



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
SECRETARÍA DE SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA

**“Dismotilidad intestinal en el diagnóstico temprano
de neoplasia endocrina múltiple tipo 2B”**

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE
ESPECIALISTA EN PEDIATRÍA

PRESENTA:

Dr. José Eduardo Frías Mantilla
Médico Residente de Pediatría del Instituto Nacional de Pediatría

Asesor de tesis: Dra. Karla Alejandra Santos Jasso
Co Asesor de Tesis: Dra. María Antonieta Cabrera Hernández
Asesores metodológicos: Dra. Patricia Cravioto Quintana y
Fís. Mat. Fernando Galván Castillo



CIUDAD DE MEXICO.

2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

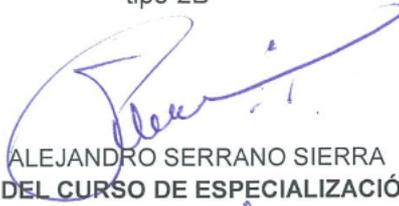
DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

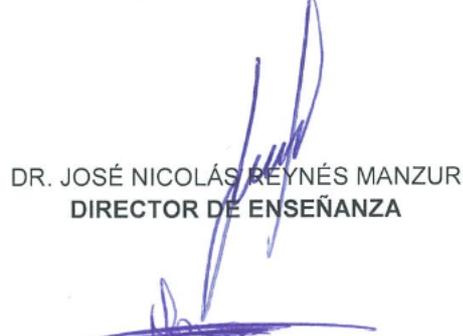
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

TÍTULO DE TESIS:

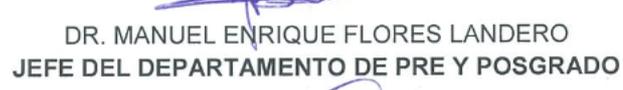
"Dismotilidad intestinal en el diagnóstico temprano de neoplasia endocrina múltiple tipo 2B"



**DR. ALEJANDRO SERRANO SIERRA
PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE ESPECIALIZACIÓN EN PEDIATRÍA**



**DR. JOSÉ NICOLÁS REYNÉS MANZUR
DIRECTOR DE ENSEÑANZA**



**DR. MANUEL ENRIQUE FLORES LANDERO
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE PRE Y POSGRADO**



**Dra. Karla Alejandra Santos Jasso
TUTOR DE TESIS**



DRA. PATRICIA CRAVIOTO QUINTANA



**FÍS. MAT FERNANDO GALVÁN CASTILLO
ASESORES METODOLÓGICOS**

Índice:

1-	Portada.....
2-	Hoja de Firmas.....
4-	Marco Teórico y Antecedentes.....
8-	Planteamiento del problema.....
9-	Justificación.....
10-	Objetivo General.....
	Objetivos Específicos.....
	Tipo de Estudio.....
	Universo de Estudio.....
	Criterios de inclusión.....
	Criterios de Exclusión.....
	Variables.....
12-	Análisis Estadístico.....
	Resultados.....
22-	Discusión.....
26-	Bibliografía.....

Marco Teórico y Antecedentes:

Con el nombre de neoplasias endocrinas múltiples (NEM) se denomina a un conjunto de alteraciones hereditarias que predisponen al desarrollo de neoplasias que afectan, predominantemente, a glándulas endocrinas.

La neoplasia endocrina múltiple tipo 2b (NEM 2B) es un orden autosómico dominante causado por mutaciones en el proto oncogen RET, localizado en el cromosoma 10q11 codifica para una glicoproteína de membrana en la familia de los receptores tirocinquinasa de las células de la cresta neural.¹ Una pérdida de función en el gen RET codifica para enfermedad de Hirschsprung (EH) mientras que una mutación para ganancia de función guarda relación con ganglioneuromatosis y NEM 2B ² representado entre sus características por carcinoma medular de tiroides (CMT), feocromocitoma y un fenotipo característico habitualmente relacionado a un hábito marfanoide.¹ (Figura1 Y 2)



Figura 1, Izq Paciente pediátrico con fenotipo característico de NEM2B servicio de cirugía colorectal Children's Hospital of Pittsburgh. Figura 2, Der. Paciente adulto con fenotipo característico de NEM2B Servicio de Cirugía pediátrica, INP. En ambos puede apreciarse una cara alargada, y estrecha, párpados característicos, presencia de ganglioneuromas en labios, lengua y conjuntiva, hábito marfanoide y paladar elevado.

La incidencia de NEM 2B es desconocida. Debido a que el CMT representa sólo 5-10% de todos los tumores tiroideos, siendo esporádico en 75% de los casos y familiar en 25% de los casos, la prevalencia de MEN 2 es ~ 1-3% de todos los tumores malignos tiroideos. Dado que los tumores tiroideos representan solo el 1% de todos los cánceres humanos, es evidente que MEN 2 es una enfermedad muy

rara, y solo los estudios cooperativos han podido incluir un número apropiado de sujetos y familias afectadas para correlacionar con precisión la mutación RET y Síndrome MEN 2.³

Surge interés en el espectro al encontrar una relación entre el carcinoma tiroideo y el feocromocitoma en 1961. En 1968 esta constelación de padecimientos hereditarios en conjunto con la hiperplasia paratiroidea fueron agrupados como NEM 2B.⁴

En 1993, grupos independientes de estudio descubrieron que mutaciones puntuales germinales en el proto-oncogen RET eran causa de NEM 2B,^{5,6,7} característica genética que podría ser utilizada para su diagnóstico. A partir de entonces, con un marcador específico se encontró el medio para la importante tarea de realizar un examen molecular tan pronto como sea posible en los individuos en riesgo, es decir aquellos con historia familiar de la enfermedad o que cuenten con una clínica compatible con la misma. Sin embargo, a lo largo de diversos estudios se ha identificado que la edad media de diagnóstico de este padecimiento es a los 18 años de edad ya sea por aparición de sus manifestaciones clínicas o por el diagnóstico en la madre^{1,8,9} edad a la cual la mayoría de los pacientes habrá desarrollado CMT, entidad que puede desarrollarse desde el primer año de vida⁸ con una penetrancia superior al 95% y característica que constituye la principal condicionante de mortalidad en este complejo sindromático, ya que el 50% de los casos tienen metástasis al diagnóstico, y la supervivencia en este estadio es del 20% a los 10 años⁹ por lo que la detección temprana de la enfermedad entre las primeras 4 semanas y los 6 meses es un determinante en el pronóstico de la misma puesto que estos pacientes pueden beneficiarse de una tiroidectomía profiláctica temprana.

Surge entonces la necesidad de identificar datos tempranos en el paciente que funjan como alerta oportuna dentro de este valioso periodo de tiempo. Es la patología gastrointestinal la primera en manifestarse en estos individuos pudiendo ser la única manifiesta hasta la adolescencia o edad adulta. Cerca del 40%¹⁰ (En algunos artículos hasta el 52.3%¹¹) de los cuadros de NEM 2B en pacientes menores de un año presentan sintomatología intestinal aislada como manifestación inicial. Algunos de los datos clínicos que pueden ser identificados en este grupo de pacientes son el megacolon a la inspección radiológica, diarrea, falla de medro, distensión abdominal así como el la sintomatología obstructiva intestinal y el estreñimiento, dato que retrospectivamente puede ser encontrado hasta en un 43% de los pacientes con NEM 2B que reportaron sintomatología gastrointestinal (Figura. 3)^{10,11,12}, pudiendo ser esta la única manifestación temprana que permita establecer el manejo oportuno mediante la realización de tiroidectomía profiláctica que mejorará de manera el pronóstico del paciente.

