

**UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO**



**CORRELACIÓN DIAGNÓSTICA USANDO CALRETININA COMO
INSTRUMENTO ADYUVANTE EN RESECCIONES INTESTINALES POR
ENFERMEDAD DE HIRSCHSPRUNG RECIBIDAS EN PATOLOGÍA DEL
HOSPITAL NACIONAL DE NIÑOS DE ENERO DEL AÑO 2008 A DICIEMBRE
DEL AÑO 2012**

**Trabajo de investigación aplicada sometido a la consideración de la
Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Especialidades
Médicas para optar al grado y título de Especialista en Patología Pediátrica**

LISA NATALIA MIRANDA SOLÍS

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2014

Dedicatoria

A mi maestro, mentor y amigo, el Dr. Ernesto Jiménez Montero, el cuarto trabajo final de graduación que le dedico.

A mi maestro, el Dr. Mario González Pineda, por todo su esfuerzo al tratar de educar a Rita.

Agradecimientos

A la Dra. Ana Patricia Argüello Hidalgo por toda su paciencia.

A mis padres por mi vida.

A Dios, por todo.

“Este trabajo de investigación aplicada fue aceptado por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Especialidades Médicas de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado y título de Especialidad en Patología Pediátrica.”



Dra. Ana Patricia Argüello Hidalgo

Profesora Guía



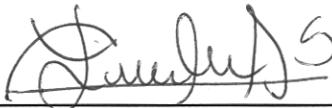
Dra. Silvia Santamaría Corea

Lectora



Dra. Mónica Núñez Delgado

Directora Programa de Posgrado de Especialidad en Patología Pediátrica



Lisa Natalia Miranda Solís

Sustentante

Tabla de Contenido

Dedicatoria.....	ii
Agradecimientos	iii
Tabla de Contenido.....	iv
Resumen.....	vii
Lista de Tablas.....	viii
Lista de Figuras.....	ix
Lista de Abreviaturas	x
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	4
1. Marco Contextual	4
1.1 Justificación	4
1.2 Objetivos	6
1.2.1 Objetivo general	6
1.2.2 Objetivos específicos.....	6
1.3 Problema.....	6
1.4 Hipótesis	7
CAPÍTULO II	9
2. Marco Teórico.....	9
2.1 Generalidades.....	9
2.2. Patología de la Enfermedad de Hirschsprung.....	15
2.2.1 Biopsias rectales	15
2.2.2 Histoquímica para Enfermedad de Hirschsprung	19
2.2.3 Inmunohistoquímica para Enfermedad de Hirschsprung: otros anticuerpos y estudios preliminares	21
2.3 Calretinina en el diagnóstico de Enfermedad de Hirschsprung.....	24
2.3.1 Calretinina	24
2.3.2 Calretinina en Enfermedad de Hirschsprung	26
CAPITULO III	39
3. Marco Metodológico	39
3.1 Tipo de estudio	39

3.2 Materiales y métodos	39
3.2.1 Características de los pacientes.....	40
3.2.2 Criterios histopatológicos.....	40
3.2.3 Inmunohistoquímica.....	41
3.2.3 Análisis de los datos	43
3.3 Alcances y limitaciones	45
CAPITULO IV.....	47
4. Resultados.....	47
4.1 Presentación de Resultados	47
4.2 Análisis y Discusión de Resultados	56
CAPITULO V.....	62
5. Conclusiones y Recomendaciones.....	62
5.1 Conclusiones	62
5.2 Recomendaciones	63
BIBLIOGRAFÍA	65
Anexo N° 1: Estadística.....	70
Anexo N° 2: Hoja de Recolección de datos.....	77
Anexo N° 3: Fotografías	79
Anexo N° 4: Aprobación del CLOBI	85

Resumen

La enfermedad de Hirschsprung continúa siendo un reto diagnóstico para los patólogos pediatras a nivel mundial, ya que depende de un hallazgo negativo, la ausencia de células ganglionares en los plexos mientérico y submucoso. La biopsia rectal por succión, que es el método diagnóstico más utilizado en la actualidad, mantiene esta problemática ya que provee una muestra limitada para su análisis anatomopatológico. Durante mucho tiempo se han buscado herramientas coadyuvantes a la hematoxilina eosina como técnicas de histoquímica e inmunohistoquímica para el diagnóstico de esta enfermedad. En este trabajo se utilizó la tinción inmunohistoquímica de calretinina en las resecciones quirúrgicas por megacolon agangliónico recibidas en el Servicio de Patología del Hospital Nacional de Niños del año 2008 al 2012, con el objetivo de valorar la interpretación de la misma y la correlación diagnóstica entre los cuatro patólogos pediatras que laboran en dicho centro.

En el período comprendido entre los años 2008 y 2012 se identificaron 34 casos que cumplían con los criterios de inclusión para la investigación, de cada uno se escogieron dos bloques parafinados, uno del área agangliónica (caso) y otro del área con presencia de células ganglionares (control), para un total de 68 láminas de calretinina. Éstas fueron evaluadas por los cuatro patólogos pediatras de nuestro servicio, demostrando una adecuada interpretación y correlación diagnóstica, al usar la tinción de calretinina como método diagnóstico en enfermedad de Hirschsprung. Además se caracterizó a la población de pacientes reclutados durante el período de estudio y se realizaron recomendaciones para futuros estudios en este tema.

Lista de Tablas

Tabla 1. Antígenos utilizados en enfermedad de Hirschsprung-----	22
Tabla 2. Interpretación de inmunoperoxidasa para calretinina por los patólogos pediatras, casos de resección por enfermedad de Hirschsprung recibidos en el Servicio de Patología del Hospital Nacional de Niños 2008-2012-----	46-48
Tabla 3. Índice de correlación Kappa entre los diferentes patólogos pediatras en la valoración de inmunoperoxidasa por calretinina, casos de resección por enfermedad de Hirschsprung recibidos en el Servicio de Patología del Hospital Nacional de Niños 2008-2012.-----	48
Tabla 4. Índice de correlación Kappa entre los patólogos pediatras y el diagnóstico con hematoxilina y eosina en la valoración de inmunoperoxidasa por calretinina, casos de resección por enfermedad de Hirschsprung recibidos en el Servicio de Patología del Hospital Nacional de Niños 2008-2012.-----	49
Tabla 5. Porcentaje de respuesta equívoca de los patólogos pediatras en la valoración de inmunoperoxidasa por calretinina, casos de resección por enfermedad de Hirschsprung recibidos en el Servicio de Patología del Hospital Nacional de Niños 2008-2012.-----	49

Lista de Figuras

Figura 1. Ejemplo de distribución de células ganglionares en intestino con enfermedad de Hirschsprung.-----	12
Figura 2. Distribución porcentual por edad al momento del diagnóstico de los pacientes con resecciones intestinales por enfermedad de Hirschsprung recibidas en Patología del Hospital Nacional de Niños en el período 2008-2012-- -----	50
Figura 3. Distribución porcentual por sexo de los pacientes con resecciones intestinales por enfermedad de Hirschsprung recibidas en el Servicio de Patología del Hospital Nacional de Niños durante el período 2008-2012.-----	51
Figura 4. Distribución por provincia de los pacientes con resecciones intestinales por enfermedad de Hirschsprung recibidas en el Servicio de Patología del Hospital de Niños en el período 2008-2012.-----	52
Figura 5. Número de biopsias requeridas para el diagnóstico de enfermedad de Hirschsprung en pacientes con resecciones intestinales recibidas en el Servicio de Patología del Hospital Nacional de Niños en el período 2008-2012.-----	53
Figura 6. Distribución porcentual con respecto al número de niveles valorados por los patólogos en las biopsias diagnósticas de los pacientes con resecciones intestinales por enfermedad de Hirschsprung, recibidas en el Servicio de Patología del Hospital Nacional de Niños en el período 2008-2012.-----	54
Figura 7. Procedimientos quirúrgicos realizados a los pacientes con resecciones intestinales por enfermedad de Hirschsprung recibidas en patología del Hospital Nacional de Niños en el período 2008-2012.-----	55

Lista de Abreviaturas

DERTA: descenso endorrectal transanal

AchE: acetilcolinesterasa

NADPH-d: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato diaforasa

H&E: hematoxilina-eosina

MAP-2: proteína asociada a los microtúbulos 2

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades congénitas de la motilidad del tracto gastrointestinal son un problema severo en niños y potencialmente en adultos. Con el paso del tiempo ha habido avances importantes en el conocimiento de una de ellas, la enfermedad de Hirschsprung.¹ Ha pasado más de un siglo desde que Harald Hirschsprung describió por primera vez el megacolon congénito, aun así, las investigaciones sobre la patogénesis y fisiopatología de esta entidad son relativamente recientes y se han basado, en la utilización de herramientas, como estudios moleculares y genéticos.²

A pesar de que el diagnóstico de la enfermedad de Hirschsprung es a veces tardío, un segmento del intestino siempre tiene aganglionosis total en los pacientes con esta enfermedad, lo cual como hallazgo anatomopatológico es poco sutil.³ Hasta la fecha la biopsia rectal en la cual no se identifican células ganglionares en los plexos submucosos y mientéricos sigue siendo el estándar para el diagnóstico de esta patología. Se han realizado a lo largo del tiempo, numerosos esfuerzos para facilitar el diagnóstico histopatológico de la enfermedad de Hirschsprung, entre ellos el uso de histoquímica con acetilcolinesterasa en tejido congelado y el empleo de diferentes marcadores inmunohistoquímicos.⁴

Durante el Seminario de Patología Pediátrica que se realizó en Guatemala en el año 2013, el cual contó con la participación de patólogos pediatras de muchos

¹ Gershon MD et al. Semin Pediatr Surg, 2004; 13: 224-235.

² Sullivan PB. Arch Dis Child, 1996; 74: 5-7.

³ Idem 1.

⁴ Kapur RP. Am J Clin Pathol, 2006; 126: 9-12.

países latinoamericanos, surgió la interrogante sobre el uso del marcador calretinina en enfermedad de Hirschsprung y su posible aplicación a los casos diagnosticados en otros centros hospitalarios pediátricos, incluyendo Costa Rica. En esta investigación se utilizará este marcador en resecciones intestinales con diagnóstico de megacolon agangliónico (realizado en el Hospital Nacional de Niños, en un período de 5 años, 2008-2012), tanto en el segmento gangliónico (control) como en el segmento agangliónico y luego se valorará la interpretación diagnóstica de la tinción entre los diferentes patólogos pediatras costarricenses.

CAPÍTULO I

MARCO CONTEXTUAL

CAPÍTULO I

1. Marco Contextual

1.1 Justificación

La enfermedad de Hirschsprung es la anomalía más común de la motilidad del tracto gastrointestinal. Los niños afectados generalmente se presentan poco tiempo después del nacimiento con signos de obstrucción intestinal baja, que si no se diagnostica y trata a tiempo puede comprometer la vida del paciente.⁵

A pesar de la aparente simplicidad anatómica de esta condición, el diagnóstico anatomopatológico de la enfermedad de Hirschsprung puede ser una experiencia estresante para el patólogo, especialmente si éste no está expuesto constantemente a estos especímenes. En la mayoría de los centros médicos como en el nuestro, el diagnóstico se basa en el análisis histopatológico de biopsias rectales en las cuales se valora únicamente mucosa y submucosa, siendo la piedra angular un hallazgo negativo, que consiste en no identificar somas de células ganglionares a pesar de un muestreo adecuado. En general estas biopsias se han abordado de dos maneras distintas, la primera, que sigue siendo la más utilizada en la mayoría de los laboratorios, es evaluar numerosos niveles de la muestra enviada con tinción de hematoxilina-eosina; la fiabilidad de este método es observador dependiente. El segundo abordaje es por medio de material congelado e histoquímica, el cual se usa principalmente en centros europeos.⁶

⁵ Kenny SE et al. Semin Pediatr Surg, 2010; 19: 194-200.

⁶ Kapur RP. Am J Clin Pathol, 2006; 126: 9-12.

Las limitaciones asociadas al abordaje con hematoxilina-eosina han impulsado esfuerzos para buscar marcadores inmunohistoquímicos que puedan simplificar este diagnóstico. Dichos marcadores deben tener una alta sensibilidad y especificidad, ser fáciles de interpretar, funcionar con biopsias incluidas en parafina y disminuir la necesidad de realizar numerosos niveles con hematoxilina-eosina en estas muestras.⁷ Muchos anticuerpos han sido estudiados y utilizados, los cuales pueden resaltar las células ganglionares pero agregan muy poco a la interpretación con la tinción de hematoxilina-eosina por un patólogo experimentado.⁸ Una excepción a esto se ha visto con el marcador calretinina, el cual se ha implementado en muchos centros como coadyuvante en el diagnóstico de enfermedad de Hirschsprung.^{9,10,11} Este estudio es la primera incursión del uso de este anticuerpo en muestras para diagnóstico de megacolon agangliónico en el Hospital Nacional de Niños.

Desde el punto de vista académico, es el primer estudio de esta índole realizado en la institución, el cual daría la base o justificación para implementar el uso de una técnica sencilla y práctica dentro de los protocolos de diagnóstico histopatológico en la enfermedad de Hirschsprung, ya que además de facilitar la interpretación histológica, también contribuiría a un mejor manejo clínico-quirúrgico de la enfermedad.

⁷ Kapur RP. Am J Clin Pathol, 2006; 126: 9-12.

⁸ Kapur RP et al. Ped Dev Pathol, 2009; 12: 6-15.

⁹ Barshack I et al. J Clin Pathol, 2004; 57: 712-716.

¹⁰ Volpe A et al. JPGN, 2013; 57: 780-787.

¹¹ Guinard-Samuel V et al. Mod Pathol, 2009; 22: 1379-1384.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo general

Determinar la interpretación y correlación diagnóstica entre los patólogos del Servicio de Patología del Hospital Nacional de Niños, al usar calretinina en las resecciones intestinales por enfermedad de Hirschsprung realizadas desde enero del 2008 hasta diciembre del 2012.

