

# ¿Qué hacer cuando en los estudios de epidemiología biomolecular la distribución genotípica no se ajusta al equilibrio de Hardy-Weinberg?

FEDERICO SORIGUER Y SONSOLES MORCILLO

*Servicio de Endocrinología y Nutrición. Hospital Universitario Carlos Haya. FUNDACIÓN IMABIS. Málaga. España.*

## COMPARISON OF GENOTYPE FREQUENCIES DEVIATING FROM HARDY-WEINBERG EQUILIBRIUM

Biomolecular epidemiology studies are becoming increasingly common, both in case series and populations. However, not all these studies use appropriate methodology to confirm the results. This occurs, for example, with the use of Hardy-Weinberg equilibrium of polymorphic distribution, an evaluation which is required before starting any type of genetic study.

Little consideration has been given to this question. In this article we discuss the use of Hardy-Weinberg equilibrium and suggest guidelines that should be followed for correct data interpretation and beneficial use of this tool for verifying equilibrium.

*Key words:* Hardy-Weinberg equilibrium. Association studies. Polymorphism.

La epidemiología biomolecular es un instrumento utilizado con creciente frecuencia tanto en los estudios de series de casos como en los estudios de poblaciones. Sin embargo, el uso adecuado de la metodología de este tipo de estudios dista mucho de haberse generalizado, y no es infrecuente la publicación de trabajos en los que el rigor metodológico es escaso, como ocurre con el uso del ajuste al equilibrio de Hardy-Weinberg de una distribución polimórfica cuya evaluación es una condición necesaria previa a cualquier tipo de estudio genético.

La reflexión sobre esta cuestión en la literatura médica es escasa, por lo que nos ha parecido interesante reflexionar sobre este tema a la vez que sugerimos algunas pautas a seguir para una correcta interpretación de los datos y un buen uso de herramientas como el cálculo del equilibrio de Hardy-Weinberg.

*Palabras clave:* Equilibrio de Hardy-Weinberg. Estudios de asociación. Polimorfismo.

En los últimos años ha aumentado extraordinariamente el número de estudios de asociación entre las variantes de secuencias de ADN y determinados fenotipos o enfermedades. En estos estudios la presencia de una asociación estadística independiente del azar entre el genotipo y el fenotipo podría implicar algún tipo de asociación biológica, directa o indirecta, entre ambos, o de riesgo de padecer la enfermedad en función de determinado genotipo. A pesar de la gran utilidad de los diseños de casos y controles para la investigación de este tipo de asociación y de la profusión de investigaciones, es frecuente la falta de reproducibilidad entre los diferentes estudios publicados<sup>1</sup>.

Esta falta de reproducibilidad puede deberse a sesgos en la información reportada, tanto en la elección de casos o controles como en la elección de marcadores genéticos, errores de genotipificación, no considerar factores de confusión o métodos analíticos inapropiados<sup>2</sup>.

Sin embargo, para que una asociación pueda ser asumida como biológicamente válida es preciso antes estar seguro de que no se

Este artículo forma parte de un proyecto parcialmente financiado por el Fondo de Investigación Sanitaria (PI021311 y la Red de Metabolismo y Nutrición RCMYN C03-08).

Correspondencia: Dra. S. Morcillo.  
Servicio de Endocrinología y Nutrición. Hospital Civil.  
Plaza del Hospital Civil, s/n. 29009-Málaga. España.  
Correo electrónico: sonsoles.morcillo.exts@juntadeandalucia.es

Manuscrito recibido el 11-1-2006 y aceptado para su publicación el 12-7-2006.

han producido sesgos sistemáticos o aleatorios en el diseño y en la elaboración del trabajo y de que se ha respetado las restricciones que todo modelo de análisis estadístico conlleva.

