiene la apariencia de un análisis de regresión logística habitual, si la variable indicadora simplemente se añade al modelo estándar, debe entonces suponerse independencia completa entre los miembros de la familia. Liang (100) empleó un enfoque de cuasi-verosimilitud que utiliza todos los posibles pares de familiares de los casos y de los controles dentro de cada estrato para obtener estimadores de b y γ , que son estadísticamente coherentes y no dependen de la suposición de independencia completa entre los familiares de casos y controles.

Este método para convertir una prueba de la razón de posibilidades de una tabla de 2×2 en un modelo de regresión logística permite considerar simultáneamente factores de riesgo en los miembros de la fami-

lia y el estado del índice (caso o control) cuando se está probando la existencia de agregación familiar y evaluando si existen pruebas de esta influencia aun después de considerar dichos factores y de hacer ajustes atendiendo a ellos. También se predice el riesgo de una forma algo más directa. Maestri et al. (101) utilizaron este método para mostrar que mientras algunas formas de malformación cardiovascular congénita sí muestran agregación familiar significativa —es decir, los familiares de los casos tienen mayor riesgo que los de los controles—, otros tipos de malformaciones del corazón no la tienen. Por lo tanto, un análisis apropiado de las familias valoradas mediante un estudio de casos y controles puede confirmar la existencia de agregación familiar, así como ayudar a identificar subgrupos heterogéneos de enfermedades.

En los estudios de casos y controles no apareados también se pueden incorporar efectos de covariables al buscar agregación familiar. Los modelos estadísticos basados en modelos de regresión logística pueden incorporar datos de factores de riesgo observados (covariables), así como parámetros que midan el grado de riesgo de agregación familiar. Un modelo logístico de este tipo utiliza el recuento de todos los familiares afectados como variable independiente para predecir el riesgo del miembro j -ésimo de la i -ésima familia (de tamaño n_i), es decir,

$$\ln \frac{P(Y_{ij} | X_{ij}, Y_{ij})}{1 - P(Y_{ij} | X_{ij}, Y_{ij})} = \alpha + \beta X_{ij} + \gamma \sum_{j \neq i, n_i} Y_{ij}$$

donde X_{ij} es un vector de covariables observadas en el ij -ésimo individuo y Y_{ij} representa todos los familiares que no sean este individuo j -ésimo. Según este modelo, $\exp(\gamma)$ se interpreta como la razón de posibilidades apareada, que refleja el riesgo asociado a tener un familiar afectado, independientemente de los efectos de las covariables del propio individuo. Connolly y Liang (102) desarrollaron un enfoque de cuasi-verosimilitud para estimar los parámetros de este modelo (α , β y γ), que brinda estimadores casi tan eficientes como los estimadores de

máxima verosimilitud convencionales, pero mucho más simples de calcular. Independientemente, Hopper et al. (103) desarrollaron una clase restringida de modelos logarítmico-lineales que requieren menos suposiciones sobre las distribuciones y son apropiados para datos de estudios de familias. Hopper y Derrick (104) demostraron cómo los datos de familias pueden proveer estimaciones de "correlaciones" inter e intraclase, que son funciones de las razones de posibilidades si se presume que no hay interacción de segundo orden o mayor en un modelo logarítmico-lineal.

Liang et al. (105) ampliaron este enfoque a la posibilidad de clases de familiares múltiples, por ejemplo, padres e hijos, mediante la inclusión de razones de posibilidades intraclase por pares (es decir, $\exp(\gamma_{her})$ y $\exp(\gamma_{pad})$) y razones de posibilidades interclase ($\exp(\gamma_{her-pad})$). Ello permite probar la existencia de agregación familiar en cada generación separadamente, algo que puede ser crítico para enfermedades de aparición tardía que producen una mortalidad importante (106). Por ejemplo, los hermanos de casos pueden mostrar una agregación familiar fuerte, pero los hijos de casos no presentarla por ser demasiado jóvenes para tener un riesgo alto de enfermar (esto es, la razón de posibilidades $\exp(\gamma_{her})$, puede ser mayor que 1, mientras que la razón de posibilidades dentro de la clase "hijos", $\exp(\gamma_{hij})$, puede que sea igual a 1). A la inversa, el riesgo de enfermar de familiares de mayor edad puede ser menor si la mortalidad es elevada en las personas afectadas, de manera que los padres observados que fueron evaluados por medio de un caso son supervivientes seleccionados no enfermos (106). En ambas situaciones, es importante evaluar las diferencias entre clases de familiares valorados por medio de casos con la enfermedad. Si bien este enfoque cuasiverosímil ofrece varias ventajas, exige estimar un mayor número de parámetros a medida que aumentan las clases. En el modelo, para k clases habrá k parámetros γ intraclase y $(k - 1)/2$ parámetros γ interclase. Este hecho, obviamente, impone un límite en el