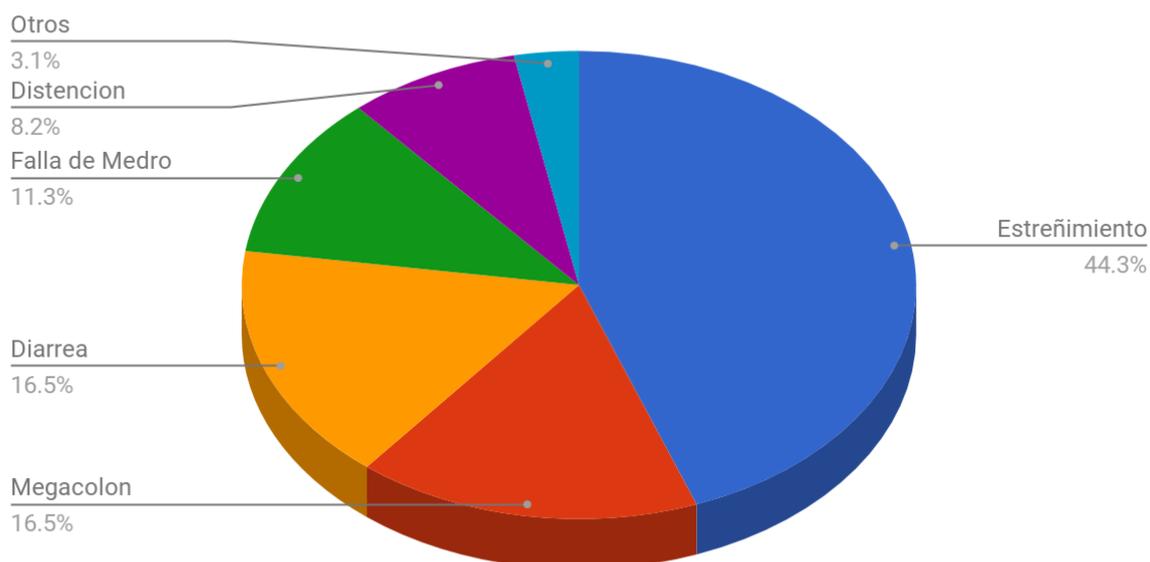


Figura 3 Sintomatología gastrointestinal en NEM2B ¹⁰

Grupo de Edad	% de Pacientes
<1 año de edad	52.3%
1-4 años	9.1%
5-12 años	16.4%
13-18 años	9.1%
>18 años	9.1%
Sin edad específica	3.6%

Tab. 1 Edades de inicio de sintomatología gastrointestinal en NEM2B⁸

Las alteraciones en el patrón gastrointestinal, específicamente un cuadro obstructivo intestinal y estreñimiento, en estos pacientes se deben a una función motora intestinal inadecuada por la estructura histológica aberrante normalmente representadas en una entidad de características definidas llamada ganglioneuromatosis intestinal (GNI). ^{10,12,13}

La GNI pertenece al grupo de disganglioneuromatosis intestinales, siendo una enfermedad rara correspondiente a menos del 0.1% dentro de este grupo ^{8,14} sin embargo, se ha reportado su presencia hasta en 40-90% de pacientes con NEM 2B siendo esta

también producto de una ganancia de función en el protooncogen RET, ⁸ dato que representa una relación importante entre ambas entidades.

La GNI se clasifica en base a su presentación en:

- 1) Ganglioneuromas polipoides solitarios
- 2) Pólipos ganglioneuromatosos
- 3) Ganglioneuromatosis asociada a NEM 2B ^{11,15} y objeto central del presente trabajo.

La ganglioneuromatosis intestinal difusa puede tener un curso asintomático o bien, manifestarse desde el primer año de vida con estreñimiento, diarrea intermitente u obstrucción intestinal funcional.⁸

Puede afectar cualquier porción del tracto gastrointestinal, pero el íleon, el colon y el apéndice son los más frecuentemente involucrados.

	Ganglioneuroma Polipoide	Poliposis Ganglioneuromatosa	GNM Difusa
Macroscópico	Pólipo Solitario	Múltiple Pólipos	Pólipos múltiples de espesor variable
Microscópico	Ganglioneuroma con discreto involucro mucoso y submucoso.	Ganglioneuroma con discreto involucro mucoso y submucoso.	Involucro mucoso, submucoso y mientérico
Síntomas de Motilidad	Ninguno	Ninguno	Estreñimiento/obstrucción
Condiciones asociadas	Ninguno	Poliposis juvenil Síndrome de Cowden	MEN 2 B Neurofibromatosis

Tab. 2 subgrupos de GNI y sus características

Es poco lo que se conoce de la epidemiología de esta enfermedad pues a causa de su baja incidencia habitualmente no se la tiene presente dentro de los diagnósticos diferenciales de obstrucción intestinal. La mayoría de los casos publicados son niños en quienes se sospechaba enfermedad de Hirschsprung y por medio de la anatomía patológica se llegó al diagnóstico de ganglioneuromatosis.¹⁷

La GNI se caracteriza histológicamente por la presencia de plexos mientéricos y submucosos hiperplásicos con troncos nerviosos de más de 200 micras y conteniendo de entre 15 a 40 células nerviosas en un solo ganglio.^{8,18} mientras que macroscópicamente, en un examen de colon por enema se observará megacolon proximal con un colon estenótico distal con gran proceso inflamatorio que puede caracterizarse en un colon espiculado. (Img. 4)

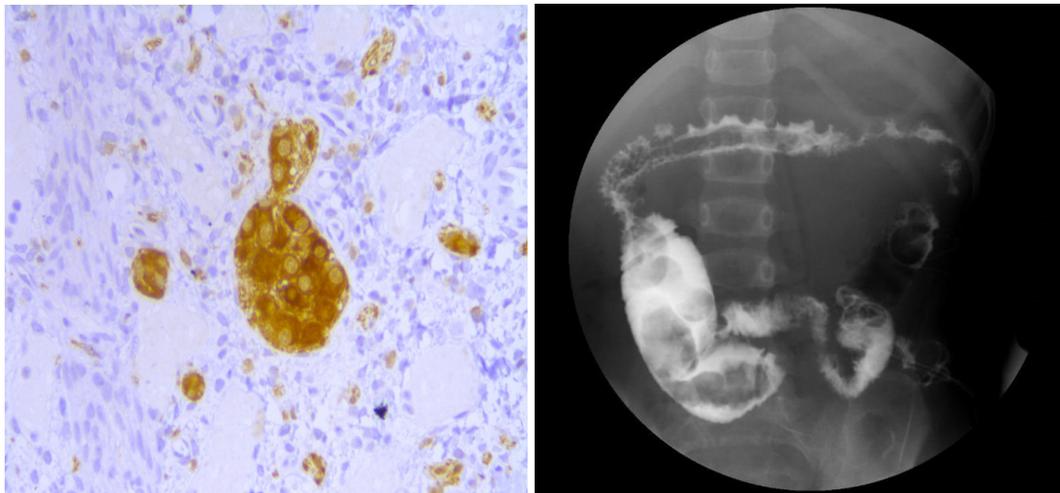


Fig.3 (Izq.) Tronco nervioso hiperplásico con presencia de gran número de células nerviosas en su interior (Servicio de patología INP), Fig. 4 (Der.) Colon por enema donde se aprecian datos inflamatorios a manera de colon espiculado en colon transverso. (Servicio de radiología INP).

