

**ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA  
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**ESTUDIO DE POLIMORFISMOS DE NUCLEÓTIDO SIMPLE  
EN EL GEN RET COMO INDICADORES DE RIESGO PARA  
EL DESARROLLO DE LA ENFERMEDAD DE  
HIRSCHSPRUNG EN NIÑOS ATENDIDOS EN EL  
HOSPITAL PEDIÁTRICO BACA ORTIZ DE LA CIUDAD DE  
QUITO, MEDIANTE PCR-RFLP**

**Previa a la obtención de Grado Académico o Título de:**

**INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA**

**ELABORADO POR:**

**MARÍA JOSÉ GUEVARA LEMA**

**SANGOLQUÍ, 17 Mayo del 2013**

# **HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS**

**ELABORADO POR**

---

María José Guevara Lema

**DIRECTORA DE LA CARRERA INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

---

Ing. Tatiana Páez, M.Sc.

Sangolquí, 17 de Mayo del 2013

## CERTIFICACIÓN

Dr. Marcelo Grijalva

Ing. Paola Párraga

Certifican:

Que el trabajo titulado ESTUDIO DE POLIMORFISMOS DE NUCLEÓTIDO SIMPLE EN EL GEN RET COMO INDICADORES DE RIESGO PARA EL DESARROLLO DE LA ENFERMEDAD DE HIRSCHSPRUNG EN NIÑOS ATENDIDOS EN EL HOSPITAL PEDIÁTRICO BACA ORTIZ DE LA CIUDAD DE QUITO, MEDIANTE PCR-RFLP, realizado por María José Guevara Lema, ha sido guiado y revisado periódicamente y cumple normas estatutarias establecidas por la ESPE, en el Reglamento de Estudiantes de la Escuela Politécnica del Ejército.

Debido a que la tesis fue financiada, realizada y publicada por el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UDLA NO se recomienda su publicación.

El mencionado trabajo consta de un documento empastado y un disco compacto el cual contiene los archivos en formato portátil de Acrobat(pdf). Autorizan a María José Guevara Lema que lo entregue a Ing. Tatiana Páez, M.Sc, en su calidad de Coordinador de la Carrera.

Sangolquí, 17 de mayo del 2013

---

**Dr. Marcelo Grijalva**  
DIRECTOR

---

**Ing. Paola Párraga**  
CODIRECTOR

# DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

María José Guevara Lema

Declaro que:

El proyecto de grado denominado ESTUDIO DE POLIMORFISMOS DE NUCLEÓTIDO SIMPLE EN EL GEN RET COMO INDICADORES DE RIESGO PARA EL DESARROLLO DE LA ENFERMEDAD DE HIRSCHSPRUNG EN NIÑOS ATENDIDOS EN EL HOSPITAL PEDIÁTRICO BACA ORTIZ DE LA CIUDAD DE QUITO, MEDIANTE PCR-RFLP, ha sido desarrollado con base a una investigación exhaustiva, respetando derechos intelectuales de terceros, conforme las citas que constan al pie de las páginas correspondientes, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente este trabajo es de mí autoría.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance científico del proyecto de grado en mención.

Sangolquí, 17 de mayo del 2013

---

**María José Guevara Lema**

# AUTORIZACIÓN

Yo, María José Guevara Lema

Autorizo a la Escuela Politécnica del Ejército la publicación, en la biblioteca virtual de la Institución, del trabajo ESTUDIO DE POLIMORFISMOS DE NUCLEÓTIDO SIMPLE EN EL GEN RET COMO INDICADORES DE RIESGO PARA EL DESARROLLO DE LA ENFERMEDAD DE HIRSCHSPRUNG EN NIÑOS ATENDIDOS EN EL HOSPITAL PEDIÁTRICO BACA ORTIZ DE LA CIUDAD DE QUITO, MEDIANTE PCR-RFLP, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Sangolquí, 17 de mayo del 2013

---

María José Guevara Lema

## DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado primeramente a Dios que con su infinito amor, es mi padre, fortaleza y guía.

Dedico este logro a mis padres. A Arturito Guevara por ser un ejemplo en mi vida y aunque fue corto el tiempo compartido, me enseñaste a soñar, a sonreír y a superarme. A Lupita Lema por todo tu apoyo incondicional y sacrificio, eres un ejemplo de amor y lucha.

A mis hermanas Geovy y Mishell que quiero tanto. A mi abuelita Rosita por su bondad infinita. A mi sobrino Felipe, que alegra mi vida. A toda la familia tíos, primas y cuñado por su ayuda.

A mis amigos Pablo, Sari, Mau, José Luis, Davo, Roberto, Jaque y Pao. Finalmente a Andrés por ser una bendición en mi vida.

Quien los ama.

**María José Guevara**

## **AGRADECIMIENTO**

En primer lugar me gustaría agradecer a Dios, pues Él es quien da a todos la vida, el aliento y todas las cosas.

Al Director de tesis Dr. Marcelo Grijalva, y a la Ing. Paola Párraga, Codirectora, por su colaboración y apoyo a este proyecto de investigación.

Al Área de Patología del Hospital Baca Ortiz por haber colaborado con las muestras, en especial a la Dra. Dolores Franco.

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de las Américas y a su Director, el Dr. César Paz-y- Miño, por haberme dado la oportunidad de adquirir experiencia profesional valiosa. Y a mis amigos del Instituto Gaby, Nadia, Santy, Majo, Lucho, Andrés, Berni, Mariu y Doyle por compartir sus conocimientos conmigo. Y a Carlita por tu ayuda constante y endulzar esta etapa con tu amistad.

A mi familia, mi mami Lupita, mis hermanas Mishell y Geovy, mi cuñado Cesar; gracias por el apoyo constante y por su amor incondicional.

A mis amigos durante los años de universidad Carlita, Cherto, Pato y Pepita; les agradezco por los hermosos momentos compartidos. A mis amigos Pablo, Sari, Davo, Roberto, José Luis, Mau, Jonathan, Pao y Jaque. A Andrés gracias por todo tu cariño, apoyo e infundirme fuerzas en todo momento Gatito.

Que Dios los bendiga  
**María José Guevara**

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS.....	ii
CERTIFICACIÓN .....	iii
DEDICATORIA.....	vi
AGRADECIMIENTO.....	vii
LISTADO DE TABLAS .....	xiii
LISTADO DE FIGURAS .....	xv
RESUMEN .....	xviii
ABSTRACT .....	xix
NOMENCLATURA UTILIZADA .....	xx
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 - Formulación del problema.....	1
1.2 - Justificación del problema: .....	2
1.3 - Objetivos .....	4
1.3.1 Objetivo general .....	4
1.3.2 Objetivos específicos .....	4
1.4 - Marco Teórico .....	5
1.4.1 Sistema Nervioso Entérico (SNE) .....	5
1.4.1.1 Organización, función y características del SNE .....	5



1.4.1.2 Origen y desarrollo del SNE .....	7
1.4.2 Enfermedad de Hirschsprung.....	10
1.4.2.1 Aspectos generales de la enfermedad de Hirschsprung .....	10
1.4.2.2 Epidemiología de la enfermedad de Hirschsprung .....	15
1.4.2.3 Etiología de la enfermedad de Hirschsprung.....	17
1.4.2.4 Genética molecular de la enfermedad de Hirschsprung.....	20
1.4.3 Técnicas moleculares .....	33
1.4.3.1 Extracción y cuantificación de ADN.....	33
1.4.3.2 PCR RFLP .....	34
1.4.3.3 Secuenciación.....	37
1.4.4 Análisis de datos .....	40
1.4.4.1 Frecuencias alélicas y genotípicas.....	40
1.4.4.2 Equilibrio de Hardy Weinberg (HWE) .....	41
1.4.4.3 Análisis de asociación de un polimorfismo con la enfermedad.....	41
1.5 - Sistema de hipótesis: .....	41
<b>CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>42</b>
2.1 - Participantes .....	42
2.2 - Zona de Estudio.....	42
2.3 - Periodo de tiempo de investigación.....	42
2.4 - Diseño.....	43

2.5 - Procedimientos .....	43
2.5.1 Obtención de muestras .....	43
2.5.2 Extracción y purificación de ADN .....	44
2.5.3 Análisis cualitativo y cuantitativo de ADN extraído .....	45
2.5.4 Determinación del genotipo.....	45
2.5.4.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	45
2.5.4.2 Digestión para análisis de los fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP).....	52
2.5.5 Secuenciación.....	57
2.5.5.1 Purificación del Producto de PCR, AMPure XP .....	58
2.5.5.2 Cuantificación por electroforesis .....	59
2.5.5.3 Reacción de Secuenciación .....	59
2.5.5.4 Purificación de la Reacción de Secuenciación, CleanSEQ .....	61
2.5.5.5 Electroforesis capilar y análisis .....	62
2.5.5.6 Polimorfismo IVS1+1813C>T.....	63
2.6 - Análisis de Datos .....	64
CAPÍTULO 3: RESULTADOS .....	65
3.1 - Edad .....	65
3.2 - Sexo.....	66
3.3 - Extracción de ADN.....	67

3.4 - Determinación de genotipo .....	69
3.4.1 Reacción en cadena de polimerasa (PCR) .....	69
3.4.1.1 Amplificación del exón 2, c135G>A.....	69
3.4.1.2 Amplificación del exón 7, c1296G>A.....	70
3.4.1.3 Amplificación del exón 15, c2712C>G.....	71
3.4.1.4 Amplificación de la región intrónica, IVS1+1813 C>T.....	72
3.4.2 Digestión con enzimas de restricción .....	73
3.4.2.1 Polimorfismo c135G>A .....	73
3.4.2.2 Polimorfismo c1296G>A .....	74
3.4.2.3 Polimorfismo c2712C>G .....	75
3.4.3 Secuenciación.....	76
3.4.3.1 Polimorfismo IVS1+1813 C>T.....	76
3.4.4 Frecuencia de alelos y análisis de Hardy-Weinberg.....	77
3.4.4.1 Polimorfismo c135G>A .....	77
3.4.4.2 Polimorfismo c1296G>A .....	78
3.4.4.3 Polimorfismo c2712C>G .....	79
3.4.4.4 Polimorfismo IVS1+1813 C>T.....	80
3.5 - Análisis estadístico.....	81
3.5.1 Pruebas de chi-cuadrado .....	81
3.5.2 Pruebas de Odds ratio .....	83

CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN.....	86
CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES.....	96
CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES.....	99
CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA.....	101

## LISTADO DE TABLAS

Tabla 1.1: Frecuencias de los tipos diferentes de HSCR.....	12
Tabla 2.1: Secuencia de los cebadores utilizados para la amplificación de las regiones de interés del gen RET.....	46
Tabla 2.2: Concentraciones y volúmenes de reactivos utilizados para la PCR del exón 2.....	47
Tabla 2.3: Programa de amplificación del exón 2 del gen RET.....	48
Tabla 2.4: Concentraciones y volúmenes de reactivos utilizados para la PCR del exón 7.....	49
Tabla 2.5: Programa de amplificación del exón 7, gen RET.....	49
Tabla 2.6: Concentraciones y volúmenes de reactivos utilizados para la PCR del exón 15.....	50
Tabla 2.7: Programa de amplificación del exón 15 del gen RET.....	51
Tabla 2.8: Concentraciones y volúmenes de reactivos utilizados para la PCR del intrón 1.....	51
Tabla 2.9: Programa de amplificación del intrón 1, gen RET.....	52
Tabla 2.10: Concentraciones y volúmenes de reactivos utilizados para la PCR-RFLP del exón 2.....	53
Tabla 2.11: Concentraciones y volúmenes de reactivos utilizados para la PCR-RFLP del exón 7.....	55
Tabla 2.12. Concentraciones y volúmenes de reactivos utilizados para la PCR-RFLP del exón 15.....	56

Tabla 2.13: Concentraciones y volúmenes de reactivos utilizados para la reacción de secuenciación de la región intrónica.....	60
Tabla 2.14: Programa de condiciones térmicas del ciclo de secuenciación.....	60
Tabla 3.1: Análisis Hardy-Weinberg para el polimorfismo c135G>A.....	78
Tabla 3.2: Análisis Hardy-Weinberg para el polimorfismo c1296G>A.....	79
Tabla 3.3: Análisis Hardy-Weinberg para el polimorfismo c2712C>G.....	80
Tabla 3.4: Análisis Hardy-Weinberg para el polimorfismo IVS1+1813 C>T.....	81
Tabla 3.5: Análisis Chi cuadrado para los grupos estudiados y los genotipos observados de cada polimorfismo.....	83
Tabla 3.6: Análisis de Odds Ratio (OR) de los cuatro polimorfismos estudiados en el Gen RET .....	84

## LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1: Representación de las neuronas entéricas en los plexos mientérico y submucoso en el tracto intestinal.....	06
Figura 1.2: Colonización del intestino por precursores procedentes de tres regiones distintas de la cresta neural.....	08
Figura 1.3: Representación del intestino grueso (derecha). Diferencias entre individuo normal e individuo con HSCR en el que se observa megacolon.....	11
Figura 1.4: Representación esquemática de las rutas de señalización e interacción, que rigen en el desarrollo del SNE.....	21
Figura 1.5: Formación del complejo multimérico de activación de la proteína RET.....	23
Figura 1.6: Esquema del Cromosoma 10.....	25
Figura 1.7: Representación esquemática de la proteína RET codificada por el gen RET .....	26
Figura 1.8: Representación esquemática de los SNPs estudiados, en el Gen RET .....	32
Figura 1.9: Estructura de dideoxi nucleótido trifosfato (ddNTPs).....	38
Figura 1.10: Diagrama de ciclo de Secuenciación de Dye Terminator.....	39
Figura 1.11: Emisión espectral de los cuatro tintes BigDye.....	40
Figura 2.1: Datos de la selección del par de cebadores del software PRIMER 3PLUS, de la región IVS+1.....	47
Figura 2.2: Diagrama de la secuenciación automática utilizada.....	57

Figura 2.3: Procedimiento utilizado en la purificación del producto de PCR, mediante Ampure XP.....	58
Figura 2.4: Procedimiento utilizado en la purificación de la reacción de secuenciación, mediante CleanSEQ.....	61
Figura 3.1: Distribución etaria en pacientes con HSCR.....	66
Figura 3.2: Distribución de los casos controles y afectos, por género.....	66
Figura 3.3: Fotografía de un gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio de los resultados de la extracción de ADN genómico de muestras embebidas en parafina.....	67
Figura 3.4: Fotografía de un gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio de los resultados de la extracción de ADN genómico de muestras de sangre periférica.....	68
Figura 3.5: Fotografía de un gel de agarosa al 2 % teñido con bromuro de etidio de los resultados de la amplificación del exón 2.....	70
Figura 3.6: Fotografía de un gel de agarosa al 2 % teñido con bromuro de etidio de los resultados de la amplificación del exón 7.....	71
Figura 3.7: Fotografía de un gel de agarosa al 2 % teñido con bromuro de etidio de los resultados de la amplificación del exón 15.....	72
Figura 3.8: Fotografía de un gel de agarosa al 2 % teñido con bromuro de etidio de los resultados de la amplificación del intrón 1.....	73
Figura 3.9: Fotografía de un gel de agarosa al 4 % teñido con bromuro de etidio de los resultados de la digestión enzimática con <i>EagI</i> del producto de PCR del exón 2.....	74



Figura 3.10: Fotografía de un gel de agarosa al 4 % teñido con bromuro de etidio de los resultados de la digestión enzimática con *BsmI* del producto de PCR del exón 7.....75

Figura 3.11: Fotografía de un gel de agarosa al 4 % teñido con bromuro de etidio de los resultados de la digestión enzimática con *RsaI* del producto de PCR del exón 15.....76

Figura 3.12: Fotografía del resultado de secuenciación de la región intrónica del gen RET. Electroferogramas del Homocigoto CC, Heterocigoto CT y Homocigoto TT.....77

## RESUMEN

La enfermedad de Hirschsprung (HSCR) es un desorden congénito caracterizado por la ausencia de células ganglionares en una porción variable del tracto gastrointestinal, tiene una incidencia global de 1 por cada 5000 recién nacidos vivos. Está causada por defectos en la migración de las células del sistema nervioso entérico durante el desarrollo embrionario. La motilidad intestinal se ve comprometida en pacientes con HSCR, con el consiguiente riesgo de obstrucción intestinal. Actualmente, se sabe el proto-oncogén RET es el principal gen involucrado en la patogénesis de HSCR, entre ellas se han asociado mutaciones sinónimas e intrónicas.

El objetivo de este estudio fue analizar polimorfismos de nucleótido simple (SNP) en los exones 2, 7, 15 e intrón 1 del gen RET, en 41 pacientes diagnosticados con HSCR mediante las técnicas PCR-RFLP y secuenciación directa. Todas las muestras fueron proporcionadas por el Hospital Pediátrico Baca Ortiz de la ciudad de Quito. Los resultados obtenidos indican que el polimorfismo A45A (c135 G>A, exón 2) está asociados a los enfermos con HSCR, ya que existen diferencias significativas respecto a la población sana; además, presentó un valor considerable de Odds ratio. A pesar de que estadísticamente no hubieron diferencias significativas en el polimorfismo IVS1+1813 C>T, el valor de OR indica que el alelo T tienen 4.16 veces más riesgo de desarrollar HSCR. Mientras que los polimorfismos A432A (c1296G>A exón 7) y S904S (c2712C>G exón 15) juegan un papel protector en la patogénesis de HSCR, en la población quiteña. Los resultados confirman que estos polimorfismos de RET desempeñan un papel en la etiología de HSCR.

## ABSTRACT

Hirschsprung's disease (HSCR), a congenital disorder characterized by the absence of ganglion cells in a variable portion of the gastrointestinal tract, has an overall incidence of 1 per every 5000 live births. HSCR has been related to defects that occur during the cell migration of the enteric nervous system during the embryonic development. Intestinal motility is compromised in patients with HSCR, with possible consequent risk of bowel obstruction. Currently, it is known that the RET proto-oncogene is a major gene involved in the pathogenesis of HSCR, with them synonymous and intronic mutations have been associated.

The aim of this study was to analyze single nucleotide polymorphisms (SNPs) in exons: 2, 7, 15 and intron 1 of the RET gene in 41 patients diagnosed with HSCR using PCR-RFLP techniques and direct sequencing. All of the samples were kindly provided by the Baca Ortiz Children's Hospital of Quito. The obtained significant differences with respect to the healthy population indicates that the A45A polymorphism (C135 G> A, exon 2) is associated with HSCR patients. Moreover, it was provided with a considerable value Odds ratio. Although, it was not found no statistically significant differences in the polymorphism IVS1 +1813 C> T, the value of OR indicates that the T allele has 4.16 times higher risk of developing HSCR. While the A432A (c1296G> A exon 7) and S904S (c2712C> G exon 15) polymorphisms play a protective role in the pathogenesis of HSCR in the Quito's population. The results confirm that the RET polymorphisms play a role in the etiology of HSCR.

## NOMENCLATURA UTILIZADA

<b>A:</b>	Adenina
<b>ADN:</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>C:</b>	Citosina
<b>dNTP:</b>	Deoxinucleótido Trifosfato
<b>ddNTP:</b>	Dideoxi nucleótido Trifosfato
<b>G:</b>	Guanina
<b>HAEC:</b>	Hirschsprung asociado con enterocolitis
<b>HSCR:</b>	Enfermedad de Hirschsprung
<b>INEC:</b>	Instituto Nacional de Estadística y Censos
<b>IVS:</b>	Intervening sequence, abreviatura usada para las secuencias de intrones
<b>Kb:</b>	Kilo bases
<b>pb:</b>	Pares de bases
<b>PCR:</b>	Reacción en Cadena de la Polimerasa
<b>RFLP:</b>	Restricción de Fragmentos de Longitud Polimórfica
<b>SNC</b>	Sistema Nervioso Central
<b>SNE</b>	Sistema Nervioso Entérico
<b>T:</b>	Timina
<b>Ta:</b>	Temperatura de annealing o hibridación de los primers
<b>TBE:</b>	Tris borato EDTA

# CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

## 1.1 - Formulación del problema

La enfermedad de Hirschsprung es la neurocristopatía más común en los seres humanos e incide en 1 de cada 5000 recién nacidos vivos (Chakravarti, 2001; Swenson, 2002). Esta es en la actualidad la causa más frecuente de obstrucción neonatal del colon, siendo responsable de la misma en un 33% de los casos (Moore y Persaud, 2009). Entre su sintomatología está el estreñimiento o constipación crónica, siendo éste un problema de alta prevalencia mundial, que afecta aproximadamente el 8% de los niños (Masi, *et al.*, 2008). De todo el universo de pacientes portadores de constipación crónica, menos de un 10% de ellos se deben a causas identificables, tales como HSCR (Montedonico, 2009).

A pesar de que la enfermedad de Hirschsprung tiene una baja tasa de mortalidad, aproximadamente 3%, debido al diagnóstico temprano y la mejora de los tratamientos quirúrgicos (Pini, *et al.*, 2011), la enfermedad puede ser letal en la infancia si se complica con enterocolitis, presentándose antes del diagnóstico de la enfermedad o después del tratamiento quirúrgico definitivo, aumentando su mortalidad a un 30% (De Manueles, 2008; Weber, 2009). En Ecuador, el INEC (Instituto Nacional de Estadística y Censos) ha registrado un caso de mortalidad ocasionada por la enfermedad de HSCR (INEC, 2010). Sin embargo, por obstrucción intestinal, se halló mortalidad en recién nacidos en 3 casos, además se encontró mortalidad por enterocolitis necrotizante en 37 casos, (INEC, 2008).

En una publicación local realizada por el Hospital de Especialidades “Eugenio Espejo” se reportaron 34 casos de la enfermedad confirmados durante el período 1982 al 2008, con un índice de mortalidad del 3% (Rubio, Pazmiño, Álvarez, Vásquez y Gallardo, 2009)

El diagnóstico de la enfermedad de Hirschsprung, se realiza mediante técnicas radiológicas e histológicas, las cuales se pueden complementar con técnicas de biología molecular, tales como PCR - RFLP y secuenciación de ADN, que facilitan el estudio de Polimorfismos de Nucleótido Simple en genes específicos como el gen RET y relacionar con la enfermedad en niños afectados.

## **1.2 - Justificación del problema:**

La relación del proto-oncogén RET con la enfermedad de HSCR es fuertemente marcada, ya que se encuentra implicado en la activación de cascadas de señalización intracelular que median la proliferación, diferenciación y supervivencia celular (Takahashi, *et al.*, 1988). Según Torfs (1998), el porcentaje de incidencia de la enfermedad en hispanos es 1 por cada 10000 recién nacidos vivos.

Uno de los objetivos fundamentales de la genética médica moderna es caracterizar la base molecular de las mutaciones que provocan enfermedades genéticas y utilizar esa información para mejorar los métodos de diagnóstico

(Nussbaum, McInnes y Willard, 2008). La mayoría de investigaciones relacionadas con el potencial uso de polimorfismos en el gen RET como marcadores de susceptibilidad en la enfermedad de Hirschsprung, se han realizado en países asiáticos y europeos. Sin embargo, no se han encontrado investigaciones realizadas en países latinoamericanos, donde las frecuencias polimórficas pueden variar de acuerdo a la composición étnica de la población en estudio.

Debido a que en la población ecuatoriana no existen datos de investigaciones realizadas para determinar la prevalencia de polimorfismos relacionados con la enfermedad de Hirschsprung, se propone estudiar cuatro SNPs en el gen que codifica para la proteína RET, los cuales han sido investigados previamente en países del continente europeo y asiático.

El conocimiento generado del estudio de polimorfismos de nucleótido simple en el gen RET, nos permitirá relacionar si los genotipos de riesgo estudiados en otras poblaciones favorecen de igual forma, al desarrollo de la enfermedad en Ecuador. Ello permitirá generar una herramienta para el diagnóstico molecular de la enfermedad en base al estudio de polimorfismos del gen antes mencionado. El presente trabajo aportará con información genética sobre polimorfismos en niños ecuatorianos con enfermedad de Hirschsprung atendidos en el Hospital Pediátrico Baca Ortiz de la ciudad de Quito.

## **1.3 - Objetivos**

### **1.3.1 Objetivo general**

Analizar los polimorfismos de un solo nucleótido de los exones 2, 7 y 15, y la región IVS1+1813 del gen RET, mediante PCR-RFLP, de un grupo de niños con diagnóstico de enfermedad de Hirschsprung atendidos en el Hospital Pediátrico Baca Ortiz de la ciudad de Quito.

### **1.3.2 Objetivos específicos**

Estandarizar la técnica de extracción de ADN a partir de biopsias rectales o de colon parafinadas.

Optimizar las condiciones de PCR-RFLP para la determinación de los polimorfismos de un solo nucleótido de los exones 2, 7 y 15, y la región IVS1+1813 del gen RET.

Determinar la frecuencia de los cuatro polimorfismos de un solo nucleótido en el gen RET en individuos afectados con la Enfermedad de Hirschsprung, así como en un grupo control.



## 1.4 - Marco Teórico

### 1.4.1 Sistema Nervioso Entérico (SNE)

#### 1.4.1.1 Organización, función y características del SNE

El sistema nervioso autónomo (SNA) se divide en sistema nervioso entérico (SNE), simpático y parasimpático, siendo el SNE la división más extensa en número de células del SNA. (Mundt & Bates, 2010). El SNE fue descrito por Langley en 1921, consiste de una red compleja de neuronas y sus células de sostén (glía) en la pared del tracto gastrointestinal (Hao, *et al.*, 2010).

Las funciones del sistema nervioso entérico son controlar la motilidad intestinal, regular la secreción intestinal, responder a los estímulos sensoriales de la pared intestinal, controlar el flujo sanguíneo intestinal e incluso intervenir en procesos inflamatorios y de respuesta inmunológica (Vohra, *et al.*, 2006). Debido a su papel fundamental en las actividades del tracto gastrointestinal, el SNE es esencial para todas las etapas de vida postnatales (Laranjeira, 2010).

El SNE se organiza en dos plexos ganglionares interconectados que se extienden desde el esófago hasta el recto y son el plexo mientérico y el plexo submucoso. Los plexos están formados por grupos de células ganglionares llamados ganglios, interconectados por los axones neuronales llamados fibras nerviosas. Los plexos forman un sistema continuo distribuido alrededor de la

circunferencia y a lo largo de la longitud del intestino. El plexo mientérico o de Auerbach, es el mayor plexo del SNE. Este es un plexo externo situado entre las capas musculares longitudinal y circular de la mayoría de las regiones del tracto gastrointestinal. El plexo submucoso o de Meissner, es un plexo ganglionar ubicado en la región submucosa entre el músculo circular y la mucosa (Figura 1.1). El plexo mientérico dirige sobre todo los movimientos gastrointestinales y el plexo submucoso controla fundamentalmente la secreción y el flujo sanguíneo local (McPhee y Hammer, 2010; Wood, 2012).

