



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
UNIDAD MÉDICA DE ALTA ESPECIALIDAD
HOSPITAL DE PEDIATRÍA DEL CMN "SIGLO XXI"

**ENFERMEDAD DE HIRSCHSPRUNG: LA INMUNOHISTOQUÍMICA EN
BIOPSIAS DE COLON COMO APOYO PARA EL DIAGNÓSTICO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

ESPECIALISTA EN PATOLOGÍA PEDIÁTRICA

PRESENTA:

DRA.CELESTINA MENCHACA CERVANTES

MÉDICO RESIDENTE DE PATOLOGÍA PEDIÁTRICA

No de Registro

R-2012-3603-41

TUTORES

DRA.ALICIA RODRÍGUEZ VELASCO

DR.GUILLERMO RAMON GARCÍA

DR. MARIO ENRIQUE RENDON MACIAS MSc



MÉXICO, D.F.

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
UNIDAD MÉDICA DE ALTA ESPECIALIDAD
HOSPITAL DE PEDIATRÍA DEL CMN "SIGLO XXI"

**ENFERMEDAD DE HIRSCHSPRUNG: LA INMUNOHISTOQUÍMICA EN
BIOPSIAS DE COLON COMO APOYO PARA EL DIAGNÓSTICO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

ESPECIALISTA EN PATOLOGÍA PEDIÁTRICA

PRESENTA:

DRA. CELESTINA MENCHACA CERVANTES

MÉDICO RESIDENTE DE PATOLOGÍA PEDIÁTRICA

No de Registro

R-2012-3603-41

TUTORES

DRA. ALICIA RODRÍGUEZ VELASCO

Médico adscrito al servicio de Patología

DR. GUILLERMO RAMON GARCÍA

Jefe del servicio de Patología

DR. MARIO ENRIQUE RENDON MACIAS MSc

Investigador clínico asociado D

México, D.F.; Diciembre de 2012



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

UNIDAD MÉDICA DE ALTA ESPECIALIDAD

HOSPITAL DE PEDIATRÍA DEL CMN "SIGLO XXI"

**ENFERMEDAD DE HIRSCHSPRUNG: LA INMUNOHISTOQUÍMICA EN BIOPSIAS DE COLON COMO
APOYO PARA EL DIAGNÓSTICO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

ESPECIALISTA EN PATOLOGÍA PEDIÁTRICA

PRESENTA:

DRA. CELESTINA MENCHACA CERVANTES

MÉDICO RESIDENTE DE PATOLOGÍA PEDIÁTRICA

TUTORES

DRA. ALICIA RODRÍGUEZ VELASCO

Médico adscrito al Servicio de Patología

Tel: 56 27 69 00 ext. 22350 correo electrónico alirove0101@gmail.com

DR. GUILLERMO RAMON GARCÍA

Jefe del servicio de Patología

Tel: 56 27 69 00 ext. 22350 correo electrónico gramon55@aol.com

DR. MARIO ENRIQUE RENDON MACIAS MSc

Investigador clínico asociado D

Tel: 56 27 69 00 ext. 22497 correo electrónico mario.rendon@imss.gob.mx

TUTORES

DRA. ALICIA RODRÍGUEZ VELASCO

Médico adscrito al Servicio de Patología de la UMAE Hospital

De Pediatría, CMN "Siglo XXI", IMSS

DR. GUILLERMO RAMON GARCÍA

Jefe del servicio de Patología de la UMAE Hospital

De Pediatría, CMN "Siglo XXI", IMSS

DR. MARIO ENRIQUE RENDON MACIAS MSc

Investigador clínico asociado D de la UMAE Hospital

De Pediatría, CMN "Siglo XXI", IMSS

DRA. CELESTINA MENCHACA CERVANTES

Médico Residente de 2º año de la especialidad en Patología Pediátrica

UMAE Hospital de Pediatría

CMN "Siglo XXI", IMSS.

SINODALES

Dr. Guillermo Ramón García

Jefe del Servicio de Anatomía Patológica de la UMAE Hospital de Pediatría,

CMN "Siglo XXI", IMSS

Dra. Rocío Herrera Márquez

Encargada de la División de Investigación de la UMAE Hospital de Pediatría,

CMN "Siglo XXI", IMSS

Dra. Karla Miranda Barbachano

Médico gastroenterólogo adscrito al Servicio de Gastroenterología y Nutrición de la
UMAE Hospital de Pediatría

CMN "Siglo XXI", IMSS

Dra. Georgina Siordia Reyes

Médico Anatomopatólogo adscrito al Servicio de Anatomía Patológica de la UMAE
Hospital de Pediatría

CMN "Siglo XXI", IMSS

Dra. Floribel Ferman Cano

Médico Anatomopatólogo adscrito al Servicio de Anatomía Patológica de la
UMAE Hospital de Pediatría

CMN "Siglo XXI", IMSS

ÍNDICE

RESUMEN	4
ANTECEDENTES	6
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
HIPÓTESIS	18
JUSTIFICACIÓN	19
OBJETIVOS	20
MATERIAL Y MÉTODOS	21
RESULTADOS	29
DISCUSIÓN	33
CONCLUSIONES	36
AGRADECIMIENTOS	37
REFERENCIAS	38

RESUMEN

ENFERMEDAD DE HIRSCHSPRUNG: LA INMUNOHISTOQUÍMICA EN BIOPSIAS DE COLON COMO APOYO PARA EL DIAGNÓSTICO

Autores: Menchaca-Cervantes Celestina, Velasco-Rodríguez Alicia, Ramón-García Guillermo, Rendón-Macías Mario Enrique. Unidad Médica de Alta Especialidad Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social.

Antecedentes: La enfermedad de Hirschsprung (EH) es una entidad cuyo diagnóstico definitivo se hace sólo con biopsia. En ocasiones el diagnóstico puede llegar a ser erróneo debido a limitaciones tanto de: la muestra (por el tamaño o la calidad del tejido) y las variantes histológicas encontradas en el plexo nervioso intrínseco de los neonatos. La inmunohistoquímica (IHQ) con calretinina mejora la sensibilidad del diagnóstico y se ha aceptado como “el estándar de oro” en la confirmación de la EH. Esto es, la falta de expresión de la calretinina indica falta de células ganglionares. En general, éste recurso no está disponible en muchos centros y la conclusión suele ser emitida exclusivamente por el criterio del patólogo con solo la tinción de hematoxilina y eosina.

Objetivos: Establecer la precisión diagnóstica histopatológica con hematoxilina y eosina e IHQ con calretinina para evidenciar neuronas ganglionares, en biopsias de colon de los casos con sospecha de enfermedad de Hirschsprung de nuestro hospital.

Material y métodos: Estudio retrospectivo observacional, transversal y descriptivo. Se realizó en especímenes obtenidos de pacientes pediátricos con diagnóstico histopatológico de EH, atendidos en nuestro hospital. Se analizaron los casos recibidos de enero del 2005 a diciembre del 2011. Se excluyeron los casos con material histológico inadecuado (cantidad y calidad). En cada paciente se analizaron cortes de tejido normal y de sospecha. Así mismo, se tomó en cuenta del tipo de muestra recibida (biopsias por succión, transmural, resección segmentaria y la revisión de laminillas con bloque de parafina); y el diagnóstico

anatomopatológico previo; además se obtuvo la edad y género. En los seleccionados se realizó IHQ para detección de calretinina (marca Dako). La positividad o negatividad en la marcación de esta proteína fue evaluada, en conjunto, por dos observadores, para una opinión consensuada.

Análisis estadístico: tipo descriptivo, se determinó el porcentaje de validez de la interpretación en el reporte histopatológico inicial contra el confirmatorio por IHQ. Se obtuvo el valor predictivo del diagnóstico histopatológico emitido por los patólogos y sus intervalos de confianza al 95%

Resultados: el diagnóstico de EH, establecido con H&E, se confirmó en el 69 %, de los 13 casos evaluados con IHQ para calretinina. Así se establece que el valor predictivo para que los patólogos del hospital hagan el diagnóstico de EH en biopsia teñida sólo con H&E es de 69.2%; IC_{95%} 38.6 a 90.1 %. El diagnóstico histopatológico, de EH, considerado de certeza con base en la biopsia inicial teñida sólo con H&E se descartó en 4 casos.

Conclusiones: El uso de la IHQ para calretinina, aunque no es de uso exclusivo para la enfermedad que aquí analizamos, permitió descartar la EH en el 31 % de los casos estudiados. Así, en un hospital de alta especialidad, debe ser considerada como una práctica rutinaria para el diagnóstico histopatológico de la EH, debido a las implicaciones, de tratamiento y pronóstico que tiene el hacer un diagnóstico preciso.

