

Estudio de polimorfismos asociados a la enfermedad de Hirschsprung

L. Vega Hernández¹, L. Castaño González^{1,4,5}, O. Belar Beitia^{1,4}, E. Ruíz Aja², N. Martínez Ezquerro³, P. López Álvarez-Buhilla²

¹Unidad de Investigación. ²Servicio de Cirugía Infantil. ³Servicio de Pediatría. Hospital de Cruces.
⁴Universidad del País Vasco (UPV-EHU). ⁵CIBERER.

RESUMEN

La enfermedad de Hirschsprung (HSCR) es un desorden congénito caracterizado por la ausencia de células ganglionares a lo largo del tracto gastrointestinal. Está causada por defectos en la migración de las células del sistema nervioso entérico durante el desarrollo embrionario. La mejora de tratamientos quirúrgicos ha disminuido la mortalidad de los pacientes, lo que facilita el estudio genético de enfermos y sus familiares. Aunque se desconoce la causa genética de la enfermedad, se sospecha que el oncogén *RET* es el principal involucrado. Se han encontrado alteraciones en este gen en enfermos con HSCR, por lo que algunos autores sugieren que ciertos polimorfismos (SNPs) en el gen podrían causar cierta predisposición genética a padecer esta enfermedad.

Nuestro trabajo ha consistido en el análisis del gen *RET* en pacientes con diagnóstico de HSCR mediante secuenciación directa y genotipado con sondas *Taqman*[®].

Los resultados obtenidos indican que ciertos alelos de los polimorfismos p.Leu769Leu (c.2307T>G, Exón 13) p.Gly691Ser (c.2071G>A, Exón 11) y p.Ser904Ser (c.2712C>G, Exón 15) están asociados a los enfermos HSCR, ya que existen diferencias significativas respecto a la población sana.

PALABRAS CLAVE: Enfermedad de Hirschsprung; Intestino agangliónico; Polimorfismo; Sondas *TaqMan*[®]; Secuenciación.

STUDY OF POLYMORPHISMS ASSOCIATED TO HIRSCHSPRUNG'S DISEASE

ABSTRACT

Hirschsprung's disease (HSCR) is a developmental disorder characterised by the absence of the enteric ganglia along the intestine. It is regarded as the consequence of the premature arrest of the migration of neural crest cells in the hindgut during the embryonic development to form the enteric nervous system (ENS). It is considered, therefore, a neurocristopathy. The development of surgical approaches has importantly decreased mortality and morbidity of Hirschsprung's patients, which has allowed the emergence of genetic studies of patients and their families.

Correspondencia: L. Vega Hernández. Laboratorio de Genética Molecular. Edificio Anatomía Patológica, planta baja. Hospital de Cruces. Plza. Cruces s/n. 48903 Barakaldo, Bizkaia.
E-mail: lorena.vegahernandez@osakidetza.net

Trabajo presentado como comunicación oral en el L Congreso de la Sociedad Española de Cirugía Pediátrica. Barcelona 2011

Recibido: Junio 2011

Aceptado: Agosto 2011

Although the genetic cause of the disease is still unknown, the *RET* oncogene is the main involved. Alterations in this gene have been found in HSCR patients, so many authors suggest that certain polymorphisms (SNPs) in this gene could be responsible of genetic predisposition to have the disease.

Our work has consisted in the genetic analysis of the *RET* gene in HSCR patients using direct sequencing and genotyping with *TaqMan*[®] probes. Our results show that some alleles of the polymorphisms p.Leu769Leu (c.2307T>G, Exon 13) p.Gly691Ser (c.2071G>A, Exon 11) and p.Ser904Ser (c.2712C>G, Exon 15) are associated to the disease since there are significant differences from the healthy population.

KEY WORDS: Hirschsprung disease; Aganglionic bowel; Polymorphism; *TaqMan*[®] probes; Sequencing.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Hirschsprung (HSCR) o megacolon agangliónico (OMIM 142623) es una malformación congénita caracterizada por la ausencia de células ganglionares en los plexos miéntérico y submucoso (Auerbach y Meissner, respectivamente) de la parte distal del intestino. Tiene una incidencia de 1/5.000 nacimientos, siendo más frecuente en varones que en mujeres. Puede estar asociado con otros síndromes médicos (18% de los casos) de los cuales más del 90% corresponde con el síndrome de Down⁽¹⁾.