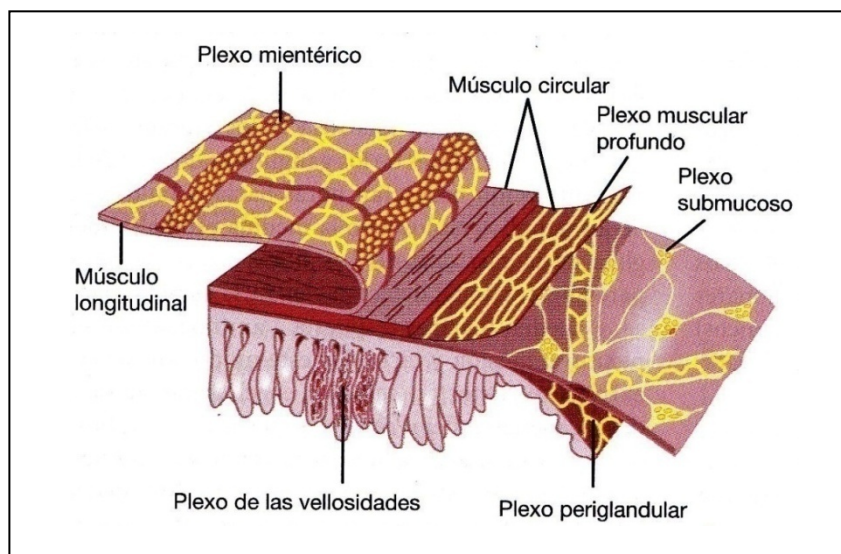


Figura 1.1: Representación de las neuronas entéricas en los plexos mientérico y submucoso en el tracto intestinal (McPhee y Hammer, 2010).

El SNE presenta algunas características particulares. Este tiene un alto grado de autonomía en el control de las funciones del tracto digestivo y es único en su capacidad de funcionar independientemente del sistema nervioso central. El grado de autonomía de las funciones digestivas es posible debido a que la pared

del tubo digestivo está equipada con una compleja red intrínseca de neuronas que constituyen el sistema nervioso entérico, por lo cual, es considerado como un "segundo cerebro en el intestino" (Gershon, 1998). En término de número de células, el SNE contiene más de 100 millones de neuronas (Montedonico, 2009).

#### 1.4.1.2 Origen y desarrollo del SNE

Los precursores neurales que formarán el SNE (neuronas y células gliales) durante el desarrollo embrionario, se derivan de las células de la cresta neural (Burns & Le Douarin, 2001). Estas células se forman a lo largo de todo el eje neural a partir del ectodermo embrionario, pero sólo ciertas regiones bien definidas de la cresta neural darán lugar a las neuronas y células gliales que forman parte de los complejos circuitos neuronales necesarios para el correcto funcionamiento del sistema nervioso entérico (Le Douarin & Kalcheim, 1999).

Las neuronas y glías del SNE se derivan de las regiones vagal, troncal y sacra de la cresta neural, desde donde los precursores emergerán para invadir el intestino en desarrollo, siguiendo unas rutas de migración celular definidas, entre la séptima y la duodécima semana de gestación (Okamoto & Uneda, 1967). Las células de la cresta neural vagal y troncal entran en la región anterior del aparato digestivo del embrión migrando en dirección rostro-caudal. Sólo una pequeña porción del SNE procede de la región troncal, limitándose exclusivamente a estructuras anteriores al duodeno. La aportación de la región vagal es mucho más

significativa, siendo estos precursores neurales los que migran hacia el resto del tracto gastrointestinal, colonizando las regiones más distales. Consecuentemente, es de esperarse que los factores limitantes que afectan la proliferación, supervivencia, migración o diferenciación de las células de la cresta neural resulten en una aganglioneosis de segmento corto (Kenny, *et al.*, 2010). Existe una segunda ola migratoria de las células derivadas de la cresta neural en los mamíferos en la que se ve implicada la región sacra. Las células derivadas de la cresta neural sacra colonizan primero los ganglios pélvicos autónomos, para migrar hacia el intestino distal en la dirección contraria caudo- rostral, colonizando el intestino postumbilical (Figura 1.2) (Kapur, 2009). Sin embargo, la migración de la cresta neural sacra en forma aislada no es suficiente para evitar el fenotipo de HSCR (Wallace & Burns, 2005).

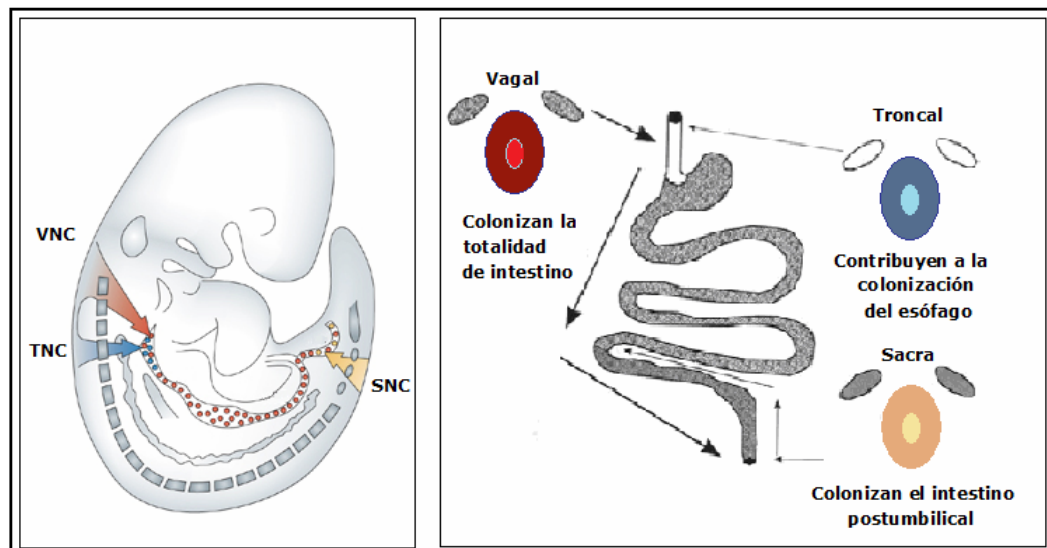


Figura 1.2: Colonización del intestino por precursores procedentes de tres regiones distintas de la cresta neural. VNC: Cresta neural vagal; TNC: Cresta neural troncal; SNC: Cresta neural sacra

(Sánchez, 2010)

En los humanos este proceso toma siete semanas, los derivados de la cresta neural entran en el intestino anterior a la quinta semana, alcanzan el íleon distal a la séptima semana, el colon medio en la octava semana, y en la duodécima semana llegan a la parte distal del recto. La desaceleración de la tasa de colonización de la parte distal del intestino es causada por el crecimiento del intestino y no por la reducción en la velocidad de migración (Wallace & Burns, 2005).

Las células que colonizan el tracto digestivo constituyen una población heterogénea que en su conjunto es pluripotente, pero incluye células con distinto grado de diferenciación (Young, *et al.*, 2005). Cualquier fallo en este proceso proliferativo restringirá la fuente de precursores para las neuronas y la glía entérica, (Binder, *et al.*, 2008) provocando una "zona agangliónica" (región del intestino que carece de neuronas entéricas sin motilidad) (Wallace & Anderson, 2011). Por lo tanto, la relación del SNE con la patología de HSCR está fuertemente marcada (Borrego, *et al.*, 2000). Para formar células nerviosas maduras y funcionales, que provienen de la cresta neural, no sólo deben migrar en todo el trayecto del intestino, además deben proliferar y diferenciarse en todos los diferentes tipos de neuronas y células gliales, en número suficiente y correcta localización (Newgreen & Young, 2002). Los precursores (células derivados de la cresta neural) tendrán que cambiar su fenotipo de manera progresiva según el estadio de desarrollo tanto durante su migración, así como después de ella. Una

de las primeras señales de diferenciación celular en los precursores una vez que han colonizado el intestino es la expresión del receptor tirosín kinasa RET (Lo & Anderson, 1995).

## **1.4.2 Enfermedad de Hirschsprung**

### 1.4.2.1 Aspectos generales de la enfermedad de Hirschsprung

La enfermedad de Hirschsprung (HSCR), llamada también megacolon congénito o megacolon agangliónico, es una anomalía congénita que se caracteriza por aganglionosis, (ausencia o falta de células neurales ganglionares), en los plexos mientérico de Auerbach y en el plexo submucoso de Meissner en una porción variable del intestino grueso, dando como resultado una obstrucción intestinal funcional debido a que en la porción agangliónica hay una pérdida de peristalsis, lo cual impide que avance el flujo fecal (McInerny, Adam, Campbell y Hoekelman, 2011). HSCR es la causa más común de obstrucción neonatal del colon, en un 33%.(Moore y Persaud, 2009).

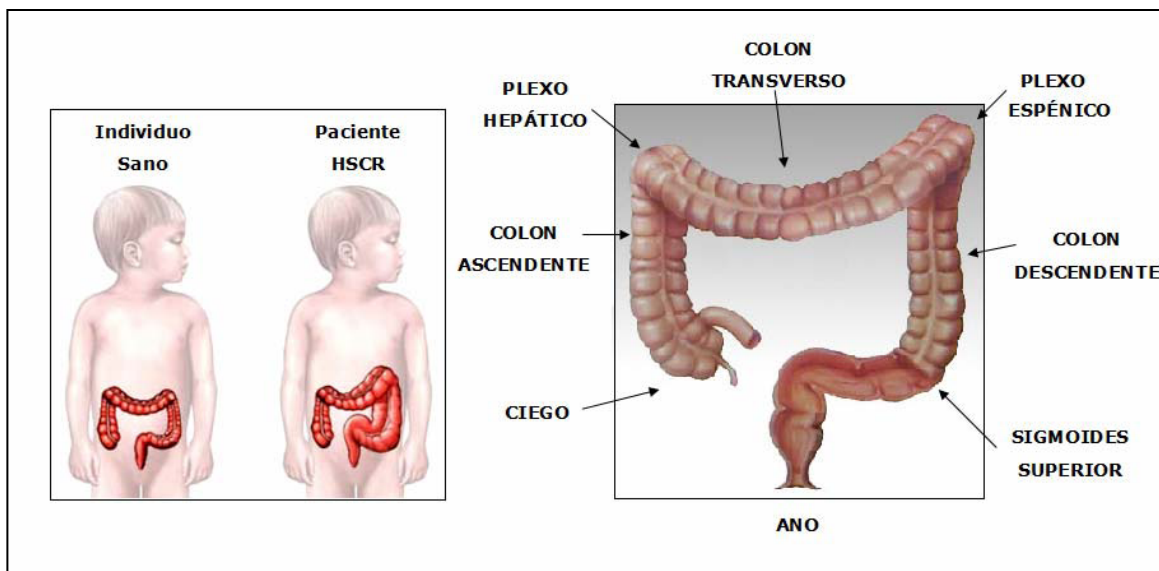


Figura 1.3: Representación del intestino grueso (derecha). Diferencias entre individuo normal e individuo con HSCR en el que se observa megacolon (Izquierda). (Sánchez, 2010).

Esta enfermedad se puede presentar bajo dos formas fenotípicas diferentes HSCR de segmento corto (S-HSCR), la cual es la forma clásica y común de la enfermedad, en la que se ve afectada una región por debajo del sigmoides superior y HSCR de segmento largo (L-HSCR) en la que la aganglionosis se extiende por encima del plexo esplénico (Figura 1.3) (Chakravarti & Lyonnet, 2002). Hay una tercer forma, que es a la vez rara y asociada con alta morbilidad y mortalidad, la aganglionosis total de colon, con ausencia de células ganglionares en todo el colon y ocasionalmente puede involucrar longitudes variables del intestino delgado, donde la prevalencia en niños y niñas es casi igual (Kenny, *et al.*, 2010; Haricharan & Georgeson, 2008). La Tabla 1.1 muestra la frecuencia relativa de las formas más comunes de HSCR.

Tabla 1.1: Frecuencia relativa de los tipos diferentes de HSCR (Haricharan, *et al*, 2008).

Tipos de HSCR	Nivel típico de aganglionosis	Frecuencia relativa (%)
Segmento corto	Sigmoides	74 – 80%
Segmento largo	Plexo esplénico o colon transverso	12 – 22%
Aganglionosis total del colon	Colon e íleon terminal	4 – 13%

En la mayoría de los casos, el diagnóstico de HSCR se realiza en el período neonatal y se identifica como una obstrucción intestinal con los siguientes signos: a) dificultad en expulsar el meconio durante las primeras 48 horas de vida (observado en el 60-70% de casos), b) distensión abdominal (observado en 63-91% de los recién nacidos con la enfermedad), que según Diamond y colaboradores (2007) se alivia con la estimulación rectal o con la administración de enemas, c) vómitos (observado en el 19-37% de los casos, según Hackam y colaboradores en el 2004), y d) enterocolitis neonatal (entre un 5% al 44% de niños pueden presentar Hirschsprung asociada con enterocolitis (HAEC), presentando diarrea, deposiciones explosivas y malolientes, fiebre y distensión abdominal (Teitelbaum, *et al.*, 2000), destacando que la enfermedad de Hirschsprung puede ser letal en la infancia si se complica con enterocolitis (McInerney, *et al.*, 2011). El reconocimiento precoz y el tratamiento de AHCE con reanimación con líquidos, irrigación rectal y antibióticos es importante para disminuir el riesgo de mortalidad. La incidencia de niños con enterocolitis es mayor en pacientes diagnosticados con HSCR en forma tardía, destacando la importancia de un diagnóstico oportuno (Singh, *et al.*, 2003). En algunos casos, el



diagnóstico de HSCR se realiza más tarde en la infancia o en la etapa adulta mostrando estreñimiento severo, distensión abdominal crónica, vómitos y retraso de crecimiento (Parc, *et al.* 1984).

El diagnóstico inicial se realiza sobre la base de la sospecha clínica y no se puede verificar por procedimientos no invasivos. Las principales técnicas diagnósticas se detallan a continuación:

- a) Radiografía simple de abdomen y enema opaco: intenta evidenciar la zona de transición entre el segmento estrecho patológico y el sano. Este ha sido el método diagnóstico de elección durante muchos años y es útil para delimitar la longitud del segmento agangliónico, lo que permitirá elegir la técnica quirúrgica más idónea. Se han propuesto como criterios radiológicos de megacolon, un diámetro del rectosigma mayor de 6,5 cm, un diámetro del colon ascendente mayor de 8 cm y un diámetro del ciego mayor de 12 cm. Esta técnica presenta una sensibilidad del 60-70%.
- b) La manometría anorrectal: Esta evalúa la ausencia del reflejo rectoanal inhibitorio, que consiste en una relajación refleja del esfínter anal interno en respuesta a la distensión rectal. Es un reflejo que exige la indemnidad de los plexos intramurales y está ausente en pacientes con enfermedad de Hirschsprung. Su sensibilidad fluctúa entre 83 y 96%.

- c) Estudio histológico: Es el estándar de oro para el diagnóstico de la enfermedad de HSCR. Inicialmente se utilizaba la biopsia quirúrgica para el diagnóstico, actualmente esta ha sido desplazada por la biopsia por succión, la cual además de disminuir complicaciones (infección, sangrado, perforación) evita la anestesia general y las suturas. Su eficacia es del 99%, el diagnóstico de HSCR se establece cuando se observa histopatológicamente la ausencia de células ganglionares en la biopsia rectal por técnicas inmuno-histoquímicas. Mediante la técnica de hematoxilina y eosina en las biopsias con HSCR, se observa ausencia de células ganglionares submucosas y mientéricas y son acetil colinesterasa (AChE) positiva con hipertrofia de las fibras nerviosas (De Manueles, 2008; Montedonico, 2009).

En el diagnóstico diferencial deben considerarse otras causas de obstrucción intestinal, distensión abdominal y falta de meconio en el recién nacido, tales como (Amiel & Lyonnet, 2001):

- a) Íleo meconial resultante de la fibrosis quística,
- b) Malformaciones intestinales tales como atresia ileal inferior y de colon, malrotación intestinal,
- c) Anomalías del SNE agrupados como síndromes crónicos intestinales con pseudo-obstrucción, y

- d) Obstrucción intestinal funcional resultante de infección materna, toxicidad materna, o hipotiroidismo congénito.

Los pacientes con la enfermedad de Hirschsprung sin tratamiento corren peligro a causa de desnutrición o sepsis después de la rotura del intestino (Wallace & Anderson, 2011). El tratamiento es la intervención quirúrgica que consiste en descender el intestino normal hacia ano y eliminar la región agangliónica. Este es un procedimiento necesario pero no suficiente en algunos pacientes, ya que aunque los síntomas pueden desaparecer tras la operación, existe una proporción de pacientes significativa en los que persisten problemas postoperatorios, como estreñimiento, diarrea o enterocolitis (Kapur, 2009; Thapar, 2009). En los últimos 50 años se han hecho intervenciones cada vez menos agresivas y más resolutivas (De Manueles y De la Rubia, 2010). La mortalidad ha estado por debajo del 6% desde la década de 1980 (Yanchar & Soucy, 1999). Según Pini (2011), reporta una mortalidad del 3%, debido al diagnóstico temprano y la mejora del tratamiento quirúrgico. Sin embargo, el tratamiento de los niños con aganglioneosis total del colon sigue siendo riesgoso (Amiel, *et al.*, 2008).

#### 1.4.2.2 Epidemiología de la enfermedad de Hirschsprung

Se estima que la incidencia global es de aproximadamente 1 caso por cada 5000 recién nacidos vivos (Behrman, *et al.*, 2004). Sin embargo, la incidencia varía en los distintos grupos étnicos, estimándose, por ejemplo 2.8 casos por

10.000 nacidos vivos en asiáticos, 2.1 casos por 10.000 nacidos vivos en afroamericanos, 1.5 casos por 10.000 nacidos vivos en población caucásica y finalmente 1.0 caso por 10.000 nacidos vivos en hispanos. En hermanos la incidencia es de aproximadamente del 3.5%, aumentando según la longitud del segmento afectado hasta un 20% (Torfs, 1998; Haricharan & Georgeson, 2008).

Normalmente, HSCR aparece como caso aislado o HSCR esporádico, y en el 80% de casos (donde los individuos afectos no presentan otros problemas adicionales) sin historia familiar previa. También existen casos familiares en los que se observan patrones de herencia autosómica dominante y recesiva con penetrancia incompleta, dependiente del sexo y expresión variable (Lantieri, *et al.*, 2006). Es predominante en el sexo masculino, siendo el ratio hombres:mujeres de 4:1. Curiosamente, este ratio es significativamente más alto para S-HSCR (hombre:mujer de 5:1) que para la forma más severa L-HSCR (aproximadamente hombre: mujer de 1:1) (Torfs, 1998).

El 30% de los pacientes con HSCR muestran asociación con otras anomalías congénitas, siendo especialmente frecuentes aquellas que afectan a estructuras derivadas de la cresta neural, entre ellas se encuentran la neoplasia endocrina múltiple tipo 2B (síndrome canceroso mendeliano autosómico dominante), neuroblastomas (tumores sólidos que aparecen en el sistema parasimpático o la médula adrenal), el síndrome de hipoventilación central congénita (se ve comprometido el sistema nervioso periférico y central en el

control de la respiración autónoma), síndrome de Waardenburg (alteraciones pigmentarias y sordera en el mismo paciente). Por otra parte, HSCR aparece asociado a alguna anomalía cromosómica en un 12% de los casos, siendo la trisomía 21 (Síndrome de Down) la más frecuente, se observa en un 2-10% de los casos HSCR (Moore, 2006; De Manueles, 2008). También se reportó que la enfermedad de Hirschsprung se presenta comúnmente en el síndrome Mowat-Wilson hasta en un 60% de pacientes (Bonnard, *et al.*, 2009).

Se engloban bajo el nombre de neurocristopatía a aquellas enfermedades, síndromes y neoplasias que afectan a tejidos derivados de la cresta neural (Bolande, 1974). Por lo tanto, HSCR es considerada una neurocristopatía, al proceder de células derivadas de la cresta neural, durante la embriogénesis del individuo para formar el sistema nervioso entérico (Iwashita, *et al.*, 2003).

#### 1.4.2.3 Etiología de la enfermedad de Hirschsprung

En 1886, el pediatra danés Harald Hirschsprung describió la enfermedad, que ahora lleva su nombre, como una constipación en la infancia temprana debido a la dilatación congénita del colon. Él realizó esta descripción en un Congreso de Pediatría donde expuso dos casos de niños de sexo masculino quienes fallecieron y tras su autopsia se observó una "dilatación enorme del colon" (Hirschsprung, 1888). En 1901, Tittel mediante estudios histológicos reveló la ausencia de células ganglionares en los plexos mientérico y de la submucosa por debajo del colon

dilatado. En 1948, Swenson y Bill reportaron la primera cirugía definitiva para reparar esta condición (Amiel, *et al.*, 2008).

La etiología primaria representa alteraciones celulares y moleculares durante la migración de las células de la cresta neural al intestino y el desarrollo del sistema nervioso entérico (Garipey, 2001). Ocurre un fallo en la migración de los neuroblastos de la cresta neural, que en condiciones normales debe alcanzar al intestino delgado en la séptima semana de gestación y el recto en la duodécima semana. Mientras más precoz sea la alteración en la migración celular, mayor será la longitud del segmento afectado (Arriagada, Alfaro y Rostion, 2008).

La etiopatogenia se basa en un fallo en la migración, proliferación, diferenciación y/o supervivencia de las células de la cresta neural durante el desarrollo del SNE. Alteraciones en estos procesos tendrían como consecuencia que los precursores neurales responsables de dar lugar a las neuronas y células de la glía entérica no serían capaces de llegar a su localización final en número suficiente o bien no se diferenciarían de manera correcta (Okamoto & Ueda, 1967). La ausencia de un número suficiente de neuronas entéricas, así como de glía, imposibilitaría la formación de ganglios entéricos. Como consecuencia, la musculatura del colon perdería su inervación y por lo tanto su capacidad contráctil. A causa del peristaltismo inefectivo y del estrechamiento del segmento afectado, el intestino próximo al segmento aganglionar se dilata y la musculatura

del colon se hipertrofia en un intento de superar la obstrucción, origina el megacolon (Sánchez, 2010).

El fenotipo de HSCR es variable (extensión variable del segmento agangliónico) debido a una amplia gama de posibles interrupciones o anomalías durante el desarrollo del SNE y durante el proceso migratorio en distintos periodos gestacionales (Martucciello, *et al.*, 2000). Se han identificado fundamentalmente dos vías metabólicas que desempeñan un papel crítico en la neurogénesis entérica de mamíferos, las cuales son la ruta de señalización del receptor tirosín quinasa (RET) y la ruta mediada por el receptor B de endotelinas (EDNRB) (Fernández, 2004).

La genética de HSCR, en la mayoría de los casos, es compleja y no mendeliana (Wallace & Anderson, 2011). Hasta la fecha, el análisis molecular de pacientes con HSCR ha permitido identificar mutaciones en nueve genes que pueden estar relacionados con la enfermedad, tales como RET, GDNF, NRTN, PHOX2B, EDNRB, EDN3, ECE1, SOX10 y ZFHX1B. Sin embargo, las mutaciones en estos genes representan sólo alrededor del 50% de todos los casos de HSCR. La mayor parte de estos genes codifican proteínas relacionadas entre sí de forma directa o indirecta para elementos de las vías de señalización más importantes en la formación del sistema nervioso entérico (Tam & Garcia, 2009). Las interrelaciones de estos genes están en su mayoría por elucidar (De Manueles, 2008). La variabilidad fenotípica y penetrancia incompleta observada

en HSCR también sugiere la implicación de genes modificadores (Wallace & Anderson, 2011)

#### 1.4.2.4 Genética molecular de la enfermedad de Hirschsprung

Los diferentes estadios del desarrollo del SNE y las distintas etapas de diferenciación celular se encuentran regulados por varias rutas de señalización que implican la secreción de moléculas por parte de las células del mesénquima intestinal que actúan sobre receptores expresados en los precursores de la cresta neural con la consiguiente activación y represión de la expresión genética de la célula (Le Douarin, *et al.*, 1999). Es decir, la interacción entre los precursores derivados de la cresta neural y el entorno del tubo digestivo en formación es crucial para el desarrollo del SNE (Young, *et al.*, 2004). Se incluyen 2 diferentes vías de señalización necesarias para la migración, proliferación y diferenciación de células entéricas derivadas de la cresta neural una vez que han colonizado el intestino y son:

- a) La vía del receptor de la tirosina quinasa RET y su ligando, factor neurotrófico derivado la línea de celular glial (GDNF), a través de co-receptores (GFRA), y
- b) La ruta del receptor endotelina tipo B (EDNR) y su ligando endotelina-3 (EDN3) (Amiel & Lyonnet, 2001; Passarge, 2002).



En la Figura 1.4, se representan los factores de transcripción implicados en la regulación de RET en el núcleo.