1.2.2 Objetivos específicos

1. Determinar la interpretación y correlación diagnóstica entre los patólogos pediatras del Servicio de Patología del Hospital de Niños al analizar la tinción de calretinina en resecciones intestinales por enfermedad de Hirschsprung.
2. Valorar la utilidad de la tinción de calretinina como instrumento coadyuvante a la tinción de hematoxilina-eosina, en el diagnóstico de enfermedad de Hirschsprung.
3. Caracterizar la población de pacientes a los que se les realizó resección intestinal por enfermedad de Hirschsprung recibidas y diagnosticadas en el Servicio de Patología del Hospital Nacional de Niños desde enero del año 2008 hasta diciembre del 2012.
4. Establecer una recomendación preliminar sobre el uso de calretinina con base en los datos obtenidos.

1.3 Problema

¿Cuál será la interpretación y correlación diagnóstica entre los patólogos pediatras al analizar la inmunohistoquímica de calretinina en las muestras de las resecciones intestinales realizadas por enfermedad de Hirschsprung recibidas en patología del Hospital Nacional de Niños entre enero del año 2008 y diciembre del año 2012?

1.4 Hipótesis

H1: La interpretación y correlación diagnóstica entre los patólogos pediatras al analizar la tinción de calretinina en muestras de las resecciones intestinales recibidas por enfermedad de Hirschsprung es adecuada.

H0: La interpretación y correlación diagnóstica entre los patólogos pediatras al analizar la tinción de calretinina en muestras de las resecciones intestinales recibidas por enfermedad de Hirschsprung no es adecuada.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

CAPÍTULO II

2. Marco Teórico

2.1 Generalidades

La enfermedad de Hirschsprung es una enfermedad del desarrollo que se caracteriza por la ausencia de células ganglionares en los plexos submucosos y mientéricos del intestino distal, lo cual resulta en pérdida de la peristalsis y obstrucción intestinal funcional.¹² Es la enfermedad congénita de la motilidad gastrointestinal más frecuente, con una incidencia constante en múltiples estudios demográficos de 1 caso por cada 5000 nacimientos.^{13,14} Dichas investigaciones se han concentrado más en la población caucásica, lo que podría generar diferencias interraciales que aún no han sido documentadas.¹⁵ Un ejemplo de esto fueron los resultados de una encuesta en California¹⁶, en la que se documentó una incidencia de 1 en cada 10,000 nacimientos en poblaciones hispánicas, 1 en cada 6,667 en poblaciones caucásicas, 1 en 4,761 en la población afroamericana y 1 en 3,571 en la población asiática. Esto podría deberse a la diferencia de consanguinidad entre estas poblaciones, no obstante hay estudios genéticos recientes que sugieren diferencias étnicas en la presencia de ciertas mutaciones causantes de la enfermedad de Hirschsprung.¹⁷

¹² Langer JC. *Curr Opin Pediatr* 2013; 25: 368-374.

¹³ Langer JC. *Curr Opin Pediatr* 2013; 25: 368-374.

¹⁴ Kenny SE et al. *Semin Pediatr Surg*, 2010; 19: 194-200.

¹⁵ Kenny SE et al. *Semin Pediatr Surg*, 2010; 19: 194-200.

¹⁶ Kenny SE et al. *Semin Pediatr Surg*, 2010; 19: 194-200.

¹⁷ Kenny SE et al. *Semin Pediatr Surg*, 2010; 19: 194-200.

La patogénesis de la enfermedad de Hirschsprung se relaciona directamente con el desarrollo del sistema nervioso entérico. El sistema nervioso entérico es independiente de la inervación del sistema nervioso central, lo cual tiene un fundamento a nivel celular. Actualmente se conoce que la ultraestructura del sistema nervioso entérico es diferente a la de los ganglios nerviosos simpáticos y parasimpáticos; las neuronas entéricas se encuentran rodeadas por células gliales en vez de células de Schwann, no tienen colágeno dentro de su estructura y en realidad son semejantes a otras porciones del sistema nervioso central más que al sistema nervioso periférico. Su complejidad excede la de los ganglios nerviosos periféricos, ya que los ganglios entéricos tienen múltiples circuitos e interneuronas.¹⁸

El sistema nervioso entérico se forma con la colonización del tracto gastrointestinal por células de la cresta neural, las cuales vienen de regiones ya definidas de la misma. La cresta vagal (somitas de nivel 3 a 7) produce la mayor cantidad de precursores de neuronas entéricas y de la glía que colonizarán los órganos gastrointestinales. Estas células derivadas de la cresta neural no migran de una manera uniforme, sino que corresponden a una población heterogénea que cambia progresivamente según las diferentes etapas del desarrollo embrionario. Se han descrito numerosos genes involucrados en la patogénesis de la enfermedad de Hirschsprung, entre ellos RET, GDNF, NRTN, EDNRB, EDN3, ECEL, PHOX2b, SOX10, PAX3 y SMAD1P1¹⁹, sin embargo estos sólo explican alrededor del 50% de los casos diagnosticados de la enfermedad. Además de lo anterior, la penetrancia de estos genes es en muchos casos incompleta y hay una diferencia importante en la expresión clínica de la enfermedad según el sexo de los pacientes.

¹⁸ Gershon MD et al. *Semin Pediatr Surg*, 2004; 13: 224-235.

¹⁹ Gershon MD et al. *Semin Pediatr Surg*, 2004; 13: 224-235.

Una característica de los productos implicados en el desarrollo de esta enfermedad es que todos ellos se requieren tempranamente en las etapas del desarrollo del sistema nervioso entérico. Cuando éstos se estudian en ratones con inactivación del gen, la mayoría causan prácticamente aganglionosis de todo el colon, con excepción de EDNRB, EDN3 y ECEL, que llevan únicamente a aganglionosis del colon terminal.²⁰

Muchos de estos genes han sido identificados debido a las asociaciones de la enfermedad de Hirschsprung con otros procesos patológicos.²¹ El conocimiento de estas asociaciones también es importante, ya que puede ser relevante al impartir consejo genético; esto debido a la severidad de algunas de estas enfermedades, como por ejemplo el carcinoma medular de tiroides, que forma parte del síndrome de neoplasia endocrina múltiple 2B, enfermedad grave que puede darse en conjunto con megacolon agangliónico. Una de las asociaciones más frecuentes es con el Síndrome de Down, en el que los pacientes tienen hasta 100 veces mayor riesgo de enfermedad de Hirschsprung que la población general.²²

En la mayoría de los casos la aganglionosis involucra el recto o rectosigmoides, en un 5-10% puede comprometer todo el colon y parte del intestino delgado.²³ La forma más común de presentación de la enfermedad como se anotó anteriormente es la “clásica” que involucra el recto o rectosigmoides (más del 80% de los casos corresponden a esta variante),²⁴ la cual se conoce también como enfermedad de segmento corto.²⁵

²⁰ Gershon MD et al. *Semin Pediatr Surg*, 2004; 13: 224-235.

²¹ Gershon MD et al. *Semin Pediatr Surg*, 2004; 13: 224-235.

²² Kenny SE et al. *Semin Pediatr Surg*, 2010; 19: 194-200.

²³ Langer JC. *Curr Opin Pediatr* 2013; 25: 368-374.

²⁴ Gershon MD et al. *Semin Pediatr Surg*, 2004; 13: 224-235.

²⁵ Gershon MD et al. *Semin Pediatr Surg*, 2004; 13: 224-235.

La enfermedad de Hirschsprung se puede clasificar anatómicamente de la siguiente forma: ultracorto, que involucra únicamente la porción distal del recto, segmento corto, que se describió anteriormente, segmento largo, en el que la zona de aganglionosis es proximal a la flexura esplénica y aganglionosis total del colon.²⁶ Algunos autores utilizan únicamente enfermedad de Hirschsprung de segmento corto y de segmento largo para clasificar los especímenes.²⁷

La presencia o ausencia de células ganglionares submucosas generalmente se correlaciona con el estatus de las células ganglionares en el plexo mientérico adyacente. La zona de transición entre el segmento intestinal agangliónico y el segmento con células ganglionares presentes suele ser irregular ya que las células ganglionares se pueden extender entre 2 y 3 cm más en una porción circunferencial de intestino; esto generalmente se observa en la porción antimesentérica (Ver figura 1).²⁸

Las características histológicas de la zona de transición descritas en la literatura incluyen, aganglionosis parcial circunferencial, hipoganglionosis mientérica, hiperganglionosis submucosa e hipertrofia de los nervios submucosos.²⁹ En la mayoría de los casos esta zona de transición tiene un plexo mientérico con hipoganglionosis y un plexo submucoso con muchas, pocas o un número adecuado de neuronas. La longitud de esta zona es en algunos casos difícil de determinar, lo cual se debe a que no existen estándares prácticos confiables para establecer cuál es la densidad adecuada de células ganglionares.³⁰

²⁶ Kapur RP. Semin Pediatr Surg, 2009; 18: 212-223.

²⁷ Kapur RP. Semin Pediatr Surg, 2009; 18: 212-223.

²⁸ Kapur RP. Semin Pediatr Surg, 2009; 18: 212-223.

²⁹ Kapur RP et al. Pediatr Dev Pathol. 2013; 16: 252-266.

³⁰ Kapur RP. Semin Pediatr Surg, 2009; 18: 212-223.

Los filetes nerviosos hipertróficos submucosos representan proyecciones de ganglios nerviosos extrínsecos, principalmente ganglios autónomos pélvicos. Estas proyecciones normalmente penetran la muscular externa e inervan los plexos mientérico y submucoso. Las propiedades morfológicas de los nervios extrínsecos difieren de las de los nervios intrínsecos de los plexos mientéricos y submucosos normales. Los axones y la glía de los nervios extrínsecos exhiben una disposición regular “compacta” y se encuentran mezclados con colágeno del endoneuro. Los nervios extrínsecos están rodeados por vainas de perineuro que expresan el transportador de glucosa tipo 1 (GLUT 1).³¹

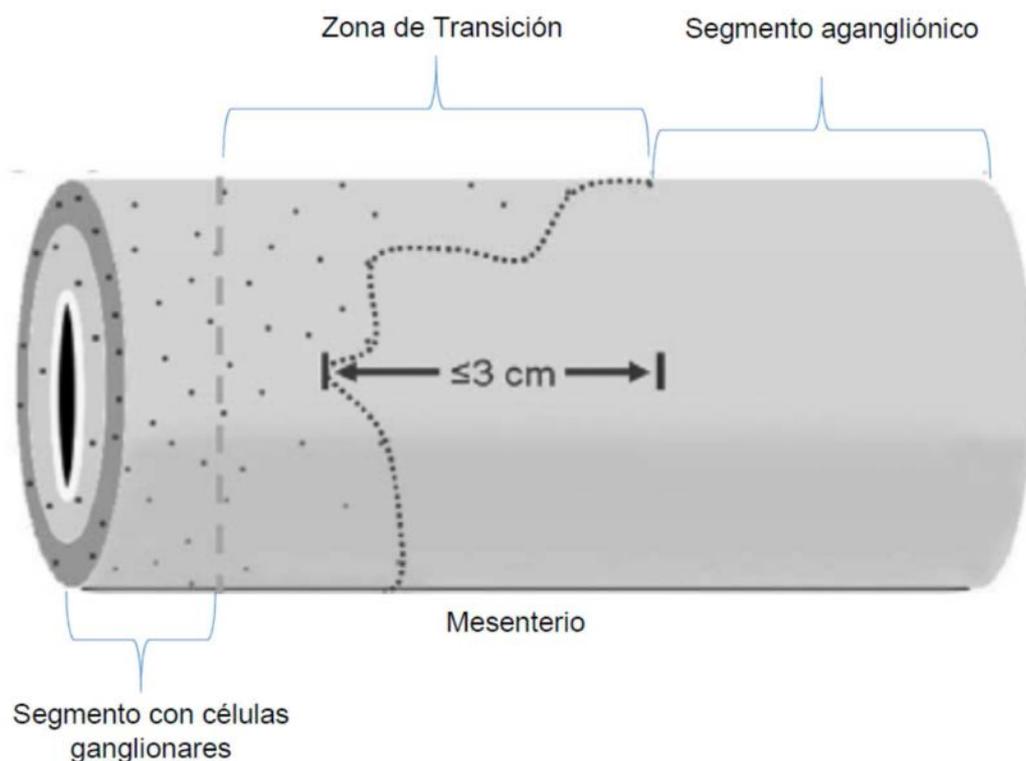


Figura 1. Ejemplo de distribución de las células ganglionares en un intestino con enfermedad de Hirschsprung³²

³¹ Kapur RP et al. *Pediatr Dev Pathol*. 2013; 16: 252-266.

³² Modificado de Kapur RP. *Semin Pediatr Surg*, 2009; 18: 212-223.

El tratamiento de la enfermedad de Hirschsprung es esencialmente quirúrgico y consiste en la resección del segmento agangliónico y la reconstrucción intestinal por medio de diferentes técnicas; siendo en la actualidad las más utilizadas, las de Swenson, Soave y Duhamel.³³ En estos procedimientos se realiza una resección de segmento agangliónico, luego un “descenso” del segmento con presencia de células ganglionares y por último una anastomosis termino-terminal del intestino inervado (gangliónico) con el intestino remanente en el margen anal.³⁴

García y colaboradores³⁵ publicaron un estudio de 87 pacientes operados por enfermedad de Hirschsprung en el Hospital Nacional de Niños de Costa Rica, en el período comprendido entre el 2000 y el 2010. En el mismo se identificó una relación hombre-mujer de 4:1, la mayoría de los casos se presentaron en recién nacidos de término (edad de inicio en el 78% fue de menos de 1 mes). Los síntomas de presentación más frecuentes fueron distensión abdominal y vómitos biliosos. En cuanto a las cirugías realizadas, en el 35 % de los pacientes se utilizó la técnica del descenso endorrectal transanal y en el 48%, la de Duhamel. La conclusión principal de este estudio fue que las características clínicas y epidemiológicas de los casos de enfermedad de Hirschsprung en la población de pacientes del Hospital Nacional de Niños eran muy similares a las descritas en la literatura.