número de clases que pueden ajustarse para familias de estructura arbitraria.

Incorporación del análisis de enlace en los estudios de casos y controles

Con la creciente disponibilidad de marcadores anónimos del ADN en cromosomas diferentes, los métodos de pares hermanos (*her-par*, *sib-pair*, en inglés) se han venido usando cada vez más como enfoque alternativo al análisis de enlace formal en la búsqueda de genes de susceptibilidad de enfermedades frecuentes tales como la diabetes, el cáncer, y las malformaciones congénitas (107–109). El método *her-par* se ha desarrollado para rasgos cualitativos y cuantitativos (110, 111) y puede extenderse más allá de los hermanos a pares arbitrarios de familiares (112).

El aspecto básico en el método de *her-par* afectados (para rasgos cualitativos) es comparar la distribución del número de alelos que son idénticos por descendencia (IPD) en un locus marcador entre pares de hermanos afectados con la distribución teórica esperada en ausencia de enlace entre el locus de enfermedad y el locus marcador. Por ejemplo, para *her-pares* afectados, una segregación independiente para un locus de enfermedad y un locus marcador predice una probabilidad de 25% de no compartir un alelo IPD, una probabilidad de 50% de compartir un alelo IPD y una probabilidad de 25% de compartir dos. Si los *her-pares* afectados comparten significativamente más alelos en el locus marcador, suele inferirse que existen pruebas de enlace genético entre el locus de enfermedad y el locus marcador. Este enfoque frecuentemente requiere efectuar pruebas a los padres para encontrar la distribución de alelos. Puede usarse como una "excursión de pesca" (*fishing expedition*) destinada a buscar genes candidatos para enfermedades frecuentes de etiología compleja. Aunque los pares de familiares pueden incluir personas afectadas y no afectadas, las muestras que solo incluyen pares afectados de familiares pueden

aportar, con ciertas suposiciones, una poderosa estrategia para estudiar enfermedades relativamente raras en las que interviene un solo mecanismo etiológico (113).

Una alternativa al método clásico herpar es un estudio epidemiológico basado en familias en el cual los probandos (casos afectados) podrían primero provenir de casos incidentes en la población (por ej., de registros bien definidos) (114). Pueden aplicarse los diseños tradicionales de estudio (cohorte y casos y controles), y el método epidemiológico para buscar asociaciones entre una enfermedad y uno o más factores de riesgo puede adaptarse con objeto de probar asociaciones entre una enfermedad y uno o más loci de genes (número de alelos IPD compartido con el probando). En esencia, un problema de enlace puede transformarse en un problema de asociación, en el cual las asociaciones encontradas podrían utilizarse a fin de inferir la existencia de enlace entre loci de enfermedades y loci marcadores.

En un método de cohorte, se sigue la evolución de los familiares no afectados de los probandos (por ejemplo, hermanos) con el propósito de valorar el desarrollo de la enfermedad. Para cada hermano de un probando, la "exposición" se define como el número de alelos IPD compartidos con el probando en un locus marcador. Los riesgos de enfermar pueden entonces estimarse para los tres grupos (comparten 0, comparten 1 y comparten 2 alelos IPD). Como muchas enfermedades tienen riesgos que dependen de la edad, deberán calcularse los estimadores acumulados del riesgo de enfermar (por ej., con métodos de tablas de vida), y estos proveerán una estimación de la penetración de la enfermedad. Según la hipótesis nula de que no hay enlace entre el locus de susceptibilidad a la enfermedad y el locus marcador, se espera que los riesgos de enfermar sean idénticos en los tres grupos.

