

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Pediatría



TESIS DOCTORAL

Enfermedad de Hirschsprung: correlación clínico-genética

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Raquel Nuñez Ramos

Directores

Jesús Ruiz Contreras
Salud Borrego López
Enrique Galán Gómez

Madrid 2018



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA

**ENFERMEDAD DE HIRSCHSPRUNG:
CORRELACIÓN CLÍNICO-GENÉTICA**

TESIS DOCTORAL

Raquel Núñez Ramos

Madrid, 2017



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA

**ENFERMEDAD DE HIRSCHSPRUNG:
CORRELACIÓN CLÍNICO-GENÉTICA**

TESIS DOCTORAL presentada por

Raquel Núñez Ramos

Bajo la dirección de los doctores

Jesús Ruiz Contreras

Salud Borrego López

Enrique Galán Gómez

Madrid, 2017



Memoria realizada con la colaboración del Departamento de Pediatría de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, la Unidad de Gestión Clínica de Medicina Maternofetal, Genética y Reproducción del Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla y el Complejo Hospitalario Universitario de Badajoz, bajo la dirección del Dr. Ruiz Contreras, la Dra. Borrego López y el Dr. Galán Gómez, que presenta la Licenciada en Medicina Raquel Núñez Ramos para optar al grado de Doctor.

Los Directores:

Fdo: J. Ruiz Contreras
Doctor en Medicina y Cirugía
H. Universitario 12 de Octubre

Fdo: S. Borrego López
Doctora en Medicina y Cirugía
H. Universitario Virgen del Rocío

Fdo: E. Galán Gómez
Doctor en Medicina y Cirugía
Complejo Hospitalario
Universitario de Badajoz

La doctoranda:

Fdo. Raquel Núñez Ramos

A mis padres

I. Agradecimientos



De las siguientes líneas no encontrarán bibliografía los lectores de este trabajo, y resulta cuanto menos curioso porque recogen mis referencias más principales, las que explican de dónde han salido las fuerzas para presentar este proyecto. Reúnen citas de acceso restringido, palabras inéditas, no publicadas o simplemente -¡lástima!- que nunca quedarán por escrito ni serán repetidas, pronunciadas en casa, en un café, en un viaje en coche o en tren, en una llamada de teléfono y en tantas otras situaciones aparentemente poco científicas. Pero todas son fruto de complejas búsquedas de comprensión, de ejercicios de empatía propios de doctores en psicología, de reacciones químicas imposibles, formuladas a partir de un cariño y de un amor infinito, por lo que lamento no poder compartir la ecuación.

A pesar de la necesaria falta de rigor en esta sección, a continuación intentaré citar ordenadamente a estos referentes. Consciente de que no doy muchos datos, permítanme advertir que, si pese a ello, el lector consiguiera identificarles o simplemente se cruzara con alguno de ellos en su camino, sepa que, como a mí, la vida le habrá sonreído. Esta es la verdadera bibliografía que ha permitido este trabajo y algunas de sus citas son las que dan sentido a mi vida:

Alvaro, por demostrarme un amor que no tiene límites, por entender mis sueños cuando ni yo misma lo consigo y por tantas otras cosas que solo los novios de las estudiantes de Medicina saben. Gracias por tu apoyo imprescindible para llegar hasta aquí. Hoy, mañana y siempre, iré si es contigo y siempre adelante.

Amigas, capítulo fundamental de este libro, no hay pseudónimos que valgan para nombrarlas con el suficiente cariño y admiración, no hay palabras para describir lo afortunada que me siento. Increíblemente feliz a vuestro lado. Así somos.

Compañeros, de varios hospitales y varias ciudades, por vuestra confianza, por ayudarme a conseguir una versión mejorada de mí misma en cada escenario, con recursos y capacidades que nunca imaginé.

Directores de este trabajo, por vuestra disponibilidad y apoyo, tres grandes ejemplos de integridad personal y profesional.

Facultad de Medicina y Complejo Hospitalario de Badajoz, por el inmenso regalo de hacerme médico y el apoyo para optar a doctor, especialmente a su equipo de Cirugía Pediátrica, por su confianza y las horas de trabajo dedicadas a los pacientes reunidos en estas páginas. Muchas personas han colaborado en las letras de este proyecto (con la ayuda de Robert y Stephanie para traducirlas), pero los números son de Miguel, las imágenes de Antonio y la edición final de Paco, gracias a todos.

Familias y pacientes, las que han participado en este proyecto y todas las que forman parte de mi trabajo diario. Tocar cada día vuestra confianza, fortaleza y dignidad, es sin duda lo mejor de la profesión.

Familias propias con acentos distintos, las de sangre y las de corazón, cuántas casas con las puertas abiertas.

Hermana, por todo tu apoyo, cariño y no merecida admiración, no tengas duda de que es recíproca. Gracias por tu tiempo para la última lectura de este trabajo. Te cuidaré siempre.

Hospital Universitario 12 de Octubre, en el que viví algunos de los años más felices de mi vida, nunca podré corresponder todo lo que me dio este lugar altamente especializado en seleccionar personas extraordinarias. Gracias por el apoyo en este proyecto y el privilegio de hacerme pediatra.

Hospital Universitario Virgen del Rocío, aquí tienen su *locus* personas que tienen la llave de preguntas sin respuesta. Vuestro trabajo, constancia y rigor, dan luz a los que quieren saber. Gracias Raquel por enseñarme tanto.

Julia, mi abuela, tesoro familiar, por tantas lecciones que no vienen en los libros. Cada vez que te veo reír doy las gracias.

Mamá, por regalarme la infancia que desearía para cualquier niño. La gran mujer que está detrás de todos nuestros logros y la que realmente los merece. Por tu cariño, tu paciencia, tu ternura y tu generosidad infinita, por escucharme sin reloj y entenderme sin medida, porque quiero ser la persona en el mundo que más se parezca a tí.

Papá, no tengo palabras para expresar todo lo recibido, por tus enseñanzas en cada viaje al conservatorio y a la facultad, por transmitirme tus pasiones, por cuidarnos sin descanso. Ejemplo grandioso de buen hacer y buen ser. Mi mejor maestro, de vida y oficio.

A todos ellos, mi más sincero agradecimiento.

Raquel

II. Índice de contenidos



I.	Agradecimientos.....	XI
II.	Índice de contenidos	XV
III.	Índice de Figuras.....	XXI
IV.	Índice de Tablas.....	XXV
V.	Abreviaturas.....	XXIX
VI.	Resumen.....	XXXIII
	VI.a) Introducción.....	XXXV
	VI.b) Hipótesis de trabajo y objetivos del estudio.....	XXXVI
	VI.c) Material y métodos	XXXVI
	VI.d) Resultados.....	XXXVII
	VI.e) Discusión	XXXIX
	VI.f) Conclusión.....	XLI
VII.	Summary.....	XLIII
	VII.a) Introduction.....	XLV
	VII.b) Working hypothesis and objectives	XLVI
	VII.c) Materials and methods.....	XLVI
	VII.d) Results	XLVII
	VII.e) Discussion.....	XLIX
	VII.f) Conclusion.....	L
1.	Introducción.....	1
	1.1. El sistema nervioso entérico (SNE).....	3
	1.1.1. Desarrollo embrionario del SNE	3
	1.1.1.1. Contribución de la cresta neural vagal a la formación del SNE.....	6
	1.1.1.2. Contribución de la cresta neural sacra al SNE.....	7
	1.1.2. Bases moleculares del desarrollo del SNE.....	7
	1.1.2.1. La ruta RET/GFR α 1/GDNF.....	8
	1.1.2.2. La ruta de las endotelinas (EDNRB, EDN3 y ECE1)	10
	1.1.2.3. Factores de transcripción.....	11
	1.1.3. Estructura, organización, tipos celulares y funciones	15
	1.1.3.1. Tipos celulares	15
	1.1.3.2. Control de la función intestinal	16
	1.1.4. Desórdenes del SNE.....	17
	1.2. Enfermedad de Hirschsprung (HSCR)	18
	1.2.1. Recuerdo histórico.....	18
	1.2.2. Definición	19
	1.2.3. Clasificación.....	20
	1.2.4. Epidemiología.....	21

1.2.5.	Cromosomopatías, neurocristopatías y anomalías asociadas.....	21
1.2.5.1.	Cromosomopatías y HSCR.....	21
1.2.5.2.	Neurocristopatías y otros síndromes asociados.....	21
1.2.5.3.	Otras anomalías asociadas.....	23
1.2.6.	Bases moleculares de HSCR.....	25
1.2.6.1.	Mutaciones en <i>RET</i> y sus ligandos.....	25
1.2.6.2.	Mutaciones en la ruta de las endotelinas (<i>EDNRB</i> y <i>EDN3</i>).....	27
1.2.6.3.	Mutaciones asociadas a HSCR en genes que codifican para factores de transcripción.....	28
1.2.7.	Fisiopatología.....	31
1.2.8.	Manifestaciones clínicas.....	31
1.2.8.1.	Presentación en el período neonatal.....	31
1.2.8.2.	Presentación en el lactante y otras edades.....	32
1.2.8.3.	Particularidades del aganglionismo cólico total.....	32
1.2.8.4.	Aspectos clínicos de la asociación del síndrome de Down y HSCR.....	33
1.2.9.	Métodos diagnósticos.....	33
1.2.9.1.	Enema de contraste.....	33
1.2.9.2.	Manometría anorrectal.....	35
1.2.9.3.	Biopsia rectal.....	36
1.2.10.	Diagnóstico diferencial.....	36
1.2.11.	Tratamiento.....	37
1.2.12.	Resultados postoperatorios. Enterocolitis y HSCR.....	40
1.2.13.	Perspectivas futuras de tratamiento.....	41
1.2.14.	Escalas relacionadas con HSCR.....	42
1.2.15.	Correlación genotipo-fenotipo.....	42
1.2.16.	Asesoramiento genético en HSCR.....	43
2.	Hipótesis de trabajo y objetivos del estudio.....	47
2.1.	Hipótesis de trabajo.....	49
2.2.	Objetivos del estudio.....	50
2.2.1.	Objetivos principales.....	50
2.2.2.	Objetivos secundarios.....	50
3.	Pacientes y métodos.....	51
3.1.	Pacientes HSCR.....	53
3.1.1.	Criterios de inclusión.....	53
3.2.	Individuos control.....	54
3.3.	Métodos.....	54
3.3.1.	Diseño de una escala para identificar la gravedad de HSCR.....	54
3.3.2.	Descripción de los ítems puntuados en la escala de gravedad de HSCR.....	54
3.3.3.	Metodología del estudio genético.....	56

3.3.3.1.	Extracción y espectrofotometría de ADN.....	57
3.3.3.2.	Amplificación de ADN genómico mediante PCR	57
3.3.3.3.	Electroforesis en gel y capilar	60
3.3.3.4.	Rastreo de mutaciones mediante dHPLC.....	60
3.3.3.5.	Secuenciación automática de los productos de PCR.	61
3.3.3.6.	Rastreo de grandes deleciones/duplicaciones mediante MLPA	62
3.3.3.7.	Genotipación por tecnología Taqman.....	64
3.3.3.8.	Análisis bioinformático	64
3.3.4.	Metodología del estudio estadístico	66
4.	Resultados.....	69
4.1.	Descripción de la serie completa incluida en el estudio	69
4.1.1.	Epidemiología.....	69
4.1.2.	Antecedentes familiares, síndromes y malformaciones asociadas.....	70
4.1.3.	Evacuación de meconio y presentación clínica.....	70
4.1.4.	Métodos diagnósticos.....	70
4.1.5.	Tratamiento	71
4.1.6.	Complicaciones y resultados postoperatorios	72
4.1.7.	Particularidades del aganglionismo cólico total	73
4.2.	Descripción de los pacientes HSCR sindrómicos	76
4.2.1.	Síndrome de Waardenburg tipo 4 (WS4).....	76
4.2.2.	Síndrome de Down	78
4.3.	Aplicación de los criterios de gravedad de HSCR.....	78
4.4.	Aplicación y análisis de la escala de gravedad de HSCR	80
4.4.1.	Estudio de la relación entre la escala y la gravedad. Determinación del punto de corte óptimo.	80
4.4.2.	Estudio de las variables que constituyen la escala y su capacidad predictiva	83
4.5.	Definición y estudio de la escala de gravedad simplificada.....	84
4.6.	Aplicación de ambas escalas sobre nuestra cohorte HSCR.....	86
4.7.	Estudio genético de la cohorte HSCR	87
4.7.1.	Análisis molecular del proto-oncogén <i>RET</i>	87
4.7.2.	Evaluación de la variante <i>Enhancer</i> (c.73+9277T>C) de <i>RET</i> en pacientes HSCR como factor de susceptibilidad	88
4.7.3.	Exclusión de mutaciones en el proto-oncogén <i>RET</i> que predisponen al desarrollo de MEN 2 en pacientes HSCR	89
4.7.4.	Análisis molecular de los genes <i>EDNRB</i> y <i>EDN3</i> en pacientes HSCR.....	89
4.7.5.	Análisis molecular del gen <i>SOX10</i> en pacientes WS4.....	90
4.8.	Asociación entre fenotipo grave y resultados del estudio molecular.	91

5.	Discusión	93
5.1.	Análisis descriptivo de la serie. Aspectos diferenciales entre los subgrupos grave y no grave.	95
5.1.1.	Incidencia.....	95
5.1.2.	Distribución por género	96
5.1.3.	Edad al diagnóstico	97
5.1.4.	Antecedentes familiares de HSCR	97
5.1.5.	Síndromes y malformaciones asociadas	98
5.1.6.	Evacuación de meconio.....	98
5.1.7.	Presentación clínica	99
5.1.8.	Exploración rectal.....	100
5.1.9.	Tratamiento médico preoperatorio (<i>nursing</i>).....	100
5.1.10.	Extensión del aganglionismo	100
5.1.11.	Resultados del enema de contraste	101
5.1.12.	Tratamiento quirúrgico y resultados postoperatorios	102
5.2.	Justificación del diseño de una escala predictora de la gravedad de HSCR	104
5.3.	Validez de la escala y la escala simplificada de gravedad de HSCR.....	105
5.4.	Estudio genético de la cohorte HSCR	107
5.4.1.	Análisis de mutaciones en la secuencia codificante del proto-oncogén <i>RET</i> en pacientes HSCR.....	107
5.4.2.	Evaluación de la variante <i>Enhancer</i> (c.73+9277T>C) de <i>RET</i> en pacientes HSCR como factor de susceptibilidad.....	112
5.4.3.	Exclusión de mutaciones en el proto-oncogén <i>RET</i> asociadas a MEN 2	112
5.4.4.	Análisis molecular de <i>EDNRB</i> y <i>EDN3</i> en pacientes HSCR.....	113
5.4.5.	Análisis molecular del gen <i>SOX10</i> en pacientes WS4.....	113
5.5.	Asociación entre fenotipo grave y resultados del estudio molecular	115
5.6.	Asesoramiento genético proporcionado a las familias participantes.....	117
5.6.1.	Mutaciones en el proto-oncogén <i>RET</i>	118
5.6.2.	Mutaciones en <i>SOX10</i>	120
5.6.3.	Mutaciones en <i>EDNRB</i>	121
6.	Conclusiones	125
7.	Bibliografía	129
8.	Anexos	155
8.1.	Anexo I: Consentimiento informado	157
8.2.	Anexo II: Certificación del Comité Ético de Investigación Clínica	158
9.	Publicaciones	159
9.1.	Publicación I.....	161
9.2.	Publicación II	167

III. Índice de Figuras



Figura 1.1:	Formación de la CN migratoria y derivados celulares de la misma.....	4
Figura 1.2:	Mapa de los derivados de la CN en embrión de pollo	5
Figura 1.3:	Intestino embrionario anterior, medio y posterior colonizado por precursores neuronales procedentes de la CN vagal, troncal y sacra.....	5
Figura 1.4:	Resumen del desarrollo del SNE y glía del ratón	6
Figura 1.5:	El desarrollo del SNE está regulado por una amplia variedad de moléculas y vías de señalización que implican a las células de la CN y al mesénquima intestinal.....	7
Figura 1.6:	Esquema de la estructura del proto-oncogén <i>RET</i> y de su correspondiente proteína.....	8
Figura 1.7:	Interacciones entre los distintos ligandos, co-receptores <i>GFRα1</i> y <i>RET</i>	10
Figura 1.8:	Estructura de <i>SOX10</i> y de la proteína que codifica con sus dominios funcionales.....	12
Figura 1.9:	Disposición de los plexos entéricos en el intestino.....	15
Figura 1.10:	Tipos de neuronas del SNE	16
Figura 1.11:	Principales fenotipos de HSCR.....	20
Figura 1.12:	Dominios del proto-oncogén <i>RET</i>	26
Figura 1.13:	A: Fisiopatología de HSCR. B: Pieza operatoria de S-HSCR.....	31
Figura 1.14:	Hallazgos radiológicos clásicos del EC en HSCR	34
Figura 1.15:	EC en TCA	35
Figura 1.16:	Manometría anorrectal.....	36
Figura 1.17:	Hallazgos anatomopatológicos en HSCR.....	37
Figura 1.18:	Tratamiento médico preoperatorio.....	38
Figura 1.19:	<i>Pull-through</i> endorrectal transanal (TEPT).....	40
Figura 3.1:	Amplificación de ADN genómico mediante PCR.....	58
Figura 3.2:	Fundamento del dHPLC	61
Figura 3.3:	Fundamentos del método de secuenciación de Sanger	62
Figura 3.4:	Fundamento del MLPA.....	63
Figura 3.5:	Fundamentos de la tecnología Taqman	64
Figura 4.1:	Extensión del aganglionismo en los pacientes de la serie.....	69
Figura 4.2:	Exploración del CA seguida de deposición explosiva en un caso S-HSCR.....	70
Figura 4.3:	Registros de manometría anorrectal	71
Figura 4.4:	EC en pacientes HSCR de la serie	71
Figura 4.5:	Complicaciones precoces registradas en los pacientes de la serie.....	72
Figura 4.6:	Complicaciones tardías registradas en los pacientes de la serie.....	73
Figura 4.7:	Fenotipo y pieza operatoria del paciente n° 23.....	76
Figura 4.8:	Fenotipo del paciente n° 28	77
Figura 4.9:	Paciente n° 33: fenotipo en edad escolar y aspecto operatorio al diagnóstico.....	78
Figura 4.10:	Paciente clasificado por nuestros criterios como no grave	79
Figura 4.11:	Paciente clasificado por nuestros criterios como grave.....	79

Figura 4.12:	La puntuación de la escala se correlaciona con la gravedad.....	82
Figura 4.13:	Curva ROC de la escala de gravedad de HSCR.....	82
Figura 4.14:	La puntuación de la escala simplificada se correlaciona con la gravedad	85
Figura 4.15:	Curva ROC de la escala de gravedad simplificada de HSCR.....	85
Figura 4.16:	A: Puntuaciones de los dos grupos en la escala de gravedad. B: Puntuaciones de los dos grupos en la escala de gravedad simplificada.....	86
Figura 4.17:	Localización de las diferentes variantes identificadas en <i>RET</i>	88
Figura 4.18:	Distribución de la cohorte de pacientes HSCR según tengan mutaciones en secuencia codificante de <i>RET</i> (CDS+) y de la variante <i>Enhancer</i> (<i>Enb+</i>).....	89
Figura 4.19:	Mutaciones identificadas en los 2 pacientes WS4.....	91
Figura 5.1:	Número de casos nuevos de HSCR por 10.000 nacidos vivos en Extremadura entre 1983-2013.....	95
Figura 5.2:	Distribución de los casos clasificados como graves por la escala en los 3 períodos del estudio	96
Figura 5.3:	Distribución de la serie según el sexo y fenotipo HSCR.....	96
Figura 5.4:	Cirugías correctoras realizadas durante los 3 intervalos de nuestro período de estudio	103
Figura 5.5:	Variantes de <i>RET</i> identificadas en este estudio y el efecto funcional según su localización en los distintos dominios de la proteína.....	110
Figura 5.6:	Representación esquemática de diferentes tipos de herencia	118
Figura 5.7:	Segregación familiar de las variantes halladas en los casos nº 23 (A) y 28 (B).....	121

IV. Índice de Tablas



Tabla 1.1:	Listado simplificado de algunos de los genes que participan en la migración, proliferación, diferenciación y supervivencia de las neuronas entéricas derivadas de la cresta vagal y sacra.....	14
Tabla 1.2:	Neuropatías entéricas	18
Tabla 1.3:	Criterios clínicos para el diagnóstico de WS.....	23
Tabla 1.4:	Síndromes asociados a HSCR.....	24
Tabla 1.5:	Genes relacionados con HSCR aislado y sindrómico.....	30
Tabla 1.6:	Validez de las manifestaciones clínicas de HSCR en el período neonatal.	32
Tabla 1.7:	Claves para el diagnóstico diferencial entre el estreñimiento funcional y HSCR.....	37
Tabla 1.8:	Epidemiología y riesgo de recurrencia de HSCR.....	45
Tabla 3.1:	Criterios que definen en nuestro trabajo el comportamiento grave de HSCR.....	54
Tabla 3.2:	Condiciones generales usadas para la amplificación de fragmentos específicos mediante PCR	58
Tabla 3.3:	Condiciones de amplificación de los exones de <i>RET</i>	59
Tabla 3.4:	Condiciones de amplificación de los exones de <i>EDNRB</i>	59
Tabla 3.5:	Condiciones de amplificación de los exones de <i>EDN3</i>	59
Tabla 3.6:	Condiciones de amplificación de los exones de <i>SOX10</i>	60
Tabla 4.1:	Principales características demográficas y clínicas de nuestra cohorte de pacientes HSCR.....	74
Tabla 4.2:	Resumen de los datos clínicos de los pacientes WS4.....	78
Tabla 4.3:	Escala de gravedad de HSCR al diagnóstico (2-20 puntos).....	81
Tabla 4.4:	Sensibilidad y 1-especificidad de los puntos de corte de la escala de gravedad de HSCR	83
Tabla 4.5:	Relación entre las variables de la escala y la variable gravedad.....	84
Tabla 4.6:	Escala simplificada de gravedad de HSCR (1-9 puntos)	84
Tabla 4.7:	Sensibilidad y 1-especificidad de los diferentes puntos de corte de la escala simplificada....	86
Tabla 4.8:	Comparación de los subgrupos grave y no grave	87
Tabla 4.9:	Características de los pacientes con resultado positivo en el estudio molecular	92
Tabla 5.1:	Comparación de 2 variables que definen el comportamiento grave de HSCR en los 3 períodos	106
Tabla 5.2:	Comparación de la variable “episodios de enterocolitis” en los 3 períodos del estudio	107
Tabla 5.3:	Aplicación de la escala de gravedad simplificada a los pacientes de la última década	107
Tabla 5.4:	Características de los pacientes con mutaciones en la secuencia codificante de <i>RET</i> y clasificación de las mutaciones.....	111
Tabla 5.5:	Características y grupo de gravedad de los pacientes con mutaciones en <i>RET</i> , <i>EDNRB</i> y <i>SOX10</i>	117

V. Abreviaturas



- Aa:** Aminoácidos
- AUC:** *Area under the curve*, Área bajo la curva
- BR:** Biopsia rectal
- CA:** Canal anal
- CCHS:** *Central Congenital Hypoventilation Syndrome*, Síndrome de hipoventilación central congénita
- CDS:** *Coding Sequence*, Secuencia codificante
- CICs:** Células intersticiales de Cajal
- CN:** Cresta neural
- CNV:** *Copy Number Variation*, Variación en el número de copias
- dHPLC:** *Denaturing High-Performance Liquid Chromatography*, Cromatografía líquida de alta resolución desnaturalizante
- DS:** *Down Syndrome*, Síndrome de Down
- EAI:** Esfínter anal interno
- EAE:** Esfínter anal externo
- EC:** Enema de contraste
- ECE1:** *Endothelin Converting Enzyme 1*, Enzima convertidora de endotelinas tipo 1
- EDN3:** Endotelina 3
- EDNRB:** *Endothelin Receptor Type B*, Receptor de endotelina tipo B
- FMTC:** *Familial Medular Thyroid Carcinoma*, Cáncer medular de tiroides familiar
- GDNF:** *Glial Derived Neurotrophic Factor*, Factor neurotrófico derivado de glía
- HAEC:** *Hirschsprung's-Associated Enterocolitis*, Enterocolitis asociada a HSCR
- HL:** Hosmer-Lemeshow
- HMG:** *High Mobility Group*, Grupo de alta movilidad
- HSCR:** Enfermedad de Hirschsprung
- IC:** Intervalo de confianza
- IQR:** *InterQuartile Range*, Rango intercuartílico
- L-HSCR:** *Long-segment HSCR*, HSCR de segmento largo
- MA:** Manometría anorrectal
- MEN 2:** *Multiple Endocrine Neoplasia type 2*, Neoplasia endocrina múltiple tipo 2
- MEN2A:** Neoplasia endocrina múltiple tipo 2A
- MEN2B:** Neoplasia endocrina múltiple tipo 2B
- MLPA:** *Multiple Ligation-dependent Probe Amplification*, Amplificación múltiple de sondas dependiente de ligación.
- M-W-W:** Mann-Whitney-Wilcoxon
- NB:** Neuroblastoma
- OR:** Odds Ratio
- PCR:** *Polymerase Chain Reaction*, Reacción en cadena de la polimerasa
- PCWH:** *Peripheral Demyelinating Neuropathy Central Dysmyelination Leukodystrophy, Waardenburg Syndrome and HSCR*, Neuropatía desmielinizante periférica, leucodistrofia desmielinizante central, WS y HSCR
- RET:** *REarranged during Transfection*
- RIA:** Reflejo inhibitor del ano
- ROC:** *Receiver Operating Characteristic*, Características operador-receptor
- SD:** *Standard Deviation*, Desviación estándar
- S-HSCR:** *Short-segment HSCR*, HSCR de segmento corto
- SNA:** Sistema nervioso autónomo

SNC: Sistema nervioso central

SNE: Sistema nervioso entérico

SNP: Sistema nervioso periférico

SNPs: *Single Nucleotide Polymorphism*, Polimorfismos de cambio de un sólo nucleótido

SOX10: *Sex determining region Y box 10*

SS-HSCR: *Skip-Segment HSCR*, HSCR segmentario

TaH: Temperatura de hibridación

TCA: *Total Colonic Aganglionosis*, Aganglionismo cólico total

TCSA: *Total Colonic and Small bowel Aganglionosis*, Aganglionismo intestinal total

TDA: *Transactivata Domain*, Dominio de transactivación

TEPT: *Transanal Endorectal Pull-Through*, *Pull-through* endorrectal transanal

TR: Tacto rectal

WS: *Waardenburg Syndrome*, Síndrome de Waardenburg

WS4: *Waardenburg Syndrome type 4*, Síndrome de Waardenburg tipo 4

ZT: Zona de transición.

VI. Resumen



VI.a) Introducción

La enfermedad de Hirschsprung (HSCR, OMIM 142623) es un trastorno del desarrollo del sistema nervioso entérico caracterizado por la ausencia de células ganglionares parasimpáticas en los plexos mientérico y submucoso del intestino. Su incidencia se estima en 1/5000 recién nacidos vivos y supone la causa más frecuente de obstrucción intestinal funcional en la infancia. La extensión proximal del aganglionismo desde el esfínter anal interno permite su clasificación en diferentes fenotipos: segmento corto o S-HSCR (*Short-segment HSCR*) en el que el aganglionismo no sobrepasa el colon sigmoide (75-80% de los casos), segmento largo o L-HSCR (*Long-segment HSCR*), en el que la ausencia de células ganglionares es proximal al sigma (15-20%) y aganglionismo cólico total, que implica la afectación de todo el colon y menos de 50 cm de íleon (*total colonic aganglionosis*, TCA, 2-13%). Se han descrito otras formas menos frecuentes como la enfermedad segmentaria y la ultracorta. Por razones no bien conocidas, la ratio hombre: mujer es mayor para S-HSCR (5,5:1) que para L-HSCR, donde podemos encontrar una relación de 1,75:1. Suele ser esporádica, aunque también hay casos familiares con herencia autosómica dominante o recesiva, penetrancia parcial y expresividad variable. Se manifiesta de forma aislada en el 70% de los pacientes, asocia anomalías congénitas en el 18% y cromosomopatías en el 12%, siendo la más frecuente el Síndrome de Down (*Down Syndrome*, DS).

Su base genética no está claramente establecida. El proto-oncogén *RET*, que codifica para un receptor de membrana con actividad tirosín-kinasa con un papel crucial en el desarrollo del sistema nervioso entérico, es el gen de mayor susceptibilidad para HSCR. Sin embargo, sólo un 50% de casos familiares y un 10-35% de los esporádicos se atribuyen a mutaciones germinales en la secuencia codificante de este gen, que originan una pérdida de función del receptor. Por otro lado, se han descrito mutaciones germinales en *RET* que ocasionan en el humano otras patologías, como los síndromes MEN 2A y MEN 2B y el carcinoma medular de tiroides familiar, de herencia autosómica dominante.

Hasta el momento, solo se han identificado una minoría de casos producidos por mutaciones en otros genes distintos de *RET*, como *EDNRB* y *EDN3*, que están implicados en otras rutas de señalización, por lo que los mecanismos causales de la enfermedad en la mayoría de los pacientes HSCR, especialmente en los casos esporádicos, aún no han sido elucidados. Hay evidencia de que la aparición de estas formas esporádicas, particularmente de tipo S-HSCR, sigue un modelo complejo de herencia en el que varios eventos deben confluír para producir el fenotipo. De hecho, se conoce que en la aparición del fenotipo influyen también variantes genéticas comunes como la localizada en el dominio conservado entre especies con función potenciadora de la transcripción (*Enhancer-like domain*), en el intrón 1 de *RET*. Esta variante, c.73+9277T>C, que muestra asociación con los casos esporádicos, podría actuar como un factor modificador modulando la penetrancia de las mutaciones en otros genes y posiblemente del propio proto-oncogén *RET*.

Además, el Síndrome de Waardenburg tipo 4, una de las formas sindrómicas de HSCR, (*Waardenburg Syndrome type 4*, WS4, OMIM 277580), es causado tanto por mutaciones autosómicas recesivas en los genes *EDNRB* y *EDN3* como por mutaciones autosómicas dominantes en *SOX10* (45-55% de los casos).

Clínicamente, HSCR se manifiesta como un espectro de severidad, distinguiéndose formas no graves manejadas con tratamiento conservador hasta la cirugía y otras graves que precisan una ostomía y una hospitalización prolongada. Con anterioridad se han validado escalas para facilitar el diagnóstico neonatal y para diferenciar HSCR de otros trastornos del sistema nervioso entérico. Sin embargo, hasta la fecha no se ha propuesto ningún sistema de puntuación para predecir su comportamiento. Por otro lado, la correlación fenotipo-genotipo aún no ha podido ser establecida.

VI.b) Hipótesis de trabajo y objetivos del estudio

El objetivo primario del presente trabajo es establecer una escala clínica que permita predecir precozmente la gravedad de HSCR así como estudiar si existe una relación entre los pacientes clasificados como graves por la escala y la presencia de mutaciones en los genes analizados.

Entre los objetivos secundarios destacan: describir las características clínicas de los pacientes de la serie, identificar la presencia de mutaciones que predisponen al desarrollo de MEN 2, aportar nuevas mutaciones causantes de HSCR no descritas hasta el momento y proporcionar asesoramiento genético a las familias estudiadas, estableciendo el tipo de herencia y riesgo de recurrencia de la enfermedad.

VI.c) Material y métodos

Se diseñó un estudio observacional retrospectivo que reclutó 42 pacientes HSCR diagnosticados entre 1983 y 2013 en el Complejo Hospitalario Universitario de Badajoz, centro terciario de referencia en Extremadura. El estudio fue aprobado por el comité ético y se obtuvo el consentimiento de los participantes. Los pacientes fueron evaluados por un pediatra y un cirujano pediátrico, completándose el protocolo habitual que incluye la realización de manometría anorrectal, enema con contraste y biopsia rectal o intestinal. El diagnóstico de confirmación vino dado por la ausencia de células ganglionares en la biopsia.

Se recogieron datos clínicos como la edad al diagnóstico, sexo, antecedentes familiares de HSCR, síndromes o malformaciones asociadas, evacuación de meconio, debut clínico (definido como los primeros síntomas identificados), tacto rectal, extensión del aganglionismo, efectividad del tratamiento médico preoperatorio, hallazgos del primer enema de contraste, procedimientos quirúrgicos, complicaciones y tiempo de hospitalización. Los pacientes fueron divididos en 2 grupos (grave y no grave) según la evolución de la enfermedad. La evolución grave fue definida por 2 o más de los siguientes criterios: necesidad de estoma o > 2 cirugías, desarrollo de al menos un episodio de enterocolitis y la hospitalización prolongada (>100 días en los primeros 2 años tras el diagnóstico). Se excluyeron las cirugías y los días de hospitalización por otras causas. El diagnóstico de enterocolitis se estableció por criterios clínicos (Tabla 3.1). Se elaboró una escala incluyendo los factores que se describen a continuación. Una vez establecido el diagnóstico cada paciente recibió una puntuación según estos 8 criterios (Tabla 4.3):

- Antecedentes familiares
- Síndromes o malformaciones asociadas
- Evacuación de meconio
- Debut clínico
- Exploración rectal

- Efectividad del tratamiento médico preoperatorio
- Extensión del aganglionismo
- Resultado del primer enema de contraste

Se realizó estudio molecular a los pacientes, sus padres y en los casos disponibles, a sus hermanos, en el Departamento de Genética, Reproducción y Medicina Fetal del Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla. Se rastrearon los genes *RET*, *EDNRB*, *EDN3* en todos los casos y *SOX10* en pacientes con sospecha de WS4. En todos los pacientes se genotipó la variante c.73+9277T>C en el intrón 1 de *RET*, dado que el alelo c.73+9277T está fuertemente asociado a HSCR y parece aumentar la penetrancia en pacientes con mutaciones en la región codificante de *RET* mediante un efecto aditivo.

El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo mediante el programa informático IBM-SPSS Statistics 19. Las variables cuantitativas se presentaron como la media \pm desviación estándar, comparando los grupos grave y no grave mediante el test no paramétrico de Mann-Whitney-Wilcoxon. La comparación del número de procedimientos quirúrgicos, el tiempo de hospitalización y los episodios de enterocolitis entre los 3 períodos temporales considerados se realizó mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis. Las variables categóricas se presentaron como porcentajes y fueron analizadas mediante las correspondientes tablas de contingencia usando el test de Chi-cuadrado de Pearson o bien el test exacto de Fisher si las condiciones de validez de la primera no eran verificadas.

La asociación entre la escala y la gravedad de HSCR fue analizada mediante un modelo de regresión logística, incluyendo la realización de la prueba de bondad de ajuste de Hosmer-Lemeshow (test HL), el cálculo del coeficiente R^2 de Nagelkerke y de los Odds Ratio (OR) con sus correspondientes intervalos de confianza. El poder discriminatorio del modelo obtenido fue valorado a través de una curva de características de receptor-operador (*Receiver Operating Characteristic*, ROC), incluyendo el estudio del área bajo la curva (*area under the curve*, AUC). Esto permitió establecer el punto de corte óptimo para la escala garantizando una sensibilidad y especificidad adecuadas. Finalmente, la capacidad predictiva de cada una de las variables de la escala a la hora explicar la gravedad se analizó mediante un modelo de regresión logística múltiple utilizando el método hacia adelante (*forward*) de selección de variables para determinar grupo óptimo de variables con mayor capacidad explicativa. Se consideró significativa una $p \leq 0,05$.

VI.d) Resultados

Entre 1983 y 2013 se trataron en nuestro centro 42 pacientes HSCR (29 varones, 69%). La mediana de edad al diagnóstico fue 52 días (2 días-14,02 años). Cuarenta pacientes presentaron una forma esporádica. Se registraron 2 HSCR familiares correspondientes a dos familias distintas. En 34 pacientes (81%) la enfermedad se presentó como evento aislado, si bien 8 pacientes padecieron una forma sindrómica; 5 DS y 3 WS4, uno de los cuales cumplía criterios de WS, leucodistrofia central desmielinizante, neuropatía periférica desmielinizante y HSCR. Tres pacientes DS presentaron afectación cardiológica. No se registraron otras malformaciones asociadas.

La forma más frecuente fue S-HSCR (26 casos), seguida de TCA (10 casos), L-HSCR (4 casos) y ña ultracorta (2 casos). No se identificó ningún aganglionismo intestinal total. En ningún caso la exploración del canal anal fue normal; la mayoría presentó una ampolla adherente o seguida de deposición explosiva

(57,1%) mientras que el tacto rectal del 42,9% restante mostró una ampolla vacía. El 50% sufrió un retraso meconial superior a 48 horas. En el 14,3% la evacuación de meconio ocurrió en las primeras 24 horas. La obstrucción intestinal fue la presentación clínica más común (23 casos), seguida del estreñimiento de evolución tórpida (12 casos). En 8 pacientes el primer enema fue informado como normal o con alteraciones poco relevantes. La zona de transición (ZT) característica se identificó en 23 pacientes. En los 11 restantes la imagen mostró otras alteraciones (colon disminuido de calibre, retraso en la evacuación del contraste o microcolon). El tratamiento médico preoperatorio fue eficaz en 24 casos (57,1%). Se realizaron 13 ostomías, ninguna permanente.

Quince de los 42 pacientes (35,7%) cumplieron los criterios de gravedad. La media de cirugías en este grupo fue de $2,5 \pm 1,4$ y del tiempo de hospitalización en los 2 primeros años tras el diagnóstico de $160,2 \pm 85,9$ días. El 80% presentó al menos un episodio de enterocolitis pre o postoperatoria. Un paciente no pudo ser clasificado por pérdida de seguimiento. Los 26 restantes fueron catalogados como no graves. Este grupo precisó $1,2 \pm 0,5$ cirugías de media, el tiempo de hospitalización fue de $35,7 \pm 22,5$ días y en un 7,7% se registraron episodios de enterocolitis ($p < 0,0001$).

Se identificaron diferencias significativas en la escala de gravedad de HSCR en los dos grupos. El grupo grave presentó puntuaciones medias superiores ($13,15 \pm 2,36$) respecto al no grave ($8,15 \pm 2,13$; $p < 0,001$) (Figura 4.16 A). Se aplicó un modelo de regresión logística para explicar la variable gravedad en función de la escala, obteniéndose una relación directa estadísticamente significativa ($p = 0,003$; OR = 2,92; 95% IC OR: 1,45-5,90; R^2 de Nagelkerke's = 0,753; HL test: $p = 0,833$, Figura 4.12). La curva ROC determinó que para un punto de corte de 11 puntos, la sensibilidad y especificidad estimadas fueron de 87% y 81% respectivamente. El AUC indicó un buen valor predictivo de la escala (0,949; 95% IC: 0,89-1, $p < 0,0001$, Figura 4.13).

Mediante un modelo de regresión logística múltiple con un método de selección de variables *forward* se determinó que solo 3 de ellas eran necesarias para explicar la variable gravedad (en presencia de estas 3, las demás no proporcionan información relevante). Estas 3 variables fueron “síndromes o malformaciones asociadas” ($p = 0,023$; OR = 4,41; 95% IC OR: 1,23-15,84), “evacuación de meconio” ($p = 0,04$; OR = 20,43; 95% IC OR: 1,15-361,9) y “extensión del aganglionismo” ($p = 0,007$; OR = 14,84; 95% IC OR: 2,11-104,24). Esto nos permitió identificar una escala de gravedad simplificada (1-9 puntos, Tabla 4.6) que también se relaciona significativamente con la gravedad ($p = 0,001$; OR = 5,75; 95%IC OR: 2,01-16,48; R^2 de Nagelkerke's = 0,725; HL test: $p = 0,889$, Figura 4.14). De nuevo, el AUC mostró de nuevo un buen valor predictivo (0,944; 95% IC: 0,88-1, $p < 0,0001$). El análisis de los puntos de corte indicó que 5 sería el óptimo en este caso, con una sensibilidad de 0,93 y especificidad de 0,84 (Figura 4.15). En el *score* simplificado, la puntuación media del grupo grave fue de $6,27 \pm 1,33$ frente a un $3,31 \pm 1,29$ en el no grave ($p < 0,001$) (Figura 4.16 B).

Se identificó mutación relacionada con la enfermedad en 12 pacientes (Tabla 4.9). En 9 de ellos (7 esporádicos y 2 familiares), las variaciones afectaron al proto-oncogén *RET*. Por tanto, la frecuencia mutacional en *RET* de nuestra cohorte es del 17,5% en casos esporádicos (7 pacientes con mutaciones de 40 casos esporádicos) y del 100% en familiares (2 familias con mutaciones de las 2 estudiadas). La vía de

transmisión más frecuente fue la materna (4 casos), seguida de la paterna y la aparición *de novo* (3 pacientes en grupo). Así mismo, se realizó genotipación de la variante c.73+9277T>C en el intrón 1 de *RET* descubriéndose en 30 pacientes (71,4%, 15 en homocigosis y 15 en heterocigosis). El rastreo reveló una única variante de secuencia en *ENDRB*. Además, de los 3 pacientes que cumplieron criterios de WS4, se identificó mutación causal en 2 de ellos.

Ocho de los 15 pacientes (53,3%) del grupo grave presentaron mutaciones genéticas frente a 4 de 26 (15,3%) del no grave ($p = 0,015$). El 66,6% de los pacientes con mutaciones presentan una puntuación ≥ 11 puntos.

VI.e) Discusión

HSCR se manifiesta como un espectro de severidad, distinguiéndose formas no graves manejadas con tratamiento conservador hasta la cirugía y otras graves que precisan una ostomía y una hospitalización prolongada. Aproximadamente el 80-90% de los pacientes presentan síntomas desde los primeros días de vida (retraso meconial, obstrucción intestinal o enterocolitis). En un 10% se manifiesta más tarde como estreñimiento crónico, retraso del crecimiento o distensión abdominal. La longitud del aganglionismo es considerada el principal condicionante de la gravedad. Sin embargo, pacientes con la misma extensión pueden tener un comportamiento diferente.

Predecir el comportamiento de HSCR al diagnóstico resultaría de gran importancia para evitar sus complicaciones pero supone un reto en la práctica clínica. Hasta la fecha, esta es la primera escala diseñada con fines pronósticos. Está basada en hallazgos clínicos y radiológicos descritos en la literatura como factores que aumentan el riesgo de un peor pronóstico de HSCR.

Se aplicó retrospectivamente a todos los pacientes, a su vez clasificados en graves ($n = 15$) y no graves ($n = 26$) según la estancia hospitalaria, las cirugías realizadas y la aparición de enterocolitis.

Los pacientes con evolución no grave presentaron una distribución por sexos de 4,2:1 similar a la clásicamente descrita, mientras que en el grupo grave fue próxima a 1:1 ($p = 0,038$), aspecto que relacionamos con el mayor número de aganglionismos extensos entre estos casos. La extensión del aganglionismo también demostró tener implicación en la gravedad de la enfermedad: el 90% de los TCA cumplieron los criterios de gravedad, así como el 50% de los L-HSCR y el 16% de los S-HSCR.

Aunque en la mayoría de los casos HSCR apareció de forma aislada, identificamos 3 WS4 y confirmamos la conocida asociación entre HSCR y DS, al encontrar una incidencia en nuestra cohorte del 11,9%. La presencia de síndromes asociados fue significativamente mayor en el grupo grave ($p = 0,026$).

También se conoce que las formas familiares son más frecuentes entre los aganglionismos muy extensos. Nuestra serie apoya este hecho ya que los dos pacientes con antecedentes familiares presentaron este fenotipo. La obstrucción intestinal fue el debut más común, especialmente en el grupo que cumplió los criterios de gravedad (73,3%). En el no grave se repartió de forma más homogénea entre la obstrucción intestinal (42,3%) y el estreñimiento (38,5%). Sin embargo, estas diferencias en la distribución de los antecedentes familiares y la presentación clínica no alcanzaron significación estadística.

La mayoría de los pacientes graves presentaron una ampolla vacía al tacto rectal. En el grupo no grave predominó la presencia de una ampolla adherente o seguida de deposición explosiva, reflejo de que

a través de la exploración digital se logró superar el espasmo de la zona agangliónica. Ningún paciente grave evacuó meconio en las primeras 24 horas, predominando entre ellos la menoniorrexis posterior a las 48 horas (86,7%). La situación fue distinta en el grupo no grave: 23,1% presentó meconiorrexis normal, 50% retraso superior a 24 horas y superior a 48 el 26,9% restante ($p < 0,001$). El tratamiento médico preoperatorio fue eficaz solo en 1 de cada 4 pacientes graves frente al 90% de los no graves ($p < 0,001$).

La variable “enema de contraste” tiene limitaciones, como demuestran los 8 casos en los que el primer enema no fue sugestivo de HSCR. Siete de ellos pertenecen al grupo no grave. Llama la atención el caso restante, correspondiente a un TCA de curso grave. La concordancia entre la ZT radiológica e histológica es baja en las formas largas. En estos casos la imagen puede tener falsos negativos, obteniéndose una puntuación inferior a la que cabría esperar.

Cabe destacar que el estudio de la escala de gravedad demostró que solo algunas de las variables clínicas recogidas al diagnóstico tuvieron implicación pronóstica. Nuestro análisis estadístico reveló que solo 3 de los 8 factores inicialmente propuestos (retraso meconial, síndromes o malformaciones asociadas así como la extensión del aganglionismo) pueden ser suficientes para alertar al pediatra y al cirujano pediátrico de un curso complicado de la enfermedad. Estas 3 variables constituyen la escala simplificada, en la que el punto de corte óptimo se establece en 5 puntos, con una sensibilidad del 93% y una especificidad del 84%.

Atendiendo a sus bases moleculares, HSCR es una enfermedad multifactorial, en la que además del componente genético existen otros factores que modulan su expresión. Identificamos mutación causal en 12 pacientes (Tabla 4.9), la mayoría localizadas en el proto-oncogén *RET*. Las mutaciones que originan una ganancia de función de la proteína se asocian a neoplasia endocrina múltiple tipo 2 (*Multiple Endocrine Neoplasia type 2*, MEN2): MEN2A (OMIM 171400), carcinoma medular de tiroides familiar (*Familial Medullar Thyroid Carcinoma*, FMTC, OMIM 155240) y MEN2B (OMIM 162300). Se ha descrito una incidencia de MEN2A en pacientes HSCR del 2,5-5%, proponiéndose que en estos casos las mutaciones actúan vía un efecto dual. Aquellas que producen el cambio de una cisteína por otro Aa en el dominio extracelular del receptor se relacionan con carcinoma medular de tiroides y MEN 2A. Varios autores defienden el despistaje de estas mutaciones en pacientes HSCR, localizadas con mayor frecuencia en los exones 10 y 11, pero también en el 13,14, 15 y 16. Todos ellos fueron analizados. Ninguna de las mutaciones detectadas implicó a los codones de riesgo. En dos casos de WS4 se identificó su origen molecular, correspondiente a mutaciones en el exón 5 de *SOX10*, previamente comunicadas por nuestro grupo.

Teniendo en cuenta los criterios de gravedad, obtuvimos que 8 de los 15 pacientes clasificamos como graves (53,3%) presentaron mutaciones frente a 4 de 26 (15,3%) entre los no graves ($p = 0,015$), lo que nos permite plantear la existencia de correlación entre la expresión fenotípica de la enfermedad y la identificación de mutaciones causales. Además, se detectó la variante c.73+9277T>C en el intrón 1 de *RET* en 30 pacientes, siendo en este caso más frecuente en el grupo no grave (76,9% vs 66,7%, $p = 0,713$). Esta diferencia, aunque no alcanzó significación estadística, podría relacionarse con el mayor número de casos esporádicos en este grupo.

La presente escala y su forma simplificada demostraron utilidad para determinar la gravedad de HSCR al diagnóstico. Dado que la versión simplificada mostró mayor sensibilidad y especificidad, la con-

sideramos una buena alternativa y más fácilmente aplicable en la práctica clínica. Sin embargo, en ambos casos es necesaria su validación prospectiva.

VI.f) Conclusión

La aplicación de una escala al diagnóstico de HSCR puede contribuir a identificar precozmente las formas graves de la enfermedad y prevenir sus complicaciones. Un valor ≥ 11 mostró una adecuada sensibilidad y especificidad para este propósito. La versión simplificada también demostró utilidad para determinar la gravedad de HSCR al diagnóstico, presentando una sensibilidad y especificidad superiores. Esto nos permite considerarla una alternativa válida a la anterior, que puede presentar mayor interés en la práctica clínica por la sencillez de su aplicación.

El estudio molecular de *RET*, *EDNRB* y *EDN3* realizado en todos los pacientes HSCR, así como de *SOX10* en los casos de WS4, reveló la presencia de 8 variantes de secuencia en *RET*, 1 en *EDNRB* y 2 en *SOX10*. De ellas, 9 han sido comunicadas por primera vez por nuestro grupo.

Defendemos el análisis molecular del proto-oncogén *RET* como parte del protocolo de estudio de los pacientes HSCR. Una de las 8 variantes de secuencia identificadas en el proto-oncogén *RET* se situó en un exón de riesgo MEN 2. Dado que no implicó el cambio de una cisteína por otro aminoácido, no fue preciso tomar medidas profilácticas a este respecto.

En más del 50% de los pacientes graves se identificaron mutaciones genéticas, observando una correlación entre la severidad de la enfermedad y el estudio molecular. No obstante, se considera necesaria la validación prospectiva de las herramientas propuestas así como la identificación de nuevos genes y mecanismos que expliquen la variabilidad fenotípica de esta entidad.

VII. Summary



VII.a) Introduction

Hirschsprung disease (HSCR, OMIM 142623) is a developmental disorder characterized by the absence of the enteric nervous system in the myenteric and submucosal plexus of the distal bowel. Its incidence is estimated to be 1/5000 live births, making it the most frequent cause of functional intestinal obstruction in childhood. The proximal extent of aganglionosis from the internal anal sphincter allows for its classification into different phenotypes: short-segment HSCR (S-HSCR, 75-80%), when the aganglionosis does not extend beyond the upper sigmoid, long-segment HSCR, when the absence of ganglion cells is proximal to the sigmoid colon (L-HSCR, 15-20%), and total colonic aganglionosis, when the entire colon and less than 50 cm of the terminal ileum are affected (TCA, 2-13%). Other less common forms of the disease have been described, such as total intestinal aganglionosis, segmental and ultra-short forms. For reasons not well understood, the male:female ratio is greater for S-HSCR (5.5:1) than for L-HSCR (1.75:1). HSCR usually appears in a sporadic form, although there are familial cases with autosomal dominant or recessive inheritance with partial penetrance and variable expressivity. It occurs as an isolated trait in 70% of patients and as part of a syndrome in the other 30%. It is associated with some chromosomopathy in 12% of cases, the commonest being Down Syndrome (DS).

The genetic basis of HSCR is still not clearly established. The major susceptibility gene for HSCR is the *RET* proto-oncogene. It encodes for a membrane receptor with tyrosine kinase activity which plays a crucial role in the formation of the enteric nervous system. However, only 50% of familial and 10-35% of sporadic cases are attributable to germline loss-of-function mutations in this gene's coding sequence. On the other hand, germinal mutations that cause other pathologies, such as the MEN 2A and MEN 2B syndromes and the familial medullary thyroid carcinoma, with an autosomal dominant inheritance, have also been attributed to *RET*.

So far, only a minority of cases are known to be due to mutations in genes other than *RET*, such as *EDNRB* and *EDN3*, that are involved in this or in other signaling pathways. Thus, there is still no complete elucidation of the molecular mechanism that causes the disease in most HSCR patients, especially in the sporadic cases. There is evidence that the appearance of these sporadic forms, particularly the S-HSCR phenotype, follows a complex pattern of inheritance in which various genetic events must converge to produce the phenotype. Indeed, it is clear that the appearance of the phenotype also depends on such common genetic variants as those which are located in the Enhancer-like domain of intron 1 of *RET*. This variant, c.73+9277T>C, shows a very strong association with sporadic cases, and could act as a modifying factor modulating the penetrance of mutations in other genes and possibly of the *RET* proto-oncogene itself.

Moreover, one of the syndromic forms of HSCR is Waardenburg Syndrome type 4 (WS4, OMIM 277580), caused by either autosomal-recessive mutations in genes *EDNRB* and *EDN3* or autosomal-dominant mutations in *SOX10* (45-55% of cases).

HSCR varies in severity from non-severe cases managed with conservative treatment until surgery to more severe forms that require a stoma and prolonged hospitalization. Previously, other scoring

systems had been validated for the neonatal diagnosis of HSCR and for its differentiation from other enteric nervous system disorders. However, to date, no scale has been proposed to predict the disease's behaviour. Furthermore, the genotype-phenotype correlation has yet to be solidly established even though it has been intensively investigated.

VII.b) Working hypothesis and objectives

The primary objective of the present study was to design a clinical scoring system that will allow for the early prediction of the severity of HSCR, and facilitate the study of the phenotype-genotype correlation through the selection of cases with severe behaviour.

The following were considered secondary objectives: to describe the clinical characteristics of the patients included in the study, to identify mutations predisposing to MEN 2, to communicate unknown mutations for HSCR and to offer genetic counseling for participants families, establishing the inheritance type and recurrent risk for the disease.

VII.c) Materials and methods

A retrospective observational study including 42 patients diagnosed with HSCR between 1983 and 2013 at the University Hospital of Badajoz, a tertiary referral centre in Extremadura (Spain), was conducted. The study was approved by the ethics committee of that hospital, and the signed informed consent of the participants was obtained. Patients were evaluated by a paediatrician and a paediatric surgeon, completing the routine protocol including contrast enema, anorectal manometry and rectal or bowel biopsy. The confirmation diagnosis was established by the absence of ganglion cells in the biopsy.

We recorded clinical data such as age at diagnosis, sex, family history of HSCR, associated syndromes or malformations, meconium evacuation, clinical onset (defined as the earliest identified symptoms), digital rectal examination, extent of the aganglionosis, effectiveness of pre-operative treatment, findings of the first enema, surgical procedures, complications and length of hospitalization. Patients were divided into 2 groups (severe and non-severe) according to the outcome of the disease. Severe behaviour was defined by 2 or more of the following criteria: the need for stoma or >2 surgical procedures, development of at least one episode of enterocolitis, or prolonged hospitalization (>100 days in the first 2 years after diagnosis). Surgery and hospital stays for other reasons were excluded. The enterocolitis diagnosis was established by clinical criteria (Table 3.1). A clinical score was prepared taking into account the factors described below. Once the diagnosis had been established, each patient was scored in accordance with these 8 criteria (Table 4.3):

- Family history
- Associated syndromes or malformations
- Meconium passage
- Clinical onset
- Digital rectal examination
- Effectiveness of preoperative medical treatment
- Extent of the aganglionosis

- Results of the first enema

A molecular study was carried out in all patients, their parents and, when available, their siblings, at the Department of Genetics, Reproduction, and Fetal Medicine, University Hospital Virgen del Rocío of Seville (Spain), screening for the coding sequence of the *RET*, *EDNRB*, and *EDN3* genes in all cases, and of *SOX10* in patients with suspected WS4. For all the patients, we also genotyped the variant c.73+9277T>C in intron 1 of *RET*, given that the c.73+9277T allele is strongly associated with HSCR and seems to increase penetrance in patients with rare *RET* coding mutations through an additive effect.

Data analysis was performed using the IBM-SPSS Statistics 19 software package. Quantitative variables are mainly presented as the mean \pm standard deviation, with the severe and non-severe groups being compared using the non-parametric Mann-Whitney-Wilcoxon test. The comparison of the number of surgical procedures, hospitalization time and enterocolitis episodes throughout the three decades that are covered by our study was made using the non-parametric Kruskal-Wallis test. Categorical variables are presented as percentages, and were analysed through the corresponding contingency tables using either Pearson's chi-squared test or Fisher's exact test if the conditions of validity of the former were not satisfied.

The relationship between the score and the severity of HSCR was analysed by means of a logistic regression model, including the Hosmer-Lemeshow (HL) test of goodness-of-fit, Nagelkerke's R^2 , and the odds ratio (OR), together with their confidence intervals. The discriminating power of the model was evaluated through its receiver operating characteristic (ROC) curve, including the study of the area under the curve (AUC). This allowed us to establish the optimal cut-point for the score ensuring adequate sensitivity and specificity. Subsequently, a multiple logistic regression model with stepwise forward selection was used to determine the predictive capacity of the variables of the scale with respect to the severity of the disease. A value of $p \leq 0.05$ was considered to be statistically significant.

VII.d) Results

Between 1983 and 2013, 42 HSCR patients were treated in our centre (29 males, 69%). The median age at diagnosis was 52 days (2 days-14.02 years). Forty patients presented a sporadic form, the other 2 were familial HSCR cases corresponding to two different families. In 34 patients (81%), the disease occurred as an isolated event, and in the other 8 patients in a syndromic form (5 DS and 3 WS4). One of the latter met the criteria for peripheral demyelinating neuropathy, central dysmyelinating leukodystrophy, Waardenburg syndrome and Hirschsprung's disease. Three DS patients had cardiac involvement. No other associated malformations were noted.

The commonest form was S-HSCR (26 cases), followed by TCA (10 cases), L-HSCR (4 cases) and ultra-short (2 cases). No total intestinal aganglionosis cases were identified. None of the cases had a normal DRE; most had a tight rectum or the digital rectal examination was followed by explosive evacuation (57.1%), and the remaining 42.9% had an empty rectum. In 50%, passage of meconium was delayed by more than 48 hours; in 14.3%, meconium passage occurred during the first 24 hours of life. Intestinal obstruction was the commonest clinical presentation (23 cases), followed by protracted constipation (12 cases). In 8 patients, the report of the first enema was normal or with irrelevant alterations. The characteristic transition zone (TZ) was identified in 23 patients whereas in the remaining 11, the image showed

other alterations (decreased colon diameter, delayed contrast evacuation or microcolon). Pre-operative medical treatment was effective in 24 cases (57.1%). Thirteen non-permanent ostomies were performed.

Fifteen of the 42 patients (35.7%) met the criteria for severe disease. The mean number of surgical procedures in this group was 2.5 ± 1.4 , and hospitalization time in the first two years after diagnosis was 160.2 ± 85.9 days. Twelve patients in the severe group (80%) had at least one episode of pre- or post-operative enterocolitis. One patient could not be classified due to being unable to reach for a follow-up. The remaining 26 were classified as non-severe. They required a mean of 1.2 ± 0.5 surgical interventions, a hospitalization time of 35.7 ± 22.5 days, and 7.7% had episodes of enterocolitis ($p < 0.0001$).

There were significant differences in the HSCR Severity Score between the two groups, with the severe group having higher mean scores (13.15 ± 2.36) than the non-severe group (8.15 ± 2.13 ; $p < 0.001$) (Figure 4.16 A). A logistic regression analysis showed a statistically significant direct relationship between the score and the severity of the disease ($p = 0.003$; OR = 2.92; 95% CI OR: 1.45-5.90; Nagelkerke's $R^2 = 0.753$; HL test: $p = 0.833$, Figure 4.12). The sensitivity and specificity of our HSCR Severity Score from the ROC curve were 87% and 81%, respectively, at a cut-point score of 11. The AUC analysis showed the score to have good accuracy (AUC = 0.949; 95% CI: 0.89-1; $p < 0.0001$; Figure 4.13).

A multivariate logistic regression model with forward selection of the variables showed that only three variables were necessary to explain severity (i.e., in the presence of these three, the other variables provided no relevant information). These 3 were "associated malformations or syndromes" ($p = 0.023$; OR = 4.41; 95% CI OR: 1.23-15.84), "meconium evacuation" ($p = 0.04$; OR = 20.43; 95% CI OR: 1.15-361.90), and "extent of the aganglionosis" ($p = 0.007$; OR = 14.84; OR 95% CI: 2.11-104.24). This allowed us to identify a simplified score (1-9 points, Table 4.6) which was also significantly correlated with severity ($p = 0.001$; OR = 5.75; 95% CI OR: 2.01-16.48; Nagelkerke's $R^2 = 0.725$; HL test: $p = 0.889$, Figure 4.14). Again, the AUC showed a good predictive value (0.944; 95% CI: 0.88-1, $p < 0.0001$). The cut-point analysis indicated that a score of 5 would be optimal in this case, with a sensitivity of 0.93 and specificity of 0.84 (Figure 4.15). In this simplified score, the mean score of the severe group was 6.27 ± 1.33 versus 3.31 ± 1.29 for the non-severe group ($p < 0.001$) (Figure 4.16 B).

Disease-associated mutations were identified in 12 patients (Table 4.9). In 9 of them (7 sporadic and 2 familial), the changes affected the *RET* proto-oncogene. Therefore, the *RET* mutation frequency in our cohort is 17.5% in sporadic cases (7 patients with mutations out of 40 sporadic cases) and 100% in familial cases (2 families with mutations of the 2 studied). The commonest route of transmission found was maternal (4 cases), with paternal transmission and *de novo* cases being found at a frequency of 3 cases each. Moreover, the variant c.73+9277T>C in intron 1 of *RET* was found in 30 patients (71.4%; 15 homozygous and 15 heterozygous). Screening revealed a single sequence mutation in *EDNRB*. Also, of the 3 patients with WS4 criteria, causative mutation was identified in 2.

Eight of the 15 patients (53.3%) in the severe group presented genetic mutations *vs* 4 of the 26 (15.3%) in the non-severe group ($p = 0.015$). Eight (66.6%) of the patients with mutations scored ≥ 11 points.

VII.e) Discussion

HSCR varies in severity from non-severe cases managed with conservative treatment until surgery to more severe forms that require a stoma and prolonged hospitalization. Approximately 80-90% of patients present symptoms in the first days of life (delayed meconium evacuation, intestinal obstruction or enterocolitis). However, in 10% of cases, it manifests later as chronic constipation, failure to thrive or abdominal distension. The extension of the aganglionosis has been considered to be the main factor conditioning severity, but patients with the same length of aganglionic bowel may have different clinical presentations and different levels of severity in their clinical course.

Predicting the behaviour of HSCR at diagnosis would be of great importance to prevent its complications, but constitutes a challenge for clinical practice. To date, the present scoring system is the first designed for prognostic purposes. It is based on clinical and radiological findings, well known in the literature to increase the risk of poor prognosis in HSCR.

We applied it retrospectively to all our patients having classified them as severe ($n = 15$) or non-severe ($n = 26$) depending on hospitalization time, surgical procedures performed and the occurrence of enterocolitis.

The sex ratio (male:female) of the patients with non-severe outcome was 4.2:1, similar to that classically described, whereas in the severe group it was close to 1:1 ($p = 0.038$), which we relate to the greater number of children with extensive aganglionosis among these latter cases. We found that the extent of the aganglionic segment influenced the severity of disease: 90% of the TCA, 50% of the L-HSCR, and 16% of the S-HSCR met the severity criteria.

Although in most cases HSCR appeared in isolation, we identified 3 cases of WS4 and confirmed the known association between HSCR and DS, finding an incidence in our cohort of 11.9%. The presence of associated syndromes was significantly greater in the severe group ($p = 0.026$).

The fact that familial forms are more common among cases with very extensive aganglionosis is also known. Our series is coherent with this since the 2 patients with familial antecedents presented this phenotype. Intestinal obstruction was the most common first sign, especially in the group that met the severity criteria (73.3%). In the non-severe group, there was a more even distribution between intestinal obstruction (42.3%) and constipation (38.5%). However, these apparent differences in the distribution of family history and clinical presentation did not reach statistical significance.

Most of the severe patients had an empty rectum at the time of digital rectal examination. In the non-severe group, there was a predominant presence of a tight rectum or an examination being followed by explosive deposition, reflecting that the digital rectal examination overcame the spasm of the aganglionic zone. No severe patient evacuated meconium in the first 24 hours, there being predominant among them passage of meconium after 48 hours (86.7%). The situation was different in the non-severe group: 23.1% had normal passage of meconium, 50% delayed to after 24 hours, and the remaining 26.9% to after 48 hours ($p < 0.001$). Pre-operative medical treatment was effective only in 1 in 4 of the severe vs 90% of the non-severe patients ($p < 0.001$).

The variable "contrast enema" has limitations, as evidenced by the 8 cases in which the first enema was not suggestive of HSCR. Seven of them belonged to the non-severe group. It is noteworthy that the remaining case corresponded to a severe course of TCA. The concordance between the radiological and histological TZ was low in the long forms for which the image may give false negatives, resulting in a lower score than would have been expected.

Interestingly, we found that only a few clinical criteria at diagnosis were significantly correlated with the clinical outcome. Our statistical analysis suggested that only 3 of the 8 factors initially considered (a history of delayed meconium evacuation combined with information regarding associated malformations or syndromes and extent of the aganglionosis), could be enough to alert a pediatrician and pediatric surgeons to the possibility of severe form of HSCR. These 3 items constitute a simplified score in which a cut-point of 5 would be optimal, with a sensitivity of 93% and specificity of 84%.

Given its molecular basis, HSCR is a multifactorial disease in which, in addition to the genetic component, there are other factors that modulate its expression. We identified causative mutation in 12 patients (Table 4.9), most located in the *RET* proto-oncogene. Gain-of-function mutations affecting the RET protein are associated with conditions of multiple endocrine neoplasia type 2 (MEN2): MEN2A (OMIM 171400), familial medullary thyroid carcinoma (FMTC, OMIM 155240), and MEN2B (OMIM 162300). The co-occurrence of MEN2A has been described in 2.5-5% of HSCR patients, it being proposed that in these cases the mutations act via a dual effect. Several authors advocate screening HSCR patients for the *RET* mutations leading to MEN2. These are most often located in exons 10 and 11, although also in 13, 14, 15, and 16. All of them were analysed. Nevertheless, none of the mutations detected in our patients involved the risk codons. The molecular origin of two cases of WS4 was identified as corresponding to mutations in exon 5 of *SOX10*, as previously reported by our group.

In applying the severity criteria, we found that 8 of the 15 patients classified as severe (53.3%) had identified mutations *vs* 4 of the 26 (15.3%) of the non-severe ($p = 0.015$), which is suggestive of a correlation between the phenotypic expression of the disease and the identification of causative mutations in the principal genes that have been described to date. Furthermore, the c.73+9277T>C variant was detected in the intron 1 of *RET* in 30 patients, being in this case more frequent in the non-severe group (76.9% *vs* 66.7%, $p = 0.713$). This difference, although not statistically significant, could be related to the greater number of sporadic cases in this group.

The scoring system and its simplified form proved useful in determining the severity of HSCR at diagnosis. Based on its superior sensibility and specificity, we find the simplified scoring system to be a good and easier to use alternative in clinical practise. Both cases, however, require prospective validation.

VII.f) Conclusion

Application of a clinical scoring system when HSCR is diagnosed may help in the early detection of severe forms of the disease and prevent its complications. A cut point of 11 on the HSCR Severity Score showed adequate sensitivity and specificity for this purpose. Our simplified score system also proved useful in determining the severity of HSCR at diagnosis with a greater sensitivity and specificity, leading us to consider it a good alternative since it is more readily applicable in clinical practice.

The molecular study of *RET*, *EDNRB* y *EDN3* conducted on all HSCR patients, as well as *SOX10* in WS4 forms, showed 8 causative mutations in *RET*, 1 in *EDNRB* and 2 en *SOX10*. Among them, 9 have been communicated for the first time by our group.

Our group advocated *RET* screening as part of the study of HSCR patients. One of the 8 identified mutations was located in a risk codon for MEN2. Given that the substitution of a cystein residue was not involved, it was not necessary to implement prophylactic measures.

Over 50% of the severe patients presented genetic mutations, most of them located in the *RET* proto-oncogene, a proportion significantly higher than in non-severe forms. This suggests a correlation between the phenotypic expression of the disease and the identification of positive results in the molecular study. However, prospective validation for the presented tools is required as well as future research focused on new genes and mechanisms explaining the phenotypic variability for this entity.

1. Introducción



1.1. El sistema nervioso entérico (SNE)

El SNE es la mayor y más compleja división del sistema nervioso periférico (SNP) y del sistema nervioso autónomo (SNA) en vertebrados (Sasselli y cols, 2012). Contiene entre 400 y 600 millones de neuronas en humanos y alrededor de 1,2 millones en ratones (Gianino y cols, 2003), y está integrado por al menos 18 tipos de neuronas funcionalmente diferentes (Brookes, 2001) que utilizan una variedad de neurotransmisores y neuromoduladores similares a los usados por el sistema nervioso central (SNC) (Sasselli y cols, 2012). Las neuronas del SNE se encuentran aglutinadas en estructuras ganglionares que se interconectan entre sí y forman dos plexos principales, el mientérico o de Auerbach, que controla la motilidad intestinal, y el submucoso o de Meissner, ausente en el esófago, que regula las funciones de la mucosa intestinal (Sasselli y cols, 2012). A diferencia de otros ganglios autónomos, los ganglios entéricos son avasculares y carecen en su interior de células del tejido conectivo y por tanto de fibrillas de colágeno. El apoyo estructural de las neuronas entéricas proviene de una población de células gliales con características morfológicas y fenotípicas más similares a los astrocitos del SNC que a las células de soporte de los ganglios simpáticos y parasimpáticos (Gershon y Rothman, 1991). Estas características morfológicas de las células gliales proporcionan al SNE un entorno regulado y protegido similar al SNC (Gabella, 1987).

El gran número de neuronas presentes en los plexos entéricos y su diversidad fenotípica se refleja en circuitos complejos, que funcionan en gran medida independientemente del SNC. De hecho, a pesar de que el SNE conecta con el cerebro y los núcleos de la médula espinal a través de las ramas simpáticas y parasimpáticas del SNA, es la única división del SNP capaz de generar una actividad refleja. Por eso, dada su autonomía y su semejanza estructural y neuroquímica con el SNC, el SNE es denominado por algunos autores como “el segundo cerebro” (Gershon, 1999).

1.1.1. Desarrollo embrionario del SNE

El SNE deriva de la cresta neural (CN), una población celular transitoria, específica de vertebrados, que se origina entre el ectodermo no neural (futura epidermis) y la placa neural, de la que se deriva el SNC (Figura 1.1) (Yntema y Hammond, 1954; Le Douarin y Teillet, 1973). Las células derivadas de la CN comprenden una población heterogénea de células progenitoras pluripotenciales que parten de la región dorsal del tubo neural tras el cierre del mismo. Durante el desarrollo embrionario, estas células pierden su carácter epitelial y adquieren características mesenquimatosas, transformándose en células migratorias. Así, las células de la CN realizan una larga migración y se diferencian en diferentes fenotipos celulares, tales como las neuronas y la glía del SNE y de los ganglios autónomos y sensoriales del SNP, las células de Schwann, los melanocitos, las células cromafines de la médula adrenal y gran parte del tejido conectivo y esquelético de las estructuras craneofaciales (Figura 1.1) (Le Douarin y Dupin, 2003). A pesar de que la CN es un derivado ectodérmico, se ha propuesto que se considerara la cuarta capa germinativa (Hall, 2008).

En 1954, Yntema y Hammond fueron los primeros en sugerir el origen del SNE a partir de la CN. Estos autores observaron que al producir la ablación de la CN vagal en embriones de aves, el SNE no se desarrollaba a lo largo del tracto gastrointestinal. Estos resultados fueron confirmados posteriormente

utilizando quimeras pollo-codorniz (Le Douarin y Teillet, 1973). Las células de la CN de codorniz fueron injertadas en embriones de pollo antes de la migración, observándose como resultado neuronas de codorniz y células gliales en el intestino de los embriones de pollo injertados. Estudios de linaje celular en ratones revelaron un origen similar para el SNE de mamíferos (Serbedzija y cols, 1991).

Sin embargo, a pesar de que las células de la CN son producidas a partir de toda la longitud del eje neural, solo ciertas regiones bien definidas del mismo dan lugar al SNE, en contraposición a otros derivados como los precursores de los melanocitos, los ganglios sensoriales y los simpáticos, que se originan a lo largo de todo el eje neural (Figura 1.2) (Le Douarin y cols, 2004).

Las regiones de la CN de las que derivan las células precursoras del SNE se dividen en vagal, troncal y sacra (Figura 1.3), siendo la primera la que más precursores aporta a la formación del SNE (>80%). Estas células precursoras entran en la región anterior del aparato digestivo del embrión entre la 7ª y la 12ª semana de gestación en humanos, en dirección rostro-caudal, hasta colonizar por completo el intestino en desarrollo (Okamoto y Ueda, 1967). Únicamente una pequeña porción del SNE procede de la región troncal de la CN, limitada a la inervación del esófago y estómago. Por último, se establece una segunda ola migratoria en la cual están implicadas las células de la CN procedentes de la región sacra. Estas últimas se encargaran de colonizar los ganglios pélvicos autónomos y migran más tarde hacia el intestino distal en dirección caudo-rostral (Fu y cols, 2004; Lake y Heuckeroth, 2013).

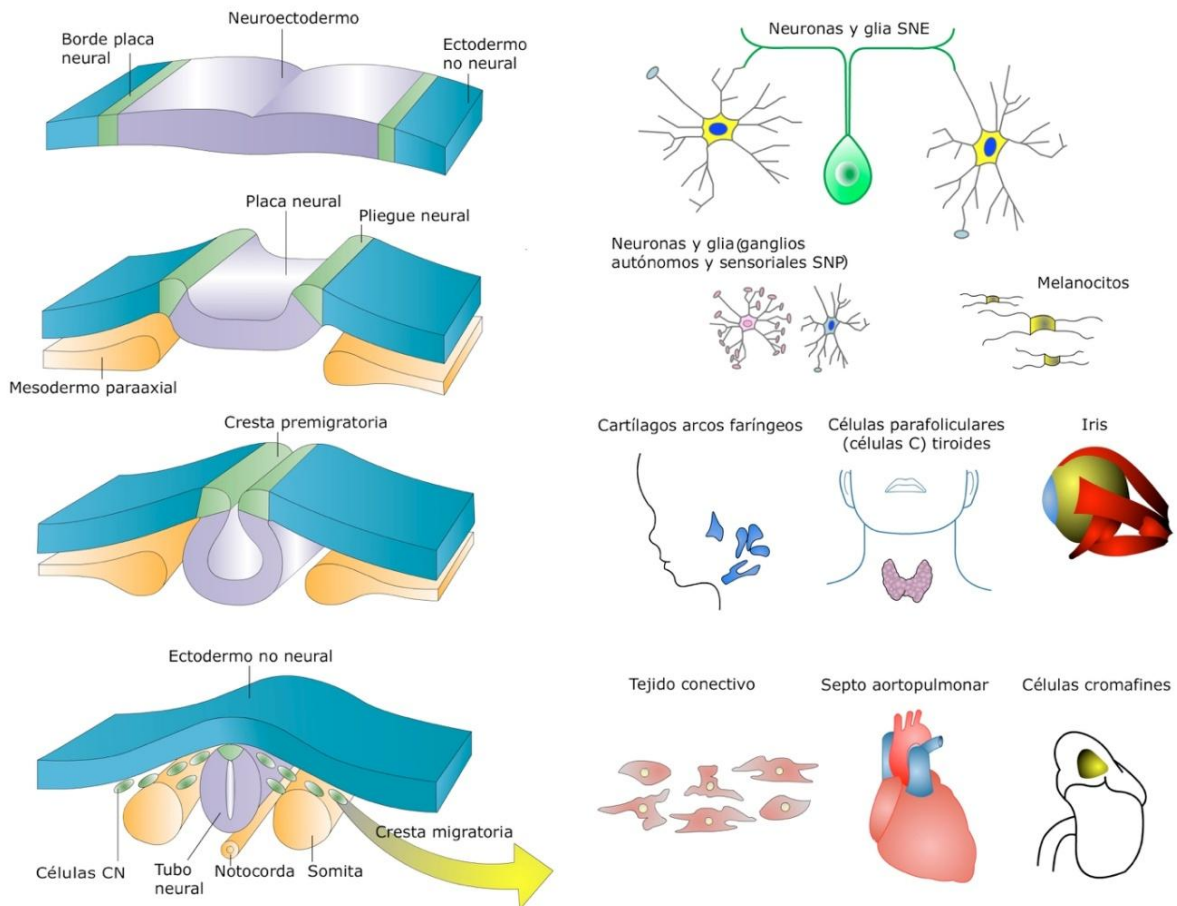


Figura 1.1: Formación de la CN migratoria y derivados celulares de la misma.