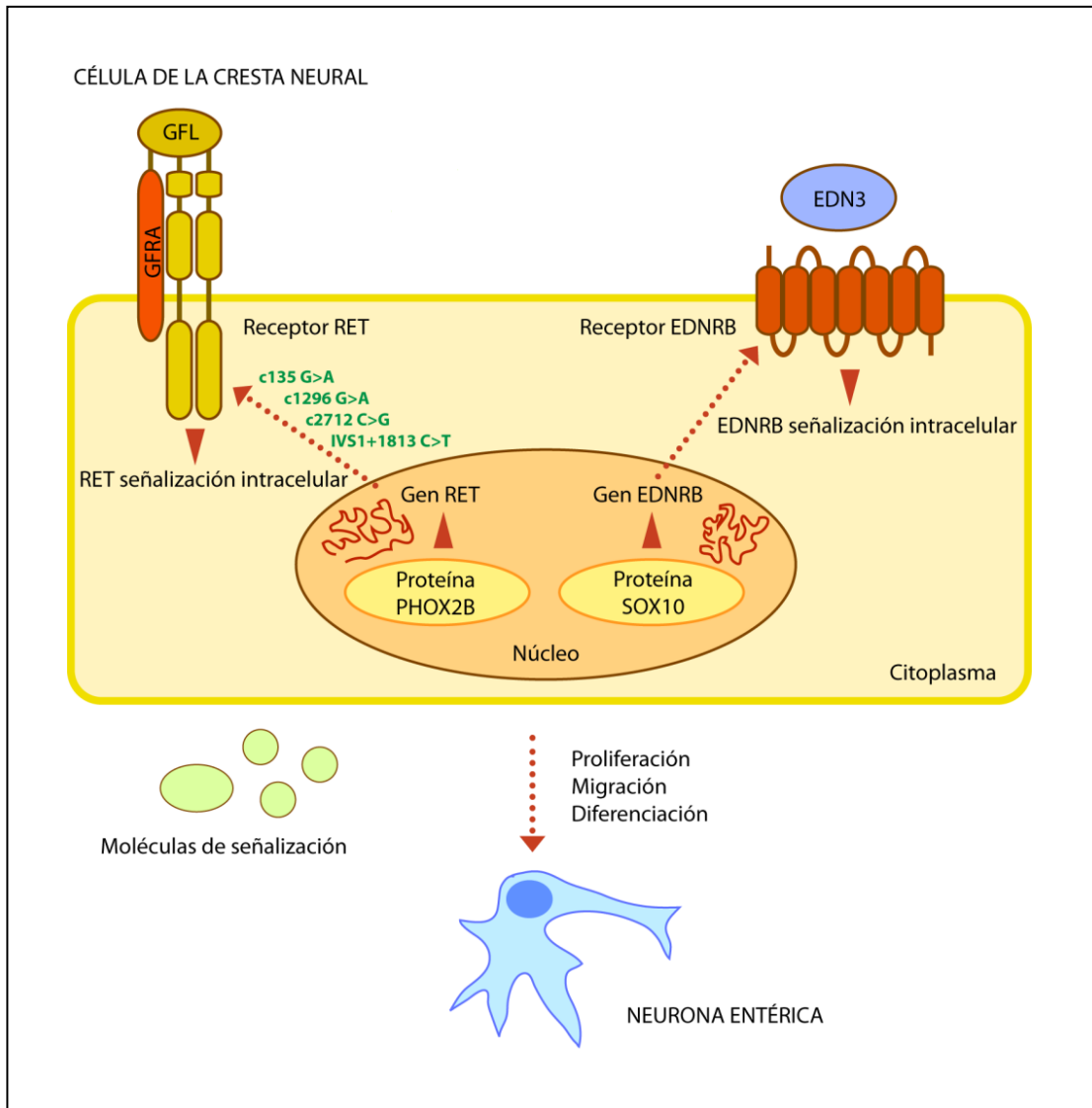


Figura 1.4: Representación esquemática de las rutas de señalización e interacción que rigen en el desarrollo del SNE (Modificado Tam & Garcia, 2004).

#### 1.4.2.4.1 Ruta de señalización del receptor tirosín quinasa

##### RET

Las células requieren de factores de crecimiento, como el factor neurotrófico derivado de glía (GDNF), para migrar a lo largo del intestino, proliferar y sobrevivir (Young, *et al.*, 2004), pero éstas no responderán a GDNF a no ser que estén programadas para expresar su receptor de membrana RET (Trupp, *et al.*, 1996).

La proteína RET funciona como un receptor para el factor neurotrófico derivado de la línea celular glial (GDNF). Las interacciones entre el ligando-receptor están mediadas por co-receptores (GFRA) (Bar, *et al.*, 1997). La activación del receptor RET por el factor neurotrófico es esencial para la migración y la diferenciación de las células de la cresta neural a neuronas entéricas. El correcto desarrollo del SNE depende de la capacidad de este factor neurotrófico para activar RET y la capacidad del receptor RET en transducir la señal (Taraviras, *et al.*, 1999).

La activación de la proteína RET requiere la formación previa de un complejo multimérico (heterotetramérico) 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 (GFR $\alpha$ ) unido a la superficie celular a través de un enlace glicosil-fosfatidilinositol (GPI) de la familia de receptores  $\alpha$

de GDNF. Los ligandos de RET pertenecientes a esta familia son GDNF, neurturina (NRTN), artemina (ARTN) y persefina (PSPN). También, existen 4 co-receptores GFR $\alpha$  conocidos como GFR $\alpha$ 1, GFR $\alpha$ 2, GFR $\alpha$ 3 y GFR $\alpha$ 4. Cada uno de los 4 ligandos GDNF tiene una especial afinidad por un co-receptor GFR $\alpha$  determinado. GDNF se une preferentemente a GFR $\alpha$ 1, NRTN a GFR $\alpha$ 2, ARTN a GFR $\alpha$ 3 y PSPN a GFR $\alpha$ 4 (Enokido, *et al.*, 1998). (Figura 1.5).

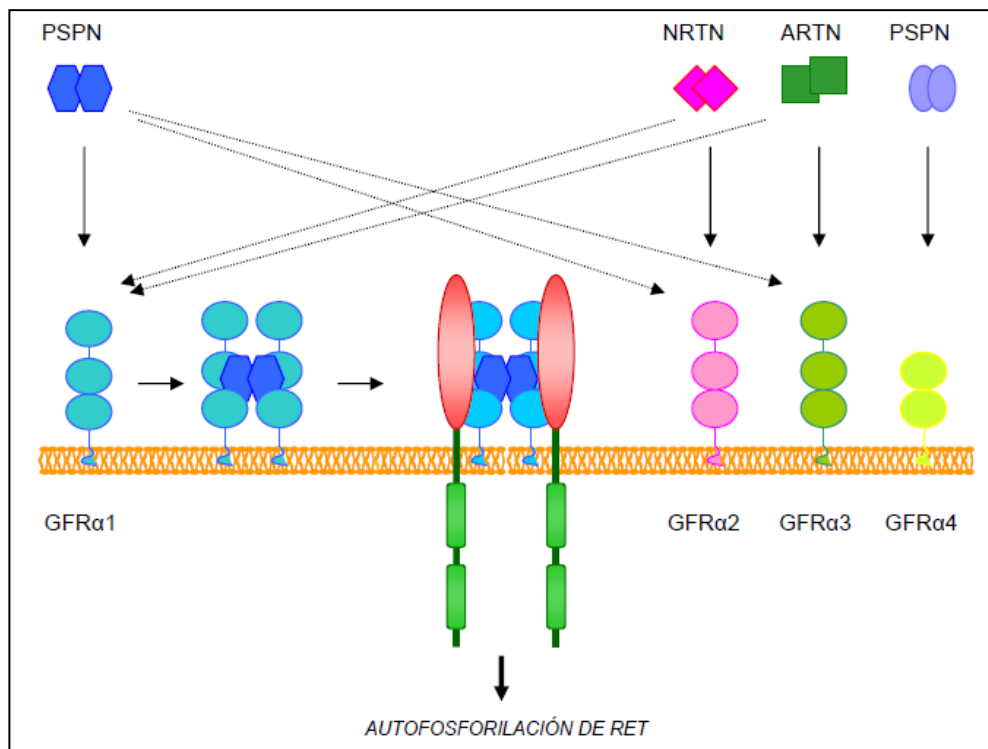


Figura 1.5: Formación del complejo multimérico de activación de la proteína RET. Interacciones entre los distintos ligandos, co-receptores GFR $\alpha$ 1 y RET (Sánchez, 2010).

Según Takahashi (2001), parece necesaria la interacción de uno de los cuatro ligandos (GDNF, NTN, PSP, ART) con alguno de sus cuatro correceptores (GFR $\alpha$  1-4) antes de que el complejo resultante pueda interaccionar con RET,

produciendo su dimerización y la autofosforilación de los residuos tirosínicos del dominio intracelular. Una vez fosforilada, los residuos de tirosina sirven como sitios de unión de alta afinidad para diversas proteínas de señalización intracelular; este sería el punto de partida de la cascada de activación, dependiente de RET que se genera en respuesta a las señales externas. Fisiológicamente, RET parece transducir intracelularmente señales externas muy diversas las cuales son señales de diferenciación, crecimiento tisular, supervivencia o apoptosis (Tam & Garcia, 2009).

#### 1.4.2.4.2 Gen RET

El proto - oncogén RET es un gen que codifica para la proteína RET, un receptor de membrana con actividad tirosín quinasa, que se expresa ampliamente en embriones de mamíferos (De Graaff, *et al.*, 2001; Tam & Garcia, 2004). Como su propio acrónimo sugiere, RET (REarranged during Transfection) fue clonado por primera vez por Takahashi y colaboradores en 1985, como un oncogén quimérico, durante un ensayo de transformación de células NIH 3T3 con ADN procedente de linfoma humano (Fernández, 2004).

Casi 10 años después de su descubrimiento casual, se identificaron mutaciones germinales en el proto - oncogén RET que son responsable de cuatro trastornos independientes en los seres humanos, el carcinoma medular de tiroides (MTC), neoplasia endocrina múltiple (MEN) tipo 2A (MEN2A) y tipo 2B (MEN2B) y

HSCR, lo cual justifica la importancia clínica del gen RET. Las mutaciones pueden causar la ganancia de función del receptor RET, causando MTC, MEN2A y MEN2B, mientras que la pérdida de la función, origina la Enfermedad de Hirschsprung, representando el mejor ejemplo documentado como una serie alélica causa diversidad fenotípica (Romeo, *et al.*, 1998).

En humanos, el gen RET se encuentra en la banda cromosómica 10q11.2 y contiene 21 exones dispersos en una región de casi 55Kb (Ceccherini, *et al.*, 1993). Alrededor del 40% de su secuencia genómica corresponde a un inmenso intrón de 23 Kb ubicado entre los exones 1 y 2 (Figura 1.6). Su patrón de expresión está finamente regulado durante el desarrollo embrionario de vertebrados, donde aparecen tasas de expresión superiores en los estadios iniciales (Myers, *et al.*, 1995)

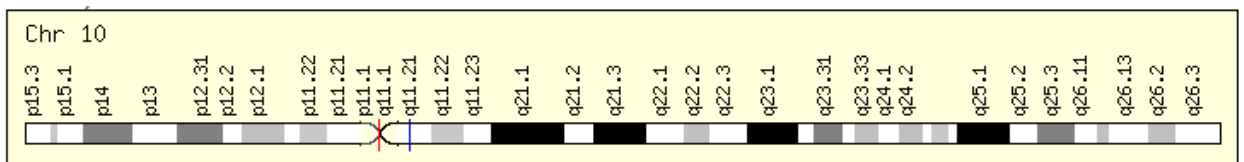


Figura 1.6: Esquema del Cromosoma 10. Gen RET localizado en la región 10q11.2 (GeneCards)

Estructuralmente, la proteína RET tiene un peso molecular de alrededor de 124kDa y su estructura comprende 3 dominios:

- a) un dominio extracelular de unión al ligando, el cual incluye cuatro repeticiones de tipo cadherina (CAD) y un dominio rico en cisteínas (CYS),
- b) un dominio hidrofóbico transmembranal (TMD), y
- c) un dominio intracelular o porción citoplasmática, que incluye al dominio con actividad tirosín quinasa, donde reside la actividad catalítica del receptor. Este dominio se activa mediante la fosforilación de determinados residuos tirosínicos, desencadenando la activación de ciertas rutas de señalización celular (Carter, *et al.*, 2001). En la Figura 1.7, los cuadrados numerados indican los exones del gen, las líneas en puntos indican los dominios de la proteínas que codifican, los cilindros muestran los dominios de receptor RET y finalmente entre paréntesis se indica los residuos aminoacídicos implicados (Tam, & Garcia, 2009).

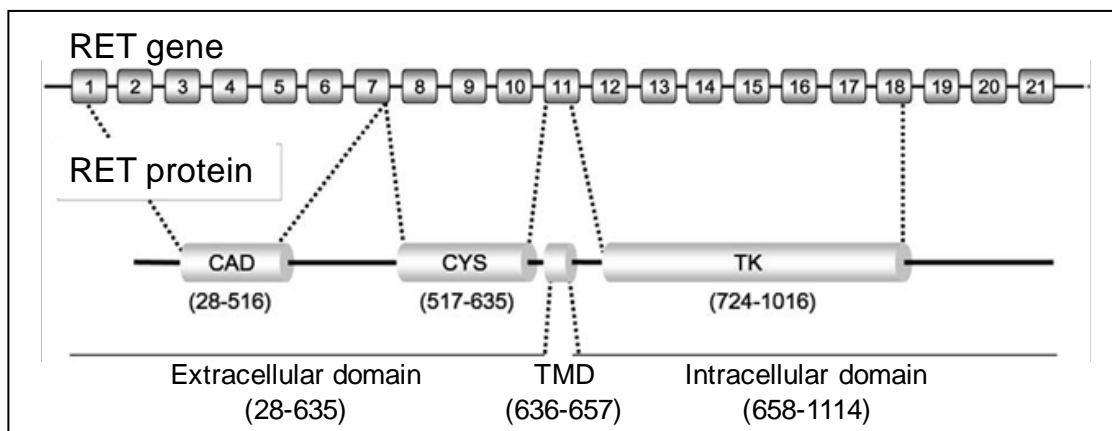


Figura 1.7: Representación esquemática de la proteína RET codificada por el gen RET (Tam & Garcia, 2009).

Un gran número de mutaciones en el gen RET se han reportado en pacientes con HSCR. En general, estas mutaciones se pueden clasificar en cuatro grupos distintos:

- a) Mutaciones que afectan el dominio extracelular de RET y tienen como resultado un fallo en el plegamiento y transporte de la proteína hasta la membrana plasmática,
- b) Mutaciones en el dominio rico en cisteínas, las cuales son responsables de la dimerización de RET y reducen su localización en la membrana plasmática,
- c) Mutaciones en el dominio tirosín-kinasa, las cuales causan la pérdida de la actividad catalítica del receptor, y
- d) Mutaciones en el dominio intracelular. Estas alteran sitios de unión de proteínas adaptadoras y, por tanto, afectan a la señalización mediada por RET. Por otra parte, las mutaciones en cualquier límite intrón / exón afectan a las secuencias de consenso de empalme, pudiendo alterar el procesamiento del ARNm. Sorprendentemente, las mutaciones silenciosas (mutaciones que no resultan en un cambio de aminoácido en la proteína) en cualquiera de los exones en RET también puede afectar el procesamiento del ARNm (Kashuk, *et al.*, 2005).

#### 1.4.2.4.3 Polimorfismos del Gen RET

Actualmente, se sabe que el proto-oncogén RET es el principal gen de susceptibilidad para HSCR (Lyonnet, *et al.*, 1993). El estudio molecular de RET en distintas series de pacientes HSCR ha permitido identificar mutaciones asociadas a este fenotipo; estas mutaciones están distribuidas por todo el gen e incluyen deleciones, microdeleciones, inserciones y mutaciones puntuales, dentro de ellas las mutaciones silenciosas (Pelet, *et al.*, 2005). A pesar del papel central que juega RET en HSCR y la extensa búsqueda de mutaciones que han llevado a cabo diferentes grupos durante los últimos años, la tasa de mutación muestra baja correlación con la enfermedad, alrededor del 50% en los casos familiares y 7-35% en los casos esporádicos (Angrist, *et al.*, 1995).

En la visión clásica de las enfermedades de base genética, se admitía que las “mutaciones silenciosas”, mutaciones que no alteran la estructura de las proteínas codificadas por los genes, eran irrelevantes para la salud. Las investigaciones sobre enfermedades humanas son las que han aportado mecanismos que explican la forma en que ese tipo de mutaciones podría alterar la síntesis de proteínas. Se ha demostrado que unas cincuenta enfermedades están causadas total o parcialmente por mutaciones silenciosas, entre ellas la Enfermedad de Hirschsprung (Chamary & Hurst, 2009). Los posibles mecanismos de las mutaciones silenciosas descritos son:



- a) Pueden afectar a los dominios reguladores ocultos dentro del ARNm, comúnmente los de control de empalme.
- b) Pueden influir en la forma en que se pliega el ARNm, pudiendo afectar la velocidad de su traducción.
- c) Influyen en la forma en que se pliega el ARNm. La forma en que un ARNm se pliega determina su estabilidad, afectando la velocidad de su traducción o la precisión del ARNm que se traduce.
- d) Incluso puede cambiar la forma en la que se pliega una proteína
- e) Otro modo son los miRNA, se establece una regulación del ARNm por estar ligado con ARN cortos, no traducidos. Una mutación de una sola base en la región de un gen, incluso si es sinónimo, podría causar una falta de coincidencia durante el emparejamiento con la secuencia miRNA, posiblemente afectando la regulación normal (Hurst, 2011).

Desde 1994, las mutaciones sinónimas e intrónicas del gen RET se han asociado con la patogénesis de HSCR (Lantieri, *et al.*, 2006), pudiendo afectar el correcto procesamiento del ARNm, lo que da como resultado ARNm alterados o proteínas truncadas (Auricchio, *et al.*, 1999; Borrego, *et al.*, 1999). Las mutaciones en el gen RET causan una pérdida de función por un mal plegamiento de proteína, falta de transporte en la superficie celular o supresión de su actividad biológica (Martucciello, *et al.*, 2007). A continuación se detalla cada uno de los SNPs estudiados en el gen RET, en el presente estudio y se observan en forma esquemática en la Figura 1.8.

a) rs 1800858: El polimorfismo c135 G>A corresponde a un SNP localizado en el exón 2, en la posición 135 y es una sustitución de guanina por adenina que resulta ser una mutación silenciosa (A45A). Lantieri, en el 2005, encontró una frecuencia alélica 135A de 65.5% en una población de pacientes italianos afectados con HSCR. Otro estudio realizado en Polonia encontró que el alelo 135A fue representado significativamente en un grupo de 70 pacientes polacos con HSCR en comparación con los individuos controles, con una frecuencia del 51,4% en individuos afectados con HSCR y un 23,7% en controles (Smigiel, *et al.*, 2006). Similares resultados fueron obtenidos en investigaciones realizadas en otras poblaciones (Borrego, *et al.*, 2000; Garcia, *et al.*, 2004; Fitze, *et al.*, 2002). El mecanismo por el cual la sustitución silenciosa del codón 45 actúa en el origen de HSCR se desconoce. Se han hecho especulaciones sobre el posible mecanismo (Fitze, *et al.*, 2002). Inicialmente se propusieron mecanismos directos de actuación de A45A, como la activación de sitios críticos de maduración, la disminución de la expresión del alelo portador de la variante conduciendo a una haploinsuficiencia funcional o el uso preferencial de ARNt específicos que disminuirían la eficiencia de la traducción del alelo que porta el polimorfismo (Borrego, *et al.*, 1999, 2000). Sin embargo, estas hipótesis no han podido ser corroboradas funcionalmente. Además, se propuso que la variante A45A podría estar en

desequilibrio de ligamiento con algún locus funcional desconocido en aquel momento (Borrego, *et al.*, 1999, 2000; Fitze, *et al.*, 2002).

- b) rs 1800860: El SNP c1296 G > A, ubicado en el exón 7, es una sustitución de guanina por adenina en la posición 1296 y resulta ser una mutación silenciosa (A432A). En Polonia, se encontró que el alelo 1296A en el exón 7 tenía una frecuencia de 34.3% en pacientes con Hirschsprung versus un 40% en el grupo control (Smigiel, *et al.*, 2006). En otro estudio realizado por Sánchez en Sevilla, en el 2010, se reportó que el alelo A estaba presente en un 27% en pacientes y en el grupo control en un 58%. Finalmente, en un estudio en Taiwán se encontró que la frecuencia alélica de este polimorfismo no era significativa en una población de pacientes afectados con HSCR ya que éste se presentaba en un 3%. (Wu, *et al.*, 2010)
- c) rs 1800863: El polimorfismo c2712C > G es una transversión de citosina por guanina, ubicada en el exón 15 que resulta en una mutación silenciosa S904S. El estudio realizado en Polonia por Smigiel, en el 2006, encontró que el alelo 2712G no es representativo en HSCR (21.4% presente en pacientes frente al grupo control con un 40%). Este polimorfismo parece estar relacionado con el fenotipo de HSCR, especialmente con la longitud del segmento agangliónico ya que presenta una asociación inversa con la severidad y el tipo de aganglionosis. Similarmente, se observó en otro estudio realizado en una población italiana que la frecuencia del alelo no era significativa y representaba al 13.9% en pacientes (Lantieri, *et al.*, 2005).

d) rs 2435365: El SNP IVS1+1813C>T es una sustitución de citosina por timina, en el nucleótido +1813 del intrón 1, el cual está relacionado con Hirschsprung (Burzynski, *et al.*, 2005 & Emison, *et al.*, 2005). En la población China se reportó una frecuencia alélica de 0.84 en pacientes, mientras que en controles fue de 0.691. También se hace mención de que rs2435365 y rs1800858 podrían ser un modelo log-aditivo y fue aceptado como el mejor modelo de herencia en Hirschsprung (Liu, *et al.*, 2008).

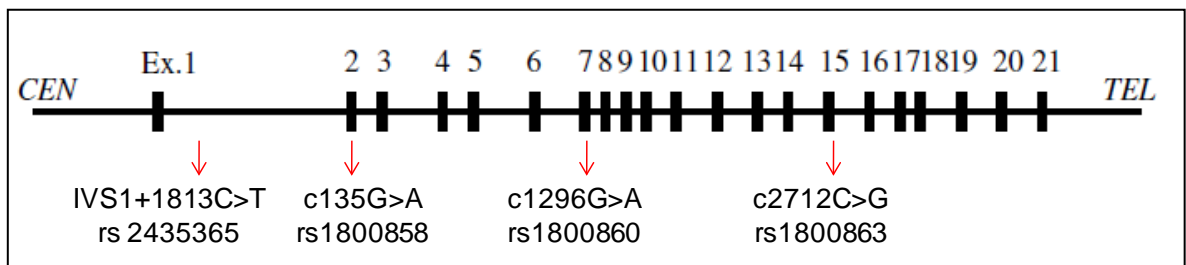


Figura 1.8: Representación esquemática de los SNPs estudiados, en el Gen RET. (Modificado Burzynski, *et al.*, 2004).

Cada vez hay más estudios que demuestran que solo algunos polimorfismos de nucleótido simple (SNP) en el gen RET podrían actuar como factores de susceptibilidad y modificar el fenotipo de HSCR, especialmente ciertas combinaciones de alelos o haplotipos. Haplotipos específicos pueden actuar como factores protectores o predisponentes que modulan la severidad de la enfermedad (Romeo, *et al.*, 1998).

### 1.4.3 Técnicas moleculares

#### 1.4.3.1 Extracción y cuantificación de ADN

El aislamiento de ADN es el primer paso para un estudio molecular, ya que permite obtener el material genético que será procesado para el análisis de SNPs ubicados en el gen RET. El éxito del análisis molecular depende del adecuado aislamiento de material genético en términos de cantidad, calidad y pureza, para lo cual es necesario separar el ADN del resto de los componentes celulares, así como el material no biológico que pueda estar presente (Fonseca, Mateus y Contreras, 2010). En general, el proceso de aislamiento de ADN genómico incluye los siguientes pasos:

- a) La lisis celular: Esta tiene el objetivo de liberar el ADN, luego de haberse producido la ruptura de las membranas celulares y nucleares. Para cumplir este propósito, se pueden emplear varios métodos entre los que se destacan el empleo de químicos (por lo general detergentes), enzimas y agentes mecánicos (agitadores) (Keer & Birch, 2008)
- b) Eliminación de proteínas y ARN: Para alcanzar este fin se emplean solventes orgánicos (beneficiándose de la diferencia de las propiedades químicas y de solubilidad entre proteínas y ADN), tratamientos enzimáticos (ARN-asa para remover el ARN, proteinasa K para degradar proteínas) y columnas de sílica gel que se basan en la capacidad que posee el ADN para unirse a superficies de sílica en presencia de altas concentraciones

de sales, mientras que las proteínas en la presencia de sales no se adsorben a esta membrana, separándolas de la solución. Este método es empleado en algunos kits comerciales (Zdanowicz, 2010).

- c) Purificación o concentración del ADN: En este paso se concentra el ADN de alto peso molecular y se eliminan las moléculas de bajo peso molecular, para lo cual se pueden utilizar tres metodologías distintas y son: la precipitación del ADN con etanol en presencia de cationes monovalentes (el etanol en presencia de estos cationes induce un cambio estructural en el ADN que causa la agregación y precipitación del mismo), diálisis de la solución de ADN en tampón y ultrafiltración a través de membranas selectivamente permeables. (Baechtel, 1989). Tras el proceso de aislamiento del ADN, se determina su pureza y concentración, permitiendo evaluar el proceso en términos de calidad y cantidad de ADN obtenido (Zdanowicz, 2010).

#### 1.4.3.2 PCR RFLP

A partir de su invención en 1985 por Kary Mullis, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) revolucionó la genética molecular, al permitir la clonación rápida de ADN y su análisis (Strachan & Read, 2004). La PCR es una técnica *in vitro* que determina la amplificación exponencial de una región seleccionada de una molécula de ADN, mediante ciclos repetidos de síntesis (Brown, 2008).

La PCR requiere de un molde de ADN, unos iniciadores (llamados también *primers*, o cebadores) que delimitan la zona del ADN matriz que deberá ser amplificado, nucleótidos que serán adicionados a la nueva cadena y la enzima ADN polimerasa que se encargará de la síntesis química, en presencia de iones magnesio (Fonseca, Mateus y Contreras, 2010). La PCR es una reacción en cadena porque las cadenas de ADN nuevas sintetizadas actúan como molde para la síntesis de ADN posterior, en los 25 a 35 ciclos subsiguientes (Passarge, 2004). Cada ciclo involucra tres fases:

- 1) Fase de desnaturalización: Cuando una molécula de ADN de cadena doble se calienta, se produce la separación de sus cadenas (desnaturalización). Esto permite el acceso de los cebadores a las plantillas de ADN de cadena sencilla. Típicamente esta temperatura está en un rango: 93-95 °C para el ADN genómico humano.
- 2) Fase de hibridación (*annealing*): En esta fase, los cebadores se unen a las zonas complementarias de la hebra molde. Sin este apareamiento inicial de los cebadores, la polimerasa no puede comenzar a trabajar. La temperatura a la que transcurre el *annealing* es específica de la secuencia y longitud del cebador y se determina experimentalmente.
- 3) Fase de extensión o síntesis: En esta etapa la temperatura (72° C) se adecúa para que pueda actuar la enzima y copiar la hebra de ADN molde mediante la adición al extremo 3' del cebador de los distintos deoxinucleótidos (dATP, dTTP, dCTP y dGTP), según las reglas de la

complementariedad (adeninas siempre apareadas con timinas y citosinas con guaninas), sintetizándose el nuevo ADN en la dirección 5' → 3' (Ávila, Vera, Hernández y Vasallo, 1995).