Una manera rápida de valorar la situación de la distribución de frecuencias de los genotipos estudiados es mediante el ajuste al equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE)<sup>3</sup>. En la reproducción sexual hay una relación entre el genotipo de una generación y el patrón de apareamiento de los padres de esta generación. Si el apareamiento es al azar entonces la frecuencia genotípica de los descendientes está determinada por la frecuencia alélica. La frecuencia alélica es la variable cuantitativa más importante desde el punto de vista genético de cualquier población. Para un sistema dialélico, las frecuencias de los alelos A y a son, respectivamente, p y q, de forma que  $(p + q) = 1$ . De este modo, las frecuencias genotípicas serían: AA =  $p^2$ ; Aa =  $2pq$  y aa =  $(1 - p)^2$ , siendo la suma de las frecuencias igual a 1. Si no hay diferencias significativas entre las frecuencias observadas y las esperadas se dice que la población está en HWE. Si, por el contrario, hay un incumplimiento de la distribución teórica según Hardy-Weinberg, la población no estaría en equilibrio.

Las asunciones de HWE implican que<sup>4</sup>:

1. El tamaño de la población es infinito (suficientemente grande).
2. El apareamiento es al azar.
3. Varones y mujeres tienen frecuencias alélicas similares.
4. No hay mutación, migración ni selección.

Tradicionalmente, la desviación del equilibrio se ha considerado como una indicación de que los alelos no segregan de forma independiente, el apareamiento no es al azar, o que los alelos reflejan una mutación reciente que aún no ha alcanzado el equilibrio. Sin embargo, existen otras posibilidades a tener en cuenta para este desequilibrio: errores de genotipificación en el laboratorio, sesgos en la selección de los sujetos controles o la existencia de una estratificación de la población<sup>5</sup>.

Dentro de un mismo locus pueden existir varios alelos, pero la suma de todas las frecuencias relativas de los diferentes alelos de un mismo locus debe sumar 1. El error estándar de esta estimación sigue una distribución binomial y puede ser calculado a partir de  $\sqrt{[p(1-p)/2N]}$ . De manera análoga, la frecuencia genotípica ( $n_g$ ) de un determinado locus entre N individuos diploides es  $n_g/N$ . Un locus dialélico con alelos A y a puede tener teóricamente 3 genotipos, AA, Aa y aa, aunque no todos los genotipos tienen que encontrarse en una determinada población.

Una desviación de las condiciones de HWE puede significar que algunas de aquellas condiciones no se cumplen o bien que ha habido algún tipo de sesgo en el diseño. En los estudios de asociación de casos y

controles es de gran importancia que el grupo control esté en equilibrio de HWE para evitar tanto errores técnicos como asociaciones falsas-positivas<sup>2,6</sup>. Sin embargo, una desviación del HWE en el grupo de los casos podría ser indicio de la existencia de una asociación real entre el genotipo y la enfermedad estudiada<sup>7,8</sup>.

No obstante, la prueba del equilibrio de HW en los estudios de epidemiología clínica dista mucho de hacerse de forma sistemática. Algunas revisiones recientes han puesto de manifiesto que en muchas de las publicaciones de los últimos años se ha hecho un uso inadecuado del HWE<sup>9-14</sup>. A las conclusiones que llegan la mayoría de estos trabajos son: 1) si la distribución genotípica no cumple el equilibrio en la población control, los resultados deberían tratarse con cautela ya que la distribución de genotipos observada no estaría representando la de una población sana; y 2) si el HWE no se cumple en la población estudiada (casos), esto podría ser una mayor evidencia para la correlación entre genotipo y enfermedad por lo que, aun no siendo obligatorio el cumplimiento del HWE en los estudios de asociación, la información que aporta es de gran utilidad.

Las desviaciones de HWE pueden deberse a múltiples razones, la mayoría de las cuales son las mismas por las que se pueden explicar muchas de las diferencias encontradas entre algunos estudios:

1. Inadecuado tamaño muestral, para todos o para algunos de los genotipos<sup>15</sup>. En estos casos la posibilidad de cometer un error tipo 1 es muy elevado, pero también errores tipo 2 (que el ajuste a HWE sea satisfecho cuando en realidad si se aumentara el tamaño muestral desaparecería).