En este estudio de García y colaboradores, la complicación postoperatoria más frecuente en el grupo al que se le practicó la cirugía tipo descenso endorrectal transanal fue la enterocolitis (14 de 19 casos), mientras que en el grupo de

³³ Langer JC. *Curr Opin Pediatr* 2013; 25: 368-374.

³⁴ Kenny SE et al. *Semin Pediatr Surg*, 2010; 19: 194-200.

³⁵ García-Arias F et al. *Acta méd. Costarric*, 2013; 55: 87-91.

pacientes a los que se les realizó la cirugía de Duhamel fue el tabique rectal (8 de 21 casos). Con estos datos se llegó a la conclusión de que las complicaciones postoperatorias y la morbilidad fueron similares para ambas técnicas quirúrgicas.³⁶

Alrededor de un 10-15% de los pacientes continuaron con síntomas obstructivos luego de la cirugía, que incluyeron constipación y/o enterocolitis recurrente; una explicación para este fenómeno fue un descenso fallido, en el cual se anastomosó la zona de transición o sea la anastomosis de un segmento con presencia de células ganglionares que tiene una neuroanatomía anormal.³⁷

2.2. Patología de la Enfermedad de Hirschsprung

2.2.1 Biopsias rectales

Las biopsias rectales son el procedimiento más utilizado para el diagnóstico de la enfermedad de Hirschsprung. Su uso para el diagnóstico de esta entidad se basa en el precepto de que las células ganglionares submucosas se encuentran invariablemente ausentes en el recto distal de los pacientes con la enfermedad y en que este fenotipo submucoso tiene correlación a su vez con ausencia de las células ganglionares mientéricas. Tanto en neonatos como en infantes, el método preferido actualmente es la biopsia rectal por succión, principalmente en los centros hospitalarios de países desarrollados, donde se cuenta con pistola para la toma de las mismas, con la cual se obtiene material adecuado y con una morbilidad mínima; conforme aumenta la edad de los niños, este procedimiento tiende a generar muestras inadecuadas para diagnóstico, probablemente por el aumento en el tejido conectivo submucoso, por lo que en

³⁶ García-Arias F et al. Acta méd. Costarric, 2013; 55: 87-91.

³⁷ Kapur RP et al. Pediatr Dev Pathol. 2013; 16: 252-266.

estos grupos etarios lo ideal es la toma de una muestra que incluya submucosa con fórceps o pinzas.³⁸

Para excluir el diagnóstico de enfermedad de Hirschsprung, los cirujanos deben tomar la biopsia rectal a dos o tres centímetros por encima de la línea pectínea, ya que numerosos estudios han demostrado que en los dos centímetros distales del recto es usual encontrar pocas o ninguna célula ganglionar. En la práctica, si la biopsia es de un grosor adecuado y se le realizan numerosos niveles, en aquellos pacientes que no tienen la enfermedad sí se puede observar un número adecuado de células ganglionares, aún en estos dos centímetros distales, sin embargo esta práctica no es muy recomendada, ya que en algunos casos son necesarios hasta 100 niveles de una misma muestra para evidenciar una célula ganglionar con morfología interpretable.³⁹

La mayoría de los autores recomiendan un mínimo de dos muestras para un diagnóstico adecuado, sin embargo algunos insisten en un muestreo mayor, otros grupos de expertos incluso proponen la toma de muestras a 1, 2 y 3 cm de la línea pectínea para evitar subdiagnóstico.⁴⁰ En el Hospital Nacional de Niños por lo general el cirujano envía una única muestra para descartar esta entidad. Una pequeña porción (aproximadamente un octavo) de la circunferencia del recto puede tener ausencia de células ganglionares submucosas, no así mientéricas; por ello, la literatura recomienda que se tomen muestras de al menos dos zonas de la circunferencia rectal.⁴¹

³⁸ Kapur RP. Semin Pediatr Surg, 2009; 18: 212-223.

³⁹ Kapur RP. Semin Pediatr Surg, 2009; 18: 212-223.

⁴⁰ Kapur RP. Semin Pediatr Surg, 2009; 18: 212-223.

⁴¹ Collins MH et al. Pediatr Dev Pathol. 2013; 16: 235-236.

En patología se descarta la enfermedad de Hirschsprung al encontrar una o más células ganglionares en la submucosa de una biopsia rectal distal. De no encontrarse células ganglionares, el hallazgo de filetes nerviosos hipertróficos apoya aún más el diagnóstico, el cual sigue siendo clínico, ya que el reporte patológico incluye la presencia o ausencia de células ganglionares y el diagnóstico definitivo debe realizarlo el médico cirujano tratante interpretando la clínica del paciente junto con los hallazgos radiológicos y patológicos.⁴²

La biopsia diagnóstica debe tener un mínimo de 3 mm de diámetro y al menos un tercio de la muestra debe corresponder a submucosa. Con una orientación adecuada y un número suficiente de niveles (50-75), la tinción de hematoxilina-eosina generalmente es suficiente para excluir o no la presencia de células ganglionares. Desafortunadamente muchas biopsias son subóptimas, debido a una cantidad insuficiente de submucosa, artefacto de toma de la muestra por compresión o ambos. Muchas series publicadas sobre biopsia rectal por succión presentan porcentajes de muestras inadecuadas hasta de un 10 y un 20%.⁴³

La fiabilidad de este método diagnóstico depende de la habilidad del observador para distinguir una célula ganglionar en base a su apariencia con la tinción de hematoxilina-eosina.⁴⁴ Lo anterior requiere de experiencia, la cual se obtiene únicamente en centros eminentemente pediátricos que reciben frecuentemente este tipo de material quirúrgico, como es el caso del Hospital Nacional de Niños. Otra posible complicación surge en el caso de los neonatos, en los cuales la apariencia indiferenciada y no neuronal de las células ganglionares “inmaduras”, en especial en los prematuros, puede dificultar la evaluación de las

⁴² Kapur RP. Semin Pediatr Surg, 2009; 18: 212-223.

⁴³ Kapur RP. Semin Pediatr Surg, 2009; 18: 212-223

⁴⁴ Kapur RP. Am J Clin Pathol, 2006; 126: 9-12.

biopsias con solo la tinción de hematoxilina-eosina. El principal reto para el patólogo es excluir la presencia de una célula ganglionar en una muestra en la que pueden existir sólo unas pocas; al final el patólogo debe confiar en su habilidad para reconocer las células ganglionares, en el contexto de filetes nerviosos hipertróficos en la submucosa e inervación anormal de la mucosa.⁴⁵

En el período comprendido entre enero del 2008 y diciembre del 2012, el Servicio de Patología recibió un total de 278 biopsias rectales para descartar enfermedad de Hirschsprung, lo cual recalca la frecuencia e importancia de este diagnóstico en la población pediátrica costarricense.

Las biopsias por congelación intraoperatorias durante las cirugías de descenso son importantes en la terapéutica de los pacientes con enfermedad de Hirschsprung. Estas se utilizan para identificar el colon normal gangliónico que debe ser anastomosado para la recuperación de la motilidad colónica normal. Las muestras evaluadas transoperatoriamente deben incluir dentro de su reporte, la evaluación del grosor, densidad de los filetes nerviosos y la presencia de aganglionosis parcial circunferencial e hipoganglionosis severa, ya que generalmente estos hallazgos se encuentran confinados a la porción distal de la zona de transición. Esto implicaría que la identificación de estos hallazgos morfológicos en una biopsia por congelación, pueden significar un “descenso fallido” o descenso en la zona de transición.⁴⁶

La evaluación intraoperatoria de presencia o no de células ganglionares debe realizarse idealmente en una “dona”, o sea, una sección transmural de la circunferencia completa de la pared intestinal, ya que algunas características se

⁴⁵ Kapur RP. Am J Clin Pathol, 2006; 126: 9-12.

⁴⁶ Kapur RP. Semin Pediatr Surg, 2009; 18: 212-223.

reconocen mejor en la submucosa que en el plexo mientérico.⁴⁷ Algunos autores recomiendan no realizar una única cirugía de descenso, para valorar mejor la presencia de células ganglionares en la biopsia definitiva y no en la congelación.⁴⁸

2.2.2 Histoquímica para Enfermedad de Hirschsprung

Algunos autores defienden el uso de histoquímica en la enfermedad de Hirschsprung e incluso han propuesto que este método es superior a la hematoxilina-eosina, al igual que la inmunohistoquímica para el diagnóstico de ésta y otras disganglionesis.⁴⁹ Este método se utiliza principalmente en centros europeos y los marcadores más utilizados son la acetilcolinesterasa (AChE) y la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato diaforasa (NADPH-d); los europeos justifican su uso porque en algunos casos se dificulta el diagnóstico utilizando únicamente hematoxilina-eosina y muchos autores incluso plantean una duda: ¿Cuál es la cantidad de submucosa que debe ser evaluada para reportar una biopsia con ausencia de células ganglionares?; además anotan que las células ganglionares submucosas son más difíciles de valorar que las del plexo mientérico, por estar más dispersas y ser más escasas.⁵⁰

La tinción de histoquímica más utilizada es la acetilcolinesterasa; su utilidad se basa en el principio de que la densidad y el grosor de las fibras nerviosas (las cuales son positivas para este marcador), son usualmente mayores en los

⁴⁷ Collins MH et al. *Pediatr Dev Pathol*. 2013; 16: 235-236.

⁴⁸ Rouzrokh M et al. *Iran J Pediatr* 2011; 21: 72-76.

⁴⁹ Montedonico S et al. *Pediatr Surg Int*, 2008; 24:785–792

⁵⁰ Montedonico S et al. *Pediatr Surg Int*, 2008; 24:785–792

segmentos agangliónicos de los pacientes con enfermedad de Hirschsprung.⁵¹ Meier-Ruge y colaboradores⁵² describieron por primera vez este método en biopsias por succión rectales; posteriormente otros autores reportaron una modificación al proceso, al añadir que la acetilcolinesterasa teñía las fibras colinérgicas casi negras, lo cual hace que sean fácilmente distinguibles.⁵³

En las biopsias de pacientes sanos, se observa muy poca actividad de AChE en la lámina propia y en la muscular de la mucosa, mientras que los ganglios submucosos se tiñen fuertemente con esta tinción. En los pacientes con enfermedad de Hirschsprung hay un aumento marcado en la actividad del marcador en la lámina propia y en la muscular de la mucosa, lo cual es evidente ya que las fibras colinérgicas se marcan con un espectro de tinción que va desde café oscuro a negro.⁵⁴

La tinción de AChE requiere de tejido congelado, o sea, es necesaria una muestra rectal adicional, ya que muchos laboratorios utilizan este método como un complemento al diagnóstico con hematoxilina-eosina (H&E). La mayoría de los expertos concuerdan en que el realizar esta tinción no evita al patólogo tener que buscar células ganglionares en numerosos niveles de hematoxilina-eosina, ya que un patrón de tinción similar al observado en Hirschsprung con AChE, se puede ver también en otras condiciones.⁵⁵

Los patrones valorables con esta tinción en enfermedad de Hirschsprung son cualitativos y cuantitativos, pero no absolutos; se requiere de experiencia en

⁵¹ Kapur RP et al. *Pediatr Dev Pathol*. 2009; 12(1):6-15.

⁵² Meier-Ruge W et al, *J Pediatr Surg*.1972; 7:11-16.

⁵³ Montedonico S et al. *Pediatr Surg Int*, 2008; 24:785–792

⁵⁴ Montedonico S et al. *Pediatr Surg Int*, 2008; 24:785–792

⁵⁵ Kapur RP. *Am J Clin Pathol*, 2006; 126: 9-12.

reconocer el patrón y el reporte puede estar influenciado por un manejo inadecuado del tejido, lo mismo que por la calidad de la tinción. La AChE no es utilizada generalmente en otros contextos clínicos, por lo que por esta y las otras razones expuestas anteriormente, la tinción no suele estar disponible en todos los laboratorios de patología.⁵⁶ La especificidad de la tinción positiva puede ser hasta de un 100%, pero la sensibilidad de este método es tan baja como de un 85%, lo cual implica muchos resultados falsos negativos.⁵⁷ La mayoría de los autores abogan por el uso de paneles combinados de inmunohistoquímica e histoquímica.⁵⁸

2.2.3 Inmunohistoquímica para Enfermedad de Hirschsprung: otros anticuerpos y estudios preliminares

A pesar de un gran número de estudios que habían sido dedicados a patrones de tinción de varios anticuerpos neurales y no neurales en la enfermedad de Hirschsprung, no se había determinado que un anticuerpo o un panel de anticuerpos tuvieran las características deseadas del marcador inmunohistoquímico ideal, como ya se mencionó en la justificación del presente estudio. La inmunohistoquímica no había recibido luz verde en todos los centros y seguía sin tener aceptación general en el diagnóstico de rutina de la enfermedad de Hirschsprung. Estas limitantes surgieron principalmente debido a las propiedades de los antígenos que habían sido estudiados, pero también por limitaciones en el diseño de los estudios en los cuales eran utilizados. La mayoría de los antígenos con distribución alterada en los pacientes con enfermedad de Hirschsprung se pueden observar en la tabla 1.⁵⁹

⁵⁶ Kapur RP et al. *Pediatr Dev Pathol*, 2009; 12(1):6-15.

⁵⁷ Holland SK et al. *Ann Diagn Pathol*, 2011; 15(5):323-8.

⁵⁸ de Arruda Lourenção PL et al. *Ann Diagn Pathol*. 2013; 17(4):352-6.

⁵⁹ Kapur RP. *Am J Clin Pathol*, 2006; 126: 9-12.