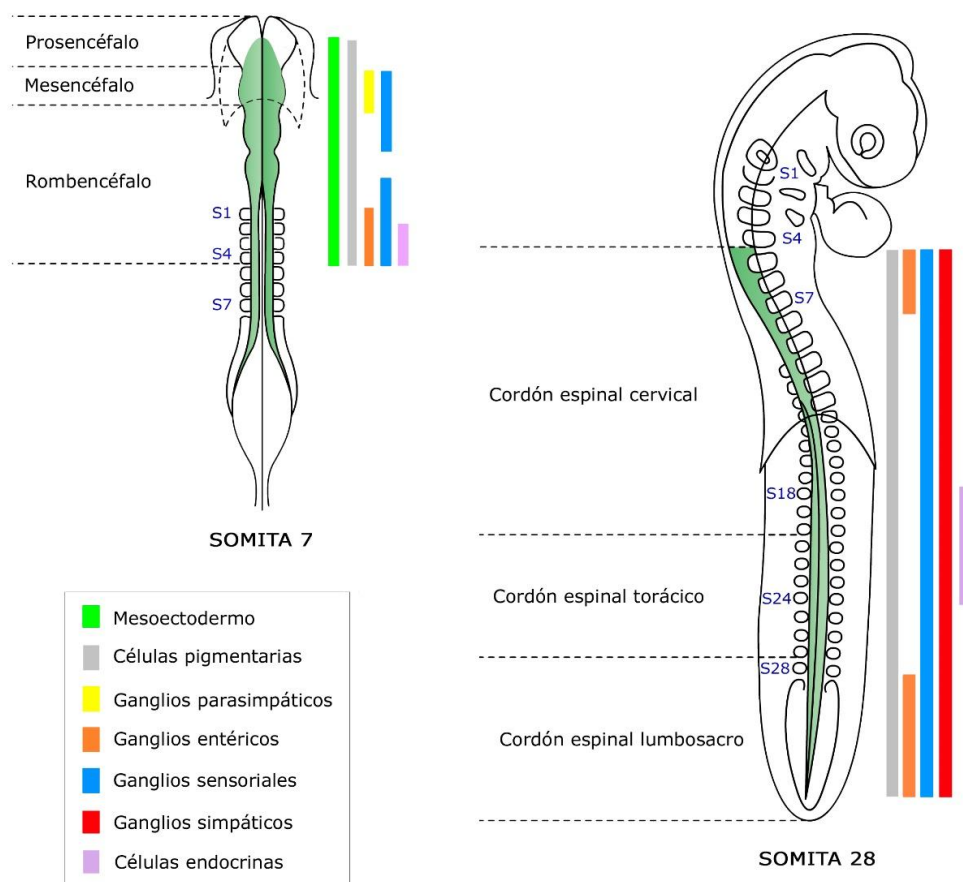


Figura 1.2: Mapa de los derivados de la CN en embrión de pollo.

Los neuroblastos que surgen del nivel anterior (somitas 1-7) colonizan la totalidad del intestino. Los neuroblastos situados en región posterior al somita 28 contribuyen a la formación de los ganglios postumbilicales. La CN de la región cervical y dorsal (somitas 8-28) no proporciona neuronas entéricas (Adaptado de Le Douarin y Teillet, 1973; Serbedzija y cols, 1991).

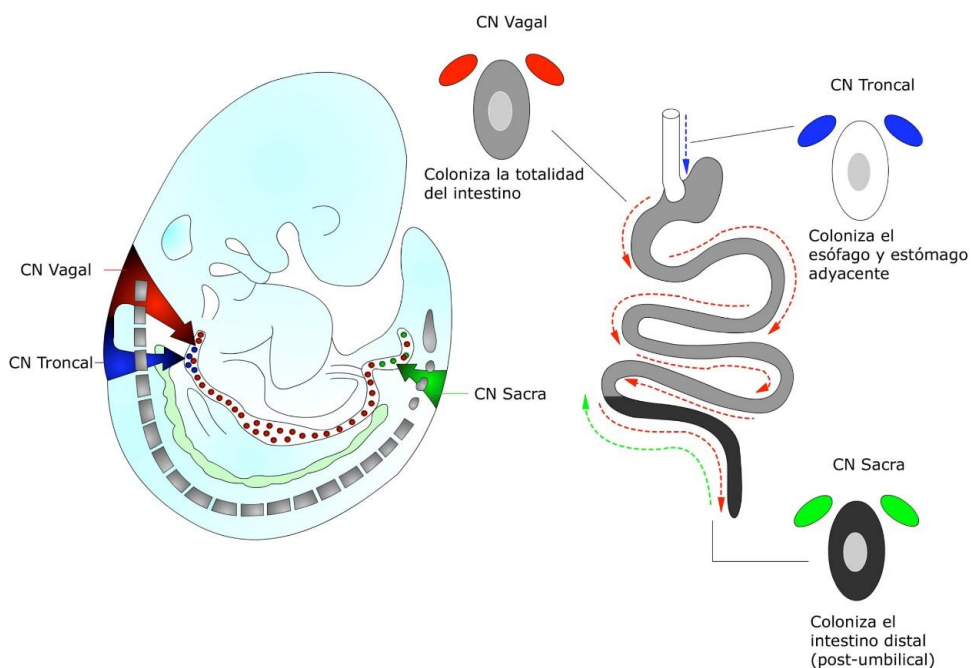


Figura 1.3: Intestino embrionario anterior, medio y posterior colonizado por precusores neuronales procedentes de la CN vagal, troncal y sacra. (Sasselli y cols, 2012).

1.1.1.1. Contribución de la cresta neural vagal a la formación del SNE

La CN vagal es el único nivel axial que proporciona células para el SNE de la totalidad del tracto gastrointestinal (Figura 1.3). El tiempo de colonización del intestino embrionario por las células de la CN vagal ha sido analizado usando marcadores celulares y líneas transgénicas. Estudios previos sobre el desarrollo del SNE en ratón, han demostrado que los progenitores vagales del SNE se desprenden del tubo neural entre el día embrionario E8.5-9 (Kapur y cols, 1992; Brookes, 2001) (Figura 1.4), iniciando la migración, primero ventralmente y luego ventromedialmente, hasta que entran en el intestino anterior el día E9.5. Una vez dentro del intestino, las ahora denominadas células madre de la CN entérica, se expanden por el intestino medio y se aproximan a la unión ileocecal el día E10.5. El día E11.5 han pasado el ciego y en el E12.5 han entrado en el intestino posterior. La migración se completa alrededor de E14.5, cuando las células de la CN entérica llegan al final del intestino posterior (Sasselli y cols, 2012). En este punto, se mezclan con células originadas de la CN sacra que están migrando caudo-rostralmente (Kapur y cols, 1992; Anderson y cols, 2006).

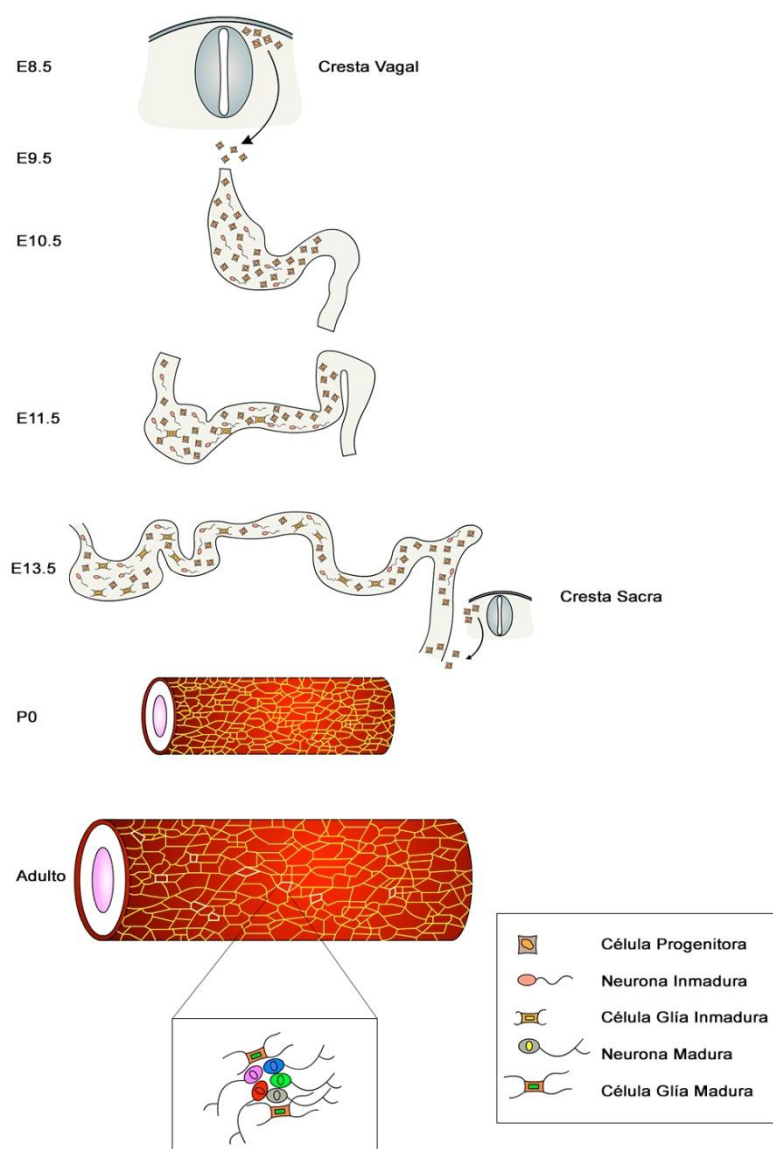


Figura 1.4: Resumen del desarrollo del SNE y glía del ratón.

Se muestra la migración y maduración de las células de la CN (vagal y sacra) a lo largo del intestino (E8.5-E13.5). P0: Día 0 postnatal. Adulto: formación de los ganglios entéricos (Adaptado de Sasselli y cols, 2012).

1.1.1.2. Contribución de la cresta neural sacra al SNE

La CN sacra se encuentra caudalmente a nivel del somita 28 en aves (Figura 1.2) y del somita 24 en ratones y sólo coloniza el intestino post-umbilical (Le Douarin y Teillet, 1973; Burns y Douarin, 1998). Inicialmente, las células de la CN sacra migran ventralmente para poblar el mesénquima pélvico y el nervio de Remak (único en las aves), y posteriormente, hacen una pausa en su migración fuera del intestino posterior. Tras la llegada de las células de la CN vagal, los progenitores sacros invaden el intestino posterior (aproximadamente el día E7.5 en aves y E13.5 en ratones) contribuyendo a la colonización de la región distal (Burns y Douarin, 1998; Kapur, 2000; Anderson y cols, 2006). Estas células dan lugar también a neuronas y células gliales, pero en comparación con la CN vagal, la proporción es pequeña y disminuye rostralmente (Burns y Douarin, 1998).

1.1.2. Bases moleculares del desarrollo del SNE

Las células de la CN que forman el SNE sufren durante el desarrollo del mismo, procesos críticos de migración, proliferación, supervivencia y diferenciación en neuronas entéricas y células de la glía (Lake y Heuckeroth, 2013). Así, los precursores neuronales, además de migrar lejos de los puntos de entrada del intestino y extenderse de manera uniforme a través de él, responden a señales de proliferación aumentando su número drásticamente (Gianino y cols, 2003). Todo este complicado proceso está perfectamente orquestado bajo el control molecular de numerosas vías de señalización, factores de transcripción y neurotróficos, que se expresan a nivel de las células de la CN y del mesénquima intestinal (Sasselli y cols, 2012). En estudios experimentales, especialmente en ratón, pollo y pez cebra, se han identificado muchas de estas vías de señalización y moléculas relacionadas (Sasselli y cols, 2012; Borrego y cols, 2013a y b; Figura 1.5). A continuación se comentan las de mayor interés.

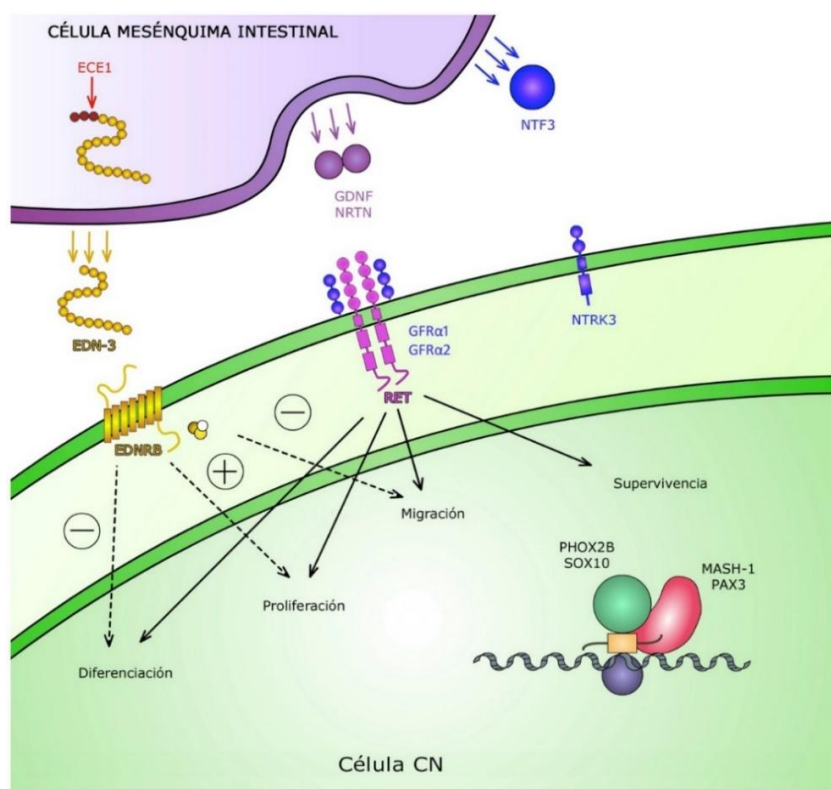


Figura 1.5: El desarrollo del SNE está regulado por una amplia variedad de moléculas y vías de señalización que implican a las células de la CN y al mesénquima intestinal.

(Adaptado de Borrego y cols, 2013a).

1.1.2.1. La ruta RET/GFR α 1/GDNF

RET (*REarranged during Transfection*) es un receptor transmembrana con actividad tirosín-kinasa que participa en la activación de cascadas de señalización intracelular que intervienen en la proliferación, diferenciación y supervivencia celular (Takahashi y cols, 1988). Es una proteína de 124 KDa que contiene 3 dominios: extracelular, transmembrana e intracelular. El dominio extracelular incluye un péptido señal, una región con alta homología a la familia de moléculas de adhesión intercelular cadherinas y una región rica en cisteínas (Takahashi y cols, 1988 y 1989). Dichos residuos cisteínicos están conservados entre especies, lo que sugiere que estos Aa desempeñan un papel fundamental en la formación de enlaces disulfuro intramoleculares, y por tanto, en determinar la estructura terciaria y cuaternaria de la proteína (Takahashi y cols, 1989; Iwamoto y cols, 1993). El dominio intracelular incluye al dominio con actividad tirosín-kinasa, donde reside la actividad catalítica del receptor, que se activa mediante la fosforilación de determinados residuos tirosínicos desencadenando la activación de distintas rutas de señalización intracelular.

Este receptor está codificado por el proto-oncogén *RET*, localizado en la región cromosómica 10q11.2 (Pasini y cols, 1995). Su estructura genómica consta de 21 exones distribuidos a lo largo de 60 Kb (Figura 1.6). Alrededor del 40% de su secuencia corresponde a un intrón muy grande, de 23 Kb, localizado entre los exones 1 y 2 (Pasini y cols, 1995; Myers y cols, 1995).

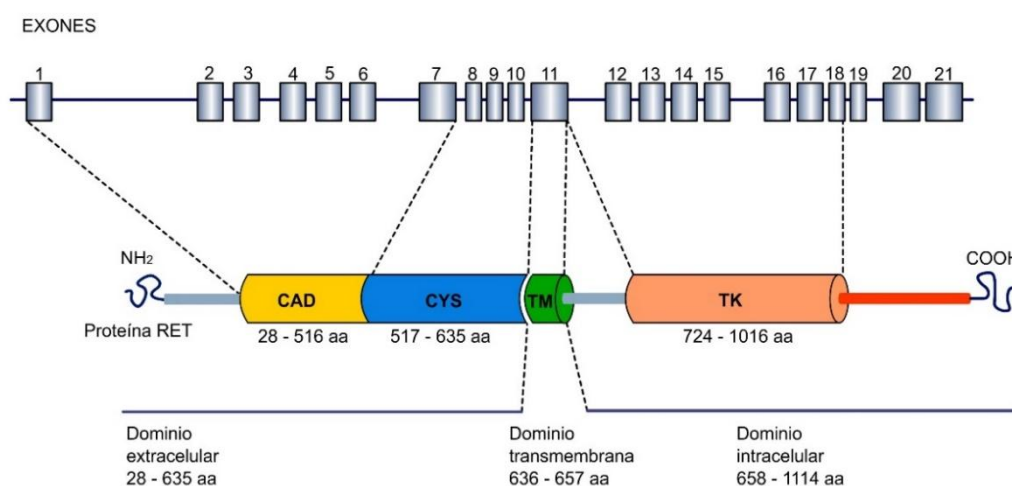


Figura 1.6: Esquema de la estructura del proto-oncogén *RET* y de su correspondiente proteína.

El patrón de expresión de *RET* está finamente regulado durante el desarrollo embrionario de los vertebrados, apareciendo unas tasas superiores en los estadios iniciales. Se expresa principalmente en la CN, el SNC, el SNP y el sistema excretor (Pachnis y cols, 1993; Tsuzuki y cols, 1995; Skinner y cols, 2008). En consonancia con su patrón de expresión, se ha visto que ratones *Ret knockout* (*Ret*^{-/-}) carecen de nervios entéricos y ganglios cervicales superiores y presentan agenesia o disgenesia renal (Schuchardt y cols, 1994; Durbec y cols, 1996). También se ha detectado expresión de *RET* en tumores derivados de la CN tales como el neuroblastoma (NB) y el feocromocitoma (Ikeda y cols, 1990; Nakamura y cols, 1994) y se ha descrito que este gen está implicado en varias patologías, como algunos casos de carcinoma papilar de tiroides, cáncer medular de tiroides esporádico, síndromes de neoplasia endocrina múltiple tipo 2 (*Multiple Endocrine Neoplasia type 2*, MEN 2) y enfermedad de Hirschsprung (HSCR) (Borrego y cols, 1998; Sánchez y cols, 1998 y 1999; Fernández y cols, 2006; Moore y Zaahl, 2008a y 2010; Moore, 2012a).

En condiciones normales, la activación de RET requiere la formación de un complejo multimérico, en el que participan un ligando soluble de la familia de factores neurotróficos derivados de la glía (*Glial Derived Neurotrophic Factors*, GDNF), y un co-receptor anclado a la membrana celular a través de un enlace glicosil-fosfatidilinositol de la familia de receptores α de GDNF ($\text{GFR}\alpha$) (Lake y Heuckeroth, 2013). Los ligandos de RET son miembros de la superfamilia del factor de crecimiento transformante beta (*Transforming Growth Factor beta*, TGF- β) (Lin y cols, 1993) y se ha visto que todos ellos actúan como potentes factores de supervivencia neuronal. Se han identificado 4 miembros pertenecientes a esta familia: GDNF, neurturina, artemina y persefina (Figura 1.7). Estos ligandos no se unen directamente al receptor RET sino que han de interactuar previamente con un co-receptor $\text{GFR}\alpha$. La formación del complejo multimérico de RET induce cambios conformacionales en el dominio intracelular, teniendo como resultado la autofosforilación de residuos tirosínicos específicos y desencadenando la activación de la cascada de señalización intracelular (Takahashi, 2001).

El principal estimulador de la proliferación, supervivencia y diferenciación de los precursores entéricos en los primeros estadios del desarrollo del SNE es GDNF, que se expresa en las células mesenquimáticas del tracto digestivo (Young y cols, 2001) incluso antes de la llegada de los precursores neuronales. Parece que la variedad de modalidades de respuesta a GDNF depende de factores que están bajo el control del receptor RET, como las proteínas intracelulares pertenecientes a las cadenas de transducción de señales. Dichos factores podrían estar regulados de manera diferencial en los distintos tipos celulares, para provocar una respuesta u otra de manera específica.

La respuesta a GDNF de las células que migran desde la CN hacia el intestino en formación comienza inmediatamente después de la colonización del mismo (Young y cols, 2001). A partir de ese momento aumenta su expresión de forma secuencial en dirección cráneo-caudal, adelantándose a la ola de migración de las células derivadas de la CN vagal. En base a esto se ha propuesto que la presencia de GDNF en el mesénquima entérico promueve la migración de los precursores hacia la parte distal del intestino. Así mismo, se ha visto que las neuronas entéricas siguen expresando RET incluso después de haberse diferenciado, no siendo así en el caso de células gliales (Young y cols, 1992), a pesar de que sus precursores en ambos casos expresan RET en las etapas iniciales del desarrollo.

Existe una clara implicación de RET en la formación del SNE y de otros tejidos y células derivadas de la CN. La ruta de señalización RET/ $\text{GFR}\alpha 1$ /GDNF ha demostrado, tanto en estudios *in vitro* como *in vivo*, promover la supervivencia neuronal, la mitosis de células progenitoras, la diferenciación neuronal y la prolongación de neuritas en una subpoblación de neuronas y sus precursores del SNC y SNP (Lin y cols, 1993; Takahashi, 2001; Lake y Heuckeroth, 2013; Wood, 2016).

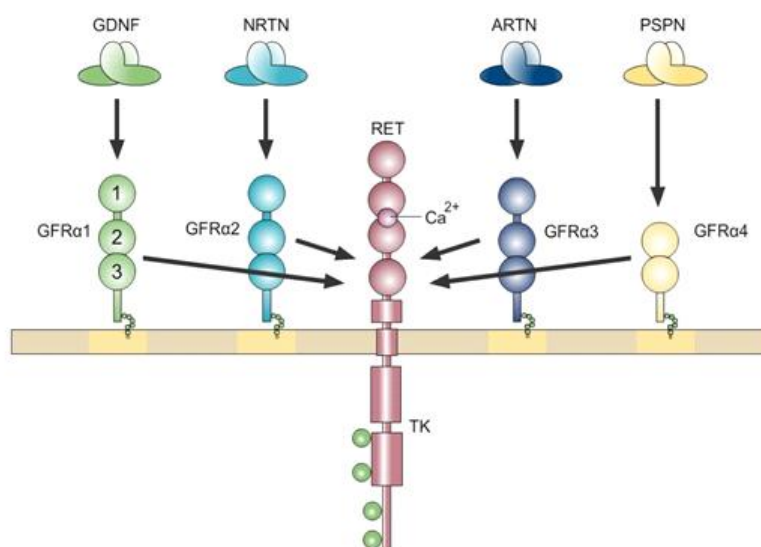


Figura 1.7: Interacciones entre los distintos ligandos, co-receptores GFRα1 y RET.
(Adaptado de Airaksinen y Saarma, 2002).

1.1.2.2. La ruta de las endotelinas (EDNRB, EDN3 y ECE1)

La señalización mediada por endotelina 3 (EDN3) y su receptor EDNRB (*Endothelin receptor type B*, receptor de endotelina tipo B), es necesaria para la migración normal de las células CN y contribuye al mantenimiento de un microambiente intestinal permisivo a la colonización por dichas células (Lake y Heuckeroth, 2013; Butler y Trainor, 2013). La disrupción de la ruta de señalización EDN3/EDNRβ provoca fallos en la diferenciación, migración, proliferación y supervivencia de los precursores de los melanocitos y de los ganglios entéricos. De hecho, mutaciones en ambos genes en humanos se han relacionado con patologías que comprometen la integridad de los melanocitos tanto de la piel como del oído interno y de las células de los ganglios entéricos, dando lugar a defectos pigmentarios, sordera y aganglionosis colónica respectivamente (Puffenberger y cols, Edery y cols, 1996; 1994; Hofstra y cols, 1996; Bidaud y cols, 1997).

El gen *EDNRB* se localiza en humanos en el cromosoma 13q22 (Puffenberger y cols, 1994) y codifica para un receptor unido a proteína G con 7 dominios transmembrana. Este gen se expande a lo largo de 24 Kb en el genoma y se estructura en 7 exones con unos tamaños comprendidos entre 109 y 2855 pb (Arai y cols, 1993). Este receptor se expresa en la CN y en varios linajes de células derivadas de la CN. Su expresión es muy temprana antes de que comience la migración celular y se mantiene después de que dichas células hayan colonizado sus tejidos diana (Brand y cols, 1998; Woodward y cols, 2000).

Existen en el humano tres endotelinas distintas (EDN1, EDN2 y EDN3) codificadas por 3 genes independientes (Inoue y cols, 2004), y que se producen como precursores de mayor tamaño (pre-endotelinas) que han de ser cortados por proteasas para generar una proteína con actividad biológica. Estas proteínas son mensajeros intercelulares de acción local que actúan a través de receptores de membrana específicos EDNRα y EDNRβ, ambos pertenecientes a la superfamilia de receptores unidos a proteína G. Estos receptores se clasifican por su afinidad a ligando; EDNRα tiene alta afinidad por EDN1 y EDN2, y baja afinidad por EDN3, mientras que EDNRβ tiene afinidad similar por los tres ligandos (Sa-

kurai y cols, 1992). La metaloproteasa ECE1 (*Endothelin Converting Enzyme 1*, enzima convertidora de endotelinas tipo 1) es la responsable del procesamiento de las endotelinas. ECE1 modifica la forma inmadura de EDN3 a la forma activa de la ruta (Butler y Trainor, 2013). Tanto *EDN3* localizado en 20q13.2-13.3, como *ECE* en 1p36.1, se expresan en las células del mesénquima entérico.

El efecto de la EDN3 en el desarrollo del SNE es sutil. De hecho, la adición de EDN3 al medio de cultivo en el que crecen precursores de SNE tiene muy poco o ningún efecto sobre los mismos. Sin embargo, si se añade EDN3 en presencia de GDNF a este mismo cultivo, inhibe la diferenciación hacia neuronas mediada por GDNF (Hearn y cols, 1998). Esto tiene una importancia fisiológica evidente cuando pensamos en el patrón de expresión de GDNF durante el proceso de formación del SNE. Los mayores niveles de expresión de GDNF se producen en el ciego (Natarajan y cols, 2002), por lo que, si no intervinieran otros factores, los precursores neurales no podrían progresar hasta las regiones distales del colon, ya que los altos niveles de GDNF en el ciego los retendrían en dicha región. Se ha propuesto la acción de la ruta de señalización EDN3/EDNR β para salvar este problema (Barlow y cols, 2003), ya que EDN3 inhibe la quimioatracción que GDNF ejerce sobre los precursores entéricos (Kruger y cols, 2003). Además, se ha descrito que el pico de expresión de la EDN3 durante el desarrollo del SNE está próximo, o justo por delante, del frente de avance de los precursores en su movimiento migratorio (Barlow y cols, 2003). Por otra parte, hay que tener en cuenta la población de células derivadas de la CN sacra que colonizan la región distal del intestino sin atravesar el ciego, para tener una visión global del proceso de formación de SNE y cómo este está finamente regulado. Para la correcta formación del SNE en el colon es necesaria la presencia de neuronas y glía que proceden tanto de la CN vagal como de la sacra (Kapur y cols, 1992). El papel de EDN3 sobre las células derivadas de la CN sacra durante el desarrollo del SNE puede adivinarse en el modelo de ratón deficiente en EDN3 (Rothman y Gershon, 1984; Payette y cols, 1987), en el que se han observado ganglios ectópicos en la región pélvica fuera del intestino. Este hallazgo puede deberse a una parada prematura de la migración de dichas células.

1.1.2.3. Factores de transcripción

Varios factores de transcripción intervienen en el desarrollo temprano del SNE (Lake y Heuckeroth, 2013), algunos de ellos mediante la regulación de la expresión de *RET* (*SOX10*, *PAX3*, *PHOX2B*, *MASH1*, *HOX11L1*) (Pattyn y cols, 1999; Lang y cols, 2000; Lang y Epstein, 2003; Leon y cols, 2009) o de *EDNRB* (*SOX10*) (Zhu y cols, 2004). A continuación se describen algunos de ellos.

SOX10 es una proteína perteneciente a la familia de factores de transcripción SOX, que incluye a más de 20 proteínas fundamentales en el desarrollo de distintos procesos embrionarios, como la determinación del sexo, diferenciación condrogénica o la hematopoyesis (Wegner y cols, 1999). Está codificada por el gen *SOX10* (*Sex determining region Y box 10*) y se caracteriza por la presencia del dominio HMG (*High Mobility Group*, grupo de alta movilidad) de unión al ADN. Consta de 5 exones, si bien los dos primeros no son codificantes, y codifica para una proteína de 466 Aa con diferentes dominios funcionales. El dominio HMG presenta un núcleo hidrofóbico altamente conservado a través del cual es capaz de unirse al surco menor del ADN, y resulta esencial para el mantenimiento de la estructura terciaria de la proteína (Bondurand y Sham, 2013). Previo al dominio HMG se encuentra el dominio de dimerización, necesario para la

dimerización de SOX10 en aquellos casos en que actúa como homodímero (Bowles y cols, 2000). Otro dominio funcional es el denominado K2, cuya delección en ratones ha revelado una función transactivadora dependiente de tejido durante el desarrollo (Schreiner y cols, 2007). Por último, en el extremo carboxi terminal, se encuentra el dominio de transactivación (*Transactivation Domain*, TAD), necesario para la activación transcripcional que ejerce esta proteína (Figura 1.8).

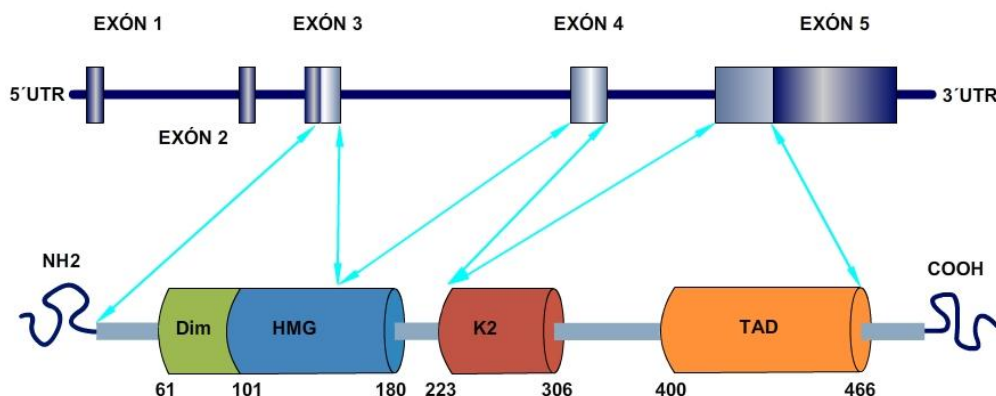


Figura 1.8: Estructura de *SOX10* y de la proteína que codifica con sus dominios funcionales.

Estudios de expresión en ratones han mostrado que SOX10 está presente en los precursores entéricos tanto de neuronas como de glía y parece estar implicado en la supervivencia de estos (Southard-Smith y cols, 1998). También se ha detectado su expresión en la CN craneal y en melanoblastos derivados de la CN en distintas especies (Dutton y cols, 2001; Aoki y cols, 2003). En humanos se ha confirmado que *SOX10* se expresa tanto en las células de la CN en migración y sus derivados, como en los ganglios craneales y espinales (Bondurand y cols, 1998; Bondurand y Sham, 2013). Su expresión está relacionada con el mantenimiento de la pluripotencialidad de las células de CN a bajas concentraciones, y con la inhibición de la diferenciación neuronal a dosis elevadas, favoreciendo la generación de la glía periférica y de los melanoblastos (Paratore y cols, 2001; Kim y cols, 2003).

De forma similar a todos los miembros de esta familia, SOX10 ejerce su función uniéndose, solo o en combinación con otros factores de transcripción, a la región promotora de sus genes diana para promover su expresión (Kuhlbrodt y cols, 1998; Kamachi y cols, 1999). Se conocen numerosos genes que son diana de la regulación de SOX10, algunos de los cuales son genes centrales en el desarrollo del SNE y de otras estructuras derivadas de la CN, como *RET* y *EDNRB* (Lang y Epstein, 2003; Zhu y cols, 2004).

Durante el desarrollo de las neuronas entéricas la expresión de SOX10 se pierde (Young y cols, 2003), lo que parece ser una señal para la transición desde precursor neural no comprometido hacia precursor con cierto grado de compromiso con la estirpe neuronal. Por tanto, un aumento de la expresión de SOX10 en progenitores entéricos, parece estar ligado a una disminución en la neurogénesis. Sin embargo, como resultado de estudios *in vivo* en ratón, parece que SOX10 tendría un efecto antagonista sobre las células derivadas de la CN promoviendo tanto la expresión de receptores que inducen diferenciación como de receptores que están implicados en el mantenimiento de dichas células en su estado indiferenciado (Bondurand y cols, 2006).

PAX3 (*Paired-box-containing*) se expresa en distintos tipos celulares derivados de la CN, incluyendo neuronas entéricas (Lang y cols, 2000). Ratones *Pax3*^{-/-} mueren durante el período de gestación debido a defectos cardíacos y en el tubo neural, y presentan ausencia de neuronas en el SNE (Lang y cols, 2000).

MASH1 (*Mammalian achaete-scute homologue 1*) está implicado en la neurogénesis tanto del SNC como del SNP, y se ha visto que durante el desarrollo embrionario se expresa en diferentes células derivadas de la CN, incluidas aquellas que van a colonizar el tubo digestivo (Lo y cols, 1991). Se considera un factor de actuación tardía en el desarrollo del SNE y su carencia da lugar a lesiones muy localizadas (Blaugrund y cols, 1996). Ratones *Mash1*^{-/-} carecen de neuronas entéricas en el esófago y se ha visto que las células de la CN migran hasta su correcta localización, pero fallan al diferenciarse en ciertos tipos neuronales (Guillemot y cols, 1993).

PHOX2B (*Paired-like Homeobox 2B*) codifica para otro factor de transcripción que se expresa en el SNC y SNP durante el desarrollo embrionario y en los ganglios entéricos en fase adulta, y que regula la expresión tanto de *MASH1* como de *RET* (Leon y cols, 2009). Se ha observado que los ratones *Phox2b*^{-/-} carecen de SNA, incluyendo el SNE que está ausente a lo largo de todo el tracto gastrointestinal (Pattyn y cols, 1999). En estos ratones las células de la CN llegan a la parte anterior del intestino, pero no son capaces de migrar más allá, probablemente como consecuencia de la falta de expresión de *RET* (Pattyn y cols, 1999).

HOX11L.1 (*Homeobox transcription factor*) se expresa en neuronas del SNE tanto en la etapa de desarrollo como durante la etapa adulta, además de neuronas no entéricas derivadas de la CN. Ratones *Hox11L.1*^{-/-} nacen sin ningún defecto morfológico aparente pero desarrollan megacolon a las pocas semanas de vida, observándose anomalías en el tamaño y distribución de ganglios y neuronas entéricas (Hatano y cols, 1997; Shirasawa y cols, 1997). Esto sugiere que HOX11L.1 es necesario para el mantenimiento y el funcionamiento correcto de SNE, jugando un papel importante en la regulación postnatal de la apoptosis.

ZFHX1B (*Zinc Finger Homeo box 1B*), también conocido como *SIP1*, codifica para un factor de transcripción importante en la especificación neural (Nitta y cols, 2007). Esta proteína se expresa en los precursores entéricos vagales hasta el momento de la colonización del digestivo, y más tarde en el desarrollo en todo el SNE (Van de Putte y cols, 2007). Ratones *Zfhx1B*^{-/-} muestran aganglionosis intestinal en el momento del nacimiento, entre otras malformaciones (Van de Putte y cols, 2003).

La Tabla 1.1 recoge los genes que participan en la migración, proliferación, diferenciación y supervivencia de las neuronas entéricas derivadas de la cresta vagal y sacra (Butler y Trainor, 2013).

Tabla 1.1: Listado simplificado de algunos de los genes que participan en la migración, proliferación, diferenciación, supervivencia y muerte celular de las neuronas entéricas derivadas de la cresta vagal y sacra. (Adaptado de Butler y Trainor, 2013).

Gen	Migración	Proliferación	Diferenciación	Supervivencia/ muerte celular
<i>RET</i>	Atraído por GDNF	Promueve la proliferación	Promueve la diferenciación neuronal	Promueve la supervivencia de las células derivadas de la CN y neuronas entéricas. Inhibe la muerte celular no apoptótica.
<i>GDNF</i>	Gradiente para atraer RET+ y GFR α 1 + células derivadas de la CN	Promueve la proliferación	Promueve la diferenciación neuronal	Promueve la supervivencia
<i>GFRα1</i>	Atraído por GDNF, necesario para cruzar el mesenterio			Promueve la supervivencia de neuronas entéricas
<i>EDNRB</i>	Necesario para la migración normal	Mantiene el estado proliferativo		
<i>EDN3/ET3</i>	Necesario para la migración normal, mantiene la permisividad del entorno		Inhibe la diferenciación neuronal	
<i>ZFHXB/SIP1/SMADIP1</i>	Especificación neuronal, transición epitelio-mesénquima			
<i>PHOX2B</i>	Se expresa durante la migración de las células derivadas de la CN			
<i>SHH</i>	Oposición a GDNF, reduce la migración	Promueve la proliferación	Inhibe la diferenciación neuronal	
<i>SOX10</i>		Mantiene el estado progenitor del SNE		
<i>NR1N/N1N</i>		Promueve la proliferación	Promueve la diferenciación neuronal	Promueve la supervivencia

1.1.3. Estructura, organización, tipos celulares y funciones

El SNE se compone de un gran número de neuronas funcionalmente distintas (aférentes, eferentes, excitatorias, inhibitorias, vasomotoras y secretoras) y células gliales agrupadas en ganglios interconectados e intercalados en la pared del intestino. Dichos ganglios se organizan en dos plexos principales: mientérico o de Auerbach, situado entre la capa de musculatura lisa longitudinal y circular, y submucoso o Meissner, localizado en la propia capa submucosa (Figura 1.9). El plexo mientérico se forma sobre la semana 12^a de gestación, mientras que el submucoso se constituye entre la 12^a-16^a semanas a partir de neuroblastos procedentes del plexo mientérico (Fu y cols, 2004; Lake y Heuckeroth, 2013; McKeon y cols, 2013).

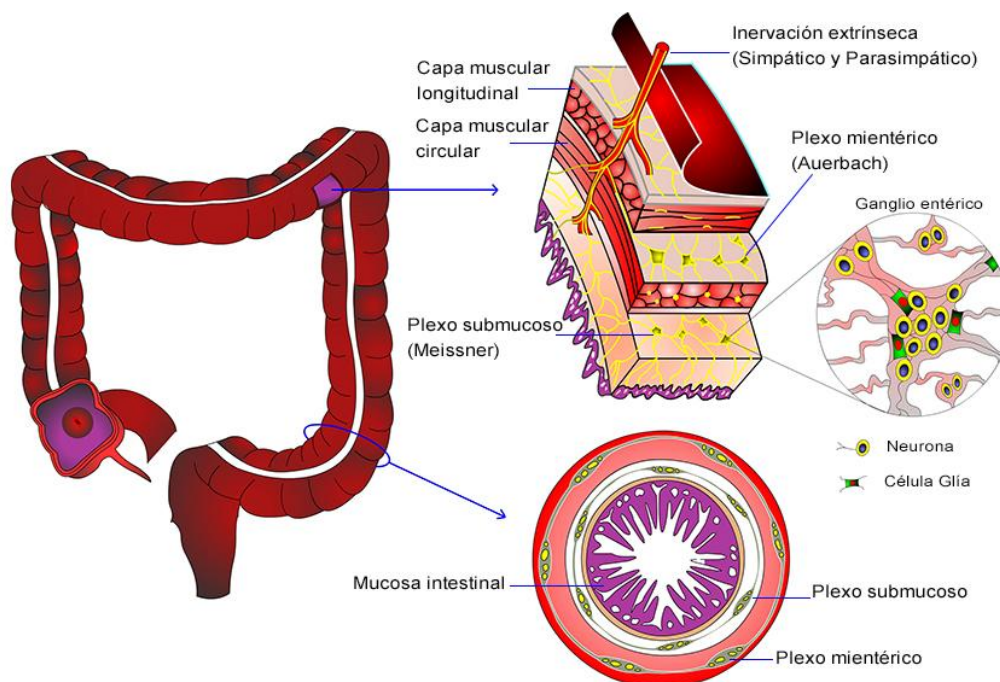


Figura 1.9: Disposición de los plexos entéricos en el intestino.

1.1.3.1. Tipos celulares

Las neuronas entéricas se pueden clasificar en tres grupos según su función: neuronas aferentes o sensoriales, interneuronas y neuronas motoras (Figura 1.10) (Furness, 2000 y 2006). Las neuronas sensoriales reciben información de receptores situados en la mucosa y en el músculo, respondiendo a estímulos mecánicos, térmicos, químicos y osmóticos (Furness y cols, 2004). Los quimiorreceptores de la mucosa sensibles a ácidos, glucosa y Aa permiten el muestreo de contenido luminal mientras que los receptores sensoriales del músculo responden al estiramiento y a la tensión. Las interneuronas integran la información procedente de las neuronas sensoriales y la transmiten a las neuronas motoras. Entre estas, encontramos neuronas excitatorias del músculo, que contienen marcadores colinérgicos y taquiquininas, tales como la sustancia P, y neuronas inhibitorias, que contienen óxido nítrico y péptido intestinal vasoactivo (Hao y Young, 2009).

Las células gliales entéricas proporcionan soporte a las neuronas entéricas. Sin embargo, a diferencia de las células de Schwann, envainan los axones en grupos, siendo diferentes a otras células gliales del SNP, y más similares a los astrocitos del SNC, con respecto a la expresión de la proteína S-100 y de la proteína glial fibrilar ácida (Gershon y Rothman, 1991; Boesmans y cols, 2013).

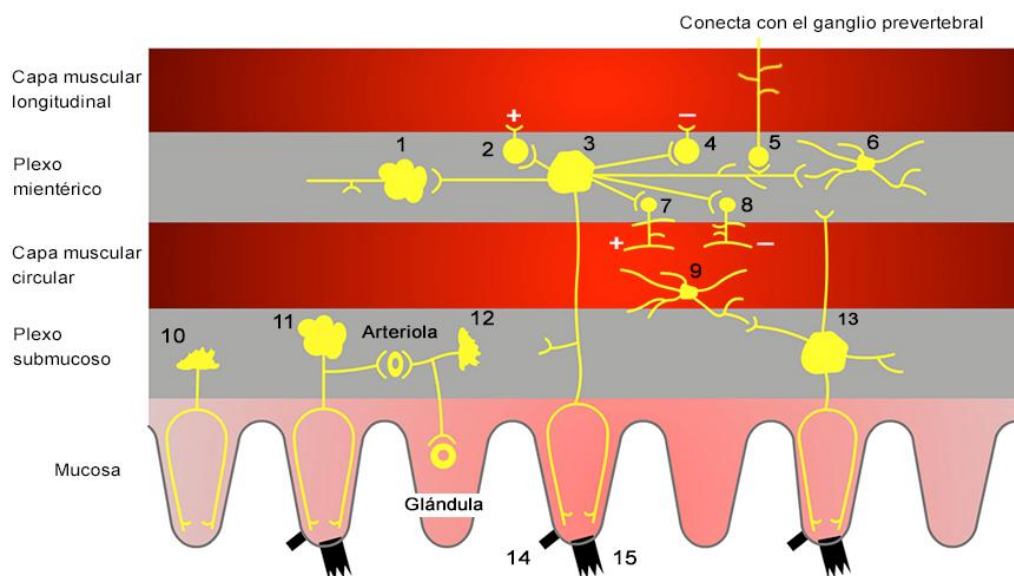


Figura 1.10: Tipos de neuronas del SNE.

1. Interneurona. 2. Neurona motora muscular excitatoria longitudinal. 3. Neurona aferente intrínseca primaria mientérica. 4. Neurona motora muscular inhibitoria longitudinal. 5. Neurona intestínofugal. 6. CIC. 7. Neurona motora muscular excitatoria circular. 8. Neurona motora muscular inhibitoria circular. 9. CIC. 10. Neurona secretomotora colinérgica (no vasodilatadora). 11. Neurona secretomotora colinérgica. 12. Neurona vasomotora no colinérgica. 13. Neurona aferente intrínseca primaria submucosa. 14. Célula mucosa. 15. Célula enterocromafín. (Adaptado de Furness, 2000).

1.1.3.2. Control de la función intestinal

Las neuronas entéricas realizan sinapsis con otras neuronas entéricas e inervan el músculo, el epitelio y los vasos sanguíneos del aparato digestivo. El SNE está involucrado en la regulación de las actividades fundamentales de la pared intestinal, tales como el peristaltismo, la secreción epitelial, la absorción de nutrientes, el flujo sanguíneo e inmunológico y los procesos inflamatorios (Boesmans y cols, 2013). En los mamíferos pequeños, el control de la motilidad intestinal es realizado fundamentalmente por el plexo mientérico, mientras que las neuronas submucosas son las principales responsables de la regulación de la secreción, la absorción y las funciones vasculares del intestino. En cambio, en mamíferos más grandes, tanto el plexo mientérico como algunas neuronas submucosas participan directamente en el control de los reflejos de la motilidad (Timmermans y cols, 2001).

La motilidad gastrointestinal y su regulación es un proceso complejo que implica la colaboración de las células intersticiales de Cajal (CICs) y de las células musculares lisas (Al-Shboul, 2013). En el humano, las CICs se encuentran en todo el tracto gastrointestinal desde el esófago (Faussonne-Pellegrini y Cortesini, 1986; Torihashi y cols, 1999) hasta el esfínter anal interno (EAI) (Hagger y cols, 1998). Se localizan en el plexo mientérico, plexo submucoso, plexo muscular profundo y en las capas muscular y serosa de la pared del intestino, y están interconectadas con neuronas entéricas y músculo liso. Existen dos teorías que intentan aproximarse a su origen embrionario; algunos autores defienden que provienen del mesénquima esplacnopleural, mientras que, otros, creen que proceden de la parte ventral del tubo neural. Dado que estas células poseen características comunes a las células de la CN (neuronas y glía) y las células derivadas del mesénquima (fibroblastos y células musculares lisas), actualmente ambas hipótesis son aceptadas (Cantarero, 2011). Estas células pueden ser identificadas mediante inmunohistoquí-

mica por la expresión c-Kit, un receptor transmembrana tirosín-kinasa esencial para su desarrollo y mantenimiento (Beckett y cols, 2007). Hasta el momento son tres las funciones atribuidas a estas células: marcapasos intestinal, intermediarias en la neurotransmisión y mecano-receptoras, y son objeto de periódicas revisiones por la comunidad científica debido a la aparición continua de datos relevantes en este campo (Cantarero, 2011; Chaudhury, 2016).

El desarrollo de la motilidad intestinal no se produce hasta el final de la gestación y después del nacimiento (Burns y cols, 2009), lo que sugiere que hay un desfase significativo de tiempo entre la aparición de las neuronas en el intestino y el establecimiento del control de la motilidad intestinal por el SNE.

1.1.4. Desórdenes del SNE

El SNE tiene un papel crítico sobre las funciones intestinales (motilidad, absorción y secreción) siendo esencial en todas las etapas de la vida postnatal. Sin embargo, es prescindible en las distintas fases embrionarias, de modo que las anomalías que afectan a su desarrollo no ocasionan morbilidad ni mortalidad prenatal. Los desórdenes del SNE surgen por la ausencia, degeneración, y/o deterioro funcional de las neuronas entéricas, ya sea por defectos congénitos producidos durante el desarrollo embrionario, por la acción de agentes conocidos (tóxicos o infecciosos), o secundarios a condiciones patológicas tales como la inflamación crónica, la diabetes o la amiloidosis (Di Nardo y cols, 2008). La Tabla 1.2 recoge una clasificación de las neuropatías entéricas.

El desorden primario del SNE con mayor impacto en la práctica clínica es HSCR o megacolon agangliónico. Se trata de una neurocristopatía caracterizada por la ausencia de neuronas entéricas en los plexos mientérico y submucoso a lo largo de un segmento del intestino, que provoca una pérdida de motilidad en el segmento afectado y una obstrucción intestinal funcional (Kenny y cols, 2010). Forma parte del grupo de las disgangliones intestinales, entre las que se incluyen las hipergangliones (displasia neuronal intestinal y ganglioneuromatosis), la acalasia neurogénica del EAI y el hipoganglione (Martucciello y cols, 2005). Aunque estas anomalías son histológicamente diferentes, sus características clínicas son similares: estreñimiento intratable y un tránsito intestinal muy lento.

En este momento solo HSCR es una entidad clínica mundialmente reconocida. Las demás disgangliones, y particularmente su origen (congénito o adquirido), siguen planteando controversia. Algunos autores creen firmemente en la existencia independiente de todas sus formas y proponen criterios diagnósticos y de tratamiento (Friedmacher y Puri, 2013a); para otros son cambios degenerativos o fenómenos secundarios a estreñimiento crónico, procesos inflamatorios, HSCR o atresias intestinales (Sacher y cols, 1993; Gálvez y cols, 2004).

Tabla 1.2: Neuropatías entéricas.

Enfermedad de Hirschsprung
Displasia neuronal intestinal
Hipoganglionismo
Acalasia del EAI
Hiperplasia neuronal y ganglioneuomas
Degeneración neuronal
Neuropatías inflamatorias (humoral y celular)
Desórdenes de neurotransmisores

En la práctica clínica se observan trastornos de la defecación por dismotilidad intestinal en los que se aprecia un aumento del número de células ganglionares en los plexos entéricos e incluso de manera ectópica en la lámina propia. Existen dos tipos de hiperganglionosis. En el primero de ellos se observa un aumento de la densidad de ganglios submucosos y un mayor número de las células por ganglio (desorden conocido como displasia neuronal intestinal tipo B). El segundo tipo de hiperganglionosis se denomina ganglioneuromatosis intestinal y se caracteriza por una proliferación nodular de las células ganglionares y las fibras nerviosas asociadas a la glía, de forma aislada o difusa. Habitualmente se manifiesta con estreñimiento, dolor y distensión abdominal y puede asociarse a otras patologías como el síndrome MEN 2 o la neurofibromatosis de Von Recklinghausen (Shekitka y Sobin, 1994).

La hipoganglionosis también ocasiona dismotilidad intestinal. Se suele observar un número reducido de células nerviosas en la zona de transición (ZT) entre intestino gangliónico y agangliónico presente en casos de HSCR, y que muchos autores relacionan con la persistencia de los síntomas tras una resección incompleta del colon afectado. También existen formas aisladas de hipoganglionosis relacionadas con alteraciones de la función intestinal. En estos casos se especula con la posibilidad de que se trate de formas frustradas de HSCR, ya que se ha observado en familiares de pacientes afectados que comparten las mismas mutaciones (Sánchez-Mejías, 2010a; Friedmacher y Puri, 2013a). Por último, ciertos desórdenes del SNE por neuropatía inflamatoria o degenerativa, enfermedades del músculo liso o alteraciones de las CICs, pueden causar cuadros de pseudoobstrucción intestinal crónica (Di Nardo y cols, 2008).

1.2. Enfermedad de Hirschsprung (HSCR)

1.2.1. Recuerdo histórico

Esta enfermedad lleva el nombre del gran pediatra danés Harald Hirschsprung (Copenhague 1830-1916). Licenciado en Medicina en 1855, demostró pronto gran interés por patología quirúrgica pediátrica (atresia de esófago, invaginación intestinal, estenosis hipertrófica de píloro o estreñimiento) (Boix-Ochoa y Abad, 2009). Así, en 1870, fue designado jefe del área médica del hospital Rigensgad en Copenhague. En este hospital desarrolló toda su investigación inicial en enfermedades pediátricas, especialmente en el neonato. En 1877 fue nombrado profesor titular de pediatría de Copenhague y en 1879 se inauguró en esa ciudad el *Queen Louise Hospital for Children*, centro en el que se dedicó de lleno a la investigación y docencia, hasta su retiro en 1904. La gran aportación a la enfermedad que hoy lleva su nombre fue realizada en 1886 durante la reunión anual del *Gesellschaft für Kinderheilkunde* en Berlín. En este congreso de pediatría presentó el caso de 2 lactantes varones no emparentados con estreñimiento crónico desde el nacimiento que fallecieron a los 8 y 11 meses de edad. En la necropsia de ambos se observó una gran dilatación e hipertrofia

del colon interpretada como la causa de la muerte y el origen de la enfermedad. El recto pareció normal. Debido a que el estreñimiento estuvo presente en estos niños desde el nacimiento, Hirschsprung denominó a la dilatación de colon “megacolon congénito”. Dos años más tarde, estos 2 casos fueron publicados con gran impacto: “*Stuhlträchtigkeit Neugeborener in Folge von Dilatation and Hypertrophie des Colons*”- Estreñimiento en el recién nacido debido a la dilatación e hipertrofia del colon- (Hirschsprung, 1888) y desde 1893 esta entidad lleva su nombre. Durante casi 50 años se mantuvo esta teoría primitiva (enfermedad localizada en colon dilatado), por lo que casi todos los esfuerzos por resolverla se dirigieron a reseca este segmento. Hirschsprung no fue el primero en describir la enfermedad (previamente habían sido comunicados más de 20 casos), pero sí fue el primero en reconocer el carácter congénito de la misma (Boix-Ochoa y Abad, 2009; Sergi, 2015; Boer y cols, 2017).

A principios del siglo XX, Tittel describió la ausencia de células ganglionares intramurales en el recto de un lactante con estreñimiento (Tittel, 1901), pero no fue hasta la década de los 40 cuando se describió por primera vez el aganglionismo del segmento distal como verdadero origen de la enfermedad (Tiffin y cols, 1940; Ehrenpreis, 1945; Whitehouse y Kernohan, 1948). En 1948, Swenson consiguió la supervivencia de los primeros casos mediante una técnica quirúrgica basada en la resección del segmento agangliónico con preservación del EAI anastomosando el colon sano al ano (Swenson y Bill, 1948). En 1955, Swenson y cols, introdujeron la biopsia rectal (BR) para el diagnóstico y Lawson y Nixon, en 1967 describieron sus características manométricas. En 1972, Meier-Ruge y cols, perfeccionaron la técnica de coloración histoquímica, que demuestra el aumento de la acetilcolinesterasa en estudios histológicos del segmento agangliónico (Swenson y cols, 1955; Lawson y Nixon y cols, 1967; Meier-Ruge y cols, 1972).

Tras la descripción de la técnica de Swenson se propusieron nuevos procedimientos hasta alcanzar las técnicas quirúrgicas actuales que se describirán más adelante en esta sección y que han supuesto toda una revolución en el manejo y pronóstico de estos pacientes.

Sin embargo no todo está resuelto en el momento actual. La base genética y el patrón de herencia no están completamente esclarecidos, aspecto que despierta un gran interés en los últimos años. Su estudio comienza con la descripción de la asociación del aganglionismo cólico total (*Total Colonic Aganglionosis*, TCA) con una deleción intersticial en el brazo largo del cromosoma 10 (Martucciello y cols, 1992). El proto-oncogén *RET* fue así el primer *locus* de susceptibilidad que se identificó tras el análisis de familias multigeneracionales, en las que HSCR presentaba una forma de herencia autosómica dominante con penetrancia parcial (Lyonnet y cols, 1993; Angrist y cols, 1993). En este momento, se conocen más de 20 genes relacionados con HSCR (Tabla 1.1), representando una de las patologías que más apasionan a investigadores clínicos y genetistas moleculares.

1.2.2. Definición

HSCR es un desorden del SNE que se caracteriza por la ausencia de células ganglionares en los plexos mientérico (Auerbach) y submucoso (Meissner) a lo largo de un segmento del intestino, que en la mayoría de los casos es la parte más distal del mismo (McKeon y cols, 2013). Se origina por una alteración en la migración de las células de la CN para colonizar el intestino entre la 7ª y 12ª semana de gestación (Kenny y cols, 2010), por lo que es considerada una neurocristopatía (Bolande, 1974). Cuanto más precoz sea la detención de la migración mayor será la extensión del aganglionismo. HSCR es la causa más fre-

cuenta de obstrucción intestinal funcional en neonatos y niños de más edad. Suele presentarse de forma esporádica, aunque se distinguen también casos familiares, con una herencia que puede ser dominante o recesiva, con baja penetrancia y con predominio en varones (Borrego y cols, 2013a).

1.2.3. Clasificación

El límite inferior del aganglionismo es el EAI y es siempre constante. El límite superior es variable y sirve para clasificar la enfermedad, identificándose 2 fenotipos según la longitud del segmento afectado: segmento corto o S-HSCR (*Short-segment HSCR*), en el que el aganglionismo no sobrepasa el colon sigmoide (80% de los casos), y segmento largo o L-HSCR (*Long-segment HSCR*), en el que la ausencia de células ganglionares se extiende más allá del sigma (20% de los casos) (Amiel y cols, 2008). En el 2-13% de estos pacientes la enfermedad afecta a todo el colon y puede extenderse proximalmente a segmentos de longitud variable de intestino delgado. Así, estas formas infrecuentes se clasifican en TCA (definido como el aganglionismo que se extiende desde el ano hasta la válvula ileocecal pero no más de 50 cm de íleon) y aganglionismo intestinal total (*Total Colonic and Small bowel Aganglionosis, TCSA*) (Moore, 2015). También se han descrito formas raras en las que una zona de intestino con inervación normal se halla rodeada proximal y distalmente por segmentos agangliónicos (*Skip-Segment HSCR, SS-HSCR*) (Raghunath y cols, 2014). En los aganglionismos de segmento corto se incluyen las denominadas formas de segmento ultracorto, en las que sólo el recto distal está afectado (Amiel y cols, 2008; Zani y cols, 2017; Figura 1.11).

Se desconoce por qué el rectosigma es el segmento intestinal más susceptible al aganglionismo. Dado que la colonización del SNE ocurre mayoritariamente en sentido craneocaudal, el aganglionismo distal puede ser un simple reflejo de la distancia que las células derivadas de la CN deben recorrer para alcanzar el intestino, de forma que cualquier fallo en la migración o proliferación de las mismas para colonizarlo afectará siempre a las zonas más distales del mismo (McKeon y cols, 2013). Experimentalmente se ha observado que la inactivación condicional de *RET* en el desarrollo tardío, una vez que la migración se ha completado, conduce a la muerte de neuronas entéricas específicamente en el colon, lo que sugiere que el intestino distal tiene aspectos específicos para el desarrollo del SNE y que otras etiologías pueden contribuir al desarrollo del fenotipo HSCR (Goldstein y cols, 2013).

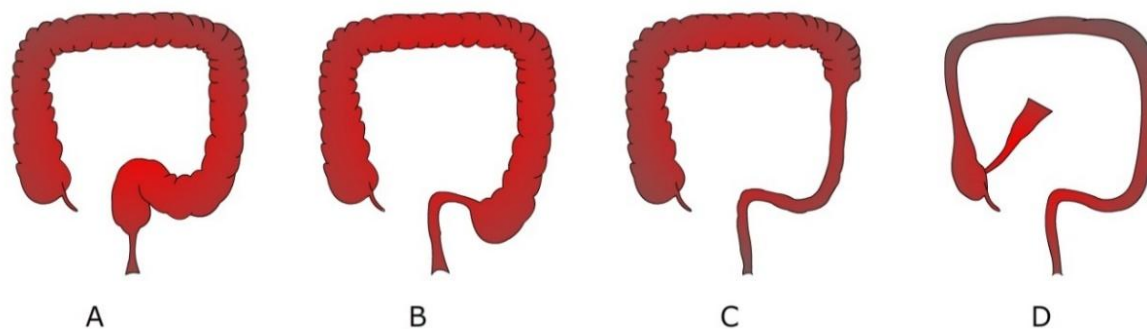


Figura 1.11: Principales fenotipos de HSCR. A: ultracorto; B: S-HSCR; C: L-HSCR; D: TCA.

1.2.4. Epidemiología

Diversos estudios demográficos han mostrado una incidencia aproximada de 1 caso por cada 5000 nacidos vivos (Kenny y cols, 2010). Sin embargo, esta incidencia varía en diferentes grupos étnicos, siendo de 1, 1,5, 2,1 y 2,8 por 10.000 nacidos hispanicos, caucasicos, afroamericanos y asiaticos, respectivamente (Amiel y cols, 2008). La incidencia por sexos varía según la extensión del aganglionismo o por su asociación a diferentes síndromes. La proporción media de afectos hombre/mujer en S-HSCR es 4/1 (4,2 hasta 5,5/1) mientras que en L-HSCR se reduce a 1,2-1,9/1, desconociéndose la causa de este sesgo sexual. En casos HSCR asociados a síndrome de Down (*Down Syndrome*, DS) esta ratio puede llegar a 10/1 (Amiel y cols, 2008). La frecuencia de casos familiares oscila desde un 3-5% en S-HSCR (Moore y cols, 1991) a 15-21% en L-HSCR (Nemeth y cols, 2001) y 50% en los aganglionismos muy extensos (Caniano y cols, 1985).

1.2.5. Cromosopatías, neurocristopatías y anomalías asociadas

1.2.5.1. Cromosopatías y HSCR

HSCR se presenta de forma aislada en el 70% de los casos, asociado a anomalías cromosómicas en el 12% y a otros defectos congénitos en el 18% de los enfermos (Amiel y cols, 2008). Entre las anomalías cromosómicas, la trisomía 21 es la más frecuente (>90%), observándose en el 2-15% de los casos de HSCR (Moore, 2012a). En una revisión de 5249 pacientes DS, la incidencia media de esta enfermedad fue del 5,8%, mucho más alta que la de la población general (0,15-0,17%). Si bien la asociación clínica de HSCR y DS es bien conocida, poco se sabe de su origen genético. Se han identificado hasta 5 niveles en los que el desarrollo del SNE puede estar afectado en pacientes DS (Moore y Jonhson, 1998; Moore y Zaahl, 2012b). Recientemente se ha observado la participación del gen *DSCAM* (21q11.1) como un *locus* de susceptibilidad para ambas patologías en casos aislados (Jannot y cols, 2013). Otras anomalías cromosómicas recurrentes en pacientes HSCR se han observado en los cromosomas 10q11 (retraso mental y L-HSCR), 13q22 (retraso mental, hipocrecimiento, rasgos dismórficos y S-HSCR), y 2q22-q23 (retraso del crecimiento postnatal, microcefalia, retraso mental, epilepsia, rasgos dismórficos y HSCR de segmento corto y largo) (Amiel y cols, 2008).

1.2.5.2. Neurocristopatías y otros síndromes asociados

En el 30% de los casos, el fenotipo HSCR se presenta en el contexto de un síndrome, asociado a otra neurocristopatía o a otras malformaciones congénitas (Amiel y cols, 2008) (Tabla 1.4). Las neurocristopatías son procesos patológicos derivados de un defecto en el crecimiento, diferenciación y/o migración de las células de la CN. Estas alteraciones de tejidos derivados de la CN pueden aparecer asociados a HSCR o de manera aislada.

Entre ellas destaca la asociación **MEN 2**, un síndrome canceroso mendeliano autosómico dominante que incluye los siguientes cuadros clínicamente diferenciables: MEN2A, MEN2B y carcinoma medular familiar de tiroides (*Familiar Medular Thyroid Carcinoma*, FMTC). El síndrome MEN 2A se presenta con la clásica tríada de carcinoma medular de tiroides (presente casi en el 100% de los casos), feocromocitoma (50%) e hiperparatiroidismo o adenoma paratiroideo (15-30%) (Eng, 1996; Eng, 1999; Moore y Zaahl, 2008a). Es la forma más común de MEN 2, abarcando el 70-80% de todos

los casos. El síndrome MEN 2B supone un 5% de los casos MEN 2, y la clínica es similar pero de presentación más precoz. Se acompaña de hábito marfanoide, ganglioneuromatosis, neuromas mucosos, engrosamiento de fibras nerviosas de la córnea y no cursa con hiperparatiroidismo (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1257/>). Finalmente, el FMTC (10-20% de los casos) tiene como único fenotipo el cáncer medular de tiroides. Aunque de manera poco frecuente, en algunas familias se ha descrito la co-segregación de MEN 2 y HSCR (Borrego y cols, 1998, 2003; Fernández y cols, 2004, 2006; Moore y Zaahl, 2008a y 2010).

Otra neoplasia que deriva de la CN es el **NB**, tumor sólido que aparece en el sistema parasimpático o la médula adrenal. En algunas familias la predisposición a sufrir este tumor segrega a lo largo de distintas generaciones con penetrancia incompleta (Chatten y Voorhess, 1967). El NB se ha visto asociado a HSCR en algunos pacientes. La aparición de este fenotipo combinado se ha asociado a mutaciones en *PHOX2B* en heterocigosis (Mosse y cols, 2004), si bien las mutaciones en este gen son infrecuentes en pacientes con NB aislado (Perri y cols, 2005).

El síndrome de hipoventilación central congénita (*Central Congenital Hypoventilation Syndrome*, CCHS), también conocido como **enfermedad de Ondine** (OMIM 209880), es una enfermedad rara englobada dentro de las neurocristopatías. En esta patología se ven comprometido el SNP y el SNC en el control de la respiración autónoma. Estos pacientes suelen presentar otros síntomas debidos a defectos en el SNA y una susceptibilidad aumentada a sufrir NB y otros tumores de tejidos derivados de la CN (ganglioblastomas o ganglioneuromas) (Weese-Mayer y cols, 2003). El 20% de los casos CCHS se presentan asociados a HSCR, en el conocido como síndrome de Haddad (Haddad y cols, 1978). El gen responsable de CCHS es *PHOX2B*, apareciendo mutaciones *de novo* en este *locus*, que en su mayoría se corresponden con expansiones en las regiones de polialaninas de esta proteína (Amiel y cols, 2003; Kwon y cols, 2011).

El **síndrome de Waardenburg** (*Waardenburg Syndrome*, WS) es una neurocristopatía hereditaria, clínica y genéticamente heterogénea, que afecta al desarrollo de los melanocitos a partir de la CN tanto en piel como en la estría vascular de la cóclea, por lo que se presenta con alteraciones pigmentarias (piel, iris y cabello) y sordera en el mismo paciente. Fue descrito por primera vez por el oftalmólogo holandés que le dio su nombre al comunicar la asociación de sordera, despigmentación y dismorfología, ahora conocida como WS tipo 1 (Waardenburg, 1951). Su prevalencia se estima 1/42.000 y es responsable de 1-3% de sorderas congénitas (Read y Newton, 1997; Song y cols, 2016). Se han descrito 4 tipos de WS, siendo los tipos 1 y 2 los más frecuentes.

El diagnóstico clínico de WS tipo 1 (OMIM 193500) requiere al menos 2 criterios mayores o 1 mayor y 2 menores (Tabla 1.3). El tipo 2 (OMIM 193510) se caracteriza por la ausencia de *dystopia cantborum*, presentando historia familiar de sordera congénita o anomalías de pigmentación en la mayoría de los casos. En el tipo 3 o Klein-Waardenburg (OMIM 148820) son características las anomalías de las extremidades. Por último, la asociación de WS (anomalías de la pigmentación y sordera neurosensorial) y HSCR se conoce como WS tipo 4 (WS4) o *Shah-Waardenburg syndrome*. La variante neurológica de WS4, también llamada neuropatía desmielinizante periférica, leucodistrofia desmielinizante central, WS y HSCR (*Peripheral Demyelinating Neuropathy Central Dismyelination Leukodystrophy, Waardenburg Syndrome and HSCR*, PCWH,

OMIM 609136), se caracteriza por la asociación de las manifestaciones del WS4 y signos neurológicos como hipotonía neonatal, déficit intelectual de gravedad variable, nistagmo, espasticidad progresiva, ataxia y epilepsia. Más recientemente, estas características neurológicas también se ha encontrado en pacientes WS tipo 2 (Bondurand y cols, 2007).

Tabla 1.3: Criterios clínicos para el diagnóstico de WS.

<p>Criterios mayores:</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ <i>Dystopia canthorum</i> ✓ Sordera neurosensorial congénita ✓ Anomalías de la pigmentación: heterocromía de iris, mechón de pelo, pestañas, cejas o pelo corporal blanco ✓ Historia familiar de herencia autosómica dominante <p>Criterios menores:</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ Hipopigmentación cutánea ✓ Raíz nasal prominente ✓ Hipoplasia ala nasal ✓ Sinofridia ✓ Color prematuramente gris del pelo

1.2.5.3. Otras anomalías asociadas

HSCR puede asociarse a otros defectos congénitos que implican a los siguientes aparatos y sistemas (Amiel y cols, 2008; Blesa y cols, 2009; Galán y cols, 2009):

- Tracto gastrointestinal (8,05%): malrotación intestinal, atresia intestinal, patología del conducto onfalomesentérico y malformaciones anorrectales.
- SNC (6,8%): retraso psicomotor, microcefalia, anencefalia, ausencia de cuerpo caloso e hidrocefalia.
- Sistema genitourinario (6,05%): hipospadias, criptorquidia, hidronefrosis, hidrouréter y disfunción vesical.
- Sistema músculo-esquelético y de los miembros (4,6-24%): distrofia muscular, hernia diafragmática, defectos espinales, polidactilia, sinfalia e hipoplasia de los miembros.
- Sistema cardiovascular (5%): defectos de septación y troncales
- Sistema craneofacial (2,9%): fisuras palpebrales estrechas, raíz nasal amplia, anormalidades craneales, fisura palatina y micrognatia.
- Sistema auditivo y ocular: sordera congénita, microftalmia, ptosis, coloboma de iris, nistagmo y heterocromía de iris.
- Piel y anejos: hipopigmentación, piebaldismo, queratitis, ictiosis e hipoplasia del pelo.

A menudo, estas anomalías forman parte de síndromes claramente definidos que cursan con HSCR, entre los que se encuentran, además de CCHS y WS4 previamente descritos, la enfermedad de Goldberg-Shprintzen, el síndrome de Mowat-Wilson o síndrome de Bardet-Biedl. Los principales síndromes asociados a HSCR se encuentran recogidos en la Tabla 1.4.

Tabla 1.4: Síndromes asociados a HSCR (Amiel y cols, 2008).

Síndromes	OMIM	Rasgos clave
Neurocristopatías		
WS4 (Shah-Waardenburg)	277580	Anomalías en la pigmentación
Yemenite deaf-blind hypopigmentation	601706	Pérdida de audición, anomalías oculares (microcórnea, coloboma, nistagmo), anomalías en la pigmentación
BADS	227010	Pérdida de audición, hipopigmentación de la piel y retina
Piebaldismo	172800	Hipopigmentación irregular de la piel
Haddad o enfermedad de Ondine	209880	Hipoventilación central congénita
MEN2A	171400	Carcinoma medular de tiroides, feocromocitoma, hiperparatiroidismo
Riley-Day	223900	Anomalías del SNA
HSCR mandatorio		
Goldberg-Shprintzen	235730	Retraso mental, polimicrogria, coloboma, facies dismórfica
HSCR con anomalías límbicas	235740	Polidactilia, agenesia renal, hipertelorismo, sordera
	235750	Polidactilia postaxial, defecto en el septo ventricular
	235760	Hipoplasia de las falanges distales y uñas, rasgos dismórficos
	604211	Polidactilia preaxial, defecto cardíaco, anomalías laríngeas
	306980	Braquidactilia tipo D
BRESHEK		Anomalías cerebrales, retraso, displasia ectodérmica, malformaciones esqueléticas, HSCR, anomalías oculares y auditivas, displasia renal
Mowat-Wilson	235730	Retraso mental, microcefalia, epilepsia, hipospadias, anomalías renales, agenesia del cuerpo caloso, cardiopatía congénita
HSCR ocasionalmente asociado		
Síndrome de Bardet-Biedl	209900	Retinopatía pigmentaria, obesidad, hipogenitalismo, retraso mental, polidactilia postaxial
Kauffman-Mckusick	236700	Hidrometrocolpos, polidactilia postaxial, cardiopatía congénita
Smith-Lemli-Opitz	270400	Retraso de crecimiento, microcefalia, retraso mental, hipospadias, sindactilia
Hipoplasia cartilago-pelo	250250	Enanismo, displasia metafisaria, inmunodeficiencia,
HSAS/MASA	307000	Hidrocefalia, retraso mental, estenosis acueductual, espasticidad, pulgares aductos, agenesia del cuerpo caloso
HSCR raramente asociado		
Distrofia congénita de Fukuyama	253800	Distrofia muscular, polimicrogria, hidrocefalia, convulsiones
Clayton-Smith	258840	Rasgos dismórficos, dedos y uñas hipoplásicas, ictiosis
Kaplan	304100	Agenesia del cuerpo caloso, pulgares cortos, ptosis, debilidad muscular
Okamoto	308840	Hidrocefalia, fisura palatina, agenesia del cuerpo caloso
Displasia mesomélica de Werner	188770	
Pitt-Hopkins	610954	Encefalopatía epiléptica, dismorfia facial, disautonomía, episodios de hiperventilación
Distrofia torácica asfíxica de Jeune	208500	
Asociaciones misceláneas		
Pallister-Hall (CAVE)	140510	
Fryns	229850	
Aarskog	100050	
Displasia frontonasal	136760	
Osteopetrosis		
Goldenhar	164210	
Lesch-Nyhan	308000	
Rubinstein-Taybi	180849	
Toriello-Carey	217980	
SEMDJL	271640	

1.2.6. Bases moleculares de HSCR

El principal gen asociado a HSCR es el proto-oncogén *RET*, que codifica para un receptor de membrana con actividad tirosín-kinasa. Actualmente se acepta que HSCR sigue, en la mayoría de los casos, un modelo de herencia complejo en el que deben confluir diversos eventos genéticos para que se produzca el fenotipo. De esta forma, sólo el 50% de casos familiares y el 10-35% de los esporádicos se relacionan con mutaciones germinales en la secuencia codificante de *RET* (Amiel y cols, 2008; Tomuschat y Puri, 2015). Alrededor del 7% de los casos son debidos a mutaciones en otros genes que participan en rutas de señalización implicadas en la migración, proliferación y diferenciación neural durante la formación del SNE (Figura 1.5 y Tabla 1.5) (Borrego y cols, 2013a, Butler y Trainor, 2013). El análisis molecular de pacientes HSCR ha permitido identificar otros genes/*loci* relacionados. Hasta el momento, se han detectado mutaciones en la región codificante de más de 20 genes, con una penetrancia y expresividad variable (Borrego y cols, 2013a y b). Sin embargo, las mutaciones de todos estos genes suman el 50% de los pacientes afectados (Gershon y Ratcliffe, 2004), es decir, en una gran parte de enfermos no se han identificado mutaciones responsables. Los casos sindrómicos suelen tener una causa genética conocida, con herencia autosómica dominante o recesiva, mientras que los aislados, suelen ser multifactoriales, poligénicos e intervienen mutaciones de baja penetrancia.

Una revisión permanentemente actualizada de las bases genéticas de la enfermedad de Hirschsprung está disponible en Genereviews (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1439/>).

1.2.6.1. Mutaciones en *RET* y sus ligandos

El proto-oncogén *RET* es el gen de mayor susceptibilidad para HSCR. Sus mutaciones (codificantes y no codificantes) representan el 80% de todas las descritas (Kashuk y cols, 2005). El rastreo molecular de *RET* en distintas series de pacientes HSCR ha permitido identificar más de 100 mutaciones codificantes distribuidas a lo largo de todo el gen. Incluyen grandes deleciones, microdeleciones, inserciones y mutaciones puntuales de sentido equivocado (*missense mutations*), sin sentido (*nonsense mutations*) o que afectan al proceso de corte y empalme de mRNA (*splicing mutations*) (Amiel y cols, 2008). El análisis *in vitro* de algunas de ellas ha mostrado que aunque los efectos son variables, en la mayor parte de los casos provocan pérdida de función (haploinsuficiencia).

Las mutaciones de *RET* asociadas a HSCR se pueden clasificar en cuatro grupos distintos (Kashuk y cols, 2005): mutaciones que afectan al dominio extracelular de *RET* y tienen como resultado un fallo en el plegamiento y transporte de la proteína hasta la membrana plasmática (tipo 1); mutaciones en el dominio rico en cisteínas responsables de la dimerización de *RET*, que reducen su localización en la membrana plasmática (tipo 2); mutaciones en el dominio tirosín-kinasa de *RET* que causan la pérdida de la actividad catalítica del receptor (tipo 3) y mutaciones localizadas en la región C-terminal que alteran sitios de unión de proteínas adaptadoras y, por tanto, afectan a la señalización mediada por *RET* (tipo 4).