Planteamiento del problema:

El diagnóstico oportuno de NEM 2B suele ser una tarea difícil ya que los datos fenotípicos que caracterizan a la enfermedad suelen detectarse a edades avanzadas de la vida cuando el CMT se ha desarrollado en el paciente y este presenta metástasis a distancia.

Hasta el año 2016, la literatura sólo presenta 6 casos de diagnóstico de NEM 2B antes del primer año de edad^{8,20,21,22,23} periodo en el que el paciente recibe el máximo beneficio de una tiroidectomía profiláctica. (Fig. 5) En los 6 casos, los síntomas gastrointestinales llevaron a la toma de biopsia que llevó al diagnóstico de GNI y consecuentemente al de NEM 2B.

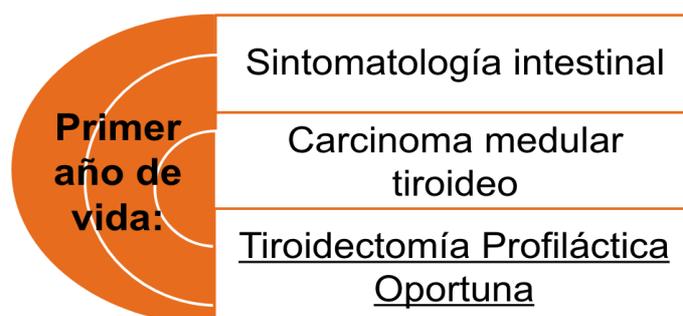


Fig. 5 El primer año de vida

La mayoría de los recién nacidos e infantes que se presentan con una historia de estreñimiento a menudo se refieren al cirujano pediatra para la realización biopsia rectal para excluir EH. Esto se sospecha cuando el recién nacido a término no logra expulsar el meconio dentro de las primeras 24 horas de vida y desarrolla distensión abdominal. Sin embargo, gracias a su baja incidencia y a la falta de información sobre la enfermedad la GNI rara vez es tomada en cuenta como probable diagnóstico diferencial.

En nuestro país no existen datos acerca de incidencia de GNI entre los pacientes con estreñimiento crónico, de igual manera, no se cuenta con bases de datos que contengan las edades a las cuales los pacientes reciben el diagnóstico, a qué medidas profilácticas para CMT son sometidos y si estas fueron realizadas dentro de un periodo óptimo de tiempo.

Nuestro Instituto constituye uno de los centros de referencia nacional en cuanto cirugía colorrectal se refiere y por tanto cuenta con una base de datos de pacientes con estreñimiento crónico y datos obstructivos intestinales con posterior abordaje quirúrgico importante. Esta base de datos puede fungir como muestra epidemiológica para determinar la incidencia de la GNI en nuestro medio, revisar las características de los pacientes, sintomatología de debut, así como medidas tomadas a la fecha para la prevención de CMT y el estado actual de los mismos.

Justificación:

El diagnóstico oportuno de NEM2B supone un reto a la práctica médica, esto debido a la tardía manifestación de la sintomatología característica de la enfermedad, lo que produce el que esta patología pase desapercibida durante los primeros años de vida, momento en que una intervención oportuna con la realización de una tiroidectomía profiláctica resulta determinante en el pronóstico del paciente.

La única manifestación clínica presente en cerca del 40% de los pacientes con NEM2B menores a un año de vida es la sintomatología gastrointestinal aislada relacionada generalmente a GNI, la cual es más frecuentemente manifestada a manera de estreñimiento crónico de sintomatología muchas veces indistinguible con EH. Es por ello que mantener sospecha diagnóstica de GNI ante sintomatología de dismotilidad intestinal, así como un correcto abordaje puede mejorar de forma dramática el futuro del paciente.

Este estudio permitirá conocer la relación que existe entre la manifestación de dismotilidad intestinal, el diagnóstico de GNI y NEM2B en nuestro medio al revisar 6 años de práctica quirúrgica, resultados histopatológicos y exámenes genéticos para con ello, crear un reporte de incidencia en marco de referencia de un centro nacional como es el nuestro y de esta forma sentar precedente y fomentar de la concientización diagnóstica.

Objetivos General:

-Concientizar sobre la posibilidad diagnóstica de GNI ante la presentación de datos obstructivos intestinales y/o estreñimiento con alteraciones radiográficas (Megacolon) que pueda conducir a un diagnóstico oportuno de NEM2B.

Específicos:

-Identificar la incidencia de GNI dentro de los cuadros de dismotilidad intestinal diagnosticados y tratados en este instituto.

-Conocer la relación específica entre los diagnósticos de GNI y el diagnóstico final de NEM2B en nuestro instituto.

-Identificar las medidas terapéuticas implementadas en estos pacientes.

-Revelar en cuantos de los pacientes fue probable realizar un diagnóstico oportuno que condujera a una tiroidectomía temprana que permitiera mejorar el pronóstico de su enfermedad.

Tipo de estudio:

Observacional, retrospectivo, longitudinal, descriptivo.

Universo del estudio:

El grupo estudiado corresponde a los pacientes diagnosticados y/o tratados en el servicio de cirugía pediátrica del Instituto Nacional de Pediatría por algún tipo de cuadro de dismotilidad intestinal con estudio radiológico con reporte de megacolon (n=52) del año 2012 al 2017.

Criterios de inclusión:

-Pacientes del Instituto Nacional de Pediatría con sintomatología de cuadro de dismotilidad intestinal (estreñimiento, diarrea, falla de medro, distensión abdominal, enterocolitis) con estudios radiológicos de características aberrantes (Megacolon).

Criterios de exclusión:

-No contar con la sintomatología ya descrita o con un estudio confirmatorio del cuadro.

-Encontrarse fuera de los parámetros de tiempo de análisis de este trabajo.

Variables a analizar:

Nombre de la Variable	Definición conceptual	Tipo de variable	Medición de la variable
Edad	Tiempo de vida desde el nacimiento hasta la actualidad.	Intervalo	Número de Años
Sexo	Tomando como Criterio los genitales externos del paciente se definirá como varón o mujer.	Nominal	1: Masculino 2:Femenino
Sintomatología y signos clínicos.	Enlista los datos clínicos presentados por el paciente que orientan al proceso diagnóstico	Nominal	1:Estreñimiento 2:Megacolon 3:Cuadro obstructivo intestinal 4:Falta de evacuación a las 48 horas de vida.
Edad de inicio de los síntomas	Tiempo desde el nacimiento hasta la aparición de los síntomas	Intervalo	Número de años
Edad del diagnóstico definitivo	Tiempo desde el nacimiento hasta el establecimiento diagnóstico definitivo	Intervalo	Número de años
Resultados de estudios Genéticos	Se analizaran las características genotípicas del paciente en busca de concordancia con gen asociado a patrón sindromático	Nominal	1:RET positivo 2:RET negativo
Resultado de análisis	Indica el resultado del estudio	Nominal	Indicará el resultado del analisis

Histológico	histopatológico		histopatológico de las muestras.
Diagnostico final	Precisara el resultado diagnóstico en base al analisis histopatologico de las muestras.	Nominal	Diagnóstico en base a histopatologia
Oportunidad diagnóstica	Determina si la si el momento de realización del diagnóstico se lleva o no acabo en su momento de máximo beneficio	Nominal	1: Diagnóstico oportuno 2: Diagnostico tardío
Medidas preventivas ante CMT	Indica si fueron o no tomadas medidas para la prevención de CMT.	Nominal	1: Con tiroidectomía 2: Sin tiroidectomía

Análisis estadístico:

Se realizará análisis descriptivo de la información utilizándose proporciones para variables cualitativas, así como medidas de tendencia central o de dispersión para variables cuantitativas.

