

Características genéticas, poblacionales y fenotípicas de pacientes con enfermedad de Hirschsprung

E. Ruiz Aja¹, L. Vega Hernández², N. Martínez Ezquerro³, E. De Diego García⁴, A. Pérez Marrodan⁵, P. López Álvarez-Buhilla¹

¹Servicio de Cirugía Infantil, ²Unidad de Investigación, ³Servicio de de Pediatría. Hospital Universitario de Cruces. Barakaldo, Vizcaya. ⁴Servicio de Cirugía Infantil. Hospital Marqués de Valdecilla. Santander. ⁵Servicio de Pediatría. Hospital San Pedro.

RESUMEN

La enfermedad de Hirschsprung (HSCR) está causada por la ausencia de células ganglionares en el intestino, debido a defectos en la migración de las células del sistema nervioso entérico durante el desarrollo embrionario. La incidencia es aproximadamente de uno en cada 5000 nacimientos, más frecuente en hombres que en mujeres. Hay dos fenotipos según la longitud del segmento aganglionar: corto (S-HSCR, 80% de los enfermos) y largo (L-HSCR, el 20%). Se han detectado variaciones en la secuencia codificante del proto-oncogén *RET* en enfermos con HSCR, lo que sugiere predisposición genética a padecer la enfermedad.

Nuestro trabajo ha consistido en encontrar y analizar polimorfismos (SNPs) asociados a la enfermedad, así como su distribución poblacional (sexo y tipo de segmento). En el estudio genético se han analizado dos polimorfismos presentes en el promotor del gen, así como un polimorfismo en el exón 13 fuertemente asociado con la enfermedad. Como poblaciones en este estudio se establecieron una de enfermos con HSCR esporádico y un grupo de individuos sanos.

Los resultados obtenidos corroboran que la enfermedad es más frecuente en hombres que en mujeres. El genotipado de *RET* indica que los alelos A y G del promotor (c.-200A>G y c.-196C>A) y G del exón 13 (c.2307T>G) están asociados a la población enferma. Los datos apuntan a que no existe relación entre el fenotipo de la enfermedad y la distribución de los polimorfismos analizados. Concluimos que la presencia de ciertos polimorfismos en la secuencia de *RET* indica predisposición genética (combinada con otros factores genéticos o ambientales) a padecer la enfermedad.

PALABRAS CLAVE: Enfermedad de Hirschsprung; Intestino agangliónico; polimorfismo; Discriminación alélica; Secuenciación.

GENETIC, POPULATION AND PHENOTYPIC CHARACTERISTICS OF PATIENTS WITH HIRSCHSPRUNG DISEASE

ABSTRACT

Hirschsprung disease (HSCR) is caused by the absence of ganglion cells in the intestine due to defects in the migration of enteric nervous system cells during embryologic development. The incidence is one in every 5000 births, more common in men than women. There are two main phenotypes according to the aganglionic segment length: Short (S-HSCR, (80% of patients) and Long (L-HSCR, 20%). Variations have been detected in the coding sequence of the *RET* proto-oncogene in patients with HSCR, suggesting a genetic predisposition to the disease. Our aim is to find and analyze polymorphisms (SNPs) associated with the disease. We are interested also in establish an association between sex and type of aganglionic segment. We analyzed the *RET* promoter as well a polymorphism in exon 13 strongly associated to the disease. The populations for the study were a group of 56 patients with sporadic HSCR and 178 healthy controls.

The results obtained show that the disease is more common in men than in women (3:1). The *RET* genotype shows that alleles A and G of the promoter (c.-200A>G and c.-196C>A) and G of exon 13 (c.2307T>G) are associated with the affected population. Our data suggest neither association between the disease phenotype and the distribution of the polymorphisms analyzed nor with the sex of the patients. The presence of certain polymorphisms in the *RET* sequence indicates a genetic predisposition (combined with other genetic or environmental factors) to the disease.

KEY WORDS: Hirschsprung disease; Aganglionic bowel; Polymorphism; Allelic discrimination; 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 mientérico y submucoso (Auerbach y Meissner, respectivamente) del intestino distal. 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.

Correspondencia: Dr. E. Ruiz Aja. Secretaría de Cirugía Pediátrica. Edificio Principal, 5º planta. Hospital de Cruces. Plza. Cruces s/n. 48903 Barakaldo, Bizkaia.