Tabla 1. Antígenos utilizados en enfermedad de Hirschsprung⁶⁰

Tipo de inmunoreactividad	Antígeno	Valor diagnóstico propuesto
Cuerpos de células ganglionares	RET	“una combinación de H&E con IHQ para RET es un método óptimo para evaluar especímenes de EH”
	BMPR 1A	“no identifica células ganglionares no vistas en H&E, pero si facilita su identificación”
	bcl 2	“puede servir como marcador adicional en EH”
Cuerpos neurales intrínsecos y extrínsecos y nervios	NSE	“Tinción de NSE y S100 es útil, principalmente cuando no hay tejido fresco para realizar histoquímica para AchE”
Nervios extrínsecos e intrínsecos	S100	Ver NSE
	MAP-5	“es útil en EH”
Nervios extrínsecos	GLUT-1	“puede ser un indicador útil en EH”
	GFAP	“puede ser de excelente valor diagnóstico en EH”
Nervios intrínsecos (reducidos o ausentes en EH)	HPC-1/Sintaxina 1A	“no fue reconocida tinción en el segmento agangliónico”
	nNOS	“puede tener un rol conjunto a la tinción de AchE en casos equívocos”
	NGFR	“100% de fiabilidad diagnóstica, especialmente en recién nacidos”
	SVP-38 kD	“IHQ en la lámina propia puede diferenciar entre colon agangliónico y colon normal”

BMPR 1A: proteína morfogénica del hueso 1A; GFAP: proteína glial ácida fibrilar; GLUT-1: transportador de glucosa tipo 1; IHQ: inmunohistoquímica; MAP-5: proteína asociada a microtúbulos 5, NGFR: receptor del factor de crecimiento nervioso; nNOS: sintasa de óxido nítrico neuronal; NSE: enolasa neuronal específica; SVP-38: proteína de vesícula sináptica 38.

Aquellos anticuerpos que tiñen el cuerpo neuronal podrían resaltar células ganglionares que fueran difíciles de identificar. Los estudios que recomiendan el

⁶⁰ Modificado de Kapur RP. Am J Clin Pathol, 2006; 126: 9-12.

uso de este tipo de marcadores resaltan la dificultad de interpretación de la H&E en algunos casos, principalmente aquellos en los cuales las células ganglionares son inmaduras. Estos anticuerpos sin embargo no eliminan la necesidad de evaluar numerosos niveles de H&E.⁶¹

Karim y colaboradores⁶² propusieron el uso de uno de ellos, el anticuerpo contra la oncoproteína RET, el cual es un protooncogen compuesto por un receptor transmembrana de 114 amino ácidos, que se expresa en el sistema nervioso central y periférico durante el desarrollo; este gen pierde su expresión en los pacientes con enfermedad de Hirschsprung. El RET se expresa en los ganglios del colon normal y en los segmentos con presencia de células ganglionares de los pacientes con enfermedad de Hirschsprung. Los autores defienden que el uso del marcaje con RET es menos engorroso que el uso de AChE,⁶³ sin embargo la utilización de cualquier marcador inmunohistoquímico también lo sería. Expertos en el tema han cuestionado el diseño de este estudio y han anotado que los datos existentes son insuficientes para determinar si el uso de RET tiene mejor sensibilidad que la valoración de numerosos niveles de H&E.⁶⁴

Cuando los reactantes marcan tanto las células ganglionares como los nervios (NSE), el marcaje de los nervios puede obscurecer el de los cuerpos de las células ganglionares. Aquellos marcadores genéricos que marcan únicamente los nervios (S100) son defendidos por algunos autores ya que su marcaje resalta los cuerpos neuronales, lo cuales no teñirían con este marcador. Los

⁶¹ Kapur RP. Am J Clin Pathol, 2006; 126: 9-12.

⁶² Karim S et al. Am J Clin Pathol. 2006; 126(1):49-54.

⁶³ Karim S et al. Am J Clin Pathol. 2006; 126(1):49-54.

⁶⁴ Kapur RP. Am J Clin Pathol, 2006; 126: 9-12.

expertos en el tema indican que ninguno de estos marcadores ofrecen una ventaja significativa sobre la H&E.⁶⁵

Otros antígenos como el NGFR y el GLUT 1 pueden discriminar entre la inervación intrínseca y extrínseca, por medio del marcaje del perineuro de estas últimas. Sin embargo, en los estudios disponibles publicados estos no marcan las ramificaciones delgadas en la mucosa, por lo que no ofrecen algo más que no sea evidente en H&E.

2.3 Calretinina en el diagnóstico de Enfermedad de Hirschsprung

2.3.1 Calretinina

La calretinina es una proteína ligadora del calcio intracelular dependiente de vitamina D.⁶⁶ Ha sido descrita en una variedad de células incluyendo neuronas, nervios periféricos de la piel y de otros órganos, células productoras de esteroides, células de los túbulos contorneados renales, glándulas ecrinas, células queratinizadas tímicas y células mesoteliales, entre otras. Esta proteína es un miembro de la familia de los factores de elongación y se cree que juega un papel en el ciclo celular. Fue aislada por primera vez de tejidos del sistema nervioso central, su masa atómica oscila entre 29 y 32 kD. Ha habido diferencias en los resultados de las tinciones dependiendo del anticuerpo utilizado, algunos autores reportan mayor especificidad con las clonas de Zymed®.⁶⁷

⁶⁵ Kapur RP. Am J Clin Pathol, 2006; 126: 9-12.

⁶⁶ Morris MI et al. J Pediatr Surg. 2013; 48(5):1037-43.

⁶⁷ En: Dabbs DJ, editor. Diagnostic Immunohistochemistry. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2010. p. 206-255.

Gotzos y colegas⁶⁸ fueron los primeros en reportar su expresión en los mesoteliomas epitelioides y en los componentes epitelioides de los mesoteliomas mixtos, comparándolos con resultados negativos de la tinción en adenocarcinomas pulmonares. Estos resultados fueron confirmados posteriormente por Doglioni⁶⁹ y su grupo, los cuales demostraron la positividad de la tinción de inmunohistoquímica para calretinina en todos los 44 mesoteliomas de su muestra, con poca tinción en varios adenocarcinomas control y tinción focal del 23% de los adenocarcinomas pulmonares.

La sensibilidad de la calretinina para distinguir células mesoteliales reactivas de células de adenocarcinoma es del 100%, y su especificidad del 80%; la interpretación de este marcador es menos compleja y muestra un marcaje fuerte tanto nuclear como citoplasmático. Entre un 10 y un 30% de los adenocarcinomas muestran tinción para calretinina, sin embargo el patrón observado en estas células es focal, menos intenso y en ocasiones únicamente se obtiene una tinción débil citoplasmática.⁷⁰

La intensidad y la proporción de células inmunoreactivas para calretinina es mayor en células mesoteliales reactivas al compararlas con los mesoteliomas malignos (92% versus 88%). En un estudio reciente por Yaziji y asociados⁷¹, la calretinina fue uno de los tres anticuerpos (junto con BGC 8 y MOC 31) que se

⁶⁸ En: Dabbs DJ, editor. Diagnostic Immunohistochemistry. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2010. p. 206-255.

⁶⁹ En: Dabbs DJ, editor. Diagnostic Immunohistochemistry. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2010. p. 206-255.

⁷⁰ En: Dabbs DJ, editor. Diagnostic Immunohistochemistry. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2010. p. 206-255.

⁷¹ En: Dabbs DJ, editor. Diagnostic Immunohistochemistry. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2010. p. 206-255.

identificaron en un panel de 12 anticuerpos como los más eficientes para distinguir un mesotelioma epiteliode de un adenocarcinoma. Actualmente es uno de los marcadores más utilizados para mesotelioma; en estos tumores la tinción es tanto citoplasmática como nuclear y la tinción nuclear es necesaria para la especificidad en mesotelioma.

La calretinina también tiñe células cebadas, schwannomas, tumores de células granulares, células adrenocorticales y es de particular interés para los patólogos que estudian el tracto genital femenino, ya que se utiliza en el diagnóstico diferencial de los tumores de los cordones sexuales y estromales del ovario. La calretinina tiñe un rango más amplio de tumores de los cordones sexuales y estromales que la inhibina, y tiene más sensibilidad pero menos especificidad que la misma en estas neoplasias.⁷²

El control recomendado para esta tinción es apéndice o colon sano, en el cual los nervios periféricos tiñen fuerte núcleo y citoplasma, las células ganglionares de fuerte a moderado y los axones de leve a moderado. Los macrófagos periféricos tienen también tinción nuclear y citoplásmica; no debe verse tinción en las células epiteliales.⁷³

2.3.2 Calretinina en Enfermedad de Hirschsprung

Barshack y colaboradores⁷⁴ fueron los primeros en describir los patrones de tinción para calretinina en enfermedad de Hirschsprung. Para ello, utilizaron diez especímenes de resección intestinal con este diagnóstico, de los cuales

⁷² En: Dabbs DJ, editor. Diagnostic Immunohistochemistry. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2010. p. 206-255.

⁷³ www.e-immunohistochemistry.info

⁷⁴ Barshack et al. J Clin Pathol. 2004; 57(7):712-6

muestrearon tanto la zona gangliónica (presencia de células ganglionares), como la zona agangliónica (ausencia de células ganglionares) y la zona de transición. Las muestras que se incluyeron en este estudio eran de espesor completo de la pared intestinal, incluyendo tanto el plexo submucoso como el mientérico. En los especímenes de la zona gangliónica de resección más del 80% de las células ganglionares fueron positivas para calretinina en ambos plexos; las células de Schwann y las fibras nerviosas también presentaron inmunoreacción. En los segmentos agangliónicos la tinción de inmunohistoquímica fue negativa por ausencia de células ganglionares, lo mismo que en las fibras nerviosas. La conclusión principal de este primer estudio fue que la ausencia de expresión de la calretinina puede funcionar como ayuda diagnóstica para identificar los segmentos agangliónicos en la enfermedad de Hirschsprung.

Posteriormente en la Universidad de Washington y el Hospital de Niños de Seattle, Kapur y colegas⁷⁵ en el 2009, investigaron los patrones de tinción inmunohistoquímica para calretinina en el material más utilizado a nivel mundial para el diagnóstico de enfermedad de Hirschsprung, esto es, en biopsias por succión rectales. En este estudio compararon los patrones de tinción obtenidos en pacientes con y sin enfermedad de Hirschsprung, además se realizó una comparación del valor diagnóstico de la calretinina con el de la acetilcolinesterasa, un método ya validado y de uso frecuente en Europa.

Las biopsias por succión rectales que tenían células ganglionares presentaron pequeños nervios en la lámina propia, muscular de mucosa y submucosa superficial con tinción positiva para calretinina, en un patrón que formaba agregados granulares. En las biopsias agangliónicas de los pacientes con

⁷⁵ Kapur et al. *Pediatr Dev Pathol.* 2009; 12(1):6-15.

enfermedad de Hirschsprung la tinción de estas fibras nerviosas se encontraba completamente ausente.⁷⁶

Numerosos observadores revisaron de manera independiente las tinciones tanto de inmunohistoquímica para calretinina como de histoquímica para acetilcolinesterasa de 14 pacientes con enfermedad de Hirschsprung y de 17 controles de pacientes sanos. Cinco observadores, cegados al diagnóstico correcto por hematoxilina-eosina de las muestras, reportaron cada inmunohistoquímica para calretinina y cada tinción de acetilcolinesterasa como enfermedad de Hirschsprung (tinción negativa), sin enfermedad de Hirschsprung (tinción positiva) o equívocas. Se compararon las discrepancias mayores y menores en los diagnósticos; la inmunohistoquímica para calretinina no mostró diagnósticos equívocos o discrepancias entre los observadores, por el contrario, dos diagnósticos equívocos y más desacuerdos se presentaron entre los observadores al valorar la tinción con acetilcolinesterasa. Estos autores concluyen que la calretinina impresiona ser una alternativa razonable y potencialmente superior a la acetilcolinesterasa, como método diagnóstico adjunto para la evaluación de biopsias rectales por succión en la enfermedad de Hirschsprung.⁷⁷

En ese mismo año, Guinard-Samuel y su grupo⁷⁸ en Francia realizaron un estudio retrospectivo de 131 biopsias por succión rectales que se tomaron por sospecha de enfermedad de Hirschsprung en un período de quince años. El estándar que utilizaron para probar la validez del diagnóstico original fue la resección en los pacientes con la enfermedad (n = 54) y el seguimiento clínico en los pacientes que se determinó por biopsia que no tenían la enfermedad (n = 77).

⁷⁶ Kapur et al. *Pediatr Dev Pathol.* 2009; 12(1):6-15.

⁷⁷ Kapur et al. *Pediatr Dev Pathol.* 2009; 12(1):6-15.

⁷⁸ Guinard-Samuel et al. *Mod Pathol.* 2009; 22(10):1379-84.

En estos pacientes se realizó la tinción de calretinina en biopsias incluidas en parafina. Cuando no se observaba tinción, la biopsia se diagnosticó como enfermedad de Hirschsprung. Estos resultados se compararon con la metodología estándar utilizada en ese laboratorio, la cual era semejante a la usada en la mayoría de los laboratorios europeos, que es el uso de histología con hematoxilina-eosina y tinción histoquímica para acetilcolinesterasa. De las 131 biopsias, 130 fueron diagnosticadas adecuadamente con base en la positividad o negatividad de la tinción de calretinina. Los patólogos experimentados (dividieron el grupo en patólogos “senior” y patólogos “junior”, siendo los “senior” los más experimentados) identificaron todos los casos de enfermedad de Hirschsprung sin falsos positivos y además se demostró la facilidad de la interpretación de la tinción de calretinina comparada con la acetilcolinesterasa para los patólogos con menos experiencia.⁷⁹

En este estudio doce casos que originalmente se habían considerado como dudosos por enfermedad de Hirschsprung usando los métodos tradicionales, se diagnosticaron correctamente al usar la tinción de calretinina. Sólo se reportó un falso negativo, un caso de enfermedad de Hirschsprung que presentó una biopsia con tinción de calretinina positiva.⁸⁰

Estos autores concluyen que la tinción de inmunohistoquímica para calretinina supera la mayoría de las dificultades encontradas usando la combinación de tinciones de histología y acetilcolinesterasa y que detecta con confianza la mayoría de los casos de enfermedad de Hirschsprung, sin falsos positivos. Proponen a la vez que la calretinina es superior a la acetilcolinesterasa para

⁷⁹ Guinard-Samuel et al. *Mod Pathol.* 2009; 22(10):1379-84.