2. Variaciones no aleatorias dentro de la estructura genética de la población estudiada, tales como endogamia, mezclas de diferentes grupos étnicos con diferentes frecuencias alélicas del marcador estudiado, y una inadecuada selección dentro de ella, que dará lugar a una sobre o subrepresentación de algunos de los alelos.

3. Presencia no cuantificada de variables de confusión. Por ejemplo, la no consideración de la edad o el sexo en un estudio de asociación entre un marcador de hipercolesterolemia y los valores de colesterol, con la posibilidad de que la distribución por edad y sexo no sea la misma en los casos y en los controles.

4. Desequilibrio de ligamiento (LD) entre el marcador estudiado y otro u otros polimorfismos<sup>3</sup>.

5. Errores de genotipificación.

A pesar de que el ajuste de la distribución genotípica al HWE es muy informativo, su uso en los trabajos publicados dista de hacerse de manera sistemática o de manera adecuada. De hecho en una revisión Xu et al<sup>1</sup> encuentran que en el 12% de los estudios de asociación genotipo-fenotipo revisados, las distribuciones genotípicas no se ajustaron al HWE, con grados

de rechazo que oscilaron entre  $10^{-3}$  y 0,049 y que en otros muchos ni siquiera se planteó el ajuste al HWE o fueron erróneamente presentados como ajustados a la distribución teórica de HWE. Xu et al<sup>1</sup> proponen una serie de recomendaciones a tener en cuenta a la hora de genotipificar polimorfismos. Si los genotipos de los controles de una población determinada no se ajustan al HWE lo primero que hay que hacer es estar seguros de que no se trata de un error de genotipificación, especialmente en los estudios de casos y controles de enfermedades complejas y multifactoriales, pues, por un lado, siendo la medida del efecto (el riesgo) de la asociación genotípica-fenotípica generalmente baja, incluso un modesto error de la genotipificación puede provocar falsos positivos o falsos negativos. La contaminación por el personal del laboratorio o por otras fuentes ambientales del laboratorio, la posibilidad de un sesgo no sistemático por la medición no simultánea de los casos y de los controles, problemas de identificación y codificación e incluso subjetividad en la valoración de las lecturas de los resultados, etc. son algunos de los más frecuentes. Aunque siempre pueden ocurrir errores esporádicos en el proceso de genotipificación, es recomendable que las lecturas y los procedimientos analíticos sean hechos de manera que el instrumentista no conozca cuáles son los casos y los controles. La inclusión de controles en diferentes posiciones en la cadena de análisis, la medición sistemática de duplicados, la doble lectura ciega por otro instrumentista y, finalmente, realizar una prueba de HWE para cada polimorfismo antes de testar cualquier hipótesis de asociación son algunas de las opciones para controlar los errores de genotipificación.

El conocimiento de la distribución teórica del genotipo estudiado es pertinente, además, porque la utilización de determinados estadísticos podría ser inadecuada para contrastar la hipótesis de nulidad de la distribución de frecuencia alélica entre casos y controles. Con frecuencia es utilizado el estadístico de  $\chi^2$  de Pearson. Para una tabla de contingencia de  $2 \times G$ , donde G es el número de genotipos (y 2: casos frente a controles), los grados de libertad pueden ser muchos si el número de genotipos es alto, con lo que esta prueba estadística tiene un poder limitado. En otras ocasiones son comparadas en lugar de los genotipos las frecuencias alélicas en tablas de contingencia de  $2 \times K$  (siendo K el número de alelos), que tiene la ventaja sobre la distribución genotípica de que disminuyen los grados de libertad del contraste de hipótesis. No obstante, no se debe sustituir una prueba por otra ya que ambas proporcionan información importante y diferente sobre la estructura genética de la población.