Por otro lado, se han descrito mutaciones germinales en *RET* que ocasionan en el humano otras patologías, como los síndromes MEN 2A y MEN 2B y el FMTC, de herencia autosómica dominante (Lallier y cols, 1998; Skinner, 2003).

La incidencia de MEN2A y FMTC en los pacientes HSCR se estima entre el 2,5 y el 5% (Olivares Muñoz y cols, 2012; Virtanen y cols, 2013), mientras que se ha reportado una prevalencia de HSCR en pacientes con MEN 2A/FMTC entre el 29% y el 42% (Bütter y cols, 2007). Esta asociación es rara y genéticamente tiene su base en las conocidas como mutaciones “Janus”, que producen un efecto dual en la función de la proteína RET en el mismo paciente. En la mayoría de los casos se localizan en el exón 10 de *RET* (codones C609, C611, C618 y C620) y originan la sustitución de una cisteína por otro Aa en el dominio extracelular de la proteína (Figura 1.11) (Moore y Zaahl, 2008a; Olivares Muñoz y cols, 2012). Por una parte, a nivel embrionario esas mutaciones originan una pérdida de función del receptor al verse afectada su localización en la membrana plasmática, dando lugar al fenotipo HSCR. Por otra, ya en la etapa adulta, originan una ganancia de función causada por una activación constitutiva, dando lugar a una anormal proliferación celular y a los procesos neoplásicos (Bütter y cols, 2007; Moore y Zaahl, 2008a). La mutación en C620 es la más frecuente y representa el 50% de los casos descritos de MEN2A y HSCR, en su mayoría formas de segmento largo y TCA (Bütter y cols, 2007; Coyle y cols, 2014). La asociación HSCR/MEN2A ha sido reportada en más de 25 familias (Borrego y cols, 1998; Fernández y cols, 2006; Moore y Zaahl, 2008a y 2010).

En MEN2B (carcinoma medular de tiroides, feocromocitoma, fenotipo marfanoide y neuromas intestinales) la mutación se produce en el 95% de los casos en el codón 918 del exón 16 (Moore y Zaahl, 2012c) (Figura 1.12), recomendándose la realización de la tiroidectomía profiláctica antes de los 6 meses de vida.

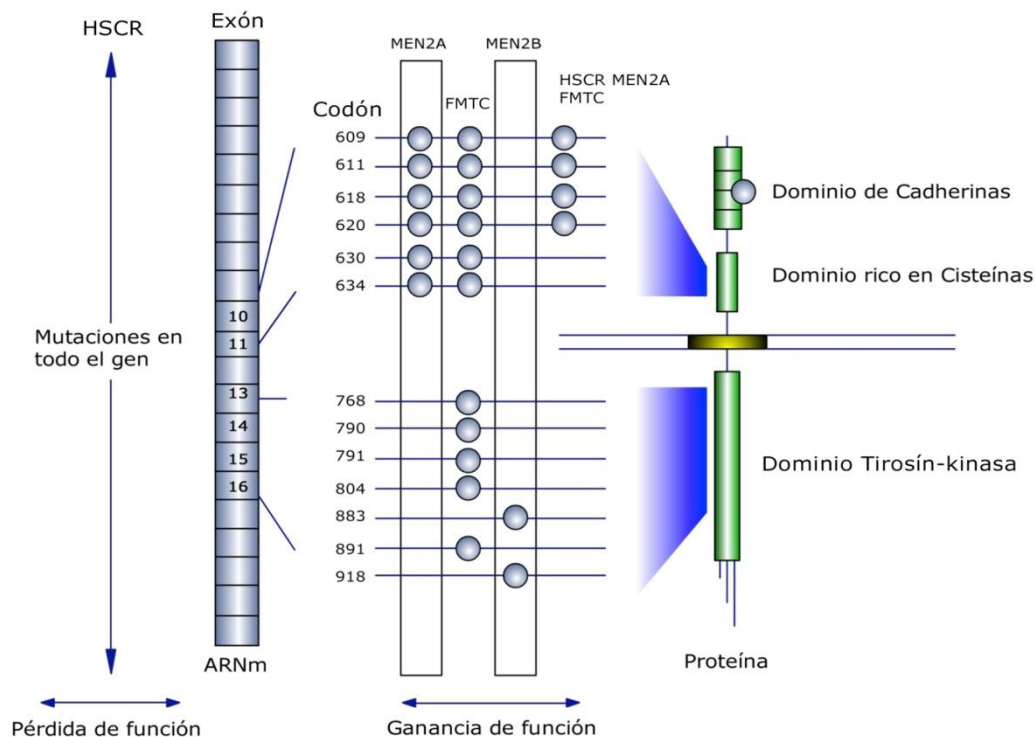


Figura 1.22: Dominios del proto-oncogén *RET*.

Pérdida de función de la proteína RET en HSCR y ganancia de función en MEN2A, MEN2B y FMTC.

Por otra parte, el papel de *RET* en HSCR convierte a los genes que codifican para las proteínas de su complejo de activación, es decir a sus ligandos (*GDNF*, *NRTN*, *ARTN* y *PSPN*) y correceptores

(*GFR1*, *GFR2*, *GFR3* y *GFR4*) en potenciales candidatos para el desarrollo de la enfermedad. Algunos estudios han demostrado que el complejo GDNF-RET-GFR α 1 es necesario para prevenir la aganglioneosis. Sin embargo, hasta la fecha se ha descrito un reducido número de mutaciones en *GDNF* asociadas a HSCR. La mayoría de esos pacientes presentan alteraciones genéticas adicionales como mutaciones en *RET* o trisomía 21, por lo que las mutaciones en *GDNF* parecen no ser suficientes para originar el fenotipo (Sánchez-Mejías y cols, 2010b). También se han identificado mutaciones asociadas a HSCR en los genes *NRTN* y *PSPN* (Ruiz-Ferrer, 2007) y *GFR1* (Borrego y cols, 2003).

Dado que en la mayoría de los casos las mutaciones observadas en la secuencia codificante de *RET* son insuficientes para señalarlas como responsables únicas en la patogénesis de la enfermedad, la hipótesis más aceptada es la del modelo aditivo, en la que debe confluír más de un evento genético para que se manifieste la enfermedad. En este sentido, además de las mutaciones tradicionales que dan lugar a HSCR, se ha observado que existen polimorfismos comunes (*Single Nucleotide Polymorphism*, SNPs) y haplotipos de *RET* que se encuentran fuertemente asociados a las formas esporádicas de la enfermedad (Borrego y cols, 1999, 2000, 2003; Fernández y cols, 2005; Emison y cols 2005, 2010). Así, se ha logrado identificar un dominio conservado con potencial función reguladora de la transcripción (*Enhancer-like*), situado entre las kilobases 9 y 10 del intrón 1. Dentro de este dominio, la variante c.73+9277T ha mostrado ser un factor de susceptibilidad genético con una contribución a la aparición de HSCR, 20 veces mayor que las mutaciones codificantes, con un efecto funcional *per se*, capaz de reducir la capacidad de SOX10 para unirse al dominio *Enhancer-like* y disminuir la transcripción del proto-oncogén *RET* (Emison y cols, 2005).

Por tanto, HSCR se encuadra dentro de las llamadas “enfermedades multifactoriales”, en las que el componente genético está claro pero existen otros factores ambientales y/o genéticos que la modulan y pueden hacer que entre individuos con la misma secuencia del gen, unos padezcan la enfermedad y otros no.

1.2.6.2. Mutaciones en la ruta de las endotelinas (*EDNRB* y *EDN3*)

La propuesta de un *locus* de susceptibilidad para HSCR en 13q22 se debió a la identificación de deleciones intersticiales en esta localización en pacientes HSCR y a la existencia de sintenia entre la región 13q22 en humanos y el *locus* del modelo de ratón para aganglioneosis *piebald-letha* (Amiel y cols, 2008). La candidatura de *EDNRB* para esta región fue confirmada con la identificación de la mutación W276C en un paciente HSCR (Puffenberger y cols, 1994), aunque la penetrancia de esta mutación no era completa y parecía estar influida por el sexo. Posteriormente, el rastreo de *EDNRB* en familias consanguíneas WS4, reveló la presencia de mutaciones en homocigosis en una fracción de las mismas (Attíe y cols, 1995). El rastreo mutacional de *EDNRB* en series de pacientes HSCR esporádicos ha demostrado que es el segundo gen de susceptibilidad más importante, encontrándose mutaciones en aproximadamente el 5-7% de los pacientes HSCR (Tam y García-Barceló, 2009). El análisis funcional para determinar la relevancia patogénica de diferentes mutaciones en este gen, ha revelado que éstas generan una pérdida de función del receptor (Abe y cols, 2000).

El número de mutaciones en *EDN3* responsables del fenotipo HSCR es minoritario (<5% de los casos) siendo más prevalentes en los casos sindrómicos que en los aislados (Tam y García-Barceló, 2009). Cabe mencionar que en esos pacientes la penetrancia de mutaciones en heterocigosis de *EDN3* y *EDNRB*

es incompleta, no se identificaron mutaciones *de novo*, y el fenotipo predominante al que dan lugar es HSCR de segmento corto (Sánchez-Mejías y cols, 2010b).

Las mutaciones en heterocigosis en estos dos genes dan lugar a HSCR aislado y las mutaciones en homocigosis se han asociado con WS4 (Bondurand y cols, 2007). En concreto, WS4 se ha asociado en un 20-30% de los casos a mutaciones en homocigosis en los genes *EDN3* y *EDNRB* (Puffenberger y cols, 1994; Edery y cols, 1996; Hofstra y cols, 1996). Sin embargo, entre un 15-35% de los casos de WS4 no tienen una causa conocida a nivel molecular, lo que sugiere que podrían estar involucrados otros genes o que las mutaciones en los genes conocidos se hayan omitido en screenings anteriores.

Por último, también se ha podido identificar una mutación en heterocigosis en el gen *ECE1* en un paciente HSCR con defectos craneofaciales y cardíacos (Hofstra y cols, 1999), ya que esta proteína participa en la maduración postraduccional no solo de *EDN3*, sino también de *EDN1* y *EDN2*.

1.2.6.3. Mutaciones asociadas a HSCR en genes que codifican para factores de transcripción

La relevancia de *SOX10* en HSCR fue identificada mediante el estudio de un modelo murino, de forma que el defecto molecular en el ratón *Dom* (*dominant megacolon*) es una mutación en este gen (Southard-Smith y cols, 1999). El ratón *Dom* en heterocigosis se presenta con aganglionosis distal e hipomelanosis localizada de piel y pelo (hechos similares a los de WS tipo 2), lo que indica que tanto los melanocitos como las neuronas entéricas, ambos derivados de la CN, se afectan por la mutación en *SOX10* (Borrego y cols, 2013b).

Hasta la fecha se han descrito hasta 100 mutaciones en el gen *SOX10* que causan fenotipos variables, como las formas familiares y esporádicas de WS4, WS tipo 2 (despigmentación y sordera sin HSCR), y WS4 asociado a desórdenes neurológicos por desmielinización central y periférica (Inoue y cols, 2004; Pingault y cols, 2010). Las mutaciones en heterocigosis de *SOX10* suman aproximadamente el 50% de los casos WS4 y son también responsables de la forma más severa PCWH (Verheij y cols, 2006; Bondurand y cols, 2007). En su mayoría ocurren *de novo* (Inoue y cols, 2004) y constituyen el 5% de los casos sindrómicos y no sindrómicos de HSCR (Butler y Trainor, 2013). La web <http://grenada.lumc.nl/LOVD2/WS/> contiene una base de datos regularmente actualizada, en la que se recopilan todas las mutaciones causantes de WS. Recientemente se han descrito mutaciones en *SOX10* en casos aislados de HSCR, lo que indican una relación *per se* de las mismas en su patogénesis (Bondurand y cols, 2007; Pingault y cols, 2010; Sánchez-Mejías y cols, 2010c; Borrego y cols, 2013b).

El gen *PHOX2B* (*Paired-like homeobox 2b*), localizado en el cromosoma 4p12, codifica un factor de transcripción implicado en el desarrollo de varias poblaciones de neuronas noradrenérgicas en ratones. En el modelo murino, la expresión *PHOX2B* se inicia tan pronto como los enteroblastos invaden el mesénquima del intestino anterior y se mantiene durante todo el desarrollo de las neuronas entéricas, por lo que el silenciamiento en homocigosis del gen *PHOX2B* en ratones conduce a una ausencia de ganglios entéricos (Pattyn y cols, 1999). Por esto, *PHOX2B* es considerado un gen candidato para HSCR proponiéndose un mecanismo basado en haploinsuficiencia (Tam y García-Barceló, 2009). El gen *PHOX2B* es el *locus* principal para CCHS o síndrome de Ondine (OMIM 209880), que está asociado a HSCR en el 25-30% de

los casos (síndrome de Haddad) (Amiel y cols, 2003). Así mismo, una mutación en la línea germinal de *PHOX2B* representa el primer factor genético de predisposición al NB (Fan y cols, 2004). Solo excepcionalmente, mutaciones en este gen han sido descritas asociadas a HSCR en contextos diferentes del CCHS y del NB (Fernández y cols, 2013). Este gen también ha sido descrito como un factor clave en la regulación transcripcional de *RET* (Pattyn y cols, 1999). Así mismo, se ha reportado que la interacción entre SNPs del gen *PHOX2B* y de *RET* incrementan la susceptibilidad a HSCR (Miao y cols, 2007).

Se han encontrado mutaciones en el gen *SIP1* (*Smad Interacting Protein-1*), también conocido como *ZFHX1B* (*Zinc Finger Homeo box 1B*), en pacientes con síndrome de Mowat-Wilson, caracterizado por retraso mental, malformaciones y otras anomalías congénitas que con frecuencia incluyen a HSCR (Mowat y cols, 2003; Garavelli y Mainardi, 2007). *SIP1* es un factor de la transcripción implicado en el desarrollo del SNE, que media en la señalización de BMP-4 y BMP-2, y participa en la expresión de *EDNRB*. Se piensa que estos fenotipos son el resultado de la haploinsuficiencia de *SIP1* generada por mutaciones en uno de los alelos (Sánchez Mejías, 2010a).

También se han descrito mutaciones en homocigosis en el gen *KLA1279* en dos familias independientes que presentan el síndrome de Goldberg-Shprintzen (Brooks y cols, 2005). Este síndrome se caracteriza por la aparición de microcefalia, retraso mental, rasgos dismórficos y HSCR. La función de la proteína codificada por este gen aún no se conoce, pero el análisis de los distintos motivos proteicos predice que podría estar implicada en la regulación del ciclo celular, control transcripcional, neurogénesis y plegamiento de proteínas (Brooks y cols, 2005). Por otra parte, se ha visto expresión en distintas partes del SNC. Así, la identificación de mutaciones en este gen asociadas a HSCR, hace pensar que podría jugar un papel importante en el desarrollo del SNP y SNC.

Igualmente, se han reportado diversas mutaciones en el gen *L1CAM* en pacientes con hidrocefalia y HSCR (Okamoto y cols, 2004; Fernández y cols, 2012). A pesar de que *L1CAM* se expresa durante el desarrollo del SNE (Heanue y Pachnis, 2007), y la proteína que codifica es necesaria para la migración y diferenciación de las células derivadas de la CN, se ha demostrado que la pérdida completa de la misma no es suficiente para producir la aganglionosis (Anderson y cols, 2006), sugiriendo que *L1CAM* podría actuar como modificador génico.

Por otra parte, se han detectado mutaciones *de novo* en el gen *TCF4* en pacientes con síndrome de Pitt-Hopkins, caracterizado por retraso mental, malformaciones faciales, hiperventilación intermitente y HSCR (Amiel y cols, 2007; Zweier y cols, 2007). *TCF4* codifica para un factor de transcripción implicado en la ruta PHOX-RET durante el desarrollo del SNE, por lo que su ausencia de función podría ser la responsable de la aparición de HSCR en estos pacientes (Zweier y cols, 2007).

La Tabla 1.5 recoge los principales genes implicados en las formas aisladas y sindrómicas de HSCR.

Tabla 1.5: Genes relacionados con HSCR aislado y sindrómico.
(Borrego y cols, 2013a. Genetics Basis of Hirschsprung's Disease in Constipation in Children).

Gen	Localización	Fenotipo	Herencia	Modelo murino
<i>RET</i>	10q11.2	HSCR HSCR-MEN2/FMTC	Dominante, penetrancia incompleta D dominante	Aganglionismo intestinal total, agenesia renal
<i>GDNF</i>	5p13.2	HSCR	Dominante, baja penetrancia	Aganglionismo intestinal total, agenesia renal
<i>NRTN</i>	19p13.3	HSCR	Dominante, baja penetrancia	Déficit moderado de neuronas entéricas
<i>PSPN</i>	19p13.3	HSCR	Dominante, baja penetrancia	-
<i>GFR1</i>	10q25.3	HSCR	Dominante, baja penetrancia	Aganglionismo intestinal total, agenesia renal
<i>EDNRB</i>	13q22.3	WS	Recesiva/ Dominante	Aganglionosis, pelo con manchas
<i>EDN3</i>	20q13.32	4/HSCR WS4/HSCR	Recesiva/ Dominante	Aganglionosis, pelo con manchas
<i>ECE-1</i>	1p36.12	HSCR, defectos cardíacos, alteraciones craneofaciales y disfunción autonómica	Dominante	Aganglionosis, pelo con manchas, defectos craneofaciales
<i>SOX10</i>	22q13.1	WS4/HSCR	Dominante	Aganglionosis, pelo con manchas
<i>PHOX2B</i>	4p12	CCHS/NB+HSCR	Dominante	Aganglionismo intestinal total, ausencia de sistema nervioso autónomo, anomalías ventilatorias
<i>NTF3</i>	12p13.31	HSCR	Dominante, baja penetrancia	Déficit de neuronas entéricas
<i>NTRK3</i>	15q25.3	HSCR	Dominante, baja penetrancia	Déficit de neuronas entéricas
<i>PROKRI</i>	2p14-p13.3	HSCR	Dominante, baja penetrancia	-
<i>PROKR2</i>	20p12.3	HSCR	Dominante, baja penetrancia	Hipoplasia del bulbo olfatorio y sistema reproductivo
<i>PROKI</i>	1p13.3	HSCR	Dominante, baja penetrancia	-
<i>SEMA3A</i>	7p12.1	HSCR	Dominante, baja penetrancia	Déficit de la inervación simpática cardíaca y malformación de los ganglios estrellados
<i>NRG1</i>	8p12	HSCR	Dominante, baja penetrancia	D efecto cardíaco letal
<i>ZFHXB</i>	2q22.3	Síndrome de Mowat-Wilson	Dominante	Letal durante la gastrulación
<i>KIAA1279</i>	10q22.1	Síndrome de Goldberg-Siprinzen	Recesiva	-
<i>LICAM</i>	Xq28	Hidrocefalia obstructiva por estenosis del acueducto de Silvio/ síndrome MA-SA* + HSCR	Ligada a X	Hidrocefalia
<i>SEMA3D</i>	7q21.11	HSCR	Dominante, baja penetrancia	-
<i>NRG3</i>	10q23.1	HSCR	Dominante, baja penetrancia	-

*Mental retardation, Aphasia, Shuffling gait, Adducted thumbs.

1.2.7. Fisiopatología

El aganglionismo produce una pérdida de motilidad en el segmento afecto y un espasmo o contracción secundaria del mismo (Figura 1.13). Esta contracción se debe a la hipertrofia de las fibras colinérgicas del sistema nervioso extrínseco que producen un espasmo del mismo, a la ausencia de neuronas inhibitorias ligadas al óxido nítrico y a una probable alteración de las CICs, que relajan el intestino. Por el mismo motivo, el EAI no se relaja ante la distensión rectal, lo que se conoce como ausencia de reflejo inhibitor del ano (RIA). Todo ello contribuye a la obstrucción funcional intestinal y al cuadro clínico, con dilatación e hipertrofia del intestino proximal (De Lorijn y cols, 2007; Puri y O'Donell, 2009). También se han observado alteraciones electrofisiológicas (miogénicas) en el segmento agangliónico (Kubota y cols, 2002). La gravedad de la obstrucción varía entre los pacientes que tienen similar longitud de segmento agangliónico, lo que sugiere que en la obstrucción participan otros factores, además de los expuestos.

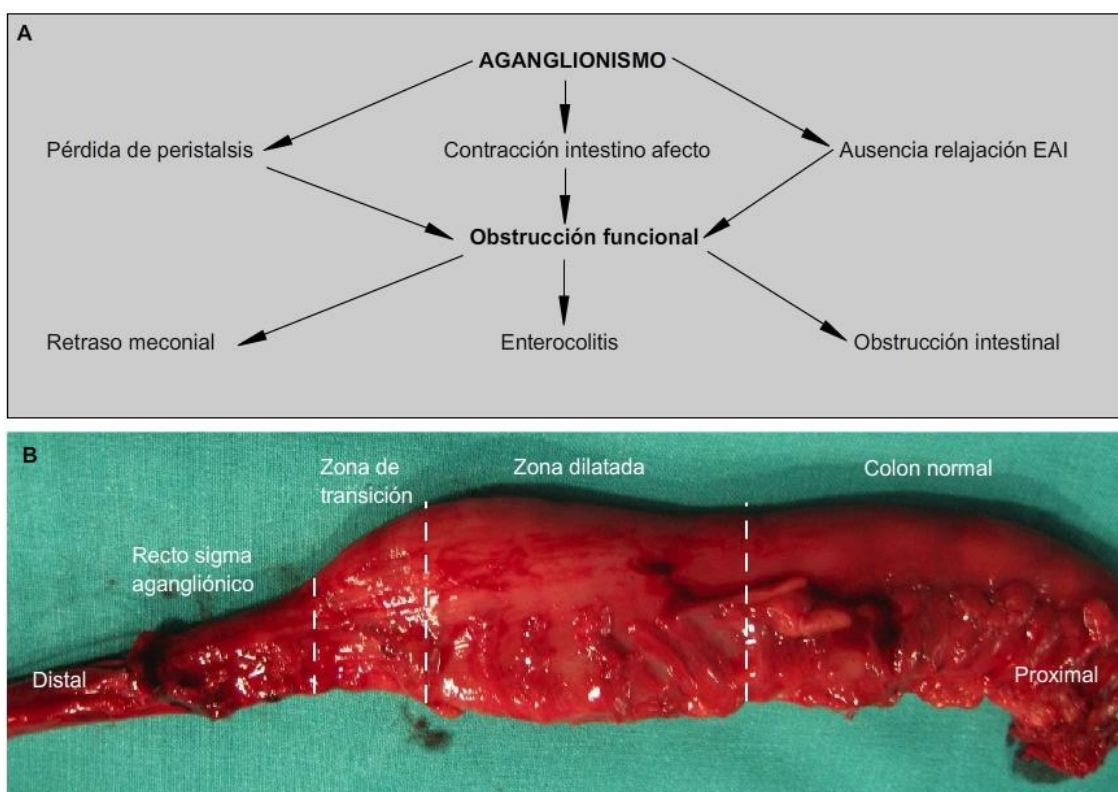


Figura 1.3: A: Fisiopatología de HSCR. B: Pieza operatoria de S-HSCR.

Puede observarse el segmento estrecho (agangliónico), la ZT, la zona dilatada y más proximalmente, el colon de calibre normal.

1.2.8. Manifestaciones clínicas

1.2.8.1. Presentación en el período neonatal

HSCR es la causa más frecuente de obstrucción intestinal funcional en el recién nacido. El 80-90% de los pacientes debutan en primeros días de vida, en forma de retraso meconial, distensión abdominal, vómitos, obstrucción intestinal, diarrea o perforación intestinal. La sensibilidad y especificidad de los síntomas al diagnóstico en el período neonatal se recogen en la Tabla 1.6. Suele tratarse de recién nacidos a término y de peso adecuado para la edad gestacional. Dentro del espectro clínico, el retraso meconial superior a 24 horas es uno de los síntomas más típicos, pues menos del 10% de los neonatos afectados reali-

zan su primera deposición meconial en el primer día de vida (Núñez y cols, 2009a). Mediante el tacto rectal (TR) se aprecia un recto estrecho, con una ampolla vacía y que se adhiere al dedo examinador. En algunos casos, especialmente en S-HSCR, al retirar el dedo del recto se produce una deposición explosiva con eliminación de heces líquidas y gases, acompañada de una disminución de la distensión abdominal. HSCR también puede manifestarse a esta edad en forma enterocolitis, cuadro clínico caracterizado por distensión abdominal, fiebre, diarrea y afectación del estado general (Núñez y cols, 2009a).

Tabla 1.6: Validez de las manifestaciones clínicas de HSCR en el período neonatal. (Guo y cols, 2006).

Manifestaciones clínicas	Sensibilidad %	Especificidad %	Valor predictivo %
Retraso meconial	83	88	0,77
Vómitos	77	38	0,30
Distensión abdominal	83	33	0,26
Diarrea	86	13	0,11
Obstrucción intestinal	80	18	0,14
Ano estrecho ¹	91	67	0,68

¹Es la sensación de resistencia al introducir el dedo meñique en el recto (ampolla estrecha y vacía; a veces deposición explosiva).

1.2.8.2. Presentación en el lactante y otras edades

En el 10% de los pacientes la enfermedad no da síntomas en el período neonatal y se manifiesta más tarde, en lactantes, niños de más edad e incluso en adultos, en forma de estreñimiento pertinaz, retraso del crecimiento, distensión abdominal, enterocolitis o cuadros de obstrucción intestinal (Doodnath y Puri, 2010; Langer, 2013; López Ruiz y cols, 2016). En la Tabla 1.7 se reflejan las diferencias clínicas entre el estreñimiento crónico de perfil funcional y HSCR.

1.2.8.3. Particularidades del aganglionismo cólico total

TCA se define como el aganglionismo que se extiende desde el ano hasta la válvula ileocecal pero no afecta a más de 50 cm proximal a la misma (Moore, 2015), siendo excepcionales los casos en los que la afectación de intestino delgado es más extensa. Se considera una forma especial dentro del espectro HSCR por su incidencia (2-13% de los casos), así como por su severidad clínica, dificultades diagnósticas y tratamiento. Es más común en mujeres y la incidencia clásica a favor del sexo masculino de 4/1 típica de S-HSCR disminuye a 1,1/1 o 0,8/1 (Moore, 2009a). La mayoría de los pacientes presentan un cuadro clínico de obstrucción intestinal funcional en las primeras semanas de vida, en relación con la extensión del aganglionismo, sin embargo, no es infrecuente que se presente de forma más larvada y mucho más tarde de lo esperado, habiéndose reportado casos de presentación tardía, en el adolescente y adulto (Lall y cols, 1999; Moore y Zaahl, 2009b). Otro aspecto que diferencia a ambas formas de aganglionismo es la dificultad diagnóstica del TCA. Así, algunos autores refieren en su experiencia dificultades diagnósticas en el 50% de los pacientes (Moore, 2012d). Esto se debe, entre otros factores, a la influencia del segmento de intestino delgado implicado, la menor sensibilidad y especificidad de los estudios radiológicos, que con frecuencia informan de la presencia de un colon de aspecto normal, y las particularidades de su histopatología (Moore, 2015).

Por otra parte, TCA se presenta de forma familiar con más frecuencia que S-HSCR ($p < 0,001$) (Moore y cols, 1991), habiéndose descrito mutaciones en *RET* en el 82% de los pacientes TCA frente al

33% de los afectos de HSCR de segmento corto (Moore, 2012d). Finalmente, a pesar de los avances en su tratamiento quirúrgico, los resultados a largo plazo son poco satisfactorios en muchos casos (Laughlin y cols, 2012).

1.2.8.4. Aspectos clínicos de la asociación del síndrome de Down y HSCR

DS es la anomalía cromosómica más comúnmente asociada a HSCR. La incidencia de esta asociación ha aumentado en las últimas décadas (Menezes y Puri, 2005; Suita y cols, 2005). Los individuos con DS muestran un riesgo 40 veces mayor de padecer HSCR que la población general, lo que sugiere que el cromosoma 21 está implicado de alguna manera en la etiología de HSCR (Arnold y cols, 2009; Moore y Zaahl, 2012b). El diagnóstico de esta asociación a menudo se retrasa debido, entre otros factores, a la preocupación por el tratamiento de otras malformaciones como las cardiopatías, o al estreñimiento que estos pacientes padecen con frecuencia por su hipotonía o hipotiroidismo. La incidencia de enterocolitis y mortalidad preoperatoria es mayor en pacientes en los que concurren DS y HSCR. Se ha descrito una incidencia de enterocolitis posoperatoria del 48% en pacientes DS y HSCR frente al 25% de los pacientes no DS ($p < 0,05$) (Menezes y Puri, 2006). En pacientes DS se ha establecido una deficiencia inmunológica intrínseca con disminución de la función citotóxica de los linfocitos T y trastornos de la inmunidad humoral, situación que incrementa el riesgo de hacer enterocolitis asociada a la HSCR. Es importante destacar que ciertos haplotipos del gen *ITGB2* presente en el cromosoma 21, que codifica para CD18 ($\beta 2$ integrina), promotora de la activación de los linfocitos T, se asocian significativamente con enterocolitis asociada a HSCR (Moore y cols, 2008b). El aganglionismo de segmento corto es el más frecuentemente vinculado a DS, mientras que el fenotipo TCA es raro en este contexto (Moore, 2015). Globalmente, la tasa de mortalidad de HSCR en pacientes DS con anomalías cardiovasculares continúa siendo elevada (Ieiri y cols, 2009).

1.2.9. Métodos diagnósticos

La sospecha precoz de HSCR es imprescindible para prevenir complicaciones y planificar el tratamiento quirúrgico. Sin embargo, sus métodos de estudio presentan limitaciones cuando se aplican en el período neonatal y el diagnóstico a esta edad supone un reto en la práctica clínica. Los principales métodos diagnósticos en el momento actual son la manometría anorrectal (MA), el enema de contraste (EC) y la BR ya sea por succión o de espesor total. A continuación se describirán brevemente cada uno de ellos.

1.2.9.1. Enema de contraste

El EC fue el primer método empleado en el diagnóstico de HSCR (Swenson y cols, 1949) y permaneció como primera opción durante muchos años, siempre combinado con la BR para la confirmación de la enfermedad. En la actualidad ha perdido valor diagnóstico, describiéndose una sensibilidad del 76% y una especificidad del 97% (De Lorig y cols, 2005), pero continúa siendo muy útil para conocer la extensión del aganglionismo y planificar la intervención (Frongia y cols, 2016). El EC debe ser realizado sin preparación previa del colon y, en el caso de que el paciente reciba irrigaciones rectales, suspendiéndolas 24 - 48 horas antes. En posición de decúbito lateral izquierdo y con las piernas flexionadas, se introduce una sonda de 8-12 Fr hasta el canal anal (CA). A continuación, y bajo control fluoroscópico, se administra manualmente (jeringa de 60 ml) un contraste hidrosoluble a baja presión

para detectar el inicio de la zona dilatada y no distender artificialmente el segmento agangliónico. Se recomienda evitar los contrastes baritados, especialmente en el recién nacido. Cuando se observa la ZT el estudio se puede dar por finalizado. En estos casos, el EC muestra una zona estrecha proximal al ano, seguida por una zona semejante a un embudo y una zona dilatada más proximal. Anatómicamente estos segmentos corresponden respectivamente a la zona agangliónica, hipogangliónica y ganglionar (Figura 1.13 B). El hallazgo más característico del EC es la presencia de la ZT, en la que se observa el cambio de calibre entre la zona agangliónica y la dilatada (Figura 1.14 A y B). Sin embargo, la ZT no se observa en el 30% de los neonatos HSCR, existiendo una concordancia entre la ZT radiológica e histológica del 64,5-94,4% en los segmentos cortos y de 25-50% en los largos (Granero y cols, 2010; Frongia y cols, 2016). Otros signos de HSCR incluyen: inversión del índice rectosigmoideo (la proporción del diámetro del recto/sigma en HSCR es inferior a 1), el retraso en la eliminación del contraste superior a 24 horas (Langer, 2013), irregularidades en la mucosa (en casos de enterocolitis asociada) y contracciones irregulares de la pared intestinal (Alehossein y cols, 2015). El diagnóstico de TCA es difícil de establecer por EC debido a la ausencia de hallazgos radiológicos específicos, no siendo habitual identificar la ZT (Moore y Zaahl, 2009b). En un interesante estudio se identificaron tres tipos de imágenes radiológicas en el TCA: colon en forma de interrogante, microcolon y colon de aspecto normal (Stranzinger y cols, 2008; Figura 1.15). Sin embargo, aunque el EC sea normal, debe sospecharse TCA si el paciente permanece sintomático y se han excluido otras causas de obstrucción intestinal.

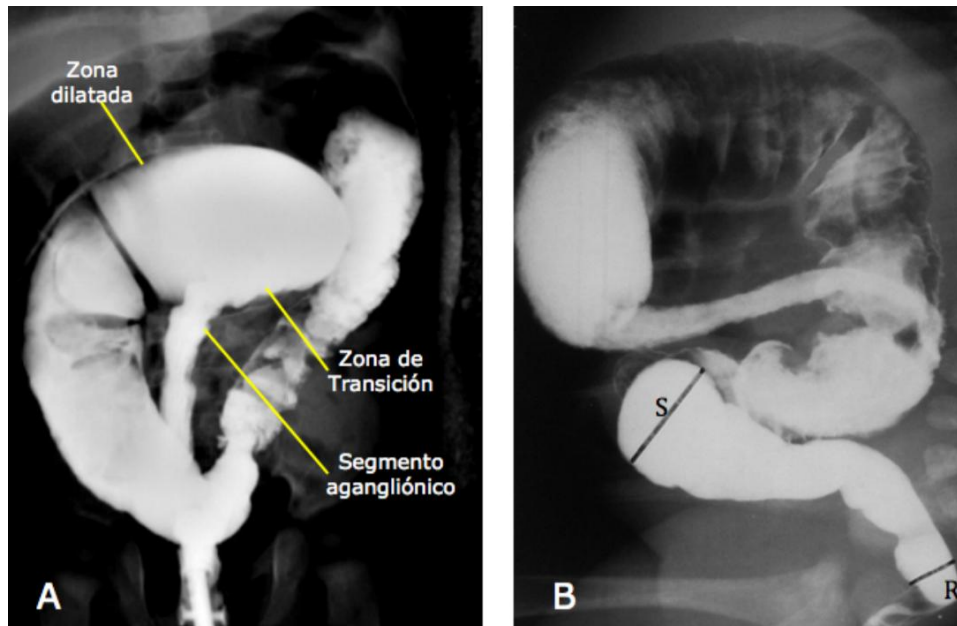


Figura 1.4: Hallazgos radiológicos clásicos del EC en HSCR.

- A: EC en S-HSCR. Se aprecia un segmento rectosigmoideo estrecho y muy espástico.
- B: EC que muestra un índice rectosigmoideo <1.

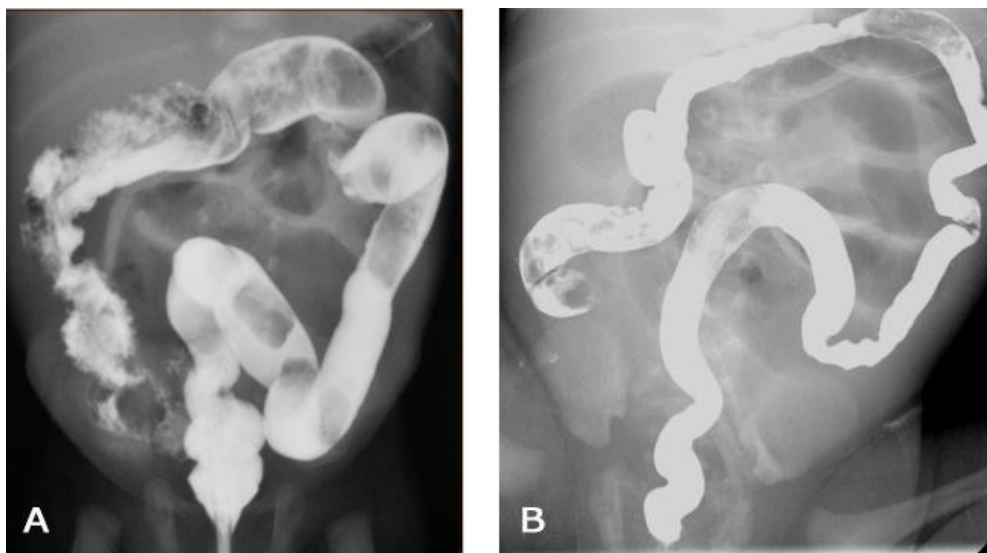


Figura 1.5: EC en TCA.

A: Calibre del colon disminuido, bordes rígidos e irregularidades en mucosa de colon derecho sugestivas de enterocolitis. B: Microcolon en recién nacido con TCA con afectación ileal amplia.

1.2.9.2. Manometría anorrectal

La MA es un método empleado para el diagnóstico de HSCR, cuyo objetivo es demostrar la ausencia de RIA. Para su realización se precisa de sondas que disponen en la punta de un balón para la distensión rectal así como orificios laterales (canales) para la toma de las presiones anorrectales, de transductores que transforman los cambios de presión en señal eléctrica, de un polígrafo que procesa y transforma las señales eléctricas en un registro gráfico y de un ordenador conectado al polígrafo que muestra los gráficos en el monitor y facilita el análisis. En pacientes sanos la distensión del balón rectal de la sonda con aire produce una pérdida de presión en el CA por relajación del EAI, hecho fisiológico conocido como RIA (Figura 1.16). En este reflejo participan la inervación intrínseca (SNE) y extrínseca (parasimpático pélvico) (Shafik y cols, 2002). El reflejo aparece cuando hay un descenso de al menos 5 mmHg en la presión del EAI. En HSCR, debido al fracaso en la migración de las células de la CN para colonizar los segmentos más distales del intestino, la ausencia de inervación parasimpática da lugar a la ausencia de RIA (Figura 1.16).

Estudios previos han demostrado una sensibilidad y especificidad de este test del 88% y 94% respectivamente (Takawira y cols, 2015). Sin embargo, estos resultados son variables según las series y dependen de la experiencia de cada centro. Así, Wu y cols en 2013, reportaron una tasa de falsos negativos del 0 al 24% y de falsos positivos del 0 al 62%. El megarrecto puede originar resultados falsos positivos al subestimar el nivel al que debe ser inflado el balón para obtener el reflejo. Por el contrario, la malposición del catéter es una causa frecuente de falso negativo. Estudios recientes ofrecen resultados prometedores en relación a la anomanometría de alta resolución, técnica en la que el catéter dispone de múltiples sensores de presión, aunque sus resultados aún no están estandarizados (Tang y cols, 2014).

La MA en HSCR está dirigida a demostrar la ausencia de RIA. Tradicionalmente esta técnica ha sido poco utilizada en el recién nacido por considerarse que el RIA aparecía a partir de los 12 días o más de 39 semanas de edad gestacional corregida. Sin embargo, desde hace más de una década, se sabe que el reflejo está presente incluso en prematuros y que por tanto la MA es tan eficaz en el recién nacido como en otras edades, siendo un método útil y seguro e indicado en todo neonato con retraso meconial superior

a 24 horas (Tuduri y cols, 2008). En este contexto, nuestro grupo de trabajo ha comunicado una sensibilidad y especificidad de la MA convencional en el diagnóstico de HSCR en el recién nacido del 99,02% y 90,4% respectivamente (Enríquez y cols, 2010). Otras causas de ausencia de RIA en el recién nacido a tener en consideración son la displasia neuronal intestinal, el hipoganglionismo y el síndrome de colon izquierdo pequeño (Enríquez y cols, 2010).

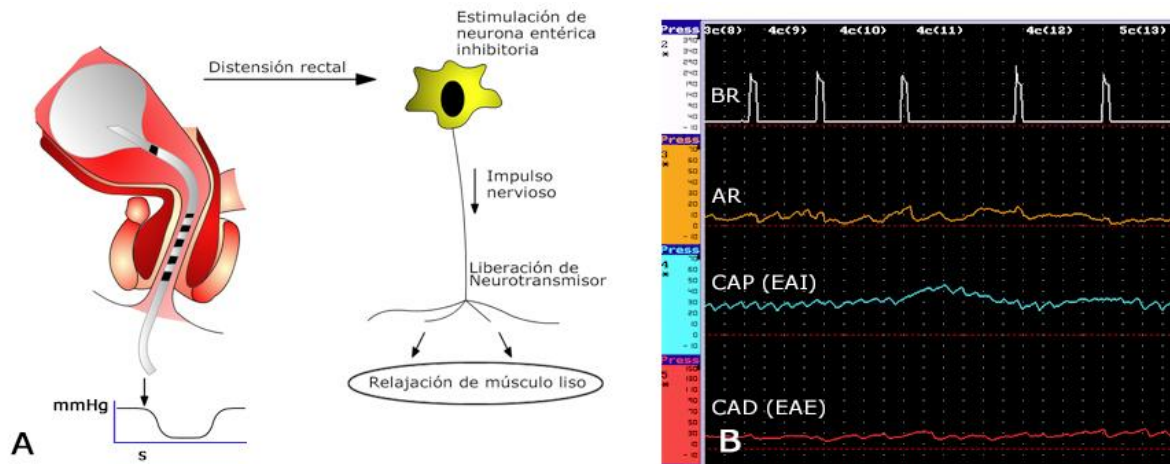


Figura 1.6: Manometría anorrectal.

A: Fundamento de la técnica. B: MA patológica en recién nacido con retraso meconial. Obsérvese la ausencia de RIA ante estímulos rectales (distensión balón rectal con 3-5 ml de aire). BR: Balón rectal, AR: Ampolla rectal, CAP: Canal anal proximal (EAI), CAD: Canal anal distal (Esfínter anal externo, EAE).

1.2.9.3. Biopsia rectal

El diagnóstico definitivo de HSCR es anatomopatológico, de ahí que la BR analizada por un patólogo experto, sea siempre necesaria para confirmar el diagnóstico. Existen dos tipos de BR: por succión (que debe incluir mucosa y submucosa) o de espesor total, y ambas demuestran la ausencia de células ganglionares y la hipertrofia de fibras nerviosas mediante estudios histoquímicos (acetilcolinesterasa), inmunohistoquímicos (calretinina) o hematoxilina-eosina. (Figura 1.17 A y B). Normalmente la BR debe tomarse de 0,5 a 2 cm proximal a la línea pectínea, de modo que una biopsia muy distal puede resultar en un falso positivo (dado que las células ganglionares pueden estar ausentes en este área en condiciones normales) y una muestra muy proximal puede no detectar correctamente aganglionismos cortos. La BR por succión es considerada como el *gold standard* (Martucciello y cols, 2005) habiendo demostrado una eficacia equivalente a la de espesor total para proporcionar muestras adecuadas de submucosa (Muise y cols, 2016). Sin embargo, tiene limitaciones en el período neonatal inmediato (falsos negativos, muestras incorrectas) y complicaciones potencialmente graves (perforación, hemorragia rectal o sepsis) (Friedmacher y Puri, 2015).

1.2.10. Diagnóstico diferencial

El diagnóstico diferencial de HSCR incluye diversas patologías de origen funcional u orgánico. Entre las primeras destacan la prematuridad (inmadurez de los ganglios entéricos), la displasia neuronal intestinal, el hipoganglionismo, el síndrome de colon izquierdo pequeño, el tapón meconial, el hipotiroidismo, la toxicidad farmacológica, la acalasia del EAI y el estreñimiento funcional (Tabla 1.7). Las principales causas orgánicas que pueden simular HSCR son: íleo meconial, atresia de íleon distal y de colon, estenosis de intestino delgado, malrotación intestinal y malformaciones anorrectales bajas (Núñez y cols, 2009a; Puri y Gosemann, 2012; Burkardt y cols, 2014).

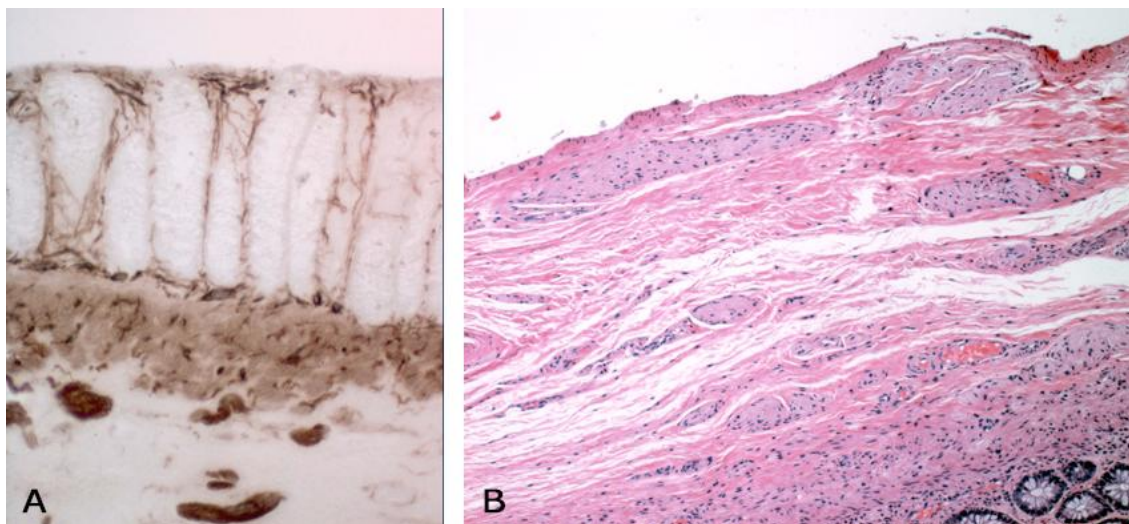


Figura 1.7: Hallazgos anatomopatológicos en HSCR.

A: BR por succión: se aprecia incremento de la actividad de acetilcolinesterasa en fibras parasimpáticas en la lámina propia de la mucosa, *muscularis mucosae* y en la submucosa. Ausencia de células ganglionares en la submucosa. B: BR de espesor total: se observa gran hipertrofia de fibras nerviosas parasimpáticas en el plexo mientérico y ausencia de células ganglionares (calretinina).

Tabla 1.7: Claves para el diagnóstico diferencial entre el estreñimiento funcional y HSCR.

Aspectos clínicos	Estreñimiento	HSCR
Distensión abdominal	Raro	Frecuente
Crisis de obstrucción intestinal	Raro	Ocasional
Retraso del crecimiento	Raro	Ocasional
Dolor abdominal recurrente	Ocasional	Frecuente
Enterocolitis	No	Frecuente
Incontinencia fecal funcional	Frecuente	Raro
Retraso meconial	Raro	Frecuente
Rectorragia	Ocasional	Raro
Retención fecal voluntaria	Frecuente	Raro
Tamaño de las heces	Grandes	Acintadas/normales
Fecalomas palpables	Frecuente	Raro
Heces en recto	Frecuente	Raro
Configuración rectal	Normal/dilatado	Estrecho
Tono anal	Variable	Elevado

1.2.11. Tratamiento

Una vez confirmado el diagnóstico, el tratamiento definitivo es siempre quirúrgico y tiene como objetivos reseca el segmento agangliónico, anastomosar el intestino sano al ano proximalmente a la línea pectínea y preservar la continencia fecal. Los pilares principales en los que se basa el manejo de HSCR son los cuidados médicos preoperatorios, la realización de una ostomía en los casos necesarios y la intervención definitiva.

Antes de la cirugía es necesario realizar irrigaciones rectales para descomprimir el colon y facilitar la evacuación fecal (*nursing*). Para ello se introduce una sonda rectal a través del ano (12-18 Fr, según edad) hasta el segmento dilatado y se irriga el colon con suero fisiológico (10-20 ml/Kg) hasta eliminar el contenido fecal (Figura 1.18). La frecuencia del *nursing* dependerá del grado de obstrucción aunque, en general, una o dos veces al día suelen ser suficientes, resultando muy efectivo en las formas S-HSCR. Los objetivos

del *nursing* son: evitar la colostomía, prevenir la enterocolitis, disminuir la dilatación del colon y garantizar una nutrición adecuada. La dilatación anal mediante el tacto rectal también puede ser útil para descomprimir el intestino distal (Núñez y cols, 2009b). En los pacientes en los que el *nursing* no es efectivo o en casos de enterocolitis grave, perforación intestinal o aganglionismos extensos, puede ser necesario realizar un estoma (frecuentemente ileostomía) para facilitar el tránsito intestinal (Núñez y cols, 2009b). Posteriormente, cuando la ileostomía ha madurado y las heces son sólidas, se efectúa la intervención definitiva.

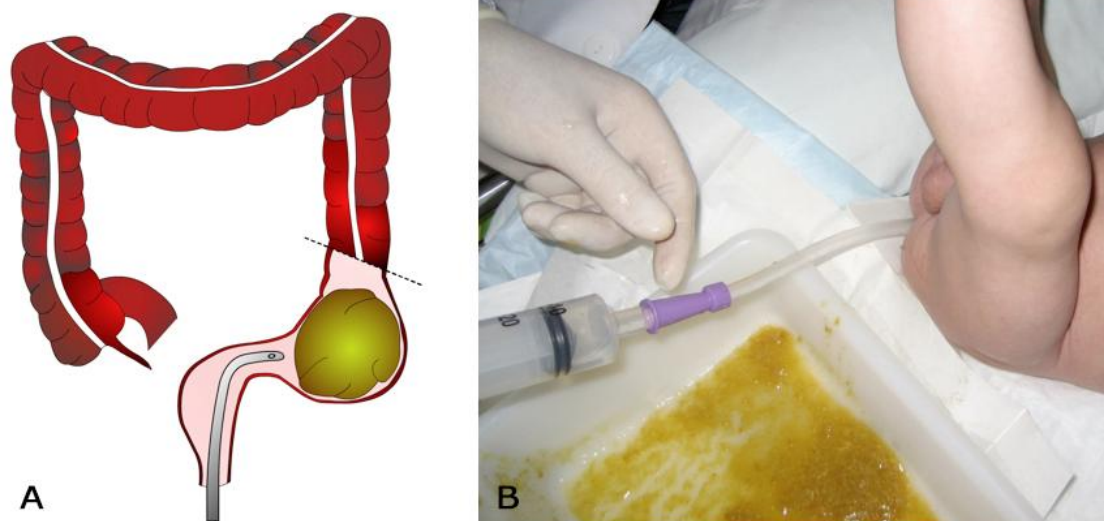


Figura 1.8: Tratamiento médico preoperatorio.

A: La sonda rectal debe sobrepasar la zona agangliónica y alcanzar el colon dilatado. B: El volumen de suero fisiológico infundido debe ser extraído para evitar trastornos hidroelectrolíticos.

Varias técnicas quirúrgicas para la corrección de HSCR han sido descritas a lo largo de la historia de la enfermedad. El primer hito lo protagonizaron **Swenson** y **Bill** en 1948, al conseguir, a raíz de un trabajo experimental en perros, la supervivencia de los primeros casos mediante una cirugía basada en la resección del segmento agangliónico con preservación del EAI anastomosando el colon sano al ano (Swenson y Bill, 1948; Swenson y cols, 1949). Inicialmente se efectuaba en tres etapas (colostomía, *pull-through* y cierre del estoma). Es una técnica difícil que implica una amplia disección pélvica con posible daño de la inervación vesical y genital.

Tras esta descripción se han sucedido las aportaciones al manejo quirúrgico de HSCR: **Rhebein** (Bremen, 1953), aportó el abordaje abdominal con la resección infraperitoneal supraleatoria; **Duhamel** (París, 1956), publicó el descenso retrorectal, que respeta los plexos nerviosos perirrectales y **Soave** (Génova, 1964), describió el *pull-through* endorrectal (Rhebein, 1953; Duhamel, 1956; Soave, 1964). En 1968, **Lester Martin**, propuso una modificación de la técnica de Duhamel para el tratamiento del TCA; en 1980, **So** y cols, fueron los primeros en intervenir a recién nacidos sin colostomía; **Boley** en 1984 y **Kimura** en 1988 describieron nuevas técnicas para el TCA utilizando parches de colon derecho y en 1995 **Georgeson** publicó la técnica del descenso transanal (Soave) con abordaje abdominal laparoscópico (para toma de biopsia y movilización del colon) (Martin, 1968; So y cols, 1980; Boley, 1984; Kimura y cols, 1988; Georgeson y cols, 1995). Posteriormente, en 1998, **De la Torre** y **Ortega**, comunicaron el *pull-through* endorrectal transanal (*Transanal Endorectal Pull-Through*, TEPT, De la Torre-Mondragon y Ortega-Salgado, 1998) exclusivo para el aganglionismo rectosigmoideo. Ambas técnicas supusieron un gran avan-

ce para el tratamiento de estos pacientes, con menor morbilidad postoperatoria y resultados muy satisfactorios. Recientemente se describió la utilización primaria de la técnica de Swenson por vía transanal (Sookpotarom y Vejchapipat, 2009; Levitt y cols, 2013).

Sin embargo, ninguna de ellas está exenta de complicaciones, dado que, para mantener la continencia fecal, se debe preservar el EAI (que es agangliónico) y su espasticidad puede ser causa de estreñimiento y enterocolitis. Por otra parte, la anastomosis del intestino gangliónico con el ano se debe situar proximal a la línea pectínea. La lesión del canal anal durante la intervención o una anastomosis demasiado baja pueden ocasionar incontinencia fecal.

En la actualidad la técnica más utilizada para tratar S-HSCR es la técnica de De la Torre (TEPT). Mediante este procedimiento, por vía anal, se practica la colectomía del segmento agangliónico, el descenso del colon normogangliónico y la anastomosis coloanal proximal a la línea pectínea (Fig. 1.19). Algunos autores realizan el TEPT desde el primer mes de vida (De la Torre y Langer, 2010). En aganglionismos más extensos se puede realizar esta técnica con abordaje laparoscópico (Georgeson y Robertson, 2004).

En el caso del TCA, el tratamiento quirúrgico continúa siendo un gran reto (Márquez y cols, 2009). En estos casos, se recomienda el descenso íleo-anal con ileostomía protectora que se cierra cuando las heces son de consistencia normal (Dodero y cols, 2001). En pacientes con mayor afectación de intestino delgado es muy útil la unión del íleon sano a un segmento de colon derecho para incrementar la absorción y frenar la motilidad intestinal, y realizar una anastomosis del íleon sano al ano (Márquez y cols, 2009; Núñez y cols, 2001). En los raros casos de aganglionismo de todo el intestino la única alternativa viable es el trasplante intestinal (López-Santamaría y Hernández, 2009).

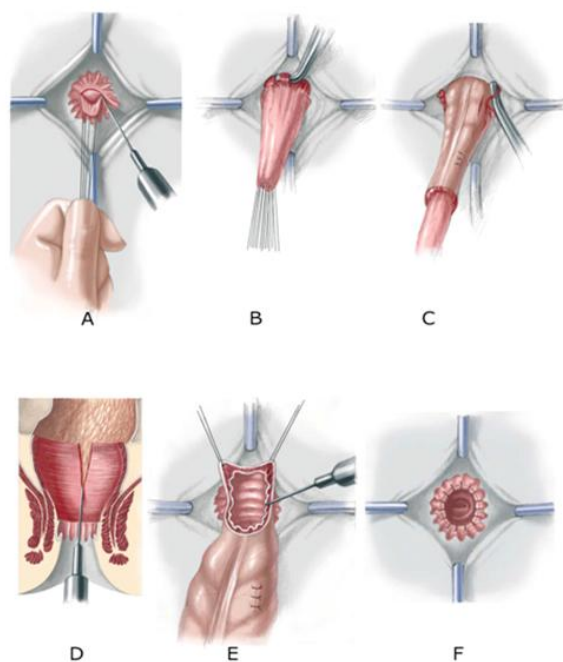


Figura 1.9: Pull-through endorrectal transanal (TEPT).

A: Mucosectomía rectal circunferencial 0,5-1 cm por encima de la línea pectínea. B: Discección submucosa proximal hasta sobrepasar la reflexión peritoneal. Apertura circunferencial de la pared rectal. C: Ligaduras vasculares. Movilización del recto y colon sigmoide a través del ano, exteriorizando el segmento agangliónico, zona de transición y colon de calibre normal. Toma de biopsias de espesor total en estas zonas. D: Miotomía longitudinal de la funda rectal en la parte anterior y posterior. E: Confirmación de la inervación normal del colon. Colectomía del segmento agangliónico y dilatado. F: Anastomosis del colon normal con el ano por encima de la línea pectínea. (Adaptado de Prem Puri, 2006).

1.2.12. Resultados postoperatorios. Enterocolitis y HSCR

Aproximadamente el 50% de los pacientes intervenidos de HSCR presentan alguna complicación postoperatoria precoz o tardía, especialmente los afectos de aganglionismos extensos y aquellos con síndromes asociados. Entre las precoces se describen la dermatitis perianal, el íleo prolongado, la dehiscencia o estenosis de la anastomosis, la obstrucción intestinal, la enterocolitis y el absceso pélvico (De la Torre y Langer, 2010). Entre las tardías, principales condicionantes de la calidad de vida del paciente y resultados a largo plazo, destacan la enterocolitis recurrente (5 - 42% de los casos), el estreñimiento (4 - 33%) y la incontinencia fecal (4 - 11%) (Ieiri y cols, 2010). Se ha propuesto que uno de los factores que pueden explicar el origen del estreñimiento postoperatorio es la asociación de HSCR y displasia neuronal intestinal (Kobayashi y cols, 1995). Otros autores han sugerido que la alteración de la expresión de *FHL1* (*locus* Xq27.2) en el músculo liso intestinal en pacientes HSCR podría estar asociado con la remodelación de la pared intestinal durante la intervención y ser uno de los factores de riesgo de disfunción motora gastrointestinal (Wang y cols, 2014).

La enterocolitis asociada a HSCR (*Hirschsprung's-associated enterocolitis*, HAEC) es la complicación más grave de HSCR y sigue siendo la principal causa de la morbimortalidad de la enfermedad (Núñez y cols, 2009c; Burkardt y cols, 2014), con una mortalidad global que se estima entre el 1 y el 10%. Se caracteriza por una inflamación intestinal clínicamente manifestada por fiebre, distensión abdominal y diarrea, síntomas inespecíficos y que pueden conducir a diagnósticos alternativos y erróneos (enteritis infecciosas) y retrasos diagnósticos. En un intento de unificar criterios, un grupo de 27 gastroenterólogos y cirujanos pediátricos

participaron en el desarrollo de una escala diagnóstica (Pastor y cols, 2009), si bien la sospecha clínica continúa siendo la principal herramienta. Entre los factores que predisponen al desarrollo de HAEC se incluyen el fenotipo de segmento largo, la asociación a DS, la historia familiar de HSCR y los episodios previos de enterocolitis (Moore y cols, 2008b). Sin embargo, su etiopatogénesis no es bien conocida y con objeto de aclararla los esfuerzos más recientes se dirigen al estudio de la inmunidad de mucosas, la predisposición genética y la microbiota intestinal (Gosain, 2016). En la literatura se describe una frecuencia variable pero tan alta como del 60%, aunque la incidencia global más comúnmente comunicada oscila entre el 25-35% (Frykman y Short, 2012). Puede aparecer tanto en el pre como en el postoperatorio, con una incidencia similar en ambos escenarios, siendo la forma de presentación de la enfermedad en el 25% de los casos.

Una de las claves para su prevención radica en el diagnóstico precoz de HSCR en los primeros días de vida. Esto permite el inicio del tratamiento descompresivo del intestino (*nursing* o estoma) y realizar la intervención quirúrgica en los primeros meses de vida (Pastor y cols, 2009). Para prevenir la enterocolitis postoperatoria es importante realizar dilataciones de la anastomosis colo-anal, ya que la estenosis de la misma es un factor frecuentemente implicado (Hackam y cols, 1998). Otras medidas como la administración a largo plazo de metronidazol o el uso de probióticos, no disponen en la actualidad la evidencia suficiente para ser recomendadas de forma rutinaria (Gosain, 2016).

Además de prevenir la enterocolitis preoperatoria, las irrigaciones rectales también son eficaces para la prevención de la forma postoperatoria. Marty y cols, reportaron una reducción tanto de la incidencia (7,5% *vs* 35,8%) como de la gravedad de HAEC en 40 niños que recibieron irrigaciones rectales postoperatorias programadas. Núñez y cols, en 2005, comunicaron resultados similares, iniciando las irrigaciones una o dos semanas después de la intervención y manteniéndolas dos veces al día durante tres meses, y posteriormente a diario en los siguientes tres meses.

Una vez ya establecida, los casos leves de HAEC suelen responder a modificaciones de la dieta y descompresión del intestino mediante irrigaciones rectales. En pacientes con cuadros moderados se debe añadir a lo anterior terapia de descontaminación intestinal. En casos severos puede ser necesaria la antibioterapia intravenosa, el reposo digestivo y las irrigaciones rectales siempre que no haya riesgo de perforación del recto (Burkardt y cols, 2014). En pacientes con enterocolitis recurrentes la inyección intraesfintérica de toxina botulínica se ha mostrado eficaz (Han-Geurts y cols, 2014). Así mismo, en casos de DS asociados a HSCR y HAEC de repetición, la administración de cromoglicato sódico puede ser de gran utilidad (Rintala y Lindahl, 2001).

1.2.13. Perspectivas futuras de tratamiento

Los enormes avances en biología molecular y genética de la última década han aumentado significativamente nuestro conocimiento acerca del desarrollo y funcionamiento del SNE. Estas técnicas, combinadas con los progresos en los campos de la farmacología y la biología con células madre, han permitido la identificación de nuevas herramientas y dianas terapéuticas dirigidas a reemplazar componentes ausentes o defectuosos del SNE.

Varios grupos investigan el tratamiento de HSCR mediante células madre. Metzger y cols, demostraron que las biopsias endoscópicas del intestino postnatal pueden proporcionar una fuente viable de células

madre para futuras terapias de HSCR (Metzger y cols, 2009). Hotta y cols (Melburne, 2013), han trasplantado neuroesferas generadas a partir de células derivadas de la CN del intestino fetal y postnatal en el colon de ratones observando que migran, proliferan y generan neuronas y células gliales que forman grupos ganglionares dentro del colon trasplantado. Las neuronas injertadas exhiben características neuroquímicas, electrofisiológicas y morfológicas similares a las de las neuronas entéricas; reciben entradas sinápticas, y sus neuritas se proyectan a las capas musculares y a los ganglios entéricos de los ratones receptores. Estos resultados, y los obtenidos recientemente por el mismo grupo de trabajo respecto al trasplante autólogo de progenitores en ratones (Hotta y cols, 2013 y 2016), muestran que las células progenitoras neurales entéricas trasplantadas pueden generar neuronas funcionales en el intestino postnatal y hace avanzar la noción de que la terapia celular es una estrategia prometedora para el tratamiento de HSCR y de otras neuropatías entéricas.

1.2.14. Escalas relacionadas con HSCR

En últimos años se han validado varias escalas para el estudio de HSCR. Así, en 2006, Guo y cols, diseñaron una escala para el diagnóstico neonatal de esta enfermedad; en el 2009, Pastor y cols, publicaron una escala para definir HAEC y posteriormente, Wu y cols, elaboraron otra para diferenciar HSCR de otros desórdenes del SNE (Guo y cols, 2006; Pastor y cols, 2009; Wu y cols, 2013). Recientemente se ha publicado un sistema de puntuación que determina la probabilidad de HSCR en pacientes sospechosos a partir de los hallazgos del EC (Alehossein y cols, 2015). Sin embargo, hasta el momento, no se ha propuesto ninguna escala clínica con valor pronóstico.

1.2.15. Correlación genotipo-fenotipo

Si bien se han reportado más de 100 mutaciones en *RET* con potencial para producir HSCR, la correlación precisa entre el fenotipo molecular y la gravedad de los síntomas no está esclarecida (Amiel y cols, 2008; Moore, 2012d). De hecho, tanto el fenotipo, su incidencia, la longitud del aganglionismo, así como el riesgo de asociarse a otras patologías, varía entre pacientes HSCR portadores de idénticas mutaciones (Amiel y cols, 2008).

Se sabe que tanto variantes raras como comunes de *RET* tienen un papel en la patogénesis de la enfermedad, si bien las variantes comunes están fuertemente asociadas con las formas más frecuentes de HSCR (formas esporádicas de S-HSCR en varones) y las variantes raras con mayor frecuencia se encuentran en formas más graves de la enfermedad (formas familiares de L-HSCR o TCA en mujeres) (Emison y cols, 2010; So y cols, 2011).

Por otra parte, el análisis de las mutaciones en *SOX10* y el fenotipo al que se asocian han mostrado una correlación entre la localización específica de la mutación en la secuencia de *SOX10* y la longitud del segmento agangliónico. La proteína *SOX10* presenta diferentes dominios funcionales esenciales para su correcta actividad. Las mutaciones descritas en *SOX10* son en su mayoría mutaciones truncantes, que normalmente producen la pérdida del dominio de transactivación y en algunas ocasiones incluso del dominio HMG (Pingault y cols, 2010). Aquellas mutaciones que se encuentran a lo largo del dominio HMG dan como resultado proteínas mutantes que se distribuyen parcialmente a nivel citoplasmático y/o subnuclear, y que en la mayoría de los casos pierden su capacidad de unión a dianas específicas en el tejido (Chaoui y cols, 2011). Así, mutaciones que afectan al dominio de unión a ADN, conducen a HSCR de

segmento corto, mientras que mutaciones en el dominio de transactivación llevan a una aganglionosis total del colon o a HSCR segmento largo (Sham y cols, 2001).

La mayoría de las mutaciones puntuales en *SOX10* asociadas a HSCR se encuentran en el exón 5 (Bondurand y cols, 2007) y parecen conducir a una reducción del número de precursores neuronales (haploinsuficiencia) que colonizan el intestino.

Por último, aquellas mutaciones puntuales o deleciones grandes localizadas mayoritariamente en los dos últimos exones del gen, son responsables del fenotipo observado en los pacientes con WS4, de su variante neurológica PCWH, del WS tipo 2 y del síndrome de Kallmann (Pingault y cols, 1998, Inoue y cols, 2004, Bondurand y cols, 2007, Pingault y cols, 2013).

1.2.16. Asesoramiento genético en HSCR

El asesoramiento genético en el caso de enfermedades de herencia mendeliana, en las que el riesgo de recurrencia para familiares de individuos afectados depende del grado de parentesco y del patrón de herencia de la enfermedad, es una práctica clínica relativamente sencilla y pragmática. Sin embargo, la mayor parte de enfermedades humanas tienen un patrón de herencia complejo y multifactorial, en los que la expresión de la enfermedad depende de la concurrencia de pequeñas diferencias alélicas en más de un gen que actúan de manera aditiva (Carter, 1969).

HSCR es un claro ejemplo de esta situación, en la que el asesoramiento genético resulta un reto para el genetista clínico. Teniendo en cuenta el complicado proceso que tiene lugar para controlar la formación del SNE, podemos asumir que alteraciones en cualquiera de los genes que codifican las moléculas señalizadoras implicadas en el mismo podrían interferir con el proceso de migración o diferenciación de los precursores neurales del SNE y suponer una causa potencial de aganglionismo. Por lo tanto, el fenotipo HSCR puede aparecer por una mutación patogénica severa en uno de los genes que codifique moléculas cruciales para la formación del SNE, o bien por la suma de una serie de variaciones menos graves en uno o varios genes, o por la combinación de ambos fenómenos. En estos casos, el riesgo de recurrencia no es una propiedad de ningún gen en particular sino que se trata de una propiedad emergente del fondo genético del individuo y particularmente del genotipo de varios *loci*, haciendo muy complicado el asesoramiento genético. Esto, unido a la escasa correlación genotipo-fenotipo conocida hasta el momento, hace que el estudio molecular no se realice de forma habitual en la mayoría de los países (Amiel y cols, 2008). Sin embargo, resulta muy recomendable ofrecer a las familias de pacientes HSCR información sobre el riesgo de recurrencia de la enfermedad, basados en los datos de recurrencia observados en series muy extensas de pacientes (Amiel y cols, 2008).

De todos los genes descritos, *RET* es el principal gen de susceptibilidad, representando el 80% de las mutaciones encontradas en pacientes HSCR, incluyendo variantes tanto a nivel de secuencia codificante como no codificante. Además del interés del asesoramiento genético, el estudio molecular de *RET* resulta necesario ya que alrededor del 2,5-5% de los pacientes HSCR tienen una mutación en *RET* que predispone a MEN2A o FMTC, estando indicada en estos casos la tiroidectomía profiláctica (Moore y cols, 2008b; Virtanen y cols, 2013). En la mayoría de esos casos en los que co-segregan MEN2A y HSCR, las mutaciones se localizan en el exón 10 de *RET* (codones Cys609, Cys611, Cys618 y Cys620) y originan la

sustitución de una cisteína por otro aminoácido en el dominio extracelular de la proteína. Se ha propuesto para esas mutaciones un efecto dual sobre la proteína RET en el mismo paciente. Por una parte originarían una pérdida de expresión del receptor a nivel de la membrana celular durante los estadios iniciales del desarrollo embrionario, lo que daría lugar al fenotipo HSCR. Por otra, en la etapa adulta, ocasionaría una ganancia de función del receptor (activación), lo que conduciría a una anormal proliferación celular y a los procesos neoplásicos (Bütter y cols, 2007; Moore y Zaahl, 2008a). La asociación HSCR/MEN2A ha sido reportada en más de 25 familias (Skába y cols, 2006; Virtanen y cols, 2013). En base a esto, se recomienda el estudio molecular de este gen en todos los pacientes HSCR, especialmente los exones 10, 11 y 13. Esto facilita la detección de portadores de mutaciones con riesgo de FMTC permitiendo un manejo correcto de estos pacientes (Skába y cols, 2006).

Respecto a *EDN3*, el número de mutaciones descritas en su secuencia como responsables del fenotipo HSCR aislado es minoritario (Bidaud y cols, 1997), siendo más prevalentes en casos sindrómicos (WS4) (Hofstra y cols, 1996; Bolk y cols, 1996; Ederly y cols, 1996; Pingault y cols, 2001; Sánchez-Mejías y cols, 2010a). En cambio, el rastreo mutacional de *EDNRB* en pacientes HSCR esporádicos revela la presencia de mutaciones en aproximadamente un 5-7% de los pacientes HSCR, dando lugar a una pérdida de función del receptor de endotelinas (Amiel y cols, 2008). La penetrancia para las mutaciones encontradas en heterocigosis tanto en *EDN3* como *EDNRB* es incompleta y el fenotipo predominante es S-HSCR. Generalmente, mutaciones en heterocigosis dan lugar a la aparición de HSCR aislado mientras que aquellas que se encuentran en homocigosis o heterocigosis compuesta se relacionan con WS4 (Attíe y cols, 1995; Ederly y cols, 1996; Hofstra y cols, 1996; Verheij y cols, 2002).

En el caso del gen *SOX10*, se han descrito mutaciones en diferentes escenarios: WS2 (sin alteraciones gastrointestinales), formas familiares y esporádicas de WS4 y pacientes que además de alteraciones propias de WS4 presentan desórdenes neurológicos debidos a desmielinización central y periférica conocidas como PCWH (Inoue y cols, 1999, Southard-Smith y cols, 1999, Touraine y cols, 2000, Sham y cols, 2001, Verheij y cols, 2006, Shimotake y cols, 2007, Bondurand y cols, 2007). También se ha descrito una mutación truncante en un paciente HSCR sin ningún síndrome adicional (Sánchez-Mejías y cols, 2010c).

De forma global, los casos esporádicos y aislados de HSCR responden a un patrón de herencia no mendeliano con baja penetrancia, expresividad variable y modificada por el sexo (Amiel y cols, 2008; Tam y García-Barceló, 2009). El riesgo de recurrencia entre hermanos del probando se estima en un 4% (riesgo relativo = 200), pero varía según la longitud del segmento agangliónico y del sexo del paciente y de sus hermanos (1-33%). En las formas S-HSCR el riesgo de recurrencia para hermanos e hijos del paciente está en torno al 1-5%. En el caso de las formas L-HSCR, el riesgo de recurrencia para hermanos está estimado entre el 9-33% (Amiel y cols, 2008, Tabla 1.8). Así, el mayor riesgo de recurrencia sería para hermanos varones de pacientes mujeres L-HSCR (33%), mientras que el menor riesgo sería para hermanas de pacientes S-HSCR varones (1%).

En otros casos, HSCR puede comportarse como una enfermedad mendeliana. Esto ocurre tanto en los casos familiares, en los que se han descrito patrones tanto autosómico dominante como recesivo, co-

mo en los sindrómicos, en los que la participación de un número reducido de genes ha sido demostrada, como es el caso de WS4 o CCHS.

Tabla 1.8: Epidemiología y riesgo de recurrencia de HSCR.

Variable	L-HSCR	S-HSCR
% Probandos	19	81
Ratio Sexo (hombre:mujer)	1,75	5,5
Modelo Genético	Dominante	Multifactorial o recesiva
Penetrancia (%) (hombre:mujer)	52:40	17:4
Riesgo de recurrencia para hermanos * (%)		
Hombre afectado	17/13	5/1
Mujer afectada	33/9	5/3

Riesgo relativo=200, *Riesgo de recurrencia para hermanos del probando hombre/mujer respectivamente (Amiel y cols, 2008).

2. Hipótesis de trabajo y objetivos del estudio



2.1. Hipótesis de trabajo

HSCR o megacolon agangliónico es una anomalía congénita originada por un fallo en la migración de las células de la CN para colonizar el tubo digestivo durante la neurogénesis, proceso que tiene lugar entre la 7ª y la 12ª semana del desarrollo embrionario. Es por tanto una neurocristopatía que se caracteriza por la ausencia de células ganglionares en los plexos entéricos de un segmento del intestino, desde el EAI a zonas más proximales del mismo, describiéndose varios fenotipos según la longitud del segmento agangliónico a partir del recto.

La ausencia de células ganglionares produce una pérdida de motilidad en el segmento afectado y una ausencia de relajación del EAI, ocasionando una obstrucción intestinal funcional de intensidad variable, que depende de la extensión del aganglionismo y del grado de espasmo del segmento agangliónico, entre otros factores. En el 80-90% de los casos HSCR se manifiesta en el recién nacido con retraso en la evacuación de meconio, distensión abdominal, vómitos o episodios de obstrucción intestinal. Sin embargo, aproximadamente el 10% de los pacientes no debutan en el período neonatal, manifestándose más tarde, en el lactante, niño mayor o incluso en el adulto. En estos casos se presenta en forma de estreñimiento crónico, desnutrición, enterocolitis o cuadros recurrentes de suboclusión intestinal.

HSCR representa por tanto un espectro malformativo con diferente expresividad clínica. Así, existen formas de presentación clínica no grave, que pueden ser manejadas con tratamiento conservador hasta la cirugía definitiva y otras graves que precisan una derivación intestinal en los primeros meses de vida y una hospitalización prolongada. Identificar precozmente a los pacientes con mayor riesgo de padecer una forma clínica de comportamiento grave resultaría útil para prevenir complicaciones y disminuir la morbi-mortalidad global de esta entidad.

Hasta el momento no disponemos de herramientas que nos permitan predecir el comportamiento de HSCR. Nuestra primera hipótesis de trabajo defiende que a través de la combinación de datos clínicos disponibles al diagnóstico y señalados en la literatura como responsables de la gravedad (antecedentes familiares de HSCR, malformaciones o síndromes asociados, retraso meconial, debut en forma de enterocolitis, hipertonía anal manifiesta, fracaso del tratamiento médico preoperatorio, aganglionismo de segmento largo y microcolon radiológico), podemos elaborar una escala capaz de predecir el comportamiento de la enfermedad al diagnóstico. Por otro lado, se ha comunicado una mayor incidencia de mutaciones genéticas en los pacientes con aganglionismo extenso, pero poco se conoce sobre la correlación clínico-genética en esta entidad. Nuestra segunda hipótesis de trabajo apoya la existencia de una correlación genotipo-fenotipo, es decir, que los pacientes con mayor gravedad clínica, independientemente de la extensión del aganglionismo, tienen con mayor frecuencia, mutaciones en la región codificante de genes con un papel clave en el desarrollo del SNE.

2.2. Objetivos del estudio

2.2.1. Objetivos principales

2.2.1.1. Diseñar una escala que permita identificar precozmente a los pacientes con riesgo de presentar una enfermedad de comportamiento grave.