La técnica PCR-RFLP (por sus siglas en inglés, conocida como Reacción en cadena de la Polimerasa y Restricción de Fragmentos de Longitud Polimórfica) es una herramienta útil para determinar los genotipos de un polimorfismo, se basa en la amplificación de un segmento de ADN y su posterior restricción con una enzima determinada (Bartrés y Redolar, 2009), es decir, un RFLP es un fragmento de ADN de tamaño previsible originado por la digestión o corte de una cadena de ADN por una enzima de restricción específica (Persing, *et al.*, 2004). El análisis de restricción tiene su fundamento en la especificidad con la que enzimas de restricción cortan un sitio determinado. La detección de la variación puede darse de dos maneras, por creación o por eliminación de un sitio de restricción ocasionado por una mutación puntual. Los fragmentos resultantes de la digestión se separan de acuerdo a su longitud mediante electroforesis en gel de agarosa, donde se pueden visualizar las bandas considerando a cada longitud como un alelo y permitiendo discriminar entre individuos homocigotos o heterocigotos debidos a un polimorfismo de un solo nucleótido (Cumbal, 2010).



### 1.4.3.3 Secuenciación

La secuenciación consiste en determinar la secuencia de nucleótidos de un fragmento de ADN. La técnica más empleada para la secuenciación es el método enzimático, la cual fue puesta a punto por Sanger, Nicklen y Coulson a mediados de la década de 1970 y revolucionaron de manera significativa la genética molecular (Pierce, 2010). Ésta técnica es también conocida como el método enzimático de terminación de cadena, método enzimático de Sanger, método dideoxi y secuenciación enzimática (Vásquez, 2006).

El método enzimático de Sanger se basa en la incorporación de terminadores (dideoxinucleótidos, ddNTPs) a una nueva cadena de ADN mediante la actividad de la ADN polimerasa. Los terminadores se incorporan a la nueva cadena de la misma forma que se incorporan los deoxinucleótidos (dNTPs). Un dideoxinucleótido (ddNTP) es el análogo de un dNTP normal, del que difiere por la ausencia de un grupo hidroxilo en la posición del carbono 3', necesario para la elongación de la cadena y está reemplazado por un H (Figura 1.9). Cuando un deoxinucleótido (dATP, dTTP, dGTP y dCTP) se añade al extremo 3' la extensión de la cadena puede continuar; sin embargo, cuando un dideoxinucleótido (ddATP, ddTTP, ddGTP y ddCTP) se añade a el extremo 3', la extensión de la cadena termina, ya que cuando se incorpora un terminador a la nueva cadena creciente de ADN, la ausencia del grupo hidroxilo evita la formación del puente fosfodiéster con el siguiente nucleótido y la elongación de la cadena se

termina en este punto (Passarge, 2004). En el método original, se empleaba cada uno de los cuatro terminadores en cuatro reacciones distintas paralelas, utilizando una mezcla de uno de los cuatro dNTPs y una pequeña proporción de su ddNTP correspondiente, de forma que se obtenían poblaciones de ADN de distinta longitud de nucleótidos. Los fragmentos radioactivos se separaban en un gel de poliacrilamida y la secuencia de ADN completa se determinaba mediante autoradiografía.

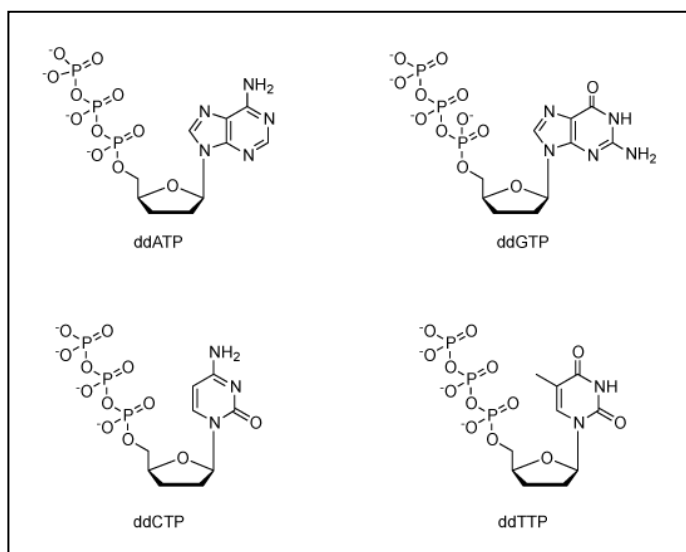


Figura 1.9: Estructura de dideoxi nucleótido trifosfato (ddNTPs) (ATDBio, 2012).

En los últimos años, el método original de Sanger se ha modificado y mejorado substancialmente. Entre los cambios más importantes que ha sufrido el método de Sanger está la aplicación de la PCR, (denominada secuenciación cíclica o secuenciación por ciclado térmico) y la sustitución de la radioactividad por marcadores fluorescentes. Se suelen utilizar cebadores o dideoxinucleótidos marcados con fluoróforos distintos (Oliva y Vidal, 2006).

La secuenciación cíclica, al igual que una reacción de PCR estándar, utiliza ADN polimerasa termoestable y ciclos de temperatura de desnaturalización, hibridación y síntesis de ADN (Figura 1.10). La diferencia es que en la secuenciación cíclica se emplea sólo un cebador e incluye terminadores de cadena ddNTP. El uso de un único cebador hace que a diferencia del aumento exponencial de producto durante las reacciones de PCR estándar, el producto se acumula linealmente (Strachan & Read, 2004). Los dideoxinucleótidos con tintes fluorescentes se utilizan para etiquetar los productos de extensión. Los componentes se combinan en un solo tubo de reacción por muestra, el cual contiene: un molde de ADN, un cebador, ADN polimerasa, los cuatro nucleótidos (dNTPs), los cuatro dideoxinucleótidos (ddNTPs) marcados con fluorescencia y un buffer de reacción (Applied Biosystems, 2009).

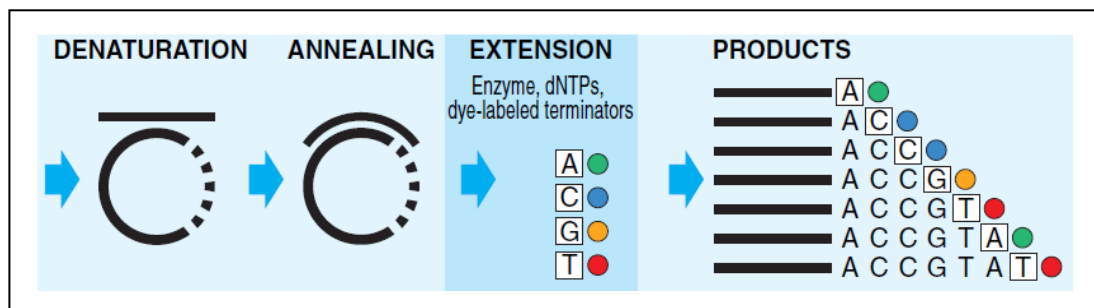


Figura 1.10: Diagrama de ciclo de Secuenciación de Dye Terminator (Applied Biosystems, 2009).

Todos los fragmentos que terminen en un ddNTP contienen un tinte en su extremo 3', de tal forma que al separar estos fragmentos por electroforesis en geles de poliacrilamida es factible conocer la secuencia del fragmento de ADN

estudiado. Cada ddNTP diferente (ddATP, ddCTP, ddGTP y ddTTP) llevará un color diferente de colorante (Figura 1.11) (Applied Biosystems, 2009).

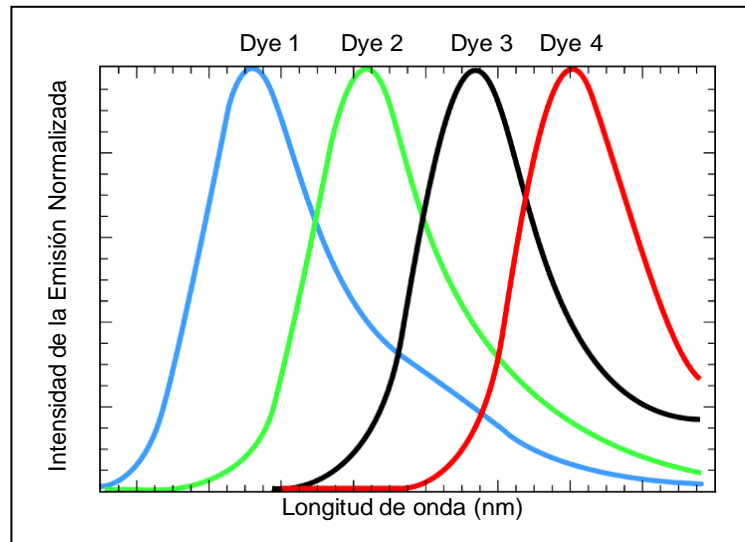


Figura 1.11: Emisión espectral de los cuatro tintes BigDye. (Applied Biosystems, 2009) Dye 1 = Big-d1110, Dye 2 = R6G, Dye 3 = Big-dTAMRA y Dye 4 = Big-dROX

#### 1.4.4 Análisis de datos

##### 1.4.4.1 Frecuencias alélicas y genotípicas

En los estudios caso-control se comparan las frecuencias alélicas y genotípicas de los diferentes marcadores evaluados entre los grupos. Una diferencia en la frecuencia alélica o genotípica de un determinado SNP en casos en comparación con los controles podrían indicar que la presencia de un alelo de un SNP podría modificar el riesgo de la enfermedad (Lewis, 2002).

#### 1.4.4.2 Equilibrio de Hardy Weinberg (HWE)

El equilibrio de Hardy Weinberg es usado para entender las características genéticas de las poblaciones. HWE establece que la composición genética de una población permanece en equilibrio mientras no actúen factores como la selección natural, migraciones y las mutaciones, que hay apareamiento al azar y que los alelos no afectan la fertilidad (Wittke, *et al.*, 2005).

#### 1.4.4.3 Análisis de asociación de un polimorfismo con la enfermedad

Para evaluar la asociación de un polimorfismo con la enfermedad se construye la tabla de contingencia correspondiente y se puede contrastar la hipótesis de asociación mediante test de  $\chi^2$ . También se pueden calcular las *odds ratios* (OR) de cada genotipo respecto de la referencia para cuantificar la magnitud de la asociación, donde: en caso de ser mayor a 1 se puede decir que el alelo o genotipo es de riesgo, pero si por el contrario es menor a 1 se considera protector (Inieta, Guinó. y Moreno, 2005).

### 1.5 - Sistema de hipótesis:

Las combinaciones de los cuatro polimorfismos de un solo nucleótido de los exones 2, 7 y 15, y la región IVS1+1813 del gen RET están asociados con la enfermedad de Hirschsprung.

## **CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1 - Participantes**

El presente proyecto fue financiado por el Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB) de la UDLA. Se contó con la colaboración del Departamento de Patología del Hospital Pediátrico Baca Ortiz de Quito, entidad que proveyó las muestras de casos afectos y controles, y el Hospital Machachi (Área de Salud No.16) que también proporcionó muestras controles, bajo la dirección del Dr. Marcelo Grijalva y la codirección de la Ing. Paola Párraga.

### **2.2 - Zona de Estudio**

El desarrollo del proyecto se realizó en su totalidad en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de las Américas (Av. de los Granados y Colimes esq.) en la ciudad de Quito, cantón Distrito Metropolitano de Quito, provincia de Pichincha.

### **2.3 - Periodo de tiempo de investigación**

Esta investigación se realizó en un período de tiempo de 10 meses a partir del 30 de noviembre del 2011, fecha en la cual fue aprobada.

## **2.4 - Diseño**

La presente investigación requirió un diseño experimental de estudio caso control y de un análisis estadístico de tipo descriptivo, que incluyó un total de 82 muestras pertenecientes a pacientes sanos y afectados. El análisis estadístico de tipo descriptivo contempló frecuencias alélicas y genotípicas, equilibrio de Hardy-Weinberg y análisis de asociación del polimorfismo con la enfermedad.

## **2.5 - Procedimientos**

### **2.5.1 Obtención de muestras**

Se obtuvieron 41 muestras de biopsias de colon de pacientes afectados con la enfermedad de Hirschsprung del Hospital Pediátrico Baca Ortiz de Quito, mediante el Departamento de Patología. Las muestras se recolectaron durante los años 2002 al 2011 y se preservaron embebidas en parafina. Se nos dio la autorización para revisar las historias clínicas de los pacientes con el objetivo de conocer datos de edad, sexo y nombre. De igual manera los controles, fueron proporcionados por el Hospital Pediátrico Baca Ortiz (20 muestras parafinadas) y el Hospital Machachi (Área de Salud No.16) contribuyó con 21 muestras de sangre periférica de niños. También, se tuvo acceso a sus historias clínicas con

datos de edad, nombre y sexo; los padres de los pacientes llenaron el respectivo consentimiento informado (Anexo A).

## **2.5.2 Extracción y purificación de ADN**

### 2.5.2.1 Extracción de ADN a partir de muestras embebidas en parafina PureLink™ Genomic ADN Kits de Invitrogen™

El aislamiento de ADN genómico de las biopsias de tejido se realizó utilizando el kit de extracción PureLink™ Genomic ADN Kit de Invitrogen™ empleando una modificación al protocolo propuesto por el fabricante (Invitrogen, 2007). El procedimiento utilizado se detalla en el Anexo B.

### 2.5.2.2 Extracción de ADN a partir de muestras sangre periférica PureLink™ Genomic ADN Kits de Invitrogen™

El aislamiento de ADN genómico de sangre periférica de las 21 muestras controles proporcionadas por el Hospital Machachi (Área de Salud No.16), se realizó utilizando el kit de extracción PureLink™ Genomic ADN Kit de Invitrogen™ empleando el protocolo propuesto por el fabricante (Invitrogen, 2007), detallado en el Anexo C.



### **2.5.3 Análisis cualitativo y cuantitativo de ADN extraído**

Se usó la electroforesis en gel de agarosa para comprobar la existencia e integridad del ADN extraído. La concentración a la cual es preparado el gel dependió del tamaño de la molécula de ADN a analizarse en el mismo. En este caso, para la visualización de ADN genómico se preparó un gel de agarosa al 1%, como se describe en el Anexo D.

El análisis cuantitativo del ADN extraído, fue realizado en un fluorómetro (*Qubit™, Invitrogen*) mediante el kit comercial *Quant-iT dsDNA HS* de Invitrogen que contiene los siguientes reactivos: fluoróforo, *buffer* de dilución y estándares de calibración. Este permite la detección de entre 0,01 y 100 ng de ADN por microlitro. El protocolo utilizado fue el sugerido por el fabricante (Invitrogen, 2010), como se detalla en Anexo E

### **2.5.4 Determinación del genotipo**

#### 2.5.4.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

##### 2.5.4.1.1 Diseño y análisis de cebadores

Los cebadores empleados para la amplificación de los exones: 2, 7 y 15 del gen RET fueron definidos por Smigiel y colaboradores (2006). Las características

de todos los cebadores fueron determinadas empleando el programa IDT OLYGO ANALYZER, las cuales están descritas en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1: Secuencia de los cebadores utilizados para la amplificación de las regiones de interés del gen RET. Secuencias tomadas de Smigiel, *et al.*, (2006)

Exón/ Intron	Cambio de nucleótido	Secuencia 5' → 3'	% CG	Tm (°C)	Longitud (pb)
2	c135G>A rs1800858	FW: CCTTATTCTCACCATCCCTCACTC	50	56.6	24
		RV: CCTGGATGCAGATCCAGTTGTTCT	50	58.9	24
7	c1296G>A rs1800860	FW: AAGGGGAGTAAAGGGTTGAGTCAG	50	58.3	24
		RV: TCATTCACAAACAGGATCCCCGAG	50	58.9	24
15	c2712C>G rs1800863	FW: CGTGCTATTTTTCTCACAGCTCG	50	58.2	24
		RV: GAGCGGAGTTCTAATTGGGTCCTT	50	58.7	24
IVS1	IVS1+1813 C>T rs2435365	FW: GATAACCCGGACACCACAGT	55	56.8	20
		RV: TGTGGAAGAACCCTCATCCT	50	55.6	20

Para la amplificación de la región IVS+1 se diseñaron cebadores utilizando el programa PRIMER 3PLUS, en base a la secuencia nucleotídica del gen RET - NCBI. El programa dio como resultado 5 posibles pares de cebadores, de los cuales se escogió un par, teniendo en cuenta las siguientes consideraciones: amplificación de la región de interés, tamaño, contenido de GC, temperatura de melting y alineamiento de secuencias (Figura 2.1)

Pair 4:

Left Primer 4:

Sequence:

Start: 11      Length: 20 bp      Tm: 59.7 °C      GC: 55.0 %      ANY: 4.0      SELF: 3.0

Right Primer 4:

Sequence:

Start: 308      Length: 20 bp      Tm: 59.5 °C      GC: 50.0 %      ANY: 4.0      SELF: 2.0

Product Size: 298 bp      Pair Any: 5.0      Pair End: 1.0

Figura 2.1: Datos de la selección del par de cebadores del software PRIMER 3PLUS, de la región IVS+1.

#### 2.5.4.1.2 Amplificación del exón 2, c135G>A

Las cantidades y concentraciones de los reactivos utilizados por reacción para la amplificación del fragmento de 238 pares de bases, que contiene el SNP rs1800858 del exón 2 del gen RET, se encuentran descritas en la Tabla 2.2

Tabla 2.2: Concentraciones y volúmenes de reactivos utilizados para la PCR del exón 2

Reactivos	Concentración inicial	Concentración Final	Volumen 1x (µL)
ADN		10 ng	3
<i>Buffer</i>	10 X	1 X	5
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	2 mM	2
dNTP's	10 mM	0,2 mM	1
Cebador <i>Fw</i>	10 µM	0,2 µM	1
Cebador <i>Rv</i>	10 µM	0,2 µM	1
Platinum Taq Pol	5 U/µL	1.5 U	0.3
Agua ultra pura	-	-	36.7
Volumen total			50

El programa de amplificación se detalla en la Tabla 2.3, usando el termociclador MultiGene™ (*Labnet International, Inc.*). Los fragmentos resultantes se observaron tras una corrida electroforética en gel de agarosa al 2% en el transiluminador *ImageQuant 300 (GE Healthcare Life Sciences)* a una longitud de onda de 365nm.

Tabla 2.3: Programa de amplificación del exón 2 del gen RET.

Nº Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	95 °C	10 min
35	94 °C	30 seg
	59.6 °C	45 seg
	72 °C	45 seg
1	72 °C	4 min
1	4 °C	∞

#### 2.5.4.1.3 Amplificación del exón 7, c1296G>A

Para la amplificación del fragmento de 474 pares de bases de la región que contiene el SNP c1296G>A del exón 7 del gen RET, se utilizaron las cantidades y concentraciones de los reactivos por reacción descritas en la Tabla 2.4

Tabla 2.4: Concentraciones y volúmenes de reactivos utilizados para la PCR del exón 7

Reactivos	Concentración inicial	Concentración Final	Volumen 1x (µL)
ADN		10 ng	3
<i>Buffer</i>	10 X	1 X	5
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	1 mM	1
dNTP's	10 mM	0,2 mM	1
Cebador <i>Fw</i>	10 µM	0,2 µM	1
Cebador <i>Rv</i>	10 µM	0,2 µM	1
Platinum Taq Pol	5 U/µL	1.5 U	0.3
Agua ultra pura			37.7
Volumen total			50

El programa de amplificación se detalla en la Tabla 2.5 y se usó el termociclador MultiGene™ (*Labnet International, Inc.*). Los fragmentos resultantes se observan tras corrida electroforética en gel de agarosa al 2% en el transiluminador *ImageQuant 300 (GE Healthcare Life Sciences)* a una longitud de onda de 365nm.

Tabla 2.5: Programa de amplificación del exón 7, gen RET.

Nº Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	95 °C	10 min
35	94 °C	30 seg
	58.3 °C	45 seg
	72 °C	45 seg
1	72 °C	4 min
1	4 °C	∞

#### 2.5.4.1.4 Amplificación del exón 15, c2712C>G

En la Tabla 2.6 se describen las cantidades y concentraciones de los reactivos utilizados por reacción para la amplificación del fragmento de 323 pares de bases, que contiene el SNP c2712C>G del exón 15 del gen RET.

Tabla 2.6: Concentraciones y volúmenes de reactivos utilizados para la PCR del exón 15.

Reactivos	Concentración inicial	Concentración Final	Volumen 1x (µL)
ADN		10 ng	3
<i>Buffer</i>	10 X	1 X	5
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	2 mM	2
dNTP's	10 mM	0,4 mM	2
Cebador <i>Fw</i>	10 µM	0,2 µM	1
Cebador <i>Rv</i>	10 µM	0,2 µM	1
Platinum Taq Pol	5 U/µL	1.5 U	0.3
Agua ultra pura			35.7
Volumen total			50

El programa de amplificación se detalla en la Tabla 2.7 y se usó el termociclador MultiGene™ (*Labnet International, Inc.*). Los fragmentos resultantes se observaron tras una corrida electroforética en gel de agarosa al 2% en el transiluminador *ImageQuant 300* (*GE Healthcare Life Sciences*) a una longitud de onda de 365nm.

Tabla 2.7: Programa de amplificación del exón 15 del gen RET

Nº Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	95 °C	10 min
35	94 °C	30 seg
	61.6 °C	45 seg
	72 °C	50 seg
1	72 °C	4 min
1	4 °C	∞

#### 2.5.4.1.5 Amplificación de la región intrónica, IVS1+1813 C>T

Las cantidades y concentraciones de los reactivos utilizados por reacción en la amplificación del fragmento de 298 pares de bases, que contiene el SNP IVS1+1813C>T del gen RET, se encuentran descritas en la Tabla .2 8

Tabla 2.8: Concentraciones y volúmenes de reactivos utilizados para la PCR del intrón 1.

Reactivos	Concentración inicial	Concentración Final	Volumen 1x (µL)
ADN		10 ng	3
<i>Buffer</i>	10 X	1 X	5
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	1 mM	1
dNTP's	10 mM	0,2 mM	1
Cebador <i>Fw</i>	10 µM	0,2 µM	1
Cebador <i>Rv</i>	10 µM	0,2 µM	1
Platinum Taq Pol	5 U/µL	2 U	0.4
Agua ultra pura			37.6
Volumen total			50

El programa de amplificación se detalla en la Tabla 2.9 y se usó el termociclador MultiGene™ (*Labnet International, Inc.*). Los fragmentos resultantes se observaron tras una corrida electroforética en gel de agarosa al 2% en el transiluminador *ImageQuant 300* (*GE Healthcare Life Sciences*) a una longitud de onda de 365nm.

Tabla 2.9: Programa de amplificación del intrón 1, gen RET

<b>Nº Ciclos</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>
1	95 °C	10 min
35	94 °C	30 seg
	58.9 °C	45 seg
	72 °C	1 min
1	72 °C	4 min
1	4 °C	∞

#### 2.5.4.2 Digestión para análisis de los fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP)

La determinación de las enzimas adecuadas para la digestión de los fragmentos se realizó mediante la correlación de las secuencias de los mismos con la base de datos de enzimas de restricción de New England Biolabs® Inc., usando la aplicación web NEBcutter V2.0 de esta casa fabricante (New England Biolabs, 2011).



#### 2.5.4.2.1 Polimorfismo c135G>A

El polimorfismo corresponde a un SNP localizado en el exón 2 del gen RET en la posición 135 y corresponde a una sustitución de G por A (c135 G>A), en el codón 45 (A45A). La digestión del producto de PCR de la región del exón 2 se realizó con la enzima de restricción *EagI* de *New England Biolabs® Inc.* El genotipo de un individuo, de acuerdo a este polimorfismo, podría ser: homocigoto (GG o AA) o heterocigoto (GA). El sitio de reconocimiento de la enzima de restricción *EagI* es:



El reconocimiento y revelado de genotipo se da gracias a la digestión con esta enzima. El protocolo utilizado se describe en la Tabla 2.10

Tabla 2.10: Concentraciones y volúmenes de reactivos utilizados para la PCR-RFLP del exón 2

Reactivos	Concentración inicial	Concentración Final	Volumen 1x (µL)
PCR	-	-	10
<i>Buffer 3</i>	10X	1 X	2
Enzima <i>EagI</i>	10 U/µL	7 U	0.7
Agua ultra pura	-	-	7.3
Volumen total			20

La digestión se realizó durante 4 horas a 37°C en el termociclador Multigene™ (*Labnet International, Inc.*). Posteriormente las muestras se corrieron en un gel de agarosa al 4%. El genotipo homocigoto GG se identificó al observar 2 bandas resultantes de la digestión (134bp y 104 bp), el genotipo homocigoto AA al observar una banda de 238 bp y el genotipo heterocigoto GA al observar 3 bandas (238 bp, 134bp y 104 bp).

#### 2.5.4.2.2 Polimorfismo c1296G>A

El polimorfismo corresponde a un SNP localizado en el exón 7 del gen RET en la posición 1296 y corresponde a una sustitución G por A (c1296G>A), en el codón 432 (A432A). La digestión del producto de PCR se realizó con la enzima de restricción *BsmI* de *New England Biolabs® Inc.* El genotipo de un individuo, de acuerdo a este polimorfismo, podría ser: homocigoto (GG o AA) o heterocigoto (GA). El sitio de reconocimiento de la enzima de restricción *BsmI* es:



El reconocimiento y revelado de genotipo se realizó gracias a la digestión con la enzima *BsmI*, las cantidades y concentraciones de los reactivos utilizados por reacción se detallan en la Tabla 2.11

Tabla 2.11: Concentraciones y volúmenes de reactivos utilizados para la PCR-RFLP del exón

7.

Reactivos	Concentración inicial	Concentración Final	Volumen 1x (μL)
PCR	-	-	10
<i>Buffer 4</i>	10X	1 X	2
Enzima <i>BsmI</i>	10 U/μL	7 U	0.7
Agua ultra pura	-	-	7.3
Volumen total			20

La digestión se llevó a cabo durante 4 horas a 65°C en el termociclador Multigene™ (*Labnet International, Inc.*). Posteriormente, las muestras se corrieron en un gel de agarosa al 4%. El genotipo homocigoto GG se identificó al observar una banda de 394 bp, el genotipo homocigoto AA al observar una banda de 362 bp y el genotipo heterocigoto GA al observar 2 bandas de 394 bp y 362 bp

#### 2.5.4.2.3 Polimorfismo c2712C > G

Este polimorfismo corresponde a un SNP c2712C>G localizado en el exón 15 del gen RET. La digestión del producto de PCR de la región del exón 15

se realizó con la enzima de restricción *Rsal* de *New England Biolabs® Inc.* El genotipo de un individuo, de acuerdo a este polimorfismo, podría ser: homocigoto (GG o CC) o heterocigoto (GC). El sitio de reconocimiento de la enzima de restricción *Rsal* es:



El reconocimiento y revelado de genotipo se da gracias a la digestión con la enzima *Rsal*, las cantidades y concentraciones de los reactivos utilizados por reacción se detallan en la Tabla 2.12

Tabla 2.12. Concentraciones y volúmenes de reactivos utilizados para la PCR-RFLP del exón

15.