Resultados:

Se realizó la revisión de expedientes de pacientes entre los años 2012 y 2017 (6 años) con antecedente de sintomatología de dismotilidad intestinal, así como evidencia de megacolon en colon por enema.

Como datos clínicos de dismotilidad intestinal se analizaron las siguientes variables:

Cuadro de obstrucción intestinal, definido como la presencia de dos o mas de los siguientes síntomas: distensión abdominal, vómitos de contenido biliar y ausencia de evacuaciones. ²⁴ (Fig. 6)

□Estreñimiento definido según los criterios de Roma III para niños menores de 4 años donde se establecen los siguientes criterios^{25,26}

- 1) Menos de dos evacuaciones por semana.
- 2) Mas de un episodio a la semana de incontinencia después de haber adquirido control de esfínteres.
- 3) Historial de retención excesiva de heces en el recto.
- 4) Historial de evacuaciones duras y/o dolorosas.
- 5) Presencia de masa fecal grande en el recto.
- 6) Historial de evacuaciones de diámetro importante que pudieran obstruir el WC.

-Se requiérela presencia de al menos 2 de los criterios durante mas de un mes antes del establecimiento diagnóstico del paciente

□Ausencia de evacuaciones en las primeras 48 horas de vida.

Se excluyeron aquellos pacientes que no contaran con examen diagnostico histopatológico definitivo.



Fig.6 Paciente de la población de estudio con cuadro de obstrucción intestinal con presencia de dolor, distención abdominala y necesidad de una sonda por presencia de vomito de contenido biliar.(Servicio de cirugía pediátrica INP)

Se obtuvieron 52 pacientes, 43 masculinos (83%) y 9 Femeninos (17%) con inicio de presentación diagnóstica entre el nacimiento y los 18 meses de edad con una media de debut de los síntomas de 1.019 meses.

23 (44.23%) de los pacientes no presentaron evacuaciones durante las primeras 48 horas de vida mientras que 14 (25%) pacientes presentaron estreñimiento en edades posteriores.

37 (71%) de los pacientes debutaron con un cuadro obstructivo intestinal acompañado de alguna de las entidades anteriores o bien como sintomatología única (Fig. 6)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	
C	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
V	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+
E	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52
C	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+
V	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-
E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-

Tabla 3: Incidencia de síntomas en pacientes de la muestra

Obstrucción Intestinal

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
NO	16	30.8	30.8	30.8
Válidos SI	36	69.2	69.2	100.0
Total	52	100.0	100.0	

Ausencia de evacuación en las primeras 48h

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	NO	29	55.8	55.8
	SI	23	44.2	100.0
	Total	52	100.0	100.0

Estreñimiento

	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	NO	39	75.0	75.0
	SI	13	25.0	100.0
	Total	52	100.0	100.0

Tablas 4,5 y 6: Presentación estadística de sintomatología en los pacientes de la muestra.

Se practicaron estudios de imagen a manera de radiografías simples de abdomen (Fig. 7) y colon por enema en los cuales fue posible apreciar dilatación de asas colónicas con o sin una zona franca de transición.

La presencia de zona de transición en el estudio radiológico contrastado es un dato con carga diagnóstica importante para EH, sin embargo, completar el abordaje con toma de biopsia resulta imperativo para el diagnóstico de la enfermedad.



*Fig.7 Radiografías simples de abdomen
con dilatación de asas colónicas. Servicio de radiología (INP).*

En tres de los pacientes el estudio contrastado demostró datos inflamatorios a manera de colon especulado con megacolon proximal a esta zona

Dadas las características clínicas de los pacientes en conjunto con los datos radiológicos ya mencionados se continuo con toma de biopsia rectal en 51 de los pacientes en las que se reportan 50 muestras de tejido agangliónico (98%) resultado compatible con EH y 1 de ellas con presencia de plexos mientéricos y submucosos hiperplásicos con troncos nerviosos de más de 200 micras(2%) compatible con GNI.

Los 52 pacientes de la muestra fueron sometidos a tratamiento quirúrgico durante el cual fueron tomadas biopsias de espesor total de pared colónica en las que fueron reportadas 49 muestras agangliónica y 3 con datos histopatológicos compatibles con GNI cambiando dos de los diagnósticos previamente realizados por biopsia rectal. (Fig.8)

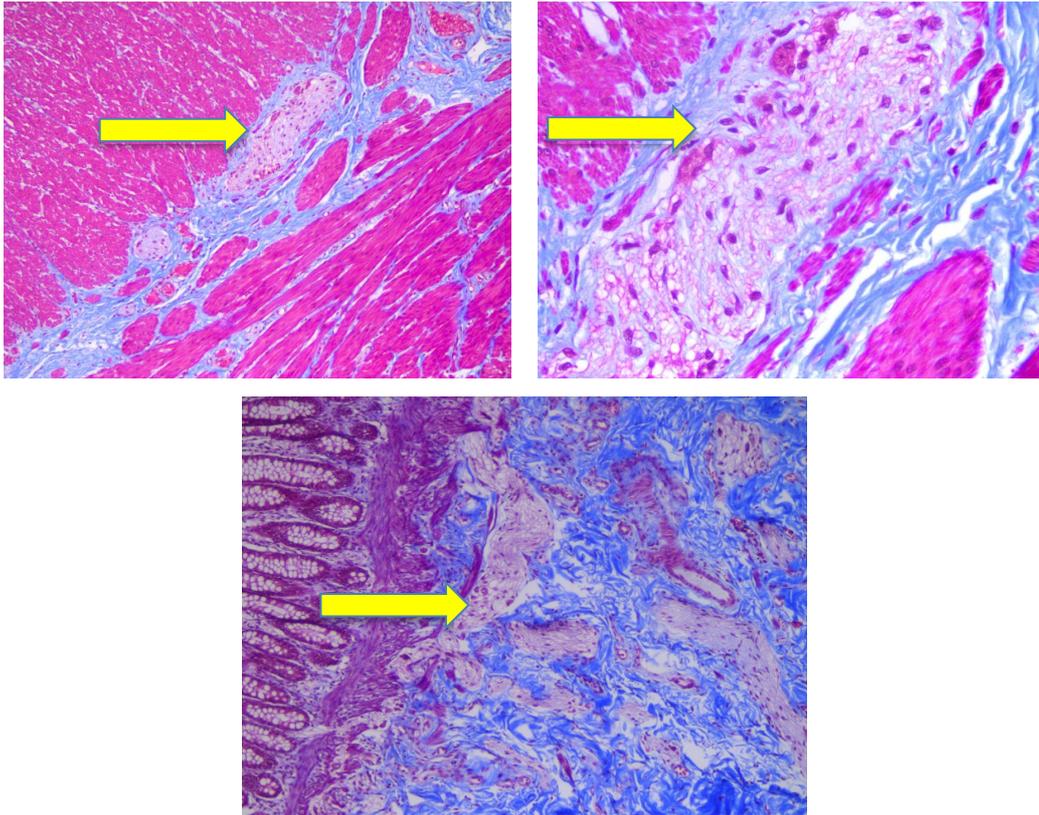


Fig.8 Biopsias de espesor total de colon donde se señalan plexos mientéricos y submucosos hiperplásicos con troncos nerviosos de más de 200 micras teñidas con hematoxilina y eosina que establecen el diagnóstico de GNI. (Servicio de patología INP)