La enfermedad se divide en HSCR de segmento corto (*Short*, S-HSCR, en el 75-80% de los casos), largo (*Large*, L-HSCR, 15-20% de los casos) o total (TCA, 3-8% de los casos) según la zona agangliónica alcance al colon sigmoide, la parte proximal del colon sigmoide o todo el intestino grueso, respectivamente⁽¹⁾. La ausencia de células ganglionares en los enfermos HSCR se considera una neurocristopatía, ya que es resultado de un fallo de la colonización de las células de la cresta neural durante la embriogénesis del individuo para formar el sistema nervioso entérico⁽²⁾.

Se sabe que la mayoría, si no todos, de los casos de HSCR tienen un componente genético. El riesgo de malformación está determinado por variaciones en la secuencia de varios genes, diez de los cuales han sido descritos⁽¹⁾. De estos genes, el on-

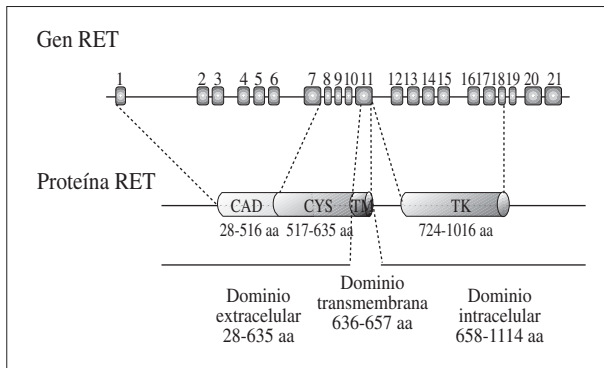


Figura 1. Esquema del gen y el receptor RET. Los exones del gen están indicados con números y rectángulos, las líneas de puntos indican los dominios de la proteína que codifican, indicados con cilindros. La parte extracelular de RET contiene el dominio cadherina (CAD) y una región conservada rica en cisteínas (CYS). TM corresponde al dominio transmembrana y la parte intracelular comprende dos dominios tirosina quinasa (TK) (Adaptación de Tam et al., 2004; 13: 236-48).

cogén *RET* (*REarranged during Transfection*) es el principal factor involucrado en la etiología de la enfermedad. Este gen consta de 20 exones y codifica un receptor tirosina quinasa de la superfamilia de las cadherinas (Fig. 1), que también está implicado en otras patologías como la neoplasia endocrina múltiple tipo 2 (MEN2) y el carcinoma medular de tiroides (CMT)⁽³⁾. Al contrario que en estas enfermedades de tipo endocrino, la causa molecular del HSCR podría ser una variación en la secuencia del gen que produzca una haploinsuficiencia del receptor, es decir, una disminución de su función⁽⁴⁾.

A pesar del papel central que juega *RET* en el HSCR y la extensa búsqueda de mutaciones que han llevado a cabo diferentes grupos durante los últimos años, la tasa de mutación todavía resulta demasiado baja, alrededor del 50% en los casos familiares y 7-35% en los casos esporádicos⁽⁵⁾. Dado que estos valores son insuficientes para señalar a las mutaciones en *RET* como responsables de la enfermedad, recientemente se ha abierto una nueva perspectiva en la que el gen podría estar regulado de forma

epistática. Esto requeriría la interacción de varios genes para producir el fenotipo de la enfermedad, polimorfismos (SNPs, *Single Nucleotide Polymorphisms*) o haplotipos determinados de *RET* que confieran susceptibilidad al locus y causen la enfermedad⁽⁶⁻⁸⁾. Desde 1999 se han descrito varios SNPs en la región codificante de *RET* más o menos representados al compararlos con controles sanos. Los datos indican que SNPs presentes en la población general y, por consiguiente, considerados no patogénicos, podrían estar implicados en la enfermedad.