⁸⁰ Guinard-Samuel et al. *Mod Pathol.* 2009; 22(10):1379-84.

complementar la histología con hematoxilina eosina, y que podría sustituir a la acetilcolinesterasa de una manera ventajosa.⁸¹

Holland y colaboradores⁸² en un estudio de casos y controles de pacientes con Hirschsprung versus pacientes con inervación colónica normal demostraron un índice de correlación kappa adecuado entre sus patólogos ($\kappa = 0.858$), una especificidad del 83% (95% CI, 0.60-0.94) y una sensibilidad del 100% (95% CI, 0.82-1) al clasificar a los pacientes en una u otra categoría usando la tinción de calretinina.

La positividad típica en los pacientes sanos de esta serie consistió en una tinción granular intensa de las fibrillas nerviosas en la submucosa superior y en la lámina propia de la mucosa colónica. Se observó variabilidad en la intensidad de la tinción, desde débil a muy fuerte; por lo que fue necesaria siempre una evaluación a alto poder de las láminas para identificar fibras nerviosas con tinción débil. La tinción en las células ganglionares, cuando estaba presente, mostraba en la mayoría de los casos depósito del cromógeno en el citoplasma y el núcleo. Algunos de los pacientes con enfermedad de Hirschsprung presentaron marcaje en células no neurales, que probablemente correspondían a células cebadas o histiocitos. Todos los casos de enfermedad de Hirschsprung fueron negativos para la tinción en células ganglionares (ausentes) y en las fibras nerviosas intrínsecas. Se observó tinción positiva en algunos filetes hipertróficos extrínsecos típicos de enfermedad de Hirschsprung, sin embargo estos no deben ser valorados al interpretar esta tinción para el diagnóstico de aganglionosis.⁸³

⁸¹ Guinard-Samuel et al. *Mod Pathol*. 2009; 22(10):1379-84.

⁸² Holland SK et al. *Ann Diagn Pathol*. 2011; 15(5):323-8.

⁸³ Holland SK et al. *Ann Diagn Pathol*. 2011; 15(5):323-8.

Como conclusión, los autores proponen que la inmunohistoquímica para calretinina es útil, importante y reproducible para la evaluación de las biopsias rectales por succión. En la experiencia de este grupo, el identificar fibras nerviosas intrínsecas con calretinina podría eliminar la necesidad de considerar una muestra como inadecuada en casos que tienen apariencia histológica similar a la zona agangliónica fisiológica (a menos de 3 cm de la línea pectínea). Además, en algunas biopsias superficiales que usualmente se considerarían inadecuadas para diagnóstico, una tinción ausente para calretinina puede sugerir el diagnóstico de enfermedad de Hirschsprung y una tinción positiva sería un argumento en contra del mismo. Anotan a su vez que en ciertas ocasiones la tinción puede ser positiva en pacientes con enfermedad de Hirschsprung y que puede ser negativa en pacientes sin enfermedad de Hirschsprung, por lo que la interpretación de la tinción debe ser valorada en el contexto de cada caso.⁸⁴

Varios autores posteriormente probaron la efectividad de la calretinina en especímenes de biopsias de espesor total de pared colónica, de biopsias por succión rectal y en resecciones por enfermedad de Hirschsprung.^{85,86,87} Entre estos vale la pena resaltar el estudio por Alexandrescu y colaboradores en la Universidad de Texas, ya que éste fue el primero en describir el patrón de tinción de calretinina en la zona de transición.⁸⁸ La tinción característica para la zona de transición se describió como positividad leve en los filetes nerviosos gruesos, ausencia de células ganglionares y fibrillas nerviosas mucosas y submucosas positivas para calretinina.

⁸⁴ Holland SK et al. *Ann Diagn Pathol*. 2011; 15(5):323-8.

⁸⁵ Hiradfar M et al. *Iran J Basic Med Sci*. 2012; 15(5):1053-9.

⁸⁶ Kannaiyan L et al. *J Indian Assoc Pediatr Surg*. 2013; 18(2):66-8.

⁸⁷ Alexandrescu S et al. *Int J Clin Exp Pathol*. 2013; 6(12):2955-61.

⁸⁸ Alexandrescu S et al. *Int J Clin Exp Pathol*. 2013; 6(12):2955-61.

Uno de los retos más importantes de la enfermedad de Hirschsprung es cuando considerar una biopsia por succión rectal como inadecuada para diagnóstico. En la literatura se reporta que al menos un 17% de las biopsias realizadas para la evaluación del megacolon agangliónico se consideran como material insuficiente o inadecuado para el diagnóstico.⁸⁹ En la mayoría de estos casos las biopsias tienen muy poca submucosa evaluable o son tomadas a menos de 3 cm sobre la línea pectínea, en la zona de transición entre mucosa anal y rectal.

Gonzalo y colaboradores⁹⁰ trataron de abordar esta problemática, en un estudio retrospectivo de todas las biopsias consideradas como inadecuadas en doce años en la Clínica de Cleveland, Ohio. Se identificaron diecisiete casos y posteriormente se requirió de seguimiento clínico o nuevo abordaje quirúrgico en estos pacientes. A todos los casos en los que se identificó epitelio cilíndrico simple, o sea que al menos tenían una porción rectal y no exclusivamente mucosa anal, se les realizó la tinción de inmunohistoquímica para calretinina, sin conocimiento del resultado final de cada caso desde el punto de vista clínico patológico.

Todos los doce pacientes que posteriormente se documentó que no tenían enfermedad de Hirschsprung presentaban fibras nerviosas en la lámina propia o en la muscular de la mucosa, positivas para calretinina. Los cinco pacientes en los cuales se realizó el diagnóstico de enfermedad de Hirschsprung luego de una nueva biopsia o resección quirúrgica no tenían tinción de calretinina positiva en las fibras nerviosas de los especímenes que habían sido

⁸⁹ Gonzalo DH. Arch Pathol Lab Med. 2013; 137(8):1099-102.

⁹⁰ Gonzalo DH. Arch Pathol Lab Med. 2013; 137(8):1099-102.

considerados como inadecuados. Los autores concluyeron que la calretinina predijo el desenlace clínico en todos los casos.⁹¹

Este grupo propone que a pesar de que el “*gold*” estándar para el diagnóstico de la enfermedad continua siendo la ausencia de células ganglionares en una muestra con suficiente submucosa, la tinción de inmunohistoquímica para calretinina es muy útil en el abordaje posterior de los pacientes en los que la primera muestra se consideró inadecuada aunado a la sospecha clínica de megacolon agangliónico.⁹²

Otras dificultades que se presentan en el diagnóstico son con especímenes de aganglionosis total del colon y biopsias de pacientes prematuros; Morris y colegas en la Universidad de Montreal abordaron estos obstáculos usando calretinina.⁹³ En este estudio ellos revisaron los 199 casos diagnosticados como megacolon agangliónico desde 1985 hasta el 2010 en el Centro Hospitalario Saint Justine en Montreal. Del total, 17 pacientes presentaban aganglionosis total del colon, en los cuales se pudo estudiar la pared colónica completa hasta la válvula ileocecal.

La investigación también incluyó un componente prospectivo, donde se revisaron todas las colectomías parciales por megacolon agangliónico realizadas en ese mismo centro entre el año 2010 y el 2012 (n = 5) para estudiar la tinción en el segmento normal, zona de transición y en el segmento agangliónico de todo el espécimen. Se valoraron también todas las biopsias por succión rectal realizadas por sospecha de enfermedad de Hirschsprung, en total 25, de las cuales 7 confirmaron el diagnóstico y 18 lo descartaron. Por último,

⁹¹ Gonzalo DH. Arch Pathol Lab Med. 2013; 137(8):1099-102.

⁹² Gonzalo DH. Arch Pathol Lab Med. 2013; 137(8):1099-102.

⁹³ Morris MI et al. J Pediatr Surg. 2013; 48(5):1037-43.

agregaron además muestras intestinales y rectales de cuatro fetos producto de terminación de embarazo, cuyas edades gestacionales oscilaban entre las 22 y 26 semanas.⁹⁴

En el 35% de los pacientes con aganglioneosis total el diagnóstico inicial se retrasó y podría haberse hecho de forma más temprana con la tinción de calretinina. Esto fue debido a que la hipertrofia de los troncos nerviosos (valoración que se realizó originalmente con acetilcolinesterasa al momento del diagnóstico de esos especímenes) se encontraba ausente o era mínima, o a que la biopsia era muy superficial para confirmar la presencia de células ganglionares. La inmunohistoquímica para calretinina confirmó el diagnóstico de enfermedad de Hirschsprung en estas biopsias.⁹⁵

En la porción prospectiva del estudio, 18 biopsias de las 25 fueron consideradas normales, pero llamó la atención que en tres de los especímenes (12%) la muestra era demasiado superficial para valorar la actividad de la acetilcolinesterasa; definieron una biopsia superficial como una biopsia rectal que no incluía submucosa o muscular de la mucosa. La tinción de calretinina excluyó el diagnóstico de enfermedad de Hirschsprung en todas estas muestras superficiales y en todos los especímenes colónicos fetales la calretinina mostró tinción positiva en las fibrillas nerviosas. La conclusión principal de este estudio fue que el uso de calretinina puede ser considerado superior al de la acetilcolinesterasa, particularmente en el contexto de una aganglioneosis total del colon, biopsias definidas como superficiales y de prematuridad, logrando un diagnóstico más temprano de enfermedad de Hirschsprung en estos pacientes.⁹⁶

⁹⁴ Morris MI et al. J Pediatr Surg. 2013; 48(5):1037-43.

⁹⁵ Morris MI et al. J Pediatr Surg. 2013; 48(5):1037-43.

⁹⁶ Morris MI et al. J Pediatr Surg. 2013; 48(5):1037-43.

Varias publicaciones reportan beneficios al utilizar paneles combinados de anticuerpos para megacolon agangliónico. Entre los anticuerpos que se han utilizado se encuentra el MAP-2 (proteína asociada a los microtúbulos 2). Yang y colaboradores utilizaron este anticuerpo en combinación con calretinina en tejido congelado, con resultados positivos en las células ganglionares en el plexo submucoso del segmento gangliónico y negativos en el segmento agangliónico. La calretinina marcaba fuertemente el núcleo y el citoplasma, en comparación con el MAP-2, en el cual la tinción sólo tiñe citoplasma. En el tejido congelado no se observó tinción de fibras nerviosas para ningún anticuerpo. Se concluyó que tanto la calretinina como el MAP-2 si se usan combinados son útiles para el diagnóstico de enfermedad de Hirschsprung y pueden saldar las dificultades diagnósticas asociadas a esta enfermedad.⁹⁷

Otras combinaciones de anticuerpos que han sido recomendadas son calretinina asociada a periferina y S-100⁹⁸, calretinina junto con inmunohistoquímica para beta tubulina⁹⁹ y calretinina en combinación con histoquímica para acetilcolinesterasa.¹⁰⁰

Se han mencionado cuidados que deben tenerse al momento de interpretar este anticuerpo, principalmente en los pacientes con enfermedad de Hirschsprung de segmento ultracorto (menos de 2 cm de segmento agangliónico). Kapur¹⁰¹ realizó un análisis de una serie de resecciones de rectosigmoides en pacientes con enfermedad de Hirschsprung de segmento

⁹⁷ Yang MI et al. J Pediatr Surg. 2013; 48(10):2112-7.

⁹⁸ Holland SK et al. Ann Diagn Pathol. 2011; 15(5):323-8.

⁹⁹ Volpe A et al. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2013; 57(6):780-7.

¹⁰⁰ de Arruda Lourenção PL et al. Ann Diagn Pathol. 2013; 17(4):352-6.

¹⁰¹ Kapur RP. Pediatr Dev Pathol. 2014; 17(1):28-35.

corto y de segmento ultracorto en el cual demostró la presencia de nervios mucosos inmunoreactivos para calretinina en los segmentos proximales (1-2 cm) de colon agangliónico. La presencia de estas fibras nerviosas en biopsias distales de recto podría complicar el diagnóstico de la enfermedad de Hirschsprung de segmento ultracorto. En el análisis retrospectivo de biopsias distales de recto preoperatorias agangliónicas de 9 pacientes con megacolon agangliónico de segmento ultracorto, estas mostraron tinción en fibras nerviosas mucosas para calretinina.

El diagnóstico acertado en estos casos fue posible ya que las muestras tenían una adecuada porción de submucosa, a la cual se le realizaron numerosos niveles de hematoxilina-eosina (*gold estándar*) para excluir la presencia de células ganglionares y la presencia de abundantes nervios submucosos de gran calibre, o sea, más de 4 nervios de 0.30 mm grosor/3200 (campo) o más de 2 nervios de 0.40 mm de grosor por campo de 3200x. El autor concluyó que la ausencia de innervación mucosa apoya el diagnóstico de megacolon agangliónico, pero la presencia de nervios mucosos inmunoreactivos para calretinina no excluye el diagnóstico de aganglionosis, especialmente en los pacientes con enfermedad de Hirschsprung de segmento ultracorto.¹⁰²

En Latinoamérica los pioneros en el uso de calretinina para el diagnóstico de enfermedad de Hirschsprung fueron México¹⁰³ y Brasil¹⁰⁴, sin embargo en el Simposio Latinoamericano de Patología Pediátrica celebrado en Ciudad de Guatemala en el 2013 se comentó que países como Panamá la incluyeron en su panel diagnóstico en el Hospital del Niño del Seguro Social desde el 2011 y

¹⁰² Kapur RP. *Pediatr Dev Pathol.* 2014; 17(1):28-35.

¹⁰³ Menchaca-Cervantes C et al. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.* 2013; 51(6):610-613.

¹⁰⁴ de Arruda Lourenção PL et al. *Ann Diagn Pathol.* 2013; 17(4):352-6.

que otros como Honduras y Guatemala tenían el marcador disponible únicamente en la práctica privada.

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

CAPITULO III

3. Marco Metodológico

3.1 Tipo de estudio

El estudio realizado es tipo observacional, retrospectivo, descriptivo, de serie de casos y controles. Es además exploratorio, ya que se trata de un tema poco abordado a nivel nacional, el cual aplicará por primera vez una prueba en los casos de megacolon agangliónico del Servicio de Patología del Hospital Nacional de Niños.