ANTECEDENTES

Generalidades

Por primera vez, en 1886 Harald Hirschsprung presentó en una reunión científica *-in der Gesellschaft fur Kinderheilkunde Berlin-* su casuística de recién nacidos con estreñimiento que fallecieron. Señaló que las autopsias mostraban el colon transversal y descendente con gran dilatación (megacolon) e hipertrofia, pero que el recto y sigmoideos no estaban afectados (1). Este es, aparentemente, el primer antecedente sobre lo que ahora se conoce como Enfermedad de Hirschsprung (EH). En ese entonces se pensaba que el segmento afectado era el dilatado y no el segmento distal agangliónico y estenótico. Alrededor de cincuenta años más tarde se establecieron las bases clínicas, radiológicas, quirúrgicas e histopatológicas para el diagnóstico de la EH como las conocemos ahora (2).

La EH se define como la ausencia, segmentaria o total, congénita de neuronas ganglionares en el plexo nervioso intrínseco de la porción distal del tubo digestivo, asociada a contracción persistente (estenosis) del segmento afectado, falta de movimientos propulsivos, obstrucción colónica y dilatación subsecuente de la porción proximal normal (3). La enfermedad afecta recto y sigmoideos en el 80 % de los casos y se clasifica según el segmento afectado en: 1) de segmento corto (75 a 80 % de los casos), cuando no afecta más allá de la unión rectosigmoidea; 2) de segmento ultracorto, si sólo afecta el esfínter interno o algunos centímetros por arriba de dicho esfínter y 3) de segmento largo, cuando la agangliosis se extiende más allá de la unión rectosigmoidea. El 5% de los casos se presentan con ausencia de células ganglionares en toda la longitud del colon.

Es una enfermedad genética heterogénea, en la que la mayoría de los casos son esporádicos (70%), aunque se ha reportado componente familiar en aproximadamente el 10% de los pacientes (2). La herencia es poligénica, de penetrancia variable. En alrededor del 50% de los casos las mutaciones genéticas son específicas y residen en los cromosomas 2, 10 y 13 (4). Entre los varios genes descritos involucrados con la EH también se han informado anomalías

localizadas en el cromosoma 21q22, lo que explica la prevalencia de la enfermedad en el 10 % de los pacientes con trisomía 21. En 10 a 15 % de los pacientes se presentan otras anomalías congénitas u otras enfermedades y en 5% hay anormalidades neurológicas severas. Las mutaciones puntuales del gen RET relacionadas con neoplasia endocrina múltiple (MEN) tipos IIA y IIB y el carcinoma medular de tiroides familiar frecuentemente se asocian con EH, en la que se han descrito más de 50 mutaciones RET (2).

La enfermedad se sospecha cuando hay manifestaciones de obstrucción del tracto intestinal bajo en el periodo neonatal o en caso de constipación crónica intensa en niños mayores. El diagnóstico de certeza se establece con biopsias rectales, que incluyan la submucosa o todo el espesor de la pared intestinal.

Se estima que la EH es poco frecuente ya que su incidencia es de un caso por cada 5000 nacidos vivos al año, con predilección por el género masculino, con una relación de 3-4.5:1 (5, 6).

Muchos artículos han sido publicados para explicar la patogenia de la EH, la hipótesis actual sobre la patogénesis refiere que en el desarrollo embriológico normal del sistema nervioso entérico intrínseco, las células neuroentéricas migran de la cresta neural hacia el tracto alimentario superior y se dirigen en dirección caudal y hacia la doceava semana de gestación ya se encuentran en el colon distal (2). Mientras más temprano ocurre el defecto en la migración celular el segmento afectado es más largo. La migración ocurre primero hacia el plexo mientérico (Auerbach) y posteriormente estas células se internan en el plexo submucoso (5). También se ha hablado de la teoría del “microambiente alterado” en la que se plantea la posibilidad de que las células ganglionares migren correctamente, pero ya en el intestino no encuentren las condiciones aptas para su desarrollo (4). Además hay reportes que describen alteración en las células intersticiales de Cajal (ICCs), algunos autores encuentran un número de ICCs normal, mientras que otros sugieren que su número esta disminuido (7). Sin

embargo no existen datos precisos sobre las características de éstas células y la EH.

Fisiopatología

En la inervación del colon participan los sistemas simpático (inhibitorio) y parasimpático, (excitatorio) mediados por adrenalina y acetilcolina respectivamente. Las neuronas pre-ganglionares de estos sistemas se encuentran en diferentes secciones de la médula espinal. Las neuronas pos-ganglionares simpáticas son paravertebrales o pre-aórticas. Las neuronas pos-ganglionares parasimpáticas se encuentran en el órgano mismo o muy cerca de él. Además el tracto gastrointestinal tiene su inervación intrínseca conocida como sistema nervioso entérico (figura 1), constituido por los plexos mientérico (Auerbach) y submucoso (Meissner), conectados entre sí por medio de fibras amielínicas. Normalmente en el colon existe equilibrio entre las fuerzas de relajación y contracción. El reflejo de motilidad normal consiste en la contracción por arriba del bolo y la dilatación por debajo del mismo, este reflejo es puramente intrínseco y su ausencia indica falta de células ganglionares. Cuando falta el plexo nervioso intrínseco del colon, se produce hipertrofia de las fibras nerviosas colinérgicas del plexo extrínseco parasimpático (5, 8-10).

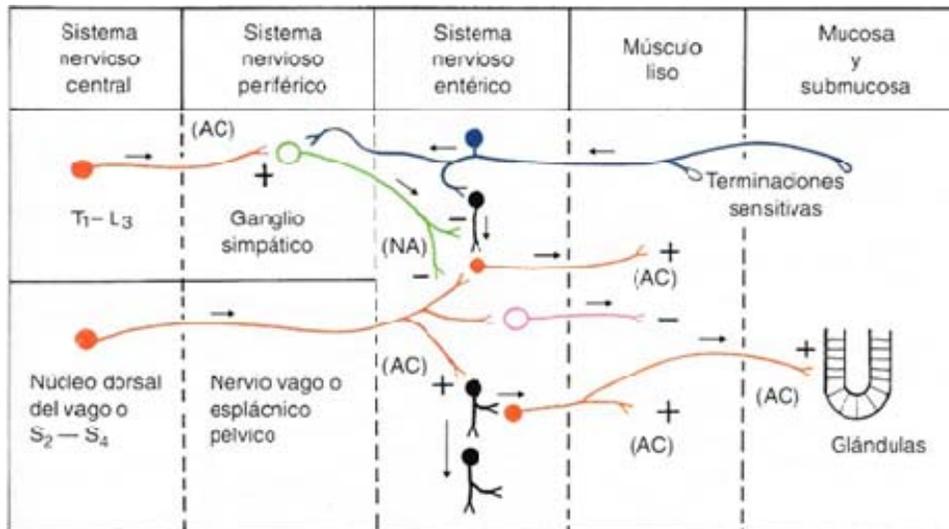


Figura 1. En el esquema se muestra la relación que existe entre el sistema nervioso entérico (intrínseco) con los sistemas central y periférico. Tomado de: Kiernan J.A, Barr El Sistema Nerviosos Humano. McGraw Hill USA 2005:399

Características clínicas

La EH se puede manifestar dentro de las primeras 24 a 48 horas de haber nacido, aunque más del 80% de los casos se diagnostican durante el primer año de vida y 10% se manifiesta en adultos. Típicamente entre los síntomas con los que debe sospecharse la enfermedad esta la constipación, definida en el recién nacido como retraso mayor a 48 horas para la evacuación meconial, síntoma que se presenta en el 60 % de los casos; vómito, dilatación importante del segmento normal proximal y la distensión abdominal subsecuente. La disminución en la ingesta de alimento y la malabsorción causan alteraciones en el crecimiento y desarrollo. El estado nutricional deteriorado favorece las infecciones que pueden empeorar el problema y ser la causa subyacente de mortalidad. Algunos pacientes desarrollan intususcepción intestinal debido a las diferentes presiones de la luz, específicamente en el sitio afectado. En el periodo neonatal los pacientes pueden presentar perforación al ocurrir simultáneamente con enterocolitis necrosante, causa de mortalidad en el 30 % de los pacientes con EH (5).