Este trabajo se centra en la búsqueda de polimorfismos en el gen *RET* que puedan estar asociados al HSCR. Para ello se analizaron mediante secuenciación algunos exones del oncogén *RET* (10, 11, 13, 14, 15 y 16) en nuestra población de enfermos. Se han realizado además ensayos de genotipado con sondas *TaqMan*[®] específicas de los polimorfismos detectados en las secuencias para comparar los resultados obtenidos con población sana. Nuestra finalidad es determinar si las variantes encontradas o su combinación (haplotipo) predisponen a padecer la enfermedad de Hirschsprung.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en un grupo de 49 pacientes con HSCR que fueron diagnosticados y tratados en el Servicio de Cirugía Infantil del Hospital de Cruces. Como población a comparar se utilizaron 178 controles sanos.

Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó a partir de linfocitos de muestras de sangre periférica. Para ello se empleó el kit de extracción de ADN *QIAamp DNA Blood Mini Kit de QIAGEN*[®], siguiendo las recomendaciones del fabricante.

PCR

Se diseñaron pares de oligos específicos para amplificar los exones 10, 11, 13, 14, 15 y 16 del oncogén *RET* de la población con HSCR (Tabla I). El volumen total de la reac-

Tabla I Oligonucleótidos utilizados para las reacciones de PCR y longitud del producto amplificado

Exón	Nombre	Secuencia	Amplificación (pb)
10	NFRET10	5'-GGAGGCTGAGTGGGCTACGT-3'	120
	10AS	5'-TCCCAACAAGGGAGGAAATTG-3'	
11	CFRET11	5'-CCAGTGGTGGCCGAGCCTCT-3'	250
	11AS	5'-AGACAGAGGCCATCCTGTGA-3'	
13	13S	5'-CTCTCTGTCTGAACTTGGGC-3'	239
	13AS	5'-TAAGGCCAGCTGCAGGGTGA-3'	
14	14S	5'-AAGACCCAAGCTGCCTGAC-3'	326
	14AS	5'-CCACACCCTGACCCACCAC-3'	
15	15S	5'-GTCTCACCAGCCGCTAC-3'	292
	15AS	5'-GGGATCCCAGGTGCACCAT-3'	
16	16S	5'-AAGATACCGAAGTTAGTGA-3'	1792
	16AS	5'-ACACCCTTATACATGTAGTGG-3'	

Tabla II Análisis de los polimorfismos de los exones 11, 13 y 15 mediante sondas TaqMan®

Exón 11: rs1799939 (p.Gly691Ser)						
Genotipo	HSCR		Sanos		p-valor	OR (IC95%)
	n	%	n	%		
GG	40	82,00	105	58,99	$3,48 \times 10^{-3}$	3,09 (1,34-7,31)
AA	0	0,00	11	6,18	$7,44 \times 10^{-2}$	0
GA	9	18,00	62	34,83	$2,77 \times 10^{-2}$	0,42 (0,18-0,97)
Total	49	100	178	100		

Exón 13: rs1800860 (p.Leu769Leu)						
Genotipo	HSCR		Sanos		p-valor	OR (95%)
	n	%	n	%		
GG	10	20,41	5	2,81	$1,13 \times 10^{-5}$	8,87 (2,59-31,88)
TT	18	36,73	117	65,73	$2,51 \times 10^{-4}$	0,30 (0,15-0,81)
GT	21	42,86	56	31,46	$1,36 \times 10^{-1}$	1,63 (0,81-3,28)
Total	49	100	178	100		

Exón 15: rs1800863 (p.Ser904Ser)						
Genotipo	HSCR		Sanos		p-valor	OR (95%)
	n	%	n	%		
CC	40	82,00	104	58,43	$2,82 \times 10^{-3}$	3,16 (1,37-7,48)
GG	0	0,00	11	6,18	$7,44 \times 10^{-2}$	0
CG	9	18,00	63	35,39	$2,33 \times 10^{-2}$	0,41 (0,17-0,95)
Total	49	100	178	100		

De cada polimorfismo estudiado se recoge el número de casos homocigóticos y heterocigóticos para cada genotipo. También se expresa el porcentaje de cada uno de ellos para cada grupo de estudio. Para cada genotipo se indica el p-valor y el odd ratio (OR) con un índice de confianza (IC) del 95%.

ción tuvo lugar en 20 µl y se utilizaron 40 ng de DNA, 200 µM dNTPs, 0,4 µM de cada oligo, 0,4 U *Kapa Taq DNA Polymerase*®. Los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa al 1,5% y se purificaron tratándolos con fosfatasa alcalina y exonucleasa I (*ExoSAP-IT, USB*®).