3.2 Materiales y métodos

De los archivos del Servicio de Patología del Hospital Nacional de Niños se estudiaron los casos de resección intestinal por enfermedad de Hirschsprung diagnosticados desde enero del 2008 hasta diciembre del 2012. Se incluyeron todos los casos diagnosticados como megacolon agangliónico, sin importar la longitud del segmento agangliónico (ultracorto, corto, largo, aganglionosis total).

Se identificaron treinta y siete pacientes a los que se les realizó resección intestinal por megacolon agangliónico. De estas resecciones se revisaron los reportes de biopsia, las laminillas histológicas y el expediente clínico. Las variables histológicas consideradas fueron la presencia o no de células ganglionares en las laminillas valoradas de hematoxilina eosina. Se escogieron dos muestras de cada caso valorable para la preparación de inmunohistoquímica con calretinina, una del segmento gangliónico (el cual es

idéntico a un intestino normal) y otra del segmento agangliónico (el cual permite hacer el diagnóstico de enfermedad de Hirschsprung).

Otras variables cualitativas utilizadas para la caracterización de la población fueron: edad al diagnóstico de la enfermedad, sexo, procedencia del paciente por provincia, número de biopsias por succión rectales necesarias para el diagnóstico, número de niveles realizados a la biopsia por succión rectal para hacer diagnóstico y tipo de procedimiento quirúrgico realizado.

3.2.1 Características de los pacientes

Se revisaron del archivo de reportes, las biopsias correspondientes al período comprendido entre enero del 2008 y diciembre del 2013, se incluyeron treinta y cuatro de los treinta y siete pacientes a los cuales se les realizó resección intestinal por megacolon agangliónico. Dos de las muestras originales identificadas fueron excluidas debido a la ausencia de segmento agangliónico en la resección según lo reportado originalmente en la biopsia (pacientes que en el reporte final no tuvieron diagnóstico de enfermedad de Hirschsprung). No fue posible conseguir los bloques de inclusión de uno de los casos, por lo que este se excluyó. En los casos incluidos, se realizó revisión del expediente de salud y de las laminillas histológicas de cada caso.

3.2.2 Criterios histopatológicos

Del archivo de láminas del Servicio de Anatomía Patológica se obtuvieron las laminillas histológicas de hematoxilina-eosina y los bloques de inclusión en parafina de los treinta y cuatro casos de resección intestinal con diagnóstico de enfermedad de Hirschsprung. Todas las laminillas fueron evaluadas por la investigadora principal, especialista en Anatomía Patológica y residente de la subespecialidad en Patología Pediátrica. Esta evaluación preliminar de la

tinción fue documentada para comparación con los datos obtenidos por los patólogos.

En base al estudio de los cortes histológicos de cada resección intestinal y al análisis de su respectivo reporte (diagnóstico final), de cada caso se escogieron dos de las muestras de inclusión, una del segmento agangliónico y otra del segmento gangliónico (control, ya que es idéntico al colon normal). A estos bloques se les realizó la tinción de calretinina por medio del proceso automatizado (Hospital San Juan de Dios), utilizando anticuerpo monoclonal de conejo pre diluido de Ventana®. Se revisaron los controles de cada laminilla (apéndice cecal sano) para constatar que las tinciones realizadas eran adecuadas.

3.2.3 Inmunohistoquímica

Lista de materiales básicos

Todo el proceso se realizó en equipo automatizado Roche Diagnostics GmbH®

- Anticuerpo primario:

CONFIRM Calretinin (clona SP65) Rabbit Monoclonal Primary Antibody (Monoclonal de conejo, Ventana®)

- Soluciones recuperadoras de antígeno tisular

EDTA (Ventana®), pH 8

BORG Decloaker (Ventana®), pH 9

- Peróxido de hidrógeno al 3 %

- Diluyente de anticuerpo primario (Ventana®)

- Diluyente de anticuerpo primario: van Gogh Yellow (Ventana®)

- Sistema de detección

LSAB + (Ventana®)

- Cromógeno: Diaminobenzidina (DAB) (Ventana®)

- Buffer de lavados (TBS) con Tween 20 (Ventana®)

- Batería de histología
- Desparafinización (xilol, alcoholes de 100°, 95°, 70°)
- Contratinción (Hematoxilina Gill's III)
- Deshidratación (alcoholes de 70°, 95°, 100°)
- Aclaramiento (xilol)
- Láminas silanizadas
- Sistema de capilaridad Cover Plate para incubaciones

Inmunohistoquímica: Metodología para la tinción de calretinina

Pasos realizados:

- Se hicieron cortes del tejido a 4 micras.
- Se colocaron láminas con los cortes en la estufa a 60°C por 1 hora para adherir el tejido a la lámina.
- Estas láminas se incluyeron en el equipo automatizado Roche Diagnostics GmbH®, el cual sigue los siguientes pasos: Se procedió a desparafinar con la siguiente secuencia: Xilol: 3 cambios de 2 minutos cada uno, alcohol 100°: 1 cambio de 2 minutos, alcohol 95°: 1 cambio de 2 minutos y alcohol 70°: 1 cambio de 2 minutos. Posteriormente se realizó lavado con agua corriente durante 5 minutos. Se lavó con agua destilada. Seguidamente se llevó a cabo el rescate antigénico con BORG Decloaker por 10 minutos (a una presión de 20 PI) y a una temperatura de 95°C. Se dejó reposar durante 20 minutos a temperatura ambiente. Rápidamente se lavó con agua destilada. Se procedió a colocar las láminas en el Sistema Cover Plate. Se realizó lavado con el buffer de lavados TBS (pH 6.7). Se bloqueó la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 3 % por 10 minutos. Inmediatamente se lavó con TBS durante 5 minutos. Se procedió a bloquear la proteína por 5 minutos. Luego se lavó con TBS por 5 minutos. Se incubó en anticuerpo primario por una hora a temperatura ambiente, el cual es CONFIRM Calretinin (clona SP65) Rabbit Monoclonal Primary Antibody (Monoclonal de

conejo, Ventana®), con una concentración sugerida: 1/50 – 1/100, prediluido, se utilizan 300 microlitros por lámina y se utiliza como control apéndice cecal. Posteriormente se lavó con TBS por 5 minutos. Se realizó incubación de anticuerpo secundario por 30 minutos a temperatura ambiente. Nuevamente se lavó con TBS por 5 minutos. Luego se hizo la incubación en Estreptavidina durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se lavó con TBS por 5 minutos. Se realizó el proceso de revelado (aplicación del cromógeno): se aplicó Diaminobenzidina (DAB), 200 microlitros por 10 minutos. Se lavó con TBS por 5 minutos. Se hizo contratinción de las láminas con Hematoxilina Gill's III. Finalmente se procedió a deshidratar y aclarar.

- El montaje de la laminilla se realiza de forma manual.

Las láminas de inmunohistoquímica se prepararon sin rotulación del número de biopsia o número de expediente que pudiera identificar al paciente, únicamente rotulada con un número del 1 al 68 y sin la laminilla de hematoxilina-eosina para comparar el espécimen. En esas condiciones fueron entregadas a los cuatro patólogos pediatras del Servicio de Patología del Hospital Nacional de Niños, para que interpretaran cada una de las tinciones como positiva, negativa o inadecuada para diagnóstico. En caso de que el patólogo diera esta última interpretación, debía anotar en el espacio de observaciones la causa por la cual reportó la muestra como inadecuada. Estos datos fueron documentados por cada uno de ellos en una hoja de recolección de datos que se les entregó para este fin.

3.2.3 Análisis de los datos

Para el análisis de los datos se realizó la determinación de frecuencias y proporciones para las variables cualitativas. Posteriormente se compararon estas frecuencias y proporciones con las publicadas en la literatura.

Se realizó la tabulación de los resultados de la evaluación de las muestras por los patólogos pediatras, según lo documentado por ellos mismos en la hoja de recolección de datos. Se anotaron valores absolutos de cada una de las tres posibles respuestas, además de documentarse las razones dadas por los patólogos en el caso de una muestra reportada como inadecuada. Se realizó además el cálculo del porcentaje de respuestas equívocas para cada una de las láminas, considerándose como respuesta equívoca aquella que difería del diagnóstico original de la muestra con la evaluación de la hematoxilina-eosina (presencia o ausencia de células ganglionares documentada en ese segmento específico de la resección).

La estimación del índice de correlación diagnóstica se realizó por medio del índice de concordancia Kappa (Kappa de Fleiss) entre los resultados de cada uno de los patólogos pediatras y los resultados originales de la interpretación con hematoxilina-eosina, en los que un índice de concordancia de 0.6 o más fue interpretado como una buena correlación (propuesta de rangos por Landis y Koch)¹⁰⁵ y una proporción de acuerdo de 0.6 o más fue interpretada como adecuada. Este se calculó usando software estadístico de la Universidad de Vassar, Nueva York, Estados Unidos, disponible de manera gratuita en línea¹⁰⁶ y el cálculo se repitió utilizando el complemento RealStats® para Microsoft Office Excel®.

¹⁰⁵ <http://www.seh-lilha.org/concor2.htm>

¹⁰⁶ <http://vassarstats.net/kappa.html>

3.3 Alcances y limitaciones

En cuanto al alcance del proyecto la principal limitante fue el número de casos disponibles, ya que por logística del archivo de reportes, láminas e inclusiones en bloques de parafina del Servicio de Patología, no fue posible conseguir reportes de biopsias y laminillas de antes del año 2008 para realizar la investigación en un intervalo mayor a 5 años.

De los casos disponibles, uno de ellos debió excluirse ya que a pesar de que los bloques debían encontrarse dentro del archivo no se pudo recuperar el material. Otra limitante fue no contar con apoyo presupuestario institucional para aplicar la tinción a más bloques de inclusión de los ya disponibles, ya que el presupuesto de esta investigación fue propio del investigador principal y los reactivos donados por la Universidad de Costa Rica.

Es importante recalcar además que sólo uno de los patólogos pediatras incluidos en el estudio tenía experiencia previa con este marcador inmunohistoquímico, en patologías diferentes a la enfermedad de Hirschsprung. Para la caracterización de los pacientes una dificultad encontrada fue la obtención de ciertos datos en el expediente de salud que estaban incompletos o ausentes en algunos de ellos.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

CAPITULO IV

4. Resultados

4.1 Presentación de Resultados

La tabla 2 muestra los resultados de la evaluación de las laminillas histológicas con la inmunoperoxidasa para calretinina por los patólogos pediatras del Servicio de Patología del Hospital Nacional de Niños.

Tabla 2. Interpretación de inmunoperoxidasa para calretinina por los patólogos pediatras, casos de resección intestinal por enfermedad de Hirschsprung recibidos en el Servicio de Patología del Hospital Nacional de Niños 2008-2012

# de caso	P1	P2	P3	P4	Diagnóstico H&E
1	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
2	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
3	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
4	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
5	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
6	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
7	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
8	Negativo	Negativo	Negativo	Inadecuado	Negativo
9	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
10	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
11	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
12	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
13	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
14	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
15	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
16	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
17	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
18	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
19	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
20	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo

21	Negativo	Inadecuado	Negativo	Negativo	Negativo
22	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
23	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
24	Negativo	Positivo	Inadecuado	Inadecuado	Negativo
25	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
26	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
27	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
28	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
29	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
30	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
31	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
32	Negativo	Positivo	Inadecuado	Inadecuado	Positivo
33	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
34	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
35	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
36	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
37	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
38	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
39	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
40	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
41	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
42	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
43	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
44	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
45	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
46	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
47	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
48	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
49	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
50	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
51	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
52	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
53	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
54	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
55	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
56	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
57	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
58	Inadecuado	Positivo	Inadecuado	Positivo	Negativo
59	Positivo	Positivo	Inadecuado	Inadecuado	Negativo
60	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
61	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

62	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
63	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
64	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
65	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
66	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
67	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
68	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Fuente: Hojas de recolección de datos y reportes de biopsias (diagnóstico).

Con respecto a los índices de correlación kappa, los valores obtenidos entre los patólogos pediatras del Hospital Nacional de Niños se pueden apreciar en la tabla 3. La tabla 4 nos muestra el índice de correlación kappa entre el diagnóstico proporcionado por los patólogos al valorar la inmunoperoxidasa, en comparación con el diagnóstico realizado con hematoxilina-eosina. Ambos tienen un intervalo de confianza de 95%.

Tabla 3. Índice de correlación Kappa entre los diferentes patólogos pediatras en la valoración de inmunoperoxidasa por calretinina, casos de resección intestinal por enfermedad de Hirschsprung recibidos en el Servicio de Patología del Hospital Nacional de Niños 2008-2012.

Comparación	Valor de Kappa
Patólogo 1 vs. Patólogo 2	0.68
Patólogo 1 vs. Patólogo 3	0.86
Patólogo 1 vs. Patólogo 4	0.78
Patólogo 2 vs. Patólogo 3	0.72
Patólogo 2 vs. Patólogo 4	0.69
Patólogo 3 vs. Patólogo 4	0.91

Fuente: Tabla 2.

Tabla 4. Índice de correlación Kappa entre los patólogos pediatras y el diagnóstico con hematoxilina y eosina en la valoración de inmunoperoxidasa por calretinina, casos de resección intestinal por enfermedad de Hirschsprung recibidos en el Servicio de Patología del Hospital Nacional de Niños 2008-2012.

Patólogo	Valor de Kappa
1	0.91
2	0.68
3	0.83
4	0.78

Fuente: Tabla 2.

Con respecto a las respuestas equívocas, los porcentajes según los diferentes patólogos pueden observarse en la tabla 5. Para el cálculo de respuesta equívoca, los casos interpretados como inadecuados no se consideran, ya que en la práctica clínica se repetiría la tinción de inmunohistoquímica.