En un estudio de casos y controles anidado (115, 116), se sigue en el tiempo una cohorte fija de participantes en un estudio. Las personas que desarrollan la enfermedad (casos) y una muestra de las personas de la

cohorte total (estudio de casos-cohorte) o una muestra de personas que no desarrollan la enfermedad (método de casos y controles) se comparan con respecto a exposiciones o acontecimientos pretéritos. Este enfoque podría ser efectivo en función del costo, especialmente cuando se usan marcadores biológicos (genéticos, nutricionales, infecciosos, etc.) obtenidos de toda la población en el momento de su alistamiento, debido a que las pruebas de laboratorio se realizan en una muestra de las personas y no con la población completa del estudio. En los estudios basados en familias, los casos son hermanos del probando que con el tiempo se enfermarán y los controles se escogen aleatoriamente entre los hermanos de los probandos. Aquí, en lugar de evaluar a todos los familiares por el número de alelos IPD compartidos con el probando, solo se necesita un subconjunto (aunque puede disponerse de muestras de todos los hermanos). No obstante, para obtener resultados válidos hay que ser cauteloso en el proceso de muestreo de casos y controles. Para enfermedades crónicas que se manifiestan en la edad adulta, ello puede requerir apareamiento individual o por grupos de casos y controles según la edad (o grupos de edad) en que se diagnostican los casos (117, 118). Como alternativa, al analizar los datos debería considerarse la edad (y otras covariables) para evitar el sesgo relacionado con la supervivencia selectiva (116–118).

Como en un estudio de cohorte, la "exposición" de casos y controles se define como el número de alelos IPD que cada uno comparte con el probando en el locus marcador. Las razones de posibilidades se obtienen comparando la distribución de frecuencias de los alelos IPD entre casos y controles. En un enfoque de caso-cohorte, las razones de posibilidades que se obtienen comparando el grupo que comparte 2 y el grupo que comparte 1 con el grupo que comparte 0 son idénticas a las razones de riesgos obtenidas con el método de cohorte (cuadro 1). En el método de casos y controles, las razones de posibilidades deben aproximarse estrechamente a los valores de

CUADRO 1. Estudios de casos y controles basados en la familia para marcadores de ADN enlazados

Haplotipos IPD compartidos con el probando (No.)	Diseño no apareado			RP
	Casos	Controles		
0	a	b		1
1	c	d		cb/ad
2	e	f		eb/af
(Controles)	Diseño apareado (1:1) casos			RP
	0	1	2	
0	a	b	c	1
1	d	e	f	b/d
2	g	h	i	c/g

IPD = idéntico por descendencia.

RP = razón de posibilidades.

la razón de riesgos siempre que la enfermedad sea relativamente rara. En una variante de este enfoque, los controles pueden elegirse del mismo grupo de hermanos que los casos. Las "exposiciones" de casos y controles pueden corresponder al mismo probando. Este método requiere familias con al menos un pariente afectado y uno no afectado entre los hermanos, además del probando. Las razones de posibilidades para diseños apareados 1:1 también se muestran en el cuadro 1. Si bien los diseños apareados de hermanos maximizan la comparabilidad entre casos y controles con respecto a otras variables de la familia, el número de familias que pueden emplearse en el análisis se reduce.

En este enfoque de casos y controles también pueden evaluarse, tanto en relación con el riesgo como en busca de pruebas de interacción estadística con el marcador genético (la variable 0, 1, 2 IPD), covariables entre las que se incluyen otros marcadores genéticos y exposiciones ambientales. Para evaluar varios factores simultáneamente

pueden emplearse los análisis estratificado y multivariante. Los efectos de epistasis entre diferentes loci pueden evaluarse indirectamente buscando la existencia de interacción en diferentes loci marcadores en relación el riesgo de enfermar. En los diseños de casos y controles apareados pueden usarse modelos de regresión logística condicional. La variable edad al inicio puede incluirse en esos modelos logísticos (119).