Reactivos	Concentración inicial	Concentración Final	Volumen 1x (μL)
PCR	-	-	10
<i>Buffer 4</i>	10X	1 X	2
Enzima <i>Rsal</i>	10U/μL	7 U	0.7
Agua ultra pura	-	-	7.3
Volumen total			20

La digestión se realizó durante 4 horas a 37°C en el termociclador Multigene™ (*Labnet International, Inc.*). Posteriormente, las muestras se corrieron en un gel de agarosa al 4%. El genotipo homocigoto GG se identificó al observar

2 bandas resultantes de la digestión (197bp y 126 bp), el genotipo homocigoto CC al observar una banda de 323 bp y el genotipo heterocigoto GC al observar 3 bandas (323 bp, 197bp y 126 bp).

### 2.5.5 Secuenciación

Una vez estandarizada la PCR convencional de la región IVS +1 del gen RET, se procedió a secuenciar el producto de PCR. El método se encuentra esquematizado en la Figura 2.2.

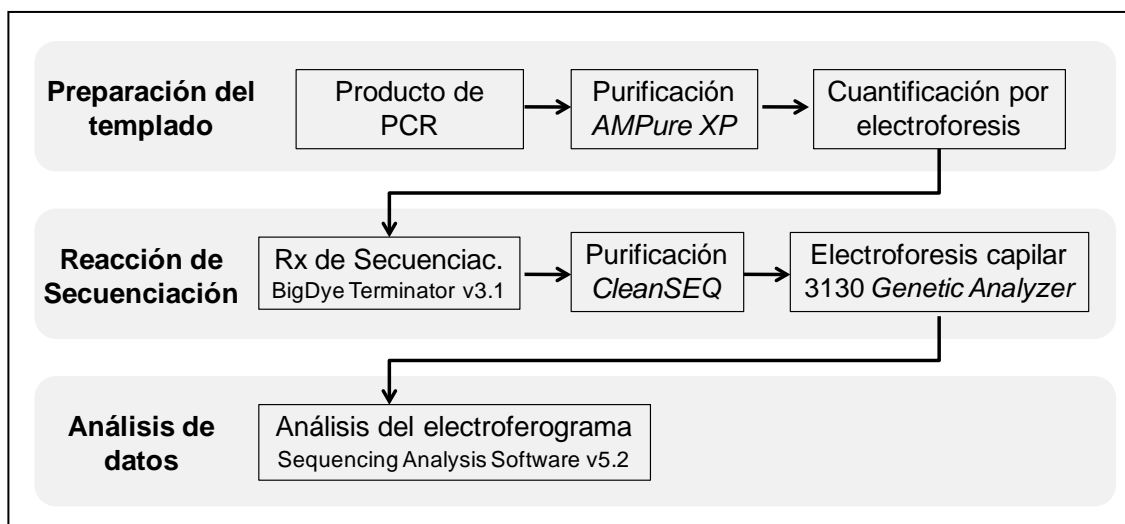


Figura 2.2: Diagrama de la secuenciación automática utilizada. Modificado de Applied Biosystems, (2009).

### 2.5.5.1 Purificación del Producto de PCR, AMPure XP

Los fragmentos amplificados de la región IVS del gen RET se trataron con *Agencourt® AMPure® XP* (*Beckman Coulter Genomics*), con el fin de purificar el producto de PCR, eliminando el exceso de *primers*, dímeros de *primers*, nucleótidos libres y sales. *AMPure Xtra Performance*, es un sistema altamente eficaz basado en el sistema de separación magnética y su tecnología llamada Fase Sólida de Inmovilización Reversible (SPRI® por sus siglas en inglés: Solid Phase Reverse Immobilization). Los ácidos nucleicos de interés son inmovilizados en las micropartículas magnéticas bajo condiciones específicas de tampones de trabajo. Se siguió el protocolo sugerido por el fabricante (*Beckman Coulter, Inc, 2009*), el mismo que se detalla en el Anexo F y se esquematiza en la Figura 2.3:

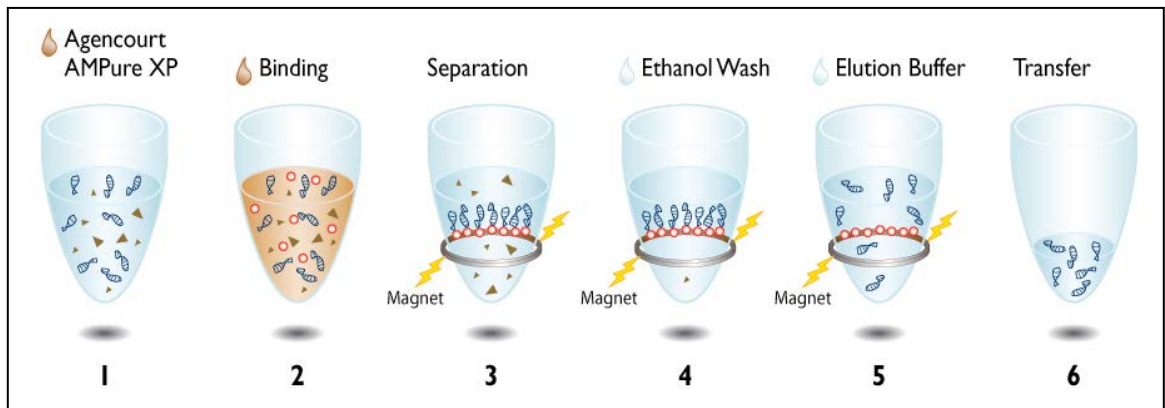


Figura 2.3: Procedimiento utilizado en la purificación del producto de PCR, mediante Ampure XP

(Beckman Coulter, Inc. 2009)

### 2.5.5.2 Cuantificación por electroforesis

Posteriormente a la purificación con *AMPure XP*, se cuantificó el producto de PCR purificado, mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2%, con el fin de examinar la calidad del ADN. El ADN purificado debe verse como una sola banda en el gel; además, dependiendo de la intensidad de la banda, se colocará el volumen del producto purificado de la PCR en la reacción de secuenciación, donde: se añadirá 4  $\mu\text{L}$  para una banda leve, para una media 3  $\mu\text{L}$  y para una banda fuerte 2  $\mu\text{L}$ .

### 2.5.5.3 Reacción de Secuenciación

Una vez obtenido los productos de PCR purificados y cuantificados, se continuó con el ciclo para secuenciación, método que se basa en la acción de cuatro terminadores dideoxi (ddNTPs) marcados con diferentes marcadores fluorescentes en la reacción de PCR. La reacción de marcaje se realizó en la cámara de flujo laminar apagando la luz blanca de la misma empleando el kit de secuenciación *ABI PRISM™ BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*, (el kit contiene los reactivos necesarios para la reacción de secuenciación, únicamente hay que añadir el *primer*, el producto de PCR y agua ultra pura). El kit incluye *BigDye® Terminator v3.1* y un *buffer* de secuenciación 5X.

En la reacción de secuenciación se utilizó las cantidades y concentraciones de los reactivos detallados en la Tabla 2.13 y se empleó el cebador Forward 5' GAT AAC CCG GAC ACC ACA GT 3':

Tabla 2.13: Concentraciones y volúmenes de reactivos utilizados para la reacción de secuenciación de la región intrónica.

Reactivos	Concentración inicial	Concentración Final	Volumen 1x (µL)
PCR	3 –10 ng	-	2 - 4
Cebador <i>Fw</i>	10 µM	3.2 pmol	3.2
<i>Buffer</i> BigDye 4	5 X	1 X	2
BigDye v3.1	-	-	1
Agua ultra pura	-	-	c.s.
Volumen total			10

c.s: cantidad suficiente

Se utilizó el termociclador MultiGene™ (Labnet International, Inc.) con el siguiente programa (Tabla 2.14):

Tabla 2.14: Programa de condiciones térmicas del ciclo de secuenciación. (Applied Biosystems, 2009).

Nº Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	96 °C	3 min
25	96 °C	10 seg
	50 °C	5 seg
	60 °C	4 min
1	4 °C	∞



#### 2.5.5.4 Purificación de la Reacción de Secuenciación, CleanSEQ

Las reacciones de secuenciación se purificaron usando *Agencourt CleanSEQ* (Beckman Coulter Genomics), con el fin de purificar los productos de extensión de la reacción de secuenciación, eliminando así ddNTPs libres, dNTPs libres, sales y contaminantes. Este método se basó en el mismo procedimiento descrito en la purificación del producto de *PCR AMPure XP*. Sin embargo durante la realización de este procedimiento debe protegerse de la exposición a la luz blanca. Se siguió el protocolo propuesto por el fabricante Beckman Coulter, (2006) el mismo que se detalla en Anexo G y se resume en la Figura 2.4:

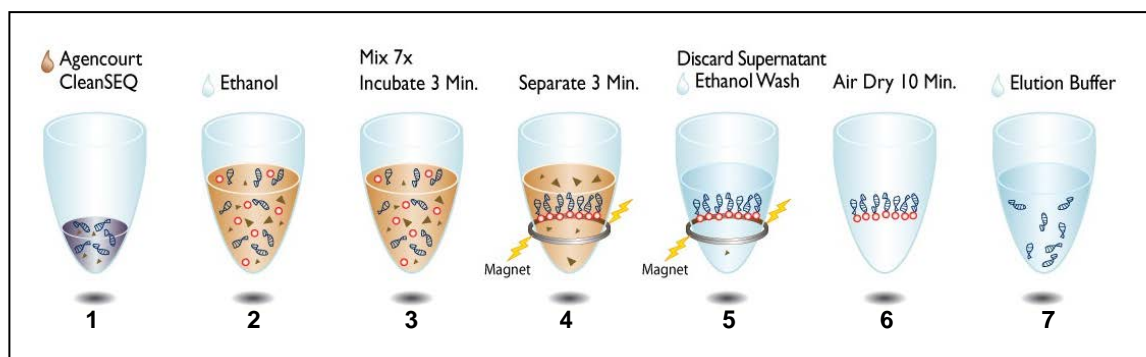


Figura 2.4: Procedimiento utilizado en la purificación de la reacción de secuenciación, mediante CleanSEQ (Beckman Coulter, Inc. 2006)

#### 2.5.5.5 Electroforesis capilar y análisis

Una vez purificadas las muestras *Agencourt CleanSEQ (Beckman Coulter Genomics)*, éstas se introdujeron en la placa del secuenciador, siguiendo la metodología del fabricante. El equipo funciona de manera totalmente automática, inyectando las muestras en un capilar previamente cargado con un polímero que funciona como si fuera un gel de secuenciación, permitiendo separar fragmentos de ADN de cadena sencilla que se diferencian en una única base. A una altura determinada, el láser del dispositivo detecta la fluorescencia emitida por el ADN fluorescente de cadena sencilla y traduce dicha emisión en la secuencia correspondiente.

La secuenciación de ADN se realizó en el secuenciador automático ABI PRISM™ 3130 *Genetic Analyzer (Applied Biosystems HITACHI)* empleando el método de Sanger de terminación de cadena y utilizando terminadores dideoxi marcados con la utilización de un cebador específico mediante varios ciclos de PCR. La secuenciación se realizó en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, Quito-Ecuador.

Finalmente, una vez terminada la electroforesis capilar se obtienen como resultado los electroferogramas, los cuales presentan una sucesión de picos de cuatro colores (rojo, azul, verde y negro). El color de cada pico representa una base nitrogenada (timinina, citosina, adenina y guanina, respectivamente). Los

electroferogramas fueron analizados mediante el Software Sequencing Analysis v5.2 (*Applied Biosystems*), y las secuencias obtenidas del fragmento de ADN estudiado se compararon con las descritas en la base electrónica de datos NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

#### 2.5.5.6 Polimorfismo IVS1+1813C>T

Este polimorfismo corresponde a una sustitución de citosina por timina en el nucleótido +1813 del intrón 1. El genotipo del mismo se visualizó en un electroferograma utilizando el paquete informático Sequencing Analyzing Software Version 5.2 (*Applied Biosystems*), una vez finalizada la secuenciación. Dado que cada uno de los cuatro ddNTPs lleva unido un fluorocromo diferente, el color del pico obtenido en el electroferograma, indica el genotipo de la muestra en la posición estudiada. El genotipo de un individuo, de acuerdo a este polimorfismo, podría ser: homocigoto (CC o TT) o heterocigoto (CT).

El genotipo homocigoto CC se determina al observar un pico de color azul, indicando la presencia de citosina. El genotipo homocigoto TT se confirma al observar un pico de color rojo en la posición estudiada, indicando la presencia de timina y el genotipo heterocigoto CT se determina al observar 2 curvas sobrepuestas, es decir una de color azul y otra roja, en la misma posición.

## 2.6 - Análisis de Datos

Una vez determinado el genotipo de los individuos afectos y controles se procedió a calcular la frecuencia alélica de las variantes estudiadas. Para esto se dividió el número de alelos alterados para el número total de alelos estudiados en el grupo, siendo el doble de individuos estudiados debido a que cada individuo posee dos alelos. Además se calculó la frecuencia genotípica para los grupos afectos y control. Este cálculo se realizó dividiendo el número de individuos con cada genotipo para el número total de individuos. Para determinar el equilibrio en la población estudiada, la suma de las frecuencias genotípicas para un solo locus debe ser igual a 1,00. Las frecuencias esperadas se obtienen a partir de las frecuencias alélicas mediante la ecuación de Hardy-Weinberg. De esta manera, las frecuencias de los individuos homocigotos consiste en la frecuencia de cada alelo elevado al cuadrado ( $p^2$  y  $q^2$ ), mientras que la frecuencia de los individuos heterocigotos es dos veces la frecuencia de cada alelo ( $2pq$ ) (Stephenson, 2003).

Para determinar si existían diferencias significativas entre los individuos afectos y control para los polimorfismos estudiados, se realizó el análisis estadístico mediante la prueba Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) usando el programa SPSS® 17.0 para Windows®. Finalmente la prueba de Odds Ratio fue usada para determinar el riesgo relativo de desarrollar la enfermedad de Hirschsprung para cada genotipo estudiado, entre individuos afectos con respecto a los controles, usando tablas de contingencia 2x2. (Ponce., Martínez y Ávila, 2001).

## CAPÍTULO 3: RESULTADOS

### 3.1 - Edad

Al momento de la toma de la muestra, según el Anexo H, la edad promedio de todos los individuos estudiados fue de 3,44 años con un rango de 0.042 (15 días) a 12 años. Dentro de los individuos afectados con HSCR la edad promedio es de  $2,86 \pm 2.74$  años en el rango de 0.042 a 11 años. En este grupo se encontró que 21 (51.22%) individuos tenían una edad inferior a la edad promedio, mientras que 20 (48.78%) individuos están sobre el promedio. La edad promedio de los individuos controles fue  $3,97 \pm 3.54$  años dentro de un rango de 0.061(22 días) a 12 años. En este grupo se encontró que 26 (63,41%) individuos se encuentran por debajo del promedio de edad, mientras que 15 (36,59%) están sobre el promedio. Además, en la Figura 3.1 se muestra la distribución etaria de los pacientes con Hirschsprung, de los 41 pacientes: 20 fueron menores de 2 años, 15 en el grupo de 3 a 5 años, 4 en el grupo de 6 a 8 años y 2 pacientes en el grupo de edad de 9 a 11 años.

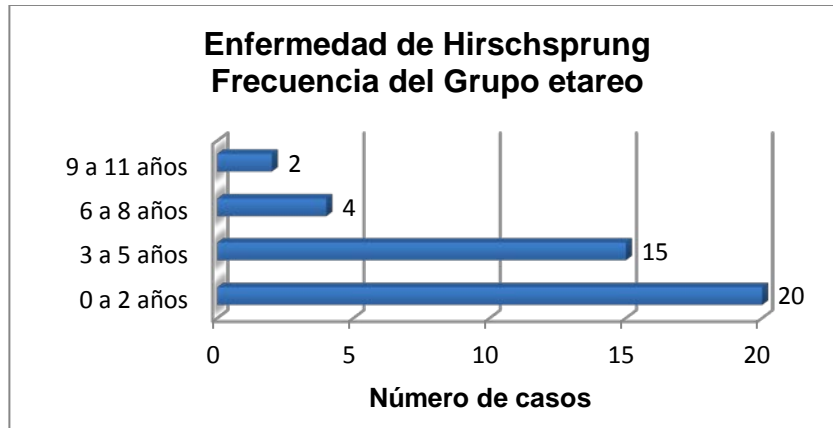


Figura 3.1: Distribución etaria de los pacientes con HSCR analizados en el presente estudio.

### 3.2 - Sexo

En cuanto al género del total de 82 individuos analizados en el presente estudio, 54 (65,85%) corresponden al sexo masculino y 28 (34,15%) son de sexo femenino. En cuanto a los casos afectos con HSCR, 28 fueron hombres (68.29%) y 13 mujeres (31.71%). Mientras, los 41 controles se dividieron en 26 hombres (63.41%) y 15 mujeres (36.59%); como se observa en la Figura 3.2.

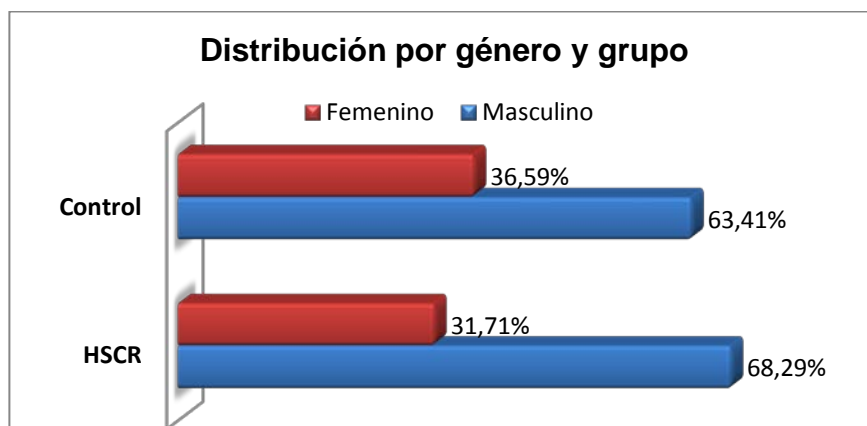


Figura 3.2: Distribución de los casos controles y afectos, por género.

### 3.3 - Extracción de ADN

Mediante la aplicación del protocolo de extracción de ADN de tejido detallado en el capítulo anterior, se obtuvieron 61 muestras (41 de individuos afectados con HSCR y 20 de los controles), ver Anexo H. Luego de la electroforesis en gel de agarosa se aprecia la presencia de ADN genómico degradado de las muestras de tejido embebido en parafina (Figura 3.3).

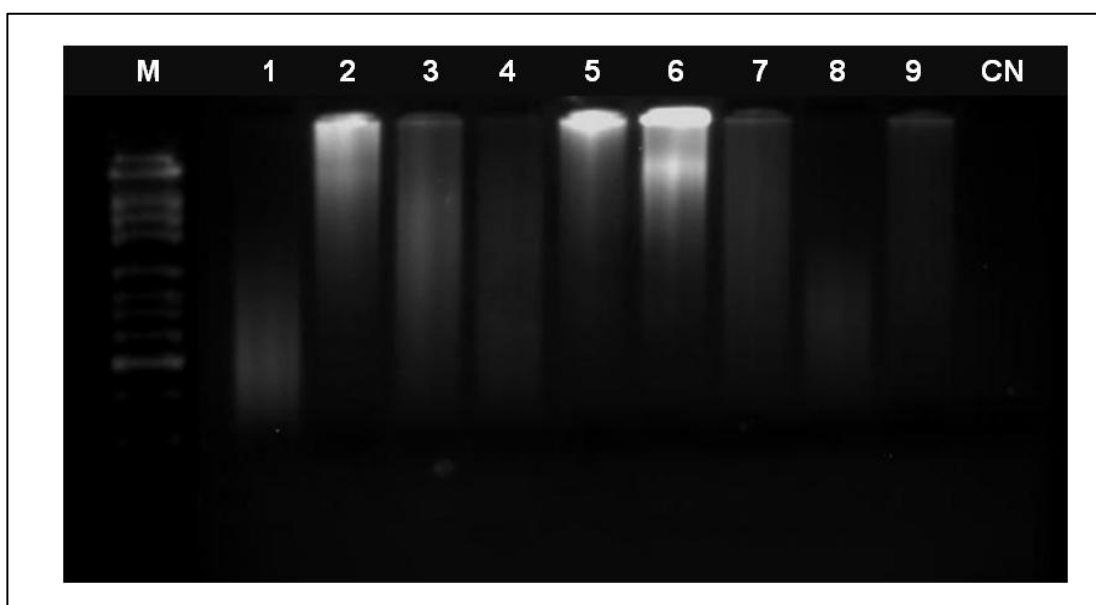


Figura 3.3: Fotografía de un gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio de los resultados de la extracción de ADN genómico de muestras embebidas en parafina. M: Marcador molecular de 100pb, 1 – 9: Muestras, CN: Control negativo.

Mediante el uso del protocolo de extracción de ADN a partir de muestras de sangre periférica, detallado en el capítulo anterior, se obtuvo ADN genómico

de 21 muestras controles (Anexo H). En la Figura 3.4 se observa ADN genómico de alto peso molecular e integro.

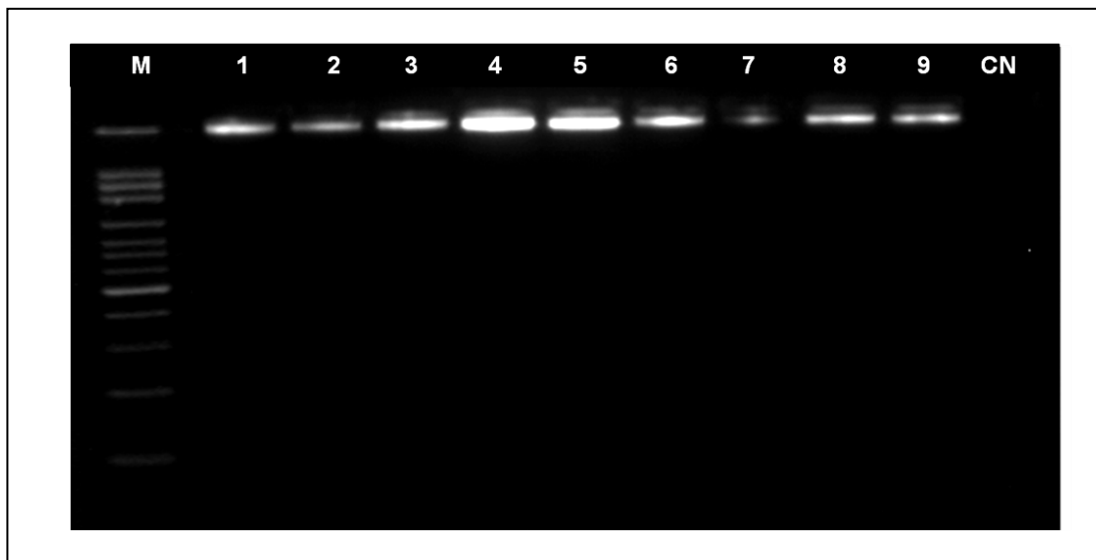


Figura 3.4: Fotografía de un gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio de los resultados de la extracción de ADN genómico de muestras de sangre periférica. M: Marcador molecular de 100pb, 1 – 9: Muestras, CN: Control negativo

La cuantificación del ADN total se realizó por fluorometría con el kit comercial *Quant-iT dsDNA HS* en el equipo Qubit® (Invitrogen) según el protocolo detallado en la sección anterior. Según el Anexo H, la concentración de ADN en el grupo de afectos presenta un rango de 4.43 ng/ $\mu$ L a 103 ng/ $\mu$ L con una concentración promedio de  $34.33 \pm 20.17$  ng/ $\mu$ L, mientras que en las muestras de ADN de los individuos del grupo control presentan un rango de 11 ng/ $\mu$ L a 135 ng/ $\mu$ L con un promedio de concentración de  $56,91 \pm 35.51$  ng/ $\mu$ L.



### 3.4 - Determinación de genotipo

#### 3.4.1 Reacción en cadena de polimerasa (PCR)

Después de la optimización de la técnica PCR, se establecieron las cantidades y concentraciones más adecuadas de cada uno de los reactivos utilizados, así como las condiciones óptimas de termociclado; descritas previamente en el capítulo de materiales y métodos.

Mediante la PCR se amplificaron los 4 fragmentos de interés: exón 2, exón 7, exón 15 e intrón 1 del gen RET, que contienen cada uno de los polimorfismos bajo estudio.

##### 3.4.1.1 Amplificación del exón 2, c135G>A

Se obtuvo la óptima amplificación de un fragmento de 238 pares de bases del exón 2 del gen RET que contiene el polimorfismo c135 G>A, tanto en los grupos afectados como en los controles. Los resultados fueron observados en un gel de agarosa al 2% en el transiluminador *ImageQuant 300*, como se presenta en la Figura 3.5.

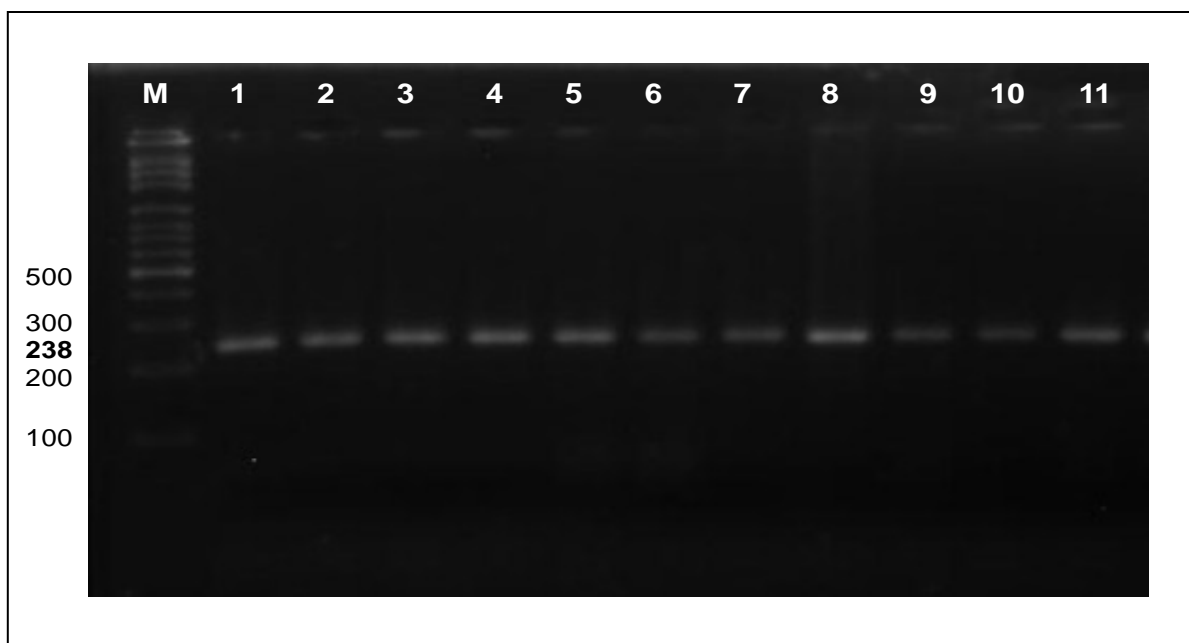


Figura 3.5: Fotografía de un gel de agarosa al 2 % teñido con bromuro de etidio de los resultados de la amplificación del exón 2. 1 – 11: Muestras, M: Marcador de peso molecular de 100pb.