2.2.1.2. Estudiar si existe una relación entre los pacientes clasificados como graves por la escala y la presencia de mutaciones en los genes analizados.

2.2.1.3. Profundizar en el conocimiento de aspectos genéticos de HSCR que puedan justificar las diferencias en la expresividad clínica.

2.2.2. Objetivos secundarios

2.2.2.1. Describir las características clínicas de los pacientes de nuestra serie con diagnóstico de HSCR aislado y HSCR sindrómico, con especial interés en WS4.

2.2.2.1. Identificar, a través del rastreo mutacional del proto-oncogén *RET*, mutaciones que predisponen al desarrollo de MEN 2 en los pacientes de nuestra serie o sus familiares.

2.2.2.2. Aportar nuevas mutaciones causantes de HSCR no descritas hasta el momento.

2.2.2.3. Proporcionar asesoramiento genético a las familias analizadas, intentando establecer el tipo de herencia y el riesgo de recurrencia de la enfermedad.

3. Pacientes y métodos



3.1. Pacientes HSCR

3.1.1. Criterios de inclusión

El presente proyecto de tesis ha incluido 42 pacientes diagnosticados de HSCR en el Complejo Hospitalario Universitario de Badajoz entre 1983 y 2013, centro de referencia para el tratamiento de esta entidad en la Comunidad Autónoma de Extremadura.

Todos los individuos participantes han firmado un consentimiento informado (Anexo 1) siguiendo las normas de protección de los sujetos humanos contenidas en la declaración de Helsinki, así como lo estipulado en la Ley de Investigación Biomédica (Ley 14/2007, del 3 de Julio de 2007). Así mismo, todos los estudios han sido aprobados por el Comité de Ética e Investigación Clínica del Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla y el Complejo Hospitalario Universitario de Badajoz (Anexo 2).

Los pacientes fueron evaluados por un pediatra y un cirujano pediátrico completándose el protocolo de estudio habitual ante la sospecha de HSCR, que incluye la realización de:

- Historia clínica y exploración física
- Estudio radiológico mediante EC
- Registro manométrico anorrectal
- Estudio anatomopatológico

- Estudios de genética clínica mediante la realización del árbol genealógico, valoración de la transmisión familiar, clasificación de los sujetos en riesgo, análisis de la heterogeneidad clínica intra y extrafamiliar y extracción protocolizada de muestras de sangre del paciente índice y de sus familiares para el estudio.

Se diseñó un estudio observacional retrospectivo, recogiendo las siguientes variables: sexo, peso al nacimiento, edad gestacional, edad al diagnóstico, antecedentes familiares de HSCR, síndromes o malformaciones asociadas, evacuación de meconio, debut clínico, exploración rectal, extensión del aganglionismo, efectividad del *nursing*, hallazgos del EC, registro anomanométrico, resultados anatomopatológicos, edad a la intervención, cirugías realizadas y evolución postoperatoria, para la que se investigó la función intestinal a la finalización del estudio (considerándose normal si el paciente controlaba la defecación y estaba libre de síntomas, y alterada en casos de estreñimiento, incontinencia fecal o *soiling*, entre otros).

Para establecer la gravedad, nuestro grupo de trabajo definió unos criterios, valorando la estancia hospitalaria, las cirugías realizadas y la aparición de enterocolitis asociada a HSCR (Tabla 3.1). El diagnóstico de esta entidad se estableció por criterios clínicos (episodios de fiebre, distensión abdominal, diarrea explosiva y mal estado general) si bien un estudio radiológico con datos de obstrucción intestinal y edema de mucosa y una analítica sugestiva de infección, reforzaron la sospecha diagnóstica.

De esta forma, los pacientes fueron divididos en 2 grupos (grave y no grave) según la evolución de la enfermedad. Se excluyeron las cirugías y los días de hospitalización motivados por otras causas.

Tabla 3.1: Criterios que definen en nuestro trabajo el comportamiento grave de HSCR.

Al menos 2 de los siguientes criterios:

1. Necesidad de estoma o de más de 2 cirugías.
2. Diagnóstico de al menos un episodio de enterocolitis asociada a HSCR (HAEC) según criterios clínicos (Pastor y cols, 2009).
3. Hospitalización prolongada en relación con la enfermedad (≥ 100 días en los primeros 2 años tras el diagnóstico).

3.2. Individuos control

El grupo control empleado en el presentado trabajo estuvo constituido por 200 individuos sanos no relacionados, sin antecedentes personales o familiares de enfermedad genética, alteraciones entéricas o neurocristopatías, y se utilizó para comprobar si una nueva variante encontrada mediante el rastreo de la secuencia codificante de un gen era una mutación o un polimorfismo común.

3.3. Métodos

3.3.1. Diseño de una escala para identificar la gravedad de HSCR

Con el propósito de evaluar la gravedad de HSCR al diagnóstico, se elaboró una escala como herramienta de clasificación objetiva. La escala que a continuación desarrollamos podría ser clasificada como una escala de enfermedad y puntuación ascendente, donde el valor 0 indicó la mejor situación del paciente para una determinada variable, y puntuaciones superiores fueron indicativas de situaciones más desfavorables hasta un máximo de 2-4 puntos según el ítem considerado (metodología Likert).

3.3.2. Descripción de los ítems puntuados en la escala de gravedad de HSCR

Aunque se conocen algunos de los factores que empeoran el pronóstico global de HSCR, como la afectación extensa del aganglionismo y las malformaciones asociadas (Pini Prato y cols, 2011), su gravedad a menudo es difícil de predecir en el momento del diagnóstico. Tras analizar los factores que se discuten en la literatura como condicionantes de mal pronóstico elaboramos una escala clínica (2-20 puntos) destinada a reconocer precozmente las formas más graves de la enfermedad, optimizar su tratamiento y prevenir sus complicaciones. Los ítems puntuados en la misma se detallan a continuación:

1) Antecedentes familiares de HSCR:

Los casos esporádicos y aislados de HSCR responden a un patrón de herencia no mendeliana con baja penetrancia, que además es dependiente del sexo y presenta expresión variable. De forma global, el riesgo de recurrencia para hermanos del probando se estima en un 4%, pero varía según la longitud del segmento agangliónico y el sexo del probando, así como el sexo de los hermanos (Amiel y cols, 2008). Se ha estimado que aproximadamente el 5% de los hermanos y el 1-3% de las hermanas de pacientes S-HSCR tienen también la enfermedad. En el caso de L-HSCR, los porcentajes de riesgo de recurrencia para hermanos oscilan entre el 17- 33% y entre el 9-13% para las hermanas del probando. Los antecedentes familiares se consideran un factor de riesgo de enterocolitis (Engum y cols, 1993; Frykman y Short, 2012), por lo que este factor añade morbilidad a la enfermedad. Por todo ello, hemos considerado el papel de la transmisión familiar y el aumento de riesgo de recurrencia en familiares de individuos afectados puntuando en nuestra escala clínica la presencia de antecedentes familiares de primer y de segundo grado.

2) Síndromes/otras malformaciones asociadas:

El 30% de los pacientes con HSCR presenta algún tipo de comorbilidad, ya sea una cromosomopatía (12% de los casos) o bien alguna malformación asociada (18%), tales como malformaciones gastrointestinales, fisura palatina, polidactilia, defectos del septo cardíaco y anomalías cráneo-faciales (Amiel y cols, 2008). Sin embargo, no todas ensombrecen por igual el pronóstico global de la enfermedad. Por el aumento de riesgo de enterocolitis grave y la inferioridad de sus resultados postoperatorios, hemos considerado como más grave el aganglionismo en contexto de DS (Menezes y Puri, 2005; Catto-Smith y cols, 2006; Friedmacher y Puri, 2013b), seguido del que aparece asociado a una neurocristopatía u otro síndrome y por último, el que cursa con otras malformaciones asociadas.

3) Evacuación de meconio:

Entre el 80 y el 95% de los recién nacidos sanos a término evacúan meconio en las primeras 24 horas de vida, llegando este porcentaje hasta el 99% en las primeras 48 horas (Clark, 1977; Bekkali y cols, 2008; Okoro y Enyindah, 2013). Por el contrario, menos del 10% de los pacientes HSCR expulsan meconio en las primeras horas (Núñez y cols, 2009a). Por tanto, nuestra escala no ha puntuado a la minoría de pacientes con antecedente de evacuación de meconio en el primer día de vida, recibiendo hasta un máximo de 2 puntos los que presentan ausencia de meconiorrexis espontánea a las 48 horas de vida.

4) Debut clínico:

La obstrucción intestinal neonatal es la forma de presentación más frecuente en el recién nacido y lactante pequeño (Haricharan y Georgeson, 2008a). Hasta un 44% pueden debutar en forma de enterocolitis grave, presentando diarrea explosiva, fiebre e importante distensión abdominal. Si no es adecuadamente identificado y tratado, este cuadro puede evolucionar hacia megacolon tóxico o perforación intestinal. Esta es la forma de presentación más grave de la enfermedad y a la que hemos atribuido una mayor puntuación.

En el otro extremo, HSCR puede manifestarse en el niño mayor o incluso en el adulto en forma de estreñimiento de evolución tórpida (Qiu y cols, 2013). Dado que el estreñimiento es frecuente en la infancia (Chogle y cols, 2016) en ocasiones puede ser difícil identificar a estos pacientes, siendo fundamental recoger una adecuada historia clínica (evacuación de meconio, edad de comienzo de la clínica) y exploración física (desarrollo ponderoestatural, distensión abdominal, exploración rectal), que permitan diferenciarlo del estreñimiento funcional.

5) Exploración rectal:

La exploración digital del CA permite valorar indirectamente la longitud del segmento agangliónico. Hemos atribuido la mayor puntuación a las exploraciones que revelaron la existencia de una ampolla vacía o un esfínter muy hipertónico (Guo y cols, 2006) e intermedia a las que revelaron una ampolla adherente o se siguieron de deposición explosiva, reflejo de que a través de la exploración digital se logró superar el espasmo correspondiente a la zona agangliónica.

6) Efectividad del tratamiento médico preoperatorio (*nursing*):

La irrigación rectal o *nursing* ha sido descrito como un método seguro y eficaz en el manejo preoperatorio de estos enfermos (Núñez y cols, 2009b). Los objetivos fundamentales de este tratamiento son: disminuir el riesgo de enterocolitis, reducir la distensión del colon y evitar la realización de una ostomía hasta el momento de la cirugía definitiva. Nuestro grupo de trabajo ha considerado predictor de enfermedad de curso clínico no grave el manejo satisfactorio del paciente mediante irrigaciones rectales, sin precisar estoma en los primeros momentos tras el diagnóstico.

7) Extensión del aganglionismo:

En la escala que presentamos se ha empleado la clasificación más frecuentemente utilizada de HSCR en forma ultracorta, S-HSCR, L-HSCR y TCA. Cada paciente fue asignado a una de ellas en función de la sospecha inicial, ya que en todos los casos la extensión definitiva se estableció a través de las biopsias intraoperatorias. Recibe la puntuación máxima el TCA (que se extiende desde el ano hasta al menos la válvula ileocecal pero no más de 50 cm proximal a la misma) al que se atribuye una alta morbilidad y peor pronóstico funcional a largo plazo (Moore, 2015).

8) Enema de contraste:

Los hallazgos del EC en HSCR son bien conocidos. Entre ellos destacan la identificación de la ZT, la presencia de un índice rectosigmoideo anormal, la contracción irregular del colon y el retraso en la evacuación del contraste en la radiografía abdominal de control a las 24 horas (Langer, 2013). Hemos atribuido la mayor puntuación en la escala a la presencia de un microcolon, colon espástico o disminuido de calibre, datos presentes con frecuencia en los casos de aganglionismo extenso (Stranzinger y cols, 2008). La ZT es un marcador radiológico clásico de S-HSCR, sin embargo, la concordancia de la ZT radiológica y la histológica es variable según los estudios (Frongia y cols, 2016), especialmente en los aganglionismos extensos, y por ello ha recibido una puntuación intermedia en nuestra escala.

3.3.3. Metodología del estudio genético

Hasta la finalización de los distintos estudios incluidos en el presente trabajo, hemos conseguido obtener muestra de ADN genómico de un total de 42 pacientes HSCR recibidos en las consultas de Cirugía Pediátrica, Pediatría y Genética Clínica del Complejo Hospitalario Universitario de Badajoz. De estos pacientes, 40 son esporádicos y los 2 restantes son casos familiares pertenecientes a 2 familias. De esta manera, la tasa de casos familiares registrados en nuestra cohorte hasta el presente momento es de un 4,7%. Además, en 35 casos pudimos disponer del ADN germinal de los progenitores completando así los tríos HSCR (Afecto-Padre-Madre) y en 4 casos más, de ADN materno.

Se rastrearon los genes *RET*, *EDNRB*, *EDN3* en todos los casos y *SOX10* en pacientes seleccionados con sospecha de WS4 (3 casos de los 42 casos). Las secuencias de referencia de estos genes se obtuvieron de la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* NCBI Reference Sequence (RefSeq; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>). El rastreo de mutaciones puntuales se efectuó mediante la técnica dHPLC sobre los productos de PCR de cada uno de los exones codificantes de los genes en estudio (secciones 3.3.3.2 y 3.3.3.4). Para la caracterización de los cambios de secuencia detectados se aplicó la secuenciación Sanger (sección 3.3.3.5). En cuanto al rastreo de grandes deleciones y/o duplicaciones de

uno o varios exones de los genes testados, se aplicó la técnica MLPA (sección 3.3.3.6). Finalmente, para la genotipación en los pacientes y sus familiares de la variante intrónica c.73+9277T>C de *RET*, fuertemente asociada a la aparición de la enfermedad, se aplicó la tecnología Taqman (sección 3.3.3.7).

3.3.3.1. Extracción y espectrofotometría de ADN

La extracción del ADN genómico se ha realizado a partir de una muestra de sangre periférica de los pacientes, familiares relacionados y controles. Esta se ha efectuado de forma automática con el equipo MagNA Pure LC 1.0 (Roche Diagnostics) que realiza la extracción de ácidos nucleicos mediante bolas magnéticas combinado con el conjunto de tampones específicos del MagNA Pure LC DNA Isolation Kit-Large Volume (Roche Diagnostics). Así, a partir de 1 ml de sangre periférica se obtienen 200 μ l de ADN puro a una concentración aproximada de 100 ng/ μ l. Una vez obtenido el ADN y con el fin de confirmar la concentración del mismo y determinar su pureza usamos el sistema de espectrofotometría NanoDrop 8000 (Thermo Scientific). Este aparato nos permite medir la densidad óptica a 260 nm y 280 nm. La primera nos indica la concentración de ADN (siendo 1 el equivalente a 50 ng/ μ l) y la segunda la de proteínas. De esta forma, el cociente entre ambas nos da una estimación de la pureza de la muestra, debiendo estar este valor entre 1,6 y 2.

3.3.3.2. Amplificación de ADN genómico mediante PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) es un método rápido de amplificación *in vitro* de secuencias de ADN específicas dentro de una muestra. La reacción se diseña para permitir la amplificación selectiva de una o varias secuencias específicas de ADN presentes en una mezcla compleja de secuencias. Para llevar a cabo la amplificación de un fragmento específico de ADN es necesario conocer las secuencias flanqueantes a la región de interés, las cuales nos van a aportar la información necesaria para el diseño de los cebadores o *primers*. Dichos cebadores son secuencias cortas de ADN, de unas 15 a 30 bases complementarias a cada una de las cadenas de la región que se quiere amplificar. También son necesarios los desoxinucleótidos, dATP, dCTP, dGTP y dTTP, que actúan como precursores del ADN, así como una ADN polimerasa. La PCR se desarrolla normalmente en tres pasos (Figura 3.1):

1. Desnaturalización: esta fase se realiza a 95°C y en ella tiene lugar la separación de la doble cadena de ADN.

2. Hibridación: es la fase en la que los *primers* se unen específicamente a las cadenas sencillas mediante complementariedad de bases. La temperatura de hibridación es específica de cada fragmento y de los *primers* empleados.

3. Extensión: esta fase se realiza a 72°C y en ella la enzima ADN polimerasa incorpora los dNTPs disponibles en la solución y extiende la hebra que se está sintetizando. Después de cada ciclo se obtiene como resultado la duplicación de la secuencia de ADN diana. Dado que las nuevas copias también sirven como moldes en los siguientes ciclos, la cantidad de ADN generado se incrementa de forma exponencial. De este modo, al final de n ciclos el número de copias de ADN por cada molécula será de 2ⁿ.

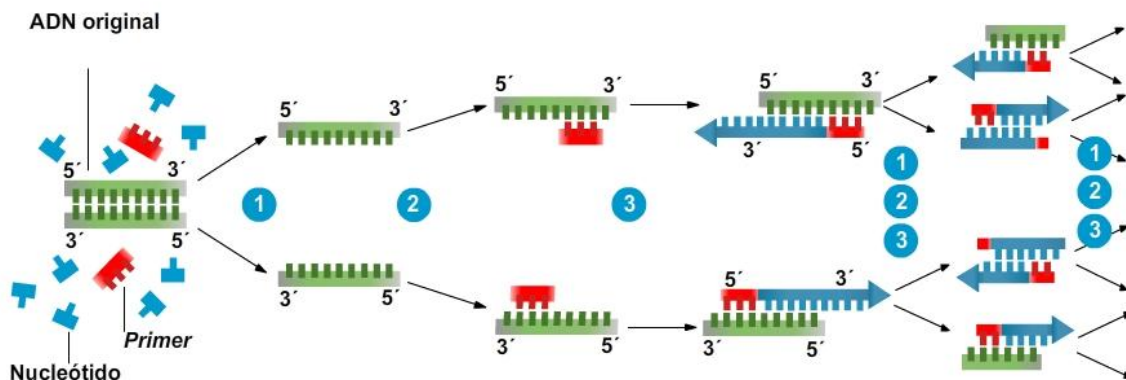


Figura 3.1: Amplificación de ADN genómico mediante PCR.

Las condiciones de amplificación de cada fragmento dependen de la naturaleza del mismo (tamaño, contenido en GC, etc). No obstante, las condiciones experimentales de PCR más frecuentemente utilizadas en este proyecto se detallan a continuación. La química general utilizada en la PCR se muestra en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2: Condiciones generales usadas para la amplificación de fragmentos específicos mediante PCR.

Reactivos	Cantidad
ADN genómico*	10-25 ng
dNTPs (Roche Diagnostics)	200 μ M/cada uno
Tampón de PCR 10x (Roche Diagnostics)	1X
Cl ₂ Mg (Roche Diagnostics)	3 mM
Solución de cada <i>primer</i> **	0.2 μ M
Taq ADN polimerasa (Roche Diagnostics)	1U
H ₂ O csp	25 μ l

*10ng de ADN genómico humano equivalen a 7500 copias de cualquier segmento monocopia (Innis y Gelfand, 1990).

**Los *primers* han sido suministrados por Sigma-Aldrich.

Las condiciones de amplificación generales son las siguientes: (95°- 5') \rightarrow [(95°-30'') \rightarrow (TaH-30'') \rightarrow (72°-30'')] x 35 \rightarrow (72°-7'). Para llevar a cabo la amplificación de los distintos fragmentos mediante PCR se utilizaron los termocicladores PTC-100™ (MJ Research), Biometra® T^{GRADIENT} (Whatman Biometra), 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems) y DNA Engine Tetrad 2 (BioRad) (Ruiz-Ferrer y cols, 2006; Sánchez-Mejías, 2010a; Sánchez-Mejías y cols, 2010c). Las secuencias de los *primers* utilizados para la amplificación de los exones codificantes de los genes analizados se muestran a continuación (Tablas 3.3-3.6). Así mismo se indican las secuencias de referencia de los genes sobre las que se ha trabajado (RefSeq).

Tabla 3.3: Condiciones de amplificación de los exones de *RET* (RefSeq NM 020975).

Exón	Secuencia <i>Forward</i> (5'-3')	Secuencia <i>Reverse</i> (5'-3')	Tamaño (pb)	TaH (°C)
1	CTAGCCGCAGTCCCTCCA	ACAGAAAGGCGATTCTGAAC	206	64
2	CCTTATTCTCACCATCCCTC	AGTGTACAGCGGCTGTGATAA	387	56
3	CCCCACAGACCTGACTTCTCT	AAGACCAGCAGTAGCAGGCA	375	57
4	GCCCTGTCTGCTTGGTGC	GGACACTAAACCGACCGAG	342	64
5	ACTGACCAACGCCCTCTGC	GCACCTCATTTCTGGGGG	275	57
6	ATTGTTGTGCCCTACCTG	CCCCAGACAGGCAATAGGTA	285	57
7	TCTACCCTCAGGCCATTACA	AACCATTTACTGCTGGGTCA	483	57
8	TGGTGTCTGTCCCTGTCC	CCACCGGTGCCATCGCCCCCT	262	57
9	AGCCTGTCTGTGTCTCTGTG	CCATGCCCTGATTAACCCCT	160	59
10	GCGCCCAGGAGGCTGAGTG	GGTGGTGGTCCCGGCCGCC	186	61
11	TGCCAAGCCTCACACCAC	TCCCTCCCTGGAAGGCAG	349	64
12	TTCTTCCTCCCCTGTCATCCT	TCTTCAGGGTCCCATGCTG	307	59
13	GCAGGCCTCTCTGTCTGAACTT	GGAGAACAGGGCTGTATGGA	296	57
14	AAGACCCAAGCTGCCTGAC	GCTGGGTGCAGAGCCATAT	295	64
15	GTCTCACCAGGCCGCTAC	ATGGTGCACCTGGGATCCCT	292	57
16	AGGGATAGGGCCTGGCCTTC	TAACCTCCACCCCAAGAGAG	192	57
17	CACTGGTCCTTTCACTCTCT	GGGAGGGAATGCACACAGAT	231	59
18	TGTGGTGGGCTGTCTTCTG	CTGGGGTGGAGCTGGAGTCT	235	63
19	AGTGACCGCCATCTCTGT	ATAGTGCAAAGGGGACAGC	229	57
20	AGTTTTGGTTCTTCAGTGC	GACTTTCCATTCTCAGCAT	266	57
21	GCTTCTTGTCATTCTTCATTGC	CTTGGCCTCACAAAATGC	268	61
Intrón	Secuencia <i>Forward</i> (5'-3')	Secuencia <i>Reverse</i> (5'-3')	Tamaño (pb)	TaH (°C)
1*	TCTGAGTCACTGCCTTGCTG	AGTTGCTTCCGGCTTCTATG	289	60

*Fragmento de intrón 1 donde se ubica la variante del dominio enhancer de *RET*, c.73+92771>C.

TaH: Temperatura de hibridación.

Tabla 3.4: Condiciones de amplificación de los exones de *EDNRB* (RefSeq NM 000115).

Exón	Secuencia <i>Forward</i> (5'-3')	Secuencia <i>Reverse</i> (5'-3')	Tamaño (pb)	TaH (°C)
1A	AGCTGACCCAAGTGTCTCTGT	CACAAGGCAGGACACAACC	428	57
1B	ATGACGCCACCCACTAAGAC	TTCTCATCTCCCCGTCTCC	418	57
2	AACCCCTAACAGAGCTTCG	GCTGGCATACTTAGTTTTATTGAA	254	57
3	TTGTATTTAAGCTGGCATACTT	GGGGAACAGGGGAAAAATAG	320	57
4	TGTTTCAAGTAAGTGTGGCCTGA	CAAGAAAAAGGAAATATGCTCTGG	432	57
5	TGCTATGAGTAAAATGAGCCATC	AAGATCGATGGAAACACTTCTGA	254	57
6	TTTCCTTACAAAAGCACAGAAGC	TTTTGAAAGCTTATATTTGAGCCATA	257	60
7	AAGGGCCCAAGAACTCCTAA	TTTGTTTTGGCAAATGTTTCA	328	55

Tabla 3.5: Condiciones de amplificación de los exones de *EDN3* (RefSeq NM 207032).

Exón	Secuencia <i>Forward</i> (5'-3')	Secuencia <i>Reverse</i> (5'-3')	Tamaño (pb)	TaH (°C)
1	GGTGCCTGTGAGTGTG	CGGGCTTTTCTGGCTTCT	395	57
2	CAGTCCAGCCCCTCTGG	CCCTGGGTCTTTTGTGTG	483	61
3	CCCCCTCCTCAGGTGTTT	GCTGGGGTGGAGTGAGGT	403	59
4	TCTCGCTCCACCCCTTG	TCAGCACCTCCTTCTCTGG	396	59
5	AATTTGACACCGAAAAACCA	CAGAGCTACAAGGGATGCAAG	396	59

Tabla 3.6: Condiciones de amplificación de los exones de *SOX10* (RefSeq NM 006941)

Exón	Secuencia <i>Forward</i> (5'-3')	Secuencia <i>Reverse</i> (5'-3')	Tamaño (pb)	TaH (°C)
1A	GTGCCACGTCCTGTCTC	CTGAGCACCTGGCTGACG	400	64
1B	AAGGTCAAGAAGGAGCAGCA	AGACAGTCCCGCTCTGAGGT	373	64
2	GAGTGCTCTGGCATTACAG	CACCCTCAGCTCTGTCATCA	358	63
3A	CACCTGCCTCTAACCTGCCT	CATTGGGCGGCAGGTACT	275	61
3B	TTTGATGTGGCTGAGTTGGA	GCCGAGTAGAGGCCAGAG	398	61
3C	TCAGCCCTCAGGACCCTATT	GGTCATCAGGGCAGTGAGC	350	61

3.3.3.3. Electroforesis en gel y capilar

Tras la finalización de la PCR se puede realizar una electroforesis con el fin de comprobar la correcta amplificación de cada fragmento. Para ello hemos realizado electroforesis en geles de agarosa al 2% con tinción con bromuro de etidio utilizando como referencia los marcadores V y VI de Roche Diagnostics. Alternativamente, hemos utilizado el equipo QIAxcel® (Quiagen) que realiza una electroforesis capilar automatizada y genera una imagen digital de los fragmentos amplificados. El procesado de las muestras se ha realizado en el QIAxcel DNA High Resolution Cartridge (Quiagen) usando el programa OH500 siguiendo las recomendaciones del fabricante.

3.3.3.4. Rastreo de mutaciones mediante dHPLC

Para el rastreo de mutaciones de la secuencia codificante de los distintos genes se ha utilizado la cromatografía líquida de alta resolución desnaturizante (*Denaturing High-Performance Liquid Chromatography*, dHPLC). Este método, basado en la formación de heterodúplexes, es altamente sensible y permite la detección de sustituciones de un único nucleótido, así como pequeñas inserciones y deleciones (Oefner y Underhill, 1998; Marsh y cols, 2001, Figura 3.2). Se inicia con una amplificación del fragmento a estudiar. El producto de PCR se somete a un proceso de desnaturización a 95°C, seguido de una renaturalización descendiendo la temperatura hasta 65°C durante 30 minutos. De esta forma, se favorece la formación de heterodúplexes si existe alguna variación de secuencia entre los dos alelos. La muestra se inyecta en la columna donde se queda retenida por la fase móvil. Dependiendo del apareamiento de los fragmentos, estos tardarán más o menos tiempo en salir de la columna y ser detectados por el sensor de radiación ultravioleta que se sitúa al final de la misma. De esta manera, si no existe ninguna variante de secuencia en la muestra, todos los fragmentos de ADN se encuentran completamente apareados y salen de la columna al mismo tiempo, apareciendo un solo pico en el cromatograma. Sin embargo, si existe alguna mutación o variante de secuencia, aparecen entre dos y cuatro picos.

El proceso se ha realizado siguiendo las instrucciones del fabricante inyectando 5 µL de cada muestra en la columna DNASep® (Transgenomic) con una tasa de flujo de fase móvil de 0,9 mL/min y bajo condiciones de temperatura (específica del fragmento) que permiten la desnaturización parcial del ADN. El análisis se realiza en el sistema WAVE DNA Fragment Analysis (Transgenomic) (Ruiz-Ferrer y cols, 2006; Sánchez-Mejías y cols, 2010b; Sánchez-Mejías y cols, 2010c).

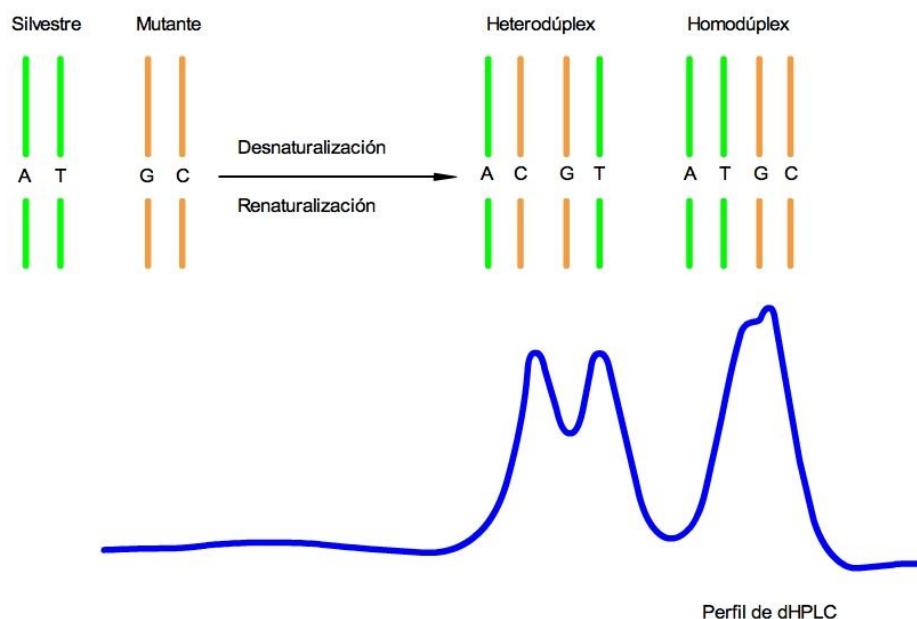


Figura 3.2: Fundamento del dHPLC.

3.3.3.5. Secuenciación automática de los productos de PCR

Para caracterizar los cambios encontrados en los distintos genes analizados mediante dHPLC se ha utilizado la secuenciación automática de ADN (Figura 3.3). Por razones costo-efectivas y de complejidad, esta técnica se ha empleado exclusivamente con el fin de caracterizar las variantes de secuencia en aquellos exones de aquellos pacientes en los que se había observado perfil aberrante por dHPLC, no como técnica de cribado general. Se ha llevado a cabo en el secuenciador 3730 DNA analyzer (Applied Biosystems) dotado de 48 capilares. El proceso de secuenciación comienza con la amplificación por PCR del fragmento de ADN que queremos analizar. Posteriormente, se procede a la purificación del producto utilizando ExoSAP-IT (USB Corporation) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Este proceso consiste en la eliminación enzimática, mediante una exonucleasa y una fosfatasa alcalina, de los cebadores y dNTPs no consumidos en la reacción de PCR.

Una vez obtenido el producto purificado se lleva a cabo la reacción de secuenciación que está basada en el método clásico de terminación de la cadena o método de Sanger, utilizando dideoxinucleótidos marcados como terminadores. Esta se ha efectuado en los termocicladores PTC-100™ (MJ Research) o Biometra® T^{GRADIENT} (Whatman Biometra). Para ello utilizamos el Kit Big Dye^R Terminator Sequencing v.3.1 (Applied Biosystems) con la siguiente química: 1X Big Dye^R Sequencing buffer, 5μM de primer, 1,5 μl de producto de PCR, 0,5 μl de BigDye® Terminator y agua c.s.p. 10 μl. El programa general de secuenciación utilizado fue (96°-3") → [(96°-10") → (50°-5") → (60°-4")] × 35 (Ruiz-Ferrer y cols, 2006; Sánchez-Mejías y cols, 2010b; Sánchez-Mejías y cols, 2010c; Núñez-Torres y cols, 2011).

Posteriormente, procedemos a la purificación de los productos de secuenciación mediante el empleo de las placas AutoSeq96 que contienen Sephadex G-50 prehidratado (EdgeBio). Las muestras una vez purificadas se introducen en el correspondiente dispositivo del secuenciador para proceder a la inyección. La electroforesis se realiza dentro de cada uno de los capilares rellenos del polímero POP7™ (Perfor-

mance Optimized Polymer de Applied Biosystems) bajo las siguientes condiciones: 15 kV de voltaje y 40 minutos, aunque el tiempo de la carrera puede variar en función del tamaño de los productos. La lectura e interpretación de la secuencia se ha realizado con el programa SeqScape v2.5 (Applied Biosystems) que nos permite comparar con la secuencia de referencia obtenida de las bases de datos públicas (RefSeq; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq>).

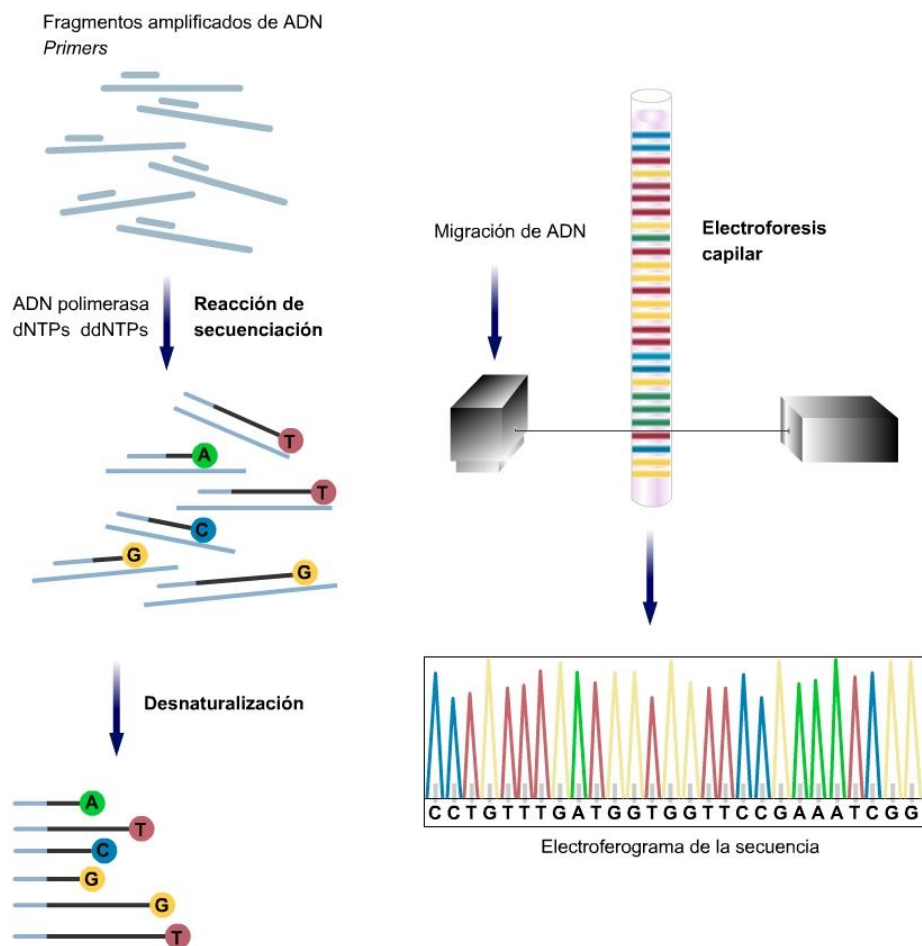


Figura 3.3: Fundamentos del método de secuenciación de Sanger.

Además de los dNTPs propios de cualquier reacción de PCR, esta reacción utiliza también dideoxynucleótidos como terminadores de la síntesis de la cadena complementaria. Cada uno de los dideoxynucleótidos (ddATP, ddCTP, ddTTP y ddGTP) está marcado con un fluorocromo distinto y su unión a la cadena en formación detiene la elongación de la misma. Por tanto, como resultado de esta reacción se obtiene una colección de fragmentos de todos los tamaños posibles abarcados entre el tamaño del *primer*+1pb (correspondiente a la incorporación del terminador en el primer ciclo) y el tamaño total del amplicón. Posteriormente se realiza una electroforesis capilar para separar los fragmentos en función de su tamaño. Durante esta electroforesis se realiza un registro fluorimétrico continuo. Finalmente, la utilización de un software específico permite interpretar los datos de fluorescencia registrados en función del tiempo, y por tanto inferir la secuencia del fragmento. Los resultados se muestran en forma de electroferograma.

3.3.3.6. Rastreo de grandes deleciones/duplicaciones mediante MLPA

La metodología MLPA (*Multiple Ligation-dependent Probe Amplification*) consiste en una PCR múltiple que nos permite detectar una variación en el número de copias en una o varias regiones de ADN. Se basa en la hibridación de sondas por especificidad de secuencia al ADN genómico, su ligación y posterior amplificación de dichas sondas ligadas (Schouten y cols, 2002). El protocolo se ha realizado siguiendo las recomendaciones de MRC Holland que suministró todos los reactivos necesarios para la realización de la

técnica, en la que se emplearon los kits SALSA MLPA P169 (que incluye sondas específicas para *RET* y *EDN3*) y P318 (que incluye sondas específicas para *EDNRB* y *SOX10*) (Núñez-Torres y cols, 2009). Una vez finalizado el proceso, se mezcla 1 μL de producto de MLPA con 0,1 μL de GeneScan™-500LIZ™ Size Standard (Applied Biosystems) y 9 μL de formamida Hi-Di™ (Applied Biosystems) y se desnaturaliza a 95° durante 5 minutos para poder realizar la electroforesis capilar en el secuenciador 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems). Las condiciones de inyección fueron de 1,2 kV de voltaje durante 23 segundos. La electroforesis se llevó a cabo en polímero POP-7™ (Applied Biosystems), bajo un voltaje de 15 kV durante 40 minutos. Los resultados se analizan con el programa GeneMarker v1,75 (Softgenetics) comparando el electroferograma del paciente con el de individuos control. Estos habían sido examinados previamente y no presentaban alteraciones génicas en las zonas a estudiar. Se normalizaron las muestras en función de la altura de los picos y se consideró la dosis génica normal diploide entre 0,75 y 1,30. Los resultados fuera de este rango tuvieron que ser replicados en 3 experimentos independientes para ser considerados válidos.

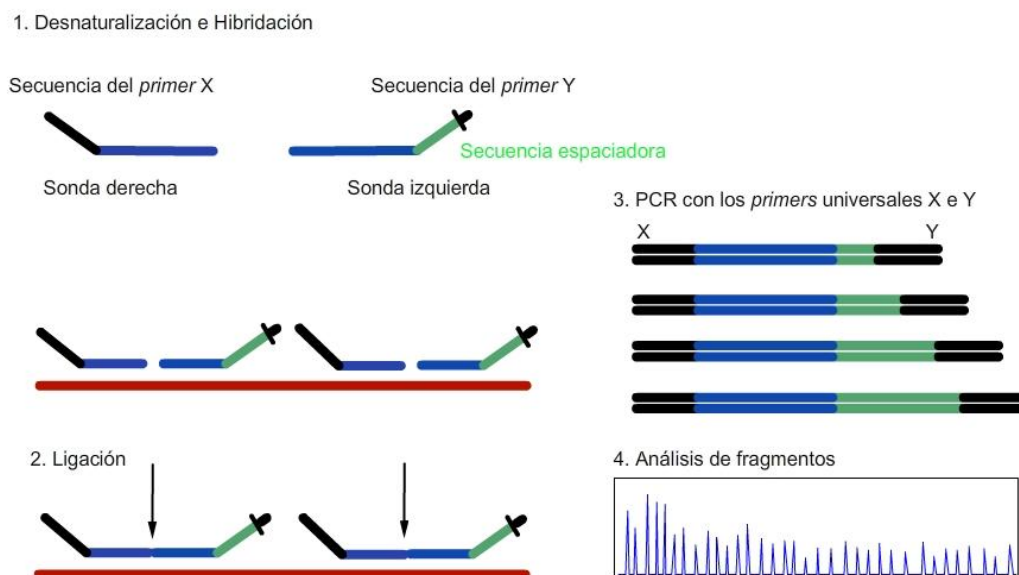


Figura 3.4: Fundamento del MLPA.

En la primera fase se lleva a cabo la hibridación del ADN genómico, previamente desnaturalizado, con un juego de sondas específicas del segmento a analizar. Una vez hibridadas a su diana, se unirán mediante el uso de una ligasa termoestable, generando una sonda continua flanqueada por sitios de unión a cebadores universales que serán usados para su amplificación por PCR tradicional. Solo se amplificarán exponencialmente aquellas sondas que hayan sido previamente ligadas. Uno de estos cebadores está marcado con un fluorocromo para su detección tras la electroforesis capilar.

3.3.3.7. Genotipación por tecnología Taqman

Los estudios de discriminación alélica mediante tecnología Taqman son ensayos que nos permiten genotipar SNPs. La presencia de dos sondas en cada reacción permite la detección de dos posibles variantes de un SNP en una secuencia específica (Figura 3.5). Estos ensayos miden el cambio de fluorescencia de los fluorocromos asociados a unas sondas específicas (De Kok y cols, 2002). El proceso de genotipación consta de una reacción de PCR que hemos realizado en el sistema 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems), y a la que se añaden dos sondas Taqman® MGB (Applied Biosystems) complementarias a la región donde se localiza la variación de secuencia que queremos estudiar, cada una a un alelo. El programa general de amplificación utilizado es: $(95^{\circ}-10'') \rightarrow [(92^{\circ}-15'') \rightarrow (60^{\circ}-1'')] \times 40$. Esta PCR se realizó a volumen final de 5 o 10 μL , para placas de 96 pocillos, con 15ng de ADN genómico y utilizando el kit comercial TaqMan 2x Genotyping PCR Master Mix (Applied Biosystems), según las recomendaciones del fabricante. Los cebadores y sondas fueron diseñados y suministrados por Applied Biosystems. Esta tecnología se ha empleado para la genotipación de la variante c.73+9277T>C (rs2435357) dentro del dominio *Enhancer-like* en el intrón 1 del gen *RET* (Fernández y cols, 2009), tanto en los pacientes HSCR como en sus familiares disponibles.

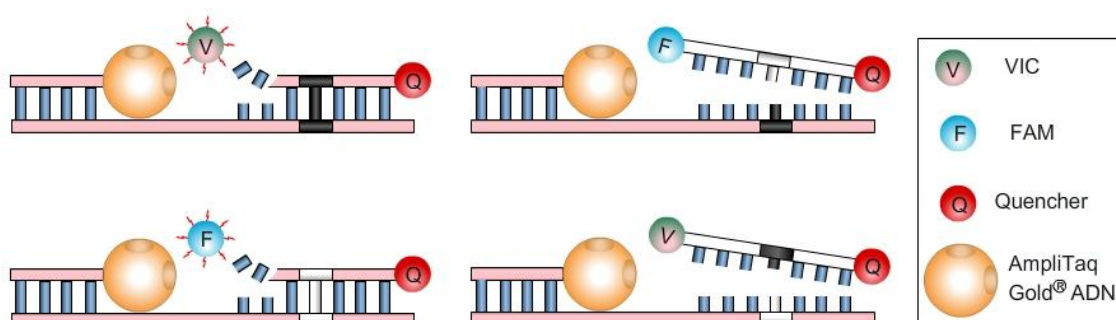


Figura 3.5: Fundamentos de la tecnología Taqman.

Para llevar a cabo la reacción se necesitan dos sondas que permiten diferenciar la amplificación de los dos alelos ya que poseen en su extremo 5' una molécula fluorescente (“reporter”) distinta (FAM o VIC), y una molécula no fluorescente en su extremo 3' denominada “quencher”. Cuando la sonda está íntegra, la proximidad del *reporter* y del *quencher* provoca un fenómeno denominado FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) en el que el *quencher* capta la fluorescencia emitida por el *reporter* y se traduce en la anulación de la fluorescencia de la sonda. En el curso de la PCR, cada sonda se une específicamente a su secuencia complementaria y durante la extensión de la cadena, la actividad 5' exonucleasa de la polimerasa AmpliTaq Gold DNA permite eliminar nucleótidos desde el extremo 5' de una cadena de ácido nucleico y provoca la liberación del *reporter* solo de la sonda que ha hibridado. Los desapareamientos de base entre la sonda y la secuencia alélica reducen la eficiencia de la sonda para hibridar y la polimerasa desplaza la sonda completa en lugar de cortarla y liberar el *reporter*. La rotura de la sonda hace que se separen *reporter* y *quencher*, aumentando la fluorescencia emitida por el *reporter*. De esta manera, la fluorescencia generada en la PCR indica el/los alelo/s que están presentes en la muestra.

3.3.3.8. Análisis bioinformático

La Bioinformática se define como aquella disciplina interesada en todos los aspectos relacionados con la adquisición, almacenamiento, procesamiento, distribución, análisis e interpretación de la información biológica, mediante la aplicación de técnicas y herramientas de las matemáticas, biología e informática con el propósito de comprender el significado biológico de una gran variedad de datos. Con la finalización del Proyecto Genoma Humano se ha impulsado la aparición y desarrollo de herramientas bioinformáticas integradas para la búsqueda y recuperación de datos sobre secuencias, estructuras, mutaciones y enfermedades.

3.3.3.8.1. Bases de datos

Los datos de secuencia de ADN y proteínas, así como la información de las mutaciones y polimorfismos descritos, se obtuvieron a través del buscador del genoma humano UCSC (<http://genome.ucsc.edu/>), del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y la base de datos Ensembl (<http://www.ensembl.org>).

3.3.3.8.2. Nomenclatura de las variantes de secuencia

La nomenclatura empleada para la descripción de las variantes de secuencia identificadas en el presente proyecto de tesis se encuadra dentro de las recomendaciones de la “*Human Genome Variation Society*” (<http://www.hgvs.org/mutnomen/>) (Dunnen y Antonarakis, 2000).

3.3.3.8.3. Análisis de la patogenicidad de las variantes de secuencia

- Alteración del *splicing*: para analizar el efecto de una variante en la aparición o pérdida de sitios donadores o aceptores del *splicing* hemos utilizado las herramientas:

http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html y http://www.tigr.org/tdb/GeneSplicer/gene_spl.html

- Alteración de sitios de unión de factores de transcripción: para analizar si una variante altera el sitio de unión de factores de transcripción en la secuencia promotora del gen se utilizaron las herramientas disponibles en:

http://www.fruitfly.org/cgi-bin/seq_tools/promoter.pl y <http://www.ebi.ac.uk/asd-srv/wb.cgi>.

- Predicción de la influencia de un cambio de aminoácido en la función de la proteína: el programa SIFT (<http://blocks.fhcrc.org/sift/SIFT.html>) predice si una determinada sustitución aminoacídica en una proteína será tolerada o no desde el punto de vista de conservación de su funcionalidad. Para ello se basa en homologías de secuencias con otras especies y en las propiedades físico-químicas de los Aa (Ng y Henikoff, 2003). La herramienta PolyPhen (<http://coot.embl.de/PolyPhen>) es capaz de estimar el posible impacto de una sustitución aminoacídica en la estructura y función de una proteína usando parámetros similares a los de SIFT (Ramensky y cols, 2002).

- Predicción de la influencia de un cambio aminoacídico en la estructura secundaria de la proteína: la herramienta GARNIER (<http://emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/garnier>) predice la estructura secundaria de una proteína utilizando el método de GOR (Garnier y cols, 1996). De esta forma, podemos utilizar la información obtenida para conocer la influencia que puede tener una variante de secuencia en la estructura secundaria de la proteína, así como para evaluar la patogenicidad de la variante en función del papel estructural que presente el residuo.

- Predicción de la influencia de un cambio de Aa en la estructura terciaria de la proteína: la herramienta DiANNA (<http://clavius.bc.edu/~clotelab/DiANNA/>) analiza el posible impacto de la inclusión de nuevos residuos de cisteína en la secuencia proteica, ya que es capaz de estimar con qué probabilidad una cisteína de cierta proteína se encuentra reducida, formando un puente disulfuro, o unida a un ligando metálico (Ferrè y Clote, 2005). Por otro lado, el programa Swiss PDB Viewer 4.0 (Guex y Peitsch, 1997) nos permite la visualización de estructuras proteicas en tres dimensiones así como interaccionar con la

misma. De esta forma, podemos observar la posición espacial en la que se encuentra la variante así como ver la influencia que podría tener sobre su potencial electrostático.

3.3.4. Metodología del estudio estadístico

El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo mediante el programa informático IBM-SPSS Statistics 19.

En primer lugar se realizó un análisis descriptivo de las variables estudiadas en la muestra. Para ello, las variables cuantitativas se presentaron principalmente como la media \pm desviación estándar (*Standard Deviation*, SD), indicando también mediana, rango y rango intercuartílico (*InterQuartile Range*, IQR) para alguna de ellas. Desde el punto de vista gráfico los datos correspondientes a este tipo de variables se presentaron en diagramas de caja o *box-plots*.

Por su parte, las variables categóricas se presentaron en porcentajes y tablas de contingencia. Gráficamente se representaron mediante diagramas de barras y diagramas de sectores.

La comparación del comportamiento de las variables cuantitativas entre los grupos grave y no grave se ha realizado mediante el test no paramétrico de Mann-Whitney-Wilcoxon (M-W-W). Para estas variables, su comparación entre los 3 períodos temporales considerados se llevó a cabo mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis. La elección de métodos estadísticos no paramétricos se debió a los pequeños tamaños muestrales y/o a la naturaleza discreta de las variables consideradas. El análisis estadístico de las variables categóricas se realizó mediante la prueba de Chi-cuadrado de Pearson o el test exacto de Fisher si las condiciones de validez de la primera no eran verificadas (estas son, que a lo sumo un 20% de las frecuencias esperadas sea menor que 5 y ninguna inferior a 1).

La relación entre la escala y la gravedad de HSCR se analizó mediante un modelo de regresión logística binaria. Estos modelos constituyen una herramienta que permite explicar el comportamiento de una variable respuesta discreta (en nuestro caso binaria) a través de una o varias variables independientes explicativas de naturaleza cuantitativa y/o cualitativa. El análisis realizado incluyó la realización de la prueba de bondad de ajuste de Hosmer-Lemeshow (test HL), el cálculo del coeficiente R^2 de Nagelkerke y de los Odds Ratio (OR) con sus correspondientes intervalos de confianza (IC, nivel de confianza del 95%). Además, el poder discriminatorio del modelo obtenido fue valorado a través de una curva de características de receptor-operador o curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) —también conocidas como curvas de rendimiento diagnóstico—, incluyendo el estudio del área bajo la curva (*area under the curve*, AUC). Esto permitió establecer el punto de corte óptimo para la escala garantizando una sensibilidad y especificidad adecuadas. Finalmente, la capacidad predictiva de cada una de las variables de la escala a la hora explicar la gravedad se analizó mediante un modelo de regresión logística múltiple utilizando el método hacia adelante (*forward*) de selección de variables para determinar el grupo óptimo de variables con mayor capacidad explicativa. En todos los análisis realizados se consideró un resultado estadísticamente significativo cuando el correspondiente p-valor fue menor o igual a 0,05 ($p \leq 0,05$) (Van Belle y cols, 2004).

4. Resultados



4.1. Descripción de la serie completa incluida en el estudio

4.1.1. Epidemiología

El presente estudio se ha llevado a cabo en el Complejo Hospitalario Universitario de Badajoz, centro de referencia de la comunidad autónoma de Extremadura para el diagnóstico y tratamiento de HSCR. Entre 1983 y 2013, se trataron en nuestro hospital 47 pacientes. Durante este período se registraron 350.886 nacimientos (<http://estadistica.gobex.es>), lo que nos ofrece una incidencia de HSCR en esta comunidad de 1,34 por cada 10.000 nacidos vivos. Sin embargo, no se repartieron de forma homogénea a lo largo de las 3 décadas incluidas en el estudio, por lo que fueron divididos para su análisis como se describe a continuación: en el primer período (1983 - 1993), se diagnosticaron 14 casos de HSCR entre 148.529 recién nacidos (0,94 casos por cada 10.000), en el segundo (1994 - 2003), 13 casos entre 102.942 nacimientos (1,26 casos por cada 10.000) y desde el final del período anterior hasta la fecha de finalización del estudio (2004 - 2013), encontramos un aumento de la incidencia, registrándose 20 pacientes nuevos en una etapa en la que el número de nacimientos descendió a 99.415 (2 casos por cada 10.000). De los 47 enfermos, 5 no aceptaron la participación o no fueron localizados, de modo que la cohorte final reclutada fue de 42 casos. Nuestra serie mostró un predominio de pacientes de sexo masculino (29 varones, 69%) con una media (\pm SD) de edad al diagnóstico de $386,6 \pm 1056,7$ y una mediana de 52 días (rango 2 días - 14,02 años). El 88% de los pacientes nacieron fruto de una gestación a término, siendo el porcentaje restante, pretérminos tardíos con edad gestacional superior a las 35 semanas en todos los casos. Se registró una gestación gemelar bicorial biamniótica con afectación de uno de los gemelos. Todos los embarazos excepto uno fueron controlados, sin existir en ningún caso sospecha ecográfica prenatal. El peso medio al nacimiento fue de 3200 ± 520 g. La distribución de la serie atendiendo a la longitud del segmento agangliónico se expone en la Figura 4.1. No se identificó ningún caso de aganglionismo intestinal total.

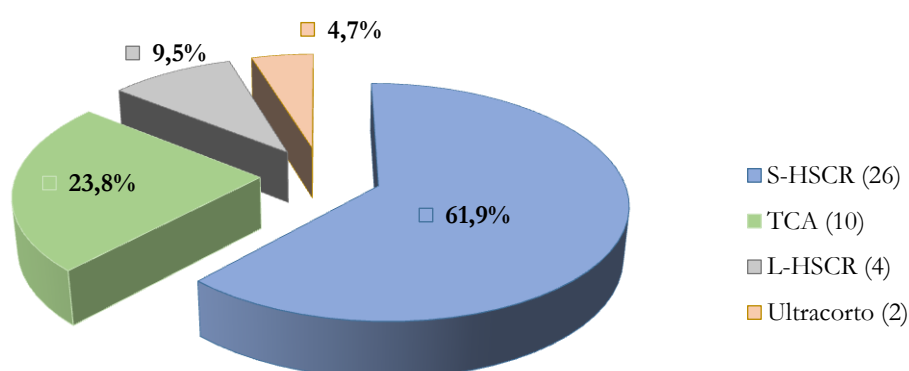


Figura 4.1: Extensión del aganglionismo en los pacientes de la serie.

4.1.2. Antecedentes familiares, síndromes y malformaciones asociadas

El 95% de nuestra cohorte (40 pacientes) presentó una forma esporádica de la enfermedad. Se registraron dos HSCR familiares, correspondientes a dos familias distintas (en un caso los miembros afectados fueron un padre y su hijo y en el otro dos hermanas). Atendiendo a las malformaciones y síndromes asociados, en el 81% de la serie, HSCR se presentó de forma aislada, mientras que 8 pacientes (19%) presentaron formas sindrómicas. Entre ellos, 5 pacientes fueron diagnosticados de DS y 3 de WS4, uno de los cuales asociaba afectación neurológica cumpliendo criterios de WS, leucodistrofia central desmielinizante, neuropatía periférica desmielinizante y HSCR (PCWH). Tres de los 5 pacientes con trisomía 21 presentaron además afectación cardiológica (canal auriculoventricular común, ductus arterioso persistente y comunicación interventricular). No se registraron otras malformaciones asociadas.

4.1.3. Evacuación de meconio y presentación clínica

La presentación clínica más frecuente fue la obstrucción intestinal (23 casos), seguida del estreñimiento de evolución tórpida (12 casos) y la enterocolitis (7 casos). En el examen físico inicial ningún paciente presentó una exploración del CA normal. El 42,9% de los pacientes presentaron una ampolla rectal vacía o un esfínter hipertónico, y el 57,1% restante, una ampolla adherente o un TR seguido de deposición explosiva (Figura 4.2). El 85,7% de la serie presentó retraso en la evacuación de meconio superior a las 24 horas y el 50% superior a las 48. En un porcentaje menor de pacientes (14,3%) la meconiorrexis se produjo en el primer día de vida.



Figura 4.2: Exploración del CA seguida de deposición explosiva en un caso S-HSCR.

4.1.4. Métodos diagnósticos

El protocolo de estudio habitual en nuestro centro ante sospecha de HSCR incluye la realización de registro anomanométrico, EC y BR (por succión o de espesor total). La MA se realizó en el 90% de los casos (38 pacientes), obteniéndose un resultado patológico (ausencia de RIA) en 36 de ellos (94,7%) y no concluyente en 2 (5,3%). Diecinueve de las 38 manometrías se realizaron en los primeros días de vida (rango 2 - 28 días), todas ellas sugestivas de HSCR (Figura 4.3), estableciéndose un diagnóstico de sospecha en edad neonatal en el 45,2% del total de los casos.

El diagnóstico definitivo vino dado en todos los pacientes por la ausencia de células ganglionares en los plexos mientérico y submucoso en la BR. Así, la confirmación diagnóstica se obtuvo en el período neonatal en el 26,2% y en un 83,3% en el primer año de vida.

En todos los casos se realizó estudio radiológico antes de la intervención quirúrgica. En 8 pacientes el primer EC fue informado como normal o presentó alteraciones poco relevantes. La ZT característica se identificó en 23 pacientes. En los 11 restantes la imagen mostró otras alteraciones, entre las que destacan el hallazgo de un colon disminuido de calibre o la presencia de microcolon (Figura 4.4).

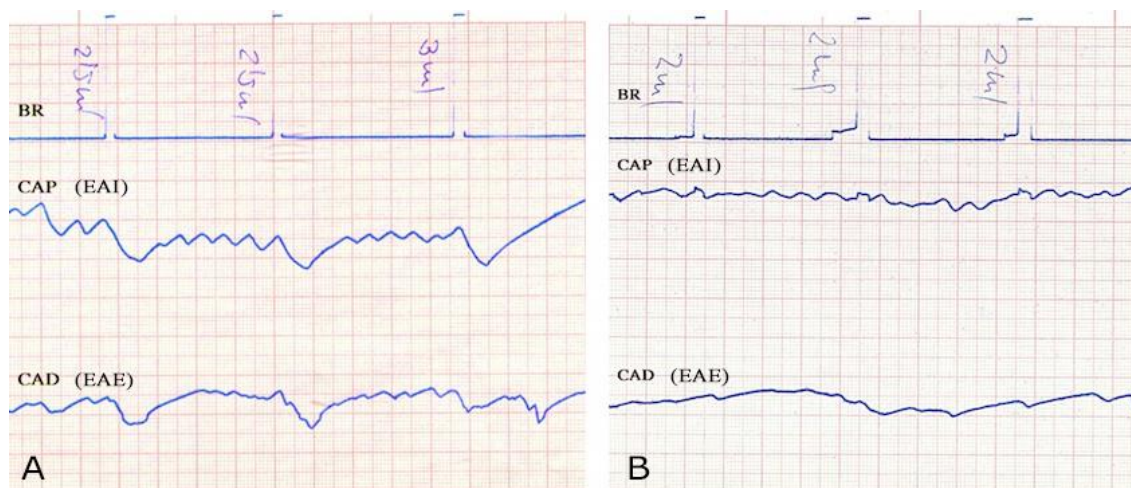


Figura 4.3: Registros de manometría anorrectal.

A: RIA presente. B: Estudio sugestivo de HSCR (ausencia de RIA). BR: balón rectal. CAP: canal anal proximal (EAI). CAD: canal anal distal (EAE).

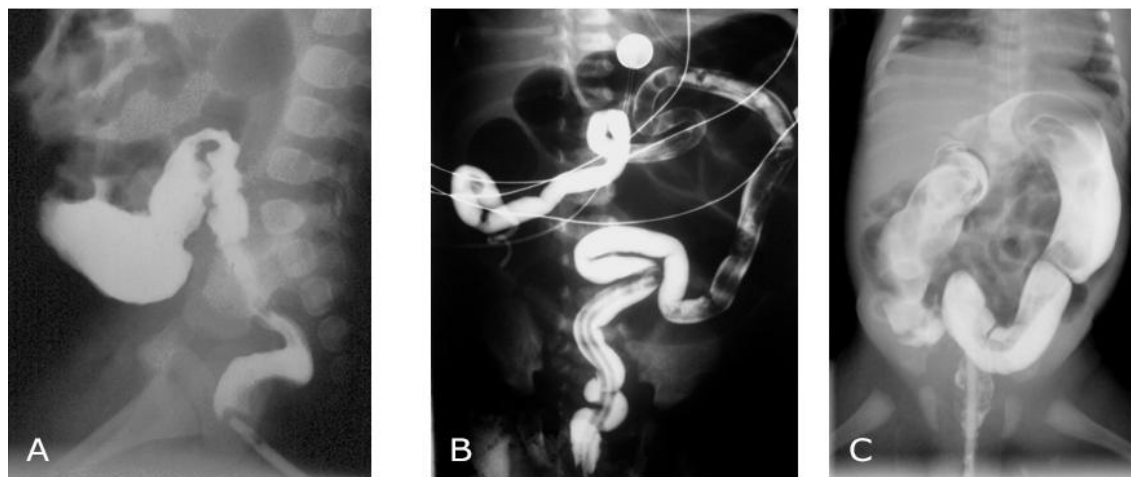


Figura 4.4: EC en pacientes HSCR de la serie.

A: ZT en rectosigma. B: Microcolon en paciente con TCA y afectación ileal. C: EC informado como normal en un caso de L-HSCR en el que se aprecian bordes lisos del colon y rectosigma de menor calibre.

4.1.5. Tratamiento

El 88,1% de los pacientes de la serie fueron manejados mediante *nursing* hasta la cirugía definitiva. En el 65% de estos casos este tratamiento fue eficaz para evacuar con facilidad el contenido fecal, evitar la necesidad de estoma, garantizar un estado nutricional adecuado y prevenir la enterocolitis. La media (\pm SD) de la edad en meses en el momento de la intervención definitiva fue de $20,48 \pm 38,5$ con una mediana de 7,98 meses (rango 3,6 meses - 14,6 años). Las técnicas quirúrgicas empleadas fueron: TEPT (13 pacientes), la técnica de Rehbein (10 casos), la técnica de Boley-Rehbein (8 casos), el descenso endorrectal de Soave (5

casos) y la técnica de Deloyers-Rehbein (2 casos). En 1 de los 4 casos intervenidos con otras técnicas, se empleó el abordaje abdominal laparoscópico de Georgeson (Tabla 4.1). Un paciente fue intervenido en otro centro por lo que se perdió el seguimiento posterior. La media de cirugías en el conjunto de la serie fue de $1,64 \pm 1,10$ con un tiempo medio de hospitalización en los dos primeros años tras el diagnóstico de $81,32 \pm 81,16$ días. De los 13 pacientes portadores de ostomía, 10 presentaron fenotipo TCA, 2 S-HSCR y 1 L-HSCR. Ninguna ostomía fue permanente. En todos los casos se realizaron dilataciones anales con tallos de Hegar a partir del día 14 postintervención manteniéndose durante los 6 primeros meses del postoperatorio. Igualmente, en los pacientes con TCA intervenidos con la técnica de Boley se realizaron irrigaciones rectales con suero salino fisiológico tras la cirugía para prevenir la enterocolitis.

4.1.6. Complicaciones y resultados postoperatorios

Se registraron varias complicaciones precoces (26 en 22 pacientes, Figura 4.5) entre las que destacan: enterocolitis (tanto en el pre como postoperatorio, 14 casos), dermatitis perianal (8 casos intervenidos mediante TEPT, resuelta en los primeros meses postintervención) y necesidad de reintervención quirúrgica (4 pacientes). Las causas que motivaron la reintervención fueron: obstrucción intestinal en postoperatorio inmediato secundaria a invaginación intestinal, estenosis de la anastomosis, enterocolitis crónica (extirpación del parche de colon en paciente DS con fenotipo TCA tratado con la técnica de Boley) y persistencia de clínica obstructiva en un caso de TCA tratado con la técnica de Lester-Martin.

Al finalizar el estudio se efectuó un control clínico para valorar la función intestinal e identificar las complicaciones tardías. En este momento todos los pacientes eran mayores de 4 años, con una media de edad de $14,59 \pm 9,25$ años y mediana de 13,1 años (rango 5,6 - 35,2). En 22 pacientes (15 fenotipo S-HSCR, 2 L-HSCR, 2 ultracorto y 3 TCA) la función intestinal fue normal. Se observaron episodios de enterocolitis en 10 casos (4 S-HSCR y 6 TCA), estreñimiento en 6 (4 S-HSCR y 2 L-HSCR), soiling en 2 casos de S-HSCR e incontinencia fecal 1 paciente con TCA (Tabla 4.1, Figura 4.6). En 3 de los 10 pacientes que padecieron episodios recurrentes de HAEC a lo largo de la evolución se administró toxina botulínica intraesfinteriana, con buena respuesta inicial en todos los casos. No se produjo ningún fallecimiento durante el tiempo de seguimiento. Todos los pacientes presentan autonomía digestiva. Ningún paciente ha sido valorado como candidato a trasplante intestinal ni ha precisado nutrición parenteral domiciliaria.

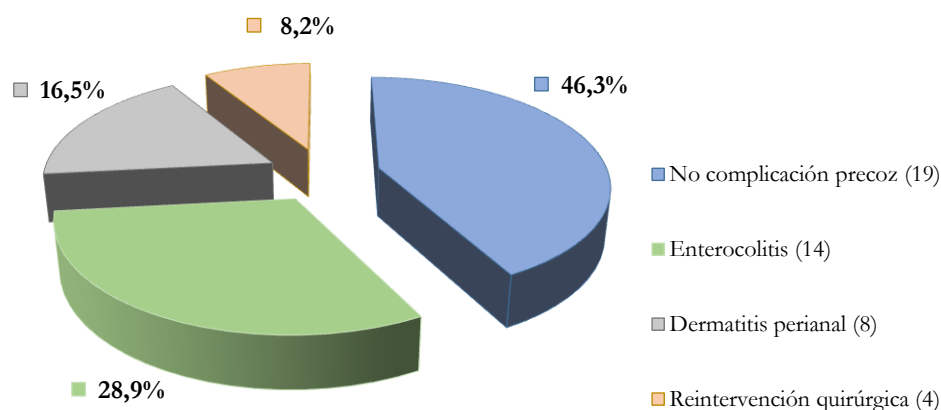


Figura 4.5: Complicaciones precoces registradas en los pacientes de la serie.

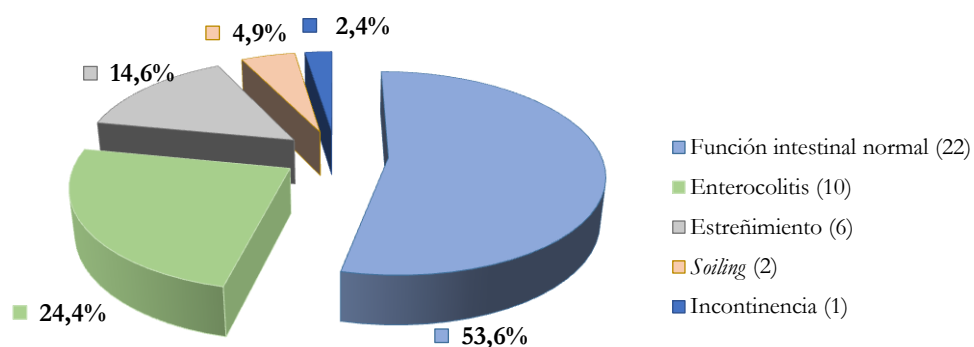


Figura 4.6: Complicaciones tardías registradas en los pacientes de la serie.

4.1.7. Particularidades del aganglionismo cólico total

Entre los 42 pacientes incluidos en el presente trabajo, encontramos 10 casos de TCA (23,8%), con una proporción hombre: mujer de 1,5:1. El porcentaje de HSCR sintromico para este subgrupo fue del 30% (2 casos de WS4 y 1 caso de DS). La mayoría de los casos fueron diagnosticados en el período neonatal, con una media de edad al diagnóstico de $36,50 \pm 49,23$ días y una mediana de 17 días (rango 2 - 150). Todos los pacientes presentaron retraso en la evacuación de meconio (siendo en el 80% superior a las 48 horas de vida). La forma más frecuente de presentación de la enfermedad fue la obstrucción intestinal (7 casos), seguida de la enterocolitis (2 casos). Todos los pacientes fueron portadores de ostomía y el 80% presentó algún episodio de enterocolitis grave en la evolución de la enfermedad.

Tabla 4.1: Principales características demográficas y clínicas de nuestra cohorte de pacientes HSCR. H: Hombre. M: Mujer.

Nº	Sexo	Presentación	Extensión	Debut clínico	Evacuación meconial	EC	Ostomía	Cirugía	Control función intestinal
1	M	Aislado esporádico	L-HSCR	Obstrucción intestinal	>48 h	ZT presente	Sí	Soave	Función normal
2	H	Aislado esporádico	S-HSCR	Enterocolitis	>48 h	Sin hallazgos	No	Soave	Función normal
3	H	Aislado esporádico	S-HSCR	Obstrucción intestinal	>48 h	ZT presente	Sí	Rehbein	Función normal
4	M	Aislado esporádico	S-HSCR	Estreñimiento	24 - 48 h	ZT presente	No	Soave	Función normal
5	H	Aislado esporádico	S-HSCR	Estreñimiento	24 - 48 h	ZT presente	No	Rehbein	Función normal
6	M	Aislado esporádico	TCA	Obstrucción intestinal	>48 h	Microcolon	Sí	Boley-Rehbein	Enterocolitis
7	H	Aislado esporádico	S-HSCR	Obstrucción intestinal	24 - 48 h	ZT presente	No	Rehbein	Función normal
8	H	Aislado esporádico	TCA	Estreñimiento	24 - 48 h	Calibre disminuido	Sí	Boley-Rehbein	Función normal
9	H	Aislado esporádico	S-HSCR	Obstrucción intestinal	24 - 48 h	Sin hallazgos	No	De la Torre	Estreñimiento
10	H	Aislado familiar	L-HSCR	Estreñimiento	>48 h	ZT presente	No	Georgeson	Estreñimiento
11	H	Aislado esporádico	TCA	Obstrucción intestinal	24 - 48 h	Microcolon	Sí	Boley-Rehbein	Enterocolitis
12	M	DS	S-HSCR	Estreñimiento	24 - 48 h	ZT presente	No	De la Torre	Enterocolitis
13	H	Aislado esporádico	S-HSCR	Obstrucción intestinal	24 - 48 h	ZT presente	No	De la Torre	Función normal
14	M	Aislado esporádico	S-HSCR	Obstrucción intestinal	<24 h	ZT presente	No	De la Torre	Soiling
15	H	Aislado esporádico	S-HSCR	Obstrucción intestinal	>48 h	Sin hallazgos	No	De la Torre	Función normal
16	H	Aislado esporádico	S-HSCR	Obstrucción intestinal	<24 h	ZT presente	No	De la Torre	Soiling
17	H	Aislado esporádico	S-HSCR	Enterocolitis	<24 h	ZT presente	No	De la Torre	Función normal
18	M	Aislado esporádico	L-HSCR	Estreñimiento	>48 h	Colon espástico	No	Deylers-Rehbein	Estreñimiento
19	H	Aislado esporádico	S-HSCR	Enterocolitis	>48 h	ZT presente	No	De la Torre	Función normal
20	H	Aislado esporádico	Ultracorto	Estreñimiento	<24 h	Sin hallazgos	No	De la Torre	Función normal
21	M	Aislado esporádico	S-HSCR	Obstrucción intestinal	24 - 48 h	Sin hallazgos	No	Rehbein	Estreñimiento

Nº	Sexo	Presentación	Extensión	Debut clínico	Evacuación meconial	EC	Ostomía	Cirugía	Resultado Postoperatorio
22	H	Aislado esporádico	S-HSCR	Enterocolitis	<24 h	ZT presente	No	Rehbein	Estreñimiento
23	H	WS4	TCA	Obstrucción intestinal	>48 h	Microcolon	Sí	Boley-Rehbein	Enterocolitis
24	M	Aislado esporádico	TCA	Enterocolitis	>48 h	Microcolon	Sí	Lester-Martin	Incontinencia
25	H	Aislado esporádico	S-HSCR	Estreñimiento	24-48 h	ZT presente	No	Soave	Función normal
26	M	Aislado esporádico	S-HSCR	Estreñimiento	24-48 h	ZT presente	No	Rehbein	Función normal
27	H	Aislado esporádico	S-HSCR	Enterocolitis	>48 h	ZT presente	Sí	Rehbein	Enterocolitis
28	H	WS4	S-HSCR	Estreñimiento	>48 h	ZT presente	No	Rehbein	Función normal
29	H	Aislado esporádico	Ultracorto	Estreñimiento	<24 h	ZT presente	No	Esfinterotomía	Función normal
30	H	DS	S-HSCR	Obstrucción intestinal	24-48 h	Sin hallazgos	No	Rehbein	Función normal
31	M	Aislado familiar	TCA	Obstrucción intestinal	>48 h	Microcolon	Sí	Boley-Rehbein	Enterocolitis
32	H	DS	TCA	Obstrucción intestinal	>48 h	Microcolon	Sí	Boley-Rehbein	Enterocolitis
33	H	WS4	TCA	Obstrucción intestinal	>48 h	Sin hallazgos	Sí	Boley-Renbein	Función normal
34	H	Aislado esporádico	S-HSCR	Obstrucción intestinal	>48 h	Sin hallazgos	No	De la Torre	Estreñimiento
35	H	Aislado esporádico	TCA	Enterocolitis	>48 h	Microcolon	Sí	Boley-Rehbein	Función normal
36	H	DS	S-HSCR	Obstrucción intestinal	>48 h	ZT presente	No	Rehbein	Función normal
37	H	Aislado esporádico	S-HSCR	Obstrucción intestinal	>48 h	ZT presente	No	Soave	-
38	M	DS	S-HSCR	Obstrucción intestinal	>48 h	ZT presente	No	De la Torre	Enterocolitis
39	M	Aislado esporádico	TCA	Obstrucción intestinal	>48 h	Calibre disminuido	Sí	Descenso ileal-De la Torre	Enterocolitis
40	H	Aislado esporádico	S-HSCR	Obstrucción intestinal	24-48 h	ZT presente	No	De la Torre	Función normal
41	H	Aislado esporádico	S-HSCR	Estreñimiento	24-48 h	ZT presente	No	De la Torre	Enterocolitis
42	M	Aislado esporádico	L-HSCR	Obstrucción intestinal	24-48 h	Colon espástico	No	Deloyers-Rehbein	Función normal

4.2. Descripción de los pacientes HSCR síndrómicos

4.2.1. Síndrome de Waardenburg tipo 4 (WS4)

Se identificaron 3 pacientes con diagnóstico de WS4, todos ellos varones y pertenecientes a familias no relacionadas. A continuación se expone la descripción de los casos. Sus características clínicas se encuentran resumidas en la Tabla 4.2.

Caso 1 (paciente n° 23, Tabla 4.1): varón de origen español, primer hijo de padres sanos no consanguíneos, nacido a término con un peso adecuado para la edad gestacional. A las 60 horas de vida presentó rechazo de la ingesta, vómitos biliosos y distensión abdominal. A la exploración física destacaba: regular estado general, aspecto deshidratado y tinte icterico. Abdomen muy distendido y doloroso a la palpación. Resto de la exploración normal. La radiología de abdomen mostró importante distensión de asas, identificándose la presencia de un microcolon en el EC. El 4° día de vida se realizó una laparotomía en la que se evidenció la existencia de un microcolon y microíleon (80 cm) con dilatación proximal, practicándose una ileostomía de descarga con toma de biopsias intestinales que confirmaron el aganglionismo. El paciente permaneció hospitalizado los primeros meses de vida presentando un curso complicado por un cuadro de enterocolitis grave y por el síndrome malabsortivo secundario. A los 4 meses de vida se realizó ileocoloplastia tipo Boley con resección del microcolon y microíleon (Figura 4.7B) y descenso ileorrectal. La anatomía patológica reveló la presencia de neuronas en colon derecho y ausencia en recto, sigma, colon descendente y microíleon (SS-HSRC). A lo largo de la evolución se constató un retraso psicomotor llamativo, nistagmo horizontal rotatorio y sordera bilateral profunda, destacando en su fenotipo un cabello rubio e iris azul brillante bilateral (Figura 4.7A). Se realizó cariotipo y estudio metabólico, ambos con resultado normal. En las pruebas de imagen cerebral presentaba una alteración difusa de la mielización. El estudio genético confirmó el diagnóstico de WS4.



Figura 4.7: Fenotipo y pieza operatoria del paciente n° 23.

A: Iris azul brillante bilateral. B: Pieza operatoria que muestra un microcolon y microíleon. Imagen utilizada con el consentimiento de los padres.