Diagnóstico

El cuadro clínico y los estudios de imagen pueden orientar hacia un problema obstructivo intestinal. Si la constipación crónica no tiene una causa mecánica debe pensarse en EH. Las radiografías simples, anteroposterior y lateral de abdomen pueden ser de gran ayuda para orientar el diagnóstico. El enema contrastado muestra una sensibilidad del 70 % y una especificidad de 83 % (11), con éste se hace evidente una zona distal (proximal al ano) estrecha (agangliónica), una zona de transición (hipogangliónica) en forma de embudo y la zona proximal dilatada (gangliónica). El cuadro clínico y las alteraciones en el estudio de imagen sugestivas de EH son motivo para solicitar la manometría ano rectal y colónica, sin embargo **el procedimiento más importante para el diagnóstico es la biopsia**, por succión o transmural. La biopsia, considerada como el estándar de oro, desde la introducción de la biopsia rectal por succión, procedimiento menos traumático para el paciente, se ha incrementado el grado de dificultad diagnóstica para los patólogos que utilizan sólo H&E para el diagnóstico. La dificultad estriba en que las

células ganglionares en la submucosa son más pequeñas y están más esparcidas que en el plexo intramural. Generalmente se toman de dos a tres muestras endorectales por succión, a dos o tres cm. del margen anal. Una muestra adecuada debe incluir hasta la submucosa. Cuando se complementa con evaluación por inmunohistoquímica, la biopsia posee sensibilidad cercana al 100 % y especificidad del 100 %. (11, 12)

Hallazgos anatomo-patológicos

En la EH, tanto el plexo mientérico (Auerbach) como el submucoso (Meissner) son agangliónicos. Aunque, como ya se mencionó, la biopsia que es actualmente el único recurso para confirmar el diagnóstico no está exenta de problemas de interpretación. Si las muestras se toman más allá de los 3 cm. antes referidos puede no diagnosticarse la forma de segmento ultracorto; si se toman más próximas al ano puede hacerse un diagnóstico falso positivo ya que los primeros 3 cm, por arriba del ano normalmente son agangliónicos. La presencia de uno o más cuerpos de células ganglionares (figura 2A) permite excluir el diagnóstico de EH, mientras que la ausencia de células ganglionares (figura 2B), en una muestra identificada como adecuada (bien orientada, tamaño suficiente, bien cortada y bien teñida), especialmente si se acompaña de hipertrofia de las fibras nerviosas, en plexos nerviosos submucoso o mientérico (diámetro mayor o igual a 40 μm) correlaciona fuertemente con agangliosis. El aumento en el número de las fibras nerviosas en la muscular de la mucosa y la lámina propia que acompaña a la EH sólo es evidente con tinciones diferentes a la hematoxilina y eosina. La más utilizada es la inmunohistoquímica (IHQ) con acetilcolinesterasa, que sólo se puede realizar en tejido congelado en fresco, lo que le confiere a la biopsia una sensibilidad del 85 % y una especificidad del 100 %. (Figura 3) La hipertrofia de los nervios está asociada con aumento en el número de mastocitos, estos producen factor de crecimiento nervioso con estimulación del crecimiento neural. En otras palabras, es bien sabido que lo más característico de la EH es la ausencia de células ganglionares en el segmento estenosado. Para su diagnóstico

con tejido fijado en formol, incluido en parafina y teñido con hematoxilina y eosina (H&E) se requiere de considerable experiencia.

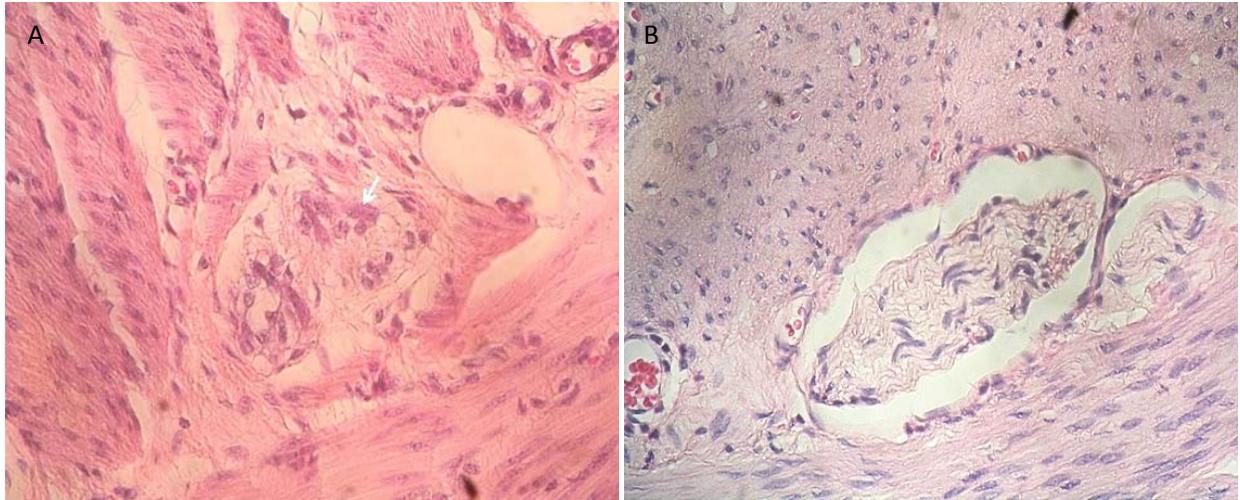


Figura 2. Aspectos histopatológicos de la enfermedad de Hirschsprung. A, Plexo mientérico normal en un recién nacido con neurona aparente (flecha). H&E, 40 X. B, plexo mientérico agangliónico y con hipertrofia de las fibras nerviosas extrínsecas, del simpático. H&E, 40 X. C.

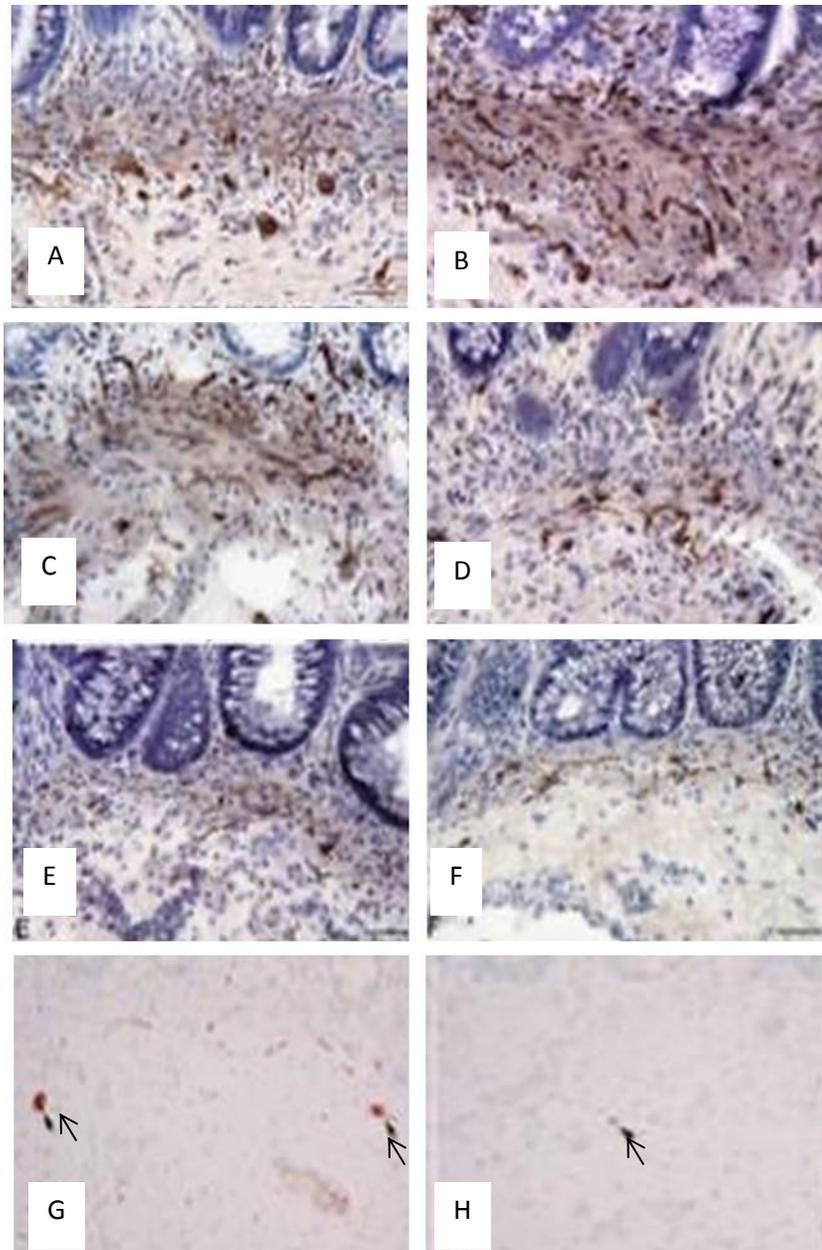


Figura 3. Panel de inmunohistoquímica con acetilcolinesterasa (A-F) y calretinina. (G, H). A, B y D muestran casos de pacientes con EH, C, E y F muestran casos de pacientes sin EH. Los casos de los cuadros C y D fueron valorados por dos observadores, uno interpretó, ambos, como EH, mientras que otro dijo que no eran EH. Comparándolos con sus controles positivos (A, B) y negativos (E, F) se ejemplifica la dificultad para valorar la AChE como herramienta auxiliar en el diagnóstico de la EH. Mientras que la IHQ con calretinina (G, calretinina positivo) el paciente enfermo (C), se descarta fácilmente la enfermedad; así en el paciente enfermo (D), se confirma el diagnóstico (H, calretinina negativo). Tomada y modificada de: Kapur RP et al. (9)

