

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

Facultad de Medicina

División de Estudios de Posgrado

HOSPITAL PARA EL NIÑO POBLANO

**UTILIDAD DE LA CALRETININA COMO PRUEBA
DIAGNOSTICA DE ENFERMEDAD DE HIRSCHSPRUNG**

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN QUE

PRESENTA EL



DR. JOSE ALEJANDRO RUIZ MONTAÑEZ

PARA OBTENER EL DIPLOMA DE

ESPECIALISTA EN CIRUGÍA PEDIÁTRICA

PUEBLA, PUE. 2011



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.

**UTILIDAD DE LA CALRETININA COMO PRUEBA DIAGNOSTICA DE LA
ENFERMEDAD DE HIRSCHSPRUNG**

Dr. Hugo Cabrera González

Jefe de la División de Atención Quirúrgica

Dra. Elizabeth Ruíz Gutierrez

Coordinadora de Investigación Clínica

Dra. Ma. Fabiola del Carmen Lara Hernández

Jefe de Servicio de Laboratorio de Anatomía Patológica

Dr. Luis De la Torre Mondragón

Profesor Titular del Curso Universitario de Cirugía Pediátrica y Cirugía Pediátrica
Colorrectal. Tutor de la Tesis.

AGRADECIMIENTOS.

A Dios;

por permitirme vivir para darle cuidado a sus angeles, los niños.

A mi madre Rebeca y mis abuelos Elvira y José;

descansan en paz, pero se que siempre han estado pendientes de mi.

A mi amigo y maestro;

Dr. Luis De la Torre Mondragón, por sus consejos, su motivación y sus valores como ser humano. Le aprendí que hacer las cosas bien, es la única forma de hacerlas y que el éxito se acompaña de mucho trabajo, y los sueños y grandes proyectos pueden hacerse realidad. Me enseñó cariño y respeto por cada paciente y por cada cirugía y que la responsabilidad y la honestidad son los pilares para ser y trascender como cirujano y persona.

A mis amigos;

Karla Alejandra, casi gemela, verdadera amiga y hermana quirúrgica. Siempre confiable, perseverante, responsable y honesta. Contigo podria operar casi a ojos cerrados, gracias por tu incondicional amistad.

Rocío, mi madre quirúrgica. Amiga y maestra ejemplar. Gracias por tus enseñanzas como cirujano y persona.

Juanita, Jose Luis y Carlos, mis residentes menores. Froy, Hermes, Rodrigo y Manuel, mis residentes mayores, todos grandes compañeros y amigos. Gracias por su amistad, sus consejos, y por cada grandioso momento fuera y dentro del quirófano.

Cirujanos; Guillermo Victoria, Manuel Gil, Fernando Cuellar, Miguel Ontiveros, Rafael Aguilar, Ulises Martínez, Alberto Compean, Hugo Cabrera. Mis adscritos y amigos. De cada uno he aprendido muchas cosas dentro y fuera del quirófano. Dr. Roberto Vargas González, Biól. Luz del Carmen Quiroz Amigón, Dra. Bricia Araceli del Rosario Tamayo, Dra. Elizabeth Ruíz Gutierrez; por su colaboración y participación en el desarrollo de este protocolo de investigación.

A mi esposa;

Emma Lucy por tu amor y confianza, le das significado a mi vida. Fátima, nuestra hija, un angel y gran motivación de vida. Las amo.

INDICE

INTRODUCCION.....	6
ANTECEDENTES GENERALES.....	7
ANTECEDENTES ESPECIFICOS.....	10
JUSTIFICACION.....	14
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	15
OBJETIVOS.....	16
DISEÑO.....	18
UNIVERSO DE TRABAJO.....	18
DEFINICIONES OPERACIONALES.....	18
PROCEDIMIENTOS.....	19
ANALISIS DE DATOS.....	20
RECURSOS.....	24
RESULTADOS.....	27
CONCLUSIONES.....	31
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	32

***UTILIDAD DE LA CALRETININA COMO PRUEBA DIAGNOSTICA DE LA
ENFERMEDAD DE HIRSCHSPRUNG***

INTRODUCCION

La enfermedad de Hirschsprung (EH) es un defecto congénito definido histológicamente por la ausencia de células ganglionares y con hipertrofia de los troncos nerviosos en el plexo submucoso y mientérico del recto. La aganglioneosis puede extenderse de manera proximal y afectar distintas longitudes o inclusive todo el colon. Todos los niños con EH presentan signos de obstrucción intestinal durante el periodo neonatal, sin embargo la intensidad de la expresión clínica de esta obstrucción varía entre los neonatos y en ocasiones su diagnóstico se retrasa o se trata como un “simple” estreñimiento crónico. El diagnóstico erróneo de esta enfermedad tiene consecuencias catastróficas en cuanto a morbilidad, mortalidad, número de operaciones innecesarias, y tratamientos quirúrgicos más complicados. Se han intentado y se practican distintas modalidades de diagnóstico para confirmar la EH. Sin embargo, **el estándar de oro para establecer el diagnóstico de EH es el estudio histopatológico de la biopsia de recto.**