Caso 2 (paciente n° 28, Tabla 4.1): el caso índice es un varón de origen portugués, primer hijo de padres no consanguíneos, nacido a término y de peso adecuado para la edad gestacional. Ingresó en dos ocasiones en el período neonatal por episodios de distensión abdominal, vómitos y diarrea. Reingresó en nuestro centro a los 2 años para estudio y tratamiento por estreñimiento crónico severo. En la exploración física inicial destacaba: buen estado general, heterocromía de iris (iris derecho marrón e izquierdo azul en

sus 3/4 partes) (Figura 4.8A), cabello rubio con mechón hipopigmentado. Abdomen muy distendido, apreciándose un gran fecaloma en fosa ilíaca izquierda. El EC reveló un segmento estenótico rectosigmoideo con dilatación proximal. El aganglionismo se confirmó por MA y BR por succión. El paciente fue intervenido realizándose un descenso abdominoperineal según la técnica de Rehbein. En el postoperatorio presentó un cuadro de enterocolitis que resolvió tras 2 semanas de tratamiento médico. La evolución posterior ha sido satisfactoria. El paciente asocia una hipoacusia neurosensorial profunda. Como antecedentes familiares destacan su madre, afecta de hipoacusia unilateral, y su abuela materna, con hipopigmentación cutánea extensa (Figura 4.8B). El estudio genético confirmó el diagnóstico de WS4.

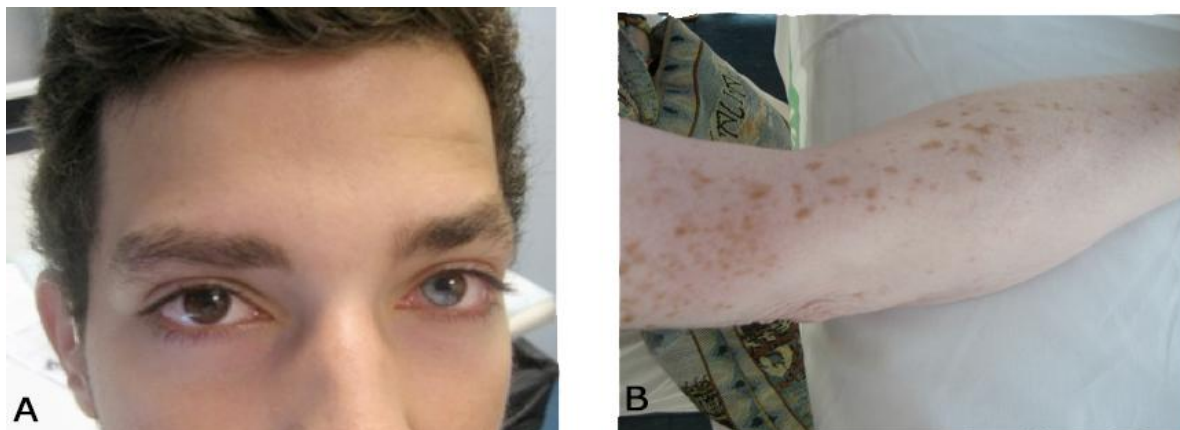


Figura 4.8: Fenotipo del paciente n° 28.

A: Heterocromía de iris del caso índice, mostrando el color oscuro del ojo derecho y azul en 3/4 partes del ojo izquierdo B: Manchas hiperpigmentadas sobre piel hipopigmentada en la abuela materna. Imagen utilizada con el consentimiento de los padres.

Caso 3 (paciente n° 33, Tabla 4.1): el caso índice es un varón, de madre venezolana y padre español. Nació en España, fruto de un embarazo gemelar normal, mediante parto eutócico vaginal a las 36 semanas y con peso adecuado para la edad gestacional. El referido es el primer gemelo. A las 36 horas de vida ingresó por cuadro de vómitos persistentes con ausencia de evacuación de meconio. Exploración física: fenotipo normal, cabello castaño, heterocromía de iris (Figura 4.9A). No manchas ni áreas de hipopigmentación cutánea. Auscultación cardiopulmonar normal. Abdomen distendido y doloroso a la palpación. Se realizó radiografía de abdomen en la que se observaba distensión de asas intestinales con ausencia de gas distal. En el EC con gastrografín no se identificó clara ZT. Los estudios manométricos realizados a los 7 y 21 días de vida demostraron la ausencia de RIA. El aganglionismo se confirmó al mes de vida a través de BR por succión. Ante la persistencia de la clínica en este momento, no manejable con *nursing*, se realizó laparotomía con biopsias intraoperatorias evidenciándose la extensión del aganglionismo hasta íleon terminal (Figura 4.9B), por lo que se practicó una ileostomía a 20 cm de la válvula ileocecal. La cirugía definitiva se realizó a los 4 meses de vida. En el postoperatorio presentó un episodio de enterocolitis grave resuelta favorablemente con tratamiento médico. Ha sido valorado por otorrinolaringología sin detectarse alteración de la audición hasta el momento. No presenta otros estigmas de WS. Destaca entre sus antecedentes, un familiar de 2° grado con diagnóstico clínico de WS tipo 1, residente en Venezuela y que no ha podido ser estudiado. El hermano gemelo de nuestro paciente es sano.

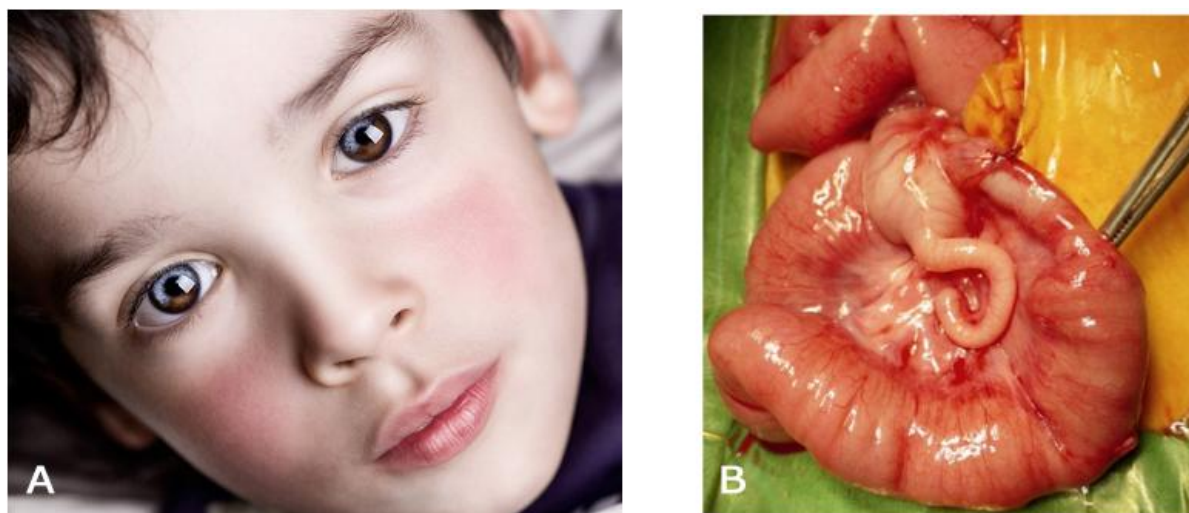


Figura 4.9: Paciente n° 33: fenotipo en edad escolar y aspecto operatorio al diagnóstico.

A: Heterocromía de iris. B: Campo operatorio que muestra un TCA con afectación del ileon terminal. Imagen utilizada con el consentimiento de los padres.

Tabla 4.2: Resumen de los datos clínicos de los pacientes WS4.

N° paciente (Tabla 4.1.)	23	28	33
Sexo	Hombre	Hombre	Hombre
Sordera	Sí	Sí	No
Anomalías de la pigmentación	Iris azul brillante bilateral	Mechón blanco Heterocromía de iris izquierdo	Heterocromía de iris bilateral
Extensión	TCA	S-HSCR	TCA
Enterocolitis	Sí	Sí	Sí

4.2.2. Síndrome de Down

Identificamos 5 casos (3 varones) en los que HSCR se asoció a DS, lo que ofrece una incidencia de DS en nuestra cohorte del 11,9%. En ningún caso se registraron antecedentes familiares de HSCR. El fenotipo más frecuente fue S-HSCR (4/5 casos) siendo la obstrucción intestinal la forma de presentación más común (4/5). El 80% presentó algún episodio de enterocolitis grave en la evolución de la enfermedad. No se registraron otras cromosopatías en nuestra cohorte HSCR.

4.3. Aplicación de los criterios de gravedad de HSCR

De los resultados anteriores, se deduce que HSCR se manifiesta clínicamente como un espectro de gravedad, donde encontramos:

- Formas no graves, que debutan en forma de obstrucción intestinal distal neonatal o estreñimiento crónico y pueden ser manejadas con tratamiento conservador hasta la cirugía definitiva.
- Formas graves, que se presentan como obstrucción intestinal sin respuesta a tratamiento médico, enterocolitis o perforación intestinal y precisan la realización de un estoma en los primeros meses de vida así como una hospitalización prolongada.

Tras la revisión exhaustiva de las historias clínicas, nuestra cohorte de pacientes HSCR fue dividida en 2 grupos (grave y no grave) según los criterios previamente descritos (Tabla 3.1).

Quince de los 42 pacientes estudiados (35,7%) cumplieron nuestros criterios de enfermedad grave. La media (\pm SD) de cirugías en este grupo fue de $2,5 \pm 1,4$ con un tiempo medio de hospitalización en los dos primeros años tras el diagnóstico de $160,2 \pm 85,9$ días. Un 80% de estos pacientes presentaron al menos un episodio de enterocolitis pre o postoperatoria. Un paciente no pudo ser clasificado por perderse el seguimiento tras el diagnóstico.

Los 26 pacientes restantes de la serie fueron clasificados como formas no graves de la enfermedad. Este grupo precisó una media de $1,2 \pm 0,5$ cirugías correctoras, el tiempo medio de hospitalización en los primeros años de vida fue de $35,7 \pm 22,5$ días y en un 7,7 % se registraron episodios de enterocolitis. La comparación de los 2 grupos a nivel de estas variables mostró diferencias estadísticamente significativas (en las 3 comparaciones $p < 0,0001$). Las Figuras 4.10 y 4.11 muestran un ejemplo de cada grupo.

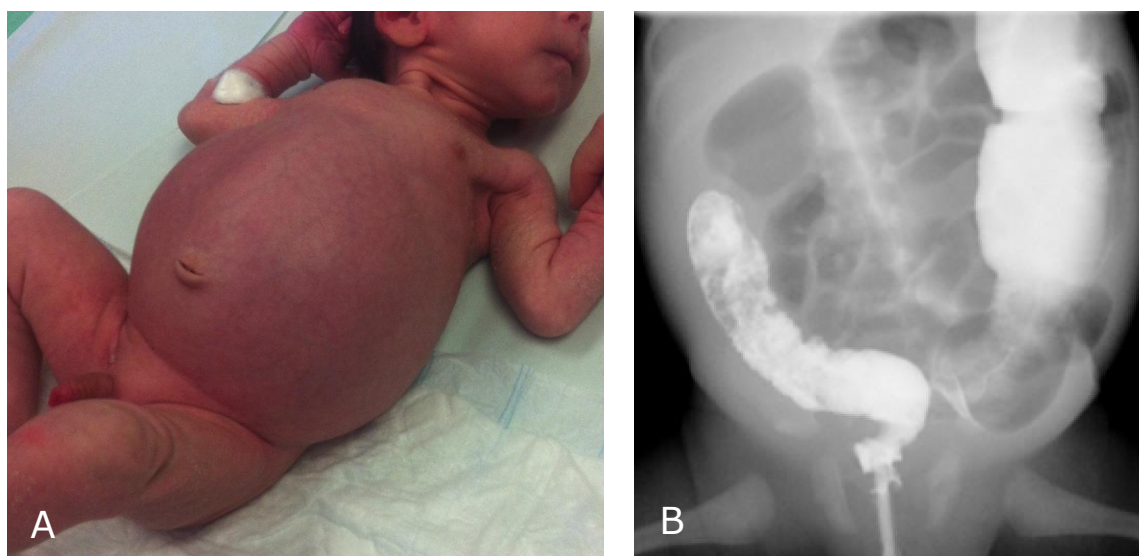


Figura 4.10: Paciente clasificado por nuestros criterios como no grave.

A: Distensión abdominal en período neonatal. B: EC que muestra un S-HSCR. El aganglionismo se confirmó en la BR. El paciente fue tratado con *nursing* precisando una única cirugía correctora (técnica de De la Torre) con evolución favorable. No presentó episodios de enterocolitis. El tiempo de hospitalización fue de 28 días.

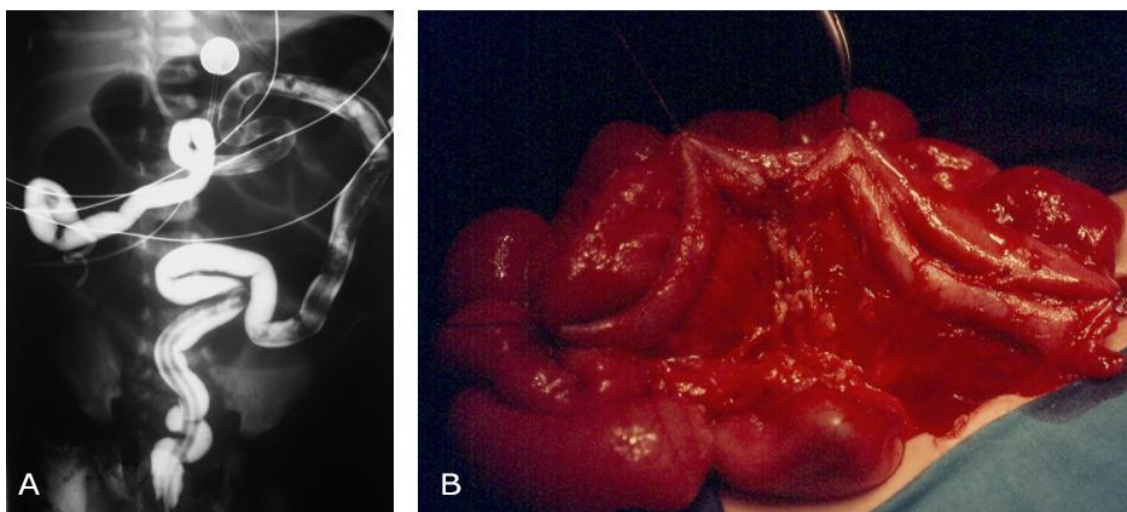


Figura 4.11: Paciente clasificado por nuestros criterios como grave.

A: Neonato de 24 horas de vida con obstrucción intestinal. El EC demuestra un microcolon por TCA con afectación de 80 cm de íleon. Preciso 4 intervenciones quirúrgicas y fue portador de ileostomía. El tiempo de hospitalización en los dos primeros años tras el diagnóstico fue de 256 días. B: Campo operatorio en el que se puede apreciar el calibre disminuido del colon.

4.4. Aplicación y análisis de la escala de gravedad de HSCR

4.4.1. Estudio de la relación entre la escala y la gravedad. Determinación del punto de corte óptimo

De acuerdo a la metodología descrita en la sección 3.2.1 se elaboró una escala de gravedad de HSCR recogida en la Tabla 4.3. Una vez diseñada la escala y clasificados los pacientes como graves o no graves, se aplicó un modelo de regresión logística para explicar la variable gravedad en función de la escala, obteniéndose una relación directa estadísticamente significativa ($p = 0,003$; OR = 2,92; 95% IC OR: 1,45-5,90; R^2 de Nagelkerke = 0,753; test HL: $p = 0,833$, Figura 4.12).

A continuación, se estudió el valor óptimo de la escala para discriminar si el paciente se comporta como grave o no. Para ello se realizó una curva ROC (Figura 4.13), que determinó que el punto de corte óptimo se situaría en el valor de 11 puntos, proporcionando una prueba con una sensibilidad y especificidad estimadas de 0,87 y 0,81, respectivamente (Tabla 4.4). El AUC indicó un buen valor predictivo de la escala (AUC = 0,949; 95% IC: 0,89-1, $p < 0,0001$). En la clasificación habitual de los test de diagnóstico en función de la AUC, la escala se clasificaría como muy buena, al superar la estimación puntual del AUC el valor de 0,9 (aunque siendo inferior a 0,97).

Tabla 4.3: Escala de gravedad de HSCR al diagnóstico (2-20 puntos).

1. Antecedentes familiares de HSCR	
a) Ausencia	0
b) 2º grado	1
c) 1º grado	2
2. Síndromes o malformaciones asociadas	
a) HSCR aislado	0
b) Malformaciones asociadas	1
c) Síndrome no Down/Waardenburg/otras neurocristopatías	2
d) Síndrome de Down	3
3. Evacuación de meconio	
a) < 24 horas	0
b) 24-48 horas	1
c) > 48 horas	2
4. Debut clínico	
a) Estreñimiento	1
b) Obstrucción intestinal	2
c) Enterocolitis o perforación intestinal	3
5. Exploración rectal	
a) Normal	0
b) Discreta hipertonía/deposición explosiva	1
c) Hipertonía manifiesta/ampolla vacía	2
6. Efectividad del tratamiento médico preoperatorio (<i>nursing</i>)	
a) No precisado/no realizado	0
b) Efectivo	1
c) No efectivo	2
7. Extensión del aganglionismo	
a) Ultracorto	1
b) S-HSCR	2
c) L-HSCR	3
d) TCA	4
8. Enema de contraste	
a) Normal/hallazgos poco relevantes	0
b) Presencia de ZT	1
c) Colon espástico/disminuido de calibre globalmente/microcolon	2

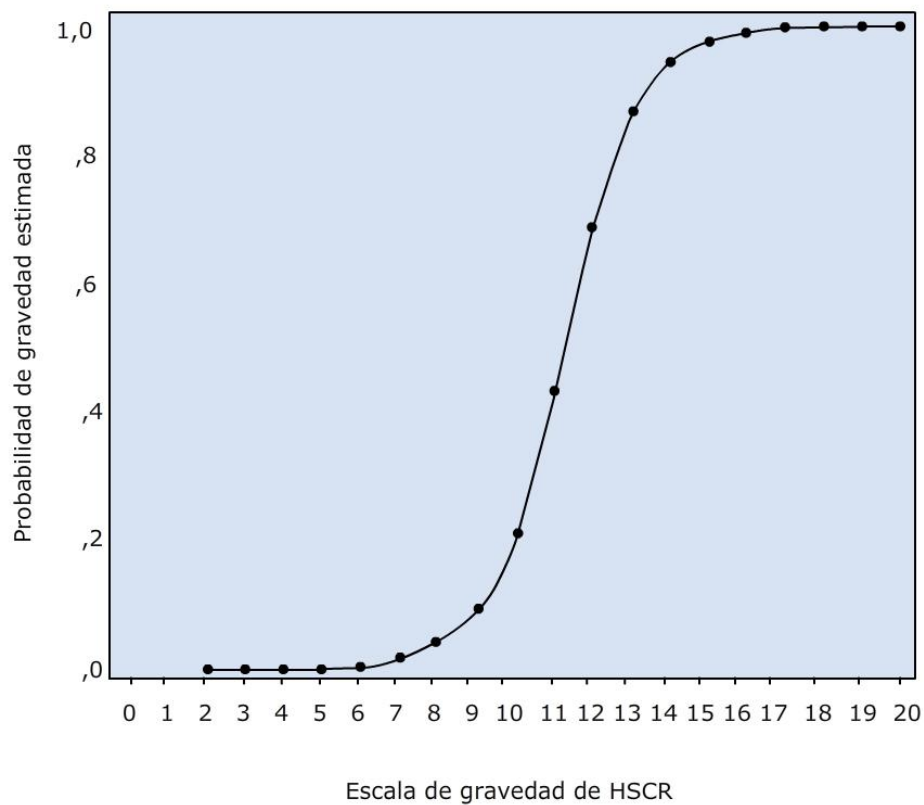


Figura 4.12: La puntuación de la escala se correlaciona con la gravedad.

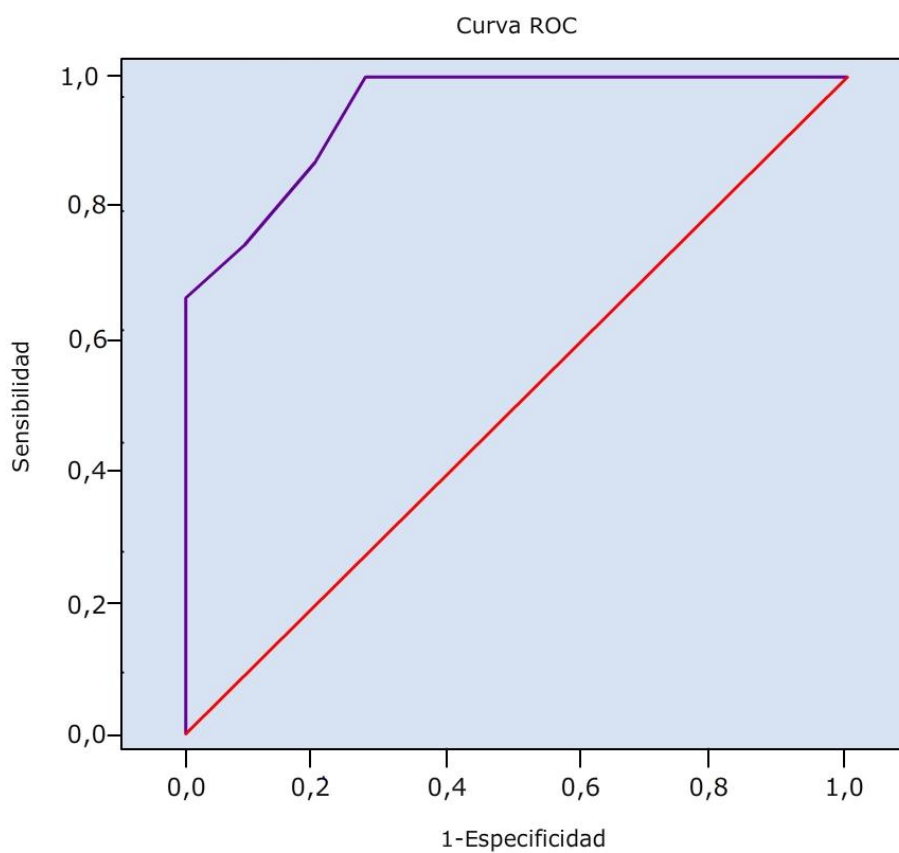


Figura 4.13: Curva ROC de la escala de gravedad de HSCR.

Tabla 4.4: Sensibilidad y 1- especificidad de los puntos de corte de la escala de gravedad de HSCR.

Positivo si es mayor o igual que ^a	Sensibilidad	1 – Especificidad
2	1,000	1,000
4	1,000	0,962
5,5	1,000	0,923
6,5	1,000	0,885
7,5	1,000	0,577
8,5	1,000	0,308
9,5	1,000	0,269
10,5	0,867	0,192
11,5	0,733	0,077
12,5	0,667	0,000
13,5	0,533	0,000
14,5	0,400	0,000
15,5	0,200	0,000
16,5	0,133	0,000
18	0,000	0,000

a: El menor valor de corte es el valor de contraste observado mínimo menos 1, mientras que el mayor valor de corte es el valor de contraste observado máximo más 1. Todos los demás valores de corte son la media de dos valores de contraste observados ordenados y consecutivos.

4.4.2. Estudio de las variables que constituyen la escala y su capacidad predictiva

En primer lugar, se estudió la relación individual de cada una de las variables de la escala con la variable gravedad mediante un test de M-W-W (considerando los datos ordinales). Resultado de este análisis se obtuvo la Tabla 4.5 que muestra que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes graves y no graves para las variables “antecedentes familiares de HSCR” y “debut clínico” mientras que el resto de las variables muestran una relación estadísticamente significativa con la variable gravedad. Este análisis también se realizó considerando las variables que constituyen la escala como cualitativas. El estudio de las correspondientes tablas de contingencia proporcionó el mismo resultado que el análisis anterior (Tabla 4.8). Posteriormente, se aplicó un modelo de regresión logística múltiple con un método de selección de variables *forward* para determinar qué variables de las empleadas para definir la escala son las idóneas para explicar la variable gravedad. Los resultados confirmaron la falta de capacidad predictiva de las variables “antecedentes familiares de HSCR” y “debut clínico”, indicando que solo son necesarias las variables “síndromes o malformaciones asociadas” ($p = 0,023$; OR = 4,41; 95%IC OR: 1,23-15,84), “evacuación de meconio” ($p = 0,04$; OR = 20,43; 95%IC OR: 1,15-361,9) y “extensión del aganglionismo” ($p = 0,007$; OR = 14,84; 95%IC OR: 2,11-104,24), siendo la información aportada por las otras variables irrelevante en presencia de estas. El modelo con estas tres variables presenta un test de HL con p -valor = 0,984 (i.e., modelo adecuado) y un R^2 de Nagelkerke = 0,788.

Tabla 4.5: Relación entre las variables de la escala y la variable gravedad.

Variables	Grave (n=15) Media \pm SD (mediana; IQR)	No grave (n=26) Media \pm SD (mediana; IQR)	P
Antecedentes familiares de HSCR	0,27 \pm 0,59 (0;0)	0,08 \pm 0,39 (0;0)	0,109
Síndromes/ otras malformaciones asociadas	1,07 \pm 1,39 (0;3)	0,19 \pm 0,69 (0;0)	0,012
Evacuación de meconio	1,87 \pm 0,35 (2;0)	1,04 \pm 0,72 (1;1)	<0,001
Debut clínico	2 \pm 0,54 (2;0)	1,81 \pm 0,75 (2;1)	0,33
Exploración rectal	1,8 \pm 0,41 (2;0)	1,23 \pm 0,43 (1;0)	<0,001
Efectividad del <i>nursing</i>	1,67 \pm 0,62 (2;1)	0,92 \pm 0,48 (1;0)	<0,001
Extensión del aganglionismo	3,33 \pm 0,90 (4;2)	2,08 \pm 0,56 (2;0)	<0,001
Enema de contraste	1,53 \pm 0,64 (2;1)	0,81 \pm 0,57 (1;1)	<0,001

Test de M-W-W.

4.5. Definición y estudio de la escala de gravedad simplificada

A partir de las variables: “antecedentes familiares de HSCR”, “debut clínico” y “síndromes o malformaciones asociadas” se definió una escala simplificada que toma valores de 1 a 9 (Tabla 4.6). Mediante un modelo de regresión logística simple se probó que esta escala simplificada también se relaciona de un modo estadísticamente significativo con la gravedad ($p = 0,001$; OR = 5,75; 95% IC OR: 2,01-16,48; Nagelkerke $R^2 = 0,725$; test de HL: $p = 0,889$, Figura 4.14). El análisis posterior de la correspondiente curva ROC mostró también un buen valor predictivo para la escala simplificada (AUC = 0,944; 95% IC: 0,88-1, $p < 0,0001$). El estudio de los puntos de corte indicó que 5 sería el punto de corte óptimo en este caso (Tabla 4.7), con una sensibilidad de 0,93 y especificidad de 0,84 (Figura 4.15).

Tabla 4.6: Escala simplificada de gravedad de HSCR (1-9 puntos)

1. Síndromes o malformaciones asociadas	
a) HSCR aislado	0
b) Malformaciones asociadas	1
c) Síndrome no Down/Waardenburg/otras neurocristopatías	2
d) Síndrome de Down	3
2. Evacuación de meconio	
a) < 24 horas	0
b) 24-48 horas	1
c) > 48horas	2
3. Extensión del aganglionismo	
a) Ultracorto	1
b) S-HSCR	2
c) L-HSCR	3
d) TCA	4

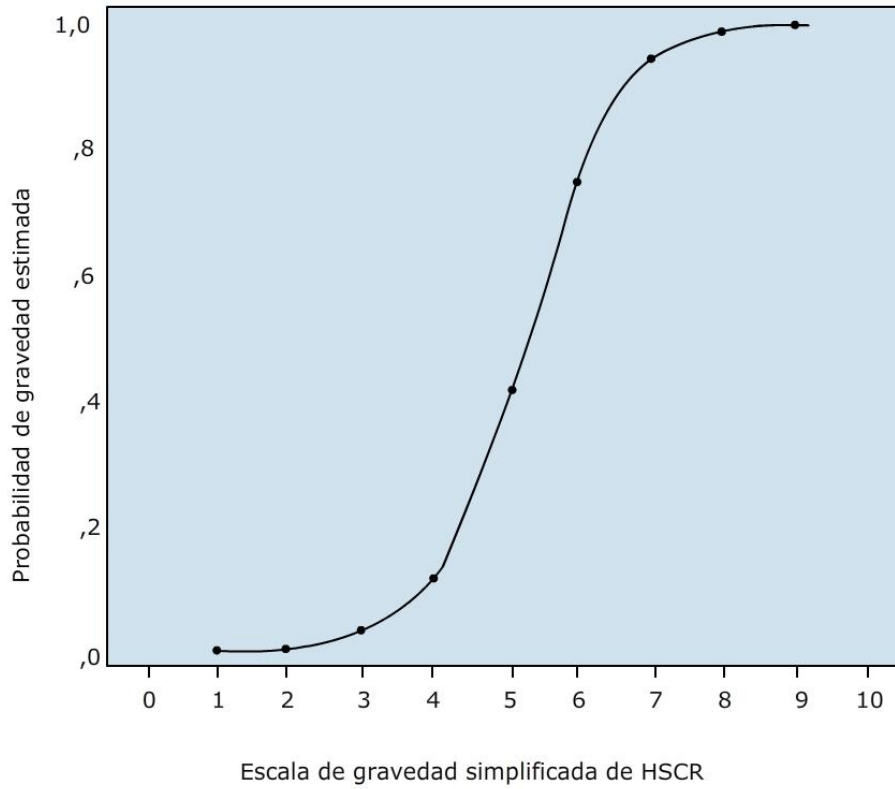


Figura 4.14: La puntuación de la escala simplificada se correlaciona con la gravedad.

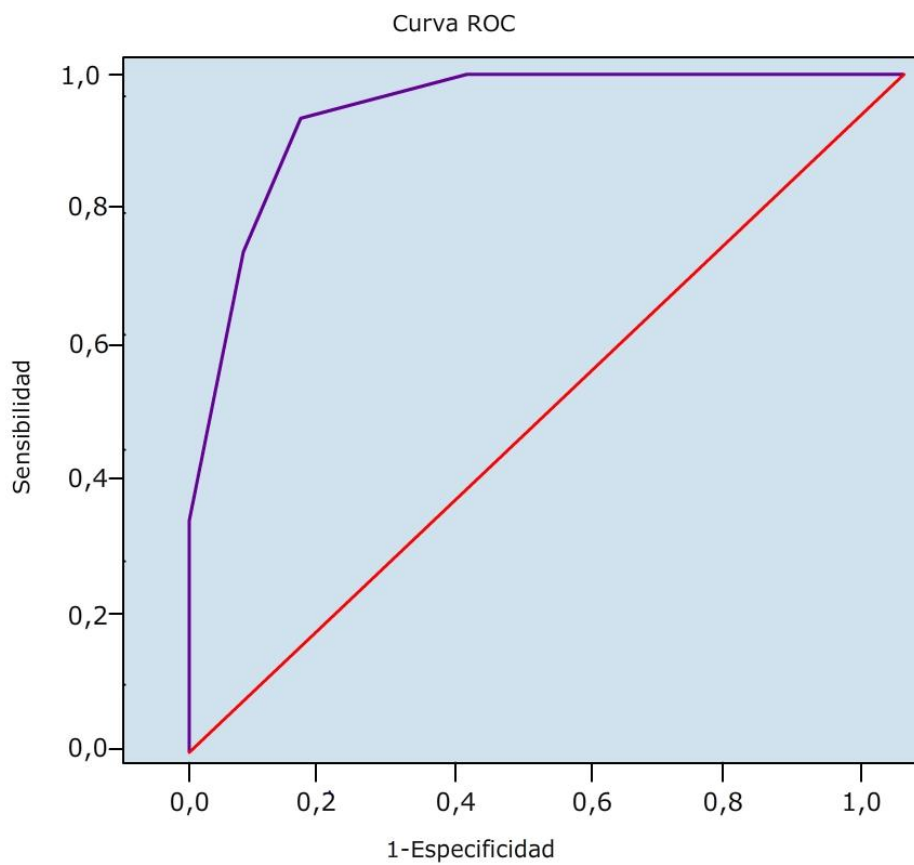


Figura 4.15: Curva ROC de la escala de gravedad simplificada de HSCR.

Tabla 4.7: Sensibilidad y 1- especificidad de los diferentes puntos de corte de la escala simplificada.

Positivo si es mayor o igual que ^a	Sensibilidad	1-Especificidad
0	1,000	1,000
1,5	1,000	0,923
2,5	1,000	0,769
3,5	1,000	0,385
4,5	0,933	0,154
5,5	0,733	0,077
6,5	0,333	0,000
7,5	0,200	0,000
8,5	0,067	0,000
10	0,000	0,000

a: El menor valor de corte es el valor de contraste observado mínimo menos 1, mientras que el mayor valor de corte es el valor de contraste observado máximo más 1. Todos los demás valores de corte son la media de dos valores de contraste observados ordenados y consecutivos.

4.6. Aplicación de ambas escalas sobre nuestra cohorte HSCR

La escala de valoración de gravedad de HSCR fue aplicada de forma retrospectiva a todos los pacientes de nuestra cohorte HSCR. La Tabla 4.8 muestra los resultados de los parámetros valorados en la escala en ambos grupos. El grupo grave presentó puntuaciones medias y medianas superiores ($13,15 \pm 2,36$; mediana= 14) respecto al no grave ($8,15 \pm 2,13$; mediana = 8) (Figura 4.16), indicando el test de M-W-W diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$) entre ambos grupos. En la escala simplificada, la puntuación media y mediana del grupo grave fue de $6,27 \pm 1,33$ y 6 respectivamente, frente a los valores de $3,31 \pm 1,29$ y 3 obtenidos en el no grave (Figura 4.14). De nuevo el test de M-W-W nos proporcionó diferencias estadísticamente significativas entre los 2 grupos ($p < 0,001$).

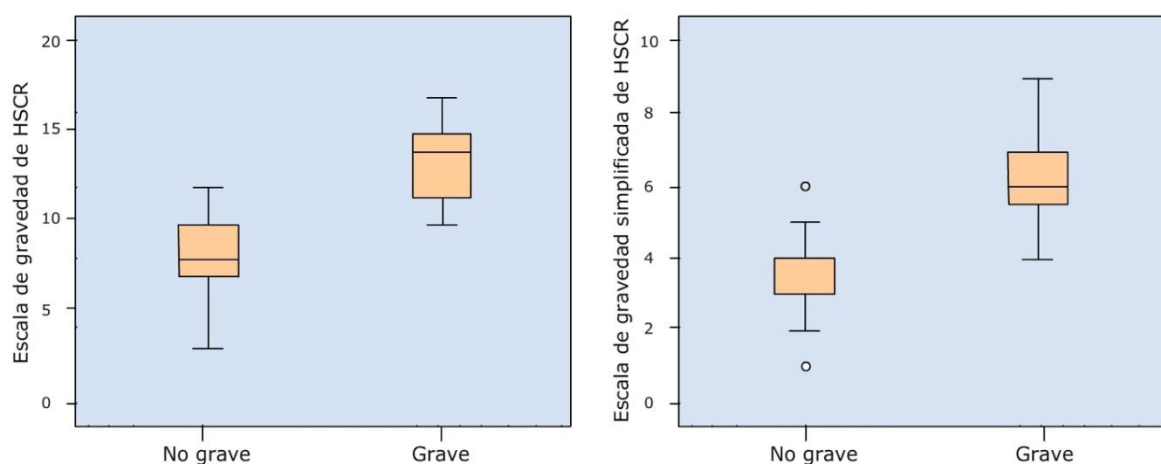


Figura 4.16: A: Puntuaciones de los dos grupos en la escala de gravedad.
B: Puntuaciones de los dos grupos en la escala de gravedad simplificada.

Tabla 4.8: Comparación de los subgrupos grave y no grave.

Variables	Grave (n=15)	No grave (n=26)	P
Edad al diagnóstico			0,099***
Media \pm SD	87,5 \pm 114,6	588,4 \pm 1333,8	
Mediana; IQR	32; 148	70,5; 205	
Sexo			0,038*
Hombre	7 (46,7%)	21 (80,8%)	
Mujer	8 (53,3%)	5 (19,2%)	
Antecedentes familiares de HSCR			0,243*
Ausencia	12 (80%)	25 (96,2%)	
1° grado	2 (13,3%)	0	
2° grado	1 (6,7%)	1 (3,8%)	
Síndromes/otras malformaciones asociadas			0,026*
HSCR aislado	9 (60%)	24 (92,3%)	
Síndrome no Down/WS4/otra neurocristopatía	2 (13,3%)	1 (3,8%)	
DS	4 (26,7%)	1 (3,8%)	
Evacuación de meconio			0,001*
<24 h	0	6 (23,1%)	
>24h	2 (13,3%)	13 (50%)	
>48 h	13 (86,7%)	7 (26,9%)	
Debut clínico			0,167*
Estreñimiento	2 (13,3%)	10 (38,5%)	
Obstrucción intestinal	11 (73,3%)	11 (42,3%)	
Enterocolitis o perforación	2 (13,3%)	5 (19,2%)	
Ampolla vacía en exploración rectal	12 (80%)	6 (23,1%)	0,001**
Extensión del aganglionismo			<0,0001*
Ultracorto	0	2 (7,7%)	
S-HSCR	4 (26,7%)	21 (80,8%)	
L-HSCR	2 (13,3%)	2 (7,7%)	
TCA	9 (60%)	1 (3,8%)	
Efectividad del <i>nursing</i>			<0,0001*
No precisado/no realizado	1 (6,7%)	4 (15,4%)	
Efectivo	3 (20%)	20 (76,9%)	
No efectivo	11 (73,3%)	2 (7,7%)	
Hallazgos del EC			0,001*
Normal/sin hallazgos relevantes	1 (6,7%)	7 (26,9%)	
ZI presente	5 (33,3%)	17 (65,4%)	
Microcolon/colon disminuido de calibre	9 (60%)	2 (7,7%)	

*Test Exacto de Fisher. **Test de Chi-cuadrado de Pearson. ***Test M-W-W.

4.7. Estudio genético de la cohorte HSCR

4.7.1. Análisis molecular del proto-oncogén *RET*

El proto-oncogén *RET* es el principal gen asociado a HSCR habiéndose descrito más de 100 mutaciones de distintos tipos en pacientes HSCR, y teniendo una frecuencia mutacional del 7-20% en pacientes esporádicos y hasta un 50% en casos familiares (Amiel y cols, 2008). Por esta razón, el rastreo de *RET* en pacientes HSCR resulta fundamental. En el presente trabajo hemos analizado la secuencia codificante (*Coding Sequence*, CDS) de *RET* mediante dHPLC (seguida de secuenciación cuando era pertinente) y MLPA en 42 pacientes, de los cuales 40 eran casos esporádicos y 2 casos familiares pertenecientes a 2 familias. El rastreo de mutaciones puntuales por dHPLC/secuenciación reveló la presencia de diversas variantes de secuencia que habían sido previamente descritas como polimorfismos, eran sustituciones sinónimas o se localizaban en regiones no codificantes de los genes. No encontramos evidencias de que

ninguna de las variantes sinónimas o localizadas en la región no codificante, produjeran ninguna alteración en el proceso de transcripción, maduración o traducción, al someterlas a distintas herramientas bioinformáticas. No obstante, además de todas esas variantes no asociadas a la enfermedad, se encontró que 9 pacientes presentaban 11 variantes de secuencia en heterocigosis (8 de ellas diferentes) presumiblemente patogénicas según la bibliografía y datos disponibles en el momento de los hallazgos, o bien según las predicciones bioinformáticas *in silico* (Tabla 4.9). Concretamente, la variante c.2944C>T (p.Arg982Cys) había sido previamente descrita como asociada a la enfermedad (Sasaki y cols, 2003) y se detectó en 3 de nuestros pacientes. Las 7 variantes restantes no habían sido descritas con anterioridad: 5 sustituciones aminoacídicas y 2 alteraciones de la pauta de lectura.

En cuanto al rastreo mediante MLPA de variaciones en el número de copias (*Copy Number Variation*, CNVs) de 1 o varios exones de *RET*, no se detectó ninguna delación, duplicación o inserción en la serie de pacientes.

Cabe destacar que la vía de transmisión más frecuente de las mutaciones puntuales codificantes halladas en los pacientes fue la materna (4 de 11 pacientes) seguida de la paterna y la aparición *de novo* (3 pacientes en grupo). En un caso no pudo realizarse estudio a los progenitores.

Con estos datos, la frecuencia mutacional en *RET* de nuestra cohorte de 42 pacientes HSCR es del 17,5% en casos esporádicos (7 pacientes con mutaciones de 40 casos esporádicos) y del 100% en casos familiares (2 familias con mutaciones de las 2 estudiadas).

La ubicación de las variantes en los dominios funcionales de la proteína se puede observar en la Figura 4.17.

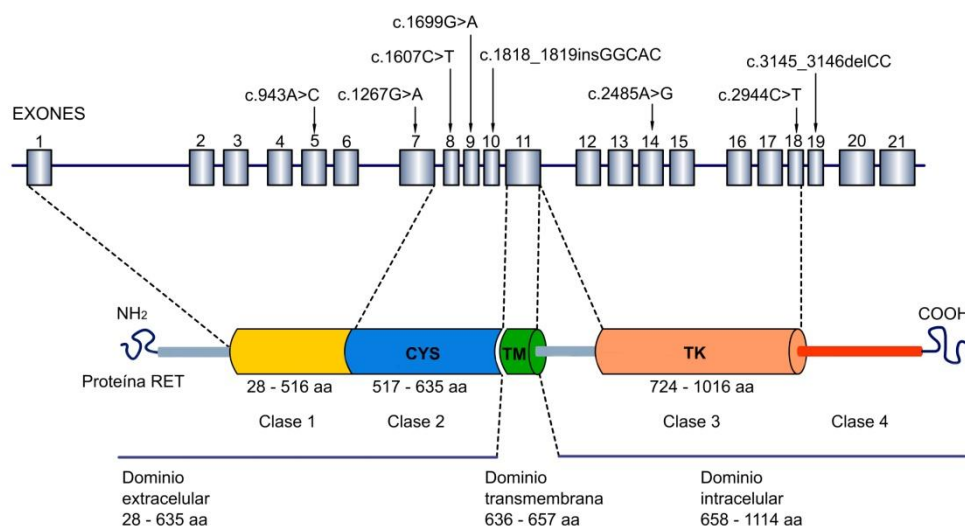


Figura 4.17: Localización de las diferentes variantes identificadas en *RET*.

4.7.2. Evaluación de la variante Enhancer (c.73+9277T>C) de *RET* en pacientes HSCR como factor de susceptibilidad

La variante *Enhancer* en el intrón 1 (c.73+9277T>C, rs2435357), ha demostrado ser un factor de susceptibilidad genético con una contribución a la aparición de HSCR, 20 veces mayor que las mutaciones codificantes. Por este motivo, se realizó su genotipación en los 42 casos de nuestra cohorte, identificándose su presencia en 30 de los pacientes (71,4%, el 50% de ellos en heterocigosis y el otro 50% en homocigosis).

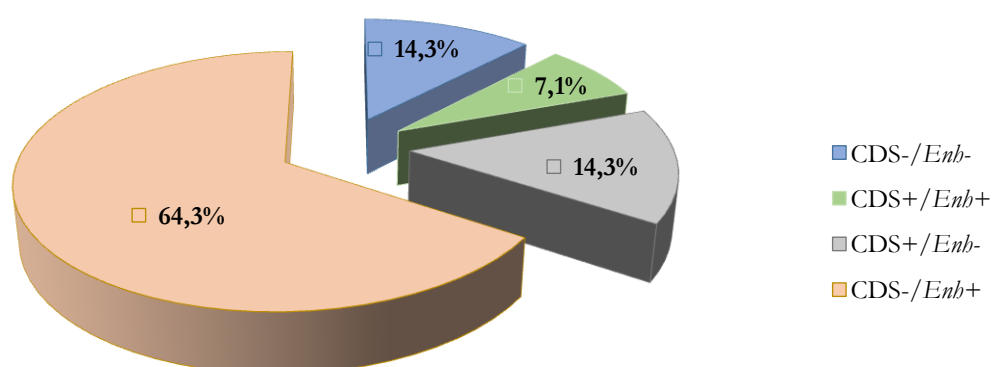


Figura 4.18: Distribución de la cohorte de pacientes HSCR según tengan mutaciones en secuencia codificante de *RET* (CDS+) y de la variante *Enhancer* (Enh+).

4.7.3. Exclusión de mutaciones en el proto-oncogén *RET* que predisponen al desarrollo de MEN 2 en pacientes HSCR

Se estima que aproximadamente el 92% de los casos de MEN 2 presentan mutaciones germinales en 6 exones distintos de *RET* (exones 10, 11, 13, 14, 15 y 16) (Eng, 1996; Eng, 1999). Muy recientemente se han descrito también mutaciones en los exones 5, 7 y 8 de *RET* asociadas a MEN 2, aunque son muy poco frecuentes (Genereviews MEN 2). En el caso concreto de MEN 2A, el 98% de los pacientes tienen mutaciones germinales agrupadas en un “sitio caliente” que se corresponde con 5 codones cisteínicos presentes en el dominio extracelular de la proteína (codones Cys609, Cys611, Cys618, Cys620 y Cys634) (Mulligan y cols, 1994; Eng, 1996). También un 80% de los casos de FMTC se deben a mutaciones en dichos codones. Dada la existencia de algunas familias en las que cosegregan MEN 2A/FMTC y HSCR debido a la presencia de mutaciones que afectan a esos codones cisteínicos, parece más que razonable el análisis de *RET* en los pacientes HSCR. Un paciente portador de mutación asociada a MEN2 tiene un riesgo del 100% de desarrollar el tumor, de ahí que la tiroidectomía profiláctica sea el único tratamiento eficaz (Nozhat y Hedayati, 2016). Por ello, varios autores defienden que el manejo integral de los pacientes HSCR exige el despistaje de mutaciones en el proto-oncogén *RET* asociadas a MEN 2 (Moore y cols, 2009b).

Todos los exones referidos son analizados por nuestro grupo de forma rutinaria. Ninguna de las 8 mutaciones detectadas en el proto-oncogén *RET* en nuestra cohorte implicó a los codones de riesgo para desarrollar MEN 2.

4.7.4. Análisis molecular de los genes *EDNRB* y *EDN3* en pacientes HSCR

En el presente trabajo se realizó también el análisis de la región codificante de *EDNRB* y *EDN3* en nuestra serie completa de pacientes HSCR mediante dHPLC/secuenciación y MLPA. Mientras que análisis de CNVs por MLPA resultó negativo, el rastreo de mutaciones puntuales mediante dHPLC/secuenciación reveló una única variante de secuencia en *EDNRB* no descrita previamente. Se trata de la mutación puntual c.1169delC (p.Ser390Argfs*31) localizada en el exón 6 de dicho gen. Esta mutación es responsable de la pérdida de la pauta de lectura en el mRNA, dando lugar a una secuencia

proteica completamente diferente a partir de la posición 390. La paciente afecta presenta un HSCR aislado y esporádico de tipo TCA. No se pudo determinar si la variante era un evento *de novo* o si había sido heredada de alguno de sus progenitores. Cabe destacar que en este caso también se identificó la presencia de la variante intrónica c.73+9277T>C del proto-oncogén *RET* en heterocigosis.

4.7.5. Análisis molecular del gen *SOX10* en pacientes WS4

La asociación de mutaciones en el gen *SOX10* con WS4 es bien conocida, por lo que en estos casos el estudio genético realizado a nuestra cohorte incluyó el rastreo molecular de este gen por secuenciación y MLPA. Sin embargo, dada su baja frecuencia, no se realizó estudio molecular del gen *SOX10* en los pacientes con HSCR aislado.

En el presente trabajo se analizó la región codificante de *SOX10* en los 3 pacientes previamente descritos en el apartado 4.2, que presentaban criterios clínicos compatibles con WS4. Se identificó mutación causal en 2 de los casos (Figura 4.19).

En el caso 1 (paciente n° 23, Tabla 4.1) se identificó una mutación *de novo* c.915delG (p.His306Thrfs*5) en el exón 5 de *SOX10*, previamente descrita (Viñuela y cols, 2009). Se trata de la delección de una guanina en la posición 915 que genera un desplazamiento en el marco de lectura, dando lugar a la aparición de un codón de parada prematuro 5 Aa después. Tanto el paciente como sus padres eran portadores de la variante intrónica c.73+9277T>C de *RET* en heterocigosis (Fernández y cols, 2014).

En el caso 2 (paciente n° 28, Tabla 4.1) se realizó estudio genético al caso índice, sus padres y la abuela materna. El rastreo mutacional reveló la presencia de una mutación en heterocigosis, no descrita previamente, en el exón 5 del gen *SOX10*. Se trata de una inserción de 19 nucleótidos, c.1107_1108ins GCTGGGGCCCCCACACTAC (c.1107ins19 según nomenclatura antigua, Fernández y cols, 2014), que genera una alteración de la pauta de lectura a partir de la posición aminoacídica 370, y un codón de parada prematuro 38 residuos después (p.Thr370Serfs*38). Esta mutación estaba también presente en su madre y su abuela, que tenían manifestaciones clínicas compatibles con WS aunque no HSCR. En ninguno de los miembros de la familia se identificó la variante intrónica c.73+9277T>C de *RET*.

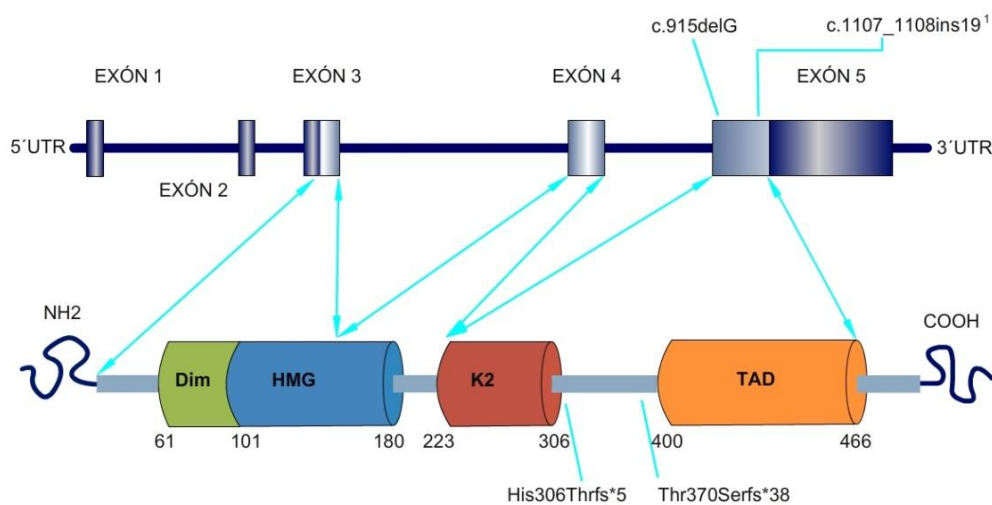


Figura 4.19: Mutaciones identificadas en los 2 pacientes WS4.

Representación esquemática del gen y la proteína *SOX10*, indicando las posiciones específicas afectadas por las mutaciones.
¹Los 19 nucleótidos de la inserción corresponden a la secuencia GCTGGGGCCCCCACACTAC.

Se analizó un tercer caso (paciente n° 33, Tabla 4.1) que cumple criterios clínicos de WS4: heterocromía de iris, antecedentes familiares de WS y aganglionismo extenso. Sin embargo, no se identificaron mutaciones patogénicas puntuales en la región codificante de *SOX10*. El paciente era portador de la variante intrónica c.73+9277T>C de *RET* en homocigosis.

4.8. Asociación entre fenotipo grave y resultados del estudio molecular

Se identificó mutación relacionada con la enfermedad en 12 de los 42 pacientes analizados, la mayoría de ellos catalogados como graves según los criterios previamente descritos. Concretamente, 8 de los 15 pacientes (53,3%) del grupo grave presentaron mutaciones genéticas frente a 4 de los 26 pacientes (15,3%) del grupo no grave (test exacto de Fisher, $p=0,015$).

La Tabla 4.9 sintetiza los resultados del estudio molecular, las características más importantes y sus puntuaciones en la escala gravedad de HSCR y su versión simplificada.

Tabla 4.9: Características de los pacientes con resultado positivo en el estudio molecular.

Paciente	Presentación	Extensión del aganglionimo	Gen	Exón	Mutación	Naturaleza; Herencia	Escala gravedad	Escala gravedad simplificada
10	Aislado Familiar	L-HSCR	RET	18	c.2944C>T; p.Arg982Cys	Miscense; Paterna	12	5
12	DS	S-HSCR	RET	9	c.1699G>A; p.Asp567Asn	Miscense; Paterna	10	6
15	Aislado esporádico	S-HSCR	RET	5	c.943A>G; p.Thr315Pro	Miscense; Materna	8	4
18	Aislado esporádico	L-HSCR	RET	10	c.1818_1819insGGCAC; p.Gly607Glyfs*32	Frameshift, nonense; De novo	11	5
21	Aislado esporádico	S-HSCR	RET	7 14	c.1267G>A; p.Gly423Arg c.2485A>G; p.Ser829Gly	Miscense; Paterna Miscense; Materna	7	3
24	Aislado esporádico	TCA	RET	8	c.1607C>T; p.Ser536Phe	Miscense; De novo	15	6
31	Aislado familiar	TCA	RET	19	c.3145_3146delCC; p.Pro1049Serfs*8	Frameshift, nonense; Materna	16	6
35	Aislado esporádico	TCA	RET	18 9	c.2944C>T; p.Arg982Cys c.1699G>A; p.Asp567Asn	Miscense; Materna Miscense; De novo	15	6
36	DS	S-HSCR	RET	18	c.2944C>T; p.Arg982Cys	Miscense; No disponible	11	7
6	Aislado esporádico	TCA	EDNRB	6	c.1169delC; p.Ser390Argfs*31	Frameshift, nonense; No disponible	14	6
23	WS4	TCA	SOX10	5	c.915delG; p.His306Thrfs*5	Frameshift, nonense; De novo	17	8
28	WS4	S-HSCR	SOX10	5	c.1107_1108ins191; p.Thr370Serfs*38	Frameshift, nonense; Materna	10	6

¹Los 19 nucleótidos de la inserción corresponden a la secuencia GCTGGGGCCCCCACACTAC.

5. Discusión



5.1. Análisis descriptivo de la serie. Aspectos diferenciales entre los subgrupos grave y no grave

5.1.1. Incidencia

La incidencia de HSCR se estima en 1 por cada 5000 nacidos vivos (Kenny y cols, 2010). Sin embargo, varía significativamente entre diferentes grupos étnicos y parece ser superior entre la población asiática (2,8/10.000 nacidos vivos), seguida por la afro-americana (2,1/10.000), la caucásica (1,5/10.000) y la hispánica (1/10.000) (Amiel y cols, 2008). En el norte de Reino Unido, Best y cols, en 2012, analizaron la prevalencia de esta entidad situándola en 1,63 por cada 10.000 nacidos vivos, pero con una clara tendencia ascendente en los últimos años. Del mismo modo, el estudio europeo más amplio publicado hasta el momento, que recogió datos de 31 países a lo largo de 30 años, estimó la prevalencia de HSCR en 1,09 por cada 10.000 nacidos vivos, demostrándose el mismo comportamiento a lo largo del tiempo (Best y cols, 2014). Durante el período que abarca nuestro estudio (1983-2013), encontramos en Extremadura un aumento significativo en el número de casos (0,94 casos por cada 10.000 nacidos vivos en el primer período frente a 2 por cada 10.000 nacimientos en el último (Figura 5.1). El complejo Hospitalario Universitario de Badajoz es el centro de referencia de la Comunidad Autónoma para el diagnóstico y tratamiento de HSCR. Interpretamos este incremento en relación a un probable descenso en el número de derivaciones a otras comunidades desde el inicio del estudio, sumado a un aumento real de la prevalencia de la enfermedad, tal como describen otros autores.

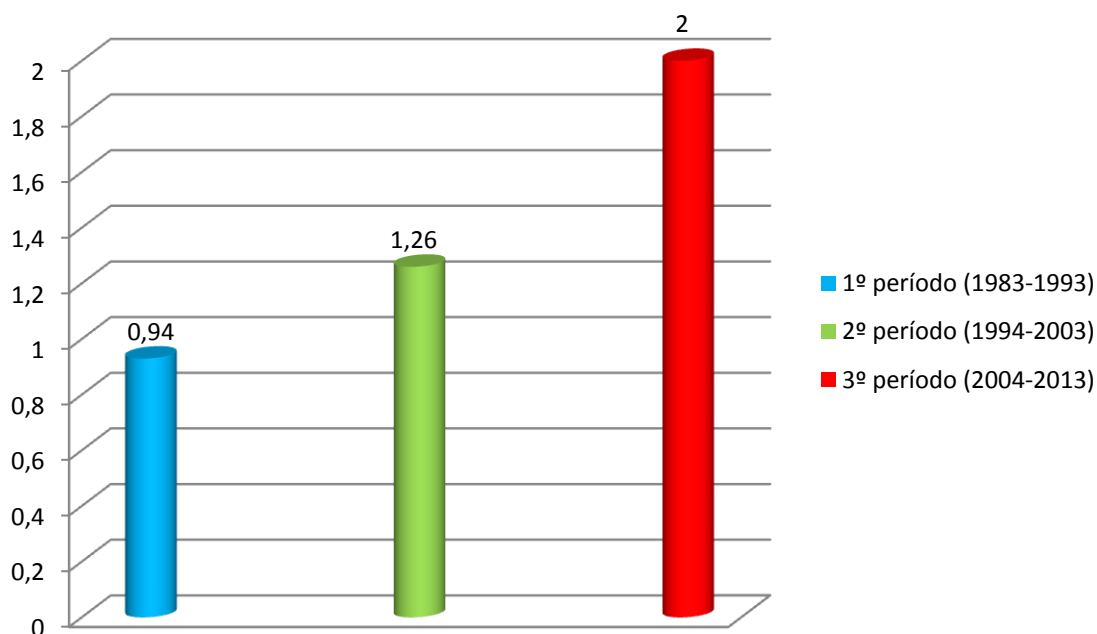


Figura 5.1: Número de casos nuevos de HSCR por 10.000 nacidos vivos en Extremadura entre 1983-2013.

Los 15 pacientes clasificados como graves se distribuyeron a lo largo del tiempo de la siguiente forma: 3 fueron diagnosticados en el primer período (entre ellos 1 caso de TCA) y 6 tanto en el segundo como en el tercer período (6 y 3 casos de TCA respectivamente), por lo que en conjunto el porcentaje de pacientes graves en cada intervalo osciló entre el 30 y el 50% (Figura 5.2). El período que reunió mayor

porcentaje de casos graves (50%, 2º período), corresponde también a aquel en el que mayor número de pacientes TCA fueron diagnosticados (6 de 10 casos).

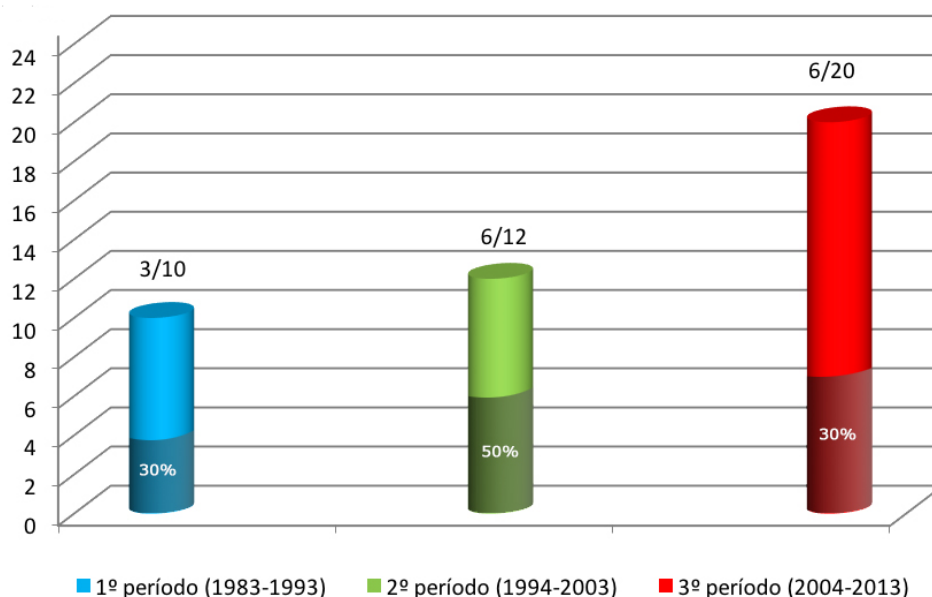


Figura 5.2: Distribución de los casos clasificados como graves por la escala en los 3 períodos del estudio.
Casos graves/Casos totales de cada período.

5.1.2. Distribución por género

Se describe un claro predominio de varones afectados, siendo la ratio hombre:mujer de 4:1. Curiosamente, esta proporción es significativamente mayor para las formas S-HSCR respecto a L-HSCR (Amiel y cols, 2008). Nuestros datos confirman el predominio de sexo masculino para esta enfermedad; de los 42 pacientes estudiados, 29 correspondieron a pacientes varones (69%) y 13 a mujeres. También comprobamos en nuestra serie este sesgo relacionado con el sexo, de modo que para las formas cortas (ultracorta y S-HSCR) la proporción hombre:mujer fue de 3,67:1 y para las extensas (L-HSCR y TCA) de 1:1. La distribución de nuestra serie según el sexo y fenotipo de HSCR se recoge en la Figura 5.3.

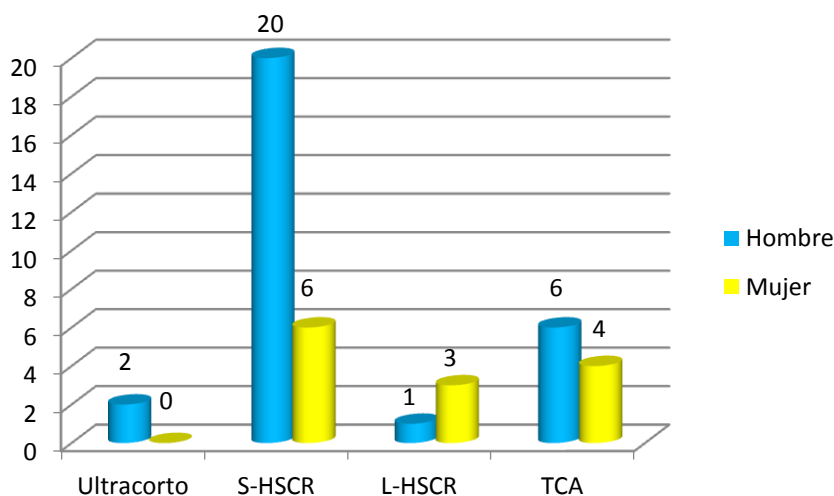


Figura 5.3: Distribución de la serie según el sexo y fenotipo HSCR.

5.1.3. Edad al diagnóstico

Aunque se han comunicado casos aislados, la sospecha prenatal de HSCR es infrecuente (Meyers, 2016) y se estima que el valor de la ecografía fetal para confirmar o excluir el aganglionismo es muy reducido (Belin y cols, 1995; Jakobson-Setton y cols, 2015). En nuestra serie no existió sospecha prenatal de HSCR en ningún caso, de forma similar a lo comunicado por otros autores (Best y cols, 2012).

Habitualmente HSCR se considera una patología propia del período neonatal, describiéndose que hasta un 80-90% de los pacientes son diagnosticados en las primeras 4 semanas de vida (Guo y cols, 2006). Estudios recientes difieren de este dogma clásico y sugieren una presentación posiblemente más tardía, al observar en una cohorte de más de 10.000 pacientes, que solo el 6,5% debutó en el período neonatal y el 60% en los 12 primeros meses de vida, siendo en este grupo la mediana de edad al diagnóstico de 1 año (Aboagye y cols, 2014). Nuestra experiencia ofrece una posición intermedia: un 26,2% de la serie fue diagnosticada en el período neonatal y el 83,3% en el primer año de vida, con una media de edad al diagnóstico de $386,6 \pm 1056,7$ y una mediana de 52 días (rango 2 días-14,02 años), medida más representativa en nuestro caso por la elevada dispersión que mostraron los datos.

Respecto a la edad de diagnóstico y el fenotipo de HSCR, la extensión del aganglionismo a menudo condiciona que el debut clínico sea más precoz en el TCA. Así, de forma similar a lo descrito por otros autores (Ikeda y Goto, 1986; Moore, 2015), encontramos un porcentaje de diagnóstico de TCA en el período neonatal del 70%. Excepcionalmente se han comunicado diagnósticos muy tardíos para este fenotipo (Lall y cols, 1999), si bien en nuestra serie no encontramos ningún paciente con TCA diagnosticado por encima de los 2 meses de edad. De acuerdo con esta tendencia, encontramos diferencias en la edad al diagnóstico entre los subgrupos grave y no grave (media 87,5 *vs* 588,4 días; mediana 32 *vs* 70,5; Tabla 4.8), aunque no alcanzaron significación estadística ($p = 0,099$).

Esta gran variabilidad respecto al momento de presentación más frecuente de HSCR puede estar relacionada, entre otros factores, con el índice de sospecha o los criterios definidos para la selección de los casos. La mayoría de los grupos, y también el nuestro, consideran requisito indispensable para establecer el diagnóstico de confirmación la realización de una BR o intestinal.

5.1.4. Antecedentes familiares de HSCR

HSCR aparece habitualmente como un evento esporádico. Este fue el caso de la gran mayoría de los pacientes estudiados, en los que no existió historia familiar previa. Identificamos 2 formas familiares correspondientes a 2 familias distintas (4,7%), proporción similar a la referida en la literatura (Moore y cols, 1991). En otros 2 casos se identificaron antecedentes de HSCR en familiares de 2º grado.

Se estima que la frecuencia de casos familiares es hasta 10 veces más frecuente entre los aganglionismos muy extensos que en las formas S-HSCR (Moore y cols, 1991). Nuestra serie apoya este hecho; las dos formas familiares correspondieron a fenotipos L-HSCR y TCA y los dos pacientes con familiares de 2º grado afectados presentaron un TCA. No se detectaron antecedentes familiares en ningún caso de afectación rectosigmoidea o ultracorta. Tras aplicar los criterios de enfermedad grave y dividir la muestra en los subgrupos grave y no grave, encontramos diferencias en cuanto a la presencia de antecedentes familia-

res (20% *vs* 3,8%). Sin embargo, no alcanzaron significación estadística, probablemente por el pequeño tamaño muestral.

5.1.5. Síndromes y malformaciones asociadas

Nuestros resultados concuerdan con lo descrito en cuanto a las malformaciones y síndromes asociados. Aproximadamente el 70% de los pacientes HSCR no tiene otras manifestaciones clínicas adicionales, mientras que en el 30% restante, este fenotipo se presenta en el contexto de un síndrome, asociado a otras malformaciones congénitas o a otros desórdenes genéticos adicionales (Amiel y cols, 2008). En concreto, HSCR aparece asociado a una cromosomopatía en un 12% de los casos, siendo la trisomía 21 la más frecuente (>90%) (Chakravarti y Lyonnet, 2001). En nuestra cohorte, HSCR se presentó como un evento aislado en el 81% de los casos y asociado a un síndrome más complejo en el 19% restante.

Confirmamos también la conocida asociación entre HSCR y DS, al encontrar una frecuencia de DS en nuestra serie HSCR del 11,9% (5 casos), similar a la de otros estudios, que la sitúan entre el 2 y el 10% (Goldberg, 1984; Spouge y Baird, 1985; Amiel y cols, 2008). Al igual que en los casos no sindrómicos, el fenotipo más frecuente fue S-HSCR (4/5 casos), hallazgo que concuerda por lo comunicado en series más amplias (Friedmacher y Puri, 2013). La mayoría de ellos (80%) presentaron un comportamiento grave, que explicamos por el elevado número de episodios de enterocolitis diagnosticados en estos pacientes.

Los síndromes reportados en asociación con HSCR son numerosos. Con frecuencia aparece asociado a otras neurocristopatías, destacando entre ellas WS, la asociación MEN 2A y el NB. La coexistencia de WS y HSCR es infrecuente, sin embargo, su incidencia es llamativamente mayor a la esperable por la coincidencia de ambos trastornos por azar, habiéndose descrito más de un caso por cada 100 casos de megacolon. En nuestra cohorte, identificamos un número relevante de casos con diagnóstico de WS4 (3/42 casos), aspecto que ha sido previamente comunicado por nuestro grupo (Fernández y cols, 2014). Dos de estos pacientes cumplieron los criterios de enfermedad grave.

No identificamos otros síndromes ni malformaciones asociadas a HSCR, a excepción de las cardiopatías congénitas que presentaron 3 de los 5 pacientes con trisomía 21, ofreciendo una prevalencia acorde a la descrita (Duess y Puri, 2015). Este aspecto que refuerza la necesidad de realizar despistaje de anomalías cardíacas en los casos de HSCR sindrómico (Duess y Puri, 2015).

En nuestra serie demostramos diferencias respecto a esta variable entre el grupo grave y no grave, de forma que la presencia de síndromes y malformaciones asociadas fue significativamente mayor en el grupo grave ($p = 0,026$), siendo este uno de los ítems de la escala que mostró mayor capacidad predictora de gravedad. Esto es esperable por el aumento de morbilidad que confieren las anomalías asociadas así como el posible retraso diagnóstico de HSCR cuando aparece en el contexto de un síndrome más complejo. Otros autores también han encontrado un aumento de complicaciones y peores resultados funcionales en los pacientes HSCR sindrómicos (Friedmacher y Puri, 2013b).

5.1.6. Evacuación de meconio

El retraso en la evacuación meconial es uno de los aspectos clínicos fundamentales que caracterizan a HSCR. En el 95% de los recién nacidos a término sanos, la meconiorrexia ocurre en las primeras 24 horas de vida, aumentando el porcentaje hasta el 99% en las primeras 48 horas (Bekkali y cols, 2008, Núñez-Ramos y

cols, 2011). Por otro lado, menos del 10% de los pacientes HSCR evacúan meconio en las primeras 24 horas. El escenario es diferente en el caso de los recién nacidos pretérmino, dado que solo el 66% de los menores de 32 semanas evacúan meconio en las primeras 48 horas de vida (Weaver y Lucas, 1993). Analizamos este aspecto también en nuestra serie, en la que todos los pacientes presentaron una edad gestacional superior a las 35 semanas. De los 42 pacientes incluidos en el estudio, el 85,7% presentaron un retraso en la evacuación de meconio superior a 24 horas, siendo en el 50% de los casos superior a 48 horas.

Esta variable mostró diferencias significativas al ser considerada en los subgrupos grave y no grave. Ningún paciente con criterios de enfermedad grave presentó una evacuación de meconio en las primeras 24 horas, siendo mayoritario en este subgrupo el porcentaje de pacientes con meconiorrexis superior a las 48 horas (86,7%). La situación fue muy distinta en los pacientes clasificados por nuestros criterios como no graves. Entre ellos, encontramos un 23,1% con evacuación meconial en el primer día de vida, un 50% con meconiorrexis entre las 24 y 48 horas de vida y un retraso superior a las 48 horas en el 26,9% restante ($p < 0,001$). De nuevo, este fue un ítem que mostró capacidad predictora de gravedad y que consideramos como muy adecuado para constituir la escala por la objetividad en su cumplimentación.

El retraso meconial no es específico de la enfermedad, pero sí debe alertar sobre la posibilidad de su existencia. Por ello, ante un retraso en la evacuación de meconio, en un niño sano y por lo demás asintomático, en nuestro centro se realiza MA como método de screening de HSCR, habiendo demostrado ser un método sencillo, inocuo y de gran sensibilidad y especificidad para su diagnóstico (Enríquez y cols, 2010). Esto permitió que, aunque el porcentaje de pacientes con diagnóstico de confirmación en el período neonatal fue inferior a un tercio del total, el diagnóstico de sospecha de HSCR por registro anómalo patológico (ausencia de RIA, Figura 4.3) se estableciera en el período neonatal en el 45,2% de los casos. Es por esto que algunos grupos, entre los que se incluye el nuestro, consideran el retraso meconial la principal indicación de MA en el recién nacido (Tuduri y cols, 2008).

5.1.7. Presentación clínica

HSCR suele manifestarse en forma de obstrucción intestinal, estreñimiento de larga evolución o enterocolitis (Langer, 2013). El cuadro clínico depende en gran medida de si la enfermedad se manifiesta o no en el período neonatal. Típicamente, el neonato afecto es un recién nacido a término y de peso adecuado que presenta rechazo de la alimentación, vómitos y distensión abdominal. Sin embargo, en algunos casos, HSCR se manifiesta en el niño más mayor en forma de estreñimiento de evolución tórpida. Tanto para S-HSCR como para TCA, la presentación más frecuente es un cuadro de obstrucción intestinal funcional, más precoz en los casos de aganglionismos extensos. Sin embargo, aunque el debut en las primeras semanas de vida es acorde al cuadro clínico esperable para el fenotipo TCA, con frecuencia se describen presentaciones más tardías a las esperables (Moore, 2015).

En nuestra experiencia, la obstrucción intestinal fue la forma de debut de la mayoría de los pacientes (54,8%), especialmente en el subgrupo que cumplió nuestros criterios de enfermedad grave, siendo esta la presentación del 73,3% de estos casos. En el subgrupo no grave el debut clínico se repartió de forma más homogénea entre la obstrucción intestinal (42,3%) y el estreñimiento (38,5%). En ambos grupos, menos del 20% desarrolló una enterocolitis como presentación, siendo esta la manifestación inicial minoritaria aunque de

mayor gravedad, también en otras series (Demehri y cols, 2013). Estas diferencias en la distribución de la presentación clínica en los grupos grave y no grave no alcanzaron significación estadística, de forma que esta variable no mostró capacidad predictora de gravedad y no fue seleccionada para constituir la escala simplificada.

Consideramos que la forma de debut clínico no tuvo el peso esperado como factor pronóstico probablemente porque presentaciones precoces con clínica cardinal de obstrucción intestinal permiten un diagnóstico precoz y el establecimiento de un tratamiento dirigido adecuado desde fases iniciales de la enfermedad.

5.1.8. Exploración rectal

En la exploración rectal del recién nacido con sospecha de HSCR es típico encontrar un ano estrecho que muestra resistencia a la inserción del dedo del explorador (Guo y cols, 2006), a pesar de que este hallazgo es considerado poco fiable por algunos autores (Teitelbaun y cols, 1998). Aunque con las limitaciones propias de una recogida retrospectiva de los hallazgos de la exploración física y de una descripción explorador-dependiente, esta variable mostró diferencias significativas al ser estudiada en los pacientes clasificados como graves y no graves. Así, en nuestra serie ningún paciente presentó una exploración del canal anal normal. La mayoría de los pacientes con evolución grave (12/15), presentaron una ampolla vacía al TR, frente a 6/26 en el grupo no grave, en el que predominó la presencia de una ampolla adherente o seguida de deposición explosiva, reflejo de que a través de la exploración digital se logra superar el espasmo de la zona agangliónica ($p = 0,001$).

5.1.9. Tratamiento médico preoperatorio (*nursing*)

Otro aspecto valorado en nuestra serie fue el tratamiento preoperatorio y sus resultados. La mayoría de nuestros pacientes (88,1%) recibió irrigaciones rectales o *nursing* tras el diagnóstico. Solo en un pequeño porcentaje, correspondiente a casos de diagnóstico tardío que cursaron con estreñimiento pertinaz, este tratamiento no fue considerado. Entre los 37 pacientes sometidos a *nursing*, encontramos una eficacia del mismo del 64,8% (24 pacientes). De ellos, la gran mayoría no cumplió los criterios de gravedad definidos, de forma que el tratamiento médico preoperatorio fue eficaz en aproximadamente 9 de cada 10 pacientes con evolución no grave pero solo en 1 de cada 4 pacientes con evolución grave ($p < 0,001$). El 35,1% restante no respondió al manejo conservador siendo preciso realizar una ostomía de descarga, porcentaje discretamente inferior al que comunican otros autores (Pini Prato y cols, 2008).