Frecuentemente la pared del intestino proximal al segmento agangliónico se biopsia durante la cirugía para asegurar que la resección marginal es correcta. Si hay hipertrofia de los troncos nerviosos o no hay células ganglionares en los cortes de tejido congelado la cirugía se debe extender en dirección proximal y valorar nuevamente las muestras en cortes de tejido congelado para precisar la región que contiene neuronas normales y así prevenir la recurrencia de la sintomatología. Si el paciente presenta síntomas postoperatorios, puede ser porque hay una zona residual con neuropatía intestinal agangliónica, variedad displasia neuronal, que según criterios clínicos e histopatológicos tiene los siguientes tipos: A, aplasia o hipoplasia de la inervación simpática; B, hipertrofia neural, aumento en el número de células ganglionares. El diagnóstico de esta entidad se realiza con biopsia sólo en el 50 % de los casos. Otras causas de recurrencia de la sintomatología son: un segmento agangliónico residual o un desorden secundario: isquemia o infección postoperatorias (2, 3, 5, 6).

Problemas de diagnóstico anatómo-patológico

A pesar de que la EH fue descrita por primera vez hace más de 100 años el diagnóstico anatómo-patológico sigue siendo un reto para el patólogo, sobre todo si en los casos considerados como positivos para EH la interpretación de la biopsia sólo se basa en la tinción de rutina con H&E. Cuando no se cuenta con técnicas auxiliares que faciliten la identificación de los plexos en la submucosa, las biopsias por succión son más difíciles de interpretar porque en el plexo submucoso, normalmente, las células ganglionares son escasas (4, 8, 13).

En el recién nacido, especialmente si es pretérmino, puede ser difícil reconocer las células ganglionares por ser más pequeñas de los esperado y con núcleo poco evidente y existe el riesgo de emitir un diagnóstico falso positivo. Su presencia se puede sugerir cuando se encuentran estructuras rosetoides con una matriz tipo neuropilo. Las células ganglionares inmaduras pueden parecer macrófagos, células de músculo liso y células de Schwann, y aún con tinciones especiales las células inmaduras pueden pasar inadvertidas porque suelen no teñirse con marcadores gangliónicos (5, 7, 8, 14).

La utilidad de la biopsia depende completamente de la habilidad del cirujano que tome la muestra, de los recursos con los que se cuente en el servicio de patología y de la experiencia del patólogo que interprete el material (1, 7, 8). El diagnóstico histopatológico adecuado de la EH determinará el mayor o menor éxito en el tratamiento quirúrgico de la enfermedad. Los pasos que se recomienda seguir con cada una de las muestras son:

Si el patólogo no observa células ganglionares, con tinciones de H&E, porque la biopsia es muy superficial o porque sólo estudió pocos cortes debe ser muy cuidadoso antes de emitir un diagnóstico. En esta última situación, el patólogo debe solicitar tantos cortes (hasta 100) (8) como sea necesario para concluir que no hay células ganglionares (1), inclusive hay quienes recomiendan agotar el tejido. Con base en las limitaciones referidas, se han propuesto varias técnicas especiales como auxiliares en el diagnóstico histopatológico de la EH.

Técnicas especiales para evaluar las biopsias en la enfermedad de Hirschsprung

Durante décadas se ha utilizado la tinción de H&E para confirmar o excluir el diagnóstico histopatológico de EH, con la que pueden revisarse hasta 400 niveles en los bloques de parafina, para confirmarlo. En muchos laboratorios se continúa haciendo el diagnóstico de esta forma y sólo en contados se utiliza el apoyo de la histoquímica enzimática a base de acetilcolinesterasa (ACE) y la inmunohistoquímica, y algunos anticuerpos, en cortes congelados e incluidos en parafina, respectivamente. A la fecha, se ha desarrollado con base en la inmunohistoquímica, principalmente, varios marcadores neuronales como técnica auxiliar de diagnóstico para el patólogo, que facilitan la identificación de células neuronales, aunque los resultados no son siempre uniformes y se han reportado casos tanto falsos positivos como falsos negativos, por lo que es importante identificar el más útil con base en los recursos, tanto materiales como humanos, de cada hospital. Debido a que la especificidad y la sensibilidad de estas formas adicionales de evaluar las biopsias varían de un centro a otro, se siguen buscando nuevas herramientas de apoyo para el diagnóstico histopatológico (14).

Con la tinción de histoquímica enzimática de AChE, lo que se hace patente es el aumento de la red de fibras nerviosas colinérgicas en la lámina propia y la muscular de la mucosa. En la submucosa hay troncos nerviosos pequeños y grandes. El aumento de las fibras nerviosas AChE positivas es característico de la EH de segmento corto y largo. Sin embargo el patrón de tinción de AChE es menos intenso en neonatos que en niños mayores y esto puede ser causar diagnósticos falso negativo.

El procedimiento más común para la tinción de AChE es: en dos biopsias, una se congela y la otra se fija en formol para incluirla en parafina. Otra razón por la que el segmento congelado puede dar falsos negativos es la degradación enzimática cuando pasa mucho tiempo antes de procesar la muestra.

Varios marcadores de IHQ como: la proteína S100, enolasa de neurona específica, proteína glial fibrilar ácida, CD56 y la catepsina D. (10, 11, 15) Además marcadores de nervios intrínsecos y extrínsecos como NGFR y GLUT 1, han sido utilizados para corroborar el diagnóstico de EH pero ninguno ha mostrado ser mejor que la AChE, en cuanto a sensibilidad (8), Cuadro 1.

En la práctica, a través de una red de correo electrónico donde se consultan casos de patología pediátrica (pedpath@washingtton.edu; experiencia personal), patólogos de once hospitales, tanto de Europa y Estados Unidos, dan a conocer la forma cómo en sus servicios de patología se trabaja con las biopsias de colon referidas con el diagnóstico clínico de EH. Sus opiniones confirman la falta de protocolos mundialmente aceptados para el diagnóstico histopatológico de EH. En general todos coinciden en que: “en la actualidad no debe hacerse el diagnóstico en el estudio transoperatorio”. En este sentido, seis centros no utilizan la acetilcolinesterasa para el diagnóstico, cuatro si la emplean y uno solamente en casos con dificultad para el diagnóstico. Además, el número de cortes que se hacen en la biopsia, antes de diagnosticar ausencia de células ganglionares, es muy variado: en tres de ellos agotan el bloque; en dos no hacen niveles, si la muestra es insuficiente y piden otra biopsia; dos hacen 50 niveles y en otro piden más de 80 niveles. Esta práctica inclusive varia dentro de un mismo hospital,

dependiendo del patólogo que trabaje la biopsia; práctica que también se encuentra en nuestro servicio.