Consideremos el caso más simple de un gen con dos únicos alelos (A y B), siendo A el alelo de mayor riesgo para determinado fenotipo. Si p es la frecuencia del alelo A, entonces, según HWE, la prevalencia de los genotipos AA, AB y BB, será  $p^2$ ,  $2p(1-p)$  y  $(1-p)^2$ . Es importante señalar que incluso si la población ge-

neral está en HWE, la distribución genotípica del marcador que se espera asociado al riesgo de tener determinado fenotipo (o enfermedad) pueden estar desviados del HWE cuando la asociación es realmente cierta<sup>2,16</sup>.

Por esta razón, para evitar el error tipo 1 de una decisión estadística basada en procedimientos que no tienen en cuenta las restricciones del modelo teórico sobre los que se fundamenta<sup>17</sup>, se ha propuesto que el ajuste al HWE debe ser rutinariamente realizado en los estudios de asociación entre genotipos y fenotipos<sup>6</sup>.

Habitualmente para comparar si las frecuencias alélicas entre casos y controles pertenecen o no a la misma población, se usa la prueba estadística de  $\chi^2$  de Pearson, así como otros estadísticos que asumen la distribución normal de la variable. Algunos autores<sup>17</sup> sugieren que el estadístico  $\chi^2$  de Pearson no debería usarse para calcular frecuencias alélicas, especialmente si éstas no se ajustan al HWE y que sólo deberían compararse las frecuencias genotípicas, y que los riesgos relativos deberían calcularse con otros tipos de pruebas, como el test de tendencia de Armitage<sup>18</sup>.

Schaid y Jacobsen<sup>2</sup> han demostrado que los resultados de los estudios en poblaciones que no se ajustan a HWE, usando el estadístico  $\chi^2$  de Pearson pueden ser muy conservadores, especialmente si la frecuencia de homocigotos para el alelo de alto riesgo es menor que la predicha por HWE, y han calculado la tasa de error tipo 1 y de falsos positivos que comporta su utilización en una población que no se ajusta al HWE; propusieron procedimientos alternativos estadísticos que al menos cuantifiquen el tamaño del error tipo 1, procedimiento que resumimos brevemente.

Si  $p_d$  es la frecuencia del alelo A entre los casos y  $p_c$  la frecuencia del alelo A entre los controles (calculados, simplemente, contando los alelos a partir de los genotipos entre los casos y los controles), un estadístico para comparar ambas prevalencias puede ser:

$$Z = (p_d - p_c) / \sqrt{V} \quad (1)$$

Donde V es la varianza de  $(p_d - p_c)$ . Si la varianza es correctamente especificada z tiene una distribución aproximadamente normal. Cuando existe HWE, la varianza se puede calcular según las propiedades de una distribución binomial:

$$V_{HWE} = p(1-p) (1/2N_d + 1/2N_c) \quad (2)$$

Siendo p la frecuencia alélica común a casos y controles, prevalencia que puede ser calculada considerando conjuntamente los casos y los controles, bajo la hipótesis nula de no asociación, y siendo  $N_d$  y  $N_c$  el número de casos y controles, respectivamente.

Cuando la distribución alélica se aparta de HWE, entonces V puede ser calculada como sigue<sup>19</sup>:

$$V_{non-HWE} = [p(1-p) + P_{AA} - p^2] (1/2N_d + 1/2N_c) \quad (3)$$

Siendo  $P_{AA}$  la frecuencia de AA homocigotos. Como puede verse, esta última varianza incluye una medida de la discrepancia ( $\delta$ ) entre la prevalencia real entre los homocigotos ( $P_{AA}$ ) y la predicha si estuviera bajo HWE ( $p^2$ ),  $\delta = (P_{AA} - p^2)$ .