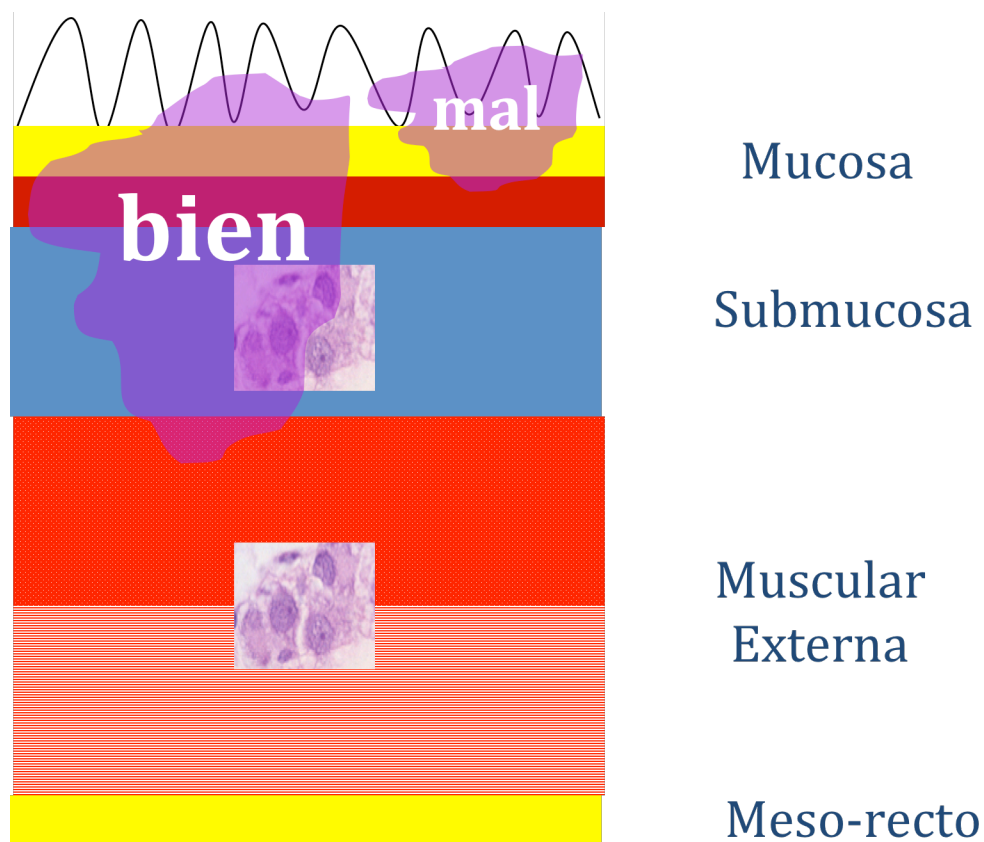
ANTECEDENTES GENERALES:

La enfermedad de Hirschsprung (EH) es una enfermedad congénita consistente en la formación de un megacolon debido a que al existir una sección agangliónica distal, la motilidad es inexistente, produciéndose una obstrucción intestinal por encima del segmento agangliónico que dilata la luz colónica proximal.

La enfermedad toma su nombre de Harald Hirschsprung, el médico danés que la describió en 1888 por primera vez.

La EH debe ser confirmada o excluida por una biopsia rectal adecuada, la cual puede ser obtenida por aspiración o incisional, que debe contener submucosa y evitar que la biopsia sea muy superficial ya que esta situación con lleva el riesgo de que el patólogo la reporte como recto sin células ganglionares (Figura 1).

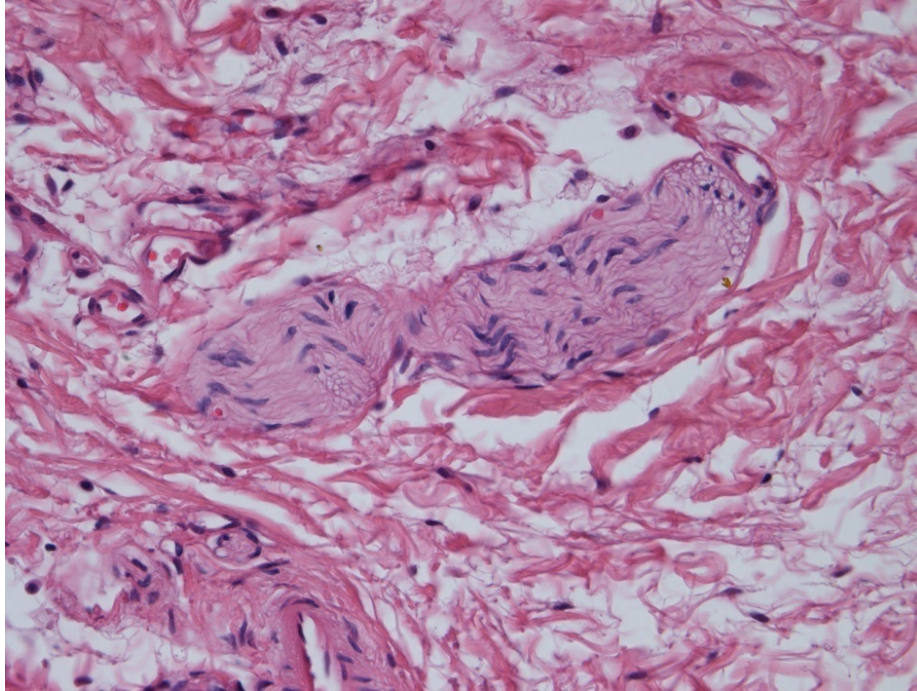
Figura 1.



Los dos marcadores histológicos que definen la EH son:

- 1.- Ausencia de células ganglionares.
- 2.- Presencia de troncos nerviosos hipertróficos (Figura 2).^{1,2}

Figura 2.