En 2004 Barshack y cols. (13) mostraron la falta de expresión de la calretinina, por medio de IHQ, en fibras nerviosas en biopsias de colon en pacientes con HD. La calretinina, que es una proteína fijadora de calcio de 32 KDA, dependiente de vitamina D, que juega un papel importante en la organización y funcionamiento del sistema nervioso entérico (16). Las células ganglionares y sus proyecciones expresan calretinina tanto en el plexo nervioso intestinal, submucoso y mientérico. La falta de expresión de calretinina en las células nerviosas relacionadas es una herramienta para el diagnóstico de agangliosis. Recientemente, Kapur y cols. (8, 9) evaluaron el valor diagnóstico de la IHQ con calretinina en biopsias rectales. Entre las ventajas de utilizar calretinina para el diagnóstico de EH mencionan que: 1) la técnica se realiza en biopsias fijadas en formol. El análisis en tejido congelado no es necesario, ya que el procedimiento se hace en un momento donde la conducta quirúrgica no es necesaria definirla. 2) El patrón de expresión es simple y no deja duda, 3) no es necesario cuantificar la intensidad ni la magnitud de la expresión, simplemente se interpreta como presente (no EH) o ausente (EH), y 4) marca células inmaduras, por lo tanto, no habría falsos positivos entre los recién nacidos.(8) Por ello, con base en este último recurso se podría prescindir de hacer numerosos cortes teñidos con H&E, lo cual consume mucho tiempo y esfuerzo, sin que realmente se alcance mayor utilidad en ello.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La EH es una enfermedad pediátrica del tracto gastrointestinal, que representa un reto diagnóstico, aún para patólogos experimentados. La dificultad para el diagnóstico se incrementó con la introducción de biopsias rectales por succión y ha sido explicada en parte por: muestras insuficientes o inadecuadas (superficiales) tomadas durante los procedimientos endoscópicos, la presencia de tejidos inmaduros en el sistema nervioso entérico por ser de neonatos y la falta de recursos auxiliares en el diagnóstico histopatológico, como la IHQ. Esto ha llevado a un riesgo en la emisión de diagnósticos erróneos, particularmente de falsos positivos con evaluaciones realizadas solo con la técnica de H&E. Por ello, se ha recomendado emplear técnicas adicionales como la inmunohistoquímica para marcar las células ganglionares, cuyo propósito es el de hacer evidente el defecto en la inervación enteral y así confirmar el diagnóstico morfológico. Debido a que en México no existen reportes sobre la experiencia ni la validez predictiva en el diagnóstico de los patólogos en la evaluación de pacientes con sospecha de EH evaluados con técnica por H&E, ni con base en la confirmación por medio de IHQ específica para células ganglionares (calretinina), nos hacemos la siguiente pregunta de investigación.

¿Cuál es el valor predictivo de la evaluación histopatológica por técnica de H&E de los pacientes pediátricos con sospecha de enfermedad de Hirschsprung, considerando la confirmación diagnóstica por medio de IHQ específica para células ganglionares?

HIPOTESIS

El valor predictivo diagnóstico de un resultado considerado como positivo para enfermedad de Hirschsprung por nuestros patólogos, apoyados solo en una técnica de H&E, será de al menos 90% de los casos.

JUSTIFICACIÓN

A pesar de la experiencia ganada con la evaluación frecuente de pacientes con enfermedad de Hirschsprung, por las limitaciones antes comentadas, es factible que existan algunos casos con diagnóstico erróneo de esta condición, emitido con base en las evaluaciones realizadas sólo con microscopía con H&E.

Con la disponibilidad de técnicas de IHQ específicas es factible establecer este margen de error. El presente trabajo permitirá determinar la magnitud de esta diferencia y con ello, justificar la necesidad del recurso para futuros estudios. Si se demuestra una tasa de error del 10% o más, por las repercusiones clínicas en la decisión quirúrgica, consideramos se justificaría la incorporación de este recurso a la evaluación de estos pacientes en todo momento.

Por otro lado, los resultados permitirán determinar con un alto grado de confianza, la frecuencia y características de los pacientes en quienes se realizó el diagnóstico, e informar sobre los hallazgos en un hospital de concentración como la UMAE HE CMN Siglo XXI.

OBJETIVOS

General

Estimar el valor predictivo (y por tanto, también la tasa de falsos positivos) de la evaluación histopatológica por medio de la técnica de H&E, de los pacientes con EH.

Específicos

1. Realizar la reevaluación histopatológica con HIQ específica para células ganglionares (calretinina) en pacientes con diagnóstico histopatológico por H&E de enfermedad de Hirschsprung.
2. Establecer la tasa de verdaderos positivos y falsos positivos (valor predictivo positivo) emitidos con el apoyo de la tinción con H&E.

MATERIAL Y METODOS

A. LUGAR DONDE SE DESARROLLO EL ESTUDIO

El estudio se llevó a cabo en el servicio de Anatomía Patológica del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional "Siglo XXI".

B. TIPO DE ESTUDIO

Estudio retrospectivo, transversal, comparativo y observacional

C. UNIVERSO DE ESTUDIO

Pacientes con datos clínicos altamente sugestivos de enfermedad de Hirschsprung, en quienes por biopsia y estudio histopatológico con técnica de tinción con H&E se confirmó el diagnóstico.

Muestra:

Se obtuvo por conveniencia no probabilística de los casos estudiados durante el periodo del 1 de enero del 2005 al 31 de diciembre del 2011.

Unidad de análisis: biopsias de pacientes

SELECCIÓN DE PACIENTES (BIOPSIAS)

Criterios de Inclusión:

- Reporte de biopsias colónicas reportadas con la presencia de datos histopatológicos compatibles con una EH por tinciones de H&E.
- Procedentes de pacientes menores de 17 años de edad.
- De cualquier sexo.

Criterios de exclusión:

- Biopsias con material en parafina insuficiente en cantidad y calidad (apreciación del patólogo).

- Ausencia de material en los bloques de parafina.
- Solo se analizó una biopsia por paciente, se eliminaron las realizadas en forma consecutiva (se seleccionó la más representativa).

Criterios de eliminación:

- Evidencia de tejido mal preservado posterior a la tinción con IHQ. Definido con datos de lisis celular por mala fijación, ausencia de tinción de neurofilamentos.

II. TAMAÑO DE LA MUESTRA

Considerando un precisión de un 95% (intervalo de confianza) con un estimado de al menos un valor predictivo positivo del 90% y considerando una hipótesis de una sola cola, se estimó un tamaño mínimo de muestra de: 14 pacientes

DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO

I. BUSQUEDA DE LOS CASOS

En el archivo del Servicio de Patología del Hospital de Pediatría del CMN “Siglo XXI” del IMSS, se llevó a cabo la búsqueda de los reportes de estudios histopatológicos con diagnóstico de enfermedad de Hirschsprung, recibidos entre el 1° de enero de 2005 al 31 de diciembre de 2011. Se seleccionaron aquellos que tenían bloque de parafina de la biopsia colónica con las condiciones previamente estipuladas para llevar a cabo la inmunohistoquímica (calretinina).

Una vez obtenido el material en parafina se llevó a cabo la tinción de algunos cortes con la siguiente técnica:

TINCION DE IHQ

Debido a que la agangliosis generalmente es segmentaria, durante el procedimiento quirúrgico se toman muestras tanto del sitio macroscópicamente afectado como del aparentemente normal. Por lo tanto, de cada caso se tienen

laminillas teñidas con H&E con muestras de las zonas posiblemente agangliónicas y muestras de tejido normal.

De cada laminilla teñida con H&E se seleccionó la que reuniera las mejores condiciones de tejido: tamaño y orientación. También se obtuvieron cortes de un tejido considerado como normal para control.

Inmunohistoquímica:

La inmunohistoquímica s, tanto para el problema como para el control, se realizó con el sistema peroxidasa-antiperoxidasa por un biólogo capacitado en la técnica de acuerdo a las recomendaciones de los proveedores.

Se realizaron cortes de 3 a 4 μm de tejido incluido en parafina, previamente fijado en formol amortiguado al 10%, utilizando porta objetos con *poly-L lysine*. (0.1% en agua destilada). El tejido se desparafinó en la estufa a 56° C durante 30 minutos y rehidratado desde xilol hasta agua destilada pasando por alcoholes a concentraciones decrecientes (5 minutos en cada uno de las soluciones). Posteriormente se efectuó la recuperación antigénica con DAKO *target retrieval solution* al 10% durante 10 minutos en olla de presión. Una vez que se enfrió (temperatura ambiente) se retiró del recuperador y se enjuago con agua destilada o PBS. La peroxidasa se bloqueo por 10 minutos con DAKO *peroxidase blocking* al 3% (evitando el contacto con la luz) y se lavó con agua destilada o PBS.

Los cortes se incubaron en cámara húmeda durante 20 minutos con los anticuerpos primarios: Calretinina (1:50 DAKO corporation, Carpenteria Ca. Anticuerpo monoclonal de ratón anti-calretinina humano Clona Ki-S5 Isotipo IgG kappa. Código No M 7187) y Neurofilamentos (1:150 DAKO corporation, Carpenteria Ca. Anticuerpo policlonal de conejo anti-neurofilamentos. Código No A0485).

El anticuerpo primario se detectó a través de un anticuerpo secundario biotinilado. Una vez aplicado, se incubo durante 30 minutos en streptavidina conjugada

(peroxidasa de rábano). Posteriormente se reveló con el cromógeno diaminobencidina (DAB) por 5 minutos y finalmente será contraste con hematoxilina.

El tejido se deshidrató con alcoholes de menor a mayor concentración (70%, 90% y 100%) y xilol. Las preparaciones se montaron con resinas.