CONSIDERACIONES FINALES

En esta revisión se ha ofrecido un panorama de las aplicaciones del método de casos y controles en epidemiología genética, tanto en entornos poblacionales como familiares. Este método constituye un recurso único para estudiar la función de los factores genéticos, puesto que esos factores no varían con el tiempo. Es previsible que en la búsqueda de las causas de las enfermedades los estudios de casos y controles basados en familias se utilizarán cada vez con mayor frecuencia. Es estos estudios, los investigadores pueden evaluar, usando un diseño único, el papel que desempeñan los factores ambientales, los loci de genes específicos y las interacciones gen-ambiente en la etiología y la patogénesis de las enfermedades humanas.

REFERENCIAS

1. Morton NE. *Outline of genetic epidemiology*. Basel, Switzerland: S. Karger, AG; 1982.
2. Khoury MJ, Beaty TH, Cohen BH. *Fundamentals of genetic epidemiology*. New York, NY: Oxford University Press; 1993.
3. US Congress. *Mapping our genes. Genome projects: how big, how fast?* Baltimore, MD: The Johns Hopkins University Press; 1988.
4. Watson JD. The Human Genome Project: past, present and future. *Science* 1990;248:44-48.
5. Watson JD, Cook-Deegan RM. Origins of the human genome project. *FASEB J* 1991;5:8-11.
6. Jordan E [Editorialista invitado]. The human Genome Project: where did it come from, where is it going? *Am J Hum Genet* 1992;51:1-6.

7. Cohen BH. Chronic obstructive pulmonary disease: a challenge in genetic epidemiology. *Am J Epidemiol* 1980;112:274–288.
8. King MC, Lee GM, Spinner N, et al. Genetic epidemiology. *Annu Rev Public Health* 1984; 1:1–52.
9. Huether CA. Epidemiologic aspects of Down syndrome: sex ratio, incidence and recent impact of prenatal diagnosis. *Issues Rev Teratol* 1990;5: 283–316.
10. Cassidy SB, Li L, Erickson RP. Clinical correlation of molecular 15q deletions and maternal disomy for chromosome 15 in Prader-Willi syndrome [Resumen]. *Am J Hum Genet* 1992; 51:A92.
11. Janerich DT, Bracken MB. Epidemiology of trisomy 21: a review and theoretical analysis. *J Chronic Dis* 1986;39:1076–1093.
12. Hassold T, Jacobs PA. Trisomy in man. *Annu Rev Genet* 1984;18:69–97.
13. Antonarakis SE, and the Down Syndrome Collaborative Group. Parental origin of the extra chromosome in trisomy 21 indicated by analysis of DNA polymorphisms. *N Engl J Med* 1991;324: 872–876.
14. Sherman SL, Takaesu N, Freeman S, et al. Trisomy 21: association between reduced recombination and non-disjunction. *Am J Hum Genet* 1991;49:608–620.
15. Olshan AF, Baird PA, Tesckle K. Paternal occupational exposures and the risk of Down syndrome. *Am J Hum Genet* 1989;44:646–651.
16. Cassidy SB, Gainey AJ, Butler MG. Occupational hydrocarbon exposure among fathers of Prader-Willi syndrome patients with and without deletions of 15q. *Am J Hum Genet* 1989;44:806–810.