Pruebas genéticas para la determinación de protooncogén RET fueron solicitadas en los tres pacientes con diagnóstico de GNI reportándose dos con mutaciones relacionadas directamente con NEM2B y CMT y uno de ellos con mutación en exón 13, rs1800861, mutación que no origina cambio de aminoácido (ctT/ctG; Leu769Leu) lo que lo identifica como alelo benigno, sin embargo, algunas revisiones literarias como la de Sromek y colaboradores ²⁸, refieren puede guardar relación con CMT estando presente en aquellos pacientes del grupo analizado en quienes la enfermedad se desarrolló a una edad más temprana. Se inicia abordaje radiológico de glándula tiroides con toma de ultrasonido en los tres casos reportándose nódulos hipocóicos dentro de lóbulos de la glándula en dos de ellos (Mutación oncogénica de RET) y un tercero con imagen quística posterior. (paciente con mutación presumiblemente benigna) (Fig.9 y 10)

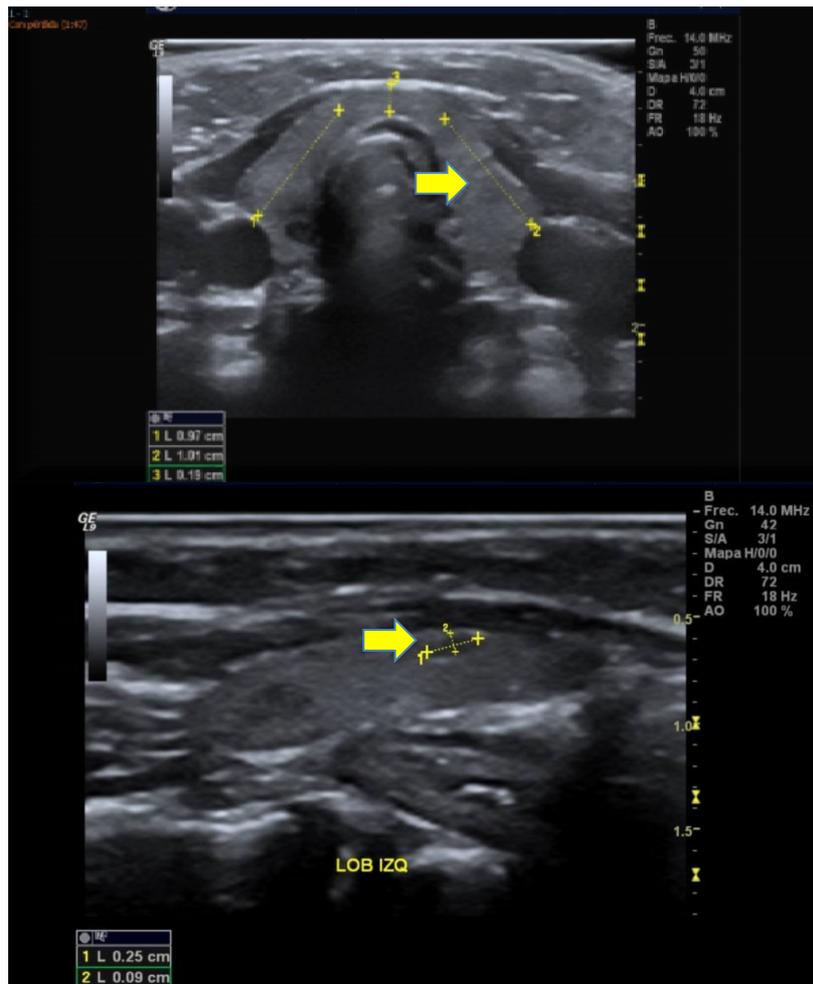


Fig. 9 y 10, Se muestran ultrasonografías de glándula tiroides en pacientes con diagnóstico de GNI con protooncogén RET positivo en las que se señalan nódulos hipoeoicos sugestivos de proceso tumoral. (Servicio de radiología INP)

En ambos pacientes que presentaron nódulos hipoeoicos en el ultrasonido tiroideo se procedió a la realización de una tiroidectomía total. Debido a un retraso en el procesamiento de la muestra para RET del tercer paciente y a la presencia de anomalías ecográficas (quiste posterior) se da abordaje inicial con hemitiroidectomía.

De los resultados histopatológicos de los tres pacientes, los practicados en los pacientes sujetos a tiroidectomía total fueron concluyentes para carcinoma medular de tiroides. En el tercer paciente se reportó hiperplasia de células C, diagnóstico que en presencia de protooncogén RET u otras características de NEM2B es reconocido en la literatura como precursor de carcinoma medular tiroides.

En nuestra muestra de pacientes, y como es establecido en las tablas de regresión logística siguientes existe una relación importante entre el diagnóstico de GNI y los síntomas cardinales de cuadro de obstrucción intestinal (COI) estreñimiento (ES) y ausencia de evacuación en las primeras 48 horas (EV 48). Sin embargo no es posible establecer una relación de significancia que brinde a estos síntomas valor predictivo positivo para el establecimiento diagnóstico de la enfermedad, esto probablemente debido al número limitado pacientes con diagnóstico final de GNI en la muestra por lo que continuar el estudio aumentando el número de pacientes podría aportar nuevas cifras de significancia.

COI * Diagnostico					
Tabla de contingencia					
			Diagnostico		Total
			1 Ganglio	2 Hirschsprung	
COI	0 COI	Recuento	1	35	36
		Frecuencia esperada	2.1	33.9	36.0
		% dentro de COI	2.8%	97.2%	100.0%
		% dentro de Diagnostico	33.3%	71.4%	69.2%
	1 Sin COI	Recuento	2	14	16
		Frecuencia esperada	.9	15.1	16.0
		% dentro de COI	12.5%	87.5%	100.0%
		% dentro de Diagnostico	66.7%	28.6%	30.8%
Total	Recuento	3	49	52	
	Frecuencia esperada	3.0	49.0	52.0	
	% dentro de COI	5.8%	94.2%	100.0%	
	% dentro de Diagnostico	100.0%	100.0%	100.0%	

Pruebas de chi-cuadrado					
	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	1.926 ^a	1	.165		
Corrección por continuidad ^b	.553	1	.457		
Razón de verosimilitudes	1.744	1	.187		
Estadístico exacto de Fisher				.221	.221
N de casos válidos	52				

a. 2 casillas (50.0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es .92.

b. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

Estimación de riesgo

	Valor	Intervalo de confianza al 95%	
		Inferior	Superior
Razón de las ventajas para COI (0 COI/ 1 Sin COI)	.200	.017	2.386
Para la cohorte Diagnostico = 1 Ganglio	.222	.022	2.277
Para la cohorte Diagnostico = 2 Hirschsprung	1.111	.916	1.348
N de casos válidos	52		

EV 48 * Diagnostico

Tabla de contingencia

		Diagnostico			Total
		1 Ganglio	2 Hirschsprung		
EV 48	0 No evacuo en las primeras 48h	Recuento	1	22	23
		Frecuencia esperada	1.3	21.7	23.0
		% dentro de EV 48	4.3%	95.7%	100.0%
		% dentro de Diagnostico	33.3%	44.9%	44.2%
	1 Evacuo en las primeras 48h	Recuento	2	27	29
		Frecuencia esperada	1.7	27.3	29.0
		% dentro de EV 48	6.9%	93.1%	100.0%
		% dentro de Diagnostico	66.7%	55.1%	55.8%
Total	Recuento	3	49	52	
	Frecuencia esperada	3.0	49.0	52.0	
	% dentro de EV 48	5.8%	94.2%	100.0%	
	% dentro de Diagnostico	100.0%	100.0%	100.0%	