En cada caso se incluyó pared de colon sin alteraciones histológicas como control positivo conocido, para calretinina. Cabe señalar que la calidad del tejido fue evaluada con la expresión de neurofilamentos, marcador que debe ser positivo en todos los cortes de pared de colon, sin excepción. Por tanto, si un espécimen no sale positivo a este marcador nos indicará la mala preservación del tejido, así se evita tener falsos negativos.

Una vez obtenidas las laminillas, con la IHQ fueron valoradas por 2 patólogos expertos (ARV y GRG) de manera simultánea. Se revisaron con microscopio óptico convencional marca Olympus bajo objetivos 10x y 40x. Se buscó la positividad en las células ganglionares en los plexos submucoso y mientérico manifestadas por una coloración café marrón en su citoplasma. Cuando se encontraron se reportó la biopsia como negativa para enfermedad de Hirschsprung y su ausencia como confirmatoria de enfermedad de Hirschsprung..

RECOLECCIÓN DE DATOS DE PACIENTES

II.CAPTURA DE LA INFORMACIÓN

Se llevó a cabo en hojas de recolección de datos. Se tomó en cuenta: género, edad y tipo de biopsia. Ver Anexo.

Posterior al estudio con IHQ se hizo la siguiente distribución:

Con EH: biopsia en la que por IHQ se demostró ausencia para calretinina, en tejido conservado (control positivo adecuado).

Sin EH: biopsia en la que por IHQ se encontraron células positivas para calretinina en tejido conservado.

DEFINICIÓN DE VARIABLES

VARIABLE	DEFINICIÓN OPERACIONAL	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	TIPO DE VARIABLE	ESCALA DE MEDICIÓN	INDICADORES
Edad	Tiempo transcurrido en años desde el nacimiento hasta la toma de la biopsia. Informado en el expediente.	Tiempo de vida en años	Independiente	Cuantitativa continua	Años cumplidos. En pacientes neonatos se considerarán los días.
Género	Género definido en el expediente del paciente	Características fenotípicas relacionado al sexo	Independiente	Nominal Dicotómica	Masculino Femenino
Enfermedad de Hirschsprung por IHQ	Reporte de ausencia de células ganglionares en los plexos submucoso y mientérico del colon a la tinción con IHQ	Ausencia De células ganglionares en los plexos entéricos	Independiente (Predicción)	Nominal Dicotómica	Positiva: ausencia de células teñidas Negativa: presencia de células teñidas (ganglionares)

E. ANALISIS ESTADÍSTICO

Descriptiva:

Se realizó estadística descriptiva de las características de los pacientes: para género frecuencia simple y porcentual; edad se obtuvo media y desviación estándar o mediana y máximo-mínimo según distribución. Así mismo, se establecieron las frecuencias por grupos etarios.

Analítica:

Se determinó el valor predictivo del diagnóstico inicial, emitido por la interpretación de las biopsias teñidas sólo con H&E. Este se estableció como la proporción (porcentual) de los casos correctamente diagnosticados una vez evaluados con la IHQ para calretinina. Se consideró como estándar de oro el diagnóstico histopatológico con la IHQ como método auxiliar. Se obtuvieron así mismo los intervalos de confianza al 95% de este estimado. Para comparar la edad en ambos grupos se utilizó χ^2 . Los análisis se realizaron con el programa estadístico Epidat 3.1.

G. ASPECTOS ÉTICOS

De acuerdo a la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud Titulo II, Capítulo I, Artículos 17 y 23 (1997) el presente estudio se ubica en la categoría de sin riesgo por ser revisión de las bases de datos y material histológico tomado con anterioridad con autorización de los padres del paciente, por lo cual, no se necesita de un consentimiento informado verbal o escrito.

Sin embargo, de acuerdo a los lineamientos internacionales y la ley nacional antes comentada, se respetará la confidencialidad de los pacientes. La información será procesada de forma anónima y los datos serán reportados para fines de investigación.

El protocolo será sometido al comité de investigación y ética del hospital para su aprobación.

H. FACTIBILIDAD

I. Recursos humanos: Se dispuso de investigadores especialistas en el tema, así como asesores metodológicos y de histotecnólogos capacitados en el procesamiento de las muestras con H&E. La IHQ se realizó fuera del hospital por falta de personal capacitado para la realización de la misma en el servicio de patología de la unidad.

II. Recursos materiales: se contó con todo el equipo para la realización de las tinciones y la interpretación de las laminillas: Microscopio óptico convencional profesional con objetivos de 4x, 10x, 40x y 100x. Micrótopo para los cortes de los bloques de parafina, laminillas (portaobjetos), reactivo de calretinina y neurofilamentos para la IHQ.

Para el análisis se contó con equipo de cómputo y programas estadísticos.

Así mismo, en una revisión previa se encontraron 68 pacientes con biopsia de colon por sospecha clínica de EH, de los cuales en 48 se emitió el diagnóstico histopatológico de EH por H&E, sin embargo, sólo el 29% tuvieron bloques de parafina para el estudio.

No se requirió de financiamiento externo.

RESULTADOS

De un total de 100 biopsias analizadas con diagnóstico clínico de enfermedad de Hirschsprung, se confirmó el diagnóstico con la biopsia teñida con H&E en 68, de un total de 48 pacientes. De los 48 pacientes sólo en 14 (29.2%) se dispuso de bloque de parafina para el estudio de inmunohistoquímica. Uno de estos casos se excluyó porque el tejido fue insuficiente, por lo que finalmente, es de trece casos que se informan los resultados. Cuadro 1

Siete fueron del sexo masculino (54%), y seis (46%) del femenino, con rango de edad de menos de 1 año hasta 6 años con mediana de 1 año.

En los casos confirmados de EH no hubo diferencia con respecto al tipo de biopsia (succión o transmural).

En nueve de 13 , casos se corroboró la enfermedad de Hirschsprung, cinco (38%) fueron de varones y cuatro (31%) de niñas, con una relación H: M de 1.2:1.

Aunque más de la mitad (54%) fueron pacientes de 0 a un año, no hubo diferencia estadísticamente significativa por edad entre los casos confirmados y no de enfermedad de Hirschsprung ($p= 0.87$).

La inmunohistoquímica para neurofilamentos, utilizada para valorar la viabilidad del tejido fue positiva en 12 casos, con lo cual se consideró que el tejido era adecuado para la evaluación con calretinina. El caso que no la mostró fue porque no había en el plexo nervioso aparente, ni con H&E.

Con la calretinina se estableció que el valor predictivo positivo para la EH con biopsia teñida sólo con H&E es de 69.2%; IC_{95%} 38.6 a 90.1.

Cuadro 1. Características de los pacientes según resultado de la inmunohistoquímica para calretinina (N= 13 pacientes)

	Pacientes con enfermedad de Hirschsprung (calretinina negativa) N=9 (69 %)*	Pacientes sin enfermedad de Hirschsprung (calretinina positiva) N=4 (31 %)
Género		
Masculinos	5	2
Femeninos	4	2
Edad		
< 1 año	2	2
1 año	2	1
2 a 3 años	2	1
5 a 6 años	3	0
Total (p 0.87)**	9	4
Tipo de biopsia		
Transmural	7 (5 pacientes)	2
Endoscópica	6 (4 pacientes)	2

*Valor predictivo positivo para el diagnóstico de EH con HE, IC_{95 %} (38.6 a 90.1)

** χ^2

La figura 4 hace evidente la falta de reactividad de la calretinina, lo que confirma el diagnóstico histopatológico de EH.

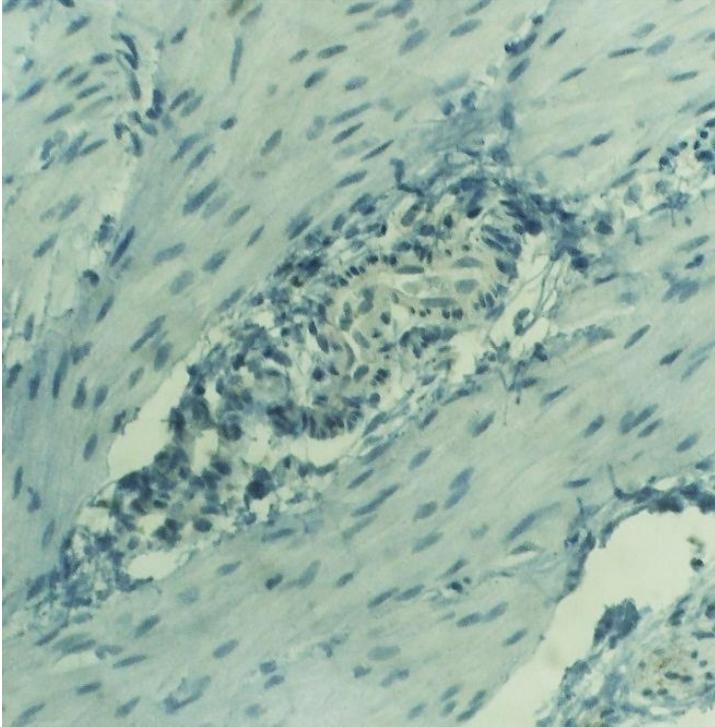


Figura 4. IHQ para calretinina. Se hace evidente la falta de reactividad lo cual confirma la ausencia de células ganglionares y sus proyecciones. Se confirma el diagnóstico de EH.