Para el diagnóstico definitivo de la EH las biopsias rectales se fijan en formol, se incluyen en parafina y se realizan cortes teñidos con hematoxilina y eosina (HyE). La identificación de una o más células ganglionares en la submucosa excluye el diagnóstico de EH. Por el contrario, el no ver células ganglionares no es sinónimo de enfermedad de Hirschsprung, al menos que se realice un protocolo muy estricto que incluya por lo menos 60 niveles y más aún si existen troncos nerviosos hipertróficos ($\geq 40\mu$) en la submucosa.¹⁻⁸ HyE es la tinción histológica actual considerada el estándar de oro para el diagnóstico con reporte de sensibilidad del 93 con intervalo de confianza del 88-95% y especificidad del 98%; con intervalo de confianza del 95-99%.⁹

Además de las consideraciones anteriores, para evitar errores diagnósticos se debe tomar en cuenta que: 1) los primeros tres centímetros por arriba de la línea dentada es una zona agangliónica o con pocos plexos submucosos y muy separados en todos los seres humanos, por lo tanto la biopsia debe obtenerse por arriba de esta zona; 4 centímetros por arriba de la línea dentada es una zona segura. 2) Los plexos submucosos en todo el recto y colon están separados a diferencia de los mientéricos, por lo que es necesario numerosas niveles con HyE para identificar células ganglionares. 3) En pacientes pequeños la célula ganglionar no expresa la misma morfología que la de un niño mayor y estas neuronas presentes pero inmaduras son más difíciles de reconocer si no se tiene experiencia y es causa de que muchos patólogos piensen que no es posible el diagnóstico de EH en recién nacidos (Figura 3). 4) Y una última consideración es que el otro marcador morfológico, “la hipertrofia de troncos nerviosos”, en la biopsia de recto pueden no estar presente en pacientes recién nacidos, prematuros, pacientes con EH de segmento largo o total y por lo tanto es un marcador poco sensible en ocasiones.⁵⁻⁷

El diagnóstico se basa en demostrar algo que no existe, es decir asegurar que hay ausencia de células ganglionares. Cuando el patólogo encuentra células ganglionares, el diagnóstico de enfermedad de Hirschsprung queda excluido y se termina el problema.

El fenotipo de las células ganglionares es otro punto importante a considerarse. La célula ganglionar inmadura es una neurona apolar, pequeña, ovoide, con pequeños nucléolos y escaso citoplasma que podría confundirse con alguna otra estirpe celular: como un linfocito. Y es aquí donde se dificulta el diagnóstico con HyE. Las células ganglionares maduras se localizan característicamente en grupos de dos o tres justo por debajo de la capa muscular de la mucosa, tienen un citoplasma basofílico abundante y un nucleolo prominente. Este último es difícil de ver en neonatos y prematuros. La presencia de una sola célula ganglionar es suficiente para descartar el diagnóstico de EH.

ANTECEDENTES ESPECIFICOS

La evaluación de las biopsias rectales en búsqueda la de células ganglionares puede hacerse difícil especialmente en casos negativos o dudosos sobre todo en biopsias de recién nacidos, que cada vez son más frecuentes, en los cuales las células ganglionares son inmaduras. Como resultado de estas dificultades se han buscado auxiliares a la HyE con estudios de histoquímica (HQ) y/o inmunohistoquímica (IHQ) para ayudar a revelar células ganglionares o delinear la naturaleza de las fibras nerviosas. La técnica más conocida es la histoquímica con acetilcolinesterasa (AChE) la cual fue introducida por Meier-Ruge et al.⁷ Esta técnica revela la densidad y espesor de las fibras nerviosas positivas a AChE que son grandes en pacientes con EH de recto y sigmoides, particularmente en la muscular de la mucosa. Los valores de esta prueba son cualitativos y se requiere mucha experiencia. La técnica es “caprichosa” y requiere de estar bien estandarizada con controles positivos y negativos actualizados por la pérdida progresiva de la actividad del reactivo. Puede dar falsos negativos en recién nacidos⁶ y en cuadros inflamatorios, por lo que siempre debe acompañarse de HyE. En la actualidad la acetilcolinesterasa es poco usada para diagnosticar EH ya que requiere de un espécimen congelado y no puede hacerse en bloques de parafina. No se discute su utilidad en casos especiales como otros trastornos de motilidad intestinal.⁸

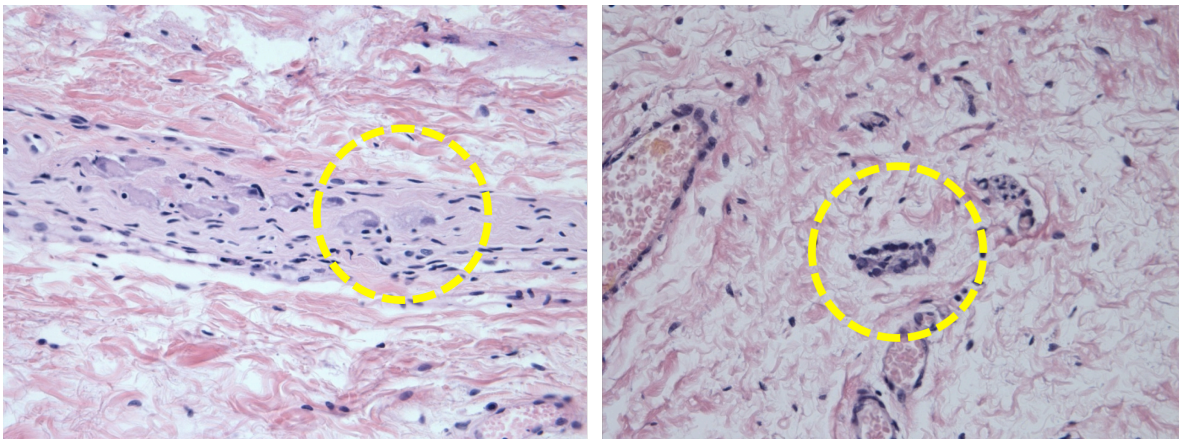
Debido a las limitaciones de la acetilcolinesterasa numerosas tinciones inmunohistoquímicas han aparecido. La inmunohistoquímica (IHQ) se basa en la utilización de un anticuerpo específico previamente unido a una enzima que funciona como el sustrato visible al formar un complejo con el antígeno buscado. La gran ventaja es que se usa en biopsias incluidas en parafina. De esta forma, se facilita la identificación de estirpes celulares, las células ganglionares. En 1988 Robey et al usaron enolasa neuronal específica para resaltar las células ganglionares y tuvieron un 91% de datos confirmatorios.