5.1.10. Extensión del aganglionismo

De acuerdo a la extensión del aganglionismo, nuestra cohorte se asemeja a lo descrito por otros autores, con un predominio de formas de segmento corto (ultracorta y S-HSCR; 28 casos, 66,7%) frente a las formas de segmento largo (L-HSCR y TCA; 14 casos, 33,3%). Comunicamos un número superior de TCA (10 casos, 23,8%) respecto a lo referido en la mayoría de las series, en las que el porcentaje oscila entre el 2 y el 14% (Moore y cols, 2009b).

Aunque hoy sabemos que la extensión del aganglionismo no es el único factor que determina la expresión clínica, tradicionalmente la gravedad de la enfermedad se ha correlacionado con la longitud de intestino enfermo. Este factor demostró tener clara implicación en la evolución de los pacientes de nuestra serie, de forma que el 90% de los TCA y el 50% de los L-HSCR cumplieron los criterios de gravedad,

frente al 16% de los S-HSCR. Esta distribución coincide con el pronóstico y los resultados funcionales comunicados por otros grupos, en los que se describe una morbimortalidad para el TCA que, aunque ha descendido en los últimos años, continúa siendo alta, con un porcentaje de enterocolitis postoperatoria superior al 50% (Menezes y cols, 2008).

De nuevo, este ítem mostró capacidad predictora de gravedad y desde una perspectiva clínica resulta fundamental valorarlo como un factor condicionante del comportamiento de la enfermedad. Como limitación, se ha de considerar un posible retraso en el reconocimiento de este aspecto, dado que la confirmación de la extensión del aganglionismo se obtiene de forma definitiva mediante las biopsias intraoperatorias. Sin embargo, es habitual disponer de una prueba de imagen desde los primeros momentos de la sospecha diagnóstica de la enfermedad que proporcione información suficiente para poder clasificarla en uno de los 4 fenotipos propuestos. Por ello, en nuestra opinión resulta muy adecuado que esta variable forme parte de la versión simplificada de la escala de gravedad.

5.1.11. Resultados del EC

Además de la manometría y de la BR o intestinal como pruebas complementarias para el diagnóstico de HSCR, es habitual la realización de un EC para conocer la extensión del aganglionismo antes de la corrección quirúrgica definitiva. Así, se realizó prueba de imagen en todos los pacientes de nuestra serie, siendo evaluados en el presente trabajo los resultados obtenidos en el primer estudio realizado. Los hallazgos radiológicos sugestivos de HSCR son múltiples. Además de la clásica ZT, se describen las irregularidades en la pared del colon, la inversión del índice rectosigmoideo o el retraso en la evacuación del contraste, entre otros (Alehossein y cols, 2015). Con el objetivo de estratificar los resultados, estos hallazgos se simplificaron en 3 categorías: normal o alteraciones poco relevantes, ZT presente y EC muy alterado, revelando la presencia de un colon por desuso o muy espástico, probablemente reflejo del aumento de actividad parasimpática.

En 8 casos de nuestra cohorte, el primer EC fue informado como normal o con alteraciones poco relevantes que inicialmente no fueron interpretadas como sugestivas de HSCR. Siete de estos pacientes fueron clasificados como formas no graves de la enfermedad. Llama la atención el caso restante, que presentó un fenotipo TCA con comportamiento grave en la evolución posterior. Este es un hecho conocido y descrito por otros autores: la concordancia entre la ZT radiológica e histológica es del 64,5% en los segmentos cortos pero mucho menor, en torno al 25%, en las formas largas (Granero y cols, 2010). Así, a medida que la extensión de la enfermedad aumenta, la probabilidad de que se identifique la ZT, y de que esta concuerde con la ausencia de neuronas a nivel patológico, disminuye. Por ello, el resultado del EC en los casos de aganglionismo de segmento largo tiene un porcentaje elevado de falsos negativos, al ser informados frecuentemente como normales, como ocurrió en nuestro paciente nº 33. En este sentido, Stranzinger y cols, en una revisión sobre la imagen del TCA, recuerdan que este diagnóstico debe ser siempre considerado en aquellos casos que persistan sintomáticos tras excluir otras causas de obstrucción intestinal, a pesar de mostrar una imagen normal en el enema (Stranzinger y cols, 2008).

A esto se añade que la ZT no se observa en un porcentaje significativo de neonatos con HSCR, que algunos autores han estimado en el 30%. Nuestra experiencia concuerda con estos hallazgos, de forma que el 50% de los enemas no concluyentes fueron realizados en el período neonatal inmediato. En nuestra

serie se identificó la ZT en 23 casos, la mayoría en el subgrupo que no cumplió los criterios de gravedad, aspecto que interpretamos en relación al mayor número de fenotipos S-HSCR entre estos casos.

En 11 casos la imagen mostró otras alteraciones, entre las que destacan el hallazgo de un colon globalmente disminuido de calibre, espástico o la presencia de un microcolon. Como era esperable, la mayoría de estos casos (81,8%) fueron clasificados como formas graves de la enfermedad.

Estas diferencias en los hallazgos del EC entre los grupos grave y no grave alcanzaron significación estadística. Sin embargo, dado que en presencia de otras variables, esta no aportaba información relevante, no fue seleccionada para constituir la escala simplificada. Consideramos que este resultado favorece la cumplimentación de la escala, dadas las limitaciones previamente descritas y las derivadas de un test observador-dependiente.

5.1.12. Tratamiento quirúrgico y resultados postoperatorios

El tratamiento definitivo de HSCR consiste en la resección del segmento agangliónico y la anastomosis del intestino sano al ano, preservando los mecanismos de la continencia fecal. Tradicionalmente se abordaba en varios estadios, realizándose una ostomía en el momento del diagnóstico, la resección del segmento agangliónico y el descenso posteriormente, seguido del cierre del estoma unos meses más tarde.

Durante el período de estudio en nuestro centro se han utilizado diferentes técnicas (Figura 5.4). La técnica de Rehbein, con alguna modificación (disección más distal del segmento agangliónico y el empleo de sutura mecánica en algunos casos), ha sido la más empleada en el período de 1983 a 2003, y continúa siendo elegida en la actualidad para aquellos casos que requieren laparatomía (L-HSCR o TCA). Si bien algunos autores la consideran obsoleta (Visser y cols, 2010), en nuestra experiencia, y de acuerdo a la de otros grupos, los resultados funcionales postoperatorios son similares a los obtenidos con otras técnicas (Zganjer y cols, 2006; Chen y cols, 2013) y presenta la ventaja de respetar el CA.

En los últimos diez años la técnica de De La Torre ha sido nuestra elección para el tratamiento de S-HSCR (Figura 1.19). Se trata de una técnica atractiva, pues se realiza por vía transanal, con menor estancia hospitalaria, mayor confort postoperatorio y que minimiza la disección abdominal, el riesgo de infección y de bridas. Según nuestra experiencia y la de otros autores (De La Torre y Langer, 2010; Chen y cols, 2013; Neuvonen y cols, 2016), los resultados funcionales postoperatorios son muy satisfactorios (Tabla 4.1).

Paralelamente a la evolución de las técnicas quirúrgicas, se ha modificado el momento de la intervención, de forma que hasta los años 90 la cirugía definitiva se realizaba alrededor del año de edad y en la actualidad se programa a partir de los tres meses (Juliá y cols, 2004; Chen y cols, 2013). A ello han contribuido las nuevas técnicas quirúrgicas y los progresos en anestesia y cuidados intensivos. En nuestra serie, la mediana de edad en el momento de la intervención quirúrgica correctora fue de casi ocho meses, reduciéndose desde 15,9 meses en el primer período, hasta siete en el último. Estos resultados coinciden por lo referido por otros autores (Chen y cols, 2013).

Merecen especial mención a este respecto los 10 casos registrados de TCA (23,8%). El tratamiento de estos pacientes, a pesar de los progresos en alimentación parenteral y enteral e innovaciones de las técnicas quirúrgicas, sigue constituyendo un reto para el cirujano (Núñez y cols, 2001; Márquez y cols, 2009; Moore, 2012a). Estos enfermos suelen precisar un estoma y lo aconsejable es mantenerlo un intervalo varia-

ble entre 12 y 24 meses para que el intestino madure y las heces sean espesas. Cuando esto sucede se puede realizar el descenso del estoma sin riesgo de graves complicaciones (Dodero y cols, 2001). Sin embargo, en casos con afectación ileal extensa, como sucedió en 8 pacientes de nuestra serie, es necesario utilizar otras técnicas. Entre ellas destaca la descrita por Boley (Boley, 1984), en la que se practica una anastomosis entre el íleon normal y un segmento de colon derecho agangliónico en posición aperistáltica para frenar la motilidad intestinal e incrementar la absorción intestinal de agua y electrolitos (Márquez y cols, 2009). Se finaliza la intervención con el *pull-through* del íleon gangliónico. Esta técnica requiere unos cuidados postoperatorios especiales dirigidos a la prevención de la enterocolitis (irrigaciones rectales con suero fisiológico, descontaminación digestiva e inhibidores de la motilidad intestinal como loperamida) tal como ha sido publicado por nuestro grupo previamente (Núñez y cols, 2001 y Núñez y cols, 2005). En nuestro caso, los resultados funcionales obtenidos con esta técnica se pueden considerar muy satisfactorios (Tabla 4.1), como demuestran los 3 pacientes entre estos casos que tienen una función intestinal normal.

El 53,6% de los pacientes presentó alguna complicación precoz (enterocolitis, dermatitis perianal o necesidad de reintervención quirúrgica), porcentaje similar al comunicado en otras series (Chen y cols, 2013). Respecto a las complicaciones tardías, la incidencia de estreñimiento postoperatorio y *soiling* en nuestra serie (14,6% y 4,9% respectivamente) también se asemeja a la referida por otros autores (Pini Prato y cols, 2008). Así mismo, registramos un caso de incontinencia fecal en una paciente con TCA que precisó reintervención y nuevo descenso, situación en la que hay más riesgo de daño en el CA (Levitt y cols, 2009). Por último, la administración intraesfinteriana (EAI) de toxina botulínica en casos de enterocolitis crónica, según nuestra corta experiencia (3 pacientes), y la referida por otros autores (Frykman y Short, 2012), es muy útil en el tratamiento de esta complicación.

Todas las ostomías pudieron ser cerradas y en el momento actual todos los pacientes mantienen autonomía digestiva. En conjunto, podemos reafirmar que los resultados clínicos postoperatorios mejoran durante la infancia, adolescencia y vida adulta (Pini Prato y cols, 2008; Ieiri y cols, 2010).

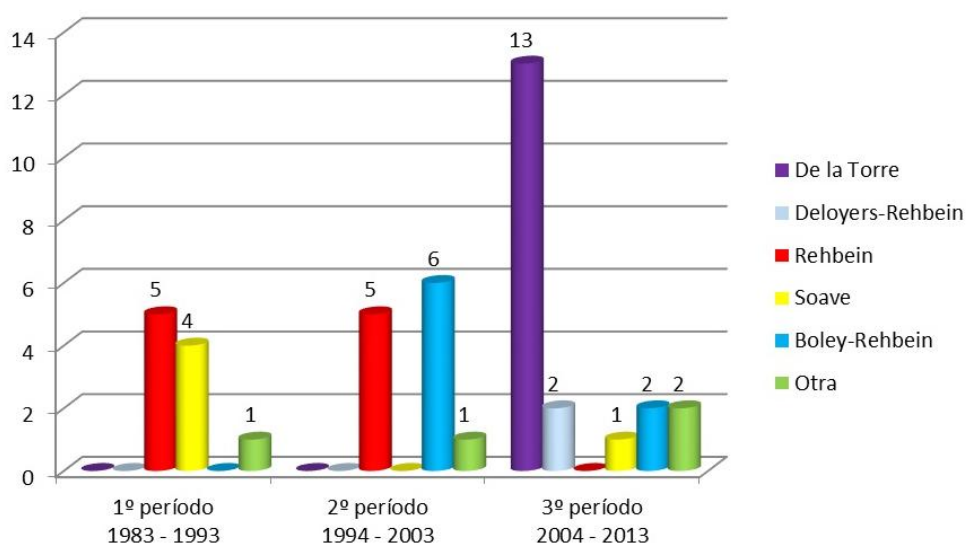


Figura 5.4: Cirugías correctoras realizadas durante los 3 intervalos de nuestro período de estudio.

5.2. Justificación del diseño de una escala predictora de la gravedad de HSCR

A pesar de que HSCR es una entidad susceptible de corrección mediante cirugía, se asocia a complicaciones graves que incluso pueden llegar a ser mortales (Pini Prato y cols, 2011). Entre las complicaciones preoperatorias se incluyen la sepsis, la enterocolitis y la perforación colónica. Entre las postoperatorias, además de la enterocolitis, destacan la obstrucción intestinal por adherencias, las fugas anastomóticas, la estenosis anal, la fístula enterocutánea, el estreñimiento y el fallo de medro. Estas complicaciones fueron reconocidas por primera vez por Swenson y Fisher en 1959, y descritas en detalle posteriormente por Bill y Chapman (Swenson y Fisher, 1959; Bill y Chapman, 1962). Posteriormente se consideró HAEC como un síndrome clínicamente diferente, definido por fiebre, diarrea, distensión abdominal, dolor cólico, letargia y diarrea sanguinolenta. Debido a los avances en el manejo de esta entidad, la incidencia de HAEC ha descendido en las últimas décadas. Sin embargo, aún hoy, es la complicación más temida de HSCR (Pontarelli y cols, 2013). Algunos autores han encontrado relación entre el desarrollo de enterocolitis preoperatoria y el pronóstico funcional y los resultados quirúrgicos a largo plazo (Murthi y Raine, 2003, Menezes y Puri, 2006), y globalmente es considerada la principal responsable de su morbilidad, que se estima entre el 1-10% (Pini Prato y cols, 2011).

Además de tener un elevado índice de sospecha sobre esta entidad en los recién nacidos que cursen con signos y síntomas de alarma, nuestro grupo de trabajo considera fundamental evaluar desde el momento de la sospecha diagnóstica, la presencia de factores de riesgo que alerten de un curso complicado. A pesar de que tradicionalmente se ha relacionado la gravedad de la enfermedad con la longitud del aganglionismo, es conocido que influyen otros muchos factores, como demuestra el hecho de que pacientes con la misma extensión tienen, con frecuencia, un curso muy distinto. Así, el comportamiento clínico de HSCR varía ampliamente de un enfermo a otro. Identificar precozmente a los casos graves permitiría realizar un manejo intensivo de estos pacientes que evite la aparición de complicaciones y mejore su pronóstico.

Sin embargo, no disponemos de una herramienta eficaz a este respecto, y responder a esta cuestión resulta un reto en la práctica diaria. Para afrontar estas situaciones, a menudo se recurre a sistemas de puntuación o escalas, destinadas a analizar diferentes situaciones clínicas, definiendo de forma precisa los distintos niveles de gravedad de un proceso patológico o su pronóstico vital y disminuyendo así el componente de información subjetiva. Las escalas permiten comparar el funcionamiento entre diferentes centros y aportar estrategias de manejo. Traducen de forma numérica situaciones clínicas complejas, facilitando la creación de un campo común para la comparación asistencial permitiendo además asignar recursos, realizar ensayos clínicos, evaluar tratamientos y favorecer la comunicación entre la comunidad científica. La facies hipocrática es probablemente la primera descripción conocida de los criterios de gravedad de un paciente. Sin embargo, la era de las escalas de gravedad y predicción de mortalidad comenzó en 1953 cuando Virginia Apgar propuso el test de valoración del bienestar del neonato al nacimiento que lleva su nombre.

De una forma simplista, podrían clasificarse las escalas en dos grupos:

- *de salud*: en ellas cuanto mayor es la puntuación obtenida, mayor es el grado de salud y bienestar del paciente. Un ejemplo de este grupo es el *score* de Glasgow, la escala más utilizada para valoración del nivel de consciencia.

- *de enfermedad*: en las que cuanto más elevada sea la puntuación, mayor es la gravedad del proceso que se evalúa. En este grupo encontramos numerosos ejemplos ampliamente difundidos en la práctica habitual, como son los criterios de Taussing-Westley para la laringitis aguda o el *score* de Boyer para la predecir la etiología bacteriana de una meningitis aguda.

Una planificación ideal sería aquella que mantuviese una misma filosofía para su interpretación, valorando la normalidad y la calidad de salud con puntuaciones ascendentes, y la enfermedad o mayor gravedad de la misma con puntuaciones descendentes. Sin embargo, por su extraordinaria utilidad en el momento actual se han impuesto las escalas ascendentes en ambos escenarios.

La escala de gravedad de HSCR que proponemos, que podríamos clasificar como de enfermedad y puntuación ascendente, está basada en datos clínicos fáciles de recabar en los primeros momentos desde el diagnóstico, tales como los antecedentes familiares, el momento de evacuación de meconio o la forma de presentación de la enfermedad. Otros de los factores valorados se obtendrían en el momento de la primera exploración física, como los síndromes o malformaciones asociadas y los hallazgos del tacto rectal. En la evolución inmediata a menudo se puede conocer si el paciente responde adecuadamente al tratamiento médico preoperatorio, o si por el contrario precisa la realización de una derivación digestiva, y habitualmente se dispone de una prueba de imagen que permita planificar adecuadamente la cirugía correctora y proporcione información sobre la extensión del aganglionismo.

Nuestro grupo decidió no incluir la edad al diagnóstico en la escala de gravedad debido a que en la literatura se comunican resultados contradictorios respecto al impacto de esta variable: si bien algunos autores han referido un mayor riesgo de HAEC en los pacientes diagnosticados más allá de la primera semana de vida respecto a los neonatos diagnosticados en los primeros días de vida (Teitelbaum y cols, 1988; Lee y cols, 2012), otros han encontrado que la mayor edad al diagnóstico de HSCR disminuye el riesgo de enterocolitis (Haricharan y cols, 2008b).

A través de la valoración los aspectos previamente descritos, podremos seleccionar de forma sencilla los pacientes con mayor riesgo de presentar un comportamiento clínico grave. En estos casos será necesario informar adecuadamente a la familia sobre la aparición de posibles complicaciones y realizar un seguimiento clínico estrecho, intensificando los cuidados médicos pero sin demorar la realización de ostomías cuando sea necesario. Teniendo en cuenta estas medidas, podremos disminuir el número de pacientes que desarrollan una situación de enterocolitis grave o una perforación colónica, principales causas de mortalidad y secuelas a largo plazo.

5.3. Validez de la escala y la escala simplificada de gravedad de HSCR

Una escala puede definirse como la colección de ítems que pretenden revelar diferentes niveles de una serie de características no observables directamente. Las escalas adquieren particular importancia cuando la variable que se pretende medir es subjetiva, es decir, que tanto su definición como sus componentes tienen un alto nivel de variabilidad.

En nuestro caso, para acercarnos a la correlación fenotipo-genotipo de HSCR, fue preciso definir las categorías de HSCR a este respecto, para lo cual establecimos una definición en enfermedad grave y diseñamos una escala que pudiera identificar a estos pacientes.

Así, en este proyecto de tesis se propone una escala que ha demostrado validez pronóstica al ser aplicada retrospectivamente a nuestra cohorte de pacientes HSCR. En ella, se evaluaron parámetros relacionados con el curso de la enfermedad encontrando diferencias significativas entre los subgrupos de pacientes que cumplieron criterios de enfermedad grave y no grave, en cuanto a la presencia de síndromes o malformaciones asociadas, la evacuación de meconio, el resultado del TR, la extensión del aganglionismo, la efectividad del *nursing* y los hallazgos del EC. En la clasificación habitual que categoriza los test de diagnóstico en función del AUC, la escala se clasificaría como muy buena, al superar la estimación puntual del AUC el valor de 0,9. El estudio estadístico permitió, además, establecer que las variables “síndromes o malformaciones asociadas”, “evacuación de meconio” y “extensión del aganglionismo”, son las idóneas para explicar la variable gravedad. De este modo, encontramos que una escala basada en estas 3 variables, y que denominamos simplificada para distinguirla de la anterior, se relacionaba significativamente con la gravedad ($p = 0,001$; OR = 4,5; 95% IC OR: 1,88-10,84). De nuevo, en la clasificación habitual de los test de diagnóstico en función del AUC, se clasificaría como muy buena, al superar la estimación puntual del AUC el valor de 0,9.

Esta escala simplificada podría ser considerada como una alternativa válida a la anterior y más fácilmente aplicable en la práctica clínica respecto a la original, aspectos que la convierten en la herramienta adecuada para satisfacer nuestro primer objetivo.

Como posible limitación al diseño del presente trabajo destacamos el extenso período de estudio, que incluyó pacientes pertenecientes a 3 décadas distintas. Durante el mismo, las decisiones terapéuticas fueron consensuadas entre el equipo médico y quirúrgico ajustándose a los significativos cambios ocurridos a lo largo de estos años pero utilizando siempre el abordaje menos invasivo posible. Comparando las 3 décadas mediante el test de Kruskal-Wallis, obtuvimos diferencias significativas en cuanto al número de procedimientos quirúrgicos por paciente realizados, que disminuyó a lo largo del tiempo, pero no en lo que concierne al tiempo de hospitalización o los episodios de enterocolitis (Tablas 5.1. y 5.2). Por ello, consideramos que nuestra definición de caso grave puede ser aplicada a toda la cohorte.

Tabla 5.1: Comparación de 2 variables que definen el comportamiento grave de HSCR en los 3 períodos.

Variable	Período 1 (n = 10) Media \pm SD (mediana; IQR)	Período 2 (n = 12) Media \pm SD (mediana; IQR)	Período 3 (n = 19) Media \pm SD (mediana; IQR)	P
Nº de cirugías/paciente	2,3 \pm 1,57 (3;2)	1,75 \pm 0,97 (2;1)	1,26 \pm 0,73 (1;0)	0,025*
Hospitalización en los 2 primeros años de vida (días)	77,5 \pm 64,62 (73,5; 96)	107,3 \pm 88,87 (65;169)	69,9 \pm 83,9 (30;75)	0,269

*Test de Kruskal-Wallis. Las diferencias significativas se encuentran entre los períodos 3 y 1.

Tabla 5.2: Comparación de la variable “episodios de enterocolitis” en los 3 períodos del estudio.

Episodios de enterocolitis Recuento (% dentro del período)	Período de estudio			Total
	1	2	3	
No	9 (90%)	6 (50%)	13 (65%)	28 (66,7%)
Sí	1 (10%)	6 (50%)	7 (35%)	14 (33,3%)
Total	10 (100%)	12 (100%)	20 (100%)	42 (100%)

Test exacto de Fisher: $p = 0,4604$

Por otra parte, aunque la escala se desarrolló a partir de datos de las 3 décadas, decidimos estudiar la validez de la escala simplificada aplicándola exclusivamente a los datos del último período. Comprobamos que la clasificación obtenida estaba de acuerdo con la verdadera situación del paciente en cuanto a gravedad de la enfermedad, al mostrar una sensibilidad del 100% (todos los casos que cumplieron los criterios de enfermedad grave fueron identificados correctamente usando la escala) y una especificidad del 92,3% (12 de los 13 casos que no cumplieron estos criterios, y por tanto, no graves, fueron correctamente clasificados, Tabla 5.3).

De nuevo, esto nos permite considerar que el valor de nuestra escala ha permanecido estable a pesar de los significativos cambios del abordaje médico-quirúrgico sufridos a lo largo del período de estudio.

Tabla 5.3: Aplicación de la escala de gravedad simplificada a los pacientes de la última década.

Variables	Casos clasificados como graves	Casos clasificados como no graves	Total
Puntuación en la escala > 5	6	1	7
Puntuación en la escala < 5	0	12	12
Total	6	13	19

5.4. Estudio genético de la cohorte HSCR

5.4.1. Análisis de mutaciones en la secuencia codificante del proto-oncogén *RET* en pacientes HSCR

El proto-oncogén *RET* codifica para un receptor tirosín-kinasa que se expresa en una amplia variedad de neuronas del SNP (neuronas entéricas, sensoriales y simpáticas), el SNC y el sistema excretor durante el desarrollo embrionario (Asai y cols, 2006). Por ello, no sorprende que mutaciones en este gen sean responsables de diferentes enfermedades, como MEN2A, MEN2B, FMTC y HSCR (Tam y García-Barceló, 2009). Sin embargo, mientras que la aparición de MEN2A, MEN2B y FMTC se atribuye a mutaciones germinales específicas en *RET* que lo activan llevando a una dimerización y a una activación constitutiva del receptor, la hipótesis más aceptada para las mutaciones asociadas a HSCR es la haploinsuficiencia o pérdida de función (Amiel y cols, 2008). De esta forma, estas mutaciones asociadas a HSCR pueden ser clasificadas según su mecanismo funcional en cinco clases:

- **Clase 1:** las mutaciones localizadas en los dominios *Cadherin-like* han sido asociadas a una interrupción de la maduración de RET y su traslocación a la membrana plasmática (Arighi y cols, 2005, Kashuk y cols, 2005, Asai y cols, 2006, Plaza-Menacho y cols, 2006). Las cadherinas comprenden una larga y divergente superfamilia caracterizada por la arquitectura de sus dominios, la estructura genética y las relaciones filogenéticas. La región extracelular de las cadherinas está formada por un número variable de módulos de unos 110 residuos aproximadamente, compartiendo todos ellos una secuencia consenso y frecuentemente la presencia de un sitio de unión a calcio entre los dominios. En el caso del receptor RET, en la región extracelular presenta 4 dominios *Cadherin-like* con un punto de unión a calcio entre los dominios 2 y 3 (Anders y cols, 2001). Kashuk y cols demostraron mediante estudios *in silico* que la secuencia del dominio extracelular está poco conservada en la evolución mostrando una identidad de secuencia interespecies del 13-20% (Kashuk y cols, 2005). Esta aparente falta de conservación podría sugerir una tolerancia a las sustituciones aminoacídicas en el dominio extracelular. Sin embargo, este tipo de eventos en los dominios *Cadherin-like* conducen a una ubiquitilación y a la eliminación de la proteína RET por la vía de degradación asociada al retículo endoplasmático (Kjaer e Ibañez, 2003, Hirsch y cols, 2009). Esta eliminación puede ser parcial o total como se ha demostrado con distintas mutaciones asociadas a HSCR (Kjaer y cols, 2010). La consecuente reducción a nivel de superficie celular de RET previene a las neuronas que lo expresan de responder a factores migratorios de la parte distal del intestino en desarrollo, siendo su déficit el principal factor responsable del desarrollo de HSCR (Heaneu y Pachnis, 2007). En el presente trabajo se ha identificado 2 mutaciones en los dominios *Cadherin-like*, (p.Thr315Pro y p.Gly423Arg). Estas mutaciones no habían sido previamente descritas en la literatura en el momento de la realización del estudio y las herramientas *in silico* aplicadas predecían efecto patogénico para ambas (Figura 5.5). Hoy día la mutación p.Thr315Pro solo ha sido descrita por nuestro grupo (Núñez-Ramos y cols, 2017), mientras que a la mutación p.Gly423Arg le ha sido adjudicado un rs, con una frecuencia poblacional de 0,0008% (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?type=rs&rs=767601598).

- **Clase 2:** las mutaciones localizadas en el dominio rico en cisteínas son mutaciones asociadas a MEN2A/FMTC y que en algunas ocasiones dan lugar también al fenotipo HSCR. Consisten en la sustitución de una de las cisteínas clave de este dominio (Cys609, Cys611, Cys618 y Cys620) por otro Aa diferente. Se ha descrito que el reemplazo de uno de esos residuos de cisteína provoca la pérdida de un puente disulfuro intramolecular y por tanto se facilita la formación de puentes disulfuro intermoleculares entre dos receptores RET mutados, produciendo de esta forma una activación constitutiva del receptor (Plaza-Menacho y cols, 2006). Sin embargo, estudios funcionales *in vitro* han demostrado que estas mutaciones también conducen a una reducción del número de receptores RET maduros en la superficie celular (Chappuis-Flament y cols, 1998, Takahashi y cols, 1999). De esta forma, una única mutación en una de esas cisteínas tendría efectos “opuestos” dependiendo de la célula en la que se exprese: por una parte, por la reducción de receptores maduros en la membrana, todas las rutas dependientes de la activación de RET durante la embriogénesis estarían disminuidas, lo que dificultaría la proliferación y la migración de las neuronas entéricas al intestino en desarrollo. Por otra parte, la dimerización y consiguiente activación constitutiva de RET, inducirían la proliferación de las células C tiroideas después del nacimiento (Asai y cols, 2006). Estos hechos ex-

plican la razón de la alta incidencia (20-50%) de ambos fenotipos, HSCR y MEN2, en individuos con una mutación en p.Cys620 (Mulligan y cols 1994, Bütter y cols, 2007, Moore y Zhaal, 2010).

En nuestra cohorte de pacientes HSCR hemos identificado 3 variantes en la región rica en cisteínas (p.Asp567Asn, p.Gly607Glyfs*32 y p.Ser536Phe). Ninguna de ellas implica a las cisteínas principales y no habían sido previamente descritas en el momento de realización del estudio, prediciéndose bioinformáticamente un efecto deletéreo para todas ellas (Figura 5.5). Actualmente la mutación p.Asp567Asn tiene adjudicado un rs, se ha reclasificado como posiblemente benigna y se ha descrito para ella una frecuencia poblacional de 0,02% (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?type=rs&rs=147219360). Las otras dos mutaciones solo se han descrito en la publicación del presente trabajo (Núñez-Ramos y cols, 2017).

- **Clase 3:** las mutaciones localizadas en el dominio tirosín-kinasa resultan en una reducción de la actividad catalítica del receptor. El dominio tirosín-kinasa de RET es homólogo a otras tirosinas kinasas y se piensa que su activación depende de una reacción de transfosforilación entre dos moléculas de RET adyacentes (Runeberg-Roos y Saarma, 2007). La afectación de este dominio conduciría a una disminución en la eficiencia de todas las rutas dependientes de RET. En nuestro caso hemos encontrado 2 mutaciones en este dominio: p.Arg982Cys y p.Ser829Gly (Figura 5.5).

La mutación p.Arg982Cys fue identificada en 3 pacientes de nuestra cohorte. Esta variante había sido encontrada en diversos casos HSCR y también en algunos individuos controles (Svensson y cols, 1998, Sancandi y cols, 2000). Además, aunque los estudios *in silico* predicen un efecto patogénico, Pasini y cols, demostraron mediante estudios funcionales que no altera la actividad tirosín-kinasa de la proteína. Estos hechos parecen indicar que esta variante más que una mutación patogénica es un polimorfismo raro presente en la población, que en todo caso podría tener un efecto sutil en la aparición del fenotipo. Por tanto hoy día no se tiene total certeza de la patogenicidad de esta variante, pues hasta un 3% de la población española la porta (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?type=rs&rs=17158558).

En cuanto a p.Ser829Gly, no había sido descrita en el momento del estudio, aunque actualmente tiene asignado un rs, con una frecuencia poblacional del 0,003% y se ha catalogado como se significado clínico incierto (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?type=rs&rs=113005278).

- **Clase 4:** mutaciones en el extremo carboxi-terminal producen la interrupción de la vía de señalización asociada a la tirosina ubicada en la posición 1062 (Tyr1062) (Asai y cols, 2006). Esta tirosina representa un sitio de unión para las numerosas proteínas adaptadoras y efectoras que son importantes para la activación de vías de señalización intracelulares como las vías RAS/ERK, PI3K/AKT y Jun (Asai y cols, 1996, Arighi y cols, 1997, Geneste y cols, 1999, Jijiwa y cols, 2004). Así, se ha observado que al cambiar la tirosina 1062 por fenilalanina hay un descenso marcado de la unión de la molécula Shc y una reducción drástica de la actividad biológica de RET (Asai y cols, 1996). Del mismo modo, se ha visto que mutaciones en los Aa adyacentes también impiden la unión de Shc y producen una pérdida parcial de la función de RET (Geneste y cols, 1999). En el presente estudio no se han identificado mutaciones que afecten al residuo pTyr1072. Solo se ha identificado una mutación *frameshift* en esta región, descrita por primera vez en nuestro grupo (p.Pro1049Serfs*8) (Figura 5.5) (Núñez-Ramos y cols, 2017).

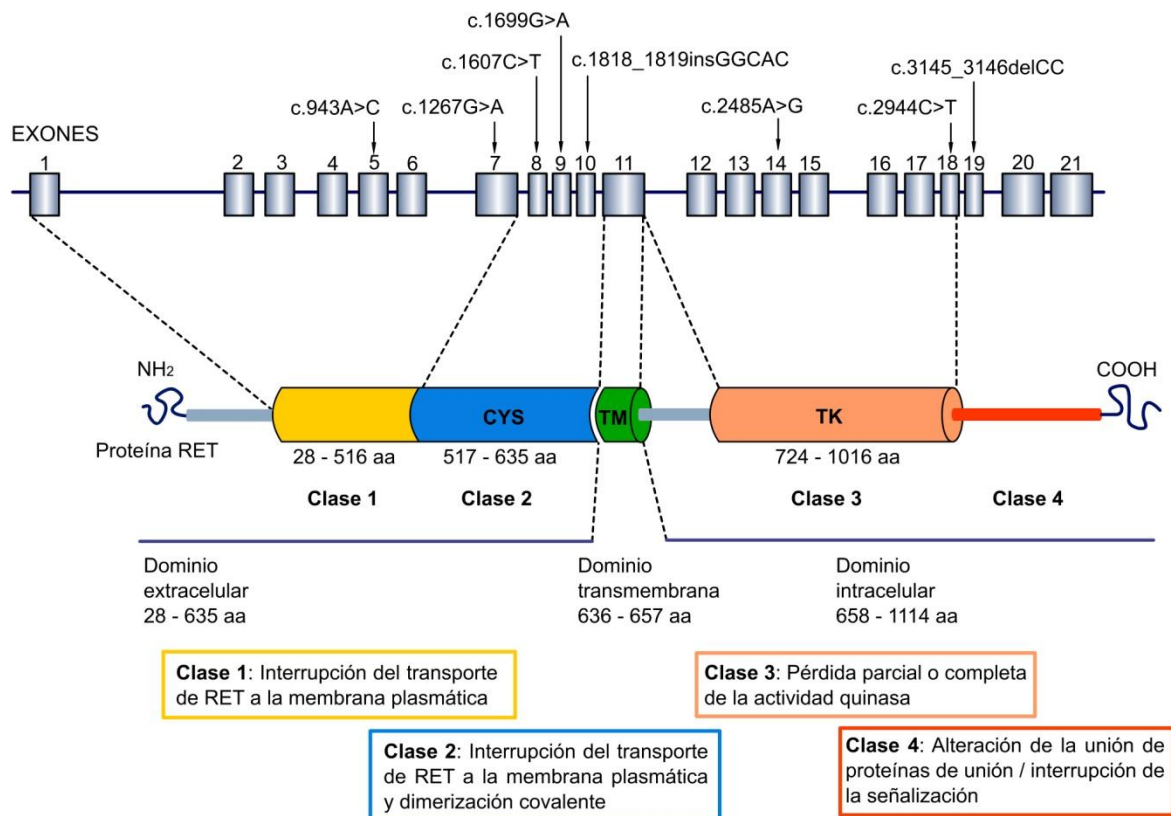


Figura 5.5: Variantes de *RET* identificadas en este estudio y el efecto funcional según su localización en los distintos dominios de la proteína.

- **Clase 5:** mutaciones localizadas en regiones reguladoras que disminuyen la transcripción de *RET*. Este tipo de mutaciones pueden estar localizadas en regiones promotoras (5'UTR), intrónicas o en regiones reguladoras finales (3'UTR). Un claro ejemplo de este tipo de mutación es la llamada variante *Enhancer* (c.73+9277T>C) del intrón 1, identificada en 30 pacientes de nuestra cohorte, y que será discutida más adelante en esta sección.

De esta forma, la frecuencia mutacional del gen *RET* entre nuestros casos esporádicos (7 pacientes con mutaciones de 40 casos esporádicos estudiados, 17,5%) coincide con la previamente comunicada, entre el 7 y el 20% (Amiel y cols, 2008). Entre los casos familiares identificamos una frecuencia del 100% (2 familias con mutaciones de las 2 estudiadas), superior a la descrita, que atribuimos al pequeño tamaño muestral.

La Tabla 5.4 recoge las mutaciones encontradas en la secuencia codificante de *RET* y su clasificación.

Tabla 5.4: Características de los pacientes con mutaciones en la secuencia codificante de *RET* y clasificación de las mutaciones.

Paciente	Presentación	Extensión del aganglionismo	Mutación	Referencia; rs	Naturaleza; Herencia	Efecto funcional (clase)
10	Aislado Familiar	L-HSCR	c.2944C>T; p.Arg982Cys	Sasaki y cols, 2003; rs17158558	Miscense; Paterna	3
12	DS	S-HSCR	c.1699G>A; p.Asp567Asn	Núñez-Ramos y cols, 2017; rs147219360	Miscense; Paterna	2
15	Aislado esporádico	S-HSCR	c.943A>C; p.Thr315Pro	Núñez-Ramos y cols, 2017	Miscense; Materna	1
18	Aislado esporádico	L-HSCR	c.1818_1819insGGCAC; p.Gly607Glyfs*32	Núñez-Ramos y cols, 2017	Frameshift, nonsense; De novo	2
21	Aislado esporádico	S-HSCR	c.1267G>A; p.Gly423Arg c.2485A>G; p.Ser829Gly	Núñez-Ramos y cols, 2017; rs767601598 Núñez-Ramos y cols, 2017; rs113005278	Miscense; Paterna Miscense; Materna	1 3
24	Aislado esporádico	TCA	c.1607C>T; p.Ser536Phe	Núñez-Ramos y cols, 2017	Miscense; De novo	2
31	Aislado Familiar	TCA	c.3145_3146delCC; p.Pro1049Serfs*8	Núñez-Ramos y cols, 2017	Frameshift, nonsense; Materna	4
35	Aislado esporádico	TCA	c.2944C>T; p.Arg982Cys c.1699G>A; p.Asp567Asn	Sasaki y cols, 2003; rs17158558 Núñez-Ramos y cols, 2017; rs147219360	Miscense; Materna Miscense; De novo	3 2
36	DS	S-HSCR	c.2944C>T; p.Arg982Cys	Sasaki y cols, 2003; rs17158558	Miscense; No disponible	3

5.4.2. Evaluación de la variante *Enhancer* (c.73+9277T>C) de *RET* en pacientes HSCR como factor de susceptibilidad

A pesar de que el proto-oncogén *RET* es el principal gen asociado a HSCR, el porcentaje de casos producidos por mutaciones en su secuencia codificante es limitado. Por eso, se han invertido notables esfuerzos en identificar otros eventos mutacionales implicados en la enfermedad, como la búsqueda de genes alternativos o de mutaciones en secuencia no codificante.

Borrego y cols, en 1999, lograron identificar los primeros factores de susceptibilidad genéticos, no relacionados con mutaciones codificantes en *RET*, descritos para HSCR, y localizados en los exones 2 (c.135G>A, p.Ala45Ala, rs1800858) y 13 (c.2307T>G, p.Leu769Leu, rs1800861) de *RET*. Posteriormente, el trazado de haplotipos basados en SNPs y el análisis de los resultados mediante *Transmission Disequilibrium Test* y *Linkage Disequilibrium mapping* permitió la caracterización de un haplotipo genético claramente ligado a la aparición de HSCR (Borrego y cols, 2003; Fernández y cols, 2005). Dichos resultados permitieron desarrollar el concepto de “alelos de baja penetrancia” en el origen de HSCR. En base a estos hallazgos, un estudio para refinar el intervalo de la secuencia de *RET* asociado a la enfermedad, logró identificar un dominio conservado con potencial función reguladora de la transcripción (*Enhancer-like*), situado entre las kilobases 9 y 10 del intrón 1 (Emison y cols, 2005). Dentro de este dominio, la variante c.73+9277T (rs2435357) ha mostrado ser un factor de susceptibilidad genético con una contribución a la aparición de HSCR, 20 veces mayor que las mutaciones codificantes (Emison y cols, 2005). El Consorcio Internacional para la enfermedad de HSCR (ICHSCR) demostró que esta variante tiene un efecto funcional *per se*, capaz de reducir la habilidad del factor de transcripción SOX10 para unirse al dominio *Enhancer-like*, y disminuir la transcripción del proto-oncogén *RET* (Emison y cols, 2010). La asociación de esta variante a la enfermedad ha sido comprobada en todas las poblaciones estudiadas (estadounidense, china y europea) (Emison y cols, 2010).

Entre los 42 pacientes de la serie, la variante fue detectada en 30 de ellos, siendo más frecuente en el subgrupo clasificado como no grave por la escala (76,9% *vs* 66,7%, $p = 0,713$). Interpretamos que este resultado puede estar relacionado con el mayor número de casos esporádicos en este grupo, de forma que si excluimos los casos familiares, que mayoritariamente se asocian a mutaciones en la secuencia codificante, encontramos el mismo porcentaje de pacientes portadores de la variante *Enhancer* en los grupo grave (20 de 26 pacientes) y no grave (10 de 13 pacientes).

5.4.3. Exclusión de mutaciones en el proto-oncogén *RET* asociadas a MEN 2

La incidencia de MEN 2A/FMTC en los pacientes HSCR estima entre el 2,5 y el 5% (Moore y cols, 2008a; Olivares Muñoz y cols, 2012; Virtanen y cols, 2013). En todos los casos, las mutaciones se localizan en el exón 10 de *RET* (codones Cys609, Cys611, Cys618 y Cys620) y originan la sustitución de una cisteína por otro Aa en el dominio extracelular de la proteína (Moore y cols, 2008a; Olivares Muñoz y cols, 2012). Por una parte, a nivel embrionario esas mutaciones originan una pérdida de función del receptor al verse afectada su localización en la membrana plasmática, dando lugar al fenotipo HSCR. Por otra, ya en la etapa adulta, originan una ganancia de función causada por una activación constitutiva, dando lugar a una anormal proliferación celular y a los procesos neoplásicos (Bütter y cols, 2007; Moore y cols, 2008a).

Dado que la penetrancia de estas mutaciones para el carcinoma medular de tiroides es completa (un paciente portador de mutación tiene un riesgo del 100% de desarrollar el tumor), la tiroidectomía profiláctica es el único tratamiento eficaz (Nozhat y Hedayati, 2016). Por ello, nuestro grupo, de acuerdo con otros autores, defiende el análisis molecular del proto-oncogén *RET* como parte del protocolo de manejo de los pacientes HSCR, especialmente los exones en los que se ubican mutaciones asociadas a MEN 2 (Moore y Zaahl, 2009b).

En nuestra cohorte identificamos 8 variantes en el proto-oncogén *RET*. De ellas, sólo una se situaba en un exón de los considerados de riesgo (paciente 18, exón 10). Dado que no implicaba el cambio de una cisteína por otro aminoácido, no fue preciso tomar medidas profilácticas a este respecto.

5.4.4. Análisis molecular de *EDNRB* y *EDN3* en pacientes HSCR

El rastreo mutacional de *EDNRB* en nuestra serie de pacientes HSCR reveló una única mutación en heterocigosis en un caso aislado y esporádico de TCA (c.1169delC) que origina un codón de parada prematuro. Esto representa una frecuencia mutacional para *EDNRB* del 2,4%, algo inferior a la descrita en la literatura (Amiel y cols, 2008). No se identificó ninguna variante de secuencia patogénica en la secuencia de *EDN3*. Esto concuerda con lo que se conoce sobre la contribución de este gen como responsable del fenotipo HSCR aislado, para el que se ha comunicado una baja frecuencia mutacional en otras series HSCR (Zhou y cols, 2006).

5.4.5. Análisis molecular del gen *SOX10* en pacientes WS4

El gen *SOX10* codifica para un factor de transcripción que participa en el desarrollo del SNE, interviniendo en la diferenciación de las células pluripotenciales de la CN hacia glía, neuronas del SNP, neuronas entéricas y melanocitos de la piel y del oído, entre otros tipos celulares.

En el presente trabajo se realizó estudio del gen *SOX10* en los 3 pacientes que cumplieron criterios clínicos de síndrome de WS4 identificándose mutación causal en 2 de los casos (Tabla 4.9).

Estas mutaciones generaron la aparición de un codón de parada prematuro en *SOX10* (p.Thr370Serfs*38 y p.His306Thrfs*5). Este tipo de mutaciones *nonsense*, presentes en los exones del extremo 3', representan la causa molecular responsable del fenotipo en la mayoría de los casos. Así mismo, la severidad del fenotipo, en cuanto a presencia o ausencia de manifestaciones neurológicas, viene condicionada por la localización específica del codón que se vea afectado (Inoue y cols, 2004; Bondurand y Sham, 2013). En este sentido, según diferentes estudios *in vitro*, las consecuencias funcionales de distintas mutaciones a lo largo de la secuencia de *SOX10* pueden ser muy diferentes.

La mayor parte de mutaciones sin sentido (*nonsense*) que afectan a los primeros exones del gen dan lugar a pequeños ARNm aberrantes que son eliminados antes de ser traducidos mediante el mecanismo celular *Nonsense-Mediated mRNA Decay* (NMD-mRNA), generando haploinsuficiencia responsable del fenotipo WS4 (Hilleren y Parker, 1999; Inoue y cols, 2004; Verheij y cols, 2006). Sin embargo, la presencia de mutaciones en el exón 5 o final del exón 4, que afectan al dominio de transactivación de *SOX10*, podrían dar lugar a ARNm aberrantes capaces de escapar de este mecanismo de protección celular, mostrando un efecto negativo al competir por la unión del promotor con aquellas proteínas normales, y dando como resultado fenotipos más agresivos como el observado en PCWH (Inoue y cols, 2004). El hipotético límite

que se ha establecido para que se produzca este evento es a partir de posiciones próximas al codón 234, donde se ha descrito que la mutación p.Gln234X da como resultado una proteína truncada muy probablemente responsable del fenotipo PCWH (Pingault y cols, 2002).

El cambio *de novo* c.915delG (p.His306Thrfs*5) identificado en el paciente n° 23 (Tabla 4.1) se ajustaría a esta hipótesis. Además, esta delección ya había sido asociada anteriormente (Viñuela y cols, 2009) al fenotipo PCWH, apoyando la correlación genotipo-fenotipo para esta mutación en concreto. También cabe mencionar que la presencia de delecciones completas en *SOX10*, descritas en pacientes que presentaban el síndrome PCWH, indica que pueden existir mecanismos adicionales al de NMD-mRNA que podrían explicar esta variabilidad fenotípica (Bondurand y cols, 2007).

Un escenario completamente diferente se observa en el caso de la mutación identificada en el paciente n° 28 (Tabla 4.1), c.1107_1108insGCTGGGGCCCCCACTAC. En este caso no se trata de una variante *de novo*, sino que es una mutación heredada que resulta en 3 fenotipos distintos a lo largo de 3 generaciones diferentes: hipopigmentación extensa en la abuela materna (Figura 4.8), sordera en la madre y WS4 en el caso índice. Hasta la fecha se han descrito pocos casos familiares de WS4 (Pingault y cols, 1998; Southard-Smith y cols, 1999) mostrando una gran variabilidad en el fenotipo. En estas familias, la penetrancia de cada rasgo es incompleta, dando lugar en algún caso a fenotipos que carecen de los signos cardinales de WS (Pingault y cols, 2010). La ausencia de grandes familias afectadas impide el estudio de la correlación genotipo-fenotipo, por lo que no es fácil explicar la relación que pueda existir entre las mutaciones encontradas y el fenotipo observado. Podríamos hipotetizar que el mosaicismo explica el hecho de que padres sanos porten las mismas mutaciones que sus hijos afectados y por tanto, sea el responsable de la penetrancia incompleta de alguna de sus manifestaciones (Pingault y cols, 2010). Sin embargo, en el caso familiar que describimos en el presente proyecto de tesis, esta hipótesis queda descartada ya que la mutación está presente en la línea germinal de tres generaciones consecutivas. La explicación más plausible para justificar las diferencias en el fenotipo encontradas en los 3 miembros de esta familia, portadores de la misma mutación c.1107ins19, sería la existencia de otros eventos moleculares en genes o regiones reguladoras no identificadas hasta el momento, que actuarían ejerciendo un efecto modificador del fenotipo.

Basándonos en esta hipótesis se decidió estudiar la presencia de la variante *Enhancer* de *RET* (c.73+9277T>C), para evaluar su posible participación en la manifestación del fenotipo a nivel entérico. Dicha variante se encuentra en un dominio que se ha demostrado como uno de los principales reguladores de la expresión de *RET*, potenciándola específicamente en el SNE (Grice y cols, 2005). Sin embargo, ninguno de ellos portaba dicho cambio, lo cual está en concordancia con hallazgos previamente descritos que reportan que la frecuencia del alelo c.73+9277T no es significativamente diferente en pacientes con WS4 (De Pontual y cols, 2007). También se analizó la secuencia codificante de los genes *EDN3* y *EDNRB*, ya que WS4 se ha visto también asociado alteraciones en estos genes, pero en ninguno de los casos se identificaron mutaciones. Esto evidencia la necesidad de buscar nuevos genes y eventos reguladores que puedan estar relacionados con la enfermedad.

5.5. Asociación entre fenotipo grave y resultados del estudio molecular

Una vez constatado que HSCR se manifiesta con gravedad variable, y diseñada la escala que permite identificar precozmente los pacientes con riesgo de presentar un comportamiento más grave, nos dirigimos a los resultados del estudio molecular en nuestra serie para intentar establecer si existe correlación entre el genotipo y la presentación clínica. Así, de forma global encontramos que más de la mitad de los pacientes que cumplieron criterios de gravedad presentaron variaciones en la secuencia codificante de los genes estudiados (8 de los 15 pacientes, 53,3%) frente a 4 de 26 (15,3%) del no grave (Test exacto de Fisher, $p = 0,015$). Estos 12 pacientes se encuentran recogidos en la Tabla 5.5.

La mutación p.Arg982Cys en el proto-oncogén *RET* fue identificada en 3 pacientes de nuestra cohorte. Esta variante ha sido encontrada en diversos casos HSCR y también en algunos individuos controlados (Svensson y cols, 1998, Sancandi y cols, 2000), hallazgo acorde con estudios funcionales que previamente han demostrado que no altera la actividad tirosín-kinasa de la proteína. Curiosamente, los 3 casos en los que se identificó esta variante (n° 10, 35 y 36) presentaban distintos fenotipos (L-HSCR, TCA y S-HSCR respectivamente), lo que cuestiona la posibilidad de establecer una relación entre esta mutación y la extensión de la enfermedad. Sin embargo, los 3 pacientes cumplieron nuestros criterios de gravedad, lo que refuerza el carácter poligénico y multifactorial de la misma, de modo que, en presencia de otros factores genéticos y ambientales, la variante identificada puede condicionar la aparición de una enfermedad de curso grave, independientemente de la extensión del aganglionismo.

Otros grupos de trabajo han intentado acercarse a la correlación genotipo-fenotipo investigando la relación entre múltiples mutaciones en *RET* y el comportamiento clínico de HSCR. Así, en un estudio en el que se identificaron polimorfismos y mutaciones patogénicas en la región codificante de *RET* (p.Asp489Asn, p.Leu769Leu y p.Val778Asp), los autores sugieren que la combinación de varios de ellos puede asociarse a la gravedad de la enfermedad, como demuestran al describir un caso de HSCR con fenotipo TCA con triple variación en *RET* evolucionó a *éxitus* (Ishii y cols, 2013). Entre nuestros casos destaca un paciente con fenotipo TCA que cumplió los criterios de gravedad, en el que coincidían 2 mutaciones (paciente n°35, Tabla 5.4). Una de las mutaciones encontradas (c.1699G>A; p.Asp567Asn), recientemente clasificada como benigna, fue también identificada, pero como evento molecular único, en otro paciente de la serie clasificado como no grave y con fenotipo S-HSCR (caso n° 12, Tabla 5.4). Este hallazgo podría reforzar el argumento previamente expuesto, de forma que la coincidencia de más de una variante en la secuencia codificante de *RET*, podría estar relacionada con una mayor gravedad en el curso de la enfermedad.

Otro aspecto a destacar es que la mayoría de las mutaciones *frameshift* se agruparon en el subgrupo de gravedad (4 de los 5 casos; 2 identificadas en el proto-oncogén *RET*, 1 en *EDNRB* y otra en *SOX10*). Esto no sorprende si consideramos las implicaciones de este tipo de cambio en la secuencia de ADN. Las mutaciones *frameshift*, también llamadas de desfase o cambio del marco de lectura, son inserciones o deleciones de uno o más pares de bases en número no múltiplo de 3, que, aún sin afectar en gran medida a la secuencia de bases, cambian la forma en que se leen los tripletes, por lo que producen una alteración importante de la proteína. Para todos nuestros casos estas inserciones o deleciones tuvieron como efecto la aparición de un codón de terminación prematuro. Este tipo de mutaciones suelen producir un considera-

ble acortamiento de la proteína y habitualmente se ve afectada dramáticamente su estructura tridimensional, su estabilidad y su función, por lo que es esperable el impacto en el fenotipo encontrado en nuestros pacientes (1 caso de L-HSCR y 3 casos de TCA).

En concreto, en el estudio molecular del gen *SOX10* en los casos WS4, las dos mutaciones identificadas generaron la aparición de un codón de parada prematuro en la proteína (p.Thr370Serfs*38 y p.His306Thrfs*5), siendo responsables de dos fenotipos diferentes: WS4 y PCWH. De acuerdo con el modelo de actividad dominante negativo de la proteína truncada descrito previamente, el cambio *de novo* c.915delG (p.His306Thrfs*5) identificado en el paciente n° 23 se ajustaría a esta hipótesis y explicaría la aparición de un fenotipo más agresivo, con alteración difusa de la mielinización y un marcado retraso psicomotor.

Sin embargo, en el paciente n° 28, a diferencia del resto de mutaciones localizadas dentro de la región 3' del gen, no se identificó clínica neurológica. En este caso, la inserción de 19 nucleótidos, c.1107_1108insGCTGGGGCCCCCACTAC, generaba una alteración de la pauta de lectura a partir de la posición aminoacídica 370, y un codón de parada prematuro 38 residuos después. En casos similares en los que se añaden largas colas de Aa, como es el caso de la mutación c.780delG (p.Arg261Alafs*25) o c.1077_1078delGA (p.Glu359Aspfs*42), pero que no dan lugar a la aparición de manifestaciones neurológicas, se ha propuesto que la presencia de estas colas podría afectar el correcto plegamiento de la proteína teniendo consecuencias sobre su procesamiento proteolítico. La importancia que la secuencia de Aa tiene en el plegamiento de proteínas reside en el equilibrio fisiológico existente entre la forma desplegada y nativa de una proteína y los cambios que se produzcan sobre la misma pueden generar pequeños cambios en la energía libre de los estados intermediarios dentro del proceso de plegamiento de la proteína. Por tanto, un plegamiento incorrecto produciría que la maquinaria proteolítica degradara dichas proteínas erróneas evitando el efecto negativo dominante (Viñuela y cols, 2009). En el caso de la mutación p.Thr370Serfs*38, podría estar teniendo lugar este evento, y por tanto no resultaría en un fenotipo PCWH, aunque estudios funcionales adicionales serían necesarios para comprobar esta hipótesis de forma definitiva.

Tabla 5.5: Características y grupo de gravedad de los pacientes con mutaciones en *RET*, *EDNRB* y *SOX10*.

Nº	Grupo gravedad	Presentación	Extensión	Gen	Exón	Mutación	Naturaleza; Herencia
10	Grave	Aislado Familiar	L-HSCR	<i>RET</i>	18	c.2944C>T; p.Arg982Cys	<i>Missense</i> ; Paterna
18	Grave	Aislado esporádico	L-HSCR	<i>RET</i>	10	c.1818_1819insGGCAC; p.Gly607Glyfs*32	<i>Frameshift</i> , <i>nonsense</i> ; <i>De novo</i>
24	Grave	Aislado esporádico	TCA	<i>RET</i>	8	c.1607C>T; p.Ser536Phe	<i>Missense</i> ; <i>De novo</i>
31	Grave	Aislado Familiar	TCA	<i>RET</i>	19	c.3145_3146delCC; p.Pro1049Serfs*8	<i>Frameshift</i> , <i>nonsense</i> ; Materna
35	Grave	Aislado esporádico	TCA	<i>RET</i>	18 9	c.2944C>T; p.Arg982Cys c.1699G>A; p.Asp567Asn	<i>Missense</i> ; Materna <i>Missense</i> ; <i>De novo</i>
36	Grave	DS	S-HSCR	<i>RET</i>	18	c.2944C>T; p.Arg982Cys	<i>Missense</i> ; No disponible
6	Grave	Aislado esporádico	TCA	<i>EDNRB</i>	6	c.1169delC; p.Ser390Argfs*31	<i>Frameshift</i> , <i>nonsense</i> ; No disponible
23	Grave	WS4	TCA	<i>SOX10</i>	5	c.915delG; p.His306Thrfs*5	<i>Frameshift</i> , <i>nonsense</i> ; <i>De novo</i>
12	No grave	DS	S-HSCR	<i>RET</i>	9	c.1699G>A; p.Asp567Asn	<i>Missense</i> ; Paterna
15	No grave	Aislado esporádico	S-HSCR	<i>RET</i>	5	c.943A>C; p.Thr315Pro	<i>Missense</i> ; Materna
21	No grave	Aislado esporádico	S-HSCR	<i>RET</i>	7 14	c.1267G>A; p.Gly423Arg c.2485A>G; p.Ser829Gly	<i>Missense</i> ; Paterna <i>Missense</i> ; Materna
28	No grave	WS4	S-HSCR	<i>SOX10</i>	5	c.1107_1108ins19 ¹ ; p.Thr370Serfs*38	<i>Frameshift</i> , <i>nonsense</i> ; Materna

¹Los 19 nucleótidos de la inserción corresponden a la secuencia: GCTGGGGCCCCCACTAC.

5.6. Asesoramiento genético proporcionado a las familias participantes

El asesoramiento genético se practica siempre con cautela, teniendo en cuenta la dificultad para establecer una correlación genotipo-fenotipo, y con los datos de patogenicidad disponibles y publicados en el momento del asesoramiento, haciendo uso de las herramientas más actuales pero compartiendo con las familias las limitaciones existentes. Por todo ello, desafortunadamente, estamos aún lejos de proporcionar un consejo genético práctico. Todos los pacientes incluidos en el presente proyecto de tesis han sido valorados en la consulta de Genética Clínica del Complejo Hospitalario Universitario de Badajoz, recibiendo el asesoramiento genético correspondiente derivado de los resultados obtenidos en el estudio molecular. De los 42 pacientes reclutados, 9 presentaron variantes de secuencia en heterocigosis presumiblemente pa-

togénicas localizadas en el proto-oncogén *RET*, en 2 de ellos se identificaron mutaciones en el gen *SOX10*, y en un único caso se detectó una mutación en *EDNRB* (Tabla 4.9).

5.6.1. Mutaciones en el proto-oncogén *RET*

De todos los genes descritos, *RET* es el principal gen de susceptibilidad y el primero en ser identificado tras el análisis de familias multigeneracionales en las que HSCR presentaba una forma de herencia autosómica dominante con penetrancia parcial (Angrist y cols, 1993; Lyonnet y cols, 1993). El rastreo molecular de *RET* en distintas series de pacientes HSCR ha permitido identificar más de 100 mutaciones asociadas a este fenotipo. Estas mutaciones están distribuidas por todo el gen e incluyen grandes deleciones, microdeleciones, inserciones y mutaciones puntuales de cambio de sentido (*missense mutations*), sin sentido (*nonsense mutations*) o que afectan al proceso de corte y empalme de mRNA (*splicing mutations*). Sin embargo, la penetrancia de las mutaciones asociadas a HSCR en el proto-oncogén *RET* no es completa, por lo que su presencia *per se* en otros miembros no implica necesariamente la aparición de la enfermedad. Las formas esporádicas, especialmente las de segmento corto, suelen presentar un patrón de herencia complejo aditivo en el que se requiere la confluencia de diversos eventos genéticos para la manifestación de la enfermedad; las formas familiares, en cambio, siguen un modelo de herencia mendeliano. Con el objetivo de ofrecer el asesoramiento genético adecuado, los pacientes fueron clasificados en los siguientes grupos (Figura 5.6):

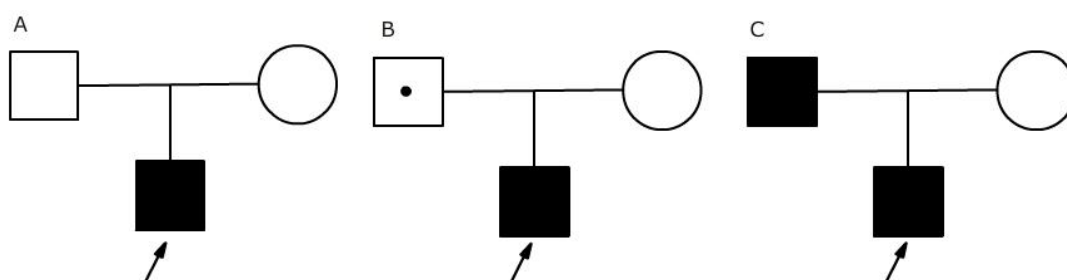


Figura 5.6: Representación esquemática de diferentes tipos de herencia.

A. Casos aislados y esporádicos *de novo*. B. Casos aislados y esporádicos heredados. C. Casos aislados y familiares.

1) Casos aislados y esporádicos con mutaciones *de novo*: esta categoría reúne a los pacientes HSCR que no presentan síndromes o malformaciones asociadas (aislados), hijos de padres no afectados y no portadores de la mutación (no heredada o *de novo*). La naturaleza *de novo* de estas mutaciones es indicativa de su implicación en la enfermedad. En estos casos, el riesgo de recurrencia para hermanos del paciente es muy bajo (<1%), aunque no puede descartarse un mosaicismo germinal en alguno de los progenitores (presencia de dos o más poblaciones celulares con diferente composición genética) que no descartaría completamente que dicha mutación pueda transmitirse a los hijos. Por otro lado, existe un 50% de posibilidades de que el paciente transmita la mutación a su descendencia. No obstante, la penetrancia de las mutaciones en *RET* asociadas a HSCR no es completa, si no que oscila en el 40-52%, por lo que la transmisión de esta mutación a la descendencia no implicará necesariamente la aparición de la enfermedad. En nuestra serie se identificaron 3 mutaciones *de novo* no descritas previamente, con fenotipo L-HSCR (caso nº 18, tipo *nonsense*) y

TCA (casos n° 24 y 35, de tipo *missense*). En este último se identificaron dos mutaciones en *RET*, una *de novo* y otra heredada por vía materna.

2) Casos aislados y esporádicos con mutaciones heredadas: esta categoría reúne a los pacientes HSCR que no presentan síndromes o malformaciones asociadas (aislados), hijos de padres no afectados pero portadores de la mutación (heredada). Este modelo de herencia se explica por la baja penetrancia de las mutaciones, por lo que su presencia *per se* en otros familiares no supone necesariamente la manifestación del fenotipo. Además hay que tener en cuenta que el desarrollo de nuevas metodologías y ensayos funcionales que permiten evaluar de forma más fidedigna la patogenicidad de las variantes de secuencia, hace que constantemente se recataloguen las mismas. No es infrecuente que mutaciones tradicionalmente catalogadas como patogénicas y asociadas a la enfermedad, sean reevaluadas como mutaciones de significado incierto o incluso benigno. Un claro ejemplo lo tenemos en este estudio con las variantes c.2944C>T y c.1699G>A, identificada en el paciente n° 35.

Se identificaron 4 mutaciones heredadas (3 por vía materna y una paterna) en 3 casos aislados y esporádicos (pacientes n° 15 y 21, con fenotipo S-HSCR y paciente n° 35 anteriormente citado, todas ellas de tipo *missense*). Estos pacientes presentan un 50% de posibilidades de transmitir la mutación a su descendencia. Por su penetrancia incompleta (40-52%), la estimación del riesgo de recurrencia para hermanos del paciente es complicada, y se basa en los datos poblacionales de series de pacientes muy grandes y bien caracterizadas. En estas series se ha observado que el riesgo de recurrencia en hermanos de pacientes afectados es altamente dependiente del sexo y de la longitud del segmento agangliónico. En las formas S-HSCR el riesgo de recurrencia para hermanos del paciente está en torno al 1-5%. En el caso de las formas L-HSCR, el riesgo de recurrencia entre hermanos está estimado entre el 9-33% (Amiel y cols, 2008). Los datos evidencian que el riesgo más alto es para un hermano varón de un probando mujer con L-HSCR.

3) Casos aislados y familiares: esta categoría reúne a los pacientes HSCR que no presentan síndromes o malformaciones asociadas (aislados), con historia familiar y con mutación que segrega con la enfermedad. En nuestra serie identificamos 2 casos familiares, compatibles con modo de herencia autosómico dominante (transmisión vertical de la enfermedad). En el paciente n° 10, se identificó una mutación *missense* que segrega con la enfermedad en la familia, puesto que se hereda del padre que también padece la enfermedad. Al tratarse de un modelo de herencia autosómico dominante, este es el supuesto en el que el asesoramiento genético resulta más sencillo, independientemente de la ya discutida implicación real de la variante hallada en la enfermedad en este caso. Esto significa que tanto el riesgo de recurrencia para hermanos, como de transmisión de la mutación a la descendencia, se estima en un 50% (Figura 5.7). En el caso n° 31, la paciente presenta una hermana afectada, heredando ambas la misma mutación *nonsense* de su madre, sana. Al tratarse de una forma de TCA, se estima un riesgo de recurrencia para hermanos e hijos de la paciente del 33%.

4) Casos sindrómicos: esta categoría reúne a los pacientes HSCR que presentan el aganglionismo en contexto de un síndrome o malformaciones asociadas. En nuestra serie se identificaron 5 pacientes con DS en los que se ofreció el asesoramiento genético correspondiente. A este respecto cabe destacar que las anomalías cromosómicas más frecuentes son esporádicas (no heredadas de ninguno de los progenitores) y, por lo tanto, el riesgo de recurrencia es bajo ($\leq 1\%$). Tal es el caso de las trisomías regulares entre las que se inclu-

yen el DS y de las anomalías estructurales (deleciones o duplicaciones). Este riesgo puede verse modificado por factores ambientales como edad de los progenitores, como en el caso de la trisomías, cuya frecuencia aumenta con la edad materna. En 2 de estos casos (n° 12 y 36) se identificaron mutaciones en *RET*; en uno de ellos, el estudio reveló una mutación en *RET* heredada por vía paterna de un progenitor no afecto, a la que se aplican las consideraciones previamente descritas para las mutaciones esporádicas heredadas. En el otro caso no pudo realizarse estudio genético a los padres por lo que no puede estimarse el riesgo de recurrencia para hermanos. En cualquier caso, el asesoramiento genético sobre la anomalía cromosómica es independiente al correspondiente asesoramiento genético sobre HSCR (que a todos los efectos sería igual que el de los casos aislados y esporádicos).

Por último, considerando que la expresión de la enfermedad dependa de la contribución de diferentes eventos moleculares adicionales, genes o regiones reguladoras que actúen de una forma aditiva o multiplicativa modulando la penetrancia de mutaciones o la expresión de la enfermedad en individuos afectados, se estudió la presencia de la variante *Enhancer* (c.73+9277C>T, rs2435357), localizada en el intrón 1 de *RET*, para evaluar su posible participación. Dicha variante se encuentra en un dominio que se ha demostrado como uno de los principales reguladores de la expresión de *RET*, potenciándola específicamente en el SNE. Esta es la variante descrita hasta la fecha con un mayor efecto sobre el riesgo de padecer HSCR, y fue identificada en 30 pacientes de la serie. No obstante su penetrancia es baja, por lo que su transmisión a la descendencia no implica la aparición de la enfermedad.

5.6.2. Mutaciones en *SOX10*

En el presente trabajo se han identificado dos mutaciones que generan la aparición de un codón de parada prematuro en *SOX10* (p.Thr370Serfs*38 y p.His306Thrfs*5), siendo responsables del fenotipo WS4 y PCWH en los pacientes n° 28 y 23 respectivamente. Este tipo de mutaciones deletéreas que originan codones de parada prematuros presentes en los exones finales del gen, representan la causa molecular responsable del fenotipo en la mayoría de los casos. Respecto al asesoramiento genético ofrecido, podemos distinguir dos escenarios:

1) Caso WS4 familiar con mutación heredada: en el caso del paciente n° 28, el estudio molecular reveló la mutación c.1107_1108insGCTGGGGCCCCCACTAC (p.Thr370Serfs*38), heredada por vía materna e identificada a lo largo de tres generaciones con fenotipos diferentes. En el caso de la abuela materna del paciente, se manifestaba en forma de hipopigmentación, y en el caso de la madre del paciente, con pérdida de audición. Se trata de uno de los pocos casos descritos de WS4 familiar, con variabilidad fenotípica entre individuos que portan la misma mutación. En este caso, el riesgo de recurrencia entre hermanos así como el de transmisión de la mutación a la descendencia se estima en un 50%, a pesar de que la penetrancia es incompleta, como queda demostrado por el hecho de que esta mutación está presente en miembros de la misma familia con formas incompletas del síndrome.

2) Caso WS4 esporádico con mutación *de novo*: corresponde al paciente n° 23, en el que se identificó la mutación *de novo* en heterocigosis c.915delG (p.His306Thrfs*5), localizada en el exón 5 del gen *SOX10*. Este paciente presentaba la variante neurológica de WS4 llamada neuropatía desmielinizante periférica, leucodistrofia desmielinizante central, síndrome de Waardenburg y enfermedad de Hirschsprung (PCWH). La

naturaleza *de novo* en este paciente esporádico (hijo de padres no afectados y no portadores de la mutación), es indicativa de su implicación en la enfermedad. El riesgo de recurrencia para hermanos del paciente es muy bajo (<1%), aunque no puede descartarse un mosaicismo germinal (Figura 5.7).

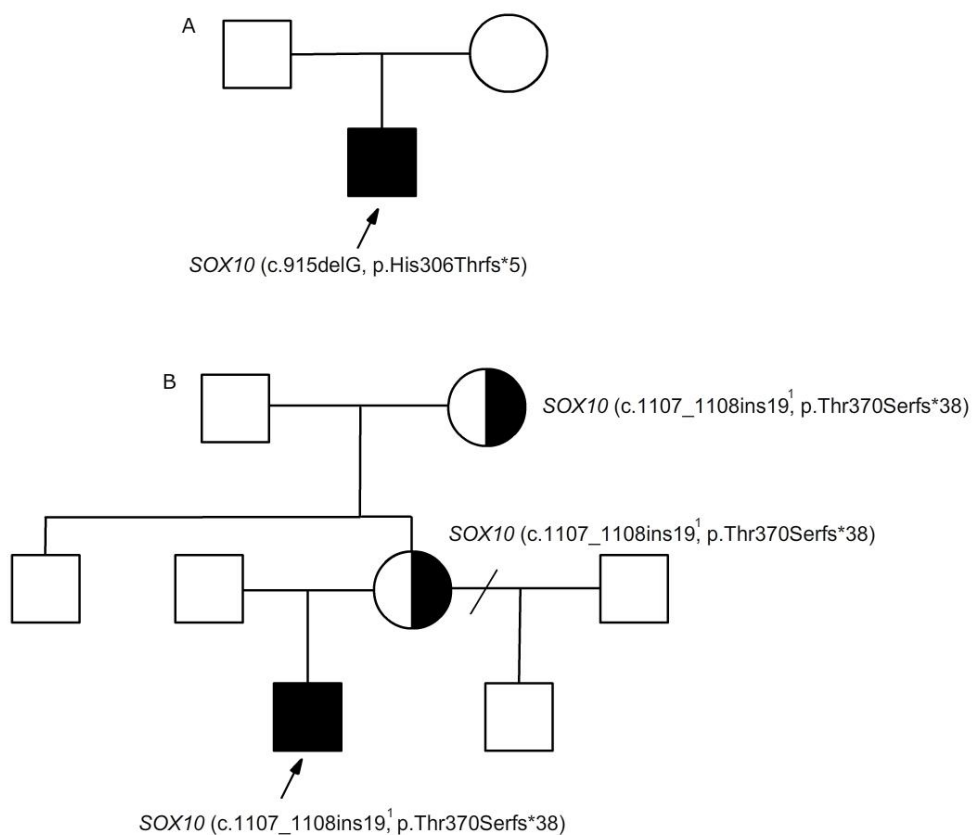


Figura 5.7: Segregación familiar de las variantes halladas en los casos n° 23 (A) y 28 (B).

†Los 19 nucleótidos de la inserción corresponden a la secuencia: GCTGGGGCCCCCACACTAC.

5.6.3. Mutaciones en *EDNRB*

La penetrancia para las mutaciones encontradas en heterocigosis tanto en *EDN3* como *EDNRB* es incompleta y el fenotipo predominante es S-HSCR. Generalmente, mutaciones en heterocigosis dan lugar a la aparición de HSCR aislado mientras que aquellas que se encuentran en homocigosis o heterocigosis compuesta se relacionan con WS4 (Attíe y cols, 1995; Ederly y cols, 1996; Hofstra y cols, 1996; Verheij y cols, 2002).

En nuestra serie, se identificó una mutación en *EDNRB* en heterocigosis (c.1169delC, que origina un codón de parada prematuro) con herencia no conocida en un caso aislado y esporádico de TCA (paciente número n° 6). La no disponibilidad de muestra de ADN de los progenitores de este paciente no nos permitió determinar si la mutación era *de novo* o heredada, por lo que no se pudo estimar el riesgo de recurrencia para hermanos. Por otra parte, el riesgo de transmisión de la mutación a la descendencia es de un 50%. La penetrancia de las mutaciones en *EDNRB* asociadas a HSCR tampoco es completa; si bien por la naturaleza propia de esta mutación, que altera la secuencia proteica en alto grado, podemos asumir que la penetrancia deber se bastante alta.

6. Conclusiones



- 6.1.** Los resultados de nuestro trabajo confirman la existencia de un espectro de gravedad clínica en la presentación de HSCR y demuestran que la aplicación al diagnóstico de una escala clínica construida a partir de variables objetivas puede contribuir a identificar precozmente las formas graves de la enfermedad. Una puntuación ≥ 11 en la escala propuesta, mostró una adecuada sensibilidad (0,87) y especificidad (0,81) para este propósito.
- 6.2.** El análisis profundo de la escala inicialmente propuesta reveló que una escala simplificada de 3 ítems, es útil para seleccionar los casos graves de HSCR, presentando una sensibilidad y especificidad superiores (0,93 y 0,84 respectivamente). En este caso, el punto de corte óptimo se situó en 5 puntos. Los autores consideran que la escala simplificada puede presentar mayor interés en la práctica clínica por la sencillez de su aplicación.
- 6.3.** En el 53,3% de los pacientes HSCR clasificados como graves se identificaron mutaciones genéticas *vs* el 15,3 % de los no graves ($p = 0,015$), lo que sugiere una correlación entre la gravedad de la enfermedad y el hallazgo de resultados positivos en el estudio genético planteado.
- 6.4.** El estudio molecular de *RET*, *EDNRB* y *EDN3* realizado en todos los pacientes HSCR, así como de *SOX10* en los casos de WS4, reveló la presencia de 8 variantes de secuencia diferentes en *RET*, 1 en *EDNRB* y 2 en *SOX10*. De ellas, 9 han sido comunicadas como asociadas a HSCR por primera vez por nuestro grupo. Estos resultados ofrecen una la frecuencia mutacional de nuestra cohorte HSCR en *RET* del 17,5% y 100% en los casos esporádicos y familiares respectivamente, así como del 2,4% en *EDNRB*. Para el subgrupo de WS4 comunicamos una frecuencia mutacional en *SOX10* del 66,7%.
- 6.5.** La variante *Enhancer* en el intrón 1 del del proto-oncogén *RET* (c.73+9277T>C, rs2435357) fue genotipada en los 42 casos de nuestra cohorte, identificándose en 30 pacientes. La mayoría de ellos correspondieron a fenotipos no graves (76,9% *vs* 66,7%, $p = 0,713$) donde predominaron los casos esporádicos. Esta distribución coincide con lo previamente descrito en la literatura para este factor de susceptibilidad genético.
- 6.6.** Nuestro grupo defiende el análisis molecular del proto-oncogén *RET* como parte del protocolo de estudio de los pacientes HSCR. Una de las 8 variantes de secuencia identificada en este gen se localizó en un exón de riesgo para MEN2A/FMTC. Dado que no afectaba a ninguno de los 4 residuos cisteínicos clave asociados a MEN2, no fue preciso tomar medidas profilácticas a este respecto.
- 6.7.** Los resultados obtenidos apoyan la importancia de realizar estudio genético en caso de sospecha de WS4, al proporcionar información sobre la extensión del aganglionismo y las posibles manifestaciones neurológicas a las que puede asociarse.
- 6.8.** Teniendo en cuenta las dificultades para la realización de un asesoramiento genético práctico en esta entidad, los resultados del estudio genético realizado contribuyeron a efectuar una estimación del riesgo de recurrencia de la enfermedad.
- 6.9.** Se considera necesaria la validación prospectiva de las herramientas propuestas así como la identificación de nuevos genes y mecanismos que expliquen la variabilidad fenotípica de esta entidad.