La figura 5 muestra los casos en los que la calretinina fue positiva y con base en ello se descartó la enfermedad de Hirschsprung,

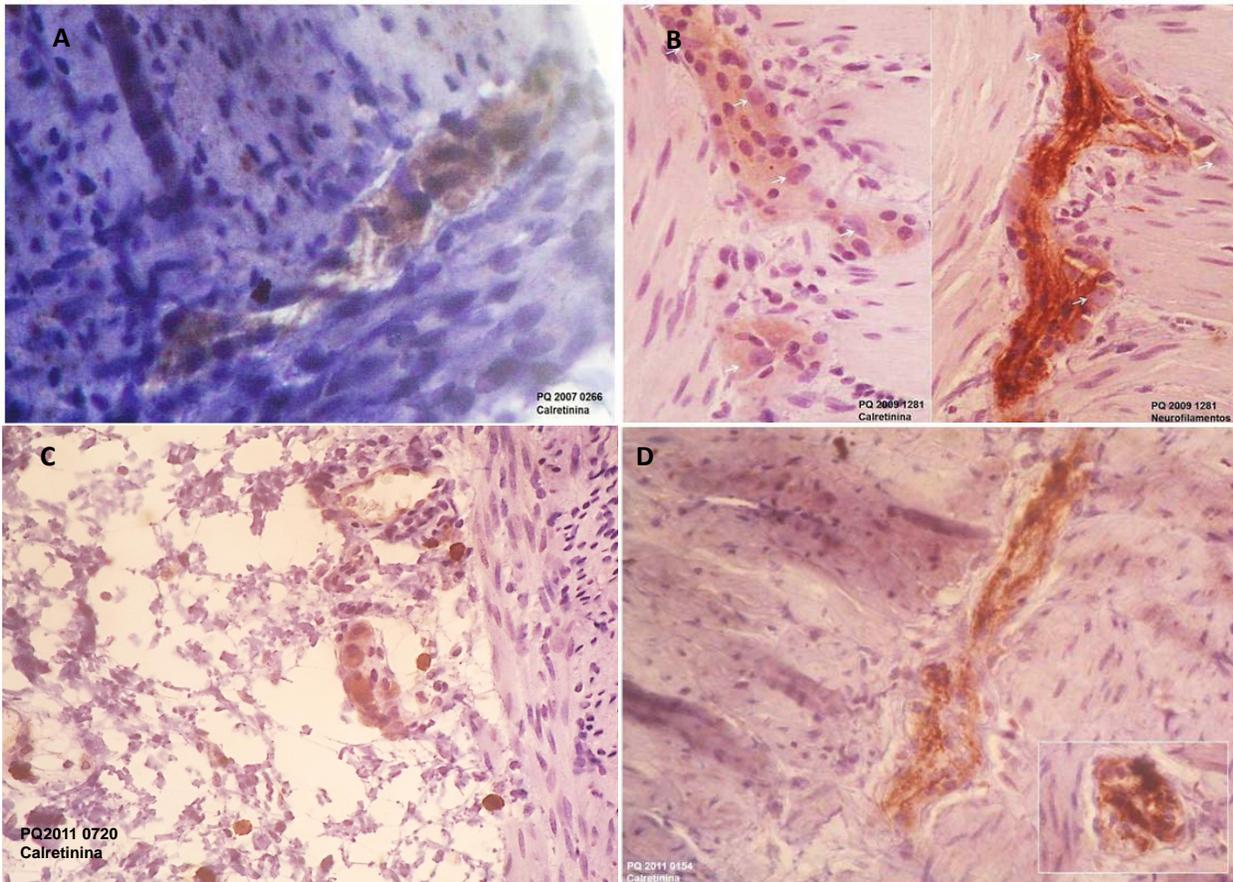


Figura 5. Inmunohistoquímica para calretinina. En los paneles A, B y C se muestra la positividad intensa para las células ganglionares en los plexos nerviosos submucoso (A y C) e intramural (B y D). En el panel B también se ilustra la positividad intensa para neurofilamentos (cuadro derecho) lo que hace evidente la presencia de las neuronas adyacentes (flechas).

DISCUSIÓN

En México cada año nacen aproximadamente 540 niños con enfermedad de Hirschsprung. (17) En nuestro instituto (IMSS) se ignora la prevalencia de la EH.

En un estudio llevado a cabo en el Hospital Infantil de México “Federico Gómez” se refiere una prevalencia para EH de 65.8%, basados en el análisis de 267 biopsias intestinales de espesor total. En éste también se evaluó la manometría anorectal como prueba diagnóstica, identificándose sensibilidad de 100% y especificidad de 88%. Aún así se considera como estándar de oro a la biopsia. (18).

En el Hospital para el niño Poblano, se reporta que la prevalencia para EH es de 67%, en un estudio realizado en 12 biopsias de colon con sospecha clínica de EH en las que se realizó el diagnóstico con H&E (19). En este estudio se concluye que los problemas en dicho hospital, para el diagnóstico de EH en material de biopsias, son tanto una toma inadecuada de la muestra como un proceso histológico deficiente.

En el Hospital Clínico de Niños “Roberto Del Río”, en Chile, se informa que la prevalencia para la EH es baja, del 17% de sus biopsias en la población atendida en ese hospital, estudio realizado en el servicio de patología. (20).

Estas frecuencias de EH en biopsias de tres hospitales, es comparable con nuestra serie donde, una vez descartados cuatro de los casos no confirmados con IHQ, la prevalencia en material de biopsias es de 44 % frecuencia menor a la referida en los dos hospitales pediátricos más importantes de México, debido probablemente a que nuestro hospital es un hospital de tercer nivel de atención.

En nuestro estudio, se emitió el diagnóstico de EH en el 48 % de las biopsias recibidas con ese diagnóstico clínico, desafortunadamente solo se pudo tener

material suficiente para el estudio de IHQ en 13 de los casos, mismo que se confirmó en nueve (69%), basándose en la IHQ para calretinina.

El análisis con inmunohistoquímica para identificar células ganglionares en los plexos nerviosos de intestino grueso es muy variado, uno de ellos es la calretinina, que ha permitido establecer con mayor certeza el diagnóstico de EH, sobretodo en casos con biopsias por succión (9). Kapur y col. en un estudio con 31 casos, reportó no discrepancias en el diagnóstico de acuerdo a su estudio comparativo con H&E vs. calretinina. En nuestro estudio fue posible descartar, por medio de la calretinina, la EH en 31% de los casos, diagnosticados así sólo con H&E. Esta predicción baja (69 %) contrasta con lo informado por Vincent y col. (16), quien señala que la tasa de error diagnóstico fue nula entre los patólogos expertos. El índice de precisión depende también de la frecuencia de casos analizados por año, por ello, hospitales de referencia tienen un nivel de predicción correcta más alta.

Así, consideramos que es fundamental como parte del procedimiento diagnóstico, la detección de la calretinina para demostrar la presencia de células ganglionares en biopsias de colon, procedimiento obligado en niños con sospecha clínica de EH. Esto permitirá una planeación adecuada de las medidas terapéuticas, donde la intervención quirúrgica podría ser más extensa y por lo tanto el pronóstico y la calidad de vida de estos niños.

Por otro lado, en estudios previos se ha puesto en evidencia los posibles problemas en la interpretación de las biopsias por succión, esto secundario a que este tipo de biopsias solo permite la valoración del plexo submucoso, donde las células ganglionares son escasas y están más dispersas. (13). El número de nuestros casos diagnosticados con biopsia por succión e identificados como negativos para EH con IHQ, no fue mayor al de los diagnosticados con biopsia transmural, por lo tanto el tamaño de la muestra no fue un impedimento para el diagnóstico de EH inicialmente emitido.

Una limitante en el análisis histopatológico, es la calidad del tejido. Está indudablemente influye tanto para la valoración por técnicas habituales como para técnicas especiales. En este trabajo se eliminó un sólo caso para el análisis, porque el material era inadecuado. La recomendación es por lo tanto, disponer de más de una biopsia cuando se hacen procedimientos endoscópicos.