E-mail: eduardo.ruizaja@osakidetza.net

Trabajo presentado como Comunicación oral en el 51 Congreso de la Sociedad Española de Cirugía Pediátrica (Córdoba, 16-19 Mayo 2012)

Recibido: Mayo 2012

Aceptado: Enero 2013

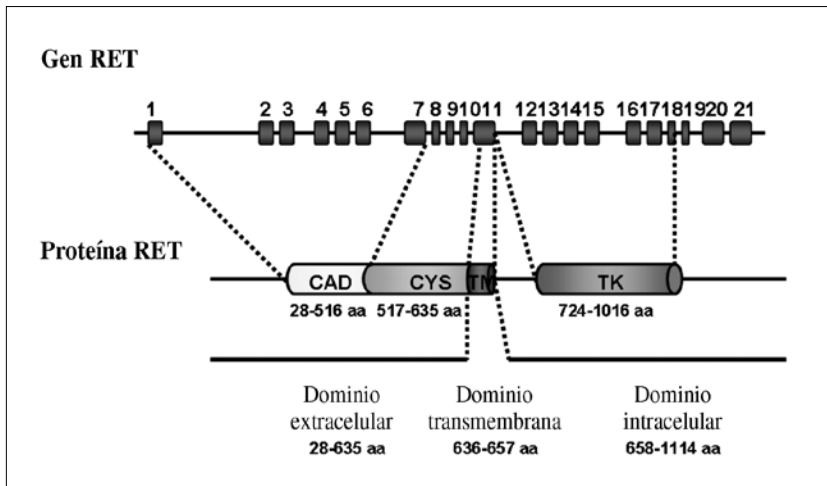


Figura 1. Esquema del gen y el receptor RET. Los exones del gen están indicados con números y rectángulos; las líneas de puntos indican los dominios de la proteína que codifican, indicados con cilindros. La parte extracelular de RET contiene el dominio cadherina (CAD) y una región conservada rica en cisteínas (CYS). TM corresponde al dominio transmembrana y la parte intracelular comprende dos dominios tirosina quinasa (TK) (*Adaptación de Tam et al., 2004; 13: 236-248*).

El fenotipo de la enfermedad se divide en función de la zona aganglionar afectada a partir del recto: 1. de segmento corto (*Short, S-HSCR*) afecta hasta el colon sigmoideo (75-80% de los casos), 2. largo (*Large, L-HSCR*) incluye parte del intestino grueso (15-20% de los casos) y 3. total (AGT) si todo el intestino grueso (y a veces parte del delgado) carece de células nerviosas (3-8% de los casos)⁽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 los casos de HSCR tienen un componente genético. Aproximadamente el 10% de los pacientes presentan historia familiar positiva (especialmente pacientes con segmentos largos). El riesgo de malformación está determinado por variaciones en la secuencia de varios genes, diez de los cuales han sido descritos^(1,3). De estos genes, el oncogén *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)⁽⁴⁾. 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⁽⁵⁾.

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⁽⁶⁾. 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⁽⁷⁻⁹⁾. 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. Nuestro trabajo ha consistido en asociación de polimorfismos ya descritos a la enfermedad de Hirschsprung, tanto en el promotor del gen como en la secuencia codificante, para establecer datos relativos a nuestra población. Además, intentamos establecer una relación entre la patología y otras características fenotípicas como el género y el tipo de HSCR.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en un grupo de 56 pacientes con HSCR, que fueron diagnosticados y tratados en el Servicio de Cirugía Infantil del Hospital Universitario de Cruces (Barakaldo) y Hospital Marqués de Valdecilla (Santander). 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 el promotor del proto-oncogén *RET*. La secuencia de los oligonucleótidos utilizados para secuenciar el promotor de *RET* está descrita en la Tabla I. El volumen total de la reacción 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*[®]).

Tabla I. Amplificación del promotor del proto-oncogén *RET*. Condiciones de amplificación, secuencia de los oligonucleótidos cebadores empleados y longitud del producto amplificado. La secuencia lleva fusionada la secuencia de los *primers* universales del fago M13. F (*Forward*), R (*Reverse*).