7. Bibliografía



- Abe Y, Sakurai T, Yamada T, Nakamura T, Yanagisawa M, Goto K. Functional analysis of five endothelin-B receptor mutations found in human Hirschsprung disease patients. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;275:524-31.
- Aboagye J, Goldstein SD, Salazar JH, Papandria D, Okoye MT, Al-Omar K, et al. Age at presentation of common pediatric surgical conditions: Reexamining dogma. *J Pediatr Surg.* 2014;49:995-9.
- Airaksinen MS, Saarma M. The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. *Nat Rev Neurosci.* 2002;3:383-94.
- Alehossein M, Roohi A, Pourgholami M, Mollaeian M, Salamati P. Diagnostic accuracy of radiologic scoring system for evaluation of suspicious hirschsprung disease in children. *Iran J Radiol.* 2015;12:e12451.
- Al-Shboul OA. The importance of interstitial cells of cajal in the gastrointestinal tract. *Saudi J Gastroenterol.* 2013;19:3-15.
- Amiel J, Laudier B, Attie-Bitach T, Trang H, de Pontual L, Gener B, et al. Polyalanine expansion and frameshift mutations of the paired-like homeobox gene *PHOX2B* in congenital central hypoventilation syndrome. *Nat Genet.* 2003;33:459-61.
- Amiel J, Rio M, de Pontual L, Redon R, Malan V, Boddart N, et al. Mutations in *TCF4*, encoding a class I basic helix-loop-helix transcription factor, are responsible for Pitt-Hopkins syndrome, a severe epileptic encephalopathy associated with autonomic dysfunction. *Am J Hum Genet.* 2007;80:988-93.
- Amiel J, Sproat-Emison E, Garcia-Barceló M, Lantieri F, Burzynski G, Borrego S, et al. Hirschsprung Disease Consortium. Hirschsprung disease, associated syndromes and genetics: a review. *J Med Genet.* 2008;45:1-14.
- Anders J, Kjar S, Ibáñez CF. Molecular modeling of the extracellular domain of the RET receptor tyrosine kinase reveals multiple cadherin-like domains and a calcium-binding site. *J Biol Chem.* 2001;276:35808-17.
- Anderson RB, Turner KN, Nikonenko AG, Hemperly J, Schachner M, Young HM. The cell adhesion molecule L1 is required for chain migration of neural crest cells in the developing mouse gut. *Gastroenterology.* 2006;130:1221-32.
- Angrist M, Kauffman E, Slaughaupt SA, Matisse TC, Puffenberger EG, Washington SS, et al. A gene for Hirschsprung disease (megacolon) in the pericentromeric region of human chromosome 10. *Nat Genet.* 1993;4:351-6.
- Aoki Y, Saint-Germain N, Gyda M, Magner-Fink E, Lee YH, Credidio C, et al. SOX10 regulates the development of neural crest-derived melanocytes in *Xenopus*. *Dev Biol.* 2003;259: 19-33.

- Arai H, Nakao K, Takaya K, Hosoda K, Ogawa Y, Nakanishi S, Imura H. The human endothelin-B receptor gene. Structural organization and chromosomal assignment. *J Biol Chem.* 1993;268:3463-70.
- Arighi E, Alberti L, Torriti F, Ghizzoni S, Rizzetti MG, Pelicci G, et al. Identification of Shc docking site on Ret tyrosine kinase. *Oncogene*, 1997;14:773-82.
- Arighi E, Borrello MG, Sariola H. RET tyrosine kinase signaling in development and cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005;16:441-67.
- Arnold S, Pelet A, Amiel J, Borrego S, Hofstra R, Tam P, et al. Interaction between a chromosome 10 *RET* enhancer and chromosome 21 in the Down syndrome-Hirschsprung disease association. *Hum Mutat.* 2009;30:771-5.
- Asai N, Murakami H, Iwashita T, Takahashi M. A mutation at tyrosine 1062 in MEN2A-Ret and MEN2B-Ret impairs their transforming activity and association with shc adaptor proteins. *J Biol Chem.* 1996; 271:17644-9.
- Asai N, Fukuda T, Wu Z, Enomoto A, Pachnis V, Takahashi M, et al. Targeted mutation of serine 697 in the Ret tyrosine kinase causes migration defect of enteric neural crest cells. *Development.* 2006;133:4507-16.
- Attié T, Till M, Pelet A, Amiel J, Edery P, Boutrand L, et al. Mutation of the endothelin-receptor B gene in Waardenburg-Hirschsprung disease. *Hum Mol Genet.* 1995;4:2407-9.
- Barlow A, De Graaff E, Pachnis V. Enteric nervous system progenitors are coordinately controlled by the G protein-coupled receptor EDNRB and the receptor tyrosine kinase RET. *Neuron.* 2003;40:905-16.
- Beckett EA, Ro S, Bayguinov Y, Sanders KM, Ward SM. Kit signaling is essential for development and maintenance of interstitial cells of Cajal and electrical rhythmicity in the embryonic gastrointestinal tract. *Dev Dyn.* 2007;236:60-72.
- Bekkali N, Hamers SL, Schipperus MR, Reitsma JB, Valerio PG, Van Toledo L, et al. Duration of meconium passage in preterm and term infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2008;93:F376-9.
- Belin B, Corteville JE, Langer JC. How accurate is prenatal sonography for the diagnosis of imperforate anus and Hirschsprung's disease? *Pediatr Surg Int.* 1995;10:30-32.
- Best KE, Glinianaia SV, Bythell M, Rankin J. Hirschsprung's disease in the North of England: prevalence, associated anomalies, and survival. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2012;94:477-80.
- Best KE, Addor MC, Arriola L, Balku E, Barisic I, Bianchi F, et al. Hirschsprung's disease prevalence in Europe: a register based study. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2014; 00:695-702.
- Bidaud C, Salomon R, Van Camp G, Pelet A, Attié T, Eng C, et al. Endothelin-3 gene mutations in isolated and syndromic Hirschsprung disease. *Eur J Hum Genet.* 1997;5:247-5.
- Bill AH, Chapman ND. The enterocolitis of Hirschsprung's disease. *Am J Surg.* 1962;103:70-4.

- Blaugrund E, Pham TD, Tennyson VM, Lo L, Sommer L, Anderson DJ, et al. Distinct subpopulations of enteric neuronal progenitors defined by time of development, sympathoadrenal lineage markers and Mash-1-dependence. *Development*. 1996;122:309-20.
- Blesa E, Galán E, Cardesa JJ. Hirschsprung's disease: Epidemiology, classification and associated congenital defects. En: Núñez Núñez R, López-Alonso M. (Eds). *Hirschsprung's disease: Diagnosis and treatment*. New York: Nova Publishers; 2009.p.72-85.
- Boer L, Radziun AB, Oostra R-J. Frederik Ruysch (1638-1731): Historical perspective and contemporary analysis of his teratological legacy. *Am J Med Genet A*. 2017;173:16-41.
- Boesmans W, Martens MA, Weltens N, Hao MM, Tack J, Cirillo C, Vanden Berghe. Imaging neuron-glia interactions in the enteric nervous system. *Front Cell Neurosci*. 2013;7:183.
- Boix-Ochoa J, Abad Calvo P. Hirschsprung's disease: Historical review. En: Núñez Núñez R, López-Alonso M. (Eds). *Hirschsprung's disease: Diagnosis and treatment*. New York: Nova Publishers; 2009.p.3-14.
- Bolande RP. The neurocristopathies: a unifying concept of disease arising in neural crest maldevelopment. *Hum Pathol*. 1974;5:409-20.
- Boley SJ. A new operative approach to total aganglionosis of the colon. *Surg Gynecol Obstet*. 1984;159:481-4.
- Bolk S, Angrist M, Xie J, Yanagisawa M, Silvestri JM, Weese-Mayer DE, et al. Endothelin-3 frameshift mutation in congenital central hypoventilation syndrome. *Nat Genet*. 1996;13:395-6.
- Bondurand N, Kobetz A, Pingault V, Lemort N, Encha-Razavi F, Couly G, et al. Expression of the *SOX10* gene during human development. *FEBS Lett*. 1998;432:168-172.
- Bondurand N, Natarajan D, Barlow A, Thapar N, Pachnis V. Maintenance of mammalian enteric nervous system progenitors by SOX10 and endothelin 3 signalling. *Development*. 2006; 133:2075-86.
- Bondurand N, Dastot-Le Moal F, Stanchina L, Collot N, Baral V, Marlin S, et al. Deletions at the *SOX10* gene locus cause Waardenburg syndrome types 2 and 4. *Am J Hum Genet*. 2007;81:1169-85.
- Bondurand N, Sham MH. The role of SOX10 during enteric nervous system development. *Dev Biol*. 2013;382:330-43.
- Borrego S, Eng C, Sánchez B, Sáez ME, Navarro E, Antiñolo G. Molecular analysis of the *RET* and *GDNF* genes in a family with multiple endocrine neoplasia type 2A and Hirschsprung disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998;83:3361-4.
- Borrego S, Sáez ME, Ruiz A, Gimm O, López-Alonso M, Antiñolo G, et al. Specific polymorphisms in the *RET* proto-oncogene are over-represented in patients with Hirschsprung disease and may represent loci modifying phenotypic expression. *Med Genet*. 1999;36:771-4.

- Borrego S, Ruiz A, Saez ME, Gimm O, Gao X, López-Alonso M, et al. *RET* genotypes comprising specific haplotypes of polymorphic variants predispose to isolated Hirschsprung disease. *J Med Genet.* 2000;37:572-8.
- Borrego S, Wright FA, Fernández RM, Williams N, López-Alonso M, Davuluri R, et al. A founding locus within the *RET* proto-oncogene may account for a large proportion of apparently sporadic Hirschsprung disease and a subset of cases of sporadic medullary thyroid carcinoma. *Am J Hum Genet.* 2003;72:88-100.
- Borrego S, Ruiz-Ferrer M, Fernández RM. Genetic basis of Hirschsprung's disease. En: Núñez Núñez R and Fabbro MA (Eds). *Constipation in children: Diagnosis and treatment.* New York: Nova Biomedical; 2013a.p.33-78.
- Borrego S, Ruiz-Ferrer M, Fernández RM, Antiñolo G. Hirschsprung's disease as a model of complex genetic etiology. *Histol Histopathol.* 2013b;28:1117-36.
- Bowles J, Schepers G, Koopman P. Phylogeny of the SOX family of developmental transcription factors based on sequence and structural indicators. *Dev. Biol.* 2000;227:239-55.
- Brand M, Le Moullec JM, Corvol P, Gasc JM. Ontogeny of endothelins-1 and -3, their receptors, and endothelin converting enzyme-1 in the early human embryo. *J Clin Invest.* 1998;101:549-59.
- Brookes SJ. Classes of enteric nerve cells in the guinea-pig small intestine. *Anat Rec.* 2001;262:58-70.
- Brooks AS, Oostra BA, Hofstra RM. Studying the genetics of Hirschsprung's disease: unraveling an oligogenic disorder. *Clin Genet.* 2005;67:6-14.
- Burkardt DD, Graham JM Jr, Short SS, Frykman PK. Advances in Hirschsprung disease genetics and treatment strategies: an update for the primary care pediatrician. *Clin Pediatr (Phila).* 2014;53:71-81.
- Burns AJ, Douarin NM. The sacral neural crest contributes neurons and glia to the post-umbilical gut: spatiotemporal analysis of the development of the enteric nervous system. *Development.* 1998;125:4335-47.
- Burns AJ, Roberts RR, Bornstein JC, Young HM. Development of the enteric nervous system and its role in intestinal motility during fetal and early postnatal stages. *Semin Pediatr Surg.* 2009;18:196-205.
- Butler Tjaden NE, Trainor PA. The developmental etiology and pathogenesis of Hirschsprung disease. *Transl Res.* 2013;162:1-15.
- Bütter A, Gagné J, Al-Jazaeri A, Emran MA, Deal C, St-Vil D. Prophylactic thyroidectomy in pediatric carriers of multiple endocrine neoplasia type 2A or familial medullary thyroid carcinoma: mutation in C620 is associated with Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg.* 2007;42:203-6.
- Caniano DA, Ormsbee HS 3rd, Polito W, Sun CC, Barone FC, Hill JL. Total intestinal aganglionosis. *J Pediatr Surg.* 1985;20:456-60.

- Cantarero Carmona I. Aportaciones originales al conocimiento de las células intersticiales de Cajal. Tesis doctoral. Universidad de Zaragoza, 2011.
- Carter CO. Genetics of common disorders. *Br Med Bull.* 1969;25:52-7.
- Catto-Smith AG, Trajanovska M, Taylor RG. Long-term continence in patients with Hirschsprung's disease and Down syndrome. *J Gastroenterol Hepatol.* 2006;21:748-53.
- Chakravarti A, Lyonnet S. Hirschsprung disease. En: Scriver CR, Beaudet AL, Valle D, Sly WS, Childs B, Kinzler K, Vogelstein B, editors. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* (8th Ed). New York: McGraw-Hill; 2001.p.6231-55.
- Chaoui A, Watanabe Y, Touraine R, Baral V, Goossens M, Pingault V, et al. Identification and functional analysis of *SOX10* missense mutations in different subtypes of Waardenburg syndrome. *Hum Mutat.* 2011;32:1436-49.
- Chappuis-Flament S, Pasini A, De Vita G, Ségouffin-Cariou C, Fusco A, Attié T, et al. Dual effect on the RET receptor of MEN 2 mutations affecting specific extracytoplasmic cysteines. *Oncogene.* 1998;17:2851-61.
- Chatten J, Voorhess ML. Familial neuroblastoma. Report of a kindred with multiple disorders, including neuroblastomas in four siblings. *N Engl J Med.* 1967;277:1230-6.
- Chaudhury A. Furthering the debate on the role of interstitial cells of Cajal (ICCs) in enteric inhibitory neuromuscular neurotransmission. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2016;311:C479 - C481.
- Chen Y, Nah SA, Lakshmi NK, Ong CC, Chua JH, Jacobsen A, et al. Transanal endorectal pull-through versus transabdominal approach for Hirschsprung's disease: a systematic review and meta-analysis. *J Pediatr Surg.* 2013;48:642-51.
- Chogle A, Velasco-Benítez CA, Koppen IJ, Moreno JE, Ramírez Hernández CR, Saps MA. Population-based study on the epidemiology of functional gastrointestinal disorders in young children. *J Pediatr.* 2016;179:139-143.
- Clark DA. Times of first void and first stool in 500 newborns. *Pediatrics.* 1977;60:457-9.
- Coyle D, Friedmacher F, Puri P. The association between Hirschsprung's disease and multiple endocrine neoplasia type 2a: a systematic review. *Pediatric Surg Int.* 2014;30:751-6.
- De Kok JB, Wiegerinck ET, Giesendorf BA, Swinkels DW. Rapid genotyping of single nucleotide polymorphisms using novel minor groove binding DNA oligonucleotides (MGB probes). *Hum Mutat.* 2002;19:554-9.
- De La Torre-Mondragon L, Ortega-Salgado JA. Transanal endorectal pull-through for Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg.* 1988; 33:1283-6.

- De La Torre L, Langer JC. Transanal endorectal pull-through for Hirschsprung disease: technique, controversies, pearls, pitfalls, and an organized approach to the management of postoperative obstructive symptoms. *Semin Pediatr Surg.* 2010;19:96-106.
- De Lorijn F, Reitsma JB, Voskuil WP, Aronson DC, Ten Kate FJ, Smets AM, et al. Diagnosis of Hirschsprung's disease: a prospective, comparative accuracy study of common tests. *J Pediatr.* 2005;146:787-92.
- De Lorijn F, Boeckxstaens GE, Benninga MA. Symptomatology, pathophysiology, diagnostic work-up, and treatment of Hirschsprung disease in infancy and childhood. *Curr Gastroenterol Rep.* 2007;9:245-53.
- De Pontual L, Pelet A, Clement-Ziza M, Trochet D, Antonarakis SE, Attie-Bitach T, et al. Epistatic interactions with a common hypomorphic *RET* allele in syndromic Hirschsprung disease. *Hum Mutat.* 2007;28:790-6.
- Demehri FR, Halaweish IF, Coran AG, Teitelbaum DH. Hirschsprung-associated enterocolitis: pathogenesis, treatment and prevention. *Pediatr Surg Int.* 2013;29:873-81.
- Di Nardo G, Blandizzi C, Volta U, Colucci R, Stanghellini V, Barbara G, et al. Review article: molecular, pathological and therapeutic features of human enteric neuropathies. *Aliment Pharmacol Ther.* 2008;28:25-42.
- Dodero P, Magillo P, Scarsi P. Total colectomy and straight ileo-anal soave endorectal pull-through: personal experience with 42 cases. *Eur J Pediatr Surg.* 2001;11:319-23.
- Doodnath R, Puri P. A systematic review and meta-analysis of Hirschsprung's disease presenting after childhood. *Pediatr Surg Int.* 2010;26:1107-10.
- Duess JW, Puri P. Syndromic Hirschsprung's disease and associated congenital heart disease: a systematic review. *Pediatric Surg Int.* 2015;31:781-5.
- Duhamel P. Une nouvelle operation pour le megacolon congénital: l'abaissement rétrorectal trananal du colon et son application possible au traitement de quelques autres malformations. *Presse Med.* 1956;64:2249-50.
- Dunnen JT, Antonarakis SE. Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. *Hum Mutat.* 2000;15:7-12.
- Durbec PL, Larsson-Blomberg LB, Schuchardt A, Costantini F, Pachnis V. Common origin and developmental dependence on c-ret of subsets of enteric and sympathetic neuroblasts. *Development.* 1996;122:349-58.
- Dutton KA, Pauliny A, Lopes SS, Elworthy S, Carney TJ, Rauch J, et al. Zebrafish colourless encodes *sox10* and specifies non-ectomesenchymal neural crest fates. *Development.* 2001;128:4113-25.

- Ederly P, Attié T, Amiel J, Pelet A, Eng C, Hofstra RM, et al. Mutation of the endothelin-3 gene in the Waardenburg-Hirschsprung disease (Shah-Waardenburg syndrome). *Nat Genet.* 1996;12:442-4.
- Ehrenpreis T. Megacolon in the newborn; a clinical and röntgenological study with special regard to the pathogenesis; a preliminary report. *Acta Paediatr.* 1945;32:358-7.
- Emison ES, McCallion AS, Kashuk CS, Bush RT, Grice E, Lin S. A common sex-dependent mutation in a *RET* enhancer underlies Hirschsprung disease risk. *Nature.* 2005;434:857-63.
- Emison ES, García-Barceló M, Grice EA, Lantieri F, Amiel J, Burzynski, et al. Differential contributions of rare and common, coding and noncoding *RET* mutations to multifactorial Hirschsprung disease liability. *Am J Hum Genet.* 2010;87:60-74.
- Eng C. Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. The *RET* proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2 and Hirschsprung's disease. *N Engl J Med.* 1996;335:943-51.
- Eng C. *RET* proto-oncogene in the development of human cancer. *J Clin Oncol.* 1999;17:380-93.
- Engum SA, Petrites M, Rescorla FJ, Grosfeld JL, Morrison AM, Engles D. Familial Hirschsprung's disease: 20 cases in 12 kindreds. *J Pediatr Surg.* 1993;28:1286-90.
- Enríquez Zarabozo E, Núñez Núñez R, Ayuso Velasco R, Vargas Muñoz I, Fernández de Mera JJ, Blesa Sánchez E. La manometría anorrectal en el diagnóstico neonatal de la enfermedad de Hirschsprung. *Cir Pediatr.* 2010;23:40-5.
- Fan J, Tam P, Vande Woude G, Ren Y. Normalization and analysis of cDNA microarrays using within-array replications applied to neuroblastoma cell response to a cytokine. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004;101:1135-40.
- Faussone-Pellegrini MS, Cortesini C. Ultrastructure of striated muscle fibers in the middle third of the human esophagus. *Histol Histopathol.* 1986;1:119-28.
- Fernández RM, Robledo M, Antiñolo G, Pecina A, Ruiz-Llorente S, Eng C, Borrego S. The *RET* IVS1-126G>T variant is strongly associated with the development of sporadic medullary thyroid cancer. *Thyroid.* 2004;14:329-31.
- Fernández RM, Boru G, Peciña A, Jones K, López-Alonso M, Antiñolo G, et al. Ancestral *RET* haplotype associated with Hirschsprung's disease shows linkage disequilibrium breakpoint at -1249. *J Med Genet.* 2005;42:322-7.
- Fernández RM, Navarro E, Antiñolo G, Ruiz-Ferrer M, Borrego S. Evaluation of the role of *RET* polymorphisms/haplotypes as modifier loci for MEN2, and analysis of the correlation with the type of *RET* mutation in a series of Spanish patients. *Int J Mol Med.* 2006;17 575–81.
- Fernández RM, Sánchez-Mejías A, Ruiz-Ferrer MM, López-Alonso M, Antiñolo G, Borrego S. Is the *RET* proto-oncogene involved in the pathogenesis of intestinal neuronal dysplasia type B? *Mol Med Rep.* 2009;2:265-70.

- Fernández RM, Bleda M, Núñez-Torres R, Medina I, Luzón-Toro B, García-Alonso L, et al. Four new loci associations discovered by pathway-based and network analyses of the genome-wide variability profile of Hirschsprung's disease. *Orphanet J Rare Dis.* 2012;28;7:103.
- Fernández RM, Mathieu Y, Luzón-Toro B, Núñez-Torres R, González-Meneses A, Antiñolo G, et al. Contributions of *PHOX2B* in the pathogenesis of Hirschsprung disease. *PLoS One.* 2013;8:e54043.
- Fernández RM, Núñez-Ramos R, Enguix-Riego MV, Román-Rodríguez FJ, Galán-Gómez E, et al. Waardenburg syndrome type 4: Report of two new cases caused by *SOX10* mutations in Spain. *Am J Med Genet A.* 2014;164:542-7.
- Ferrè F, Clote P. Disulfide connectivity prediction using secondary structure information and diresidue frequencies. *Bioinformatics.* 2005;21:2336-46.
- Friedmacher F, Puri P. Classification and diagnostic criteria of variants of Hirschsprung's disease. *Pediatr Surg Int.* 2013a;29:855-72.
- Friedmacher F, Puri P. Hirschsprung's disease associated with Down syndrome: a meta-analysis of incidence, functional outcomes and mortality. *Pediatr Surg Int.* 2013b;29:937-46.
- Friedmacher F, Puri P. Rectal suction biopsy for the diagnosis of Hirschsprung's disease: a systematic review of diagnostic accuracy and complications. *Pediatr Surg Int.* 2015;31:821-30.
- Frongia G, Günther P, Schenk JP, Strube K, Kessler M, Mehrabi A, et al. Contrast enema for Hirschsprung disease investigation: diagnostic accuracy and validity for subsequent diagnostic and surgical planning. *Eur J Pediatr Surg.* 2016;26:207-14.
- Frykman PK, Short SS. Hirschsprung-associated enterocolitis: prevention and therapy. *Semin Pediatr Surg.* 2012;21:328-35.
- Fu M, Lui VC, Sham MH, Pachnis V, Tam PK. Sonic hedgehog regulates the proliferation, differentiation, and migration of enteric neural crest cells in gut. *J Cell Biol.* 2004;166:673-84.
- Furness JB. Types of neurons in the enteric nervous system. *J. Auton Nerv Syst.* 2000;81:87-96.
- Furness JB, Jones C, Nurgali K, Clerc N. Intrinsic primary afferent neurons and nerve circuits within the intestine. *Prog Neurobiol* 2004;72:143-64.
- Furness JB. The organisation of the autonomic nervous system: peripheral connections. *Auton Neurosci.* 2006;130:1-5.
- Gabella G. The number of neurons in the small intestine of mice, guinea-pigs and sheep. *Neuroscience.* 1987;22:737-52.
- Galán E, Blesa E, Cardesa JJ. Genetics and Hirschsprung's Disease. In: Núñez Núñez R, López-Alonso M. (Eds). *Hirschsprung's disease: Diagnosis and treatment.* New York: Nova Publishers; 2009.p.86-105.

- Gálvez Y, Skába R, Vajtrová R, Frantlová A, Herget J. Evidence of secondary neuronal intestinal dysplasia in a rat model of chronic intestinal obstruction. *J Invest Surg.* 2004;17:31-9.
- Garavelli L, Mainardi PC. Mowat-Wilson síndrome. *Orphanet J Rare Dis.* 2007;2:42.
- Garnier J, Gibrat JF, Robson B. GOR method for predicting protein secondary structure from amino acid sequence. *Methods Enzymol.* 1996;266:540-53.
- Geneste O, Bidaud C, De Vita G, Hofstra RM, Tartare-Deckert S, Buys CH, et al. Two distinct mutations of the RET receptor causing Hirschsprung's disease impair the binding of signalling effectors to a multifunctional docking site. *Hum Mol Genet.* 1999;8:1989-99.
- Georgeson KE, Fuenfer MM, Hardin WD. Primary laparoscopic pull through for Hirschsprung's disease in infants and children. *J Pediatr Surg.* 1995;30:1017-22.
- Georgeson KE, Robertson DJ. Laparoscopic-assisted approaches for the definitive surgery for Hirschsprung's disease. *Semin Pediatr Surg.* 2004;13:256-62.
- Gershon MD, Rothman TP. Enteric glia. *Glia.* 1991;4:195-204.
- Gershon MD. The enteric nervous system: a second brain. *Hosp Pract.* 1999;34: 31-2, 35-8, 41-2.
- Gershon MD, Ratcliffe EM. Developmental biology of the enteric nervous system: pathogenesis of Hirschsprung's disease and other congenital dysmotilities. *Semin Pediatr Surg.* 2004;13:224-35.
- Gianino S, Grider JR, Cresswell J, Enomoto H, Heuckeroth RO. GDNF availability determines enteric neuron number by controlling precursor proliferation. *Development.* 2003;130:2187-98.
- Goldberg EL. An epidemiological study of Hirschsprung's disease. *Int J Epidemiol.* 1984;13:479-85.
- Goldstein AM, Hofstra RM, Burns AJ. Building a brain in the gut: development of the enteric nervous system. *Clin Genet.* 2013;83:307-16.
- Gosain A. Established and emerging concepts in Hirschsprung's-associated enterocolitis. *Pediatr Surg Int.* 2016;32:313-20.
- Granero Cendón R, Moya Jiménez MJ, Cabrera García R, Tuduri Limousin I, Hernández Orgaz A, De Agustín Asensio JC, et al. Relación entre la longitud radiológica del enema opaco y la longitud agangliónica de la pieza en la enfermedad de Hirschsprung. *Cir Pediatr.* 2010;23:53-6.
- Grice EA, Rochelle ES, Green ED, Chakravarti A, McCallion AS. Evaluation of the *RET* regulatory landscape reveals the biological relevance of a HSCR implicated enhancer. *Hum Mol Genet.* 2005;14:3837-45.
- Guex N, Peitsch MC. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis.* 1997;18:2714-23.

- Guillemot F, Lo LC, Johnson JE, Auerbach A, Anderson DJ, Joyner AL. Mammalian achaete-scute homolog 1 is required for the early development of olfactory and autonomic neurons. *Cell*. 1993;75:463-76.
- Guo W, Zhang O, Chen Y, Hou D. Diagnostic scoring system of Hirschsprung's disease in the neonatal period. *Asian J Surg*. 2006;29:176-9.
- Hackam DJ, Filler RM, Pearl RH. Enterocolitis after the surgical treatment of Hirschsprung's disease: risk factors and financial impact. *J Pediatr Surg*. 1998;33:830-3.
- Haddad GG, Mazza NM, Defendini R, Blanc WA, Driscoll JM, Epstein MA, et al. Congenital failure of automatic control of ventilation, gastrointestinal motility and heart rate. *Medicine*. 1978;57:517-26.
- Hagger R, Gharaie S, Finlayson C, Kumar D. Distribution of the interstitial cells of Cajal in the human anorectum. *J Auton Nerv Syst*. 1998;73:75-9.
- Hall BK. The neural crest and neural crest cells: discovery and significance for theories of embryonic organization. *J Biosci*. 2008;33:781-93.
- Han-Geurts IJ, Hendrix VC, de Blaauw I, Wijnen MH, van Heurn EL. Outcome after anal intrasphincteric botox injection in children with surgically treated Hirschsprung disease. *Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2014;59:604-7.
- Hao MM, Young HM. Development of enteric neuron diversity. *J Cell Mol Med*. 2009;13:1193-1210.
- Haricharan RN, Georgeson KE. Hirschsprung disease. *Semin Pediatr Surg*. 2008a;17:266-75.
- Haricharan RN, Seo JM, Kelly DR, Mroczek-Musulman EC, Aprahamian CJ, Morgan TL, et al. Older age at diagnosis of Hirschsprung disease decreases risk of postoperative enterocolitis, but resection of additional ganglionated bowel does not. *J Pediatr Surg*. 2008b;43:1115-23.
- Hatano M, Aoki T, Dezawa M, Yusa S, Iitsuka Y, Koseki H, et al. A novel pathogenesis of megacolon in *Ncx/Hox11L1* deficient mice. *J Clin Invest*. 1997;100:795-801.
- Heanue TA, Pachnis V. Enteric nervous system development and Hirschsprung's disease: advances in genetic and stem cell studies. *Nat Rev Neurosci*. 2007;8:466-79.
- Hearn CJ, Murphy M, Newgreen D. GDNF and ET-3 differentially modulate the numbers of avian enteric neural crest cells and enteric neurons in vitro. *Dev Biol*. 1998;197:93-105.
- Hilleren P, Parker R. Mechanisms of mRNA surveillance in eukaryotes. *Annu Rev Genet*. 1999; 33:229-60.
- Hirsch C, Gauss R, Horn SC, Neuber O, Sommer T. The ubiquitylation machinery of the endoplasmic reticulum. *Nature*. 2009;458:453-60.
- Hirschsprung H. Stuhlträghheit neugeborener in folge von dilatation and hypertrophie des colons. *Jahrb Kinderheilkd*. 1888;27:1-7.

- Hofstra RM, Osinga J, Tan-Sindhunata G, Wu Y, Kamsteeg EJ, Stulp RP, et al. A homozygous mutation in the endothelin-3 gene associated with a combined Waardenburg type 2 and Hirschsprung phenotype (Shah-Waardenburg syndrome). *Nat Genet.* 1996;12:445-7.
- Hofstra RM, Valdenaire O, Arch E, Osinga J, Kroes H, Loffler BM, et al. A loss-of-function mutation in the endothelin-converting enzyme 1 (ECE-1) associated with Hirschsprung disease, cardiac defects, and autonomic dysfunction. *Am J Hum Genet.* 1999;64:304-8.
- Hotta R, Stamp LA, Foong JP, McConnell SN, Bergner AJ, Anderson RB, et al. Transplanted progenitors generate functional enteric neurons in the postnatal colon. *J Clin Invest.* 2013;123:1182-9.
- Hotta R, Cheng LS, Graham HK, Pan W, Nagy N, Belkind-Gerson J, Goldstein AM. Isogenic enteric neural progenitor cells can replace missing neurons and glia in mice with Hirschsprung disease. *Neurogastroenterol Motil.* 2016;28:498-512.
- Ieiri S, Higashi M, Teshiba R, Saeki I, Esumi G, Akiyoshi J, et al. Clinical features of Hirschsprung's disease associated with Down syndrome: a 30-year retrospective nationwide survey in Japan. *J Pediatr Surg.* 2009;44:2347-51.
- Ieiri S, Nakatsuji T, Akiyoshi J, Higashi M, Hashizume M, Suita S, et al. Long-term outcomes and the quality of life of Hirschsprung disease in adolescents who have reached 18 years or older--a 47-year single-institute experience. *J Pediatr Surg.* 2010;45:2398-402.
- Ikeda K, Goto S. Total colonic aganglionosis with or without small bowel involvement: an analysis of 137 patients. *J Pediatr Surg.* 1986;21:319-22.
- Ikeda I, Ishizaka Y, Tahira T, Suzuki T, Onda M, Sugimura T, Nagao M. Specific expression of the ret proto-oncogene in human neuroblastoma cell lines. *Oncogene.* 1990;5:1291-96.
- Innis MA, Gelfand DH. Optimization of PCRs. En: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (Eds.) *PCR protocols: a guide to methods and applications.* San Diego: Academic Press., Inc. Harcourt Brace Jovanovich; 1990.
- Inoue K, Tanabe Y, Lupski JR. Myelin deficiencies in both the central and the peripheral nervous systems associated with a *SOX10* mutation. *Ann Neurol.* 1999;46:313-8.
- Inoue K, Khajavi M, Ohyama T, Hirabayashi S, Wilson J, Reggin, et al. Molecular mechanism for distinct neurological phenotypes conveyed by allelic truncating mutations. *Nat Genet.* 2004;36:361-9.
- Ishii K, Doi T, Inoue K, Okawada M, Lane GJ, Yamataka A, et al. Correlation between multiple *RET* mutations and severity of Hirschsprung's disease. *Pediatr Surg Int.* 2013;29:157-63.
- Iwamoto T, Taniguchi M, Asai N, Ohkusu K, Nakashima I, Takahashi M. cDNA cloning of mouse *RET* proto-oncogene and its sequence similarity to the cadherin superfamily. *Oncogene.* 1993;8:1087-91.
- Jakobson-Setton A, Weissmann-Brenner A, Achiron R, Kuint J, Gindes L. Retrospective analysis of prenatal ultrasound of children with Hirschsprung disease. *Prenat Diagn.* 2015;35:699-702.

- Jannot AS, Pelet A, Henrion-Caude A, Chaoui A, Masse-Morel M, Arnold S, et al. Chromosome 21 scan in Down syndrome reveals *DSCAM* as a predisposing locus in Hirschsprung disease. *PLoS One*. 2013;8:e62519.
- Jijiwa M, Fukuda T, Kawai K, Nakamura A, Kurokawa K, Murakumo Y, et al. A targeting mutation of tyrosine 1062 in RET causes a marked decrease of enteric neurons and renal hypoplasia. *Mol Cell Biol*. 2004;24:8026-36.
- Juliá V, Castañón M, Tarrado X, Pinzón JC, Morales L. Transanal endorectal pull-through alone as treatment of Hirschsprung's disease. *Cir Pediatr*. 2004;17:85-8.
- Kamachi Y, Cheah KS, Kondoh H. Mechanism of regulatory target selection by the SOX high-mobility-group domain proteins as revealed by comparison of SOX1/2/3 and SOX9. *Mol Cell Biol*. 1999;19:107-20.
- Kapur RP, Yost C, Palmiter RD. A transgenic model for studying development of the enteric nervous system in normal and aganglionic mice. *Development*. 1992;116:167-75.
- Kapur RP. Colonization of the murine hindgut by sacral crest- derived neural precursors: experimental support for an evolutionarily conserved model. *Dev Biol*. 2000;227:146-55.
- Kashuk CS, Stone EA, Grice EA, Portnoy ME, Green ED, Sidow A, et al. Phenotype-genotype correlation in Hirschsprung disease is illuminated by comparative analysis of the RET protein sequence. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102:8949-54.
- Kenny SE, Tam PK, García-Barceló M. Hirschsprung's disease. *Semin Pediatr Surg*. 2010;19:194-200.
- Kim J, Lo L, Dormand E, Anderson DJ. SOX10 maintains multipotency and inhibits neuronal differentiation of neural crest stem cells. *Neuron*. 2003;38:17-31.
- Kimura K, Nishijima E, Muraji T, Tsugawa C, Matsutomo Y. Extensive aganglionosis: further experience with the colonic patch graft procedure and long-term results. *J Pediatr Surg*. 1988;23:52-6.
- Kjaer S, Ibáñez CF. Identification of a surface for binding to the GDNF-GFR alpha 1 complex in the first cadherin-like domain of RET. *J Biol Chem*. 2003;278:47898-904.
- Kjaer S, Hanrahan S, Totty N, McDonald NQ. Mammal-restricted elements predispose human RET to folding impairment by HSCR mutations. *Nat Struct Mol Biol*. 2010;17:726-31.
- Kobayashi H, Hirakawa H, Surana R, O'Briain DS, Puri P. Intestinal neuronal dysplasia is a possible cause of persistent bowel symptoms after pull-through operation for Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg*. 1995;30:253-7.
- Kruger GM, Mosher JT, Tsai YH, Yeager KJ, Iwashita T, Garipey CE, et al. Temporally distinct requirements for endothelin receptor B in the generation and migration of gut neural crest stem cells. *Neuron*. 2003;40:917-29.

- Kubota M, Suita S, Kamimura T, Ito Y, Szurszewski JH. Electrophysiological properties of the aganglionic segment in Hirschsprung's disease. *Surgery*. 2002;131:S288-93.
- Kuhlbrodt K, Herbarth B, Sock E, Hermans-Borgmeyer I, Wegner M. SOX10, a novel transcriptional modulator in glial cells. *J Neurosci* 1998;18:237-50.
- Kwon MJ, Lee GH, Lee MK, Kim JY, Yoo HS, Ki CS, et al. *PHOX2B* mutations in patients with Ondine-Hirschsprung disease and a review of the literature. *Eur J Pediatr*. 2011;170:1267-71.
- Lake JI, Heuckeroth RO. Enteric nervous system development: migration, differentiation, and disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2013;305:G1-G24.
- Lall A, Agarwala S, Bhatnagar V, Gupta AK, Mitra DK. Total colonic aganglionosis: diagnosis and management in a 12-year-old boy. *J Pediatr Surg*. 1999;34:1413-4.
- Lallier M, St-Vil D, Giroux M, Huot C, Gaboury L, Oligny L, et al. Prophylactic thyroidectomy for medullary thyroid carcinoma in gene carriers of MEN2 syndrome. *J Pediatr Surg*. 1998;33:846-8.
- Lang D, Chen F, Milewski R, Li J, Lu MM, Epstein JA. Pax3 is required for enteric ganglia formation and functions with Sox10 to modulate expression of c-ret. *J. Clin. Invest*. 2000;106:963-71.
- Lang D, Epstein JA. Sox10 and Pax3 physically interact to mediate activation of a conserved c-RET enhancer. *Hum Mol Genet*. 2003;12:937-45.
- Langer JC. Hirschsprung disease. *Curr Opin Pediatr*. 2013;25:368-74.
- Laughlin DM, Friedmacher F, Puri P. Total colonic aganglionosis: a systematic review and meta-analysis of long-term clinical outcome. *Pediatr Surg Int*. 2012;28:773-9.
- Lawson J, Nixon H. Anal canal pressure in the diagnosis of Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg*. 1967;2:544-52.
- Le Douarin NM, Teillet MA. The migration of neural crest cells to the wall of the digestive tract in avian embryo. *J Embryol Exp Morphol*. 1973;30:31-48.
- Le Douarin NM, Dupin E. Multipotentiality of the neural crest. *Curr Opin Genet Dev*. 2003;13:529-36.
- Le Douarin NM, Creuzet S, Couly G, Dupin E. Neural crest cell plasticity and its limits. *Development* 2004;131:4637-50.
- Lee CC, Lien R, Chiang MC, Yang PH, Chu SM, Fu JH, et al. Clinical impacts of delayed diagnosis of Hirschsprung's disease in newborn infants. *Pediatr Neonatol*. 2012;53:133-7.
- Leon TYY, Ngan ESW, Hiu-Ching Poon, So M-T, Lui VCH, Tam PKH, et al. Transcriptional regulation of RET by Nkx2-1, Phox2b, Sox10, and Pax3. *J Pediatr Surg*. 2009;44:1904-12.
- Levitt MA, Martin CA, Olesevich M, Bauer CL, Jackson LE, Peña A. Hirschsprung disease and fecal incontinence: Diagnostic and management strategies. *J Pediatr Surg* 2009;44:271-7.

- Levitt MA, Hamrick MC, Eradi B, Bischoff A, Hall J, Peña A. Transanal, full-thickness, Swenson-like approach for Hirschsprung disease. *J Pediatr Surg.* 2013;48:2289-95.
- Lin LF, Doherty DH, Lile JD, Bektesh S, Collins F. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science.* 1993;260:1130-2.
- Lo LC, Johnson JE, Wuenschell CW, Saito T, Anderson DJ. Mammalian achaete-scute homolog 1 is transiently expressed by spatially restricted subsets of early neuroepithelial and neural crest cells. *Genes Dev.* 1991;5:1524-37.
- López Ruiz JA, Tallón Aguilar L, Sánchez Moreno L, López Pérez J, Pareja Ciuró F, Oliva Mompeán F, et al. Hirschsprung disease with debut in adult age as acute intestinal obstruction: case report. *Rev Esp Enferm Dig.* 2016;108:742-46.
- López-Santamaría M, Hernández Oliveros F. Intestinal Transplant in Hirschsprung's Disease and Intestinal Pseudoobstruction. En: Núñez Núñez R, López-Alonso M. (Eds). *Hirschsprung's disease: Diagnosis and treatment.* New York: Nova Publishers; 2009. p.385-411.
- Lyonnet S, Bolino A, Pelet A, Abel L, Nihoul-Fékété C, Briard ML, et al. A gene for Hirschsprung disease maps to the proximal long arm of chromosome 10. *Nat Genet.* 1993;4:346-50.
- Márquez TT, Acton RD, Hess DJ, Duval S, Saltzman DA. Comprehensive review of procedures for total colonic aganglionosis. *J Pediatr Surg.* 2009;44:257-65.
- Marsh D, Theodosopoulos G, Howell V, Richardson AL, Benn DE, Proos AL, et al. Rapid mutation scanning of genes associated with familial cancer syndrome using denaturing highperformance liquid chromatography. *Neoplasia.* 2001;3:236-44.
- Martin LW. Surgical management of Hirschsprung's disease involving the small intestine. *Arch Surg.* 1968;97:183-9.
- Martucciello G, Biccchi MP, Dodero P, Lerone M, Silengo M, Cirillo A, et al. Total colonic aganglionosis associated with interstitial deletion of the long arm of chromosome 10. *Pediatr Surg Int.* 1992;7:308-310.
- Martucciello G, Pini Prato A, Puri P, Holschneider AM, Meier-Ruge W, Jasonni V, et al. Controversies concerning diagnostic guidelines for anomalies of the enteric nervous system: a report from the fourth International Symposium on Hirschsprung's disease and related neurocristopathies. *J Pediatr Surg.* 2005;40:1527-31.
- Marty TL, Seo T, Sullivan JJ, Matlak ME, Black RE, Johnson DG. Rectal irrigations for the prevention of postoperative enterocolitis in Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg.* 1995;30:652-4.
- McKeon S, Stamp L, Hao MM, Young HM. Hirschsprung disease: a developmental disorder of the enteric nervous system. *WIREs Dev Biol.* 2013;2:113-29.

- Meier-Ruge W, Lutterbeck P, Herzog B, Morger R, Moser R, Schärli A. Acetylcholinesterase activity in suction biopsies of the rectum in the diagnosis of Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg.* 1972;7:11-7.
- Menezes M, Puri P. Long-term clinical outcome in patients with Hirschsprung's disease and associated Down's syndrome. *J Pediatr Surg.* 2005;40:810-2.
- Menezes M, Puri P. Long-term outcome of patients with enterocolitis complicating Hirschsprung's disease. *Pediatr Surg Int.* 2006;22:316-8.
- Menezes M, Pini Prato A, Jansoni V, Puri P. Long term clinical outcome in patients with total colonic aganglionosis: a 31-year review. *J Pediatr Surg.* 2008;43:1696-9.
- Metzger M, Caldwell C, Barlow AJ, Burns AJ, Thapar N. Enteric nervous system stem cells derived from human gut mucosa for the treatment of aganglionic gut disorders. *Gastroenterology.* 2009;136:2214-25.
- Meyers ML, Crombleholme T. Prenatal MRI diagnosis of Hirschsprung's disease at 29 weeks' gestational age in a fetus with heterotaxy and polysplenia syndrome. *Fetal Diagn Ther.* 2016;40:235-240.
- Miao X, García-Barceló MM, So MT, Leon TY, Lau DK, Liu TT, et al. Role of *RET* and *PHOX2B* gene polymorphisms in risk of Hirschsprung's disease in Chinese population. *Gut.* 2007;56:736.
- Moore SW, Millar AJ, Albertyn R, Cywes S. Familial aspects of Hirschsprung's disease. *Eur J Pediatr Surg.* 1991;1:97-101.
- Moore SW, Johnson AG. Hirschsprung's disease: genetic and functional associations of Down's and Waardenburg syndromes. *Semin Pediatr Surg.* 1998;7:156-61.
- Moore SW, Zaahl MG. Multiple endocrine neoplasia syndromes, children, Hirschsprung's disease and *RET*. *Pediatr Surg Int.* 2008a;24:521-30.
- Moore SW, Sidler D, Zaahl MG. The *ITGB2* immunomodulatory gene (CD18), enterocolitis, and Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg.* 2008b;43:1439-44.
- Moore SW. Total colonic aganglionosis and Hirschsprung's disease: shades of the same or different? *Pediatr Surg Int.* 2009a;25:659-66.
- Moore SW, Zaahl M. Clinical and genetic differences in total colonic aganglionosis in Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg.* 2009b;44:1899-903.
- Moore SW, Zaahl M. Familial associations in medullary thyroid carcinoma with Hirschsprung disease: the role of the *RET*-C620 "Janus" genetic variation. *J Pediatr Surg.* 2010;45:393-6.
- Moore SW. Chromosomal and related Mendelian syndromes associated with Hirschsprung's disease. *Pediatr Surg Int.* 2012a;28:1045-58.

- Moore SW, Zaahl MG. Intronic *RET* gene variants in Down syndrome-associated Hirschsprung disease in an African population. *J Pediatr Surg*. 2012b;47:299-302.
- Moore SW, Zaahl M. The Hirschsprung's-multiple endocrine neoplasia connection. *Clinics (Sao Paulo)*. 2012c;67:63-7.
- Moore SW. Total colonic aganglionosis in Hirschsprung disease. *Semin Pediatr Surg*. 2012d;21:302-9.
- Moore SW. Total colonic aganglionosis and Hirschsprung's disease: a review. *Pediatr Surg Int* 2015;31:1-9.
- Mosse YP, Laudenslager M, Khazi D, Carlisle AJ, Winter CL, Rappaport E, et al. Germline *PHOX2B* mutation in hereditary neuroblastoma. *Am J Hum Genet*. 2004;75:727-30.
- Mowat DR, Wilson MJ, Goossens M. Mowat-Wilson syndrome. *J Med Genet*. 2003;40:305-10.
- Muise ED, Hardee S, Morotti RA, Cowles RA. A comparison of suction and full-thickness rectal biopsy in children. *J Surg Res*. 2016;201:149-55.
- Mulligan LM, Eng C, Attié T, Lyonnet S, Marsh DJ, Hyland VJ, et al. Diverse phenotypes associated with exon 10 mutations of the *RET* proto-oncogene. *Hum Mol Genet*. 1994;3:2163-7.
- Murthi GV, Raine PA. Preoperative enterocolitis is associated with poorer long-term bowel function after Soave-Boley endorectal pull-through for Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg*. 2003;38:69-72.
- Myers SM, Eng C, Ponder BA, Mulligan LM. Characterization of *RET* proto-oncogene 3' splicing variants and polyadenylation sites: a novel C-terminus for RET. *Oncogene*. 1995;11: 2039-45.
- Nakamura T, Ishizaka Y, Nagao M, Hara M, Ishikawa T. Expression of the *RET* proto- oncogene product in human normal and neoplastic tissues of neural crest origin. *J Pathol*. 1994;172:255-60.
- Natarajan D, Marcos-Gutiérrez C, Pachnis V, de Graaff E. Requirement of signalling by receptor tyrosine kinase RET for the directed migration of enteric nervous system progenitor cells during mammalian embryogenesis. *Development*. 2002;129:5151-60.
- Nemeth L, Yoneda A, Kader M, Devaney D, Puri P. Three-dimensional morphology of gut innervation in total intestinal aganglionosis using whole-mount preparation. *J Pediatr Surg*. 2001;36:291-5.
- Neuvonen MI, Kyrklund K, Rintala RJ, Pakarinen MP. Bowel function and quality of life after transanal endorectal pull-through for Hirschsprung disease: controlled outcomes up to adulthood. *Ann Surg*. 2017;265:622-629.
- Ng PC, Henikoff S. SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res*. 2003;31:3812-14.
- Nitta KR, Takahashi S, Haramoto Y, Fukuda M, Tanegashima K, Onuma Y, et al. The N-terminus zinc finger domain of *Xenopus* SIP1 is important for neural induction, but not for suppression of *Xbra* expression. *Int J Dev Biol*. 2007;51:321-25.

- Nozhat Z, Hedayati M. Medullary thyroid carcinoma: a review on ethical considerations in treatment of children. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2016;29:633-9.
- Núñez R, Cabrera R, Agulla E, Moreno C, Serrano A, Ortiz C, et al. Aganglionismo cólico total con afectación ileal. *Plastia ileocólica. Cir Pediatr.* 2001;14:76-81.
- Núñez R, Torres A, Agulla E, Moreno C, Marín D, Santamaría JI. La irrigación rectal y descontaminación digestiva para la profilaxis de la enterocolitis postoperatoria en la Enfermedad de Hirschsprung. *Cir Pediatr.* 2005;18:96-100.
- Núñez R, Blesa E, Cabrera R. Hirschsprung's disease: Clinical Features. En: Núñez R, López-Alonso M. (Eds). *Hirschsprung's disease: Diagnosis and treatment.* New York: Nova Publishers; 2009a.p.125-136.
- Núñez R, Vargas I, Estepa MJ. Hirschsprung's disease: Preoperative Medical Care. Enterostomies. Bowel preparation for pull-through. En: Núñez R, López-Alonso M. (Eds). *Hirschsprung's disease: Diagnosis and treatment.* New York: Nova Publishers; 2009b.p.197-218.
- Núñez R, Torres A, Santamaría JI. Enterocolitis in Hirschsprung's disease. En: Núñez R, López-Alonso M. (Eds). *Hirschsprung's disease: Diagnosis and treatment.* New York: Nova Publishers; 2009c.p.319-48.
- Núñez-Ramos R, Fabbro MA, González-Velasco M, Núñez R, Romanato B, Vecchiato L, et al. Determination of the anal position in newborns and in children with chronic constipation: comparative study in two European healthcare centres. *Pediatr Surg Int.* 2011;27:1111-5.
- Núñez-Ramos R, Fernández RM, González Velasco M, Ruiz-Contreras J, Galán-Gómez E, Núñez-Núñez R, et al. A scoring system to predict the severity of Hirschsprung Disease at diagnosis and its correlation with molecular genetics. *Pediatr Dev Pathol.* 2017;20:28-37.
- Núñez-Torres R, Fernández RM, López-Alonso M, Antiñolo G, Borrego S. A novel study of copy number variations in Hirschsprung disease using multiple ligation-dependent probe amplification (MLPA) technique. *BMC Med Genet.* 2009;10:119-21.
- Núñez-Torres R, Fernández RM, Acosta MJ, Enguix-Riego M del V, Marbá M, Carlos de Agustín J, et al. Comprehensive analysis of *RET* common and rare variants in a series of Spanish Hirschsprung patients confirms a synergistic effect of both kinds of events. *BMC Med Genet.* 2011;12:138.
- Oefner PJ, Underhill PA. DNA mutation detection using denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC). *Current Protocols In Human Genetics.* 1998;p.7.10.1-7.10.14.
- Okamoto E, Ueda T. Embryogenesis of intramural ganglia of the gut and its relation to Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg.* 1967;2:437-43.
- Okamoto N, Del Maestro R, Valero R, Monros E, Poo P, Kanemura Y, et al. Hydrocephalus and Hirschsprung's disease with a mutation of *L1CAM*. *J Hum Genet.* 2004;49:334-337.

- Okoro PE, Enyindah CE. Time of passage of first stool in newborns in a tertiary health facility in southern Nigeria. *Niger J Surg.* 2013;19:20-2.
- Olivares Muñoz M, Julià Masip MV, Oriola J, Martorell Sampol L, Parareda Sallés A, Ribó Cruz JM. Hirschsprung's disease and medullary carcinoma of the thyroids: two diseases in a monogenetic disorder. *Cir Pediatr.* 2012;25:87-90.
- Pachnis V, Mankoo B, Costantini F. Expression of the *c-ret* proto-oncogene during mouse embryogenesis. *Development.* 1993;119:1005-17.
- Paratore C, Goerich DE, Suter U, Wegner M, Sommer L. Survival and glial fate acquisition of neural crest cells are regulated by an interplay between the transcription factor Sox10 and extrinsic combinatorial signaling. *Development.* 2001;128:3949-61.
- Pasini B, Hofstra RM, Yin L, Bocciardi R, Santamaria G, Grootsholten PM, et al. The physical map of the human *RET* proto-oncogene. *Oncogene.* 1995;11:1737-43.
- Pastor AC, Osman F, Teitelbaum DH, Caty MG, Langer JC. Development of a standardized definition for Hirschsprung's-associated enterocolitis: a Delphi analysis. *Pediatr Surg.* 2009;44:251-6.
- Pattyn A, Morin X, Cremer H, Goridis C, Brunet Jf. The Homeobox Gene *PHOX2B* is essential for the development of autonomic neural crest derivatives. *Nature.* 1999;399:366-70.
- Payette RF, Tennyson VM, Pham TD, Mawe GM, Pomeranz HD, Rothman TP, et al. Origin and morphology of nerve fibers in the aganglionic colon of the lethal spotted (*ls/ls*) mutant mouse. *J Comp Neurol.* 1987;257:237-52.
- Perri P, Bachetti T, Longo L, Matera I, Seri M, Tonini GP, et al. *PHOX2B* mutations and genetic predisposition to neuroblastoma. *Oncogene.* 2005;24:3050-3.
- Pingault V, Bondurand N, Kuhlbrodt K, Goerich DE, Prehu MO, Puliti, A et al. *SOX10* mutations in patients with Waardenburg-Hirschsprung disease. *Nat Genet.* 1998;18:171-173.
- Pingault V, Bondurand N, Lemort N, Sancandi M, Ceccherini I, Hugot JP, et al. A heterozygous endothelin 3 mutation in Waardenburg-Hirschsprung disease: is there a dosage effect of *EDN3/EDNRB* gene mutations on neurocristopathy phenotypes? *J Med Genet.* 2001;38:205-9.
- Pingault V, Girard M, Bondurand N, Dorkins H, Van Maldergem L, Mowat D, et al. *SOX10* mutations in chronic intestinal pseudo-obstruction suggest a complex physiopathological mechanism. *Hum Genet.* 2002;111:198-206.
- Pingault V, Ente D, Dastot-Le Moal F, Goossens M, Marlin S, Bondurand N. Review and update of mutations causing Waardenburg syndrome. *Hum Mutat.* 2010;31:391-406.
- Pingault V, Bodereau V, Baral V, Marcos S, Watanabe Y, Chaoui A, et al. Loss-of-function mutations in *SOX10* cause Kallmann syndrome with deafness. *Am J Hum Genet.* 2013;92:707-24.

- Pini Prato A, Gentilino V, Giunta C, Avanzini S, Parodi S, Mattioli G, et al. Hirschsprung's disease: 13 years' experience in 112 patients from a single institution. *Pediatr Surg Int*. 2008;24:175-82.
- Pini Prato A, Rossi V, Avanzini S, Mattioli G, Disma N, Jasonni V. Hirschsprung's disease: what about mortality? *Pediatr Surg Int*. 2011;27:473-8.
- Plaza-Menacho I, Burzynski GM, de Groot JW, Eggen BJ, Hofstra RM. Current concepts in *RET*-related genetics, signaling and therapeutics. *Trends Genet*. 2006;22:627-36.
- Pontarelli EM, Ford HR, Gayer CP. Recent developments in Hirschsprung's-associated enterocolitis. *Curr Gastroenterol Rep*. 2013;15:340.
- Puffenberger EG, Hosoda K, Washington SS, Nakao K, deWit D, Yanagisawa M, et al. A missense mutation of the endothelin-B receptor gene in multigenic Hirschsprung's disease. *Cell*. 1994;79:1257-66.
- Puri P. Hirschsprung's disease. En: Puri P, Höllwarth M. (Eds). *Pediatric Surgery*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2006.p.275-288.
- Puri P, O'Donnell AM. Pathophysiology of Hirschsprung's disease. En: Núñez Núñez R, López-Alonso M. (Eds). *Hirschsprung's disease: Diagnosis and treatment*. New York: Nova Publishers; 2009.p.55-71.
- Puri P, Gosemann JH. Variants of Hirschsprung disease. *Semin Pediatr Surg*. 2012;21:310-8.
- Qiu JF, Shi YJ, Hu L, Fang L, Wang HF, Zhang MC. Adult Hirschsprung's disease: report of four cases. *Int J Clin Exp Pathol*. 2013;6:1624-30.
- Raghunath BV, Shankar G, Babu MN, Kini U, Ramesh S, Jadhav V, et al. Skip segment Hirschsprung's disease: a case report and novel management technique. *Pediatr Surg Int*. 2014;30:119-22.
- Ramensky V, Bork P, Sunyaev S. Human non-synonymous SNPs: server and survey. *Nucleic Acids Res*. 2002;30:3894-900.
- Read AP, Newton VE. Waardenburg syndrome. *J Med Genet*. 1997;34:656-66.
- Rehbein F. Operative therapy of Hirschsprung's disease. *Langenbecks Arch Klin Chir Ver Dtsch Z Chir*. 1953;276:540-3.
- Rintala RJ, Lindahl H. Sodium cromoglycate in the management of chronic or recurrent enterocolitis in patients with Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg*. 2001;36:1032-5.
- Rothman TP, Gershon MD. Regionally defective colonization of the terminal bowel by the precursors of enteric neurons in lethal spotted mutant mice. *Neuroscience*. 1984;12:1293-311.
- Ruiz-Ferrer M, Fernández RM, Antiñolo G, López-Alonso M, Eng C, Borrego S. A complex additive model of inheritance for Hirschsprung disease is supported by both *RET* mutations and predisposing *RET* haplotypes. *Genet Med*. 2006;8:704-10.

- Ruiz-Ferrer M. Análisis molecular y funcional de genes candidatos como factores de de susceptibilidad para la enfermedad de Hirschsprung y el cáncer medulas de tiroides. Tesis Doctoral. Departamento de Genética, Facultad de Biología. Universidad de Sevilla. 2007.
- Runeberg-Roos P, Saarma M. Neurotrophic factor receptor RET: structure, cell biology, and inherited diseases. *Ann Med.* 2007;39:572-80.
- Sacher P, Briner J, Hanimann B. Is neuronal intestinal dysplasia a primary disease or a secondary phenomenon? *Eur J Pediatr Surg.* 1993;3:228-30.
- Sakurai T, Yanagisawa M, Masaki T. Molecular characterization of endothelin receptors. *Trends Pharmacol Sci.* 1992;13:103-8.
- Sancandi M, Ceccherini I, Costa M, Fava M, Chen B, Wu Y, et al. Incidence of *RET* mutations in patients with Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg.* 2000;35:139-42.
- Sánchez B, Antiñolo G, Navarro E, Japón MA, Conde AF, Astorga R, et al. Cys 634 mutations in the *RET* proto-oncogene in Spanish families affected by MEN 2A. *Hum Mutat.* 1998;1:S72-73.
- Sánchez B, Robledo M, Biarnes J, Sáez ME, Volpini V, Benítez J, et al. High prevalence of the C634Y mutation in the *RET* proto-oncogene in MEN 2A families in Spain. *J Med Genet.* 1999;36:68-70.
- Sánchez-Mejías, A. Análisis de la base genética de la enfermedad de Hirschsprung y la displasia neuronal intestinal tipo B, dos desórdenes del sistema nervioso entérico. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla, 2010a.
- Sánchez-Mejías A, Fernández RM, López-Alonso M, Antiñolo G, Borrego S. New roles of *EDNRB* and *EDN3* in the pathogenesis of Hirschsprung disease. *Genet Med.* 2010b;12:39-43.
- Sánchez-Mejías A, Watanabe Y, M Fernández R, López-Alonso M, Antiñolo G, Bondurand N, et al. Involvement of *SOX10* in the pathogenesis of Hirschsprung disease: report of a truncating mutation in an isolated patient. *J Mol Med,* 2010c;88:507-14.
- Sasaki A, Kanai M, Kijima K, Akaba K, Hashimoto M, Hasegawa H, et al. Molecular analysis of congenital central hypoventilation syndrome. *Hum Genet.* 2003;114:22-6.
- Sasselli V, Pachnis V, Burns AJ. The enteric nervous system. *Dev Biol.* 2012;366:64-73.
- Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res.* 2002;30:e57.
- Schreiner S, Cossais F, Fischer K, Scholz S, Bosl MR, Holtmann B, et al. Hypomorphic *SOX10* alleles reveal novel protein functions and unravel developmental differences in glial lineages. *Development.* 2007;134:3271-81.
- Schuchardt A, D'Agati V, Larsson-Blomberg L, Costantini F, Pachnis V. Defects in the kidney and enteric nervous system of mice lacking the tyrosine kinase receptor Ret. *Nature.* 1994;367:380-83.

- Serbedzija GN, Burgan S, Fraser SE, Bronner-Fraser M. Vital dye labeling demonstrates a sacral neural crest contribution to the enteric nervous system of chick and mouse embryos. *Development*. 1991;111:857-66.
- Sergi C. Hirschsprung's disease: Historical notes and pathological diagnosis on the occasion of the 100(th) anniversary of Dr. Harald Hirschsprung's death. *World J Clin Pediatr*. 2015;4:120-5.
- Shafik A, El-Sibai O, Ahmed I. Parasympathetic extrinsic reflex: role in defecation mechanism. *World J Surg*. 2002;26:737-40.
- Sham MH, Lui VC, Chen BL, Fu M, Tam PK. Novel mutations of *SOX10* suggest a dominant negative role in Waardenburg-Shah syndrome. *J Med Genet*. 2001;38:E30.
- Shekitka KM, Sobin LH. Ganglioneuromas of the gastrointestinal tract. Relation to Von Recklinghausen disease and other multiple tumor syndromes. *Am J Surg Pathol*. 1994;18:250-7.
- Shimotake T, Tanaka S, Fukui R, Makino S, Maruyama R. Neuroglial disorders of central and peripheral nervous systems in a patient with Hirschsprung's disease carrying allelic *SOX10* truncating mutation. *J Pediatr Surg*. 2007;42:725-31.
- Shirasawa S, Yunker AM, Roth KA, Brown GA, Horning S, Korsmeyer SJ. *Enx* (*Hox11L1*)-deficient mice develop myenteric neuronal hyperplasia and megacolon. *Nat Med*. 1997;3:646-50.
- Skába R, Dvoráková S, Václavíková E, Vlcek P, Frantlová M, Bendlová B. The risk of medullary thyroid carcinoma in patients with Hirschsprung's disease. *Pediatr Surg Int*. 2006;22:991-5.
- Skinner MA. Management of hereditary thyroid cancer in children. *Surg Oncol*. 2003;12:101-4.
- Skinner MA, Safford SD, Reeves JG, Jackson ME, Freerman AJ. Renal aplasia in humans is associated with *RET* mutations. *Am J Hum Genet*. 2008;82:344-51.
- So MT, Leon TY, Cheng G, Tang CS, Miao XP, Cornes BK, et al. *RET* mutational spectrum in Hirschsprung disease: evaluation of 601 Chinese patients. *PLoS One*. 2011;6:e28986.
- So HB, Schwartz DL, Becker JM, Daum F, Schneider KM. Endorectal pull-through without preliminary colostomy in neonates with Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg*. 1980;15:470-1.
- Soave F. Hirschsprung's disease: a new surgical technique. *Arch Dis Child* 1964;39:116-24.
- Song J, Feng Y, Acke FR, Coucke P, Vleminckx K, Dhooge IJ. Hearing loss in Waardenburg syndrome: a systematic review. *Clin Genet*. 2016;89:416-25.
- Sookpotarom P, Vejchapipat P. Primary transanal Swenson pull-through operation for Hirschsprung's disease. *Pediatr Surg Int*. 2009;25:767-73.
- Southard-Smith EM, Kos L, Pavan WJ. *SOX10* mutation disrupts neural crest development in Dom Hirschsprung mouse model. *Nat Genet*. 1998;18:60-4.

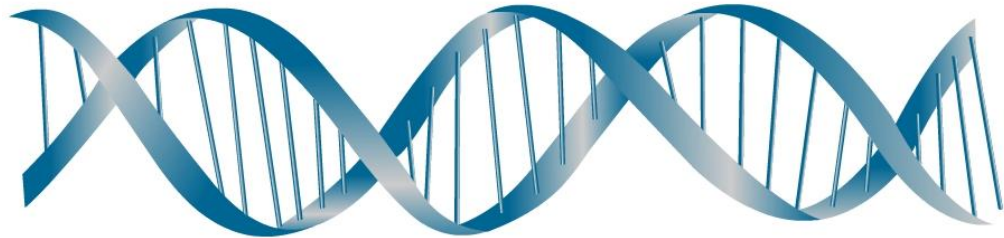
- Southard-Smith EM, Angrist M, Ellison JS, Agarwala R, Baxevanis AD, Chakravarti A, et al. The Sox10 (Dom) mouse: modeling the genetic variation of Waardenburg-Shah (WS4) syndrome. *Genome Res.* 1999;9:215-25.
- Spouge D, Baird PA. Hirschsprung disease in a large birth cohort. *Teratology.* 1985;32:171-77.
- Stranzinger E, DiPietro MA, Teitelbaum DH, Strouse PJ. Imaging of total colonic Hirschsprung disease. *Pediatr Radiol.* 2008;38:1162-70.
- Suita S, Taguchi T, Ieiri S, Nakatsuji T. Hirschsprung's disease in Japan: analysis of 3852 patients based on a nationwide survey in 30 years. *J Pediatr Surg.* 2005;40:197-201.
- Svensson PJ, Molander ML, Eng C, Anvret M, Nordenskjöld A. Low frequency of *RET* mutations in Hirschsprung disease in Sweden. *Clin Genet.* 1998;54:39-44.
- Swenson O, Bill AH. Resection of rectum and rectosigmoid with preservation of the sphincter for benign spastic lesions producing megacolon. *Surg.* 1948;24:212-20.
- Swenson O, Neuhauser EB, Pickett LK. New concepts of etiology, diagnosis and treatment of congenital megacolon (Hirschsprung's disease). *Pediatrics.* 1949;4:201-9.
- Swenson O, Fisher J, Macmahon HE. Rectal biopsy as an aid in the diagnosis of Hirschsprung's disease. *N Engl J Med.* 1955;253:632-5.
- Swenson O, Fisher JH. Hirschsprung's disease in the newborn. *Arch Surg.* 1959;79:987-93.
- Takahashi M, Buma Y, Iwamoto T, Inaguma Y, Ikeda H, Hiai H. Cloning and expression of the *RET* proto-oncogene encoding a tyrosine kinase with two potential transmembrane domains. *Oncogene.* 1988;3:571-78.
- Takahashi M, Buma Y, Hiai H. Isolation of *RET* proto-oncogene cDNA with an amino-terminal signal sequence. *Oncogene.* 1989;4:805-6.
- Takahashi M, Iwashita T, Santoro M, Lyonnet S, Lenoir GM, Billaud M. Co-segregation of MEN2 and Hirschsprung's disease: the same mutation of *RET* with both gain and loss-of-function? *Hum Mutat.* 1999;13:331-6.
- Takahashi M. The GDNF/*RET* signaling pathway and human diseases. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2001;12:361-73.
- Takawira C, D'Agostini S, Shenouda S, Persad R, Sergi C. Laboratory procedures update on Hirschsprung disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2015;60:598-605.
- Tam PK, García-Barceló M. Genetic basis of Hirschsprung's disease. *Pediatr Surg Int.* 2009;25:543-58.
- Tang YF, Chen JG, An HJ, Jin P, Yang L, Dai ZF, et al. High-resolution anorectal manometry in newborns: normative values and diagnostic utility in Hirschsprung disease. *Neurogastroenterol Motil.* 2014;26:1565-72.

- Teitelbaum DH, Qualman SJ, Caniano DA. Hirschsprung's disease. Identification of risk factors for enterocolitis. *Ann Surg.* 1988;207:240-4.
- Teitelbaum DH, Coran AG, Weitzman JJ, Ziegler MM, Kane T. Hirschsprung's disease and related disorders of intestine. In: O'Neill JA, Rowe MI, Grosfeld JL, Fonkalsrud EW, Coran AG. (Eds). *Pediatric Surgery*, 5th ed. Vol 2. St. Louis, Missouri: Mosby. 1998;p.1381-1424.
- Tiffin ME, Chandler L, Faber H. Localized absence of the ganglion cells of the myenteric plexus in congenital megacolon. *Am J Dis Child.* 1940;59:1071-82.
- Timmermans JP, Hens J, Adriaensen J. Outer submucous plexus: an intrinsic nerve network involved in both secretory and motility processes in the intestine of large mammals and humans. *Anat Rec.* 2001;262:71-8.
- Tittel K. Uber eine angeborene missbildung des dickdarmes. *Wein Klin Wochenscher.* 1901;14:903-7.
- Tomuschat C, Puri P. *RET* gene is a major risk factor for Hirschsprung's disease: a meta-analysis. *Pediatr Surg Int.* 2015;31:701-10.
- Torihashi S, Horisawa M, Watanabe Y. c-Kit immunoreactive interstitial cells in the human gastrointestinal tract. *J Auton Nerv Syst.* 1999;75:38-50.
- Touraine RL, Attié-Bitach T, Manceau E, Korsch E, Sarda P, Pingault V, et al. Neurological phenotype in Waardenburg syndrome type 4 correlates with novel *SOX10* truncating mutations and expression in developing brain. *Am J Hum Genet.* 2000;66:1496-503.
- Tsuzuki T, Takahashi M, Asai N, Iwashita T, Matsuyama M, Asai J. Spatial and temporal expression of the *RET* proto-oncogene product in embryonic, infant and adult rat tissues. *Oncogene.* 1995;10:191-98.
- Tuduri Limousin I, Cabo Valdés JA, Moya Jiménez MJ, Granero Cendón R, Fernández Pineda I, García RC, et al. Fiabilidad de la manometría anorrectal para el diagnóstico de la enfermedad de Hirschsprung en neonatos: experiencia de 25 años. *Cir Pediatr.* 2008;21:232-4.
- Van Belle G, Fisher LD, Heagert PJ, Lumley T. *Biostatistics. A Methodology for Health Sciences.* Washington: John Wiley & Sons., Inc; 2004.
- Van de Putte T, Maruhashi M, Francis A, Nelles L, Kondoh H, Huylebroeck D, et al. Mice lacking *ZFHX1B*, the gene that codes for Smad-interacting protein-1, reveal a role for multiplexed neural crest cell defects in the etiology of Hirschsprung disease mental retardation syndrome. *Am J Hum Genet.* 2003;72:465-70.
- Van de Putte T, Francis A, Nelles L, van Grunsven LA, Huylebroeck D. Neural crest-specific removal of *Zfhx1b* in mouse leads to a wide range of neurocristopathies reminiscent of Mowat-Wilson syndrome. *Hum Mol Genet.* 2007;16:1423-36.
- Verheij JB, Kunze J, Osinga J, van Essen AJ, Hofstra RM. ABCD syndrome is caused by a homozygous mutation in the *EDNRB* gene. *Am J Med Genet.* 2002;108:223-5.

- Verheij JB, Sival DA, van der Hoeven JH, Vos YJ, Meiners LC, Brouwer OF, et al. Shah-Waardenburg syndrome and PCWH associated with *SOX10* mutations: a case report and review of the literature. *Eur J Paediatr Neurol*. 2006;10:11-7.
- Viñuela A, Morín M, Villamar M, Morera C, Lavilla MJ, Cavallé L, et al. Genetic and phenotypic heterogeneity in two novel cases of Waardenburg syndrome type IV. *Am J Med Genet A*. 2009;149A:2296-302.
- Virtanen VB, Pukkala E, Kivisaari R, Salo PP, Koivusalo A, Arola J, et al. Thyroid cancer and co-occurring *RET* mutations in Hirschsprung disease. *Endocr Relat Cancer*. 2013;20:595-602.
- Visser R, van de Ven TJ, van Rooij IA, Wijnen RM, de Blaauw I. Is the Rehbein procedure obsolete in the treatment of Hirschsprung's disease? *Pediatr Surg Int*. 2010;26:1117-20.
- Waardenburg PJ. A new syndrome combining developmental anomalies of the eyelids, eyebrows and nose root with pigmentary defects of the iris and head hair and with congenital deafness. *Am J Hum Genet*. 1951 3:195-253.
- Wang LL, Gu H, Fan Y, Zhang Y, Wu D, Miao JN, et al. Up-regulated *FHL1* expression maybe involved in the prognosis of Hirschsprung's disease. *Int J Med Sci*. 2014;11:262-7.
- Weaver LT, Lucas A. Development of bowel habit in preterm infants. *Arch Dis Child*. 1993;68:317-20.
- Weese-Mayer DE, Berry-Kravis EM, Zhou L, Maher BS, Silvestri JM, Curran ME, et al. Idiopathic congenital central hypoventilation syndrome: analysis of genes pertinent to early autonomic nervous system embryologic development and identification of mutations in *PHOX2b*. *Am J Med Genet*. 2003;123A:267-78.
- Wegner M. From head to toes: the multiple facets of Sox proteins. *Nucleic Acid Res*. 1999;27: 1409-20.
- Whitehouse FR, Kernohan JW. Myenteric plexus in congenital megacolon; study of 11 cases. *Arch Intern Med*. 1948;82:75-111.
- Wood JD. Enteric Neurobiology: discoveries and directions. *Adv Exp Med Biol*. 2016;891:175-91.
- Woodward MN, Kenny SE, Vaillant C, Lloyd DA, Edgar DH. Time-dependent effects of endothelin-3 on enteric nervous system development in an organ culture model of Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg*. 2000;35:25-9.
- Wu XJ, Zhang HY, Li N, Yan MS, Wei J, Yu DH, et al. A new diagnostic scoring system to differentiate Hirschsprung's disease from Hirschsprung's disease-allied disorders in patients with suspected intestinal dysganglionosis. *Int J Colorectal Dis*. 2013;28:689-96.
- Yntema CL, Hammond WS. The origin of intrinsic ganglia of trunk viscera from vagal neural crest in the chick embryo. *J Comp Neurol*. 1954;101:515-41.

- Young HM, Furness JB, Shuttleworth CW, Brecht DS, Snyder SH. Co-localization of nitric oxide synthase immunoreactivity and NADPH diaphorase staining in neurons of the guinea-pig intestine. *Histochemistry*. 1992;97:375-8.
- Young HM, Hearn CJ, Farlie PG, Canty AJ, Thomas PQ, Newgreen DF. GDNF is a chemoattractant for enteric neural cells. *Dev Biol*. 2001;229:503-16.
- Young HM, Bergner AJ, Müller T. Acquisition of neuronal and glial markers by neural crest-derived cells in the mouse intestine. *J Comp Neurol*. 2003;456:1-11.
- Zani A, Eaton S, Morini F, Puri P, Rintala R, Heurn EV, et al. European Paediatric Surgeons' Association Survey on the Management of Hirschsprung Disease. *Eur J Pediatr Surg*. 2017;27:96-101.
- Zganjer M, Cigit I, Car A, Visnjić S, Butković D. Hirschsprung's disease and Rehbein's procedure: our results in the last 30 years. *Coll Antropol*. 2006;30:905-7.
- Zhou MN, Li JC, Ding SP. Coding-sequence mutation and polymorphism analysis of *EDNRB* gene in patients with Hirschsprung's disease from Zhejiang region. *Fen Zi Xi Bao Sheng Wu Xue Bao*. 2006;39:61-5.
- Zhu L, Lee H-O, Jordan CS, Cantrell VA, Southard-Smith EM, Shin MK. Spatiotemporal regulation of endothelin receptor-B by SOX10 in neural crest-derived enteric neuron precursors. *Nat Genet*. 2004;36:732-37.
- Zweier C, Peippo MM, Hoyer J, Sousa S, Bottani A, Clayton-Smith J, et al. Haploinsufficiency of TCF4 causes syndromic mental retardation with intermittent hyperventilation (Pitt-Hopkins syndrome). *Am J Hum Genet*. 2007;80:994-1001.