Cuando HWE es erróneamente asumida como presente y la  $V_{HWE}$  es calculada a partir de la ecuación 2, entonces se puede cometer un error tipo 1, sobreestimando o subestimando la asociación. La tasa de error tipo 1 puede estar sobreestimada cuando  $V_{HWE}$  es subestimada frente a la verdadera varianza, lo que ocurre cuando ( $\delta = (P_{AA} - p^2) > 0$ , es decir, cuando la frecuencia de AA homocigotos excede la predicha por HWE. Por el contrario, la tasa de falsos positivos o de error tipo 1 puede estar subestimada cuando  $V_{HWE} > V_{non-HWE}$  lo que ocurre cuando la frecuencia de AA homocigotos es menor que la predicha por HWE ( $\delta = (P_{AA} - p^2) < 0$ ).

Por tanto, la probabilidad de cometer un error tipo 1 es alta cuando se comparan frecuencias alélicas entre casos y controles que no se ajustan al HWE. En estos casos se podría utilizar la prueba de Armitage<sup>18</sup> o la alternativa propuesta por Schaid<sup>2</sup>, pues como ha demostrado Knapp<sup>20</sup> el cuadrado del estadístico z ( $z^2$ ) arriba calculado para las varianzas conjuntas de casos y controles es idéntico al estadístico de la prueba de tendencia de Armitage habitualmente propuesto como alternativa.

## CONCLUSIONES

Los estudios de asociación de riesgo genético de algunas enfermedades complejas son de gran utilidad para entender la etiología de estas enfermedades, pero la falta de concordancia entre los diferentes estudios, por un lado, y la falta de rigor en el procedimiento, por otro, puede hacer el esfuerzo inútil y las conclusiones desalentadoras. Algunas de las consideraciones arriba expuestas, encaminadas a una mayor pulcritud en el diseño, en la genotipificación y en el análisis de los datos, contribuirán a hacer más eficientes estos estudios. Por eso a la hora de la realización de un estudio de epidemiología biomolecular deberían tenerse en cuenta las siguientes consideraciones:

1. Que el tamaño muestral sea suficiente para poder por diseño garantizar un error muestral bajo para todas las frecuencias alélicas (especialmente para la de aquel alelo cuyo riesgo se investiga), pero también para los fenotipos o enfermedades investigadas.

2. Disponer de información suficiente sobre la estructura familiar, étnica, etc de la población estudiada, especialmente de los controles.

3. Tener información suficiente sobre el gen estudiado, así como de los polimorfismos a estudiar y la existencia o no de desequilibrio de ligamiento con otros polimorfismos.

4. Poner a punto procedimientos que garanticen la ausencia de errores en la genotipificación.

5. Disponer de la suficiente información fenotípica como para poder incluir en los modelos de predicción de riesgo no sólo el fenotipo estudiado, sino también algunas de las variables biológicas de mayor relevancia y que pueden comportarse como variables de confusión.

6. Testar sistemáticamente posibles desviaciones del HWE en todos los estudios de asociación.

7. Ante una desviación del HWE, y descartadas las anteriores posibilidades, sería recomendable calcular la tasa de falsos positivos (error tipo 1) mediante los cálculos propuestos por Schaid y Jacobsen<sup>2</sup>.

En 1984<sup>21</sup> hicimos una evaluación bibliométrica de todos los números de la revista *Endocrinología* con el objetivo de evaluar la calidad del uso de las herramientas estadísticas por los investigadores. La conclusión fue que si bien era manifiestamente mejorable en comparación con otras publicaciones clínicas, los investigadores en endocrinología utilizaban con más propiedad las herramientas estadísticas. En aquella fecha la epidemiología biomolecular y los estudios de polimorfismos en la población general apenas estaban comenzando. En el momento actual, sin embargo, cada vez más grupos incluyen entre sus estrategias de investigación el estudio de polimorfismos. Dicha investigación exige de una metodología apropiada que los clínicos y el resto de los investigadores en endocrinología y nutrición deberemos aprender a usar correctamente.