17. Cohen BH, Lilienfeld AM, Kramer S, et al. Parental factors in Down syndrome: results of the second Baltimore case-control study. En: Hook EB, ed. *Population Cytogenetics*. New York, NY: Academic Press, Inc; 1977:301–352.
18. Erickson JD. Down syndrome, paternal age, maternal age, and birth order. *Ann Hum Genet* 1978;41:289–298.
19. Kline J, Levin B, ShROUT P, et al. Maternal smoking and trisomy among spontaneously aborted conceptions. *Am J Hum Genet* 1983;35:421–431.
20. Khoury MJ, Flanders WD, James LM, et al. Human teratogens, prenatal mortality, and selection bias. *Am J Epidemiol* 1989;130:361–370.
21. Hook EB, Regal RR. Conceptus viability, malformation and suspect mutagens or teratogens in humans: the Yule-Simpson paradox and implications for inference of causality in studies of mutagenicity and teratogenicity limited to human livebirths. *Teratology* 1991;43:53–59.
22. Regal RR, Hook EB. Interrelationship of relative risks of birth defects in embryonic and fetal deaths, in livebirths and in all conceptuses. *Epidemiology* 1992;3:247–252.
23. Hassold TJ, Jacobs PA. Trisomy in man. *Annu Rev Genet* 1984;18:69–97.
24. Hook EB, Cross PK. Cigarette smoking and Down syndrome. *Am J Hum Genet* 1985;37:1216–1224.
25. Khoury MJ, James LM, Flanders WD, et al. Recurring weak associations obtained from epidemiologic studies of suspected human teratogens. *Teratology* 1992;46:69–78.
26. Kline J, Levin B, Stein Z, et al. Cigarette smoking and trisomy 21 at amniocentesis. *Genet Epidemiol* 1993;10:35–42.
27. Khat M, Khoury M. Inbreeding and diseases: demographic, genetic, and epidemiologic perspectives. *Epidemiol Rev* 1991;13:28–41.
28. Freire-Maia N. Inbreeding levels in different countries. *Soc Biol* 1982;29:69–81.
29. Al-Awadi SA, Naguib KK, Moussa MA, et al. The effect of consanguineous marriages on reproductive wastage. *Clin Genet* 1986;29:384–388.
30. Khat M. Consanguineous marriages in Beirut: time trends, spatial distributions. *Soc Biol* 1989;35:324–330.
31. Hafez M, El-Tahan H, Awadalla M, et al. Consanguineous matings in the Egyptian population. *J Med Genet* 1983;20:58–60.
32. Jaber L, Merlob P, Bu X, et al. Marked parental consanguinity as a cause for increased major malformations in an Israeli Arab community. *Am J Med Genet* 1992;44:1–6.
33. Cavalli-Sforza LL, Bodmer WF. *The genetics of human populations*. San Francisco, CA: W. H. Freeman and Company; 1971:341–386.
34. Wright S. Coefficients of inbreeding and relationships. *Am Naturalist* 1922;56:330–338.
35. Boyce AJ. Computation of inbreeding and kingship coefficients on extended pedigrees. *J Hered* 1983;74:400–404.
36. Khoury MJ, Cohen BH, Chase GA, et al. An epidemiologic approach to the evaluation of the effect of inbreeding on prereproductive mortality. *Am J Epidemiol* 1987;125:251–262.
37. Freire-Maia N, Elisbao T. Inbreeding effects on morbidity: a review of the world literature. *Am J Med Genet* 1984;18:391–400.