Secuenciación

La secuenciación del DNA amplificado en la reacción de PCR lo llevó a cabo el Servicio de Secuenciación de la Unidad de Investigación del Hospital de Cruces. Se utilizó un secuenciador *Applied Biosystems*® *ABI3130xl*. Para analizar las secuencias se utilizaron los programas informáticos Sequencing Analyzing v5.2 y SeqScape v2.5 de *Applied Biosystems*®.

TaqMan®

Para comprobar la presencia de determinados polimorfismos en el DNA de las poblaciones a estudio se utilizaron sondas *TaqMan*® (*Applied Biosystems*®) específicas para los polimorfismos p.Ser691Gly (rs1799939), p.Leu769Leu (rs1800861) y p.Ser904Ser (rs1800863) presentes en los exones 11, 13 y 15, respectivamente. Esta técnica permite identificar el genotipo de un SNP concreto gracias a sondas marcadas con distintos fluoróforos específicos (FAM y VIC).

La lectura y análisis del resultado se realizó en un Termociclador Real Time *Applied Biosystems*® *7900HT* mediante el programa informático SDS v2.3.

Análisis estadístico

Las frecuencias alélicas de los tres polimorfismos estudiados fueron comparadas entre la población de enfermos HSCR y la población sana. Para determinar la relación de los datos se llevó a cabo un análisis estadístico mediante el programa informático Statcalc v6. Se estudió la asociación de los genotipos y haplotipos a la enfermedad mediante el análisis χ^2 y se determinó el *odd ratio* con un índice de confianza del 95%.

RESULTADOS

Análisis por secuenciación de las muestras de pacientes con enfermedad de Hirschsprung

En la secuenciación directa de los exones 10, 11, 13, 14, 15 y 16 del oncogén RET encontramos de una manera frecuente los polimorfismos p.Gly691Ser (c.2071G>A), p.Leu769Leu (c.2307T>G) y p.Ser904Ser (c.2712C>G) en los exones 11,

Tabla III Genotipos combinados de los exones 11 y 15

Genotipos combinados (EX11/EX15)	HSCR		Sanos		p-valor	OR (IC95%)
	n	%	n	%		
GG/CC	40	81,63	104	58,43	$2,82 \times 10^{-3}$	3,16 (1,37-7,48)
GG/CG	0	0	1	0,56	SD	SD
GG/GG	0	0	0	0	SD	SD
GA/CC	0	0	0	0	SD	SD
GA/CG	9	18,37	62	34,83	$2,77 \times 10^{-2}$	0,42 (0,18-0,97)
GA/GG	0	0	0	0	SD	SD
AA/CC	0	0	0	0	SD	SD
AA/CG	0	0	0	0	SD	SD
AA/GG	0	0	11	6,18	SD	SD
Total	49	100%	178	100%		

De las frecuencias mayoritarias se indican el p-valor y el odd ratio (OR) con un índice de confianza (IC) del 95%. SD: sin determinar.

Tabla IV Genotipos combinados de los exones 11, 13 y 15. No se muestran haplotipos cuya frecuencia sea < 1%

Genotipos combinados (EX11/EX13/EX15)	HSCR		Sanos		p-valor	OR (IC95%)
	n	%	n	%		
GG/GG/CC	10	20,41	3	1,67	$6,00 \times 10^{-7}$	14,96 (3,56-72,29)
GG/GT/CC	18	36,73	28	15,56	$1,20 \times 10^{-3}$	3,11 (1,45-6,69)
GG/TT/CC	12	24,49	74	41,11	$2,90 \times 10^{-2}$	0,46 (0,41-0,98)
GA/GG/CG	0	0	2	1,11	$4,56 \times 10^{-1}$	SD
GA/GT/CG	3	6,12	23	13,33	$1,86 \times 10^{-1}$	SD
GA/TT/CG	6	12,24	37	21,11	$1,77 \times 10^{-1}$	SD
AA/GT/GG	0	0	5	2,78	$2,35 \times 10^{-1}$	SD
AA/TT/GG	0	0	6	3,33	$1,93 \times 10^{-1}$	SD
Total	49	100%	178	100%		

No se muestran haplotipos cuya frecuencia sea < 1%. De las frecuencias mayoritarias se indican el p-valor y el odd ratio (OR) con un índice de confianza (IC) del 95%. SD: sin determinar.