#### 3.4.1.2 Amplificación del exón 7, c1296G>A

La Figura 3.6 muestra la amplificación de los fragmentos de 474 pares de bases que contiene el SNP c1296G>A del exón 7 del gen RET, en casos afectados y controles. Los resultados fueron observados en un gel de agarosa al 2% bajo exposición a luz UV, en el transiluminador *ImageQuant 300*.

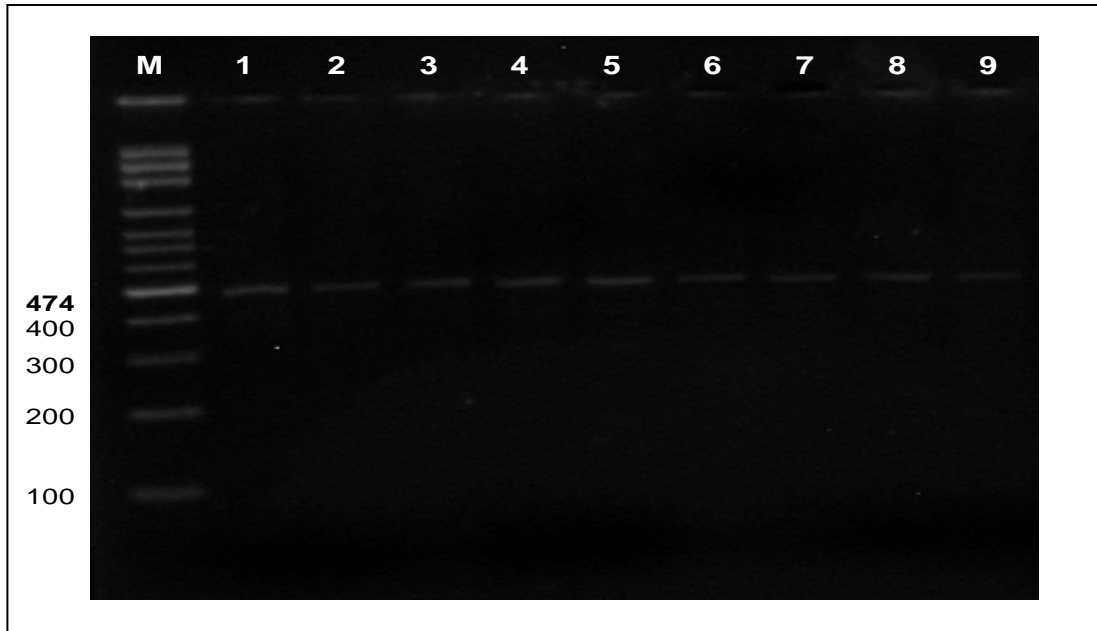


Figura 3.6: Fotografía de un gel de agarosa al 2 % teñido con bromuro de etidio de los resultados de la amplificación del exón 7. 1 – 9: Muestras, M: Marcador molecular de 100pb.

#### 3.4.1.3 Amplificación del exón 15, c2712C>G

En la Figura 3.7 se observa la amplificación del fragmento de 323 pares de bases de la región del exón 15 del gen RET, que contiene el SNP c2712C > G, en casos afectos y controles. Los resultados fueron revelados tras una corrida electroforética en un gel de agarosa al 2% visto en el transiluminador.

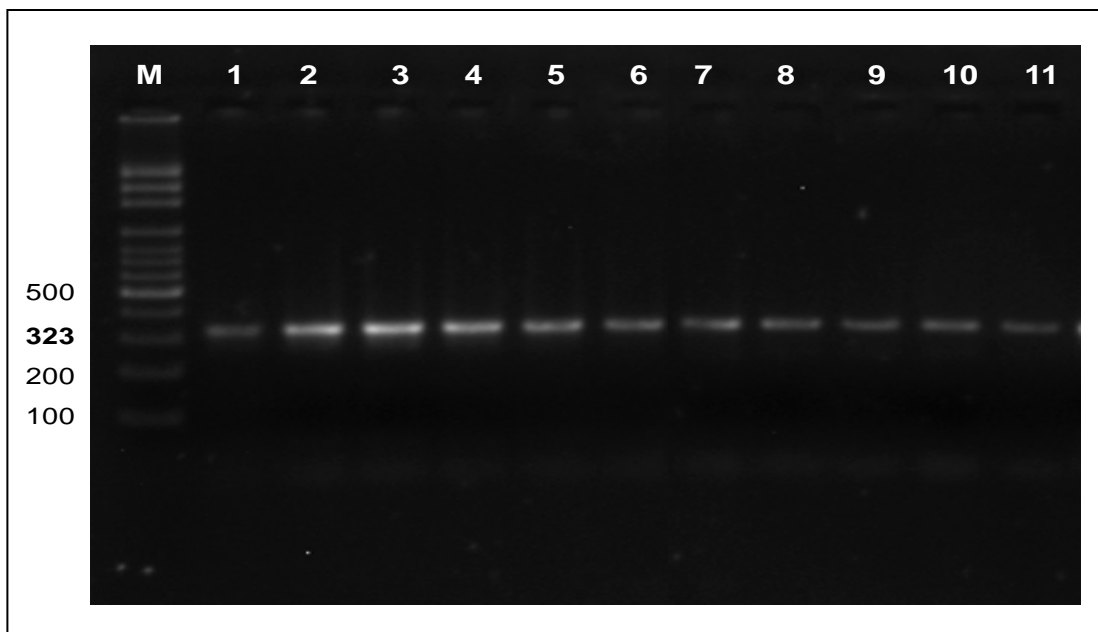


Figura 3.7: Fotografía de un gel de agarosa al 2 % teñido con bromuro de etidio de los resultados de la amplificación del exón 15. 1 – 11: Muestras, M: Marcador de peso molecular de 100pb.

#### 3.4.1.4 Amplificación de la región intrónica, IVS1+1813 C>T

Mediante la técnica de PCR optimizada se obtuvieron fragmentos amplificación de 298 pares de bases que contiene el SNP IVS1+1813C>T, localizado en el intrón uno, en los casos afectos y controles. Los resultados fueron revelados tras la corrida electroforética en un gel de agarosa al 2% visto en el transiluminador (Figura 3.8).

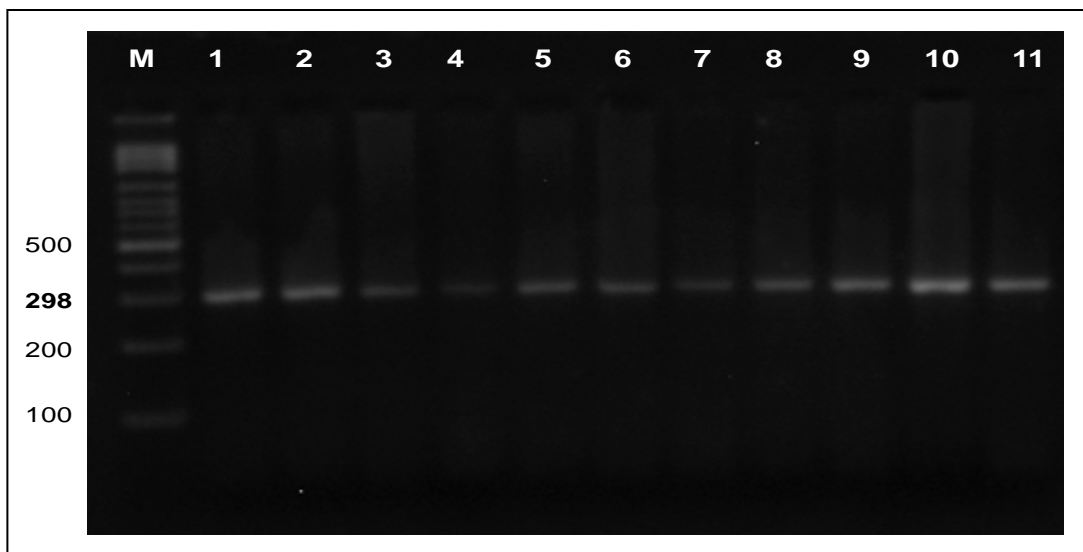


Figura 3.8: Fotografía de un gel de agarosa al 2 % teñido con bromuro de etidio de los resultados de la amplificación del intrón 1. 1 – 11: Muestras, M: Marcador molecular de 100pb.

### 3.4.2 Digestión con enzimas de restricción

Los tres productos de amplificación de los exones 2, 7 y 15 del gen RET, que contienen los polimorfismos de interés, se utilizaron para la digestión con su respectiva enzima de restricción, revelando así los diferentes genotipos.

#### 3.4.2.1 Polimorfismo c135G>A

Los resultados de la digestión con la enzima *EagI* de los productos PCR de 238 pb se observan en la Figura 3.9. Además, se tuvo la oportunidad de verificar los resultados obtenidos por digestión enzimática del exón 2, mediante

secuenciación. En el anexo I se detallan los electroferogramas mostrando los genotipos GG, AA y GA.

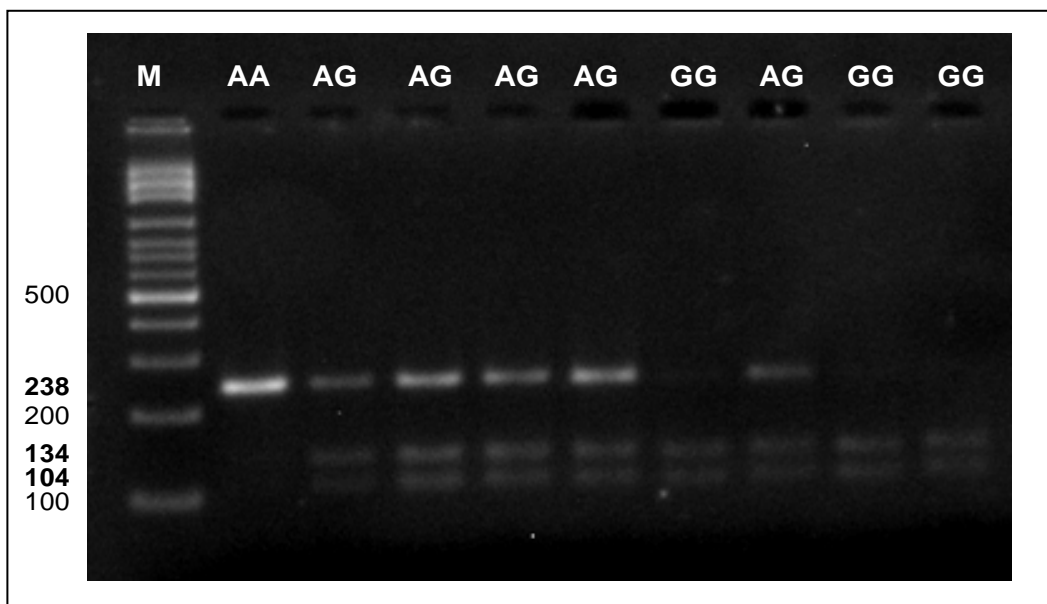


Figura 3.9: Fotografía de un gel de agarosa al 4 % teñido con bromuro de etidio de los resultados de la digestión enzimática con *EagI* del producto de PCR del exón 2. AA AG GG:

Genotipos, M: Marcador de peso molecular de 100pb

#### 3.4.2.2 Polimorfismo c1296G>A

Los resultados de la digestión de los productos de PCR de 474 pb, con la enzima de restricción *BsmI* en condiciones ya descritas en el capítulo anterior se presentan a continuación en la Figura 3.10.

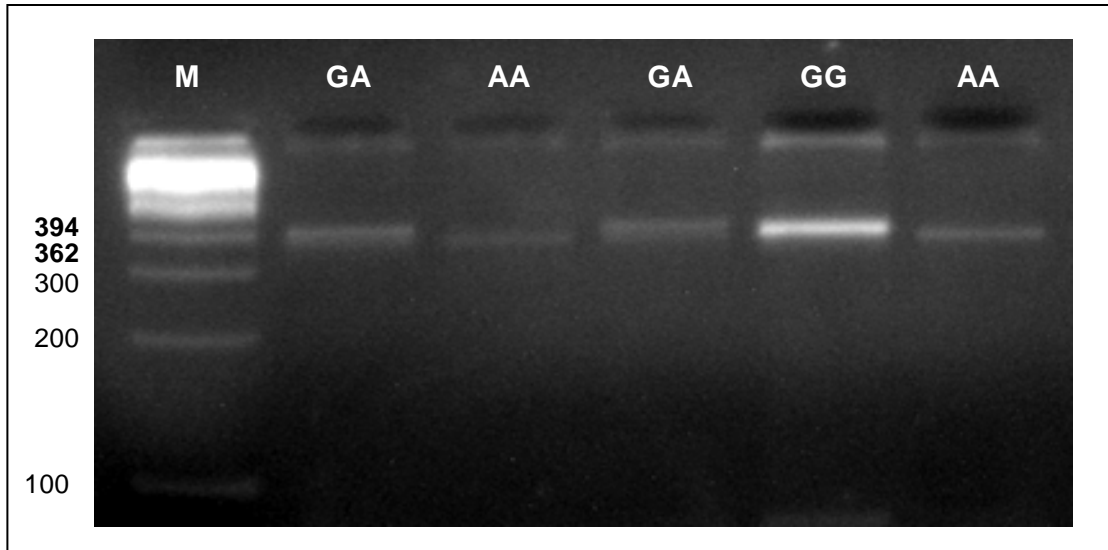


Figura 3.10: Fotografía de un gel de agarosa al 4 % teñido con bromuro de etidio de los resultados de la digestión enzimática con *BsmI* del producto de PCR del exón 7. AA AG GG: Genotipos, M: Marcador de peso molecular de 100pb.

Además, se tuvo la oportunidad de verificar los resultados obtenidos por digestión enzimática del exón 7, mediante la secuenciación de Sanger. En el Anexo J se detallan los electroferogramas mostrando los genotipos GG, AA y GA.

#### 3.4.2.3 Polimorfismo c2712C>G

Los resultados de la digestión de los productos PCR de 323 pb con la enzima de restricción *RsaI* en las condiciones descritas en la sección previa se presentan a continuación en la Figura 3.11:

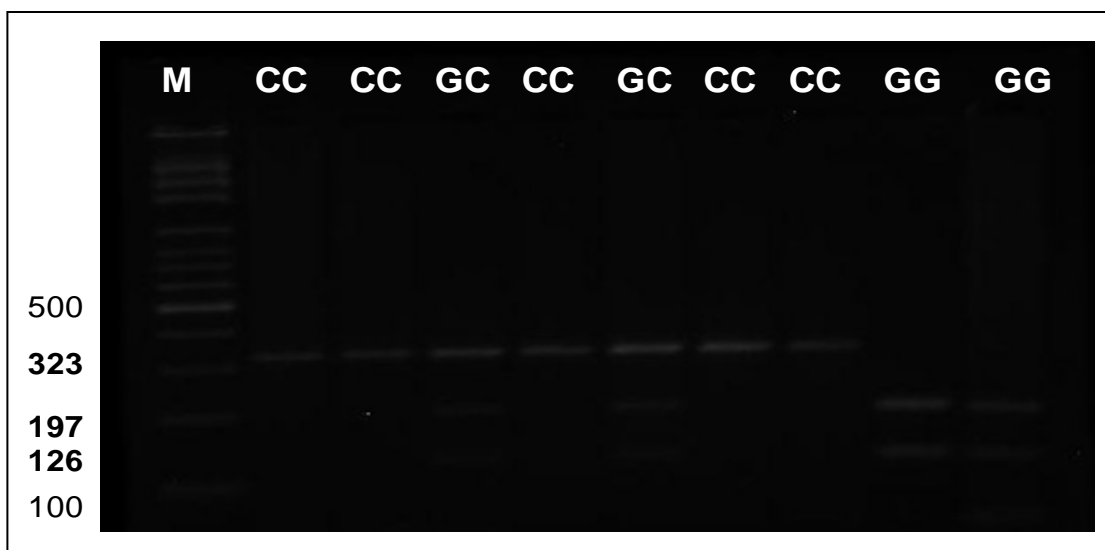


Figura 3.11: Fotografía de un gel de agarosa al 4 % teñido con bromuro de etidio de los resultados de la digestión enzimática con *RsaI* del producto de PCR del exón 15. CC GC CC: Genotipos, M: Marcador de peso molecular de 100pb

### 3.4.3 Secuenciación

#### 3.4.3.1 Polimorfismo IVS1+1813 C>T

Una vez finalizado el proceso de secuenciación detallado en la sección previa, se inspeccionaron visualmente los electroferogramas, proporcionando uno de los tres genotipos posibles, los mismos que se observan en la Figura 3.12.



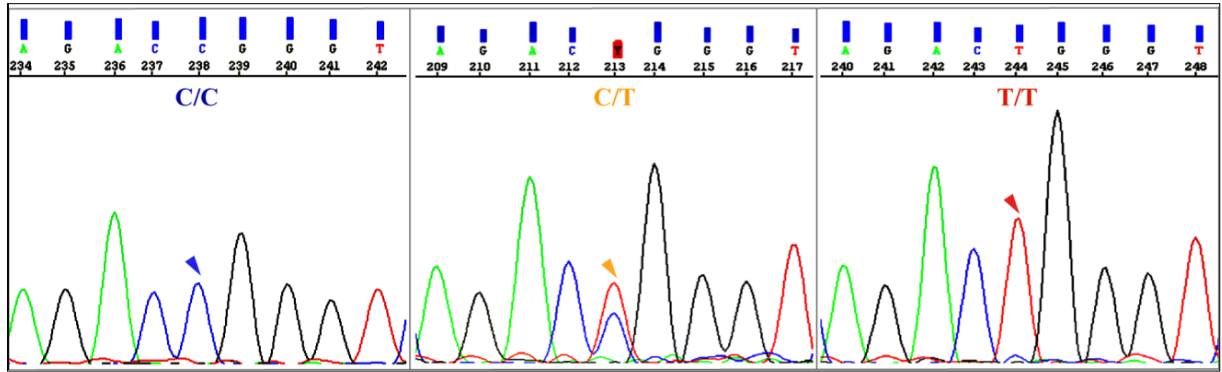


Figura 3.12: Fotografía del resultado de secuenciación de la región intrónica del gen RET.  
Electroferogramas del Homocigoto CC, Heterocigoto CT y Homocigoto TT

### 3.4.4 Frecuencia de alelos y análisis de Hardy-Weinberg

Una vez recopilados los genotipos observados por medio de la digestión enzimática (de los SNPs localizados en los exones 2, 7 y 15) y la secuenciación de la región intrónica, detallado en el Anexo K, se analizaron frecuencias de cada polimorfismo.

#### 3.4.4.1 Polimorfismo c135G>A

La distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas se detalla en la Tabla 3.1. Del grupo de casos afectados, 2 individuos fueron homocigotos normales (GG), 6 fueron homocigotos raros (AA) y 33 individuos fueron heterocigotos (GA). En el grupo de controles se encontró que 15 individuos eran homocigotos normales (GG), 4 eran homocigotos raros (AA) y 22 fueron heterocigotos (GA). En cuanto a la frecuencia del alelo G, en los casos afectados fue de 0,45 y en los

controles de 0,63; mientras que la frecuencia del alelo A en casos afectos y controles fueron de 0,55 y 0,37 respectivamente. Mediante el análisis de chi cuadrado realizado para cada grupo, se obtuvieron valores que muestran que el grupo de individuos afectos no se encuentra en equilibrio Hardy Weinberg, al contrario del grupo control, lo que puede significar la existencia de una relación entre el polimorfismo y la enfermedad.

Tabla 3.1: Análisis Hardy-Weinberg para el polimorfismo c135G>A

Población	Genotipo	No. de individuos	%	Frecuencia Genotípica	Frecuencia esperada	Frecuencia alélica	$\chi^2$ HWE	<i>p</i>
Afectos	G/G	2	4.88	0.05	0.20	0.45	16.03*	0.00006
	G/A	33	80.49	0.80	0.50			
	A/A	6	14.63	0.15	0.30	0.55		
	Total	41						
Controles	G/G	15	36.59	0.37	0.40	0.63	1.003	0.32
	G/A	22	53.66	0.54	0.46			
	A/A	4	9.76	0.10	0.13	0.37		
	Total	41						

\* Valor fuera del equilibrio Hardy-Weinberg

#### 3.4.4.2 Polimorfismo c1296G>A

La distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo c1296G>A se detalla en la Tabla 3.4. Del grupo de casos afectos, 25 individuos fueron homocigotos normales (GG), 3 fueron homocigotos raros (AA) y 13 individuos fueron heterocigotos (GA). En el grupo de controles se encontró que 6 individuos eran homocigotos normales (GG), 13 eran homocigotos raros (AA) y 22

fueron heterocigotos (GA). En cuanto a la frecuencia del alelo G, en los casos afectos fue de 0,77 y en los controles de 0,41; mientras que la frecuencia del alelo A en casos afectos y controles fueron de 0,23 y 0,59 respectivamente. Mediante el análisis de chi cuadrado realizado para cada grupo, se obtuvieron valores que muestran que ambos grupos están en equilibrio Hardy-Weinberg y que no existen diferencias significativas dentro de cada grupo, lo que puede significar que no existe una relación entre el polimorfismo y la enfermedad.

Tabla 3.2: Análisis Hardy-Weinberg para el polimorfismo c1296G>A

Población	Genotipo	No. de individuos	%	Frecuencia Genotípica	Frecuencia esperada	Frecuencia alélica	$\chi^2$ HWE	$p$
Afectos	G/G	25	60.98	0.61	0.59	0.77	0.491	0.48
	G/A	13	31.71	0.32	0.36			
	A/A	3	7.32	0.07	0.05	0.23		
	Total	41						
Controles	G/G	6	14.63	0.15	0.17	0.41	0.455	0.499
	G/A	22	53.66	0.54	0.49			
	A/A	13	31.71	0.32	0.34	0.59		
	Total	41						

#### 3.4.4.3 Polimorfismo c2712C>G

La distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo c2712C>G en la población afectos, 39 individuos fueron homocigotos normales (CC), 1 fue homocigoto raro (GG) y 1 individuo fue heterocigoto (CG). En el grupo de controles se encontró que 21 individuos eran homocigotos normales (CC), 4 eran homocigotos raros (GG) y 16 fueron heterocigotos (CG). En cuanto a la

frecuencia del alelo C, en los casos afectos fue de 0,96 y en los controles de 0,71; mientras que la frecuencia del alelo G en casos afectos y controles fueron de 0,04 y 0,29 respectivamente. Mediante el análisis de chi cuadrado realizada para cada grupo, se obtuvieron valores que muestran que el grupo de afectos no se encuentra en equilibrio Hardy Weinberg, al contrario del grupo control, lo que puede significar la existencia de una relación entre el marcador y la enfermedad. (Tabla 3.3)

Tabla 3.3: Análisis Hardy-Weinberg para el polimorfismo c2712C>G

Población	Genotipo	No. de individuos	%	Frecuencia Genotípica	Frecuencia esperada	Frecuencia alélica	$\chi^2$ HWE	$p$
Afectos	C/C	39	95.12	0.95	0.93	0.96	17.53*	0.00003
	C/G	1	2.44	0.02	0.07			
	G/G	1	2.44	0.02	0.00	0.04		
	Total	41						
Controles	C/C	21	51.22	0.51	0.50	0.71	0.135	0.713
	C/G	16	39.02	0.39	0.41			
	G/G	4	9.76	0.10	0.09	0.29		
	Total	41						

\* Valor fuera del equilibrio Hardy-Weinberg

#### 3.4.4.4 Polimorfismo IVS1+1813 C>T

En la Tabla 3.4 se detalla la distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas de los casos afectos, 3 individuos fueron homocigotos normales (CC), 25 fueron homocigotos raros (TT) y 13 individuos fueron heterocigotos (CT). En la población control se encontró que 6 individuos eran homocigotos normales (CC),

12 eran homocigotos raros (TT) y 23 fueron heterocigotos (CT). En cuanto a la frecuencia del alelo C, en los casos afectados fue de 0,23 y en los controles de 0,43; mientras que la frecuencia del alelo T en casos afectados y controles fueron de 0,77 y 0,57 respectivamente. Mediante el análisis de chi cuadrado realizada para cada grupo, se obtuvieron valores que muestran que ambos grupos están en equilibrio Hardy-Weinberg, lo que puede significar la no existencia de una relación entre el polimorfismo y la enfermedad.

Tabla 3.4: Análisis Hardy-Weinberg para el polimorfismo IVS1+1813 C>T

Población	Genotipo	No. de individuos	%	Frecuencia Genotípica	Frecuencia esperada	Frecuencia alélica	$\chi^2$ HWE	$p$
Afectos	C/C	3	7.32	0.07	0.05	0.23	0.491	0.483
	T/C	13	31.71	0.32	0.36			
	T/T	25	60.98	0.61	0.59	0.77		
	Total	41						
Controles	C/C	6	14.63	0.15	0.18	0.43	0.88	0.348
	T/C	23	56.10	0.56	0.49			
	T/T	12	29.27	0.29	0.33	0.57		
	Total	41						

### 3.5 - Análisis estadístico

#### 3.5.1 Pruebas de chi-cuadrado

Se realizaron las tablas necesarias con el objetivo de calcular el valor de chi cuadrado ( $\chi^2$ ) que brinde una idea sobre la asociación de los genotipos con los

grupos bajo estudio (afectos y controles) y determinar el nivel de significación de la variante genética entre ambos grupos. Como se aprecia en la Tabla 3.5 para el polimorfismo c135G>A, se encontró un valor  $\chi^2$  de 12.54 mostrando diferencias significativas entre los grupos, es decir, la presencia del genotipo GG se da con mayor frecuencia en los individuos controles, mientras que el genotipo AA se encuentra con mayor frecuencia en los individuos afectos. En cuanto a los polimorfismo c1296G>A se obtuvo un valor de  $\chi^2$  de 20.21 y el polimorfismo c2712C>G obtuvo un valor de  $\chi^2$  de 20.44, en ellos se muestra diferencias significativas entre los grupos; pero la presencia del genotipo raro se encuentra con mayor frecuencia en los individuos controles. Finalmente, el polimorfismo IVS+1813C>T obtuvo un valor de  $\chi^2$  de 8,35, el valor indicaría una relevancia de las diferencias significativas entre ambos grupos, control y afectos; siendo el genotipo raro TT más frecuente en los casos afectos y el genotipo CC más frecuente en controles.