	Condiciones de amplificación	Observaciones
Promotor	10' 94°C, 35x(1' 94°C, 1' 60°C, 1'30" 72°C) 7' 72°C, ∞ 4°C	10% DMSO
	Secuencia	Amplificación
	F: TGTAACGACGGCCAGCCCGACTGAGCTCCTAC R: CAGGAAACAGCTATGACCGGACGTCGCCTTCGCCAT	392 nt

Secuenciación

La secuenciación del DNA amplificado, tanto de enfermos como casos controles, en la reacción de PCR lo llevó a cabo el Servicio de Secuenciación de la Unidad de Investigación del Hospital Universitario 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 si la presencia de los polimorfismos está asociada a las poblaciones a estudio se utilizaron sondas *TaqMan*® (*Applied Biosystems*®) específicas (exón 13: rs1800861). 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. El estudio de la secuencia del promotor (análisis de enfermos y controles sanos) se analizó mediante secuenciación directa al no existir sondas *TaqMan*® específicas para estos polimorfismos.

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

1. Análisis genotípico: asociación de alelos de distintos polimorfismos a la enfermedad

En este trabajo hemos analizado varios polimorfismos del proto-oncogén *RET* descritos como asociados a la enfermedad de Hirschsprung. Después de secuenciar y analizar previamente de forma directa los exones 10, 11, 13, 14, 15 y 16 de este gen⁽³⁾, observamos gran variabilidad en tres SNPs: p.Gly691Ser (c.2071G>A) en el exón 11, p.Leu769Leu

Tabla II. Análisis del polimorfismo p.Leu769Leu (c.2307T>G) del exón 13 mediante sondas *TaqMan*. 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 *Odds Ratio* (O.R.) con un índice de confianza (I.C.) del 95%.

Genotipo	Exón 13: p.Leu769Leu				p-valor	O.R. (95%)
	HSCT		Sanos			
GG	12	21,43	5	2,81	2,80x10 ⁻⁶	9,44 (2,88-32,66)
TT	20	35,71	117	65,73	6,99x10 ⁻⁵	0,29 (0,15-0,57)
GT	24	42,86	56	31,46	0,12	0,63 (0,84-3,17)
Total	56	100	178	100		

(c.2307T>G) en el exón 13 y p.Ser904Ser (c.2712C>G) en el exón 15. Los SNPs de los exones 11 y 15 cosegregan, y sus alelos G y C respectivamente están asociados a nuestra población de estudio. Asimismo, el alelo polimórfico G de p.Leu769Leu se ha descrito como fuertemente asociado a la enfermedad de Hirschsprung⁽¹⁰⁾. Nuestros datos indican que también en nuestra población el genotipo GG está asociado a la enfermedad. Es interesante destacar que este genotipo es 8,87 veces más frecuente en los individuos sanos, con un riesgo de padecer la enfermedad de 2,59 a 31,88 veces (Tabla II).

En el año 2003, el grupo de la Dra. Ceccherini en Génova publicó la importancia de la región promotora del gen, al encontrarse dos polimorfismos fuertemente asociados a la enfermedad de Hirschsprung, uno a 5 nucleótidos y otro a un nucleótido del inicio de la transcripción del gen (c.-200A>G, rs10900296 y c.-196C>A, rs10900297). Por este motivo, y dada la importancia de encontrar variaciones en la secuencia reguladora de la expresión del gen, analizamos mediante secuenciación directa el promotor de nuestras poblaciones de estudios. El resultado se muestra en la Tabla III.

El resultado indica que los alelos A y C del promotor (c.-200A>G y c.-196C>A, respectivamente) están asociados a la enfermedad. El genotipo AA en el polimorfismo-5 no solo es más frecuente en la población enferma (55,36% frente al 3,37%

Tabla III. Análisis de los polimorfismos presentes en el promotor del proto-oncogén *RET* mediante secuenciación directa. De cada polimorfismo analizado se muestran los diferentes genotipos en la población enferma y controles sanos. 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 Odds Ratio (O.R.) con un índice de confianza (I.C.) del 95%.

Promotor (-5): c.-200A>G						
		HSCT		Sanos		
Genotipo	n	%	n	%	p-valor	O.R. (I.C. 95%)
GG	12	21,43	106	59,55	6,00x10 ⁻⁷	0,19 (0,09-0,39)
TT	31	55,36	6	3,37	0	35,55 (12,50-106,47)
GT	13	23,21	66	37,08	5,56x10 ⁻²	0,51 (0,24-1,07)
Total	56	100	178	100		