A mediados de 1990s se utilizó la catepsina D con buenos resultados. Posteriormente múltiples series mostraron protocolos con anticuerpos como bcl-2, NeuN, BMPRIA, neurofilamentos y tubulina todos con buenos resultados. En 2006, Karim et al, identificó una oncoproteína Ret dentro de las células ganglionares y concluyó que estas células podrían ser fácilmente identificadas por esta tinción. Posteriormente Burtelow y Longacre, reportaron la utilidad de MAP2.¹⁰ Los anticuerpos específicos para células ganglionares más usados son actualmente los neurofilamentos, proteína S-100 (introducida por primera vez por Robey et al. 1988)¹⁰, y la enolasa neuronal específica. La proteína S-100, es un marcador de diferenciación de la vaina nerviosa, útil para evaluar la hipertrofia de los troncos nerviosos. Es una proteína ácida quelante del calcio que se llama así por su solubilidad en sulfato de amoníaco. La Inmuno-tinción con S-100 destaca a las células ganglionares, que no son inmunoreactivas a este anticuerpo, pero que son circundadas por células altamente inmunorreactivas que son las células de Schwann. La Inmuntinción con S-100 demuestra la proliferación de fibras nerviosas.¹¹ Su utilidad puede observarse en las biopsias de pacientes recién nacidos prematuros ya que es este grupo de edad las células ganglionares son formas intermedias entre los neuroblastos apolares y las formas maduras de neuronas ganglionares bipolares. Son pequeñas, ovoides con ocasiones pequeños nucléolos y muy escaso citoplasma; pueden confundirse con células endoteliales, musculares y aun células inflamatorias, por lo que puede requerirse de estos marcadores neuronales para identificarlas.⁸

Barshack et al reportaron en 2004 que la inmunotinción con Calretinina está ausente en las fibras nerviosas intrínsecas del colon con EH, mientras que si era identificada en células ganglionares y fibras nerviosas intrínsecas de los pacientes sin enfermedad de Hirschsprung, posteriormente Kapur et al aplicaron Calretinina retrospectivamente a pacientes con EH y sin EH reportando resultados similares a los encontrados por Barshack et al, y concluyeron que la Calretinina es superior a la histoquímica con acetilcolinesterasa.⁶

La calretinina es una proteína fijadora de calcio que puede funcionar como un sensor-modulador de calcio, es expresado por un subconjunto de células ganglionares de los plexos submucosos y mientéricos, algunos de los cuales proyectan nervios terminales dentro de la mucosa. Los segmentos aganglionares carecen completamente de la inmuno-reactividad en los nervios entéricos (Figura 3). Además tanto las células ganglionares como las fibras nerviosas muestran expresión a la calretinina en áreas ganglionicas.^{5,6} La gran ventaja de la calretinina es que es visible en células maduras e inmaduras, en el cuerpo neuronal y en sus prolongaciones. Así también se ha investigado la utilidad de IHQ con Calretinina comparándola con AChE en pacientes con EH y controles, analizándose incluso biopsias inadecuadas que contenían mucosa anal, mucosa anorrectal o insuficiente submucosa, demostrando ser más sensible y específica para el diagnóstico al mostrar inmunorreacción en aquellos pacientes con diagnóstico dudoso por AChE.^{5,12}

Figura 3.



Células ganglionares
maduras

Células ganglionares
inmaduras

En el hospital para el Niño Poblano se cuenta con una clínica colorrectal en donde actualmente se atienden 182 pacientes, 27 con enfermedad de Hirschsprung, y 16 pacientes con estreñimiento crónico idiopático, 7 de éstos últimos fueron diagnosticados en un periodo de 8 meses al descartarse enfermedad de Hirschsprung con una biopsia rectal. Algunos pacientes referidos de otros centros de atención medica con procedimientos quirúrgicos invasivos y con complicaciones quirúrgicas derivados de un diagnostico histológico erróneo. Por lo anterior al ser un centro de referencia nacional de pacientes con patologías colorrectales se ha tenido la necesidad de investigar e implementar nuevas técnicas de diagnóstico histológico que superen en sensibilidad y especificidad a las pruebas empleadas actualmente para el diagnostico de la enfermedad de Hirschsprung. Partiendo de esta premisa nos propusimos investigar la utilidad de calretinina como prueba inmunohistoquímica y comparar su sensibilidad y especificidad como prueba diagnostica con las tinciones de rutina HyE (estándar) vs. inmunohistoquímica con proteína S-100 .

JUSTIFICACION

El diagnóstico de la enfermedad de Hirschsprung está basado en el análisis histopatológico de la biopsia rectal. El estudio con la acetilcolinesterasa ha facilitado el diagnóstico, pero sigue siendo una prueba con algunas limitantes en cuanto a su sensibilidad y especificidad.

La frecuencia de pacientes con cuadros sospechosos de EH en el Hospital para el Niño Poblano (HNP) es de aproximadamente 15 casos por año, sin embargo, posterior al estudio de histopatología, sólo se corroboran la tercera parte de los mismos (en promedio 5 por año).