Por los objetivos de éste trabajo se realizó la detección de neurofilamentos, para garantizar la calidad del tejido y de esa forma evitar las interpretaciones falsas negativas. Se identificó un caso con ausencia tanto de células ganglionares como de troncos nerviosos, condición denominada “aganglionosis total”, forma particular de EH. (21).

En nuestro estudio la relación hombre: mujer fue de 1.2:1, con 54% y 46% respectivamente, sin evidencia del predominio en el género masculino, como se ha informado en otros estudios que es de 2:1. Consideramos que esta diferencia en nuestro estudio es secundaria al número limitado de casos incluidos. (5, 6).

Es importante para investigaciones futuras, procurar mantener archivos de tejidos incluidos en parafina en condiciones adecuadas, esto permitirá en un futuro revalorar casos y estudiar nuevas técnicas de diagnóstico.

Un aspecto relevante de este trabajo fue demostrar que la calretinina, es un método de complementación para el diagnóstico histopatológico en la Enfermedad de Hirschsprung y que aunque no es de uso exclusivo para la enfermedad que aquí estudiamos, es de gran importancia que en un hospital de alta especialidad se invierta en este tipo de recursos, debido a las implicaciones de tratamiento y pronóstico que se tienen de no obtenerse diagnósticos precisos.

CONCLUSIONES

La utilización, como apoyo diagnóstico, de la inmunohistoquímica para calretinina en las biopsias de colon, teñidas sólo con H&E y con diagnóstico histopatológico de enfermedad de Hirschsprung, permitirá corroborar los casos diagnosticados solo con la tinción básica, independientemente del número de casos que se reciban en un servicio de patología.

Pensamos que esta estrategia tiene un costo-beneficio muy efectivo, dada las implicaciones en el manejo y pronóstico asociadas a la confirmación de la enfermedad de Hirschsprung, ya que en nuestro grupo de estudio una tercera parte de los casos valorados sólo con H&E no fueron EH.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos enormemente al Dr. Carlos Ortiz Hidalgo por su valioso apoyo en la realización de la inmunohistoquímica para la elaboración de este trabajo; y a la histotecnóloga Norma Padrón Pérez por el trabajo técnico realizado.

REFERENCIAS

1. De la Torre-Mondragón L. Enfermedad de Hirschsprung. Mitos y realidades a 120 años de su descripción. *Acta Ped Mex* 2008; 29(3): 139-46.
2. Masiakos PT, Ein SH. The history of Hirschsprung's disease: Then and Now. *Seminars in Colon and Rectal. Surgery* 2006; 17(3):10-19.
3. Hart J, Wilcox R, Weber CR. The Gastrointestinal Tract. In Stocker JT, Dehner LP: *Pediatric Pathology*. Wolters Kluwer/Lippicott Williams y Wilkins editors. 2011 USA, Third edition: 592-96.
4. Odze RD, Goldblum JR. Neuromuscular disorders of the GI tract. In: Odze RD, Goldblum.JR. *Surgical Pathology of the GI tract Liver, Biliary tract and Pancreas*. Saunders Elsevier editors. USA 2009, Second edition: 725-32.
5. O Neil JA, Rowe MI, Grosfeld JL, Fonkalsrud EW. *Pediatric Surgery*. Mosby editors. USA 1998: 1381-420.
6. Enid Gilbert-Barness.Potters. *Pathology of the fetus and infant*. Mosby editor. USA 2007: 792-4.
7. Fenoglio-Preiser.CM. *Gastrointestinal pathology an Atlas and Text*. Lippicont Williams e Wilkins editors. USA 2008, Third edition: 643-52.
8. Kapur RP. Immunohistochemistry and the diagnosis of Hirschsprung disease. *Am J Clin Pathol* 2006; 126(10): 9-12.
9. Kapur RP, Reed RC, Finn LS, Patterson K, Johanson J, Rutledge.JC. Calretinin Immunohistochemistry versus Acetylcholinesterase Histochemistry in the Evaluation of Suction Rectal Biopsies for Hirschsprung Disease. *Ped Dev Pathol* 2009; 12(3): 6–15.
- 10.Kiernan JA. Barr, *El sistema Nervioso Humano*. McGraw Hill editors. USA 2005: 391-400.
- 11.Diamond I, Casadiego G, Traubici J, Langer J, Wales P. The contrast enema for Hirschsprung.disease: predictors of a false-positive result. *J Ped Surg* 2007; 42: 792-5.

12. Lewis N, Levitt M, Zallen G, Zafar M, Iacono K, Rossman J, Caty M, Glick P. Diagnosing Hirschsprung's Disease: Increasing the odds of a positive rectal biopsy result. *J Ped Surg* 2003; 38(3): 412-6.
13. Barshack I, Fridman E, Goldberg I, Chowers Y, Kopolovic J. The loss of calretinin expression indicates aganglionosis in Hirschsprung disease. *J Clin Pathol* 2004; 57(7): 712-6.
14. Memarzadeh M, Talebi A, Edalaty M, Hosseinpour M, Vahidi N. Hirschsprung's disease diagnosis: Comparison of immunohistochemical, hematoxylin and eosin staining. *J Ind Assoc Ped Surg* 2009; 14(2): 59-62.
15. Raja Rabah. Total Colonic Aganglionosis: Case Report, Practical Diagnostic Approach and Pitfalls. *Arch Path & Lab Med* 2010; 134(10): 1467-73.
16. Guinard VS, Bonnard A, De Lagausie P, Pascale PC, Alberti C, El Ghoneimi A, Peuchmaur M, Berrebi-Binczak D. Calretinin immunohistochemistry: a simple and efficient tool to diagnose Hirschsprung disease. *Mod Pathol* 2009; 22(9): 1379–84.
17. Pediatric Colorectal Surgery.com 2009
18. Bracho-Blanchet.E, Herappe-Mellado.D. Utilidad de la manometría anorrectal como prueba diagnóstica en Enfermedad de Hirschsprung.Revista mexicana de Cirugía Pediátrica. Vol.17, No.3, julio-septiembre 2010
19. De la Torre-Mondragón.Santos K.Hirschsprung disease. Evaluation of calretinina and s-100 as ancillary methods of the diagnosis of aganglionosis in rectal biopsies .*Acta Pediatr.Mex.vol3, Num5,2012.*
20. Arriagada.M.P,Alfaro G, Rostion C.G.Revisión: Enfermedad de Hirschsprung.Revista Pediatrica electrónica 2008, vol 5, No.1
21. Altamirano E, Drut R. Aganglinosis total segmentaria combinda con aganglionosis clásica. *Patol Rev Latinoam* 2009;47:351-353.

ANEXOS

Cuadro1. MARCADORES UTILIZADOS EN LA EVALUACIÓN DE LAS ALTERACIONES DE LA MOTILIDAD INTESTINAL

Marcador	
PGP 9.5	nervios
NSE	nervios y ganglios
MAP-2	nervios
NCAM	nervios
Factor de crecimiento nervioso	nervios
Neuropeptido Y	nervios
Neurofilamento proteína	nervios
Ret	ganglios
Actividad acetilcolinesterasa	nervios colinérgicos
c-kit	células intersticiales de Cajal
VIP	nervios que contienen VIP
Sustancia P	nervios que contienen sustancia P
S100	células de Schwann y glia

INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN

NÚMERO DE EXPEDIENTE:

Iniciales del paciente:

Nº de folio:

Edad (años/meses/días):

Sexo: masculino () femenino ()

Diagnóstico clínico:

Tipo de biopsia:

Por succión:

Trasmural:

Dimensiones:

Tipo de corte:

Tejido incluido en parafina:

Tejido congelado:

Calidad de los cortes y de las tinciones:

Diagnóstico histopatológico:

IHQ (calretinina):

Positivo:

Negativo:

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

De acuerdo a la Ley General de Salud en materia de investigación para la salud Título II, Capítulo I, Artículos 17 y 23 (1997) el presente estudio se ubica en la categoría sin riesgo por ser revisión de bases de datos y material histológico tomado con anterioridad con autorización de los padres del paciente, por lo que no se considera pertinente la solicitud de consentimiento informado para este estudio.

AGRADECIMIENTOS

- A Dios por la vida que me ha dado en este instante de eternidad
- A mis padres por su amor, comprensión y por ser guías permanentes en mi vida
- A mis hermanos por su fe en mi
- A mis maestros por compartirme su tiempo y conocimientos
- A todo el personal del servicio de Patología por integrarme a su vida laboral
- En especial a la Dra. Alicia Rodríguez Velasco por practicar conmigo la profesión de Jesús