## AGRADECIMIENTOS

A Gemma Rojo y Fernando Cardona por su valoración y comentarios críticos.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Xu J, Turner A, Little J, Bleecker ER, Meyers DA. Positive results in association studies are associated with departure from Hardy-Weinberg equilibrium: hint for genotyping error? *Hum Genet.* 2002;111:573-4.
2. Schaid DJ, Jacobsen SJ. Biased test of association: comparisons of allele frequency when departing from Hardy-Weinberg proportions. *Am J Epidemiol.* 1999;149:706-11.
3. Weiss KM. Genes and phenotypes in populations. En: Weiss KM, editor. *Genetic variation and human disease. Principles and evolutionary approaches.* Cambridge Studies in Biological Anthropology. Cambridge: University Press; 1993.
4. Dorak MT. Basic Population Genetics. Disponible en: <http://dorakmt.tripod.com/genetics/popgen.html>
5. Attia J, Thakkestian A, D'Este C. Meta-analyses of molecular association studies: methodologic lessons for genetic epidemiology. *J Clinical Epidemiol.* 2003;56:297-303.
6. Tiret L, Cambien F. Departure from Hardy-Weinberg equilibrium should be systematically tested in studies of association between genetic markers and disease. *Circulation.* 1995;92:3364-5.
7. Nielsen DM, Ehm MG, Weir BS. Detecting marker-disease association by testing for Hardy-Weinberg disequilibrium at a marker locus. *Am J Hum Genet.* 1998; 63:1531-40.

8. Lee WC. Searching for disease-susceptibility loci by testing for Hardy-Weinberg disequilibrium in a gene bank of affected individuals. *Am J Epidemiol.* 2003;158:397-400.
9. Kocsis I, Vasarhelyi B, Gyorffy A, Gyorffy B. Reanalysis of genotype distributions published in "Neurology" between 1999 and 2002. *Neurology.* 2004;63:357-8.
10. Nemeth E, Vasarhelyi B, Gyorffy B, Kocsis I. Unreported deviations of genotype distributions from Hardy-Weinberg equilibrium in articles published in *Critical Care Medicine* between 1999 and 2003. *Crit Care Med.* 2004;32:1431-3.
11. Bardoczy Z, Gyorffy B, Kocsis I, Vasarhelyi B. Re-calculated Hardy-Weinberg values in papers published in *Atherosclerosis* between 1995 and 2003. *Atherosclerosis.* 2004;173:141-3.
12. Kocsis I, Gyorffy B, Nemeth E, Vasarhelyi B. Examination of Hardy-Weinberg equilibrium in papers of *Kidney International*: an underused tool. *Kidney Int.* 2004;65:1956-8.
13. Gyorffy B, Kocsis I, Vasarhelyi B. Missed calculations and new conclusions: re-calculation of genotype distribution data published in *Journal of Investigative Dermatology*, 1998-2003. *J Invest Dermatol.* 2004;122:644-6.
14. Gyorffy B, Kocsis I, Vasarhelyi B. Biallelic genotype distributions in papers published in *Gut* between 1998 and 2003: altered conclusions after recalculating the Hardy-Weinberg equilibrium. *Gut.* 2004;53:614-5.
15. Haviland MB, Kessler AM, Davignon J, Sing CF. Estimation of Hardy-Weinberg and pairwise disequilibrium in the apolipoprotein A1-CIII-AIV gene cluster. *Am J Clin Nutr.* 1991;49:350-65.
16. Risch N. A general model for disease-marker association. *Ann Human Genetic.* 1983;47:245-52.
17. Sasieni PD. From genotypes to genes: doubling the sample size. *Biometrics.* 1997;53:1253-61.
18. Armitage P. Test for linear trends in proportions and frequencies. *Biometrics.* 1955;11:375-86.
19. Weir BS. *Genetic data analysis.* Sunderland: Sinauer Associates, Inc; 1990. p. 34.
20. Knapp M. Biased test of association: comparisons of allele frequencies when departing from Hardy-Weinberg proportions. *Am J Epidemiology.* 2001;154:287-8.
21. Soriguer F. Estudio crítico de los artículos aparecidos en *Endocrinología* desde su fundación. *Endocrinología.* 1984;31:201-8.