Usando un nuevo anticuerpo diagnóstico como la calretinina puede mejorar la sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de EH y disminuir los falsos positivos y negativos en la misma, y lo que es aún más importante, la decisión terapéutica en éstos pacientes.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El uso de la calretinina para el diagnóstico de EH es una prueba que en la literatura se asume con una alta sensibilidad y especificidad, y que no ha sido probada en nuestro medio. Con éstos antecedentes determinamos cuál es la sensibilidad y especificidad de la calretinina para el diagnóstico de EH en biopsias de recto en el Hospital para el Niño Poblano; además se comparó con proteína S-100 que es la inmunohistoquímica complementaria de HyE, utilizada actualmente.

- ¿Cuál es la sensibilidad y especificidad de la tinción de inmunohistoquímica con calretinina en el diagnóstico de EH en los cortes de biopsia rectal de pacientes con sospecha de la misma en el Hospital para el Niño Poblano?
- ¿Cuál es la sensibilidad y especificidad de la tinción de con Hematoxilina y Eosina en el diagnóstico de EH en los cortes de biopsia rectal de pacientes con sospecha de la misma en el Hospital para el Niño Poblano?
- ¿Cuál es la sensibilidad y especificidad de la tinción de inmunohistoquímica con proteína S-100 en el diagnóstico de EH en los cortes de la biopsia rectal de pacientes con sospecha de la misma en el Hospital para el Niño Poblano?

OBJETIVOS

GENERAL

Identificar la especificidad y sensibilidad de la tinción con inmunohistoquímica de la calretinina para identificar células ganglionares en tejidos obtenidos de pacientes con enfermedad de Hirschsprung, en comparación con el método estándar de observación con tinción con hematoxilina y eosina vs inmunohistoquímica con proteína S-100.

ESPECIFICOS

Determinar la sensibilidad y especificidad de la tinción de inmunohistoquímica para calretinina como marcador de tejidos neuronales en biopsias rectales para identificar EH de acuerdo a los criterios diagnósticos (ver tabla 1 de definiciones operacionales) al comparar con el método estándar (HyE) en biopsias embebidas en parafina de pacientes atendidos durante el periodo de estudio.

Determinar la sensibilidad y especificidad de la tinción de inmunohistoquímica con proteína S-100 como marcador de la hipertrofia de troncos nerviosos en biopsias rectales para identificar EH de acuerdo a los criterios diagnósticos (ver tabla 1 de definiciones operacionales) al comparar con la inmunohistoquímica con calretinina en las biopsias embebidas en parafina de pacientes atendidos durante el periodo de estudio.

Determinar el valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de la hematoxilina y eosina, calretinina, y proteína S-100 como marcador de la hipertrofia de troncos nerviosos en biopsias rectales para identificar EH respectivamente.

Determinar concordancia interobservador entre los diagnósticos establecidos por los patólogos con las tinciones de inmunohistoquímica: calretinina y proteína S-100, así como la tinción con hematoxilina y eosina, en biopsias rectales para identificar EH de acuerdo a los criterios diagnósticos (ver tabla 1 de definiciones operacionales).

DISEÑO

Estudio descriptivo, transversal, retrolectivo, observacional, comparativo para obtener la utilidad de una prueba diagnóstica.

UNIVERSO DE TRABAJO

Se incluyeron biopsias rectales que contaban con bloques de parafina a los cuales se les pueda realizar inmunohistoquímica de pacientes que están siendo atendidos en la clínica colorrectal con sospecha de enfermedad de Hirschsprung en los últimos dos años (febrero 2009-febrero 2011).

UNIDADES DE OBSERVACION

Se seleccionarán todas las biopsias rectales incluidas en parafina de aquellos pacientes en quienes hubo sospecha de EH, independientemente del diagnóstico histopatológico final por medio de la prueba estándar de hematoxilina y eosina.

DEFINICIONES OPERACIONALES

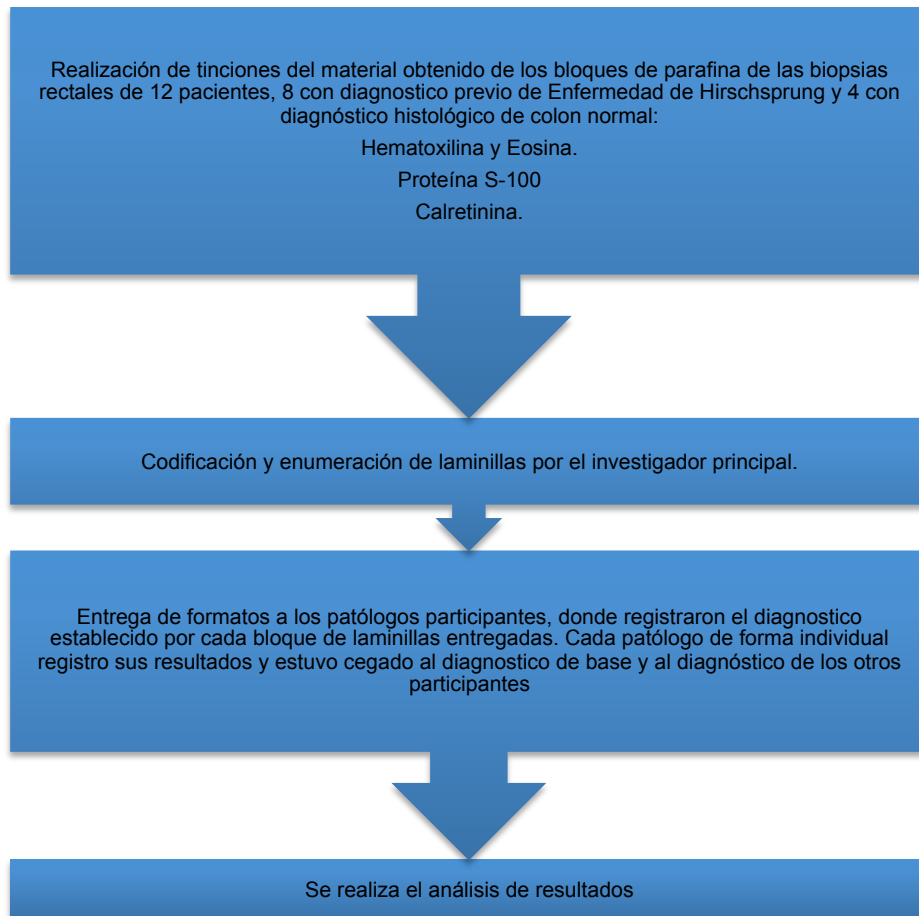
Tabla 1. Criterios histopatológicos para diagnóstico de EH.