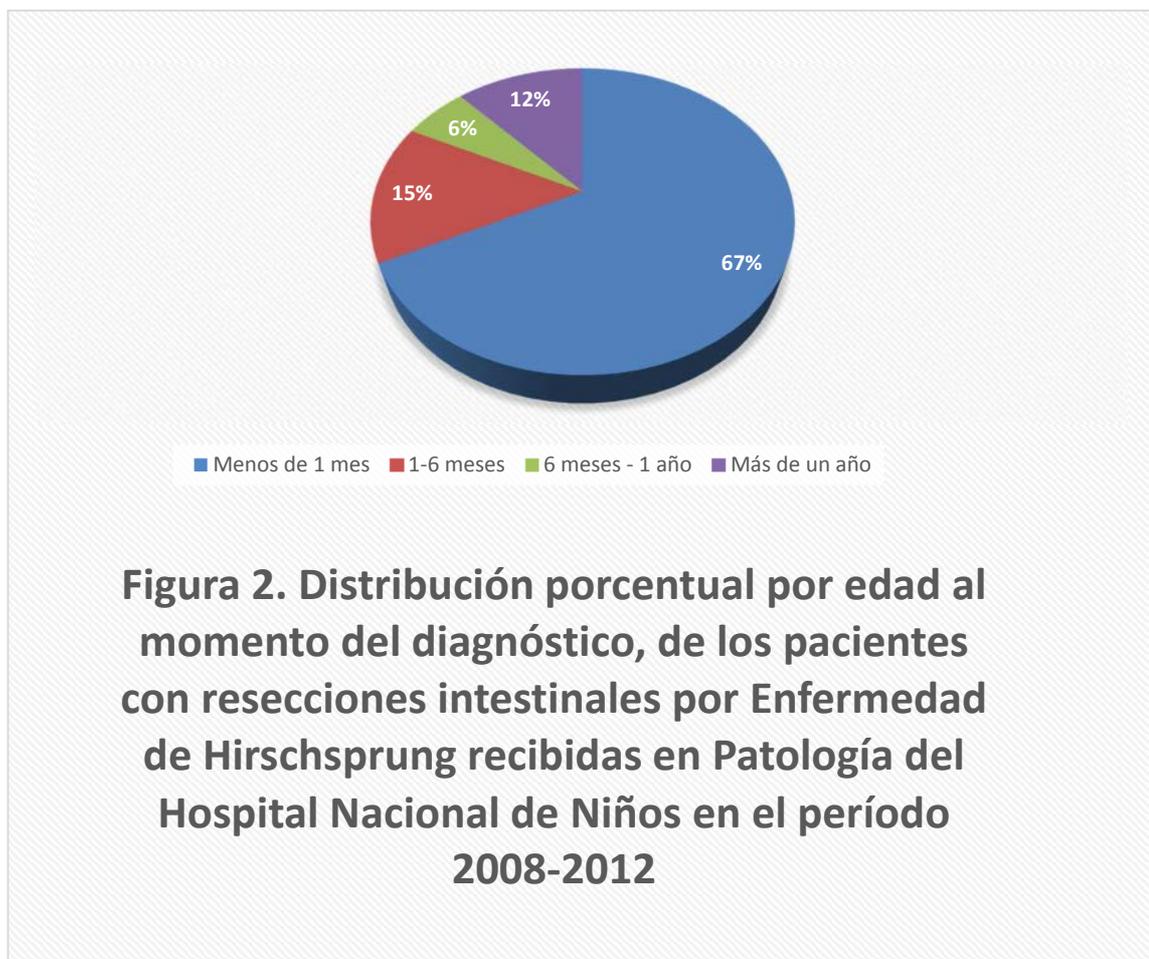
Tabla 5. Porcentaje de respuesta equívoca de los patólogos pediatras en la valoración de inmunoperoxidasa por calretinina, casos de resección intestinal por enfermedad de Hirschsprung recibidos en el Servicio de Patología del Hospital Nacional de Niños 2008-2012.

Patólogo	Porcentaje de respuesta equívoca
1	2.94
2	14.71
3	2.94
4	5.88

Fuente: Tabla 2.

El diagnóstico de los pacientes con enfermedad de Hirschsprung se realizó en la mayoría de los casos en el período neonatal, 23 de 34 pacientes fueron diagnosticados antes del mes de edad (67%), llama la atención el diagnóstico

tardío en 4 niños, con más de un año de edad (12%). El resto de los casos recibieron un diagnóstico de enfermedad de Hirschsprung entre el mes y el año de edad, un total de 7 pacientes para un 21% del total de la muestra, esto se puede observar en la Figura 2.



Fuente: Expediente de salud y reportes de biopsias.

Con respecto al sexo, de 34 pacientes incluidos en el estudio 24 (71%) pertenecían al sexo masculino y 10 (29%) al sexo femenino, como se anota en la figura 3.



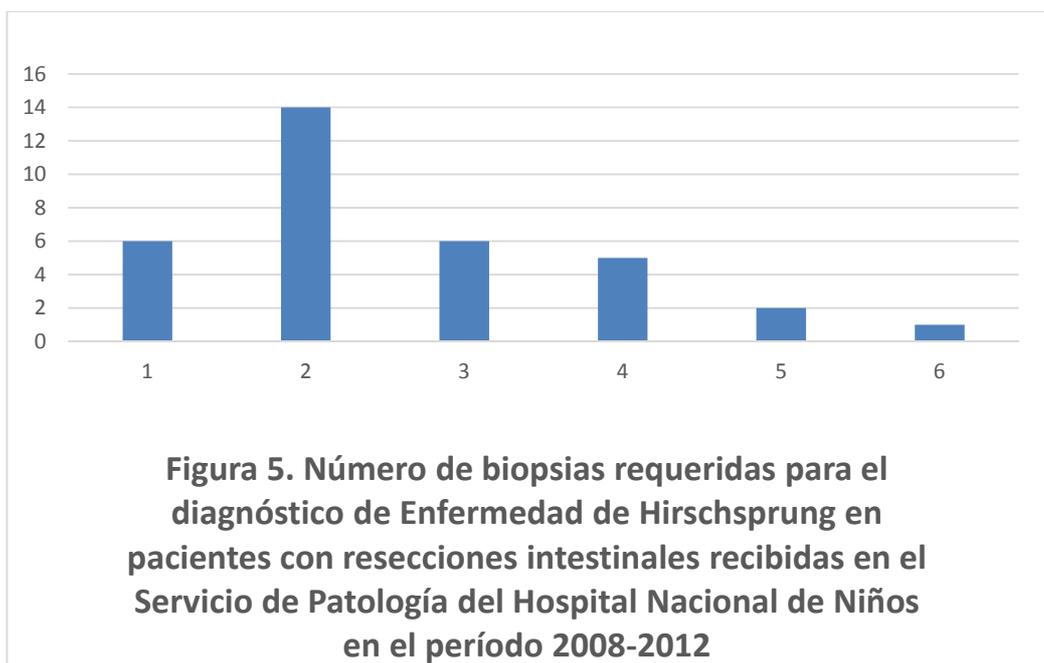
Fuente: Expediente de salud y reportes de biopsias.

En cuanto a la distribución por provincia, la mayoría de los pacientes eran vecinos de cantones de la provincia de San José (11 pacientes; 32%), seguidos por la provincia de Alajuela (8 pacientes; 23%), Heredia (5 pacientes; 15%), Cartago, Guanacaste y Puntarenas con tres pacientes cada uno (9%) y la provincia de Limón, de donde fue referido un único paciente (3%), como se indica en la Figura 4.



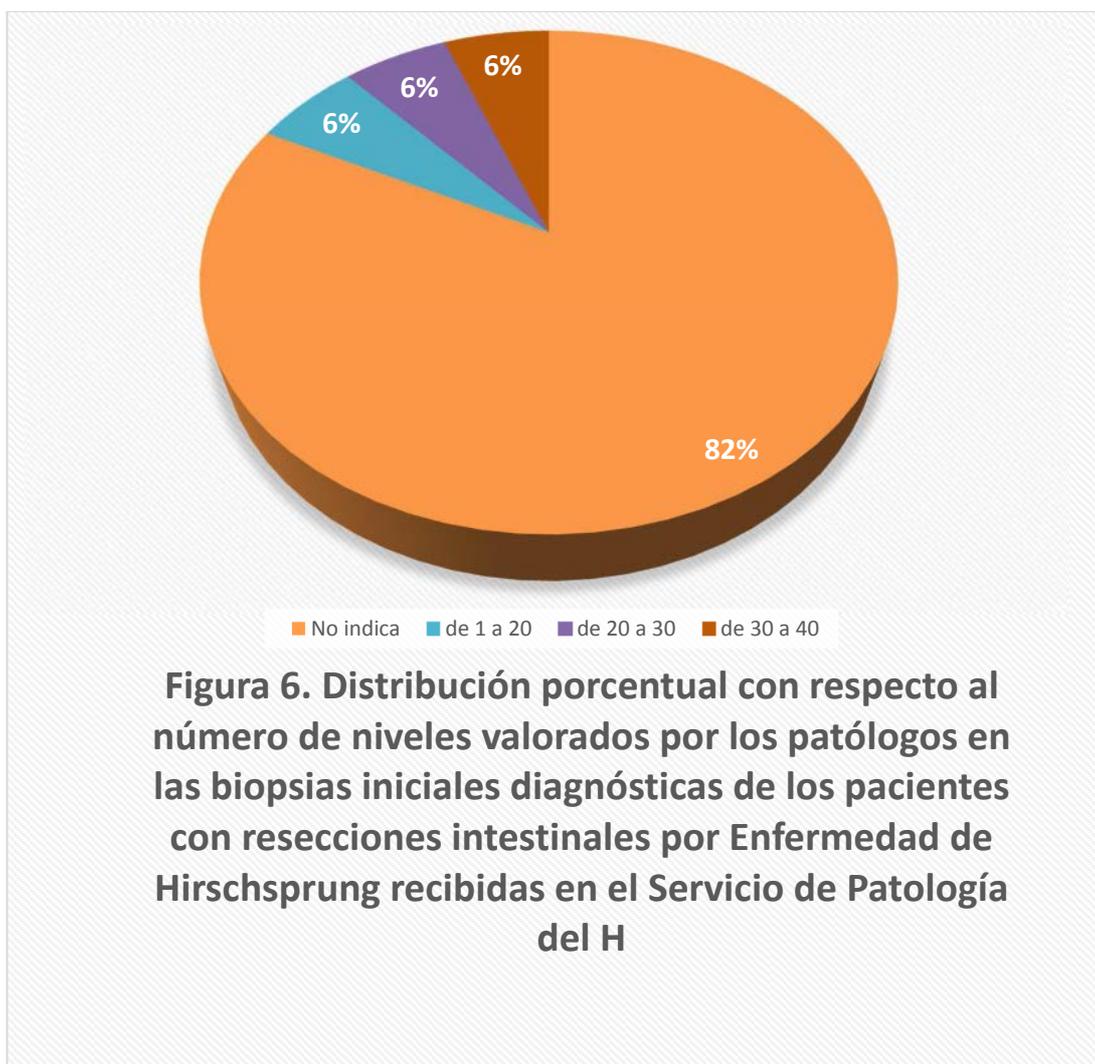
Fuente: Expediente de salud y reportes de biopsias.

El número de biopsias requeridas para hacer el diagnóstico tuvo variaciones en un rango de 1 a 6 como máximo, como se aprecia en la figura 5. La mayoría de los pacientes (41%), necesitaron dos biopsias para hacer el diagnóstico, lo cual incluyó la biopsia por succión y el mapeo intraoperatorio. Un 18% requirió de una sola biopsia, lo que incluía pacientes diagnosticados al momento del descenso por complicaciones de su patología y un paciente cuya biopsia previa al descenso era del Hospital de Alajuela. El 41% restante de los casos requirió de tres o más biopsias para el diagnóstico de enfermedad de Hirschsprung.



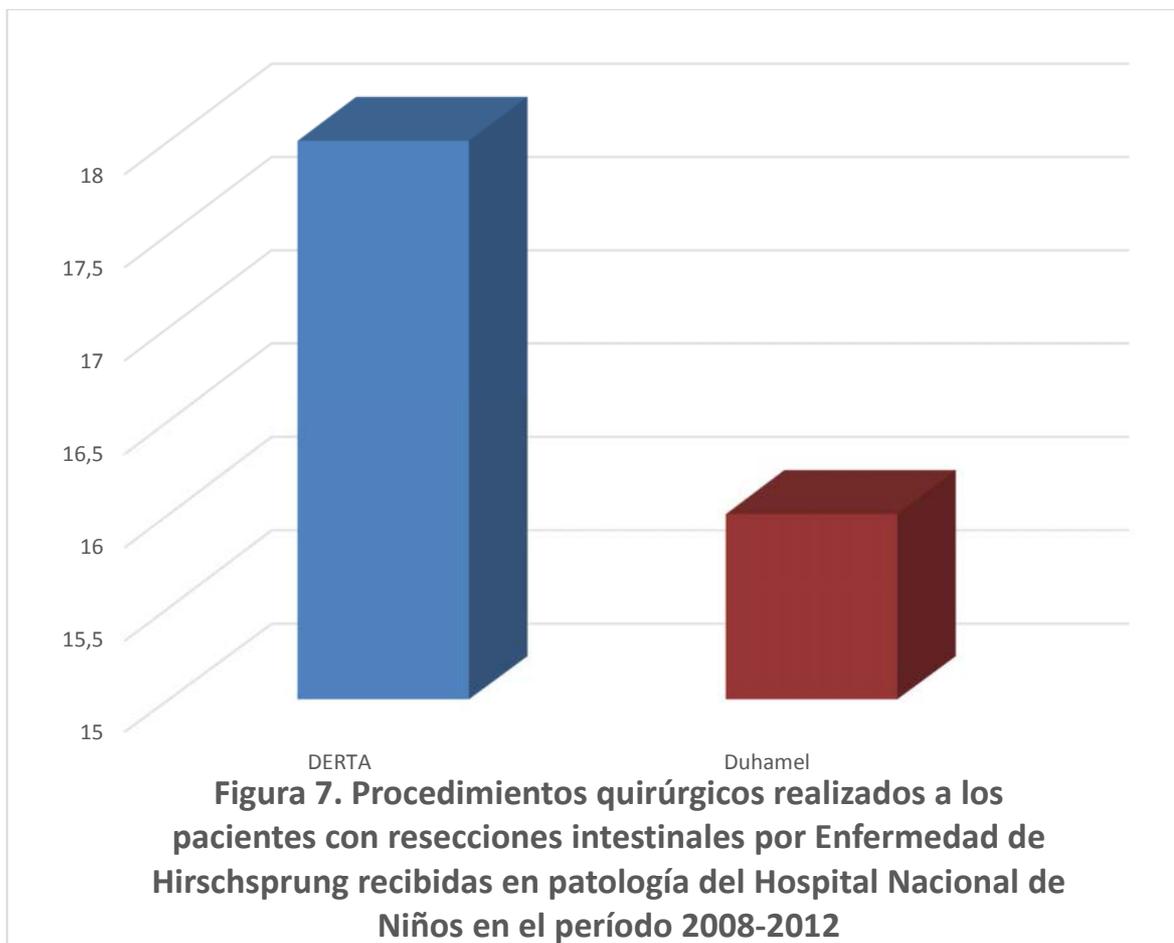
Fuente: Expediente de salud y reportes de biopsias.