13 y 15, respectivamente (e11, e13 y e15). Para comprobar si los alelos de estos polimorfismos estaban estadísticamente asociados a la enfermedad, realizamos ensayos de genotipado tipo *TaqMan*[®] junto con la población control. Los datos de cada SNP se encuentran resumidos en la tabla II.

Relación de cada alelo de los polimorfismos con la enfermedad de Hirschsprung

A partir de los datos recogidos en la tabla II realizamos el correspondiente estudio estadístico de asociación entre la enfermedad y los distintos genotipos de cada uno de los tres polimorfismos. La asociación se estableció utilizando el valor p de la prueba χ^2 . En los casos en los que existe asociación, ésta se cuantificó utilizando el valor del *odd ratio*.

Los datos de cada polimorfismo analizado individualmente indican que los genotipos GG y CC de los exones 11 y 15, respectivamente, se encuentran asociados al HSCR de forma recesiva ($p = 3,48 \times 10^{-3}$, OR= 3,09 y $p = 2,82 \times 10^{-3}$, OR=

3,16). Por su parte, los resultados del exón 13 muestran que el genotipo GG está asociado a los enfermos de forma recesiva ($p = 1,13 \times 10^{-5}$). Este genotipo es 8,87 veces más frecuente en los HSCR que en los sanos.

Los alelos G y C, y A y G de los polimorfismos de los exones 11 y 15, respectivamente, cosegregan en todos los enfermos HSCR y en un 99,43% de la población control. A la vista de este dato, estudiamos los genotipos combinados de ambos polimorfismos en nuestras poblaciones (Tabla III). Si comparamos las frecuencias de los genotipos en estos dos exones observamos que el 81,63% de los enfermos tienen la combinación GG/CC (e11/e15) ($p = 2,83 \times 10^{-3}$, OR= 3,16), lo que indica que este genotipo está asociado con riesgo a la enfermedad.

Para finalizar el estudio, se analizó la frecuencia de cada genotipo para los tres SNPs. Como se observa en la tabla IV, las combinaciones de alelos más frecuentes en nuestro grupo de estudio son GG/GG/CC (20,41%), GG/GT/CC (36,73%) y

GG/TT/CC (24,29%) (e11/e13/e15). De estos haplotipos, sólo aquellos en los que hay G en el exón 13 están asociados los enfermos de Hirschsprung, siendo el primero de ellos casi 15 veces más frecuente que el resto ($p=6,00 \times 10^{-7}$, $OR=14,96$ y $p=1,20 \times 10^{-3}$, $OR=3,11$, respectivamente). Sin embargo, en la población sana encontramos que los haplotipos mayoritarios son GG/TT/CC (41,11%) y GA/TT/CG (21,11%).

DISCUSIÓN

Los polimorfismos representan variaciones en la secuencia del genoma, presentes en al menos el 1% de la población general, que pueden tener o no efecto fenotípico. La causa genética de la enfermedad de Hirschsprung es todavía una asignatura pendiente en la comprensión de esta enfermedad, lo que hace que su estudio sea de gran interés para la comunidad médica y científica. En este trabajo hemos estudiado tres de los polimorfismos que podrían estar relacionados con el desarrollo de la enfermedad, presentes en los exones 11, 13 y 15.

Nuestros datos indican que, tal y como han descrito otros grupos, el alelo G del polimorfismo p.Leu769Leu (c.2307G>T) está más representado en los enfermos HSCR, especialmente cuando está en homocigosis⁽⁹⁾. Los haplotipos más frecuentes en nuestros casos tienen G en este SNP y, además, los enfermos la combinación GG/GG/CC es 15 veces más frecuente que el resto, lo que sugiere que esta combinación de polimorfismos está fuertemente asociada a la enfermedad.