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	.153 ^a	1	.695		
Corrección por continuidad ^b	0.000	1	1.000		
Razón de verosimilitudes	.157	1	.692		
Estadístico exacto de Fisher				1.000	.588
N de casos válidos	52				

a. 2 casillas (50.0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 1.33.

b. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

Estimación de riesgo

	Valor	Intervalo de confianza al 95%	
		Inferior	Superior
Razón de las ventajas para EV 48 (0 No evacuo en las primeras 48h / 1 Evacuo en las primeras 48 h)	.614	.052	7.223
Para la cohorte Diagnostico = 1 Ganglio	.630	.061	6.527
Para la cohorte Diagnostico = 2 Hirschsprung	1.027	.900	1.172
N de casos válidos	52		

ESTREÑIMIENTO * Diagnostico

Tabla de contingencia

			Diagnostico		Total
			1 Ganglio	2 Hirschsprung	
ESTREÑIMIENTO	0 Estreñimiento	Recuento	2	11	13
		Frecuencia esperada	.8	12.3	13.0
		% dentro de ESTREÑIMIENTO	15.4%	84.6%	100.0%
		% dentro de Diagnostico	66.7%	22.4%	25.0%
	1 Sin estreñimiento	Recuento	1	38	39
		Frecuencia esperada	2.3	36.8	39.0
		% dentro de ESTREÑIMIENTO	2.6%	97.4%	100.0%
		% dentro de Diagnostico	33.3%	77.6%	75.0%
Total	Recuento	3	49	52	
	Frecuencia esperada	3.0	49.0	52.0	
	% dentro de ESTREÑIMIENTO	5.8%	94.2%	100.0%	
	% dentro de Diagnostico	100.0%	100.0%	100.0%	

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	2.948 ^a	1	.086		
Corrección por continuidad ^b	1.061	1	.303		
Razón de verosimilitudes	2.476	1	.116		
Estadístico exacto de Fisher				.151	.151
N de casos válidos	52				

a. 2 casillas (50.0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es .75.

b. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

Estimación de riesgo			
	Valor	Intervalo de confianza al 95%	
		Inferior	Superior
Razón de las ventajas para ESTREÑIMIENTO (0 Estreñimiento / 1 Sin estreñimiento)	6.909	.571	83.540
Para la cohorte Diagnostico = 1 Ganglio	6.000	.591	60.867
Para la cohorte Diagnostico = 2 Hirschsprung	.868	.685	1.101
N de casos válidos	52		

Coi: Cuadro de obstrucción intestinal, EV48: Ausencia de evacuación en las primeras 48 horas.

A pesar de no existir una significancia estadística en la relación de estos síntomas como predictores fiables de GNI no hay duda que por su frecuencia de presentación en los pacientes con este diagnóstico deberá siempre considerarse como un diferencial a descartar. Si bien los datos obtenidos en nuestro estudio demuestran una prevalencia de GNI de solo el 5.7% entre los pacientes con cuadro de dismotilidad intestinal, (Cifras superiores a la literatura^{8, 14}) su adecuado diagnóstico pudiera guiar a medidas oportunas de prevención de un proceso oncológico.

Discusión:

El diagnóstico oportuno de NEM2B supone un reto a la práctica médica, esto debido a la tardía manifestación de la sintomatología característica de la enfermedad, lo que produce el que esta patología pase desapercibida durante los primeros años de vida.

La única manifestación clínica presente en cerca del 40% de los pacientes con NEM2B menores a un año es la sintomatología gastrointestinal aislada relacionada generalmente a GNI, la cual es más frecuentemente manifestada a manera de datos obstructivos intestinales y estreñimiento crónico muchas veces indistinguible con EH. Fueron pacientes con esta sintomatología característica en el periodo neonatal los elegidos para el abordaje de este estudio, de forma tal que a manera de muestra representativa nos permita apreciar la relación en nuestro medio entre sintomatología propia de dismotilidad intestinal con GNI.

Para motivos de este estudio se identificó la frecuencia de presentación de tres de las variables de debut más frecuentes de la enfermedad: ausencia de evacuaciones en las primeras 48 horas de vida, presentación de un cuadro obstructivo intestinal o estreñimiento crónico. En la mayoría de los pacientes, estos síntomas no se

presentaron de forma aislada si no a manera de mosaico como combinación de dos o tres de las entidades. En nuestro grupo de 52 pacientes la sintomatología de mayor presentación fue el cuadro obstructivo intestinal presente en 37 de los pacientes (71%), 23 (44%) de los pacientes no presentaron evacuaciones dentro de las primeras 48 horas de vida mientras que el estreñimiento se presentó en 14 (27%).

Dentro del grupo de pacientes con diagnóstico de GNI, los tres síntomas se hicieron presentes siendo el estreñimiento el síntoma predominante encontrándose en el 66% de los pacientes con este diagnóstico. Debido al reducido número de pacientes dentro del grupo que resultaran con este diagnóstico no es posible establecer significancia estadística que relacione la presencia de cualquiera de los tres cuadros con la presentación de GNI.

Si bien la significancia estadística de la sintomatología de un cuadro de dismotilidad intestinal por si sola es baja para el diagnóstico de GNI en el periodo neonatal, deberá siempre mantenerse dentro de los diagnósticos diferenciales del paciente, ya que su adecuado y oportuno reconocimiento pueden llevar al diagnóstico de un proceso oncológico latente tal y como ocurrió con nuestros pacientes.

La determinación del diagnóstico dependerá entonces del reconocimiento de los datos clínicos, así como de una adecuada interpretación de los estudios radiológicos confirmados por medio de un estudio histopatológico. (Fig. 11)

Ante un cuadro obstructivo intestinal, el abordaje radiológico deberá iniciarse con la toma de una placa simple de abdomen en la cual, de ser evidenciada la presencia de megacolon que refiera diagnóstico de patología obstructiva inferior se continuara abordaje con la realización de estudio contrastado de colon por enema.

La presencia de una zona de transición en el estudio será compatible con enfermedad de EH mientras que la ausencia de esta en un paciente con megacolon orienta al diagnóstico de EH total o bien de GNI, en ambos casos para el establecimiento diagnóstico definitivo será necesaria la toma de una biopsia intestinal. Es entonces fundamental para el correcto diagnóstico diferencial el contar con la asesoría de un médico patólogo con entrenamiento en el diagnóstico de disganglioneosis que pueda identificar las características propias de cada una de las entidades.