8. Anexos



8.1. Anexo I: Consentimiento informado



Servicio Andaluz de Salud
CONSEJERÍA DE SALUD

Unidad de Gestión Clínica de Genética, Reproducción y Medicina Fetal
Hospital Universitario Virgen del Rocío, H. de la Mujer
Avda. Manuel Siurot s/n
41013 Sevilla

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, D./D^a.....

con DNI..... como (marcar lo que proceda):

PARTICIPANTE

REPRESENTANTE LEGAL de

MANIFIESTO QUE

He leído el documento informativo relativo a la realización del análisis genético que me ha sido entregado.

Sé que se realizará el análisis genético en las muestras biológicas obtenidas.

He podido hacer preguntas sobre dicho análisis.

He recibido suficiente información sobre el mismo.

He podido hablar con:
(Nombre del profesional sanitario), quien me ha resuelto todas las dudas que le he planteado.

He sido informado/a de que podrán cederse los datos genéticos de carácter personal para fines diagnósticos, terapéuticos y preventivos, manteniéndose, en todo caso, las garantías de confidencialidad y protección necesarias.

Sé que el análisis puede no proporcionar una respuesta definitiva, pudiéndose dar tanto resultados falsos positivos como negativos.

He sido informado/a de que la interpretación del análisis puede depender de la información de la historia familiar o de la disponibilidad de otros familiares.

Deseo ser informado/a de los datos derivados del análisis genético, así como de los datos genéticos de carácter personal que se obtengan del análisis genético.	SI	NO

Presto libremente mi conformidad para que se realice el análisis genético, OTORGANDO, POR TANTO, MI CONSENTIMIENTO.

Firma del participante o representante legal

Fecha

Manifiesto que ha explicado las características de la realización del análisis genético al participante cuyo nombre aparece escrito más arriba. El participante consiente en que se realice el análisis genético por medio de su firma fechada en persona.

Firma del profesional sanitario

8.2. Anexo II: Certificación del Comité Ético de Investigación Clínica



Hospital Infanta Cristina
Complejo Hospitalario
Universitario de Badajoz

JUNTA DE EXTREMADURA
Consejería de Salud y Política Social

D. JULIO BENÍTEZ RODRÍGUEZ, SECRETARIO DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA DEL HOSPITAL REGIONAL UNIVERSITARIO "INFANTA CRISTINA"

CERTIFICA QUE:

Este Comité ha analizado la solicitud de Proyecto de Tesis Doctoral: Enfermedad de Hirschsprung: Correlación Clínico-Genética. Doctorando: D^a. Raquel Núñez-Ramos. Y mediante este documento expresa que este proyecto se ajusta a las normas éticas esenciales utilizadas como referencia en este ámbito y ha decidido por unanimidad expresar la idoneidad científica del proyecto así como su apoyo al mismo.

Lo que certifico para su conocimiento y efectos en Badajoz seis de octubre de dos mil catorce.



180017504

9. Publicaciones



9.1. Publicación I

CLINICAL REPORT

AMERICAN JOURNAL OF
medical genetics PART
A

Waardenburg Syndrome Type 4: Report of Two New Cases Caused by *SOX10* Mutations in Spain

Raquel M. Fernández,^{1,2} Raquel Núñez-Ramos,³ M^a Valle Enguix-Riego,^{1,2}
Francisco José Román-Rodríguez,^{1,2} Enrique Galán-Gómez,⁴ Emilio Blesa-Sánchez,⁵
Guillermo Antiñolo,^{1,2} Ramón Núñez-Núñez,⁶ and Salud Borrego^{1,2*}

¹Department of Genetics, Reproduction and Fetal Medicine, Institute of Biomedicine of Seville (IBIS), University Hospital Virgen del Rocío/CSIC/University of Seville, Seville, Spain

²Centre for Biomedical Network Research on Rare Diseases (CIBERER), Seville, Spain

³Department of Pediatrics, University Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain

⁴Unit of Genetics, University Hospital of Badajoz, Badajoz, Spain

⁵Faculty of Medicine, Department of Pediatrics, University Hospital of Badajoz, Badajoz, Spain

⁶Service of Paediatric Surgery, University Hospital of Badajoz, Badajoz, Spain

Manuscript Received: 29 July 2013; Manuscript Accepted: 30 September 2013

Shah-Waardenburg syndrome or Waardenburg syndrome type 4 (WS4) is a neurocristopathy characterized by the association of deafness, depigmentation and Hirschsprung disease. Three disease-causing genes have been identified so far for WS4: *EDNRB*, *EDN3*, and *SOX10*. *SOX10* mutations, found in 45–55% of WS4 patients, are inherited in autosomal dominant way. In addition, mutations in *SOX10* are also responsible for an extended syndrome involving peripheral and central neurological phenotypes, referred to as PCWH (peripheral demyelinating neuropathy, central dysmyelinating leucodystrophy, Waardenburg syndrome, Hirschsprung disease). Such mutations are mostly private, and a high intra- and inter-familial variability exists. In this report, we present a patient with WS4 and a second with PCWH due to *SOX10* mutations supporting again the genetic and phenotypic heterogeneity of these syndromes. Interestingly, the WS4 family carries an insertion of 19 nucleotides in exon 5 of *SOX10*, which results in distinct phenotypes along three different generations: hypopigmentation in the maternal grandmother, hearing loss in the mother, and WS4 in the proband. Since mosaicism cannot explain the three different related-WS features observed in this family, we propose as the most plausible explanation the existence of additional molecular events, acting in an additive or multiplicative fashion, in genes or regulatory regions unidentified so far. On the other hand, the PCWH case was due to a *de novo* deletion in exon 5 of the gene. Efforts should be devoted to unravel the mechanisms underlying the intrafamilial phenotypic variability observed in the families affected, and to identify new genes responsible for the still unsolved WS4 cases. © 2013 Wiley Periodicals, Inc.

Key words: Waardenburg syndrome; WS4; PCWH; *SOX10*

How to Cite this Article:

Fernández RM, Núñez-Ramos R, Enguix-Riego MV, Román-Rodríguez FJ, Galán-Gómez E, Blesa-Sánchez E, Antiñolo G, Núñez-Núñez R, Borrego. S. 2014. Waardenburg syndrome type 4: Report of two new cases caused by *SOX10* mutations in Spain. *Am J Med Genet Part A* 164A:542–547.

INTRODUCTION

Waardenburg syndrome (WS) is a clinically and genetically heterogeneous condition, resulting from the absence of melanocytes of the skin and the stria vascularis of the cochlea [Waardenburg,

Raquel M. Fernández and Raquel Núñez-Ramos have contributed equally.

Conflict of interest: The authors have no conflict of interest to declare. Grant sponsor: Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Spanish Ministry of Economy and Competitiveness, Spain; Grant number: PI1001290; Grant sponsor: Consejería de Innovación Ciencia y Empresa de la Junta de Andalucía; Grant number: CTS-7447.

*Correspondence to:

Salud Borrego, MD, PhD, Department of Genetics, Reproduction and Fetal Medicine, University Hospital Virgen del Rocío, Av Manuel Siurot s/n, 41013 Seville, Spain.

E-mail: salud.borrego.sspa@juntadeandalucia.es

Article first published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com): 5 December 2013

DOI 10.1002/ajmg.a.36302

1951]. WS is characterized by the association of pigmentation abnormalities, including depigmented patches of the skin and hair, vivid blue eyes or heterochromia irides, and sensorineural hearing loss. It is by far the most frequent condition combining pigmentary anomalies and sensorineural deafness (1/50,000 live births and 2–5% of all congenital deafness) [Amiel et al., 2008]. However, other features such as dystopia canthorum, musculoskeletal abnormalities of the limbs, Hirschsprung disease, or neurological defects are found in subsets of patients and used for the clinical classification of WS into four main phenotypes [Pingault et al., 2010]. Specifically, the combination of WS with Hirschsprung disease or aganglionic megacolon (HSCR, OMIM 142623) defines the WS4 type (Shah-Waardenburg syndrome, OMIM 277580). HSCR is a neuro-developmental defect associated with the lack of intramural ganglion cells in the myenteric and sub-mucosal plexuses along varying segments of the gastrointestinal tract [Amiel et al., 2008]. Currently, the accepted etiopathogenetic hypothesis for HSCR is based on a defect of craniocaudal migration of neuroblasts originating from the neural crest that, under normal circumstances, reach the small intestine in the 7th week of gestation and the rectum in the 12th week [Okamoto and Ueda, 1967]. Based in the length of the aganglionic region, the disorder is classified into short segment (S-HSCR: aganglionosis up to the upper sigmoid colon), long-segment (L-HSCR: aganglionosis up to the splenic flexure and beyond) and total colonic aganglionosis (TCA) forms. While HSCR occurs as an isolated trait in 70% of cases, the remaining 30% corresponds to syndromic forms in which the disease is associated to other associated congenital anomalies, as the case of WS4 [Amiel et al., 2008]. It was previously calculated that, because the frequency of congenital deafness is estimated to be 1/1,000 and the frequency of HSCR is approximately 1/5,000, then the anticipated incidence of both together would be around 1 in 5 million by chance alone [Currie et al., 1986]. Since according to the known number of WS4 cases reported, the probability of the two conditions existing together is tenfold higher than that expected by chance, it is evident that the association of both clinical phenotypes does not appear accidentally and by independent molecular events, as it has been widely demonstrated [Amiel et al., 2008; Pingault et al., 2010]. Although the length of the involved intestinal segment varies in this syndrome, most patients present TCA with or without small bowel involvement. Nevertheless rectosigmoid affection has been also reported [Jan et al., 2008].

Three disease-causing genes have been identified so far for WS4: *EDNRB* (13q22.3) encoding the endothelin-B receptor, *EDN3* (20q13.32) encoding an endothelin receptor ligand and *SOX10* (22q13.1) encoding the SOX10 transcription factor. Mutations in the *EDNRB* and *EDN3* genes are inherited in an autosomal recessive manner, with individuals carrying homozygous mutations manifesting WS4 and those with heterozygous mutations in either gene presenting with isolated HSCR, other isolated phenotypes or often being asymptomatic [Puffenberger et al., 1994; Attié et al., 1995; Ederly et al., 1996; Hofstra et al., 1996; Pingault et al., 2010]. Conversely, *SOX10* mutations, found in 45–55% of WS4 patients, are inherited in autosomal dominant manner [Pingault et al., 1998; Pingault et al., 2010; Bondurand et al., 2007, 2012]. Specific mutations (most frequently truncating mutations at the coding exon 5, and exceptionally at the very end of exon 4) appear to result

in a more severe WS4 phenotype with neurologic features characterized by peripheral demyelinating neuropathy, central dysmyelinating leukodystrophy, WS, and Hirschsprung disease (PCWH, OMIM 609136). However, 15–35% of WS4 remains still unexplained at the molecular level, suggesting that other genes could be involved and/or that mutations within known genes may have been missed in previous screenings.

In this report, we present the clinical and molecular findings of two cases diagnosed of WS4.

CLINICAL REPORT

Confirmatory diagnosis of WS4 for the two patients here presented was based in the anatomopathological analysis of rectal biopsy showing aganglionosis, as well as in the observation of clinical features as sensorineural hearing loss, alterations in iris pigmentation, white forelock or hypo-pigmentation areas. An informed consent was obtained from all the patients for clinical and molecular genetic studies. The study conformed to the tenets of the declaration of Helsinki and was approved by the Institutional Review Boards from the University Hospital Virgen del Rocío of Seville and from the University Hospital of Badajoz.

Patient 1

The propositus 1, a male of Portuguese origin, is the first child of non-consanguineous healthy parents, born at term with a birth weight of 3,190 g. During the neonatal period he attended Hospital in two occasions with episodes of distended abdomen, vomiting, and diarrhea. At 2 years old, he was admitted at hospital for medical assistance of severe chronic constipation. Physical examination denoted a notorious abdominal distension with a giant fecaloma in the left iliac fossa. He also presented with iris heterochromia (Fig. 1), white forelock and profound bilateral sensorineural hearing loss. Barium enema examination showed a stenotic rectosigmoid segment and dilated proximal colon. Anorectal manometry revealed absence of inhibitory reflex of the anal sphincter suggesting Hirschsprung disease, and aganglionosis was finally confirmed by anatomopathological analysis of a rectal biopsy. The patient underwent aganglionic bowel resection by Rehbein's procedure, and analysis of the resected specimens demonstrated aganglionosis affecting exclusively the recto-sigmoid region (S-HSCR). Postoperative enterocolitis was solved after 2 weeks of treatment. Worth of note is the familial history of independent and isolated WS4 clinical features in both his mother (moderate unilateral hearing loss) and his maternal grandmother (extensive skin hypopigmentation affecting her arms, legs, and anterior abdominal wall, but normal hearing as the result of an auditory brainstem response test) (Fig. 1).

Patient 2

The propositus 2, a male of Spanish origin, is the first child of non-consanguineous healthy parents, born at term with a birth weight of 2,550 g. During the third day after birth, the patient showed a loss of appetite and bilious vomiting. A more detailed physical examination revealed signs of dehydration and jaundice, as well as a severe abdominal distension. X-ray images after Gastrografin® enema

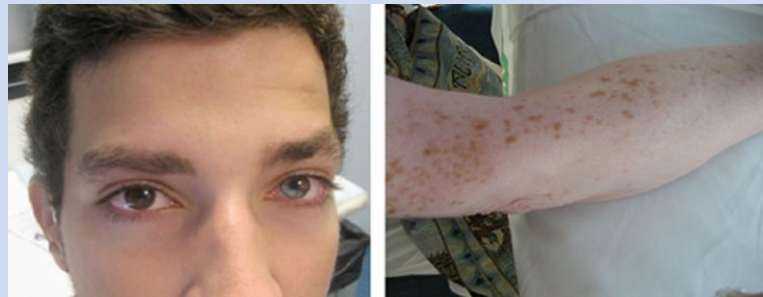


FIG. 1. Patient 1. Left: Iris heterochromia of the patient, showing brown color for the right iris and blue color for three quarters for the left iris. Right: Extensive skin hypopigmentation in the maternal grandmother of the probandus. Hyperpigmented spots can be observed on the hypopigmented skin.

administration, showed an important intestinal anse distension and led to identify the presence of a microcolon (Fig. 2). Subsequently, laparotomy confirmed the existence of both microcolon and microileum (80 cm) with proximal dilatation, which led to proceed with an ileostomy. Anatomopathological examination of several intestinal biopsies collected during the mentioned intervention, confirmed the presence of aganglionosis. The patient remained in hospital during his first months of life, due to the presentation of episodes of enterocolitis and malabsorption related to his short bowel. Finally, at 4 months old, the patient underwent a primary anastomosis with the creation of a reservoir (12 cm) made up of right colon and ganglionic small intestine (Boley procedure) and ileorectal pull-through (Rehbein procedure) using a circular stapler. Anatomopathological analysis of the resected specimen revealed the presence of ganglia along the right colon, and absence along the rectum, sigma, descendent colon and microileum ("Skip segment" HSCR). Following medical revisions detected severe bilateral hearing loss and psychomotor delay. Magnetic resonance imaging (MRI) performed 2 years after birth confirmed the pres-

ence of a diffuse alteration of the myelination. Of note, the patient also presents blond hair and bright blue irises, as well as horizontal-rotary nystagmus (Fig. 2). No family history of HSCR, deafness or any other clinical features suggestive of WS4 were present.

MUTATIONAL SCREENING

Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes from patients, and their parents and siblings when available, using standard protocols. The mutational screening analyses for *EDN3*, *EDN3RB*, *SOX10*, and *RET* were carried by sequence analysis in an ABI 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster city, CA) as previously reported [Ruiz-Ferrer et al., 2006; Sánchez-Mejías et al., 2010a,b]. The analysis of *EDN3*, *EDN3RB*, and *SOX10* aimed to identify putative mutations related to WS4 phenotype, since to date these are the only three genes associated to this syndrome. Regarding *RET*, we also decided to perform its mutational screening because of its prominent role in HSCR. The alignment of our results with the sequences provided for *EDN3* (Genbank accession



FIG. 2. Patient 1. Left: Bright blue irises of the patient. Right: Resected gut showing microcolon and microileum.

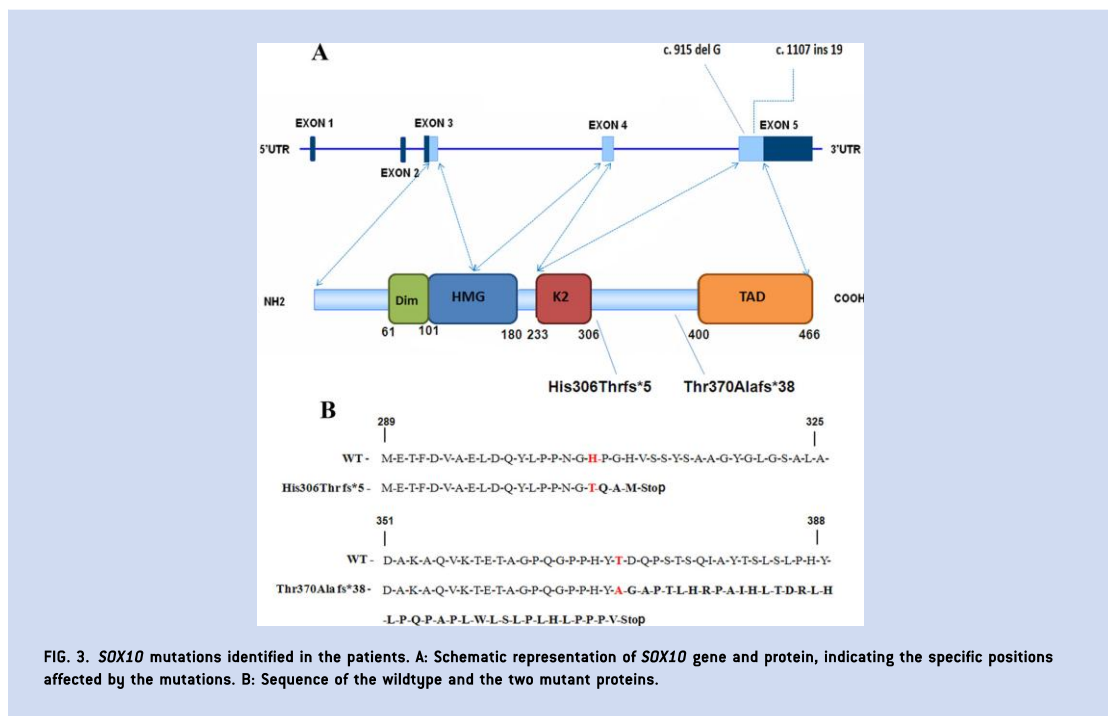
number: NM_000114.2), *EDNRB* (NM_000115.1), *SOX10* (NM_006941.3), and *RET* (NM_020975.4) (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) was carried out using the software SeqScape Ver. 2.5 (Applied Biosystems). On the other hand, analysis of the intronic *RET* enhancer mutation (c.73+9277T>C, rs2435357) was performed by Taqman technology, using previously described conditions [Borrego et al., 2003; Fernandez et al., 2005]. This common variant is considered the major low-penetrance genetic susceptibility factor for HSCR, making a 20-fold greater contribution to risk than coding mutations do [Emison et al., 2005, 2010].

The mutational screening revealed the presence of two different *SOX10* mutations in the two patients (Fig. 3). Specifically, in Patient 1, we identified the novel c.1107ins GCTGGGGCCCCA-CACTAC mutation (c.1107ins19, p.Thr370Serfs*38) in the exon 5 of the gene. That insertion generates a frameshift after codon 370, resulting in the addition of a tail of 37 aminoacid residues and a premature termination of the polypeptide chain. The mutation was also carried by his mother and his maternal grandmother. None of the family members carry the *RET* intronic c.73+9277T>C variant.

Regarding Patient 2, we identified the de novo mutation c.915delG in exon 5. This deletion was previously reported, and generates a frameshift after codon 305, which would result in the addition of four aminoacid residues and a premature stop codon (p.His306Thrfs*5) [Viñuela et al., 2009]. The patient and both parents also carry the *RET* enhancer variant in heterozygosis.

DISCUSSION

SOX10 is a key transcription factor during neural-crest development, when the pluripotent neural-crest cells migrate from the neural tube throughout the embryo along several pathways and give rise to different cell types, including glia and neurons of the peripheral nervous system, enteric neurons and glia, some of the craniofacial skeletal tissue, and melanocytes of the skin and inner ear [Le Douarin and Kalcheim, 1999]. Since 1998, approximately 100 heterozygous point mutations or deletions of *SOX10* have been reported, first in WS4 [Pingault et al., 1998], then in its neurological variant PCWH [Inoue et al., 2004], subsequently in WS2 [Bondurand et al., 2007], and finally in Kallmann syndrome with deafness [Pingault et al., 2013]. A *SOX10* truncating mutation (c.153-155del) has been reported as well in an isolated case of HSCR [Sánchez-Mejías et al., 2010a] (see also the WS gene mutation database at LOVD [Leiden Open Variation Database]. Of them, around 40 *SOX10* mutations causing either WS4 or PCWH have been reported to date (Database URL: http://research.nhgri.nih.gov/pigment_cell/), comprising about two thirds of the mutations reported for those phenotypes. In this study, we have identified the molecular cause of either WS4 or PCWH phenotype in the two cases analyzed, both of them corresponding to frameshift *SOX10* mutations in exon 5 that lead to premature stop codons, as in the majority of the cases reported to date. It has been documented that the severity of the phenotype, in terms of presence/absence of neuro-



logical manifestations, seems to be correlated with the specific location of the codon where truncation occurs [Inoue et al., 2004; Bondurand and Sham, 2013]. Different hypotheses have been forwarded speculating that those truncating mutations in exon 5 or at the very end of exon 4, let the mutant mRNAs to escape the nonsense mediated mRNA decay pathway in the nucleus, to reach the cytoplasm, and to be translated into truncated SOX10 proteins with a dominant-negative activity that is responsible for the PCWH phenotype [Inoue et al., 2004]. In contrast, if the mutant mRNA is degraded in the nucleus, the mechanism of disease would be haploinsufficiency, resulting in WS4 without neurological symptoms. The hypothetical limit has been proposed around codon 234, where the p.Gln234X mutation results in the shortest truncated protein involved in PCWH. In this sense, the c.915delG mutation (p.His306Thrfs*5), detected as a de novo event in Patient 2, would fit with the model of dominant-negative activity resulting in neurological affection since this patient, currently 16 years old, showed dysmyelination at MRI and is affected by severe psychomotor delay. Moreover, this deletion had been also reported to be associated to the PCWH phenotype [Viñuela et al., 2009], suggesting a genotype–phenotype correlation for this particular mutation.

A completely different scenario is observed for the mutation identified in Patient 1, c.1107ins19 (p.Thr370Alafs*38). First of all, it is not a de novo, but an inherited mutation which results in distinct phenotypes along three different generations: hypopigmentation in the maternal grandmother, hearing loss in the mother and WS4 in the proband. Only a few familial WS4 cases have been described so far [Pingault et al., 1998; Southard-Smith et al., 1999], showing a high phenotypic variability. In those families, the penetrance of each feature is incomplete, sometimes leading to phenotypes lacking cardinal signs of typical WS [Pingault et al., 2010]. It has been speculated that mosaicism participates in incomplete penetrance of some features, contributing to phenotypic variability in the context of those families. Mosaicism could also explain the fact that, in a few instances, *SOX10* mutations are observed in healthy parents of affected children [Southard-Smith et al., 1999; Touraine et al., 2000; Bondurand and Sham, 2013]. However, mosaicism cannot explain the three different related-WS features observed in three different generations of this family. The most plausible explanation for the different phenotypic presentation in the three members carrying the same c.1107ins19 mutation, would be the existence of additional molecular events, acting in an additive or multiplicative fashion, in genes or regulatory regions unidentified so far. In agreement with this hypothesis, a very recent report described a third-generation family with three members affected with isolated HSCR and one with HSCR and heterochromia iridum. It was postulated that HSCR could be due to the joint effect of heterozygous mutations in *EDNRB* and *EDN3*, while iris heterochromia could be due to an independent genetic event (maybe a de novo CNV encompassing the *DACH1* gene) and would account for the additional phenotype within the family [Cui et al., 2013].

Therefore, we sought to investigate the presence of the *RET* enhancer variant in the context of the family to evaluate its possible involvement in the manifestation of the enteric phenotype in the proband, but analysis showed its absence in all the family members. This is in fact in accordance with the findings previously reported by

de Pontual et al. in 2007, excluding such *RET* common hypomorphic allele as a genetic risk factor for HSCR phenotype in the context of WS patients [de Pontual et al., 2007]. Moreover, no other coding mutations were identified in any of the rest of the genes analyzed, supporting the need of further analysis of novel genes identified. In this sense, variations affecting some of the identified *SOX10* regulatory sequences have been proposed to have a role in phenotypic variability [Bondurand et al., 2012], and should be investigated as well.

On the other hand, in contrast with the majority of mutations located within the 3' region of the gene, no neurological manifestations have been recorded for any of the patients of this family. Interestingly, the insertion c.1107ins19 results in a frameshift that add a tail of 37 aminoacids. For other mutations that also act by adding large tails of aminoacids, such as c.780delG (p.Arg261Alafs*25), or c.1077_1078delGA (p.Glu359Aspfs*42), and that do not result in neurological symptoms, it has been proposed that the presence of those abnormal tails might lead to misfolding and subsequent degradation by the cell proteolytic machinery, avoiding the dominant-negative effect [Viñuela et al., 2009]. Such hypothesis could also be applied to our p.Thr370Alafs*38 mutation, resulting in no PCWH phenotype, although further investigation is warranted.

In conclusion, our findings support again the relevance of performing a genetic test in case of clinical suspicion of WS4, as a useful tool for clinical management of the patients, as well as for an appropriate genetic and reproductive counseling for the families. Moreover, our results seem to discard mosaicism, as at least the only cause of phenotypic variability in the context of the families affected. Further studies are warranted to completely elucidate such intrafamilial phenotypic variability, as well as to identify other genes involved in WS4/PCWH responsible for the cases remaining unsolved.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank the families that participated in this study. The CIBER de Enfermedades Raras is an initiative of the ISCIII, Spanish Ministry of Economy and Competitiveness. M.V.-E. is supported by fellowship PFIS11/00533 from the ISCIII.

REFERENCES

- Amiel J, Sproat-Emison E, Garcia-Barcelo M, Lantieri F, Burzynski G, Borrego S, Pelet A, Arnold S, Miao X, Griseri P, Brooks AS, Antinolo G, de Pontual L, Clement-Ziza M, Munnich A, Kashuk C, West K, Wong KK, Lyonnet S, Chakravarti A, Tam PK, Ceccherini I, Hofstra RM, Fernandez R. 2008. Hirschsprung disease consortium. Hirschsprung disease, associated syndromes and genetics: A review. *J Med Genet* 45:1–14.
- Attié T, Till M, Pelet A, Amiel J, Edery P, Boutrand L, Munnich A, Lyonnet S. 1995. Mutation of the endothelin-receptor B gene in Waardenburg-Hirschsprung disease. *Hum Mol Genet* 4:2407–2409.
- Bondurand N, Sham MH. 2013. The role of SOX10 during enteric nervous system development. *Dev Biol* 382:330–343.
- Bondurand N, Dastot-Le Moal F, Stanchina L, Collot N, Baral V, Marlin S, Attie-Bitach T, Giurgea I, Skopinski L, Reardon W, Toutain A, Sarda P, Echaieb A, Lackmy-Port-Lis M, Touraine R, Amiel J, Goossens M,

- Pingault V. 2007. Deletions at the SOX10 gene locus cause Waardenburg syndrome types 2 and 4. *Am J Hum Genet* 81:1169–1185.
- Bondurand N, Fouquet V, Baral V, Lecerf L, Loundon N, Goossens M, Duriez B, Labrune P, Pingault V. 2012. Alu-mediated deletion of SOX10 regulatory elements in Waardenburg syndrome type 4. *Eur J Hum Genet* 20:990–994.
- Borrego S, Wright FA, Fernández RM, Williams N, López-Alonso M, Davuluri R, Antiñolo G, Eng C. 2003. A founding locus within the RET proto-oncogene may account for a large proportion of apparently sporadic Hirschsprung disease and a subset of cases of sporadic medullary thyroid carcinoma. *Am J Hum Genet* 72:88–100.
- Cui L, Wong EH, Cheng G, Firmato de Almeida M, So MT, Sham PC, Cherny SS, Tam PK, Garcia-Barceló MM. 2013. Genetic analyses of a three generation family segregating Hirschsprung disease and iris heterochromia. *PLoS ONE* 8:e66631.
- Currie ABM, Haddad M, Honeyman M. 1986. Associated developmental abnormalities of the anterior end of the neural crest: Hirschsprung's disease-Waardenburg's syndrome. *J Pediatr Surg* 21:248–250.
- de Pontual L, Pelet A, Clement-Ziza M, Trochet D, Antonarakis SE, Attié-Bitach T, Beales PL, Blouin JL, Dastot-Le Moal F, Dollfus H, Goossens M, Katsanis N, Touraine R, Feingold J, Munnich A, Lyonnet S, Amiel J. 2007. Epistatic interactions with a common hypomorphic RET allele in syndromic Hirschsprung disease. *Hum Mutat* 28:790–796.
- Ederly P, Attié T, Amiel J, Pelet A, Eng C, Hofstra RM, Martelli H, Bidaud C, Munnich A, Lyonnet S. 1996. Mutation of the endothelin-3 gene in the Waardenburg-Hirschsprung disease (Shah-Waardenburg syndrome). *Nat Genet* 12:442–444.
- Emison ES, McCallion AS, Kashuk CS, Bush RT, Grice E, Lin S, Portnoy ME, Cutler DJ, Green ED, Chakravarti A. 2005. A common sex-dependent mutation in a RET enhancer underlies Hirschsprung disease risk. *Nature* 434:857–863.
- Emison ES, Garcia-Barcelo M, Grice EA, Lantieri F, Amiel J, Burzynski G, Fernandez RM, Hao L, Kashuk C, West K, Miao X, Tam PK, Griseri P, Ceccherini I, Pelet A, Jannot AS, de Pontual L, Henrion-Caude A, Lyonnet S, Verheij JB, Hofstra RM, Antiñolo G, Borrego S, McCallion AS, Chakravarti A. 2010. Differential contributions of rare and common, coding and noncoding Ret mutations to multifactorial Hirschsprung disease liability. *Am J Hum Genet* 87:60–74.
- Fernandez RM, Boru G, Pecina A, Jones K, López-Alonso M, Antiñolo G, Borrego S, Eng C. 2005. Ancestral RET haplotype associated with Hirschsprung's disease shows linkage disequilibrium breakpoint at—1249. *J Med Genet* 42:322–327.
- Hofstra RM, Osinga J, Tan-Sindhunata G, Wu Y, Kamsteeg EJ, Stulp RP, van Ravenswaaij-Arts C, Majoor-Krakauer D, Angrist M, Chakravarti A, Meijers C, Buys CH. 1996. A homozygous mutation in the endothelin-3 gene associated with a combined Waardenburg type 2 and Hirschsprung phenotype (Shah-Waardenburg syndrome). *Nat Genet* 12:445–447.
- Inoue K, Khajavi M, Ohyama T, Hirabayashi S, Wilson J, Reggin JD, Mancias P, Butler IJ, Wilkinson MF, Wegner M, Lupski JR. 2004. Molecular mechanism for distinct neurological phenotypes conveyed by allelic truncating mutations. *Nat Genet* 36:361–369.
- Jan IA, Stroedter L, Haq AU, Din ZU. 2008. Association of Shah-Waardenburg syndrome: A review of 6 cases. *J Pediatr Surg* 43:744–747.
- Le Douarin NM, Kalcheim C. 1999. *The Neural Crest*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Okamoto E, Ueda T. 1967. Embryogenesis of intramural ganglia of the gut and its relation to Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg* 2: 437–443.
- Pingault V, Bondurand N, Kuhlbrodt K, Goerich DE, Préhu MO, Puliti A, Herbarth B, Hermans-Borgmeyer I, Legius E, Matthijs G, Amiel J, Lyonnet S, Ceccherini I, Romeo G, Smith JC, Read AP, Wegner M, Goossens M. 1998. SOX10 mutations in patients with Waardenburg-Hirschsprung disease. *Nat Genet* 18:171–173.
- Pingault V, Ente D, Dastot-Le Moal F, Goossens M, Marlin S, Bondurand N. 2010. Review and update of mutations causing Waardenburg syndrome. *Hum Mutat* 31:391–406.
- Pingault V, Bodereau V, Baral V, Marcos S, Watanabe Y, Chaoui A, Fouveaut C, Leroy C, Vérier-Mine O, Francannet C, Dupin-Deguine D, Archambeaud F, Kurtz FJ, Young J, Bertherat J, Marlin S, Goossens M, Hardelin JP, Dodé C, Bondurand N. 2013. Loss-of-function mutations in SOX10 cause Kallmann syndrome with deafness. *Am J Hum Genet* 92: 707–724.
- Puffenberger EG, Hosoda K, Washington SS, Nakao K, deWit D, Yanagisawa M, Chakravarti A. 1994. A missense mutation of the endothelin-B receptor gene in multigenic Hirschsprung's disease. *Cell* 79:1257–1266.
- Ruiz-Ferrer M, Fernández RM, Antiñolo G, López-Alonso M, Eng C, Borrego S. 2006. A complex additive model of inheritance for Hirschsprung disease is supported by both RET mutations and predisposing RET haplotypes. *Genet Med* 8:704–710.
- Sánchez-Mejías A, Watanabe YM, Fernández R, López-Alonso M, Antiñolo G, Bondurand N, Borrego S. 2010a. Involvement of SOX10 in the pathogenesis of Hirschsprung disease: Report of a truncating mutation in an isolated patient. *J Mol Med (Berl)* 88:507–514.
- Sánchez-Mejías A, Fernández RM, López-Alonso M, Antiñolo G, Borrego S. 2010b. New roles of EDNRB and EDN3 in the pathogenesis of Hirschsprung disease. *Genet Med* 12:39–43.
- Southard-Smith EM, Angrist M, Ellison JS, Agarwala R, Baxevanis AD, Chakravarti A, Pavan WJ. 1999. The Sox10(Dom) mouse: Modeling the genetic variation of Waardenburg-Shah (WS4) syndrome. *Genome Res* 9:215–225.
- Touraine RL, Attié-Bitach T, Manceau E, Korsch E, Sarda P, Pingault V, Encha-Razavi F, Pelet A, Augé J, Nivelon-Chevallier A, Holschneider AM, Munnes M, Doerfler W, Goossens M, Munnich A, Vekemans M, Lyonnet S. 2000. Neurological phenotype in Waardenburg syndrome type 4 correlates with novel SOX10 truncating mutations and expression in developing brain. *Am J Hum Genet* 66:1496–1503.
- Viñuela A, Morin M, Villamar M, Morera C, Lavilla MJ, Cavallé L, Moreno-Pelayo MA, Moreno F, del Castillo I. 2009. Genetic and phenotypic heterogeneity in two novel cases of Waardenburg syndrome type IV. *Am J Med Genet Part A* 149A:2296–2302.
- Waardenburg PJ. 1951. A new syndrome combining developmental anomalies of the eyelids, eyebrows and nose root with pigmentary defects of the iris and head hair and with congenital deafness. *Am J Hum Genet* 3: 195–253.

9.2. Publicación II

Original Article

A Scoring System to Predict the Severity of Hirschsprung Disease at Diagnosis and Its Correlation With Molecular Genetics

Raquel Núñez-Ramos¹, Raquel M Fernández^{2,3}, Miguel González-Velasco⁴, Jesús Ruiz-Contreras⁵, Enrique Galán-Gómez⁶, Ramón Núñez-Núñez⁷, and Salud Borrego^{2,3}

Pediatric and Developmental Pathology
0(0) 1–10
© 2016, Society for Pediatric Pathology
All rights reserved.
Reprints and permissions:
sagepub.com/journalsPermissions.nav
DOI: 10.1177/1093526616683883
journals.sagepub.com/home/pdp
SAGE

Abstract

Objectives: Hirschsprung disease (HSCR) has a wide range of severity. There are nonsevere forms treated conservatively until surgery and severe forms that require an early stoma and prolonged hospitalization. Our objective was to establish a clinical scoring system to predict the severity of HSCR and to evaluate the possible existence of a clinical-genetic correlation.

Methods: We carried out a retrospective observational study including all HSCR cases treated in our hospital. The sample was divided into severe and nonsevere disease according to the number of surgical procedures, hospitalization time, and episodes of enterocolitis. The proposed score was applied at diagnosis, and the sensitivity, specificity, and optimal cut-point were determined. We conducted a prospective molecular study of *RET*, *EDNRB*, and *EDN3* on all patients, as well as *SOX10* in Waardenburg Syndrome type 4 forms.

Results: Among the 42 patients treated between 1983 and 2013, 15 met the severe disease criteria. This group had a higher mean score (13.15 ± 2.36) than the nonsevere group (8.15 ± 2.13 ; $p < 0.001$). A score ≥ 11 had a sensitivity of 87% and a specificity of 81% in detecting the severe cases. Causative mutations were identified in 12 patients, 8 of them in the severe group ($p = 0.015$). Most of these mutations (75%) were located in the *RET* proto-oncogene.

Conclusion: The proposed scoring system enables the early selection of patients with severe behavior of HSCR. A value ≥ 11 showed good sensitivity and specificity for this purpose. Causative mutations were identified in more than 50% of patients who met the criteria for severe disease.

Keywords

clinical scoring system, clinical severity, genetic mutations, hirschsprung disease, *RET* proto-oncogene

Introduction

Hirschsprung disease (HSCR OMIM 142623) is a developmental disorder characterized by the absence of the enteric nervous system (ENS) in the myenteric and submucosal plexus of the distal bowel.^{1,2} Its incidence is estimated to be 1/5000 live births in Caucasians, and it is the most frequent cause of functional intestinal obstruction in childhood.^{3,4} The proximal extent of aganglionosis from the internal anal sphincter allows for its classification into different phenotypes: short-segment or rectosigmoid HSCR (S-HSCR, 75%–80%), long-segment HSCR, when the absence of ganglion cells is proximal to the sigmoid colon (L-HSCR, 15%–20%), and total colonic aganglionosis, when the entire colon and less than 50 cm of the terminal ileum are affected (TCA, 2%–13%).⁵ Other less common forms of the disease have been described, such as total intestinal aganglionosis

and segmental and ultra-short forms.^{2,6} For reasons not well understood, the male:female ratio is greater for S-HSCR (5.5:1) than for L-HSCR (1.75:1).² HSCR usually appears

¹University Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain

²Department of Genetics, Reproduction and Fetal Medicine, University Hospital Virgen del Rocío, Seville, Spain

³Centre for Biomedical Network Research on Rare Diseases (CIBERER), Seville, Spain

⁴Department of Mathematics, Faculty of Sciences, University of Extremadura, Badajoz, Spain

⁵Division of Pediatrics, University Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain

⁶Division of Pediatrics, University Hospital Materno Infantil, Badajoz, Spain

⁷University Hospital Materno Infantil, Badajoz, Spain

Corresponding Author:

Raquel Núñez-Ramos, University Hospital 12 de Octubre, Av de Córdoba s/n, 28041, Madrid, Spain.
Email: nunezramos.raquel@gmail.com

sporadically, although there are familial cases with autosomal-dominant or -recessive inheritance with partial penetrance and variable expressivity.⁷ It occurs as an isolated trait in 70% of patients and as part of a syndrome in the other 30%. It is associated with some chromosomopathy in 12% of cases, the commonest being Down Syndrome (DS).²

The genetic basis of HSCR is still not clearly established. The *RET* proto-oncogene is the major susceptibility gene for HSCR. It encodes for a membrane receptor with tyrosine kinase activity which plays a crucial role in the formation of the ENS. However, only 50% of familial and 10%–35% of sporadic cases are attributable to germline loss-of-function mutations in this gene's coding sequence.^{2,7,8} So far, only a minority of cases are known to be due to mutations in genes other than *RET*, such as *EDNRB* and *EDN3*, that are involved in this or other signaling pathways.^{2,7} Thus, there is still no complete elucidation of the molecular mechanism that causes the disease in most HSCR patients, especially in the sporadic cases. There is evidence that the appearance of these sporadic forms, particularly the S-HSCR phenotype, follows a complex pattern of inheritance in which various genetic events must converge to produce the phenotype. Indeed, it is clear that the appearance of the phenotype also depends on common genetic variants such as those which are located in the enhancer-like domain of intron 1 of *RET*. This variant, c.73 + 9277T > C, shows a very strong association with sporadic cases and could act as a modifying factor modulating the penetrance of mutations in other genes and possibly of the *RET* proto-oncogene itself.^{8,9} Moreover, one of the syndromic forms of HSCR is Waardenburg Syndrome type 4 (WS4, OMIM 277580), caused by either autosomal-recessive mutations in genes *EDNRB* and *EDN3* or autosomal-dominant mutations in *SOX10* (45%–55% of cases).

Clinically, HSCR manifests itself across a spectrum of severity, where nonsevere forms managed with conservative treatment until surgery and severe forms requiring a stoma and prolonged hospitalization are found. Guo et al.¹⁰ and Wu et al.⁴ have validated scales for the neonatal diagnosis of HSCR and for its differentiation from other ENS disorders. However, to date, no scale has been proposed to predict the disease's behavior. Furthermore, because of HSCR's polygenic nature and complex genetic basis, the genotype-phenotype correlation has yet to be solidly established even though it has been intensively investigated.^{11–13}

The objective of the present study was to design a clinical scoring system that will allow for the early prediction of the severity of HSCR and facilitate the study of the phenotype-genotype correlation through the selection of cases with severe behavior.

Methods

This was a retrospective observational study that included 42 patients diagnosed with HSCR between 1983 and 2013 at the University Hospital of Badajoz, a tertiary referral center

in Extremadura, Spain. The study was approved by the ethics committee of that hospital, and the signed informed consent of the participants was obtained. Patients were evaluated by a pediatrician and a pediatric surgeon, completing the routine protocol including contrast enema, rectal or bowel biopsy, and anorectal manometry, since the time of its implementation in our center.¹⁴ There were 5 surgeons operating during the study period. The absence of ganglion cells in the biopsy confirmed the diagnosis. Medical records were reviewed. We recorded the age at diagnosis, sex, family history of HSCR, associated syndromes or malformations, time of meconium passage, clinical onset (defined as the earliest symptoms identified), digital rectal examination (DRE), extent of the aganglionosis, effectiveness of preoperative treatment, findings of the first enema, surgical procedures, complications, and length of hospitalization. Patients were divided into 2 groups (severe and nonsevere) according to the outcome of the disease. Severe behavior was defined by 2 or more of the following criteria: the need for stoma or >2 surgical procedures, development of at least one episode of enterocolitis, and prolonged hospitalization (>100 days in the first 2 years after diagnosis). Surgery and hospital stays for other reasons were excluded. The enterocolitis diagnosis was established by clinical criteria.¹⁵ A clinical score was prepared (Table 1) taking into account the following eight factors:

- Family history
- Associated syndromes or malformations
- Time of meconium passage
- Clinical onset
- DRE
- Effectiveness of preoperative medical treatment
- Extent of the aganglionosis
- Results of the first enema

As soon as HSCR was either suspected or definitively diagnosed in our center, medical treatment was commenced with saline solution rectal irrigation and daily rectal manipulation to allow passage of stool. These washouts were done through a multiperforated rectal catheter, in the form of repeated irrigation (from 10 to 20 ml/kg) and then aspirated or left to flush out spontaneously until the effluent was clear. The preoperative medical treatment was considered effective when it enabled easy stool passage, avoiding the need for a stoma and allowing an adequate nutritional status to be reached. In effective cases, this procedure eliminated the fecal stasis and reduced the intraluminal pressure of the dilated intestine, avoiding enterocolitis and the need for colostomy.

Once the diagnosis had been established, each patient was scored in accordance to the 8 criteria above (2–20 points, Table 1).

A molecular study was carried out in all patients, their parents and, when available, their siblings at the Department of Genetics, Reproduction, and Fetal Medicine, University

Table 1. Scoring System to Evaluate the Clinical Behavior of HSCR at Diagnosis (HSCR Severity Score, 2–20 points).

1. Family history of HSCR	
a) None	0
b) 2nd degree	1
c) 1st degree	2
2. Associated syndromes or malformations	
a) Isolated HSCR	0
b) Associated malformations	1
c) Non-down/Waardenburg syndrome/ other neurocristopathy	2
d) Down syndrome	3
3. Time of meconium passage	
a) <24 h	0
b) 24–48 h	1
c) >48 h	2
4. Clinical onset	
a) Constipation	1
b) Intestinal obstruction	2
c) Enterocolitis or intestinal perforation	3
5. Digital rectal examination/anal tone	
a) Normal	0
b) Discretely hypertonic/explosive evacuation	1
c) Manifestly hypertonic/empty rectum	2
6. Effectiveness of preoperative medical treatment	
a) Not stated/not done	0
b) Effective	1
c) Ineffective	2
7. Extent of aganglionosis	
a) Ultra-short	1
b) S-HSCR	2
c) L-HSCR	3
d) TCA	4
8. Contrast enema	
a) Normal/findings of no relevance	0
b) Presence of transition zone	1
c) Spastic colon/decreased colon diameter or microcolon	2

HSCR: Hirschsprung disease; L-HSCR: long-segment HSCR; S-HSCR: short-segment or rectosigmoid HSCR; TCA: total colonic aganglionosis.

Hospital Virgen del Rocío of Seville, screening for the coding sequence of the *RET*, *EDNRB*, and *EDN3* genes in all cases, and of *SOX10* in patients with suspected WS4, following the protocols described elsewhere.^{8,16} For all the patients, we also genotyped the variant *c.73 + 9277T > C* in intron 1 of *RET*, given that the *c.73 + 9277T* allele is strongly associated with HSCR and seems to increase penetrance in patients with rare *RET* coding mutations through an additive effect.⁸

Data analysis was performed using the IBM-SPSS Statistics 19 software package. Quantitative variables are

mainly presented as the mean \pm standard deviation (also indicating the median and range for some of them), with the severe and nonsevere groups being compared using the nonparametric Mann–Whitney–Wilcoxon test. The nonparametric Kruskal–Wallis test was used to compare the number of surgical procedures, hospitalization time, and enterocolitis episodes throughout the three decades that are covered by our study. Categorical variables are presented as percentages and were analyzed through the corresponding contingency tables using either Pearson’s chi-squared test or Fisher’s exact test if the conditions of validity of the former were not satisfied. The relationship between the score and the severity of HSCR was analyzed by means of a logistic regression model, including the Hosmer–Lemeshow (HL) test of goodness-of-fit, Nagelkerke’s R^2 , and the odds ratio (OR), together with their confidence intervals (CI). The discriminating power of the model was evaluated through its receiver operating characteristic (ROC) curve, including the study of the area under the curve (AUC). This allowed us to establish the optimal cut-point for the score ensuring adequate sensitivity and specificity. Subsequently, a multiple logistic regression model with stepwise forward selection was used to determine the predictive capacity of the variables of the scale with respect to the severity of the disease. A value of $p < 0.05$ was considered to be statistically significant.

Results

Between 1983 and 2013, 42 HSCR patients were treated in our center (29 males, 69%). The median age at diagnosis was 52 days (2 days–14.02 years). Forty patients presented a sporadic form, with no prior family history of the disease; the other 2 were familial HSCR cases, corresponding to 2 different families. In 34 patients (81%), the disease occurred as an isolated event, and in the other 8 patients in a syndromic form (5 DS and 3 WS4). One of the latter met the criteria for peripheral demyelinating neuropathy, central dysmyelinating leukodystrophy, Waardenburg syndrome, and Hirschsprung’s disease. Three DS patients had cardiac involvement. No other associated malformations were noted.

The commonest form was S-HSCR (26 cases), followed by TCA (10 cases), L-HSCR (4 cases), and ultra-short (2 cases). No total intestinal aganglionosis were identified. In no case was the DRE normal: most had a tight rectum or the DRE was followed by explosive evacuation (57.1%) and the remaining 42.9% had an empty rectum. In 50%, passage of meconium was delayed by more than 48 h; in 14.3%, meconium passage occurred during the first 24 h of life. Intestinal obstruction was the commonest clinical presentation (23 cases), followed by protracted constipation (12 cases). In 8 patients, the report of the first enema was normal or with irrelevant alterations. The characteristic transition zone was identified in 23 patients whereas in the remaining 11, the image showed other alterations (decreased

Table 2. Parameters Evaluated Based on the HSCR Severity Score Described in Table 1 for the Two Groups of Patients (Severe and Nonsevere).

Variables	Severe (n = 15)	Nonsevere (n = 26)	P
Age at diagnosis (mean and median in days)	87.5 ± 114.6 32; IQR 148	588.4 ± 1333.8 70.5; IQR 205	0.099 ^c
Sex			0.038 ^a
Male	7 (46.7%)	21 (80.8%)	
Female	8 (53.3%)	5 (19.2%)	
Family history of HSCR			0.243 ^a
None	12 (80%)	25 (96.2%)	
1st degree	2 (13.3%)	0	
2nd degree	1 (6.7%)	1 (3.8%)	
Syndromes/other malformations			0.026 ^a
Isolated HSCR	9 (60%)	24 (92.3%)	
Non-down syndrome/other	2 (13.3%)	1 (3.8%)	
Down syndrome	4 (26.7%)	1 (3.8%)	
Time of meconium passage			0.001 ^a
<24 h	0	6 (23.1%)	
24–48 h	2 (13.3%)	13 (50%)	
>48 h	13 (86.7%)	7 (26.9%)	
Clinical onset			0.167 ^a
Constipation	2 (13.3%)	10 (38.5%)	
Intestinal obstruction	11 (73.3%)	11 (42.3%)	
Enterocolitis or perforation	2 (13.3%)	5 (19.2%)	
Empty rectum on digital rectal examination	12 (80%)	6 (23.1%)	0.001 ^b
Extent of aganglionosis			<0.0001 ^a
Ultra-short	0	2 (7.7%)	
S-HSCR	4 (26.7%)	21 (80.8%)	
L-HSCR	2 (13.3%)	2 (7.7%)	
TCA	9 (60%)	1 (3.8%)	
Effectiveness of preoperative treatment			<0.0001 ^a
Not done	1 (6.7%)	4 (15.4%)	
Effective	3 (20%)	20 (76.9%)	
Ineffective	11 (73.3%)	2 (7.7%)	
Contrast enema			0.001 ^a
No relevant findings	1 (6.7%)	7 (26.9%)	
Transition zone present	5 (33.3%)	17 (65.4%)	
Spastic colon/reduced calibre/microcolon	9 (60%)	2 (7.7%)	

HSCR: Hirschsprung disease; L-HSCR: long-segment HSCR; S-HSCR: short-segment or rectosigmoid HSCR; TCA: total colonic aganglionosis.

^aFisher's Exact test.

^bPearson's Chi-squared test.

^cMann-Whitney-Wilcoxon test.

colon diameter, delayed contrast evacuation, or microcolon). Preoperative medical treatment was effective in 24 cases (57.1%). Thirteen nonpermanent ostomies were performed.

Using logistic regression, we created a scoring algorithm that might be useful at the time of diagnosis to predict the severity of the clinical course for children with HSCR. The HSCR Severity Score is outlined in Table 1. Data in Table 2

indicate the percentage of children in the “severe” or “non-severe” groups who fit each of our HSCR Severity Score criteria. Fifteen of the 42 patients (35.7%) met the criteria for severe disease. The mean number of surgical procedures in this group was 2.5 ± 1.4 , and hospitalization time in the first 2 years after diagnosis was 160.2 ± 85.9 days. Twelve patients in the severe group (80%) had at least one episode

of pre- or postoperative enterocolitis. One patient was lost to follow-up and therefore was not classified. The remaining 26 were classified as nonsevere. They required a mean of 1.2 ± 0.5 surgical interventions, a hospitalization time of 35.7 ± 22.5 days, and 7.7% had episodes of enterocolitis ($p < 0.0001$). There were significant differences in the HSCR Severity Score between the two groups, with the severe group having higher mean scores (13.15 ± 2.36) than the nonsevere group (8.15 ± 2.13 ; $p < 0.001$; Figure 1(a)). A logistic regression analysis showed a statistically significant direct relationship between the score and the severity of the disease ($p = 0.003$; OR = 2.92; 95% CI OR: 1.45–5.90; Nagelkerke's $R^2 = 0.753$; HL test: $p = 0.833$, Figure 2(a)). The sensitivity and specificity of our HSCR Severity Score from the ROC curve were 87% and 81%,

respectively, at a cut-point score of 11. The AUC analysis showed the score to have good accuracy (AUC = 0.949; 95% CI: 0.89–1; $p < 0.0001$; Figure 3(a)).

A multivariate logistic regression model with forward selection of the variables showed that only three variables were necessary to explain severity (i.e., in the presence of these three, the other variables provided no relevant information). These 3 were “associated malformations or syndromes” ($p = 0.023$; OR = 4.41; 95% CI OR: 1.23–15.84), “time of meconium passage” ($p = 0.04$; OR = 20.43; 95% CI OR: 1.15–361.90), and “extent of the aganglionosis” ($p = 0.007$; OR = 14.84; OR 95% CI: 2.11–104.24). This allowed us to identify a simplified score (1–9 points) which was also significantly correlated with severity ($p = 0.001$; OR = 5.75; 95% CI OR: 2.01–16.48;

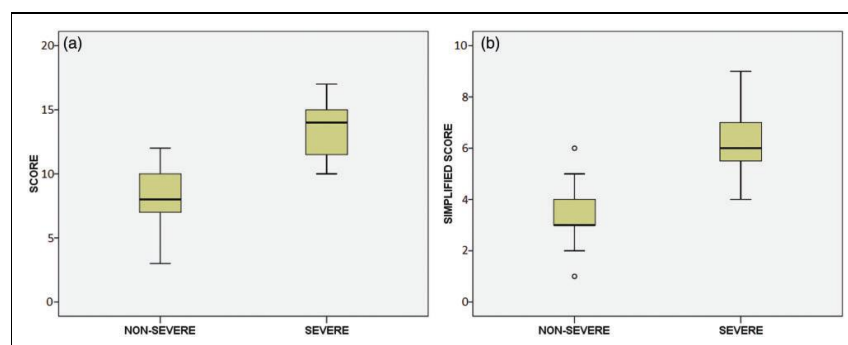


Figure 1. HSCR outcome correlates with severity scores. (a) Using the HSCR Severity Score described in Table 1, the severe group had higher mean scores (13.15 ± 2.36) than the nonsevere group (8.15 ± 2.13 ; $p < 0.001$). (b) Using the Simplified HSCR Severity Score (Table 3), the mean score of the severe group was 6.27 ± 1.33 as against 3.31 ± 1.29 in the nonsevere group ($p < 0.001$).

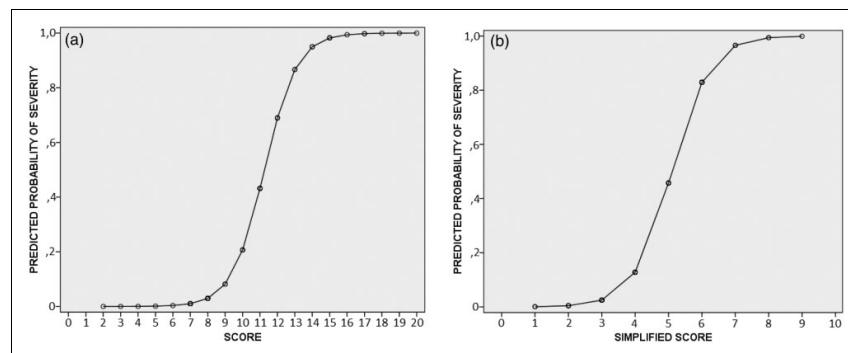


Figure 2. Logistic regression correlating the likelihood of severe disease based on HSCR Severity Score (a) and Simplified HSCR Severity Score (b).

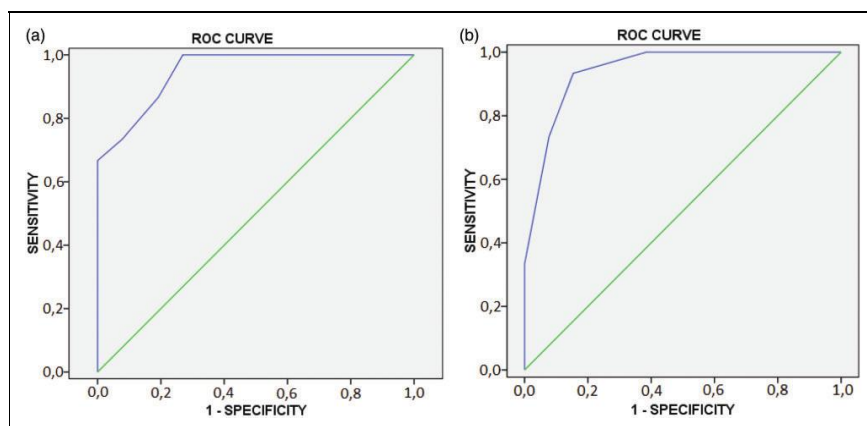


Figure 3. ROC curves based on the HSCR Severity Score (a) and Simplified HSCR Severity Score (b).

Table 3. Simplified Scoring System With 3 Variables (Simplified HSCR Severity Score).

1. Associated syndromes or malformations	
a) Isolated HSCR	0
b) Associated malformations	1
c) Non-down/Waardenburg syndrome/ other neurocristopathy	2
d) Down syndrome	3
2. Time of meconium passage	
a) <24 h	0
b) 24–48 h	1
c) >48 h	2
3. Extent of aganglionosis	
a) Ultra-short	1
b) S-HSCR	2
c) L-HSCR	3
d) TCA	4

HSCR: Hirschsprung disease; L-HSCR: long-segment HSCR; S-HSCR: short-segment or rectosigmoid HSCR; TCA: total colonic aganglionosis

Nagelkerke's $R^2 = 0.725$; HL test: $p = 0.889$, Figure 2(b)). This simplified scoring system composed of 3 variables is represented in Table 3. Again, the AUC showed a good predictive value (0.944; 95% CI: 0.88–1, $p < 0.0001$). The cut-point analysis indicated that a score of 5 would be optimal in this case, with a sensitivity of 0.93 and specificity of 0.84 (Figure 3(b)). In this simplified score, the mean score of the severe group was 6.27 ± 1.33 versus 3.31 ± 1.29 for the nonsevere group ($p < 0.001$; Figure 1(b)).

The causative mutation of the disease was identified in 12 patients. In 9 of them (7 sporadic and 2 familial), the changes affected the *RET* proto-oncogene. All the

information regarding the location, nature, and inheritance of the mutations is summarized in Table 4. Therefore, the *RET* mutation frequency in our cohort is 17.5% in sporadic cases (7 patients with mutations out of 40 sporadic cases) and 100% in familial cases (2 families with mutations of the 2 studied). The commonest route of transmission found was maternal (4 cases), with paternal transmission and de novo cases each being found at a frequency of 3 cases each. Only in one case could the transmission not be established due to not having parental blood sample available. The variant $c.73 + 9277T > C$ in intron 1 of *RET* was found in 30 patients (71.4%; 15 homozygous and 15 heterozygous). Screening revealed a single sequence mutation in *EDNRB* in an isolated and sporadic case of TCA. Also, of the 3 patients with WS4 criteria, causative mutation was identified in 2.¹⁶

Eight of the 15 patients (53.3%) in the severe group presented genetic mutations versus 4 of the 26 (15.3%) in the nonsevere group ($p = 0.015$). Eight (66.6%) of the patients with mutations scored ≥ 11 points.

Discussion

HSCR varies in severity from nonsevere cases managed with conservative treatment until surgery to more severe forms that require a stoma and prolonged hospitalization.

Approximately 80%–90% of patients present symptoms in the first days of life (delayed meconium passage, intestinal obstruction, or enterocolitis).^{18,19} However, in 10% of cases, it manifests later as chronic constipation, failure to thrive, or abdominal distension.^{18,19} The extent of the aganglionosis has been considered to be the main factor conditioning severity, but patients with the same length of aganglionic bowel may have different clinical presentations and different levels of severity in their clinical course.²⁰

Table 4. Spectrum of Mutations in the Series of Patients Analyzed.

Patient	Presentation	Extent of aganglionosis	Gene	Exon	Mutation	Reference	Nature; inheritance	HSCR Severity Score	Simplified HSCR Severity Score
1	Isolated Familial	L-HSCR	RET	18	c.2944C > T; p.Arg982Cys	Sasaki et al. ¹⁷	Missense; Paternal	12	5
2	DS	S-HSCR	RET	9	c.1699G > A; p.Asp567Asn	Novel	Missense; Paternal	10	6
3	Isolated Sporadic	S-HSCR	RET	5	c.943A > C; p.Thr315Pro	Novel	Missense; Maternal	8	4
4	Isolated Sporadic	L-HSCR	RET	10	c.1818insGGCAC; p.Gly607Glyfs*32	Novel	Frameshift, nonsense; <i>De novo</i>	11	5
5	Isolated Sporadic	S-HSCR	RET	7 14	c.1267G > A; p.Gly423Arg c.2485A > G; p.Ser829Gly	Novel Novel	Missense; Paternal Missense; Maternal	7	3
6	Isolated Sporadic	TCA	RET	18 9	c.2944C > T; p.Arg982Cys c.1699G > A; p.Asp567Asn	Sasaki et al. ¹⁷ Novel	Missense; Maternal Missense; <i>De novo</i>	15	6
7	Isolated Sporadic	TCA	RET	8	c.1607C > T; p.Ser536Phe	Novel	Missense; <i>De novo</i>	15	6
8	Isolated Familial	S-HSCR	RET	19	c.3145_3146delCC; p.Pro1049Serfs*8	Novel	Frameshift, nonsense; Maternal	16	6
9	Isolated Sporadic	TCA	RET	18	c.2944C > T; p.Arg982Cys	Sasaki et al. ¹⁷	Missense; Not available	11	7
10	WS4	TCA	SOX10	5	c.915delG; p.His306Thrfs*5	Fernández et al. ¹⁶	Frameshift, nonsense; <i>De novo</i>	17	8
11	WS4	S-HSCR	SOX10	5	c.1107insI9; p.Thr370Serfs*38	Fernández et al. ¹⁶	Frameshift, nonsense; Maternal	10	6
12	Isolated Sporadic	TCA	ENDRB	6	c.1169delC; p.Ser390Argfs*31	Novel	Frameshift, nonsense; Not available	14	6

HSCR: Hirschsprung disease; L-HSCR: long-segment HSCR; S-HSCR: short-segment or rectosigmoid HSCR; DS: Down Syndrome; TCA: total colonic aganglionosis.

Predicting the behavior of HSCR at diagnosis would be of great importance to prevent its complications, but constitutes a challenge for clinical practice. To date, the present scoring system is the first designed for prognostic purposes. It is based on clinical and radiological findings, well known in the literature to increase the risk of poor prognosis in HSCR. We included 8 items: family history,²¹ associated syndromes or malformations (notably DS because of the risk of enterocolitis),^{22,23} time of meconium passage (greater than 48 h reflects greater severity),²⁴ clinical onset (enterocolitis increases the risk of complications),²⁵ the results of DRE (tight rectum or no stool when removing the examining finger are typical of L-HSCR), effectiveness of preoperative medical treatment (its failure complicates evolution of the disease),²⁵ extent of the aganglionosis (TCA is the most complex form of the disease),⁵ and the results of the first enema (the presence of microcolon reflects a major extent).²⁶

We applied it retrospectively to all our patients having classified them as severe (n = 15) or nonsevere (n = 26) depending on hospitalization time, performed surgical procedures, and the occurrence of enterocolitis.

During the whole period, decisions regarding the treatment of HSCR patients were made by both the pediatric surgeon and the pediatrician, adjusting to the significant changes introduced over the years but always using a minimally invasive approach when possible. Comparing the three decades that compose our study period, we obtained differences in the number of surgical procedures over time (2.3 ± 1.57 ; 1.75 ± 0.97 and 1.26 ± 0.73 , respectively, $p = 0.022$), but not regarding hospitalization time or enterocolitis episodes, suggesting that our definition could be applied to all our HSCR cohort.

Among the variables analyzed, we found that the extent of the aganglionic segment influenced the severity of disease complications: 90% of the TCA, 50% of the L-HSCR, and

16% of the S-HSCR met the severity criteria. The sex ratio (male:female) of the patients with nonsevere outcome was 4.2:1, similar to that classically described, whereas in the severe group, it was close to 1:1 ($p=0.038$), which we relate to the greater number of children with extensive aganglionosis among these latter cases.

Although in most cases HSCR appeared in isolation, we identified 3 cases of WS4 and confirmed the known association between HSCR and DS, finding an incidence in our cohort of 11.9%. The presence of associated syndromes was significantly greater in the severe group ($p=0.026$).

The fact that familial forms are more common among cases with very extensive aganglionosis has already been established. Our series supports this finding since the two patients with familial antecedents presented this phenotype. Intestinal obstruction was the commonest first sign, especially in the group that met the severity criteria (73.3%). In the nonsevere group, there was a more even distribution between intestinal obstruction (42.3%) and constipation (38.4%). However, these apparent differences in the distribution of family history and clinical presentation did not reach statistical significance.

Most of the severe patients had an empty rectum at the time of DRE. In the nonsevere group, patients predominately presented with a tight rectum or the DRE being followed by explosive evacuation, reflecting that the DRE overcame the spasm of the aganglionic zone. No severe patient passed meconium in the first 24 h, with the majority of them passing meconium after 48 h (86.7%). The situation was different in the nonsevere group: 23% had normal passage of meconium, 50% delayed to after 24 h, and the remaining 27% to after 48 h ($p < 0.001$). Preoperative medical treatment was effective only in 1 in 5 of the severe versus 77% of the nonsevere patients ($p < 0.001$).

The variable "contrast enema" has limitations, as evidenced by the 8 cases in which the first enema was not suggestive of HSCR. Seven of them belonged to the nonsevere group, and it is noteworthy that the remaining case corresponded to a severe course of TCA. The concordance between the radiological and histological transition zone was low in the long forms²⁷ for which the image may give false negatives, resulting in a lower score than would have been expected. Interestingly, we found that only a few clinical criteria at diagnosis were significantly correlated with the clinical outcome. Our statistical analysis suggested that only 3 of the 8 factors initially considered (a history of delayed meconium passage combined with information regarding associated malformations or syndromes and extent of the aganglionosis) could be enough to alert a pediatrician and pediatric surgeons to the possibility of severe form of HSCR, defined in our study as the need of stoma or >2 surgical procedures, development of at least one episode of enterocolitis, and prolonged hospitalization (>100 days in the first 2 years after diagnosis). These three items constitute a simplified score in which a cut-point of 5 would be

optimal, with a sensitivity of 93% and specificity of 84%. Moreover, when applying our simplified score with a cut-point of 5 to a limited chart review (cases from the last decade), it correctly classified 100% of severe cases and 92.3% of nonsevere cases, leading us to consider that its value remained stable despite the changes in practice patterns over the time.

Given its molecular basis, HSCR is a multifactorial disease in which, in addition to the genetic component, there are other factors that modulate its expression. We identified causative mutation in 12 patients, most located in the *RET* proto-oncogene. Gain-of-function mutations affecting the RET protein are associated with conditions of multiple endocrine neoplasia type 2 (MEN2): MEN2A (OMIM 171400), familial medullary thyroid carcinoma (FMTC, OMIM 155240), and MEN2B (OMIM 162300). The co-occurrence of MEN2A has been described in 2.5%–5% of HSCR patients,^{28–30} it being proposed that in these cases, the mutations act via a dual effect. Several authors advocate screening HSCR patients for the *RET* mutations leading to MEN2. These are most often located in exons 10 and 11, although also in exons 13, 14, 15, and 16 (GeneReviews® for Multiple Endocrine Neoplasia type 2, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1257/>). Nevertheless, none of the mutations detected in our patients involved the risk codons. The molecular origin of 2 cases of WS4 was identified as corresponding to mutations in exon 5 of *SOX10*, as previously reported by our group.¹⁶

In applying the severity criteria, we found that 8 of the 15 patients classified as severe (53.3%) had identified mutations versus 4 of the 26 (15.3%) of the nonsevere ($p=0.015$), which is suggestive of a correlation between the phenotypic expression of the disease and the identification of causative mutations in the principal genes that have been described to date. Furthermore, the c.73+9277T>C variant was detected in the intron 1 of *RET* in 30 patients, more frequently in the nonsevere group (76.9% vs 66.7%, $p=0.713$). This difference, although not statistically significant, could be related to the greater number of sporadic cases in this group.

The scoring system and its simplified form proved useful in determining the severity of HSCR at diagnosis. Both cases, however, require prospective validation.

Conclusion

Application of a clinical scoring system when HSCR is diagnosed may help in the early detection of severe forms of the disease and prevent its complications. A cut-point of 11 on the HSCR Severity Score showed good sensitivity and specificity for this purpose. Our simplified score system also proved useful in determining the severity of HSCR at diagnosis with a greater sensitivity and specificity, leading us to consider it a good alternative since it is more readily applicable in clinical practice. Over 50% of the severe patients

presented genetic mutations, most of them located in the *RET* proto-oncogene, a proportion significantly higher than in nonsevere forms. This suggests a correlation between the phenotypic expression of the disease and the identification of positive results in the molecular study.

Acknowledgments

We would like to thank all the patients that participated in this study and also nurse María Luisa Plaza for her collaboration.

Declaration of Conflicting Interests

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Ethical Approval

All procedures performed in the study were in accordance with the ethical standards of the institutional research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments. Informed consent was also obtained from all individual participants included in the study.

Funding

The author(s) disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: Genetic studies were supported by the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), The Spanish Ministry of Economy and Competitiveness, Spain (PI1301560) and The Regional Ministry of Innovation, Science and Enterprise of the Autonomous Government of Andalucía (CTS-7447).

References

- Goldstein, AM, Hofstra, RM, Burns, AJ (2013). Building a brain in the gut: development of the enteric nervous system. *Clin Genet*, 83(4): 307–316.
- Amiel, J, Sproat-Emison, E, Garcia-Barcelo, M, et al. (2008). Hirschsprung disease, associated syndromes and genetics: a review. *J Med Genet*, 45(1): 1–14.
- Bodian, M, Carter, C (1963). A family study of Hirschsprung disease. *Ann Hum Genet*, 26(3): 261–277.
- Wu, XJ, Zhang, HY, Li, N, et al. (2013). A new diagnostic scoring system to differentiate Hirschsprung's disease from Hirschsprung's disease-allied disorders in patients with suspected intestinal dysganglionosis. *Int J Colorectal Dis*, 28(5): 689–696.
- Moore, SW (2012). Total colonic aganglionosis in Hirschsprung disease. *Semin Pediatr Surg*, 21(4): 302–309.
- Raghunath, BV, Shankar, G, Babu, MN, et al. (2014). Skip segment Hirschsprung's disease: a case report and novel management technique. *Pediatr Surg Int*, 30(1): 119–122.
- Borrego, S, Ruiz-Ferrer, M, Fernández, RM, et al. (2013). Hirschsprung's disease as a model of complex genetic etiology. *Histol Histopathol*, 28(9): 1117–1136.
- Núñez-Torres, R, Fernández, RM, Acosta, MJ, et al. (2011). Comprehensive analysis of RET common and rare variants in a series of Spanish Hirschsprung patients confirms a synergistic effect of both kinds of events. *BMC Med Genet*, 12(1): 138.
- Emison, ES, Garcia-Barcelo, M, Grice, EA, et al. (2010). Differential contributions of rare and common, coding and noncoding Ret mutations to multifactorial Hirschsprung disease liability. *Am J Hum Genet*, 87(1): 60–74.
- Guo, W, Zhang, O, Chen, Y, et al. (2006). Diagnostic scoring system of Hirschsprung's disease in the neonatal period. *Asian J Surg*, 29(3): 176–179.
- Kashuk, CS, Stone, EA, Grice, EA, et al. (2015). Phenotype-genotype correlation in Hirschsprung disease is illuminated by comparative analysis of the RET protein sequence. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102(25): 8949–8954.
- Ishii, K, Doi, T, Inoue, K, et al. (2013). Correlation between multiple RET mutations and severity of Hirschsprung's disease. *Pediatr Surg Int*, 29(2): 157–163.
- Moore, SW, Zaahl, M (2015). Clinical and genetic correlations of familial Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg*, 50(2): 285–288.
- Núñez, R, Vargas, I, Rubio, I, et al. (1995). Anorectal manometry in newborn. *Pediatr Surg Int*, 10(2): 105–107.
- Pastor, AC, Osman, F, Teitelbaum, DH, et al. (2009). Development of a standardized definition for Hirschsprung's-associated enterocolitis: a Delphi analysis. *J Pediatr Surg*, 44(1): 251–256.
- Fernández, RM, Núñez-Ramos, R, Enguix-Riego, MV, et al. (2014). Waardenburg syndrome type 4: report of two new cases caused by SOX10 mutations in Spain. *Am J Med Genet A*, 164(2): 542–547.
- Sasaki, A, Kanai, M, Kijima, K, et al. (2003). Molecular analysis of congenital central hypoventilation syndrome. *Hum Genet*, 114(1): 22–26.
- Núñez, R, Blesa, E, Cabrera, R (2009). Hirschsprung's disease: clinical features. In: R Núñez, M López-Alonso (Eds.). *Hirschsprung's Disease: Diagnosis and Treatment* New York, NY: Nova Publishers, pp. 125–136.
- Vorobyov, GI, Achkasov, SI, Biryukov, OM (2010). Clinical features' diagnostics and treatment of Hirschsprung's disease in adults. *Colorectal Dis*, 12(12): 1242–1248.
- Puri, P (2008). Pathophysiology of Hirschsprung's disease. In: AM Holschneider, P Puri (Eds.). *Hirschsprung's Disease and Allied Disorders* 3rd ed. Heidelberg, Berlin: Springer-Verlag, pp. 94–106.
- Frykman, PK, Short, SS (2012). Hirschsprung-associated enterocolitis: prevention and therapy. *Semin Pediatr Surg*, 21(4): 328–335.
- Menezes, M, Puri, P (2006). Long-term outcome of patients with enterocolitis complicating Hirschsprung's disease. *Pediatr Surg Int*, 22(4): 316–318.
- Menezes, M, Puri, P (2005). Long-term clinical outcome in patients with Hirschsprung's disease and associated down's syndrome. *J Pediatr Surg*, 40(5): 810–812.
- Melendez, E, Goldstein, AM, Sagar, P, et al. (2012). Case records of the Massachusetts general hospital. Case 3-2012. A newborn boy with vomiting, diarrhea, and abdominal distention. *N Engl J Med*, 366(4): 361–372.
- Núñez, R, Vargas, I, Estepa, MJ (2009). Hirschsprung's disease: preoperative medical care. Enterostomies. Bowel preparation for pull-through. In: R Núñez, M López-Alonso (Eds.). *Hirschsprung's Disease: Diagnosis and Treatment* New York, NY: Nova Publishers, pp. 197–218.

26. Stranzinger, E, DiPietro, MA, Teitelbaum, DH, et al. (2008). Imaging of total colonic Hirschsprung disease. *Pediatr Radiol*, 38(11): 1162–1170.
27. Granero, R, Moya, MJ, Cabrera, R, et al. (2010). Relationship between the radiological length of the opaque enema and the aganglionic length of the segment in Hirschsprung's disease. *Cir Pediatr*, 23(1): 53–56.
28. Moore, SW, Zaahl, MG (2008). Multiple endocrine neoplasia syndromes, children, Hirschsprung's disease and RET. *Pediatr Surg Int*, 24(5): 521–530.
29. Bütter, A, Gagné, J, Al-Jazaeri, A, et al. (2007). Prophylactic thyroidectomy in pediatric carriers of multiple endocrine neoplasia type 2A or familial medullary thyroid carcinoma: mutation in C620 is associated with Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg*, 42(6): 203–206.
30. Moore, SW, Zaahl, M (2010). Familial associations in medullary thyroid carcinoma with Hirschsprung disease: the role of the RET-C620 "Janus" genetic variation. *J Pediatr Surg*, 45(2): 393–396.