38. Khoury MJ, Cohen BH, Diamond EL, et al. Inbreeding and prereproductive mortality in the Old Order Amish: III, Direct and indirect effects of inbreeding. *Am J Epidemiol* 1987;125:473-483.
39. Jorde LB, Fineman RM, Martin RA. Epidemiology and genetics of neural tube defects: an application of the Utah Genealogical Data Base. *Am J Phys Anthropol* 1983;62:23-31.
40. Roberts DF. Consanguinity and multiple sclerosis in Orkney. *Genet Epidemiol* 1991;8:147-152.
41. Reitnauer PJ, Go RCP, Acton RT, et al. Evidence for genetic admixture as a determinant in the occurrence of insulin-dependent diabetes mellitus in U.S. Blacks. *Diabetes* 1982;31:532-537.
42. Shaw SJ, Vadheim CM, Rotter JL, et al. Ancestral origin of insulin-dependent diabetes in Mexican-Americans. *Int J Epidemiol* 1992;21:725-729.
43. Knowler WC, Williams RC, Pettitt DJ, et al. Gm3;5;13;14 and type 2 diabetes mellitus: an association in American Indians with genetic admixture. *Am J Hum Genet* 1988;43:520-526.
44. Azevedo ES, da Costa TP, Silva MC, et al. The use of surnames in interpreting gene frequency and past racial admixture. *Hum Biol* 1983;55:235-242.
45. Reed TE. Caucasian genes in American Negroes. *Science* 1969;165:762-768.
46. Chakraborty R, Kamboh MI, Nwankwo M, et al. Caucasian genes in American blacks: new data. *Am J Hum Genet* 1992;50:145-155.
47. Moy CS, LaPorte RE, Dorman JS, et al. Heritage research: the next generation of migrant studies [Resumen]. *Am J Epidemiol* 1989;130:819-820.
48. Morton NE. Linkage and association. En: Rao DC, Elston RC, Kuller LH, et al, eds. *Genetic epidemiology of coronary heart disease: past, present and future*. New York, NY: Alan R. Liss, Inc; 1984:245-265.
49. Greenberg DA. Linkage analysis of necessary disease loci versus susceptibility loci. *Am J Hum Genet* 1993;52:135-143.
50. Clerget-Darpoux F, Bonaiti-Pellie C. Strategies based on marker information for the study of human diseases. *Ann Hum Genet* 1992;56:145-153.
51. Hulka BS, Margolin BH. Methodological issues in epidemiologic studies using biologic markers. *Am J Epidemiol* 1992;135:200-209.
52. Dorman JS. Molecular epidemiology: our challenge for the twenty-first century. (En prensa.)
53. Khoury MJ, Beaty TH, Flanders WD. Epidemiologic approaches to the use of DNA markers in the search for disease susceptibility genes. *Epidemiol Rev* 1990;12:41-55.
54. Ardinger HH, Buetow KH, Bell GI, et al. Association of genetic variation of the transforming growth factor-alpha gene with cleft lip and palate. *Am J Hum Genet* 1989;45:348-353.
55. Chenevix-Trench G, Jones K, Green A, et al. Further evidence of an association between genetic variation in transforming growth factor alpha and cleft lip and palate. *Am J Hum Genet* 1991;48:1012-1013.
56. Holder SE, Vintiner GM, Malcolm S. Nonsyndromic cleft lip and palate: association and linkage studies with transforming growth factor alpha gene. [Resumen]. *Cytogenet Cell Genet* 1992;58(suppl):1869.
57. Sassari R, Bartlett SP, Feng H, et al. Association between alleles at the transforming growth factor alpha locus and the occurrence of cleft lip. *Am J Med Genet* 1993;45:565-569.
58. Shiang R, Lidral AC, Ardinger HH, et al. Association of transforming growth-factor alpha gene polymorphisms with nonsyndromic cleft palate only (CPO). *Am J Hum Genet* 1993;53:836-843.
59. Todd JA, Bell JL, McDevit HQ. HLA-DQ beta gene contributes to susceptibility and resistance to insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature* 1987;329:559-604.
60. Morel PA, Dorman JS, Todd JA, et al. Aspartic acid at position 57 of the HLA-DQ beta chain protects against type I diabetes: a family study. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:8111-8115.
61. Khoury MJ, Dorman JS. Genetic disease. En: Schulte PA, Perera FP, eds. *Molecular epidemiology: principles and practices*. San Diego, CA: Academic Press, Inc; 1993:365-383.
62. Groop LC, Kankuri M, Schalin-Jantti C, et al. Association between polymorphism of the glycogen synthase gene and non-insulin dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993;328:10-14.
63. Aylesh R, Idle JR, Ritchie JC, et al. Metabolic oxidation phenotypes as markers for susceptibility to lung cancer. *Nature* 1984;312:169-170.
64. Caporaso N, Hayes RB, Dosemeci M, et al. Lung cancer risk, occupational exposure and the debrisoquine metabolic phenotype. *Cancer Res* 1989;49:3675-3679.
65. Omenn GS, Motulsky AG. Ecogenetics: genetic variation in susceptibility to environmental agents. En: Cohen BH, Lilienfeld AM, Huang PC. *Genetic issues in public health and medicine*. Springfield, IL: Charles C Thomas, Publisher; 1978:83-111.