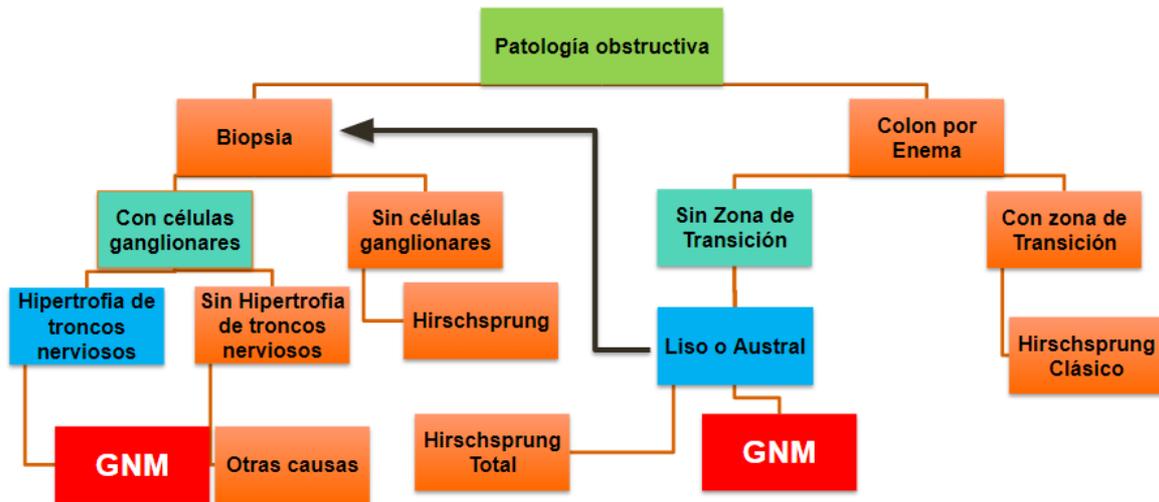


Fig.11 Algoritmo sugerido para abordaje de cuadro de dismotilidad intestinal.

Todos los pacientes del estudio fueron sometidos a toma de biopsias donde 49 pacientes reportaron diagnóstico histopatológico de EH y solo 3 de GNI (5.7%), cifras superiores de presentación dentro de nuestro periodo de estudio a las reportadas en la literatura.^{8, 14}

La importancia en el diagnóstico a partir la adecuada identificación de la sintomatología, una interpretación radiológica acertada y una valoración histopatológica por parte de un experto de la GNI radica en que el diagnóstico de la enfermedad guíara hacia el abordaje genético que puede revelar la presencia de un proceso oncológico latente en el paciente, para lo cual deberá realizarse un adecuado abordaje genético.

El análisis genético en estos pacientes va dirigido a la detección de mutaciones en el el proto-oncogen RET. Las mutaciones somáticas o germinales de este juegan un papel importante en el desarrollo del CMT tanto en formas esporádicas como familiares.

El gen humano RET se encuentra en la posición 10q11.2 y está compuesto por 21 exones con un tamaño de aproximadamente 55 kb. El protooncogén RET codifica un receptor transmembrana de tirosina quinasa que se expresa principalmente en linajes celulares derivados de la cresta neural como células C parafoliculares, células medulares adrenales y células paratiroides. El receptor RET desempeña un papel fundamental en la regulación de la proliferación, la migración y la

diferenciación celular.²⁹

En el 98% de los pacientes con MEN2a, las mutaciones ocurren en una de las cinco cisteínas en el dominio extracelular rico en cisteína de RET y se localizan en los exones 10-11 del oncogén RET. Aproximadamente el 95% de los pacientes con NEM2B, portan las mutaciones en el dominio tirosin-quinasa intracelular de RET localizado en el exón 16.³⁰

La importancia de un adecuado abordaje genético radica no solo en la correlación entre el genotipo del padecimiento sino que también es un predictor de edad de inicio de presentación del CMT y su agresividad, dato que determina la edad ideal para la realización de una tiroidectomía profiláctica. Las guías en 2001 han sugerido considerar la edad de la cirugía según tres categorías de riesgo según la mutación RET (niveles 1, 2, 3)³¹. Las directrices de la American Thyroid Association (ATA) de 2009 establecieron una categorización de riesgos de cuatro niveles (clases A, B, C, D) que reconoce el curso más agresivo de la mutación 634 dentro del nivel 2³². Para los pacientes con mutación en el codón 918 (MEN 2b), se recomienda la cirugía durante el primer año de vida, y tan pronto como sea posible. Con respecto a las mutaciones en los exones 10 y 11, se propone la cirugía profiláctica antes de los 5 años (nivel 2, ATA clase C). Finalmente, para mutaciones en los exones 13, 14 y 15, la cirugía profiláctica puede retrasarse más allá de los 5 años, en ausencia de evidencia de enfermedad de células C (nivel 1, A).

La cirugía debe incluir una tiroidectomía total, pero el momento y el alcance de la disección de los ganglios linfáticos aún son motivo de debate, basándose actualmente en la mutación germinal, la edad de la cirugía y cualquier evidencia de enfermedad, incluida la ecografía de cuello y los niveles de calcitonina sérica (CT)³⁰

Los tres pacientes de nuestro grupo con diagnóstico de GNI fueron sometidos a pruebas moleculares donde se identificaron las siguientes mutaciones:

Paciente 1- Portador de estado heterocigoto c.2753T>C (p.Met918Thr) en gen RET. Asociación con el 95% de los casos de NEM 2B.

Paciente 2- Mutación en codón 611 y 620 con mutaciones en el exón 10 en región 10111.2. Asociación con NEM2B

Paciente 3- Variante de secuencia de forma heterocigota en exón 13, rs1800861 (T/G) Variante considerada benigna aunque con reportes de asociación a malignidad.

Paciente	1	2	3
Presentación sintomatológica.	Cuadro Obstructivo intestinal	Estreñimiento	Ausencia de evacuaciones en primeras 48 horas Estreñimiento
Diagnostico en base a biopsia de espesor total de Colon.	GNI	GNI	GNI
Resultado estudio genético.	Portador de estado heterocigoto c.2753T>C (p.Met918Thr) en gen RET. Asociación con el 95% de los casos de NEM 2B.	Mutación en codón 611 y 620 con mutaciones en el exón 10 en región 10111.2 Asociación con NEM2B.	Variante de secuencia de forma heterocigota en exón 13, rs1800861 (T/G) Variante considerada benigna aunque con reportes de asociación a malignidad.
Resultado Biopsia de tiroides.	Carcinoma medular de tiroides	Carcinoma medular de tiroides	Hiperplasia de células C

Dos de los pacientes con presentación de cuadro de dismotilidad intestinal (3.8%) presentaron resultados histológicos de CMT, para el cual se realizó una tiroidectomía profiláctica oportuna que repercutirá en el pronóstico de estos pacientes. En un tercero (1.9%) el diagnostico de GNI llevo a la detección de un probable precursor neoplásico que se mantendrá en vigilancia al no contar con criterios genéticos de tiroidectomía total.

Es así que el adecuado abordaje de los cuadros de dismotilidad intestinal, desde la sospecha diagnostica hasta la realización de una biopsia analizada por un médico patólogo entrenado, puede llevar de la detección de un cuadro de estreñimiento u obstrucción intestinal a la detección y manejo profiláctico oportuno de un potencial proceso neoplásico.

Bibliografía:

1:Vasen, H. (1992). The natural course of multiple endocrine neoplasia type IIb. A study of 18 cases. *Archives of Internal Medicine*, 152(6), pp.1250-1252.

2:Knowles, P., Murray-Rust, J., Kjær, S., Scott, R., Hanrahan, S., Santoro, M., Ibáñez, C. and McDonald, N. (2006). Structure and Chemical Inhibition of the RET Tyrosine Kinase Domain. *Journal of Biological Chemistry*, 281(44), pp.33577-33587.

3:Romei, C., Mariotti, S., Fugazzola, L., Taccaliti, A., Pacini, F., Opocher, G., Mian, C., Castellano, M., degli Uberti, E., Ceccherini, I., Cremonini, N., Seregni, E., Orlandi, F., Ferolla, P., Puxeddu, E., Giorgino, F., Colao, A., Loli, P., Bondi, F., Cosci, B., Bottici, V., Cappai, A., Pinna, G., Persani, L., Uberta, V., Boscaro, M., Castagna, M., Cappelli, C., Zatelli, M., Faggiano, A., Francia, G., Brandi, M., Falchetti, A., Pinchera, A. and Elisei, R. (2010). Multiple endocrine neoplasia type 2 syndromes (MEN 2): results from the ItaMEN network analysis on the prevalence of different genotypes and phenotypes. *European Journal of Endocrinology*, 163(2), pp.301-308.