HALLAZGOS PATOLÓGICOS		
Enfermedad de Hirschsprung (EH)	Ausencia de células ganglionares	Hipertrofia de Troncos Nerviosos
Exclusión de EH	Células ganglionares	*Ausencia de Hipertrofia de Troncos nerviosos no excluye el diagnóstico de EH

PROCEDIMIENTOS

Las laminillas con las tinciones de las biopsias rectales con hematoxilina y eosina, inmunohistoquímica con proteína S-100 y calretinina fueron revisadas en forma ciega por tres patólogos de acuerdo a los criterios diagnósticos de la EH para cada tinción histológica.

Flujograma de los procedimientos:



ANÁLISIS DE DATOS

Se obtuvo estadística descriptiva de los pacientes correspondientes a las biopsias estudiadas, edad y sexo.

Se buscó sensibilidad y especificidad, y valor predictivo positivo y negativo entre las tinciones con HyE, inmunohistoquímica con proteína S100 e inmunohistoquímica con calretinina (en base a tablas 2x2). También se buscó coeficiente kappa entre pruebas diagnósticas; considerando una buena concordancia entre 0.70-0.91 y excelente 0.92-1.0.

Se buscó variación interobservador por medio de la proporción de concordancia y promedio de kappa ponderada. Se considerará que existe concordancia buena cuando el resultado sea de 0.61 a 80 y casi perfecta de 0.81 a 1.0. El tamaño de la muestra para el análisis de concordancia fue de 12 pacientes. Cuatro pacientes fueron normoganglionicos y ocho fueron aganglionicos y su diagnóstico fue corroborado por la pieza histopatológica posterior al descenso endorrectal.

	HyE+	EyH-	
Calretinina +	8	4	12
Calretinina -		24	24
	8	28	36

	S-100 +	S-100 -	
Calretinina +	0	9	9
Calretinina -	10	14	24
	10	23	33*

*Solo se analizaron 33 tinciones ya que proteína S-100 no se pudo realizar en un paciente, por falta de tejido en el bloque de parafina.

Concordancia Interobservador

	Observador 1 HyE +	Observador 1 HyE -	
Observador 2 HyE +	3	1	4
Observador 2 HyE -	0	8	8
	3	9	12

	Observador 1 HyE +	Observador 1 HyE -	
Observador 3 HyE +	1	0	1
Observador 3 HyE -	2	9	11
	3	9	12

	Observador 3 HyE +	Observador 3 HyE -	
Observador 2 HyE +	1	3	4
Observador 2 HyE -	0	8	8
	1	11	12

	Observador 1 Calretinina +	Observador 1 Calretinina -	
Observador 2 Calretinina +	4	0	4
Observador 2 Calretinina -	0	8	8
	4	8	12

	Observador 1 Calretinina +	Observador 1 Calretinina -	
Observador 3 Calretinina +	4	0	4
Observador 3 Calretinina -	0	8	8
	4	8	12

	Observador 3 Calretinina +	Observador 3 Calretinina -	
Observador 2 Calretinina +	4	0	4
Observador 2 Calretinina -	0	8	8
	4	8	12

	Observador 1 Proteína S-100 +	Observador 1 Proteína S-100 -	
Observador 2 Proteína S-100 +	4	0	4
Observador 2 Proteína S-100 -	1	6	7
	5	6	11*

	Observador 1 Proteína S-100 +	Observador 1 Proteína S-100 -	
Observador 3 Proteína S-100 +	1	0	1
Observador 3 Proteína S-100 -	4	6	10
	5	6	11*

	Observador 3 Proteína S-100 +	Observador 3 Proteína S-100 -	
Observador 2 Proteína S-100 +	1	3	4
Observador 2 Proteína S-100 -	0	7	7
	1	11	11*

*Solo se analizaron 33 tinciones ya que proteína S-100 no se pudo realizar en un paciente, por falta de tejido en el bloque de parafina.

RECURSOS HUMANOS

Investigadores Principales:

Dr. José Alejandro Ruíz Montañez. Residente de Cirugía Pediátrica.

Dra. Karla Alejandra Santos Jasso. Residente de Cirugía Colorrectal Pediátrica.

Asesores Expertos:

Dr. Luis de la Torre Mondragón. Profesor Titular del Curso Universitario de Alta Especialidad en Cirugía Pediátrica Colorrectal y Profesor Titular del Curso Universitario de Cirugía Pediátrica. Universidad Nacional Autónoma de México. Hospital para el Niño Poblano.

Dra. Fabiola Lara Hernández. Jefe de Servicio de Anatomía Patológica. Hospital para el Niño Poblano.

Dr. Roberto Vargas González. Patólogo Pediatra. Hospital Puebla.

Biól. Luz del Carmen Quiroza Amigón. Departamento de Inmunohistoquímica. Hospital para el Niño Poblano.

Dra. Bricia Araceli del Rosario Tamayo. Patólogo Pediatra, Instituto Mexicano del Seguro Social, San Alejandro.