Hemos constatado que los genotipos GG y CC de los polimorfismos p.Gly691Ser (e11) y p.Ser904Ser (e15), además de cosegregar, están fuertemente asociados a nuestra población HSCR. Los alelos A y G de estos SNPs se han descrito tradicionalmente como asociados a CMT⁽¹⁰⁾, aunque los resultados que tenemos hasta el momento nos indican lo contrario (datos no presentados). Otros autores han observado que la segregación conjunta de los alelos G/C (y A/G) de estos exones podría modular genéticamente a la neoplasia endocrina múltiple tipo 2A (MEN2A), enfermedad causada por mutaciones en el oncogén *RET*⁽¹¹⁾.

Nuestro trabajo sugiere, por lo tanto, que determinados genotipos producto de la combinación de variantes del oncogén *RET* están asociados a la enfermedad de Hirschsprung. Estos polimorfismos pueden ser los responsables de modular el fenotipo de la enfermedad. Es el estudio de la combinación de los alelos en los distintos SNPs del oncogén *RET* el que nos puede dar la clave para entender la causa genética de la enfermedad. Una vez establecidos los genotipos combinados característicos del HSCR, su estudio pasa por realizar pruebas funcionales del receptor *RET* para comprobar cómo las variaciones en la secuencia afectan a su funcionamiento. Lo que parece una realidad es que el modelo genético de la enfermedad de Hirschsprung está cerca de comprenderse, lo que generará una base para el desarrollo en el futuro de terapias óptimas para el tratamiento de la enfermedad.

Tabla V Síndromes médicos asociados a la enfermedad de Hirschsprung

Síndrome	Gen	% con HSCR
Waardenburg-Shah	<i>SOX10, EDN3, EDNRB</i>	100%
Haddad	<i>PHOX2B</i>	100%
Goldberg-Shprintzen	<i>KIAA1279</i>	100%
Mowat-Wilson	<i>ZHF1B</i>	62%
Smith-Lemli-Opitz	<i>DHCR7</i>	16%
Down	Trisomía Cr. 21	2-9%
Bardet-Biedl	<i>BBS1, BBS2, BBS4, BBS6-8</i>	2%
MEN2A (carcinoma medular de tiroides, feocromocitoma e hiperparatiroidismo)	<i>RET</i>	< 1%
Hipoplasia cartilago-cabello	<i>RMRP</i>	SD
Hidrocefalia asociada a Cr. X	<i>LICAM</i>	SD
Kauffman-McKusick	<i>BBS6</i>	SD

SD: sin determinar (Modificado de Kapur RP. Practical pathology and genetics of Hirschsprung's disease. Seminars in Pediatric Surgery. 2009; 18: 212-23).

SÍNDROMES ASOCIADOS A LA ENFERMEDAD DE HIRSCHSPRUNG

Véase tabla V.

ENFERMEDAD DE HIRSCHSPRUNG FAMILIAR

La enfermedad de Hirschsprung se considera familiar cuando está presente en más de un miembro de la misma familia. Aproximadamente un 3-8% de los casos son familiares, pero es un dato muy variable según el autor (Vargas E. Enfermedad de Hirschsprung. Guía de práctica clínica, 2009).

Los datos más fiables de los que se dispone actualmente estiman la frecuencia de la enfermedad en los familiares del sujeto índice según la longitud de su segmento aganglionar (Tabla VI).

CONCLUSIONES

- La presencia de polimorfismos (SNPs) en la secuencia del protooncogén *RET* es frecuente en enfermos de Hirschsprung.
- La combinación de diferentes alelos de polimorfismos encontrados en el gen *RET* de pacientes con Hirschsprung sugiere asociación con la enfermedad. Nuestros datos indican que la combinación de los genotipos GG (exón 11), GG (exón 13) y CC (exón 15) podrían modular la enfermedad.

Tabla VI Frecuencia estimada en familiares de enfermos de Hirschsprung según la longitud de su segmento aganglionar

	Familiar	Tipo de HSCR					
		Colon rectosigmoideo		Colon descendente		Segmentos largo y aganglionosis total	
		Varón	Mujer	Varón	Mujer	Varón	Mujer
Varón afecto	Hermano/a	4-5%	1%	9-10%	7%	9-12%	7-9%
	Hijo/a	0-1%	< 1%	10-11%	8-9%	16-19%	12-14%
Mujer afecta	Hermano/a	5-6%	1-2%	12-13%	10%	21-24%	17-19%
	Hijo/a	0-1%	< 1%	14-15%	11%	27-29%	21-22%

Modificado de Badner et al. *Am J Hum Genet.* 1990; 46: 569-80.