4:Emedicine.medscape.com. (2017). Type 2 Multiple Endocrine Neoplasia: Background, Pathophysiology, Etiology. [online] Availableat:<https://emedicine.medscape.com/article/123447-overview>.

5:Donis-Keller, H., Dou, S., Chi, D., Carlson, K., Toshima, K., Lairmore, T., Howe, J., Moley, J., Goodfellow, P. and Wells, S. (1993). Mutations in the RET proto-oncogene are associated with MEN 2A and FMTC. *Human Molecular Genetics*, 2(7), pp.851-856.

6:Wilkie, A. (1993). Medical genetics: advances in brief: Germ-line mutations of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A. *Journal of Medical Genetics*, 30(9), pp.796-796.

7:Eng, C., Smlth, D., Mulligan, L., Nagal, M., Healey, C., Ponder, M., Gardner, E., Scheumann, G., Jackson, C., Tunnaclffe, A. and Ponder, B. (1994). Point mutation within the tyrosine kinase domain of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2B and related sporadic tumours. *Human Molecular Genetics*, 3(2), pp.237-241.

8:Gfroerer, S., Theilen, T., Fiegel, H., Harter, P., Mittelbronn, M. and Rolle, U. (2017). Identification of intestinal ganglioneuromatosis leads to early diagnosis of MEN2B: role of rectal biopsy. *Journal of Pediatric Surgery*, 52(7), pp.1161-1165.

9:I.Halperin, Neoplasias endocrinas múltiples. (2007). *Gastroenterología y Hepatología Continuada*, 6(1), pp.47-49.

10:Grobmyer, S., Guillem, J., O'Riordain, D., Woodruff, J., Shriver, C. and Brennan, M. (1999). Colonic manifestations of multiple endocrine neoplasia type 2B. *Diseases of the Colon & Rectum*, 42(9), pp.1216-1219.

11:Matthews, M., Adler, B., Arnold, M., Kumar, S., Carvalho, R. and Besner, G. (2013). Diffuse intestinal ganglioneuromatosis in a child. *Journal of Pediatric Surgery*, 48(5), pp.1129-1133.

12:Ashworth, M. and Rampling, D. (2015). Paediatric gastrointestinal motility disorders. *Diagnostic Histopathology*, 21(6), pp.223-231.

13:Burns, A., Roberts, R., Bornstein, J. and Young, H. (2009). Development of the enteric nervous system and its role in intestinal motility during fetal and early postnatal stages. *Seminars in Pediatric Surgery*, 18(4), pp.196-205.

- 14: Knowles, C., De Giorgio, R., Kapur, R., Bruder, E., Farrugia, G., Geboes, K., Lindberg, G., Martin, J., Meier-Ruge, W., Milla, P., Smith, V., Vandervinden, J., Veress, B. and Wedel, T. (2010). The London Classification of gastrointestinal neuromuscular pathology: report on behalf of the Gastro 2009 International Working Group. *Gut*, 59(7), pp.882-887.
- 15: Soccorso, G., Puls, F., Richards, C., Pringle, H. and Nour, S. (2009). A ganglioneuroma of the sigmoid colon presenting as leading point of intussusception in a child: a case report. *Journal of Pediatric Surgery*, 44(1), pp.e17-e20.
- 16: Charagundla SR, Levine MS, Torigian DA, Campbell MS, Furth EE, Rombeau J. Diffuse intestinal ganglioneuromatosis mimicking Crohn's disease. *AJR Am J Roentgenol* 2004;182:1166-1168.
- 17: Smith, V., Eng, C. and Milla, P. (1999). Intestinal ganglioneuromatosis and multiple endocrine neoplasia type 2B: implications for treatment. *Gut*, 45(1), pp.143-146.
- 18: Feichter, S., Meier-Ruge, W. and Bruder, E. (2009). The histopathology of gastrointestinal motility disorders in children. *Seminars in Pediatric Surgery*, 18(4), pp.206-211.
- 19: Yin, M., King, S., Hutson, J. and Chow, C. (2006). Multiple Endocrine Neoplasia Type 2B Diagnosed on Suction Rectal Biopsy in Infancy: A Report of 2 Cases. *Pediatric and Developmental Pathology*, 9(1), pp.56-60.
- 20: Smith, V., Eng, C. and Milla, P. (1999). Intestinal ganglioneuromatosis and multiple endocrine neoplasia type 2B: implications for treatment. *Gut*, 45(1), pp.143-146.
- 21: King, S., Southwell, B. and Hutson, J. (2006). An association of multiple endocrine neoplasia 2B, a RET mutation; constipation; and low substance P-nerve fiber density in colonic circular muscle. *Journal of Pediatric Surgery*, 41(2), pp.437-442.
- 22: Unruh, A., Fitze, G., Jänig, U., Bielack, S., Lochbühler, H. and Coerdts, W. (2007). Medullary thyroid carcinoma in a 2-month-old male with multiple endocrine neoplasia 2B and symptoms of pseudo-Hirschsprung disease: a case report. *Journal of Pediatric Surgery*, 42(9), pp.1623-1626.
- 23: Evans, C., Nesbitt, I., Walker, J. and Cohen, M. (2008). MEN 2B syndrome should be part of the working diagnosis of constipation of the newborn. *Histopathology*, 52(5), pp.646-648.
- 24: Santos-Jasso KA. Enfermedad de Hirschsprung. *Acta Pediatr Mex*. 2017;38(1):72-78.
- 25: Koppen I, Di Lorenzo C, Saps M, Dinning P, Yacob D, Levitt M et al. Childhood constipation: finally something is moving!. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*. 2015;10(1):141-155.
- 26: Cheng L, Goldstein A. Surgical Management of Idiopathic Constipation in Pediatric Patients. *Clinics in Colon and Rectal Surgery*. 2018;31(02):089-098.
- 27: Sakorafas G, Nasikas D, Thanos D, Gantzoulas S. Incidental Thyroid C Cell Hyperplasia: Clinical Significance and Implications in Practice. *Oncology Research and Treatment*. 2015;38(5):249-252.

28: Sromek M, Czetwertyńska M, Skasko E, Zielińska J, Czapczak D, Steffen J. The Frequency of Selected Polymorphic Variants of the RET Gene in Patients with Medullary Thyroid Carcinoma and in the General Population of Central Poland. *Endocrine Pathology*. 2010;21(3):178-185.

29: Machens A, Lorenz K, Dralle H. Constitutive RET tyrosine kinase activation in hereditary medullary thyroid cancer: clinical opportunities. *Journal of Internal Medicine*. 2009;266(1):114-125.

30: Tacaliti A, Silveti F, Palmonella G, Boscaro M. Genetic Alterations in Medullary Thyroid Cancer: Diagnostic and Prognostic Markers. *Current Genomics*. 2011;12(8):618-625.

31: Brandi M. CONSENSUS: Guidelines for Diagnosis and Therapy of MEN Type 1 and Type 2. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2001;86(12):5658-5671.

32: Kloos (Chair) R, Eng C, Evans D, Francis G, Gagel R, Gharib H et al. Medullary Thyroid Cancer: Management Guidelines of the American Thyroid Association. *Thyroid*. 2009;19(6):565-612.