Asesor Metodológico: Dra Elizabeth Ruiz Gutiérrez. Coordinadora de Investigación. Hospital para el Niño Poblano.

RECURSOS MATERIALES:

La técnica de inmunohistoquímica fue realizada en equipo automatizado Dako por el sistema de detección Envision y usamos diaminobenzidina como cromógeno, posteriormente se aplicó un recuperador de antígeno el cual fue colocado por 40 minutos, posteriormente el anticuerpo se incubó por un tiempo de 60 minutos. Los anticuerpos utilizados fueron anticuerpos monoclonal Mouse Anti-Human Calretinin (DakoCytomation); Anticuerpos monoclonal Rabbit Anti-Cow S100 (Dako).

Paquetería office (Excel), Paquetería SPSS 19.

RECURSOS FINANCIEROS:

Propios de los investigadores.

ASPECTOS ÉTICOS

Se trabajó solamente con muestras que habían sido recolectadas anteriormente, por lo que no se investigará sujetos, por ello, no habrá riesgo para pacientes. Sin embargo de acuerdo a la Declaración de Helsinki se mantendrá el anonimato de los pacientes.

TABLA DE VARIABLES

Cédula de recolección de datos, y formato para observadores.

No. Expediente	Edad	Número de Biopsia	Número de Patólogo
Hematoxilina y eosina EH Normoganglionicos Muestra insuficiente para establecer diagnóstico.	Inmunohistoquímica Proteína S-100 EH Normoganglionicos Muestra insuficiente para establecer diagnóstico.	Inmunohistoquímica Calretinina. EH Normoganglionicos Muestra insuficiente para establecer diagnóstico.	

Calendario de actividades.

CRONOGRAMA DE TRABAJO (Gráfica de Gantt)

Actividades	MARZO 2011	MARZO 2011	MARZO 2011	ABRIL 2011	SEPTIEMBRE 2011	SEPTIEMBRE 2011
Búsqueda de Bibliografía						
Diseño de protocolo						
Aceptación del protocolo						
Captura de datos						
Análisis de resultados						
Presentación final						

RESULTADOS

La edad de los pacientes fue de 1 a 116 meses con promedio de 20 meses.

Los diagnósticos de las 12 biopsias emitidos por los tres patólogos se muestran en la tabla 2.

El estudio de las 12 biopsias con HE reportó sobre-diagnóstico de EH por dos patólogos y tres sobre-diagnósticos por un patólogo; con PS-100 el sub-diagnóstico de EH se reportó entre 3 y 7 casos.

Con calretinina ningún patólogo reportó sobre-diagnóstico ni sub-diagnósticos (Tabla 2).

Tabla 2.

Interpretación de 12 biopsias de recto tomadas a 4 cm de la línea pectínea, estudiadas por tres patólogos de forma independiente. Todas las biopsias fueron procesadas con Hematoxilina – Eosina e Inmuno-histoquímica con Calretinina y Proteína S-100.										
Paciente	Edad (meses)	Hematoxilina y Eosina			Proteína S-100			Calretinina		
		P-1	P-2	P-3	P-1	P-2	P-3	P-1	P-2	P-3
1	2	EH	EH	EH	Hipertrofia TN	No Hipertrofia TN	No Hipertrofia TN	-	-	-
2	<1	EH	EH	EH	No Hipertrofia TN	No Hipertrofia TN	No Hipertrofia TN	-	-	-
3	8	EH	EH	EH	No hipertrofia TN	No Hipertrofia TN	No Hipertrofia TN	-	-	-
4	<1	EH	EH	EH	No Hipertrofia TN	No Hipertrofia TN	No Hipertrofia TN	-	-	-
5	6	N	N	EH	No Hipertrofia TN	No Hipertrofia TN	No Hipertrofia TN	+	+	+
6	64	N	N	N	No Hipertrofia TN	No Hipertrofia TN	No Hipertrofia TN	+	+	+
7	24	EH	EH	EH	Hipertrofia TN	Hipertrofia TN	No Hipertrofia TN	-	-	-
8	20	N	N	EH	No Hipertrofia TN	No Hipertrofia TN	No Hipertrofia TN	+	+	+
9	<1	EH	EH	EH	Hipertrofia TN	Hipertrofia TN	No Hipertrofia TN	-	-	-
10	116	EH	EH	EH	Hipertrofia TN	Hipertrofia TN	No Hipertrofia TN	-	-	-
11	2	EH	EH	EH	Hipertrofia TN	Hipertrofia TN	Hipertrofia TN	-	-	-
12	<1	MI **	N	EH	MI *	MI *	MI*	+	+	+

EH= Enfermedad de Hirschsprung
N=Normoganglionico. No Hirschsprung
P-1= Patólogo 1 P-2=Patólogo 2 P-3=Patólogo 3
No Hipertrofia TN= No Hipertrofia de Troncos Nerviosos
Hipertrofia TN= Hipertrofia de Troncos Nerviosos
Calretinina (-)= tinción negativa compatible con EH.
Calretinina (+)= tinción positiva. Paciente sano, Normoganglionico, No EH.
Calretinina (+*)=Sólo se observo dendritas/axones, no se logro visualización del cuerpo neuronal.
MI*El bloque de parafina fue insuficiente para realizar esta inmunotinción.
MI** Muestra insuficiente para establecer diagnóstico para éste patólogo.(no estableció diagnóstico)

La sensibilidad encontrada para HyE fue de 100%, con una especificidad de 63.3%; para calretinina los resultados fueron: sensibilidad de 100% con especificidad del 100%. Para proteína S-100 la sensibilidad fue de 41.7%, y una especificidad del 100% (tabla 3); cuando se buscaba hipertrofia de troncos nerviosos.