- c. Estudios exhaustivos de mutaciones y polimorfismos en el protooncogén *RET* y en otros genes implicados en el desarrollo del sistema nervioso entérico, podrían ser la clave para entender la causa genética de la enfermedad.
- d. No es necesario hacer estudio genético a todos los niños afectados de la enfermedad de Hirschsprung, si bien es cierto que en aquellos casos con segmento largo o aganglionosis total es aconsejable. Con el estudio genético del gen *RET* en estos casos, se puede comprobar si hay alteraciones asociadas a la enfermedad de Hirschsprung o a otras neurocristopatías. Por lo tanto, es recomendable enviar muestras de sangre del caso índice (enfermo) y sus familiares a los centros hospitalarios especializados en este tipo de estudios.

Agradecimientos

Este estudio ha sido financiado por el Departamento de Sanidad y Consumo del Gobierno Vasco (Proyecto GV2009111054). Agradecer al Dr. José Ramón Bilbao su ayuda con el análisis estadístico de los datos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Amiel J, Sproat-Emison E, García-Barceló M, Lantieri F, Burzynski G, Borrego S, et al. Hirschsprung disease, associated syndromes and genetics: a review. *J Med Genet.* 2008; 45: 1-14.
2. Iwashita T, Kruger GM, Pardal R, Kiel MJ, Morrison SJ. Hirschsprung disease is linked to defects in neural crest stem cell function. *Science.* 2003; 301: 972-6.
3. Tam PK, Barceló M. Molecular genetics of Hirschsprung disease. *Semin Pediatr Surg.* 2004; 13(4): 236-48.
4. Pasini B, Borrello MG, Greco A, Bongarzone I, Luo Y, Mondellini P, et al. Loss of function effect of *RET* mutations causing Hirschsprung disease. *Nat Genet.* 1995; 10: 35-40.
5. Angrist M, Bolk S, Thiel B, Puffenberger EG, Hofstra RM, et al. Mutation analysis of the *RET* receptor tyrosine kinase in Hirschsprung's disease. *Hum Mol Genet.* 1995; 4: 821-30.
6. Carrasquillo MM, McCallion AS, Puffenberger EG, Kashuk CS, Nouri N, Chakravarti A. Genome-wide association study and Mouse identify interaction between *RET* and *EDNRB* pathways in Hirschsprung's disease. *Nat Genet.* 2002; 32: 237-44.
7. Borrego S, Ruiz A, Sáez ME, Gimm O, Gao X, López-Alonso M, et al. *RET* genotypes comprising specific haplotypes of polymorphic variants predispose to isolated Hirschsprung's disease. *J Med Genet.* 2000; 37: 572-8.
8. Griseri P, Sancandi M, Patrone G, Bocciardi R, Hofstra R, et al. A single-nucleotide polymorphic variant of the *RET* protooncogene is underrepresented in sporadic Hirschsprung's disease. *Eur J Hum Genet.* 2000; 8: 721-4.
9. Borrego S, Sáez E, Ruiz A, Gimm O, López-Alonso M, et al. Specific polymorphisms in *RET* proto-oncogene are over-represented in patients with Hirschsprung disease and may represent loci modifying phenotypic expression. *J Med Genet.* 1999; 36: 771-4.
10. Elisei R, Cosci B, Romei C, Bottici V, Sculli M, et al. *RET* Exon 11 (G691S) polymorphism is significantly more frequent in sporadic medullary thyroid carcinoma than in the general population. *J Clin Endocr & Metab.* 2004; 89 (7): 3579-84.
11. Robledo M, Gil L, Pollán M, Cebrián A, Ruíz S, et al. Polymorphisms G691S/S904S of *RET* as genetic modifiers of MEN 2A. *Cancer Research.* 2003; 63: 1814-7.
12. Sribudiani Y, Metzger M, Osinga J, Rey A, Burns A, Thapar N, Hofstra MW. Variants in *RET* associated with Hirschsprung's disease affect binding of transcription factors and gene expression. *Gastroenterology.* 2011; 140: 572-82.