Promotor (-1): c.-196C>A						
		HSCT		Sanos		
Genotipo	n	%	n	%	p-valor	O.R. (95%)
GG	40	71,43	66	37,08	6,50x10 ⁻⁶	4,24 (2,11-8,62)
TT	3	5,36	25	14,04	8,06x10 ⁻²	0,35 (0,08-1,27)
GT	13	23,21	87	48,88	7,10x10 ⁻⁴	0,32 (0,15-0,66)
Total	56	100	178	100		

en sanos), sino que está fuertemente asociado a la enfermedad (p-valor=0, O.R.=35,55). Estos datos indican que los individuos con genotipo AA en el SNP (-5) tienen una predisposición de padecer la enfermedad de 12,50 a 106,47 veces más que individuos con otro genotipo en ese punto. De forma similar, aunque no tan llamativa, es la asociación del genotipo CC en el SNP (-1) a la población HSCR (71,43% de los individuos analizados, p-valor < 10⁻⁵, O.R.=4,24). Nuestros datos indican y confirman, por lo tanto, que en la secuencia promotora existen polimorfismos fuertemente asociados a la enfermedad, que podrían estar implicados en la modulación de la misma.

2. Análisis fenotípico: distribución de la enfermedad según el género y tipo de segmento aganglionar

De los 56 casos estudiados, 14 se corresponden con pacientes de género femenino mientras que los otros 42 son varones. Estos datos establecen una relación hombres:mujeres de 3:1. Se ha descrito como dato general que la proporción es 4:1, con una incidencia en varones superior a la que hemos encontrado en nuestros casos. Esto puede depender del tamaño muestral, por lo que continuaremos actualizando este dato a medida que incrementemos el grupo de estudio.

Se ha descrito que las mutaciones en el proto-oncogén *RET* son más frecuentes en casos con aganglionosis total, por lo que quisimos comprobar si en nuestro grupo de estudio los polimorfismos analizados están asociados al fenotipo de la enfermedad. Además, analizamos la frecuencia de cada tipo

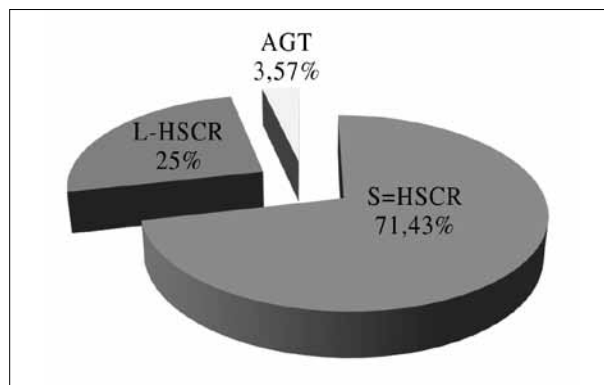


Figura 2. Distribución de los tipos de segmento aganglónico en nuestra población. Esquema que recoge la proporción de cada fenotipo de la enfermedad de Hirschsprung en el grupo de pacientes que se estudia en este trabajo.

respecto al género del paciente para intentar establecer alguna relación. En la figura 2 se representa de forma general la distribución poblacional de cada tipo de segmento. En la tabla IV A, por su parte, se muestra el resultado de la relación tipo de segmento con cada uno de los SNPs analizados. Como se puede comprobar en los datos del p-valor, no hay asociación entre los alelos de cada polimorfismo y el tipo de segmento. Además, tampoco hay diferencias significativas respecto al género del paciente (Tabla IV B). Por lo tanto, el tipo de segmento aganglionar en los enfermos con Hirschsprung es independiente del genotipo estudiado.

DISCUSIÓN

La enfermedad de Hirschsprung es un desorden congénito. El defecto se causa durante las semanas 5-12 del desarrollo embrionario, cuando las células derivadas de la cresta neural migran y colonizan el tubo neural, pero todavía no está claro su causa molecular. Se sabe que existe un alto componente genético responsable de este fallo, especialmente en los casos con reincidencia familiar (mutaciones asociadas en el 50% de estos casos y 7-35% en HSCR esporádico), pero es difícil tanto para la familia como para los propios clínicos e investigadores entender y ofrecer una explicación sencilla del origen de la patología. Los polimorfismos representan variaciones en la secuencia del genoma, presentes en al menos el 1% la población general, que pueden tener o no efecto fenotípico. Se sospecha que la presencia de polimorfismos en el proto-oncogén *RET* puede modular la enfermedad, ya que se han descritos alelos asociados a los enfermos.

Continuando con nuestro proyecto en el estudio genético de la enfermedad, en este trabajo hemos estudiado un polimorfismo presente en la secuencia codificante del gen presente en el exón 13, así como dos nuevos presentes en el promotor.