Tabla 3.5: Análisis Chi cuadrado para los grupos estudiados y los genotipos observados de cada polimorfismo

<b>Polimorfismo c135G&gt;A</b>				$\chi^2$	$p$
Genotipo	GG	GA	AA	12.54*	0.0019
Afectos	2	33	6		
Controles	15	22	4		
<b>Polimorfismo c1296G&gt;A</b>				20.21*	0.00004
Genotipo	GG	GA	AA		
Afectos	25	13	3		
Controles	6	22	13		
<b>Polimorfismo c2712C&gt;G</b>				20.44*	0.00003
Genotipo	CC	CG	GG		
Afectos	39	1	1		
Controles	21	16	4		
<b>Polimorfismo IVS1+1813C&gt;T</b>				8.35*	0.015
Genotipo	CC	CT	TT		
Afectos	3	13	25		
Controles	6	23	12		

Valores calculados con 2 grados de libertad, \*: significativo

### 3.5.2 Pruebas de Odds ratio

La prueba de Odds ratio (OR) se aplicó para conocer el riesgo relativo de que ya sea un genotipo o un alelo específico esté relacionado con el desarrollo de la enfermedad de Hirschsprung. A continuación se detalla los resultados de los cuatro polimorfismos estudiados en la Tabla 3.6:

Tabla 3.6: Análisis de Odds Ratio (OR) de los cuatro polimorfismos estudiados en el Gen RET

Polimorfismo	Genotipo	Afectos	Controles	OR	IC 95%	$p$
--------------	----------	---------	-----------	----	--------	-----

		N(%)	N(%)			
c135G>A	G/G	2 (4.88)	15 (36.59)	1 <sup>R</sup>		
	G/A	33 (80.49)	22 (53.66)	11.25	2.34-54.13	0.001*
	A/A	6 (14.63)	4 (9.76)	11.25	1.61-78.57	0.027*
	G/A + A/A	39 (95.12)	26 (63.41)	11.25	2.37-53.36	0.001*
c1296G>A	G/G	25 (60.98)	6 (14.63)	1 <sup>R</sup>		
	G/A	13 (31.71)	22 (53.66)	0.142	0.05-0.44	0.001*
	A/A	3 (7.32)	13 (31.71)	0.055	0.012-0.258	0.00001*
	G/A + A/A	16 (39.02)	35 (85.37)	0.110	0.038-0.320	0.00001*
c2712C>G	C/C	39 (95.12)	21 (51.22)	1 <sup>R</sup>		
	C/G	1 (2.44)	16 (39.02)	0.034	0.004-0.272	0.0001*
	G/G	1 (2.44)	4 (9.76)	0.135	0.014-1.283	0.131 <sup>NS</sup>
	C/G + G/G	2 (4.88)	20 (48.78)	0.054	0.011-0.253	0.0001*
IVS1+1813 C>T	C/C	3 (7.32)	6 (14.63)	1 <sup>R</sup>		
	T/C	13 (31.71)	23 (56.10)	1,130	0.241-5.293	1.00 <sup>NS</sup>
	T/T	25 (60.98)	12 (29.27)	4,167	0.887-19.581	0.132 <sup>NS</sup>
	T/C + T/T	38 (92.68)	35 (85.37)	2,171	0.504-9.35	0.480 <sup>NS</sup>

IC 95%: intervalo de confianza de 95%, NS: no significativo; \*: Significativo, <sup>R</sup>: Referencia.

Es notable la relevancia del polimorfismo c135G>A. El genotipo heterocigoto GA, homocigoto raro AA, y la suma de los mismos GA + AA, presenta un valor considerable de Odds ratio, OR de 11.25, (p=0.001, p= 0.027 y p=0.001, respectivamente), es decir, la presencia de uno de estos genotipos en un individuo le daría un riesgo 11.25 veces mayor de padecer la enfermedad de Hirschsprung, que un individuo normal.

Los valores obtenidos para los dos polimorfismos c1296G>A y c2712C>G que se encuentran en el exón 7 y 15, respectivamente, al obtenerse Odds ratios



menores a uno, (0.055 y 0.135, respectivamente) parecen ser factores protectores de la enfermedad. En el caso del polimorfismo c1296G>A, los genotipos AA y GA mostraron diferencias significativas con respecto al genotipo GG. Mientras que en el polimorfismo c2712C>G no se encontraron diferencias significativas entre individuos homocigotos CC versus individuos homocigotos raros GG. Sin embargo, al momento de comparar entre individuos homocigotos CC y heterocigotos CG se encontraron diferencias significativas.

A pesar de que estadísticamente no hubo diferencias significativas en el polimorfismo IVS1+1813 C>T, el valor de Odds Ratio indica que las personas que presentaron el alelo polimórfico T tienen 4.16 veces más riesgo de presentar la enfermedad de Hirschsprung que los individuos que presentan el alelo C.

## CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN

La enfermedad de Hirschsprung caracterizada por aganglionosis, afecta a 1 de cada 5000 recién nacidos vivos (Swenson, 2002). La enfermedad produce alteración de la motilidad intestinal que se manifiesta como una obstrucción neonatal del colon (Moore y Persaud, 2009). Esta enfermedad tiene una baja tasa de mortalidad (3%) debido al diagnóstico temprano y la mejora de los tratamientos quirúrgicos (Pini, *et al.*, 2011). Sin embargo, esta puede ser letal en la infancia si se complica con enterocolitis, aumentando su mortalidad (30%) (De Manueles, 2008; Weber, 2009). En Ecuador, HSCR registra un solo caso de mortalidad (INEC, 2010). No obstante, el Hospital de Especialidades “Eugenio Espejo” reportó 34 casos confirmados y un índice de mortalidad del 3% (Rubio, Pazmiño, Álvarez, Vásconez y Gallardo, 2009). En Latinoamérica, incluido Ecuador, no existen datos de investigaciones genéticas de la enfermedad, lo cual estimula al estudio de polimorfismos genéticos como marcadores de susceptibilidad. Además, se considera a esta enfermedad, como un modelo de una enfermedad poligénica y de herencia multifactorial, lo que hace que su estudio sea de gran interés para la comunidad médica y científica (Fernández, 2004).

La técnica utilizada se basó en 41 muestras de biopsias de tejido de colon embebido en parafina, cuyo estudio histológico reveló la ausencia de células ganglionares en los plexos. Estas muestras fueron recibidas en la Unidad de

Patología del Hospital Pediátrico Baca Ortiz de la ciudad de Quito desde el año 2002 hasta el 2011. El reducido tamaño de muestra es aceptable por su baja incidencia y comparando el número de muestras con las investigaciones realizadas en el continente asiático y europeo, se encuentra dentro del rango tolerable (García, *et al.*, 2004; Smigiel, *et al.*, 2006). Las investigaciones realizadas a nivel mundial partieron de ADN genómico extraído de muestras de sangre periférica, mientras que en el presente estudio se partió de ADN extraído de tejido parafinado.

El tejido embebido en parafina constituye una fuente incalculable de información en investigaciones de carácter retrospectivo y sigue siendo el material básico para el diagnóstico en patología (Wu, *et al.*, 2002). Esta técnica, aunque permite conservar la arquitectura del tejido, provoca problemas significativos al momento de la extracción de ADN (Yagi, *et al.*, 1996), ya que se observa degradación de los ácidos nucleicos después de la fijación. El formaldehído que forma parte de la fijación en parafinas produce entrecruzamiento (cross-linkage) entre ácidos nucleicos y proteínas, hidroliza puentes fosfodiéster del ADN y modifica covalentemente el ARN por adición de grupos mono-metilos en las bases generando problemas en la obtención de material genético de buena calidad (García *et al.*, 2006). Esto dificulta el análisis molecular posterior y hace que las técnicas de amplificación de ADN sean menos exitosas (Bartlett & Stirling, 2003).

Para evitar que la parafina interfiera con el resultado de las posteriores técnicas moleculares, fue necesario remover la mayor cantidad posible de parafina utilizando un bisturí. Además, se realizaron tres lavados iniciales de la muestra con xilol y etanol (100%) con el fin de retirar el impedimento físico de la parafina y permitir que los reactivos de la extracción tengan buen contacto con el tejido (Cumbal, 2010). La principal dificultad en esta etapa fue que algunas de las biopsias contenían muy poco tejido, lo cual se reflejó en las bajas concentraciones de ADN conseguidas y se visualizó degradación al realizar la electroforesis en geles de agarosa al 1%. El panorama contrario se presentó en el ADN extraído de sangre periférica, cuya presencia en el gel muestra una buena calidad, así como concentración y no requiere de lavados previos en el proceso de extracción. Pudimos comprobar que la extracción de ADN de tejido en parafina resultó tener un rendimiento más bajo, en contraste con la extracción en sangre periférica (Castaño, Bilbao y Urrutia, 1996). En escasas muestras se dificultó la amplificación mediante PCR. Esto se debió a que el ADN extraído de muestras parafinadas fue a menudo degradado o de baja concentración; sin embargo, los resultados fueron satisfactorios, ya que se amplificaron todas las muestras parafinadas una vez estandarizadas las PCRs, las mismas que sirvieron para usarse en PCR-RFLP y secuenciación. Unos pocos bloques parafinados tenían 11 años de antigüedad, por lo que es posible que haya un descenso en la efectividad de la PCR según la antigüedad de los mismos; Bernstein (2002), ha encontrado un efecto negativo del tiempo en el ADN de los bloques de parafina.

El Hospital de Especialidades Eugenio Espejo, reportó mayor incidencia de casos afectos con HSCR en pacientes mayores de 15 años, durante el período 1983-2008, posiblemente debido al diagnóstico tardío por desconocimiento de las características clínicas de la enfermedad (Anexo L) (Rubio, Pazmiño, Álvarez, Vásconez y Gallardo, 2009). No obstante, el Hospital Pediátrico Baca Ortiz encontró una mayor incidencia en pacientes menores a 2 años (Fig. 3.1), lo cual se debe probablemente a una mejoría en el diagnóstico temprano de la enfermedad. Además, se evidenció que los casos de Hirschsprung durante los años 2002 al 2011 en el Hospital Pediátrico Baca Ortiz de la ciudad de Quito muestran un predominio en el género masculino (68.29%).

Aunque el análisis genético molecular ha identificado varios genes implicados en la enfermedad de Hirschsprung (Passarge, 2002), el proto-oncogén RET es sin lugar a dudas el principal gen de susceptibilidad (Smigiel, 2006). Se han asociado mutaciones sinónimas e intrónicas del gen RET con la patogénesis de HSCR desde 1994, (Lantieri, *et al.*, 2006), los cuales afectan el correcto procesamiento del ARNm, dando como resultado ARNm alterados o proteínas truncadas (Auricchio, *et al.*, 1999). Los polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) representan variaciones en la secuencia del genoma, presentes en al menos el 1% de la población general (Kwok, 2003). El primer polimorfismo descrito asociado a éste fenotipo, fue c135G>A, el cual demostró estar sobre-representado en varias series de pacientes de diferentes poblaciones, tales como: española, alemana, italiana, china, polaco y estadounidense (Borrego, 1999;

Fitze, *et al.*, 1999; Lantieri, *et al.*, 2005; Sancandi, *et al.*, 2003; Smigiel, *et al.*, 2006; Emison, *et al.*, 2005).

El estudio de tres SNPs ubicados en la región codificante del gen RET se realizó empleando la técnica PCR-RFLP (Burzynski, *et al.*, 2004; Wu, *et al.*, 2010) y para el polimorfismo ubicado en la región intrónica se utilizó secuenciación automática (Liu, *et al.*, 2008). En cuanto a las frecuencias genotípicas y alélicas, los resultados obtenidos muestran que en los polimorfismos c135G>A e IVS1+1813 C>T existe una mayor frecuencia de individuos afectados que poseen el alelo raro, A (0.55) y T (0.77), respectivamente. Lo contrario ocurre en los polimorfismos c1296G>A y c2712C>G donde predominan los alelos normales G (0.77) y C (0.96) respectivamente, en casos afectados.

Comparando las frecuencias alélicas de otras poblaciones a nivel mundial, el polimorfismo c135G>A en niños afectados con HSCR tiene un comportamiento similar a los países de los continentes europeo y asiático, observándose en todos la prevalencia del alelo raro A (Alemania 77%, China 75%, Taiwán 69%, Italia 65.5%, España 59%, Ecuador 55% y Polonia 51.4%) (Gath, *et al.*, 2001; Liu, *et al.*, 2010; Wu, *et al.*, 2010; Lantieri, *et al.*, 2005; Fitze, *et al.*, 1999; Smigiel, *et al.*, 2006). China es el único estudio que reporta las frecuencias genotípicas, comparándolo con nuestra población estudiada, se observa que en Ecuador hay mayor frecuencia del heterocigoto, que el homocigoto raro como se detalla a continuación: homocigoto raro AA (Ecuador 15%, China 54.3%), heterocigoto GA

(Ecuador 80%, China 36.2%) y por último el homocigoto normal GG (Ecuador 5%, China 9.5%) (Liu, *et al.*, 2008).

En cuanto a las tendencias alélicas del polimorfismo c1296G>A, los individuos afectos de la población ecuatoriana tienen el alelo raro A en menor frecuencia (23%) coincidiendo con otras poblaciones como: Taiwán, China, Polonia y Alemania (3%, 11.1%, 34.3% y 36.9%, respectivamente) (Gath, *et al.*, 2001; Liu, *et al.*, 2010; Wu, *et al.*, 2010; Smigiel, *et al.*, 2006). Comparando las frecuencias genotípicas en Ecuador con la población china, se observa un elevado porcentaje del genotipo homocigoto normal GG (Ecuador 61%, China 79.6%), seguido por los heterocigotos GA (Ecuador 32%, China 18.5%) y por último el homocigoto raro AA (Ecuador 7%, China 1.9%) (Liu, *et al.*, 2008).

De manera similar las frecuencias alélicas del polimorfismo c2712C>G, muestran que los individuos afectos de la población ecuatoriana tienen el alelo raro A en menor frecuencia (4%), coincidiendo con otros países como: Taiwán, Polonia, Italia, Alemania y China (1%, 11.4%, 13.9%, 24.6% y 29%, respectivamente) (Wu, *et al.*, 2010; Smigiel, *et al.*, 2006; Lantieri, *et al.*, Gath, *et al.*, 2001; Liu, *et al.*, 2010). En cuanto a las frecuencias genotípicas, Ecuador y China muestran un elevado porcentaje del genotipo homocigoto normal GG (Ecuador 95%, China 94.2%), seguido por los heterocigotos GA (Ecuador 2%, China 5.8%) y por último el homocigoto raro AA (Ecuador 2%, China 0%) (Liu, *et al.*, 2008).

Finalmente, comparando las frecuencias alélicas del polimorfismo IVS1+1813 C>T, la población estudiada en el presente trabajo tiene un comportamiento similar a la de China, observándose en ambas la prevalencia del alelo raro T (Ecuador 77%, China 84%) (Liu, et al., 2008). Y las frecuencias genotípicas, en Ecuador y China, muestra un minoritario porcentaje del genotipo homocigoto normal CC (Ecuador 7%, China 3.2%), seguido por los heterocigotos CT (Ecuador 32%, China 25.6%) y por último el homocigoto raro TT muestra una elevada frecuencia (Ecuador 61%, China 71.2%) (Liu, *et al.*, 2008).

El Equilibrio Hardy-Weinberg fue el primer análisis estadístico realizado una vez obtenidos los genotipos respectivos, mediante el cual se pudo conocer que los datos para los polimorfismos c1296G>A e IVS1+1813 C>T cumplen con el equilibrio, sugiriendo que no existen fuerzas externas evolutivas como selección natural y mutación, que alteren el equilibrio de la población utilizada, es decir, las frecuencias de los alelos en la población son estables y no se han dado fallas de genotipaje. Por el contrario, el cálculo de Equilibrio Hardy-Weinberg para los polimorfismos c135G>A y c2712C>G mostraron una desviación del equilibrio en el grupo de afectos. El polimorfismo c135G>A muestra un valor  $\chi^2$  HW de 16.03;  $p < 0,05$ , mas no el de controles ( $\chi^2$  HW= 1.003;  $p > 0,05$ ), lo que apoyaría la hipótesis de un posible rol en el riesgo de desarrollar Hirschsprung (Iniesta, Guinó y Moreno, 2005). El polimorfismo c2712C>G en casos afectos muestra un valor  $\chi^2$  HW de 17.53;  $p < 0,05$ , mas no en los controles ( $\chi^2$  HW= 0.135;  $p > 0,05$ ).



Posteriormente, se realizó el análisis de chi cuadrado ( $\chi^2$ ) con dos grados de libertad para los genotipos encontrados de cada polimorfismo estudiado, con el fin de determinar el nivel de significación de los genotipos entre los grupos control y afecto. Los datos obtenidos para los polimorfismos c135G>A, c1296G>A, c2712C>G e IVS+1813C>T obtuvieron valores  $\chi^2$  de 12.54, 20.21, 20.44 y 8.35, respectivamente. Los valores altos implican que existen diferencias significativas entre los grupos afecto y control. Sin embargo, únicamente los valores de  $\chi^2$  para los polimorfismo c135G>A y c2712C>G, junto al valor de  $\chi^2$  de Hardy-Weinberg, coincide con la existencia significativa de diferencias entre controles y afectados para estos polimorfismos.

Finalmente, el análisis estadístico de Odds ratio se realizó con un intervalo de confianza del 95% para cada genotipo con respecto al homocigoto normal de todos los polimorfismos estudiados. El análisis busca cuantificar la magnitud de la asociación, obteniendo un cociente que representa el número de veces que ocurre un suceso frente al número de veces en que no ocurre. Para el polimorfismo c135G>A se obtuvieron OR significativos (>1) para todos los genotipos (GA, AA, GA+AA), por lo que existiría riesgo, que asocie a esta variante con el desarrollo de la enfermedad de Hirschsprung (Álvarez, 2007). El genotipo homocigoto raro AA arrojó un OR de 11.25; IC 95%=1.61-78.57; p=0.027 y para el heterocigoto GA arrojó un OR de 11.25; IC 95%=2.34-54.13; p=0.001. Este valor significa que existe once veces más riesgo de desarrollar la enfermedad de

Hirschsprung para una persona que sea homocigoto raro AA, coincidiendo con investigaciones realizadas en China, Países Bajos y Alemania; donde reportaron OR para el genotipo AA de 13.61, 23.22 y 31.07, respectivamente (Burzynski, *et al.*, 2004; Tou, *et al.*, 2011; Fitze, *et al.*, 2003). Aunque aún se desconoce el mecanismo exacto por el cual la sustitución silenciosa del codón 45 actúa en el origen de HSCR, se muestra que la variante c.135A está asociada fuertemente con el fenotipo HSCR (Fitze, *et al.*, 2003).

En los polimorfismos c1296G>A y c2712C>G los valores de OR fueron menores a uno en todos sus genotipos, por lo que no se puede relacionar la presencia de los alelos polimórficos A y G, respectivamente, con el riesgo de desarrollar la enfermedad de Hirschsprung (Dawson, 2011). Estos resultados en los niños de la ciudad de Quito, concuerdan con los hallazgos reportados en la población china, donde mencionan que los polimorfismos c1296G>A y c2712C>G juegan un papel protector en la patogénesis de HSCR (Liu, *et al.*, 2010). En España, se reportó que el polimorfismo c2712C>G podría proteger el desarrollo de HSCR (Borrego, *et al.*, 1999). El genotipo homocigoto raro AA del polimorfismo c1296G>A, obtuvo diferencias significativas con un OR de 0.055; IC 95%=0.012-0.258;  $p=0.00001$ , mientras que el genotipo homocigoto raro GG del polimorfismo c2712C>G no se encontraron diferencias significativas, OR de 0.135; IC 95%=0.014-1.283;  $p=0.131$ , probablemente por un resultado del tamaño de muestra inadecuado, debido a que el valor  $p$  de 0.131 se encuentra cerca del límite de la significancia.

Por último el polimorfismo ubicado en la región intrónica IVS+1813C>T, obtuvo en el genotipo homocigoto raro un OR de 4,167, pero no se encontraron en él diferencias significativas (IC 95%=0.887-19.581; p=0.132), lo que sugiere que probablemente se debe aumentar el tamaño de muestra. En China, se reportó un OR de 3.909 para este polimorfismo (Liu, *et al.*, 2008).

El estudio de los polimorfismos genéticos ayudan a definir la base molecular de las mutaciones que provocan enfermedades genéticas y utiliza esa información para mejorar los métodos de diagnóstico (Nussbaum, *et al.*, 2008). Los polimorfismos en el gen RET son de gran importancia debido a que se encuentran implicados en el desarrollo del sistema nervioso entérico durante la embriogénesis. La expresión fenotípica dependerá tanto del efecto de alelos de susceptibilidad como de alelos que confieran protección frente a HSCR (Sánchez, 2010). En este sentido, se ha establecido claramente la existencia de SNPs (c.135G>A, rs1800858) en el gen RET que parecen estar relacionados con la mayor parte de casos HSCR, (Amiel, *et al.*, 2008), así también como con el polimorfismo IVS+1813C>T (Liu, *et al.*, 2008). Por el contrario, existen SNPs de RET que parecen estar sub-representados en pacientes HSCR al compararlos con controles, tales como c1296G>A, y c2712C>G; aunque el mecanismo que habría detrás de un posible efecto protector aún no se ha esclarecido.

## CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES

1. Se demostró la existencia de los polimorfismos en el gen RET c135G>A, c1296G>A y 2712C>G ubicados en el exón 2, 7 y 15 respectivamente, mediante la utilización de la metodología PCR-RFLP (Restricción de fragmentos de longitud polimórfica) y el polimorfismo IVS1+1813C>T localizado en el intrón 1 mediante la secuenciación; en una muestra de 82 individuos pertenecientes a población ecuatoriana, de los cuales 41 pertenecieron a niños del Hospital Pediátrico Baca Ortiz de la ciudad de Quito ellos fueron considerados afectados con la enfermedad de Hirschsprung y 41 fueron controles.
2. La técnica de extracción en biopsias rectales debió ser ajustada con la adición de tres lavados con xylol y etanol antes de realizar la digestión con *buffer* y proteinasa K. En cuanto al ADN proveniente de muestras parafinadas, se constató su degradación, pero a pesar de ello su calidad fue suficientemente buena como para brindar buenos resultados de PCR. Por su parte, el ADN proveniente de muestras de sangre periférica fue de mejor calidad debido a lo cual no presentó problema alguno en la realización de las PCR.

3. Se determinaron las frecuencias genotípicas y alélicas de los cuatro SNPs en el gen RET. Usando el cálculo del valor chi cuadrado se puede asegurar que las frecuencias tanto genotípica como alélicas fueron similares entre los grupos control y afectos para los polimorfismos c1296G>A e IVS1+1813 C>T. Lo contrario sucedió en el caso de los polimorfismo c135G>A y c2712C>G, cuyas frecuencias genotípicas y alélicas fueron diferentes para el grupo control y afecto y contribuyeron a darle relevancia a estos últimos polimorfismos.
4. En cuanto al análisis del Equilibrio Hardy-Weinberg para los polimorfismos c1296G>A e IVS1+1813 C>T se mostraron resultados que confirman que la población en estudio estuvo en equilibrio y no fue afectada por fuerzas evolutivas externas, tales como mutación, consanguinidad, y selección natural. Sin embargo, los valores encontrados para los polimorfismos c135G>A y c2712C>G, permitieron conocer que mientras el grupo control estaba en equilibrio, el grupo de afectos no se encontraba en equilibrio, razón por la cual estos SNP se presume que están asociados con la enfermedad de Hirschsprung.
5. Los datos de interés obtenidos del polimorfismo c135G>A tras las primeras pruebas estadísticas realizadas fueron confirmados por la prueba estadística de Odds ratio, así en la población ecuatoriana analizada, se observa que un individuo portador del genotipo homocigoto raro AA o el genotipo heterocigoto GA tiene un riesgo once veces mayor de padecer la

enfermedad de HSCR. Mientras que los valores de los OR de los polimorfismo c1296G>A y c2712C>G son menores a uno, por lo que parecen ser significativamente factores protectores de la enfermedad.

## CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES

- Ya que los bancos de las muestras embebidas en parafina contienen valiosas piezas para estudio de diferentes patologías, se recomienda potenciar el tejido embebido en parafina, realizando cortes en un micrótopo, previa a la extracción del ADN.
- Debido a que la enfermedad de Hirschsprung es una anomalía congénita compleja, se propone seguir buscando mutaciones asociadas con este fenotipo, principalmente en el gen RET u otro gen que esté involucrado en las vías de señalización que rigen el desarrollo del SNE, como por ejemplo los genes GDNF, NTN, ENDR-B, EDN3, SOX 10.
- Se recomienda para futuras investigaciones de la enfermedad de Hirschsprung, ampliar el número de muestras analizadas.
- Hacer un nuevo estudio relacionando los diferentes tipos de aganglionosis, con la forma en que se presenta la enfermedad (esporádica o familiar) y con nuevos polimorfismos genéticos necesarios para una completa correlación fenotipo-genotipo.

- En el caso de que haya continuidad del estudio de SNPs en el gen RET relacionado con la Enfermedad de Hirschsprung, se sugiere que se incluya un análisis de haplotipos, con el fin de determinar si existe un locus de susceptibilidad, que cause la enfermedad, como lo muestra un estudio realizado en la población europea y china (Cornes, *et al.*, 2010).
- En relación a aspectos metodológicos de este estudio, el diseño del *primer* para la secuenciación, hay que considerar que debe haber una distancia de al menos 30 bases con respecto a la secuencia de interés; ya que la secuencia inmediatamente posterior al *primer* no se obtiene
- Después de la purificación del producto de PCR con AMPure XP y su cuantificación por electroforesis, se debe procurar por recomendación del fabricante realizar la reacción de secuenciación en los siguientes 10 días; con el objetivo de mantener su estabilidad.
- Durante el proceso de purificación con CleanSEQ, se debe evitar la exposición directa de la luz con las muestras a purificar. También no se debe prolongar los tiempos de espera, ya que esto puede conducir a la degradación de los colorantes.
- Para la reacción de secuenciación se recomienda cambiar la alícuota del *primer* cada dos semanas.



## CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA

Amiel, J. & Lyonnet, S. (2001). Hirschsprung disease, associated syndromes, and genetics: a review. Med. Genet 38: 729–739

Amiel, J., Sproat, E., Garcia, M., Lantieri, F., Burzynski, G., Borrego, S., Pelet, A., Arnold, S., Miao, X., Griseri, P., Brooks, A., Antinolo, G., Pontual, L., Clement, M., Munnich, A., Kashuk, C., West, K., Wong, K., Lyonnet, S., Chakravarti, A., Tam, P., Ceccherini, I., Hofstra, R. & Fernandez, R. (2008). Hirschsprung disease, associated syndromes and genetics: a review. J Med Genet 45:1–14.

Angrist, M., Bolk, S., Thiel, B., Puffenberger, E., Hofstra, R., Buys, C., Cass, D. & Chakravarti, A. (1995). Mutation analysis of the RET receptor tyrosine kinase in Hirschsprung's disease. Hum Mol Genet.4: 821-30.

Applied Biosystems. (2009). DNA Sequencing by Capillary Electrophoresis. Applied Biosystems Chemistry Guide. Second Edition. pp 4-8.

Arriagada, M., Alfaro, G. y Rostion, C. (2008). Enfermedad de Hirschsprung. Rev. Ped. Elec., Vol 5. p 1-2.

ATDBio, Ltd. (2012). Sequencing, forensic analysis and genetic analysis. University of Southampton. [En línea: <http://www.atdbio.com/content/20/Sequencing-forensic-analysis-and-genetic-analysis> consultado 14 de agosto de 2012]

Ávila, J., de Vera, A., Hernández, C. y Vasallo, M. (1995). Análisis del DNA. II: Clonar, secuenciar y PCR. Biología Molecular en Nefrología. NEFROLOGIA. Vol. XV. Suplemento 2: 38-39.

Auricchio, A., Griseri, P., Carpentieri, M., Betsos, N., Staiano, A., Tozzi, A., Priolo, M., Thompson, H., Bocciardi, R., Romeo, G., Ballabio, A. & Ceccherini, I. (1999). Double heterozygosity for a RET substitution interfering with splicing and an EDNRB missense mutation in Hirschsprung disease. Am J Hum Genet 64: 1216-1221.

Baechtel, F. (1989). The extraction, purification and quantification of DNA. In Proceedings of the International Symposium on the Forensic Aspects of DNA Analysis, FBI Academy Quantico, Virginia 25–28.

Bar, K., Facer, P., Williams, N., Tam, P. & Anand, P. (1997). Glia-derived neurotrophic factor in human adult and fetal intestine and in Hirschsprung's disease. Gastroenterology 112:1381–1385.

Bartlett, J. & Stirling, D. (2003). Methods in Molecular Biology, Vol. 226: PCR Protocols, Second Edition. Humana Press, Totowa, NJ. pp 35

Bartrés, D. y Redolar, D. (2009). Bases genéticas de la conducta. Editorial UOC. pp 47-48.

Beckman Coulter, Inc. (2006). AGENCOURT® CLEANSEQ®. Dye-Terminator Removal. Protocol 000600v032. [En línea: <https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/bibliography?docname=Protocol%2000600v032.pdf>]

Beckman Coulter, Inc. (2009). AGENCOURT® AMPURE® XP PCR Purification Protocol 000387v001. [En línea: [https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/bibliography?docname=Protocol\\_000387v001.pdf](https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/bibliography?docname=Protocol_000387v001.pdf)]

Behrman, R., Kliegman, R. y Jenson, H. (2004). Nelson Tratado de Pediatría. Decimoséptima edición. Elsevier, España. pp 1239-1241.

Bernstein, J., Thompson, W., Casey, G., Dicioccio, R., Whittemore, A., Diep, A., Thakore, S., Vaziri, S., Xue, S. & Haile, R. (2002). Comparison of Techniques for the Successful Detection of BRCA1 Mutations in Fixed Paraffin-Embedded Tissue. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 11: 809–814.

Binder, B., Landman, K., Simpson, M, Mariani, M. & Newgreen, D. (2008). Modeling proliferative tissue growth: a general approach and an avian case study. Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys 78.

Bolande, R. (1974). The neurocristopathies. A unifying concept of disease arising in neural crest maldevelopment. Hum Pathol 5: 409-26.

Bonnard, A., Zeidan, S., Degas, V., Viala, J., Baumann, C., Berrebi, D., Perrusson, O., El Ghoneimi, A. (2009). Outcomes of Hirschsprung's disease associated with Mowat-Wilson syndrome. J Pediatr Surg 44(3):587-591

Borrego, S., Saez, M., Ruiz, A., Gimm, O., Lopez, A. & Antinolo G. (1999). Specific polymorphisms in the RET proto-oncogene are over-represented in patients with Hirschsprung disease and may represent loci modifying phenotypic expression. J Med Genet 36: 771-774.

Borrego, S., Ruiz, A., Saez, M., Gimm, O., Gao, X. & Lopez, A. (2000). RET genotypes comprising specific haplotypes of polymorphic variants predispose to isolated Hirschsprung disease. J Med Genet 37: 572-578.

Brown, T. (2008). Genomas. Editorial Médica Panamericana, Tercera edición. pp 696.

Burns, A. & Le Douarin, N. (2001). Enteric nervous system development: analysis of the selective developmental potentialities of vagal and sacral neural crest cells using quail-chick chimeras. Anat Rec. 2001; 262(1):16–28.

Burzynski, G., Nolte, I., Bronda, A., Bos, K., Osinga, J., Plaza, I., Twigt, B., Maas, S., Brooks, A., Verheij, J., Buys, C., & Hofstra, R. (2005). Identifying Candidate Hirschsprung Disease–Associated *RET* Variants. Eur J Hum Genet 76:850–858.

Burzynski, G., Nolte, I., Osinga, J., Ceccherini, I., Twigt, B., Maas, S., Brooks, A., Verheij, J., Plaza, I., Buys, C. & Hofstra, R. (2004). Localizing a putative mutation as the major contributor to the development of sporadic Hirschsprung disease to the *RET* genomic sequence between the promoter region and exon 2. Eur J Hum Genet 12(8): 604–612

Carter, M., Yome, J., Marcil, M., Martin, C., Vanhorne, J & Mulligan, L. (2001). Conservation of *RET* proto-oncogene splicing variants and implications for *RET* isoform function. Cytogenet Cell Genet. 2001;95(3-4):169-76.

Castaño, L., Bilbao, J. y Urrutia, I. (1996). Introducción a la biología molecular y aplicación a la pediatría (2): Purificación de ácidos nucleicos. An Esp Pediatr 45:541-546.

Ceccherini, I., Bocciardi, R., Luo, Y., Pasini, B., Hofstra, R. & Takahashi, M. (1993). Exon structure and flanking intronic sequences of the human RET proto-oncogene. *Biochem Biophys Res Commun*;196:1288–95

Chakravarti, A. & Lyonnet, S. (2002). Hirschsprung disease. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited disease. Eds McGraw-Hill Companies.

Chakravarti, A. (2001). Hirschsprung's disease. In *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases*, New York: McGraw-Hill. pp. 6231-6255.

Chamary, J. & Hurst, L. (2009). The price of silent mutations. *Sci Am* 300(6):46-53.

Cornes, B., Tang, C., Leon, T., Hui, K., So, M., Miao, X., Cherny, S., Sham, P., Tam, P. & Garcia-Barcelo, M. (2010). Haplotype analysis reveals a possible founder effect of RET mutation R114H for Hirschsprung's disease in the Chinese population. *PLoS One* 5(6):e10918. doi: 10.1371.

Cumbal, N. (2010). Estudio de los polimorfismos en las regiones -31(T>C), -511(C>T) Y +3954(C>T) del gen IL-1 $\beta$  de interleuquina-1 $\beta$  mediante pcr-rflp en población ecuatoriana con cáncer gástrico y presencia de *Helicobacter pylori*. Tesis para obtención del título de Ingeniería en Biotecnología. ESPE.

De Graaff, E., Srinivas, S., Kilkenny, C, D'Agati, V., Mankoo, BS, Costantini, F. & Pachnis V. (2001). Differential activities of the RET tyrosine kinase receptor isoforms during mammalian embryogenesis. Genes Dev 15:2433-2444.

De Manueles, J. (2008). Enfermedad de Hirschsprung. En Protocolos Diagnósticos Y Terapéuticos De Gastroenterología, Hepatología y Nutrición en Pediatría. Ergón S.A. Segunda edición. p 55-57.

De Manueles, J. y De la Rubia, F. (2010). Enfermedad de Hirschsprung. Protocolos diagnósticos y terapéuticos de gastroenterología, hepatología y nutrición pediátrica. Asociación Española de Pediatría 47-52.

Diamond, I., Casadiego, G. & Traubici, J. (2007). The contrast enema for Hirschsprung disease: predictors of a false-positive result. J Pediatr Surg 42:792-795.

Emison, E., McCallion, A., Kashuk, C., Bush, R., Grice, E., Lin, S., Portnoy, M., Cutler, D., Green, E. & Chakravarti, A. (2005). A common sex-dependent mutation in a RET enhancer underlies Hirschsprung disease risk. Nature: 434.

Enokido, Y., de Sauvage, F., Hongo, J., Ninkina, N., Rosenthal, A., Buchman, V. & Davies, A. (1998). GFR alpha-4 and the tyrosine kinase Ret form a functional receptor complex for persephin. Curr Biol 8:1019-1022.

Fernández, R. (2004). Identificación y caracterización molecular de nuevos loci de susceptibilidad para la enfermedad de Hirschsprung y el cáncer medular de tiroides. Tesis para obtención del título de Licenciado en Farmacia. Universidad de Sevilla. p 20-24.

Fitze, G., Appelt, H., König, I., Görgens, H., Stein, U., Walther, W., Gossen, M., Schreiber, M., Ziegler, A., Roesner, D. & Schackert, H. (2003). Functional haplotypes of the RET proto-oncogene promoter are associated with Hirschsprung disease (HSCR). Hum Mol Genet 12 (24): 3207–3214.

Fitze, G., Schreiber, M., Kuhlisch, E., Schackert, H. & Roesner, D. (1999). Association of RET Protooncogene Codon 45 Polymorphism with Hirschsprung Disease. The American Journal of Human Genetics 65:1469–1473.

Fonseca, D., Mateus, H. y Contreras, N. (2010). Prácticas de Laboratorio de Biología Molecular: Su Aplicación en Genética Básica. Universidad del Rosario, Colombia. pp 27.

Garcia, M., Sham, M., Lee, W., Lui, V., Chen, B., Wong, K., Wong, J. & Tam, P. (2004). Highly Recurrent RET Mutations and Novel Mutations in Genes of the Receptor Tyrosine Kinase and Endothelin Receptor B Pathways in Chinese Patients with Sporadic Hirschsprung Disease. Clin Chem 50(1):93-100.



Gariepy, C. (2001). Intestinal motility disorders and development of the enteric nervous system. *Pediatr Res* 49:605-13.

Gath, R., Goessling, A., Keller, K., Koletzko, S., Coerd, W., Muntefering, H., Wirth, S., Hofstra, R., Mulligan, L., Eng, C. & von Deimling, A. (2001). Analysis of the *RET*, *GDNF*, *EDN3*, and *EDNRB* genes in patients with intestinal neuronal dysplasia and Hirschsprung disease. *Gut* 48:671–675.

Gershon, M. (1998). The Second Brain: The Scientific Basis of Gut Instinct and a Groundbreaking New Understanding of Nervous Disorders of the Stomach and Intestine. New York, NY: Harper Collins Publishers.

Hackam, D., Reblock, K., Redlinger, R. & Barksdale, M. (2004). Diagnosis and outcome of Hirschsprung's disease: does age really matter? *Pediatr Surg Int* 20:319-22.

Hao, M., Moore, R., Roberts, R., Nguyen, T., Furness, J., Anderson, R. & Young, H. (2010). The role of neural activity in the migration and differentiation of enteric neuron precursors. *Neurogastroenterol Motil* 22, 127–137

Haricharan, R. & Georgeson, K. (2008). Hirschsprung's Disease. *Seminars in Pediatric Surgery* 17, 266-275.

Hirschsprung, H. (1888). Stuhlträgheit neugeborener infolge von dilatation und hypertrophic des colons. Jb inderheilk 27: 1-2.

Hurst, L. (2011). The sound of silence. Nature 471:582-583.

INEC. (2008). Anuario de Estadísticas Vitales: Nacimientos y Defunciones. CUADRO No. 10 Defunciones totales, por tipo de certificación y grupos de edad, según sexo y causas de muerte. Décima revisión: 353.

INEC. (2010). Defunciones Generales 2010. Mortalidad por causa y sexo en el año 2010 de la población menor o igual a 11 años.

Iniesta, R., Guinó, R. y Moreno, V. (2005). Análisis estadístico de polimorfismos genéticos en estudios epidemiológicos. Gac Sanit 19(4):333-41.

Invitrogen. (2007). Purelink™ DNA Kits. Version A.

Invitrogen. (2010). Quant-iT™ dsDNA High-Sensitivity Assay Kit.

Iwashita, T., Kruger, G., Pardal, R., Kiel, M. & Morrison, S. (2003). Hirschsprung disease is linked to defects in neural crest stem cell function. Science 301: 972-6.

Kapur, R. (2009). Practical pathology and genetics of Hirschsprung's disease. Semin Pediatr Surg 18: 212-223.

Kashuk, C., Stone, E., Grice, E., Portnoy, M., Green, E., Sidow, A., Chakravarti, A. & McCallion, A. (2005). Phenotype-genotype correlation in Hirschsprung disease is illuminated by comparative analysis of the RET protein sequence. Proc Natl Acad Sci USA 102: 8949-8954.

Kenny, S., Tam, P. & Garcia-Barcelo, M. (2010). Hirschsprung's disease. Semin Pediatr Surg. 19(3):194-200.

Kwok, P. (2003). Single Nucleotide Polymorphisms: Methods and Protocols. Humana Press, Totowa, NJ, 212: 111-128.

Laranjeira, C. (2010). *In vivo* identification of neural stem cells in the enteric nervous system. Doctoral thesis, UCL (University College London). 18-23.

Langley, J. (1921). The autonomic nervous system. Part 1. Cambridge: HeVer.

Lantieri, F., Griseri, P. & Ceccherini, I. (2006). Molecular mechanisms of RET-induced Hirschsprung pathogenesis. Annals of Medicine 38: 11–19.

Lantieri, F., Griseri, P., Puppo, F., Campus, R., Martucciello, G., Ravazzolo, R., Devoto, M., & Ceccherini, I. (2005). Haplotypes of the Human RET Proto-oncogene Associated with Hirschsprung Disease in the Italian Population Derive from a Single Ancestral Combination of Alleles. *Ann Hum Genet*. 70:12-26.

Le Douarin, N. & Kalcheim, C. (1999). The Neural Crest. Cambridge University Press, Cambridge.

Lewis, C. (2002). Genetic association studies: design, analysis and interpretation. *Brief Bioinform* 3(2): 146-153.

Liu, C., Jin, L., Li, H, Lou, J., Luo, C., Zhou, X. & Li, J. (2008). RET polymorphisms and the risk of Hirschsprung's disease in a Chinese population. *J Hum Genet* 53(9):825-33.

Liu, C., Tang, Q., Lou, J., Luo, C., Zhou, X., Li, D., Chen, F., Li, X. & Li, J. (2010). Association Analysis of the RET Proto-Oncogene with Hirschsprung Disease in the Han Chinese Population of Southeastern China. *Biochem Genet* 48:496–503.

Lo, L. & Anderson D. (1995). Postmigratory neural crest cells expressing c-RET display restricted developmental and proliferative capacities. *Neuron* 15: 527-539, 1995.

Lyonnet, S., Bolino, A., Pelet, A., Abel, L., Nihoul, C., Briard, L., Mok, V., Kaariainen, H., Martucciello, G., Lerone, M., Puliti, A., Luo, Y., Weissenbach, J., Devoto, M., Munnich, A. & Romeo, G. (1993). A gene for Hirschsprung disease maps to the proximal long arm of chromosome 10. Nat Genet. 4(4)346-350.

Martucciello, G., Ceccherini, I., Lerone, M. & Jasonni, V. (2000). Pathogenesis of Hirschsprung's disease. J Pediatr Surg 35:1020-1022.

Martucciello, G., Luinetti, O., Romano, P. & Magrini, U. (2007). Molekularbiologie, Grund - lagenforschung und Diagnose des Morbus Hirschsprung. Pathologie 28:119–124.

Masi, P., Miele, E., Staiano, A. (2008). Pediatric anorectal disorders. Gastroenterol Clin North Am; 37: 709-730.

McPhee, J. y Hammer, G. (2010). Fisiopatología de la enfermedad. Una introducción a la medicina clínica. McGraw-Hill Interamericana Editores. Sexta edición. pp 328-329.

McInerney, T., Adam, H., Campbell, D. y Hoekelman, R. (2011). Tratado de pediatría. Primera edición. Buenos Aires: Médica Panamericana. Tomo II. pp 2495.

Montedonico, S. (2009). Constipación crónica y desórdenes de los plexos entéricos. Rev. Med. Clin. Condes 20(6) 805 – 815.

Moore, K. y Persaud, T. (2009). Embriología Clínica. Octava edición. Elsevier España. pp 238.

Moore, S. (2006). The contribution of associated congenital anomalies in understanding Hirschsprung's disease. Pediatr Surg Int 22: 305–315

Mundt, E. & Bates, M. (2010). Genetics of Hirschsprung disease and anorectal Malformations. Seminars in Pediatric Surgery, Volume 19, Issue 2: 107-117

Myers SM, Eng C, Ponder BA, Mulligan LM. (1995). Characterization of RET proto-oncogene 3' splicing variants and polyadenylation sites: a novel C-terminus for RET. Oncogene 11: 2039-2045.

New England Biolabs. 2011. NEBcutter V2.0. [en línea: <http://tools.neb.com/NEBcutter2/>]. Consulta: 26-05-2011.

Newgreen, D. & Young, H. (2002). Enteric nervous system: development and developmental disturbances. Pediatr Dev Pathol 5: 224-247.

Nussbaum, R., McInnes, R. y Willard, H. (2008). Thompson, & Thompson, Genética en Medicina. Elsevier Masson. Séptima edición. pp 41.

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.

Oliva, R. y Vidal, J. (2006). Genoma humano: Nuevos avances en investigación, diagnóstico y tratamiento. Edicions Universitat Barcelona. Volumen 2.

Parc, R., Berrod, J., Tussiot, J. & Loygue, J. (1984). Megacolon in adults. Apropos of 76 cases. Ann Gastroenterol Hepatol (Paris) 20: 133-141.

Passarge, E. (2002). Dissecting Hirschsprung disease. Nature genetics 31:11-12.

Passarge, E. (2004). Genética: Texto y Atlas. Editorial Médica Panamericana. Segunda Edición. pp 66.

Pelet, A., Pontual, L., Clement, M., Salomon, R., Mugnier, C., Matsuda, F., Lathrop, M., Munnich, A., Feingold, J., Lyonnet, S., Abel, L. & Amiel, J. (2005). Homozygosity for a frequent and weakly penetrant predisposing allele at the RET locus in sporadic Hirschsprung disease. J Med Genet 42: e18

Persing, D., Tenover, F., Versalovic, J., Tang, Y., Unger, E., Relman, D. y White, T. (2004). Molecular microbiology, Diagnostic principles and practice. Washington, D.C: ASM Press.

Pierce, B. (2010). Genética: Un enfoque conceptual. Ed. Médica Panamericana. Tercera edición. pp 524.

Pini, A., Rossi, V., Avanzini, S., Mattioli, G., Disma, N. & Jasonni, V. (2011). Hirschsprung's disease: what about mortality?. *Pediatr Surg Int* 27:473–478

Ponce, E., Martínez, E. y Ávila, M. (2001). Estudios epidemiológicos de casos y controles. Fundamento teórico, variantes y aplicaciones. *Salud Pública de México* 43 (2): 135-150.

Romeo, G., Ceccherini, I., Celli, J., Priolo, M., Betsos, N., Bonardi, G., Seri, M., Yin, L., Lerone, M., Jasonni V. & Martucciello, G. (1998). Association of multiple endocrine neoplasia type 2 and Hirschsprung disease. *J Intern Med* 243: 515–520.

Rubio, G., Pazmiño, R., Álvarez, V., Váscquez, O. & Gallardo, P. (2009). Enfermedad de Hirschsprung. *Revista Científica del Hospital de Especialidades "Eugenio Espejo"*: 12 (2):18-21.



Sancandi, M., Griseri, P., Pesce, B., Patrone, G., Puppo, F., Lerone, M., Martucciello, G., Romeo, G., Ravazzolo, R., Devoto, M. & Ceccherini, I. (2003). Single nucleotide polymorphic alleles in the 59 region of the RET proto-oncogene define a risk haplotype in Hirschsprung's disease. J Med Genet 40:714–18.

Sánchez, A. (2010). Análisis de la base genética de la enfermedad de Hirschsprung y la displasia neuronal Intestinal tipo B, dos desórdenes del sistema Nervioso entérico. Sevilla. pp 19, 65.

Singh, J., Croaker, G., Manglick, P., Wong, C., Athanasakos, H., Elliott, E. & Cass, D. (2003). Hirschsprung's disease: the Australian Paediatric Surveillance Unit's experience. Pediatr Surg Int 19:247-50.

Smigiel, R., Lebioda, A., Patkowsi, D., Czernik, J., Dobosz, T., Pesz, K., Kaczmarz, M., & Sasiadek, M. (2006). Single nucleotide polymorphisms in the RET gene and their correlations with Hirschsprung disease phenotype. Appl Genet 47(3):261–267.

Strachan, T. & Read, A. (2004). Human Molecular Genetics. Garland Science, Trird Edition. pp123.

Stephenson, F. (2003). Calculations for molecular biology and biotechnology. Academic Press. San Diego. California-USA.

Swenson, O. (2002). Hirschsprung's disease: a review. Pediatrics 109, 914-918.

Takahashi, M. (2001). The GDNF/RET signaling pathway and human disease. Cytokine Growth Factor Rev 12:361-373.

Tam, P. & Garcia, M. (2004). Molecular genetics of Hirschsprung's disease. Seminars in Pediatric Surgery 13:236-248.

Tam, P. & Garcia, M. (2009). Genetic basis of Hirschsprung's disease. Pediatr Surg Int 25:543–558.

Taraviras, S., Gutierrez, M., Durbec, P., Jani, H., Grigoriou, M., Sukumaran, M., Wang, L., Hynes, M., Raisman, G. & Pachnis, V. (1999). Signalling by the RET receptor tyrosine kinase and its role in the development of the mammalian enteric nervous system. Development 126:2785–2797.

Thapar, N. (2009) New frontiers in the treatment of Hirschsprung disease. J Pediatr Gastroenterol Nutr 48: S92–94.

Teitelbaum, D., Cilley, R, Sherman, N., Bliss, D., Uitvlugt, N., Renaud, E., Kirstioglu, I., Bengston, T. & Coran, A. (2000). A decade of experience with the

primary pull-through for hirschsprung disease in the newborn period: a multicenter analysis of outcomes. Ann Surg 232: 372-80.

Torfs C. (1998). An epidemiological study of Hirschsprung disease in a multiracial California population. The Third International Meetings: Hirschsprung disease and related neurocristopathies. Evian, France.

Trupp, M., Arenas, E., Fainzilber, M., Nilsson, A., Sieber, B., Grigoriou, M. Killkenny, C., Salazar, E., Pachnis, V. & Arumäe, U. (1999). Functional receptor for GDNF encoded by the c-ret proto-oncogene. Nature 381: 785-789.

Tou, J., Wang, L., Liu, L., Wang, Y., Zhong, R., Duan, S., Liu, W., Xiong, Q., Gu, Q., Yang, H. & Li, H. (2011). Genetic variants in RET and risk of Hirschsprung's disease in Southeastern Chinese: a haplotype-based analysis. BMC Medical Genetics 12:32.

Vásquez, C. (2006). Secuenciación genética de las *Pseudomonas*. Tesis de graduación para obtención del título de Maestría en Docencia Universitaria. . Universidad de San Carlos de Guatemala.

Vohra, B., Tsuji, K., Nagashimada, M., Uesaka, T., Wind, D., Armon, J., Enomoto, H. & Heuckeroth, R. (2006). Differential gene expression and functional analysis

implicates novel mechanisms in enteric nervous system precursor migration and neuritogenesis. Dev Biol 298(1):259-71 259-71.

Wallace, A. & Anderson, R. (2011). Genetic interactions and modifier genes in Hirschsprung's disease. World J Gastroenterol 17(45):4937-44.

Wallace, A. & Burns, A. (2005). Development of the enteric nervous system, smooth muscle and interstitial cells of Cajal in the human gastrointestinal tract. Cell Tissue Res 319:367-82.

Weber, N. (2009). Enfermedad de Hirschsprung. Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica LXIX (602) 251-256.

Wittke, J., Pluzhnikov, A. & Cox, N. (2005). Rational inferences about departures from Hardy-Weinberg equilibrium. Am J Hum Genet 76(6): 967-986.

Wood, J. (2012). Enteric Nervous System: The Brain In The Gut. Morgan & Claypool Publishers. pp 9-11.

Wu, T., Tsai, T., Chang, H., Su, C., Li, S., Lai, H. & Li, C. (2010) Polymorphisms of the RET Gene in Hirschsprung Disease, Anorectal Malformation and Intestinal Pseudo-obstruction in Taiwan. J Formos Med Assoc 109(1):32–38.

Wu, L., Patten, N., Yamashiro, T. & Chui, B. (2002). Extraction and Amplification of DNA from Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissues. Applied Immunohistochem Mol Morphol 10: 269-74.

Yagi, N., Satonaka, K., Horio, M., Shimogaki, H., Tokuda, Y. & Maeda, S. (1996). The role of DNase and EDTA on DNA degradation in formaldehyde fixed tissues. Biotech Histochem 71: 123-9.

Yanchar, N. & Soucy, P. (1999). Long-term outcome after Hirschsprung's disease: patients' perspectives. J Pediatr Surg 34:1152–60.

Young, H., Anderson, R. & Anderson, C. (2004). Guidance cues involved in the development of the peripheral autonomic nervous system. Auton Neurosci 112: 1-14.

Young, H., Turner, K. & Bergner, A. (2005). The location and phenotype of proliferating neural - crest derived cells in the developing mouse gut. Cell Tissue Res 320: 1–9.

Zdanowicz, M. (2010). Concepts in Pharmacogenomics. ASHP. pp 58-59.