66. Vesell ES. Pharmacogenetics: multiple interactions between genes and environment as determinant of drug response. *Am J Med* 1979;66:183-187.
67. Haldane JBS. The interaction of nature and nurture. *Ann Eugenics* 1946;13:197-205.
68. Ottman R. An epidemiologic approach to gene-environment interaction. *Genet Epidemiol* 1990;7:177-185.
69. Khoury MJ, Adams MJ, Flanders WD. An epidemiologic approach to ecogenetics. *Am J Hum Genet* 1988;42:89-95.
70. Cartwright RA, Glashan RW, Rogers HJ, et al. Role of *N-acetyl* transferase phenotypes in bladder carcinogenesis: a pharmacogenetic-epidemiological approach to bladder cancer. *Lancet* 1982;2:842-846.
71. Wacholder S, Silverman DT, McLaughlin JK, et al. Selection of controls in case-control studies: II. Types of controls. *Am J Epidemiol* 1992;135:1029-1041.
72. Goldstein AM, Hodge SE, Haile RW. Selection bias in case-control studies using relatives as the controls. *Int J Epidemiol* 1989;18:985-989.
73. Flegal KM, Brownie C, Haas JD. The effects of exposure misclassification on estimates of relative risk. *Am J Epidemiol* 1986;123:736-751.
74. Svejgaard A, Jersild C, Nielson LS, et al. HLA antigens and disease: statistical and genetical considerations. *Tissue Antigens* 1974;4:95-105.
75. Cooper DN, Clayton JF. DNA polymorphisms and the study of disease associations. *Hum Genet* 1988;78:299-312.
76. Rothman KH. *Modern epidemiology*. Boston, MA: Little, Brown and Company; 1986:7-22.
77. Susser M, Susser E. Separating heredity and environment. I. Genetic and environmental indicators. En: Susser M, ed. *Epidemiology, health and society: selected papers*. New York, NY: Oxford University Press; 1987:103-114.
78. Susser M, Susser E. Separating heredity and environment: II. Research designs and strategies. En: Susser M, ed. *Epidemiology, health and society: selected papers*. New York, NY: Oxford University Press; 1987:114-128.
79. Khoury MJ, Beaty TH, Cohen BH. The interface of genetics and epidemiology. *J Chronic Dis* 1986;39:963-978.
80. Dorman JS, Trucco M, LaPorte RE. Family studies: the key to understanding the genetic and environmental etiology of chronic disease? *Genet Epidemiol* 1988;5:305-310.
81. Khoury MJ, Beaty TH, Cohen BH. Interaction between genetics and epidemiology in the literature. *Genet Epidemiol* 1986;3:269-277.
82. Phillips PH, Linet MS, Harris EL. Assessment of family history information in case-control cancer studies. *Am J Epidemiol* 1991;133:757-765.
83. Sattin RW, Rubin GL, Webster LA, et al. Family history and the risk of breast cancer. *JAMA* 1985;253:1908-1913.
84. La Vecchia C, Negri E, Franceschi S, et al. Family history and the risk of stomach and colorectal cancer. *Cancer* 1992;70:50-55.
85. Steinberg GD, Carter BS, Beaty TH, et al. Family history and the risk of prostate cancer. *Prostate* 1990;17:337-347.
86. Hastrup JL, Hotchkiss AP, Johnson CA. Accuracy of knowledge of family history of cardiovascular disorders. *Health Psychol* 1985;4:291-306.
87. Rasmussen S, Mulinare J, Khoury MJ, et al. Accuracy of birth defects histories obtained through maternal interviews. *Am J Hum Genet* 1990;46:478-485.
88. Cohen BH, Ball WC, Bias W, et al. A genetic-epidemiologic study of chronic obstructive pulmonary disease: I. Study design and preliminary observations. *Johns Hopkins Med J* 1975;137:95-104.
89. Beaty TH, Cohen BH, Newill CA, et al. Impaired pulmonary function as a risk factor for mortality. *Am J Epidemiol* 1982;116:102-113.
90. Chase GA, Folstein MF, Breitner JC, et al. The use of life tables and survival analysis in testing genetic hypotheses, with an application to Alzheimer's disease. *Am J Epidemiol* 1983;117:590-597.
91. Self SG, Prentice RL. Incorporating random effects into multivariate relative risk regression models. En: Moolgavkar SH, Prentice RL, eds. *Modern statistical methods in chronic disease epidemiology: proceedings of a conference*. New York, NY: John Wiley and Sons, Inc; 1986:167-177.
92. Carter BS, Beaty TH, Steinberg GD, et al. Mendelian inheritance of familial prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:3367-3371.
93. Hrubek Z, Robinette CD. The study of human twins in medical research. *N Engl J Med* 1984;310:435-441.
94. Schull WJ, Weiss KM. Genetic epidemiology: four strategies. *Epidemiol Rev* 1980;2:1-18.
95. Goodwin DW, Schulsinger F, Hermansen L, et al. Alcohol problems in adoptees raised apart from biological parents. *Arch Gen Psychiatry* 1973;28:238-243.