Nuestros datos indican que el alelo G del polimorfismo p.Leu769Leu (c.2307G>T) está más representado en los en-

Tabla IV. Estudio fenotípico de la población de enfermos estudiada.

A) Para cada polimorfismo estudiado en el presente trabajo se calculó la asociación de los fenotipos principales (S-HSCR y L-HSCR+AGT) mediante el cálculo del p-valor para cada genotipo.

Promotor (-5): c.-200A>G

Genotipo	S-HSCR	L-HSCR	p-valor
GG	8	4	0,6804
TT	21	10	0,4965
GT	11	2	0,2297
Total	40	16	

Promotor (-1): c.-196C>A

Genotipo	S-HSCR	L-HSCR	p-valor
GG	29	11	0,7790
TT	3	0	0,2916
GT	8	5	0,3677
Total	40	16	

Exón 13: p.Leu769Leu

Genotipo	S-HSCR	L-HSCR	p-valor
GG	13	7	0,4273
TT	8	4	0,6804
GT	19	5	0,2669
Total	40	16	

B) Relación entre género y tipo de segmento agangliónico de los pacientes pertenecientes al estudio. En todos los casos, los valores p (>0,05) indican ausencia de asociación entre las variables.

Género

Tipo HSCR	Mujeres	Hombres	p-valor
S-HSCR	11	29	0,4945
L-HSCR	3	11	0,7215
AGT	0	2	0,4057
Total	14	42	

fermos HSCR, especialmente cuando está en homocigosis⁽³⁾. El análisis del promotor ha puesto de manifiesto la enorme importancia de esta secuencia no codificante, en la que se esconden variantes asociadas significativamente a los enfermos. Estos nuevos polimorfismos podrían afectar a la transcripción, *splicing* o función de *RET*.

Nuestro trabajo sugiere 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. El estudio de la combinación de los alelos en los distintos SNPs del proto-oncogén *RET* nos puede dar la clave para entender la causa genética de la enfermedad. Para

los polimorfismos estudiados en este trabajo, sin embargo, podemos concluir que el genotipo es independiente del fenotipo.

La enfermedad de Hirschsprung se encuadra dentro de las llamadas “enfermedades multifactoriales”, en las que el componente genético está claro (en este caso el proto-oncogén *RET*), pero existen otros factores ambientales y/o genéticos que modulan la enfermedad y pueden hacer que en dos personas con la misma secuencia del gen una padezca la enfermedad y la otra no. Es aquí donde reside la importancia de su estudio, para poder adquirir mayor y mejor conocimiento que permita, en el futuro, explicar la razón de esta y otras patologías para optimizar su tratamiento y mejorar la calidad de vida del paciente.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio ha sido financiado por el Departamento de Sanidad y Consumo del Gobierno Vasco (Proyecto GV2009111054).

BIBLIOGRAFÍA

- Amiel J, Sproat-Emison E, Garcia-Barcelo M, Lantieri F, Burzynski G, Borrego S, et al. Hirschsprung disease, associated syndromes and genetics: a review. *J Med Genet.* 2008; 45: 1-14.
- Iwashita T, Kruger GM, Pardo R, Kiel MJ, Morrison SJ. Hirschsprung disease is linked to defects in neural crest stem cell function. *Science.* 2003; 301: 972-6.
- Vega-Hernández L, Castaño-González L, Belar-Beitia O, Ruiz-Aja E, Martínez-Ezquerro N, López-Alvarez-Buhilla P. Estudios de polimorfismos asociados a la enfermedad de Hirschsprung. *Cir Pediatr.* 2011; 24: 131-6.
- Tam PK and Barceló M. Molecular genetics of Hirschsprung disease. *Semin Pediatr Surg.* 2004; 13: 236-48.
- 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.
- Angrist M, Bolk S, Thiel B, Puffenberger EG, Hofstra RM, Buys CH, et al. Mutation analysis of the RET receptor tyrosine kinase in Hirschsprung's disease. *Hum Mol Genet.* 1995; 4: 821-30.
- 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.
- Borrego S, Ruiz A, Saez ME, Gimm O, Gao X, Lopez-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.
- Griseri P, Sancandi M, Patrone G, Boccardi R, Hofstra R, Ravazzolo 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.
- Borrego S, Saez E, Ruiz A, Gimm O, Lopez-Alonso M, Antiñolo G, 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.