Tabla 3. Valoración de técnicas histopatológicas para el diagnóstico de la Enfermedad de Hirschsprung.

Prueba Diagnóstica	Kappa	p	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD	VPP	VPN
HEMATOXILINA EOSINA	0.999	0.01	100%	63.6%	85.7%	100%
PS 100	0.147	0.120	41.7%	100%	100%	39.1%
CALRETININA	1	<0.0001	100%	100%	100%	100%

HE = hematoxilina y eosina, PS-100=proteína S 100, k=índice de concordancia, p= nivel de significancia.

VPP=valor predictivo positivo, VPN=valor predictivo negativo.

El coeficiente de k fue bueno con HyE entre los patólogos 1-2 y fue débil al comparar al patólogo 3 con los patólogos 1 y 2; para PS-100 la k fue entre pobre y moderada para los tres patólogos, y para la calretinina la k fue excelente en los tres patólogos (Tabla 4).

Tabla 4. Concordancia inter-observador con las de tres técnicas histológicas aplicadas a 12 biopsia de recto de pacientes con “sospecha clínica de EH” estudiadas por tres patólogos.

PATÓLOGO	HyE				PS-100*				CALRETININA			
	EH n= 8	N n= 4	K	P	EH n= 8	N n= 4	K	p	EH n= 8	N n= 4	K	P
1	9	3	0.8	0.00 5	4	7	0.35 3	0.12 5	8	4	1	0.00 1
2	9	3	0.8	0.00 5	5	6	0.47 6	0.06 4	8	4	1	0.00 1
3	11	1	0.30 8	0.14 0	1	10	0.07 2	0.52 1	8	4	1	0.00 1

EH:enfermedad de Hirschsprung, N: normal, k:Concordancia, p: nivel de significancia.

La concordancia intraobservador fue valorada para el patólogo 1 y 2 obteniéndose una kappa de 1.0 respectivamente.

CONCLUSIONES

La Hematoxilina y Eosina continúa siendo la tinción que permite el diagnóstico de Enfermedad de Hirschsprung. El patólogo que no tiene experiencia, tendrá limitantes al interpretar neuronas inmaduras y es por eso que se requieren de otras tinciones de inmunohistoquímica.

La tinción de inmunohistoquímica con anticuerpos para la proteína S-100 al ser un anticuerpo que está presente en varias estirpes celulares y que pinta células de la glía y células de Schwann muestra resultados variables, ya que siempre es positiva, y por lo tanto los resultados de los patólogos son subjetivos, dependiendo de su experiencia en la identificación de hipertrofia de troncos nerviosos.

La calretinina estableció con certeza la estirpe celular, fue fácil de interpretar, porque muestra positividad si la biopsia contiene células neuronales, y no muestra tinción en pacientes con enfermedad de Hirschsprung. Este anticuerpo demostró ser una herramienta histopatológica útil que facilita el diagnóstico de enfermedad de Hirschsprung en la biopsia de recto por su alta sensibilidad y especificidad y puntualizamos los siguientes aspectos:

- 1.- No demanda experiencia en la interpretación.
- 2.- Identifica células ganglionares maduras e inmaduras, aún en pacientes recién nacidos.
- 3.- Es suficiente observar la positividad de las neuritas (axones –dendritas) aún sin ver el cuerpo neuronal.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. De la Torre ML, Langer CJ. Transanal endorectal pull-through for Hirschsprung disease: technique, controversies, pearls, pitfalls, and an organized approach to the management of postoperative obstructive symptoms. *Seminars in Pediatric Surgery* (2010) 19, 96-106.
2. Martucciello G, Pini AP, Puri P, et al. Controversies concerning diagnostic guidelines for anomalies of the enteric nervous system: A report from the fourth International Symposium on Hirschsprung's disease and related neurocristopathies. *J Pediatr Surg* 2005;40:1527-31.
3. De la torre ML. Mitos y realidades a 120 años de su descripción. *Acta Pediátrica* 2008; 29 (3):139-44.
4. Reyes-Múgica M. Hirschsprung Disease. *Pathology Case Reviews*. 5(1):51-59, 2000.
5. 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. *Pediatrician Developmental Pathology* 12, 6-15, 2009.
6. Guinard-Samuel VS, Bonnard A, De Lagausie P, Philippe-Chomette P, Alberti C, El Ghoneimi A, et al. Calretinin immunohistochemistry: a simple and efficient tool to diagnose Hirschsprung disease. *Modern Pathology* (2009) 22, 1379-1384.
7. Kapur R. Can We Stop Looking? Immunohistochemistry and the Diagnosis of Hirschsprung Disease. *Am J Clin Pathol* 2006; 126: 9-12.

8. Ridaura SC. Problemas en el diagnóstico histopatológico de la enfermedad de Hirschsprung. *Acta PediatrMéd* 2003; (24(3):166-71.
9. Lorijn F, Kremer LCM, Reitsma JB, Benninga MA. Diagnostic Test in Hirschsprung Disease: A Systemic Review. *J of Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006; 42: 496-505
10. Holland SK, Hessler RB, Reid-Nicholson MD, Ramalingam P, Lee JR. Utilization of peripherin and S-100 immunohistochemistry in the diagnosis of Hirschsprung disease. *Modern Pathology* (2010)23, 1173-1179.
11. Barshack I, Fridman E, Goldberg I, Chowers Y, Kopolovic J, The loss of calretinin expression indicates aganglionosis in Hirschsprung. *J ClinPathol* 2004; 57:712-716
12. Knowles CH, De Giorgio R, Kapur RP, Bruder E, Farrugia G, Geboes K, et al. The London Classification of gastrointestinal neuromuscular pathology: report on behalf of the Gastro 2009 International Working Group. *Gut* 2010;59:882-887.