96. Stunkard AJ, Sorenson TIA, Hanis C, et al. An adoption study of human obesity. *N Engl J Med* 1986;314:193–198.
97. Sorenson TIA, Nielsen GG, Andersen PK, et al. Genetic and environmental influences on premature death in adult adoptees. *N Engl J Med* 1988;318:727–732.
98. Stunkard AJ, Harris JR, Pedersen NL, et al. The body mass index of twins reared apart. *N Engl J Med* 1990;322:1483–1487.
99. Liang KY, Beaty TH, Cohen BH. Application of odds ratio regression models for assessing familial aggregation from case-control studies. *Am J Epidemiol* 1986;124:678–683.
100. Liang KY. Extended Mantel-Haenszel estimating procedure for multivariate logistic regression models. *Biometrics* 1987;43:289–299.
101. Maestri NE, Beaty TH, Liang KY, et al. Assessing familial aggregation of congenital cardiovascular malformations in case-control studies. *Genet Epidemiol* 1988;5:343–354.
102. Connolly M, Liang KY. Conditional logistic regression models for correlated binary data. *Biometrika* 1988;75:501–506.
103. Hopper JL, Hannah MC, Matthews JD. Genetic analysis workshop: II, Pedigree analysis of a binary trait without assuming an underlying liability. *Genet Epidemiol* 1984;1(suppl):183–188.
104. Hopper JL, Derrick PL. A log-linear model for binary pedigree data. *Genet Epidemiol* 1986;1(suppl):73–82.
105. Liang KY, Zeger SL, Qaqish BF. Multivariate regression analyses for categorical data. *J R Stat Soc Ser B*. (En prensa.)
106. Liang KY, Beaty TH. Measuring familial aggregation using odds ratio regression models. *Genet Epidemiol* 1991;8:361–370.
107. Day N, Simmons M. Disease susceptibility genes: their identification by multiple case family studies. *Tissue Antigens* 1976;8:109–119.
108. Motro U, Thomson G. The affected sib pair method: I, Statistical features of the affected sib pair method. *Genetics* 1985;110:525–538.
109. Thomson G. Determining the mode of inheritance of RFLP-associated diseases using the affected sib-pair method. *Am J Hum Genet* 1986;39:207–221.
110. Haseman JK, Elston RC. The investigation of linkage between a quantitative trait and a marker locus. *Behav Genet* 1972;2:3–19.
111. Amos CI, Elston RC, Wilson AF, et al. A more powerful robust sib-pair test of linkage for quantitative traits. *Genet Epidemiol* 1989;6:435–449.
112. Weeks DE, Lange K. The affected-pedigree member method of linkage analysis. *Am J Hum Genet* 1988;42:315–326.
113. Blackwelder WC, Elston RC. Comparison of sib-pair linkage tests for disease susceptibility loci. *Genet Epidemiol* 1985;2:85–97.
114. Khoury MJ, Flanders WD, Lipton RB, et al. The affected sib-pair method in the context of an epidemiologic study design. *Genet Epidemiol* 1991;8:277–282.
115. Prentice RL. A case-control design for epidemiologic cohort studies and disease prevention trials. *Biometrika* 1986;73:1–11.
116. Flanders WD, Louv WC. The exposure odds ratio in nested case-control studies with competing risks. *Am J Epidemiol* 1986;124:684–692.
117. Lubin JH, Gail MH. Biased selection of controls for case-control analyses of cohort studies. *Biometrika* 1984;70:63–76.
118. Flanders WD, Dersimonian R, Rhodes P, et al. Estimation of risk ratios in case-base studies with competing risks. *Stat Med* 1990;9:423–435.
119. Flanders WD, Khoury MJ. Extensions to methods of sib-pair linkage analyses. *Genet Epidemiol* 1991;8:399–408.