En la revisión de los reportes de biopsias (biopsias por succión y biopsias de mapeo colónico), la mayoría de éstos no contaban con el número de niveles valorados por los patólogos para hacer el diagnóstico inicial (28 de 34 reportes no incluían esta información en la descripción histológica). En los reportes de biopsia donde se documentó este dato, el número varió entre 1 y 40 niveles, con un 6% en cada una de las tres categorías de clasificación, sin preferencia por un número específico de niveles, como se documenta en la figura 6.



Fuente: Expediente de salud y reportes de biopsias.

En el período 2008-2012 la mayoría de los especímenes de colectomía fueron resecados por el método de descenso endorectal transanal (DERTA), 18 casos y 16 por la técnica de Duhamel, sin embargo la diferencia numérica entre los dos métodos de abordaje fue solo de dos casos.



Fuente: Expediente de salud y reportes de biopsias.

4.2 Análisis y Discusión de Resultados

Según Landis y Koch¹⁰⁷, un índice de correlación mayor a 0.6 puede ser considerado como adecuado; entre los diferentes patólogos que laboran en el Servicio de Patología del Hospital Nacional de Niños todos los índices fueron mayores a 0.6, por lo que se tuvo una correlación diagnóstica en el rango de buena (de 0.6 a 0.79) a muy buena (0.8 a 1). Con respecto a la correlación

¹⁰⁷ <http://www.seh-lilha.org/concor2.htm>

entre los patólogos y el diagnóstico dado en hematoxilina eosina, también se cumplió con estas mismas condiciones.

Con respecto al porcentaje de interpretación equívoca, este osciló entre 2.94 y 14.71%, lo que representó una interpretación equívoca de menos del 15% para una primera experiencia con el anticuerpo. Los valores de interpretación equívoca publicados en la literatura oscilan entre un 4¹⁰⁸ y un 17%¹⁰⁹, dependiendo del estudio, por lo que los resultados obtenidos se encuentran dentro de ese rango, incluso menor en dos de los patólogos.

Los casos considerados como inadecuados fueron descritos por los patólogos como con positividad en los filetes nerviosos, células y vaina de Schwann, lo cual desde el punto de vista fisiológico hace pensar que a pesar de que fueron considerados negativos o positivos en hematoxilina-eosina probablemente la fisiología neural de esa zona es semejante a la de la zona de transición.¹¹⁰

La mayoría de los niños con enfermedad de Hirschsprung se presentan con obstrucción intestinal distal en el período neonatal; con un cuadro clínico caracterizado por distensión abdominal, vómito bilioso e intolerancia a los alimentos.¹¹¹ En el presente estudio el 67% de los pacientes se les hizo el diagnóstico en el período neonatal, lo que correlaciona con la literatura, lo mismo que la sintomatología en los primeros días de vida.

En algunos pacientes la enfermedad se puede manifestar de forma más tardía, o incluso en la vida adulta, con síntomas de constipación crónica. Los niños con

¹⁰⁸ Kapur RP et al. *Pediatr Dev Pathol*. 2009; 12(1):6-15.

¹⁰⁹ Holland SK et al. *Ann Diagn Pathol*. 2011; 15(5):323-8.

¹¹⁰ Kapur RP et al. *Pediatr Dev Pathol*. 2013; 16: 252-266.

¹¹¹ Langer JC. *Curr Opin Pediatr* 2013; 25: 368-374.

lactancia materna exclusiva retardan más la aparición de los síntomas, pero desarrollan estreñimiento severo con la ablactación. Algunos lactantes o niños con estreñimiento crónico que no ha sido estudiado resultan portadores de enfermedad de Hirschsprung, ya que al ser la constipación una causa frecuente de consulta en la infancia puede ser difícil diferenciar el megacolon agangliónico de las causas más comunes de este cuadro clínico.¹¹² En este grupo poblacional un 12% de los casos fueron diagnosticados más allá del año de edad y el 21% entre el mes y el año de edad, para un total de 33%, lo que está de acuerdo con los datos publicados en la literatura.

La enfermedad de Hirschsprung predomina en varones, con una relación que varía entre 3-5 a 1,¹¹³ la población en estudio cumple estas características, un 71% de los casos se reportaron en varones.

San José y Alajuela al ser las provincias más pobladas del país¹¹⁴ tienen un 32% y 23% de los casos de Hirschsprung respectivamente. Llama la atención que la tercera provincia en población, Cartago,¹¹⁵ comparte el mismo porcentaje con Guanacaste y Puntarenas (9%). Esto podría deberse a que algunos de los casos de megacolon fueron manejados en el Hospital Max Peralta de Cartago. Al ser Guanacaste la provincia menos poblada,¹¹⁶ se esperaría en ella el menor porcentaje de casos, sin embargo lo tiene la provincia de Limón con un 3%. Heredia, la cuarta provincia en cuanto a población¹¹⁷ tiene el 15% de los casos referidos.

¹¹² Langer JC. *Curr Opin Pediatr* 2013; 25: 368-374.

¹¹³ Weber-Estrada N. *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica* 2012; 69: 251-256.

¹¹⁴ <http://www.inec.go.cr/Web/Home/GeneradorPagina.aspx>

¹¹⁵ <http://www.inec.go.cr/Web/Home/GeneradorPagina.aspx>

¹¹⁶ <http://www.inec.go.cr/Web/Home/GeneradorPagina.aspx>

¹¹⁷ <http://www.inec.go.cr/Web/Home/GeneradorPagina.aspx>

La literatura reporta hasta un 17% de biopsias por succión inadecuadas para diagnóstico, las principales razones incluyen muestreo inadecuado de submucosa o inclusión de mucosa anal.¹¹⁸ En esta serie, 14 de 34 pacientes (41%) requirieron más de 2 biopsias para el diagnóstico definitivo, más del doble de los valores reportados en la literatura para biopsias inadecuadas. Estos valores, de mantenerse en futuras series, serían preocupantes. Sin embargo, la información clínica en los expedientes no indica las razones de la repetición de las biopsias en la mayoría de los casos.

No es una práctica común en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Nacional de Niños anotar en los reportes de diagnóstico, el número de niveles valorados por los patólogos al revisar las biopsias rectales por succión, ya que en el 82% de los mismos no se encontró este dato. La literatura recomienda un rango de 50 a 75 niveles en hematoxilina-eosina valorados, como una cantidad suficiente para excluir la presencia de células ganglionares.¹¹⁹ En los casos donde el número de niveles fue consignado, los valores fueron menores a los descritos en la literatura, esto puede estar relacionado principalmente con el tamaño de la muestra enviada. La documentación del número de niveles valorados en los reportes puede ser utilizada como un marcador para control de calidad en las biopsias rectales por succión.

El tipo de resección intestinal utilizada en la mayoría de los pacientes fue DERTA (53%), con una diferencia mínima de dos casos con el método de Duhamel (47%). No hay suficiente evidencia publicada en la literatura de que alguna de estas técnicas sea mejor que la otra. El mejor procedimiento

¹¹⁸ Gonzalo DH. Arch Pathol Lab Med. 2013; 137(8):1099-102.

¹¹⁹ Kapur RP. Semin Pediatr Surg, 2009; 18: 212-223.

quirúrgico para cada paciente, va a ser aquel en el cual el cirujano a cargo se encuentre mejor entrenado y practica con mayor frecuencia.¹²⁰

¹²⁰ Langer JC. Curr Opin Pediatr 2013; 25: 368-374.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

CAPITULO V

5. Conclusiones y Recomendaciones

5.1 Conclusiones

1. La interpretación diagnóstica de los cuatro patólogos pediatras fue adecuada al valorar la tinción de calretinina, con valores de interpretación equívoca menores a los reportados en la literatura (menos de 17%), por lo que se acepta la hipótesis alternativa y se rechaza la hipótesis nula.

2. La correlación diagnóstica entre los diferentes patólogos fue adecuada, con un índice de correlación kappa mayor a 0.6, entre cada una de las interpretaciones de los cuatro patólogos, por lo que se acepta la hipótesis alternativa y se rechaza la hipótesis nula.

3. La mayoría de los pacientes fueron diagnosticados en el período neonatal, lo que concuerda con los datos publicados en la literatura.

4. La mayoría de los pacientes pertenecían al sexo masculino, que concuerda con los datos disponibles en diferentes publicaciones.

5. Las provincias de San José y Alajuela, tuvieron el mayor número de casos de enfermedad de Hirschsprung, lo cual era esperado de acuerdo a su índice poblacional.

6. En un 41% de los pacientes fue necesario realizar más de dos biopsias para hacer el diagnóstico definitivo, un porcentaje mucho mayor que lo reportado en la literatura (17%).

7. En la mayoría de los reportes de biopsias los patólogos no incluyeron el número de niveles valorados para realizar el diagnóstico definitivo.

8. El procedimiento quirúrgico más utilizado por los cirujanos en el Hospital Nacional de Niños fue el DERTA.

9. En base a la adecuada interpretación y correlación diagnóstica realizada por los cuatro patólogos pediatras del Hospital Nacional de Niños, se concluye que la calretinina es útil, como herramienta coadyuvante en el diagnóstico de enfermedad de Hirschsprung.

5.2 Recomendaciones

1. Implementar la tinción de inmunohistoquímica para calretinina como herramienta coadyuvante para el diagnóstico de enfermedad de Hirschsprung en el Servicio de Patología del Hospital Nacional de Niños.
2. Realizar otro estudio con muestras de biopsias rectales por succión, por ser éstas, el espécimen enviado con mayor frecuencia para descartar enfermedad de Hirschsprung.
3. Este estudio con biopsias rectales por succión se puede realizar en dos fases: uno retrospectivo y otro prospectivo.
4. Investigar si se realizan cirugías por Hirschsprung en el Hospital Max Peralta de Cartago y en caso de ser así, ofrecer capacitación a los patólogos que laboran en dicho centro.
5. Instruir a los patólogos pediatras del Hospital Nacional de Niños, para que en los reportes de diagnóstico de enfermedad de Hirschsprung

incluyan el número de niveles realizados a las biopsias rectales por succión.

BIBLIOGRAFÍA

1. Gershon MD, Ratcliffe EM. Developmental biology of the enteric nervous system: pathogenesis of Hirschsprung's disease and other congenital dysmotilities. *Semin Pediatr Surg.* 2004; 13(4):224-35.
2. Sullivan PB. Hirschsprung's disease. *Arch Dis Child.* 1996; 74(1):5-7.
3. Kapur RP. Can we stop looking? Immunohistochemistry and the diagnosis of Hirschsprung disease. *Am J Clin Pathol.* 2006; 126(1):9-12.
4. Kenny SE, Tam PK, Garcia-Barcelo M. Hirschsprung's disease. *Semin Pediatr Surg.* 2010; 19(3):194-200.
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. *Pediatr Dev Pathol.* 2009; 12(1):6-15.
6. Barshack I, Fridman E, Goldberg I, Chowers Y, Kopolovic J. The loss of calretinin expression indicates aganglionosis in Hirschsprung's disease. *J Clin Pathol.* 2004; 57(7):712-6.
7. Volpe A, Alaggio R, Midrio P, Iaria L, Gamba P. Calretinin, β -tubulin immunohistochemistry, and submucosal nerve trunks morphology in Hirschsprung disease: possible applications in clinical practice. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2013; 57(6): 780-7.
8. Guinard-Samuel V, Bonnard A, De Lagausie P, Philippe-Chomette P, 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(10):1379-84.
9. Langer JC. Hirschsprung disease. *Curr Opin Pediatr.* 2013; 25(3):368-74.
10. Kapur RP. Practical pathology and genetics of Hirschsprung's disease. *Semin Pediatr Surg.* 2009; 18(4): 212-23.

11. Kapur RP, Kennedy AJ. Histopathologic delineation of the transition zone in short-segment Hirschsprung disease. *Pediatr Dev Pathol.* 2013; 16(4): 252-66.
12. García-Arias F, Ceciliano-Romero N. Análisis del manejo quirúrgico de la enfermedad de Hirschsprung en el Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera, durante el periodo 2000-2010. *Acta méd. Costarric,* 2013; 55: 87-91.
13. Collins MH, Reyes-Múgica M. Defining the transition zone of Hirschsprung disease. *Pediatr Dev Pathol.* 2013; 16(4): 235-6.
14. Rouzrokh M1, Jadali F, Gharib A, Khaleghnejad-Tabari A, Tavassoli A, Mohajerzadeh L. Can we rely on frozen sections of a rectal biopsy for one-stage trans-anal pull-through operation in Hirschsprung's disease? *Iran J Pediatr.* 2011; 21(1): 72-6.
15. Montedonico S1, Piotrowska AP, Rolle U, Puri P. Histochemical staining of rectal suction biopsies as the first investigation in patients with chronic constipation. *Pediatr Surg Int.* 2008; 24(7): 785-92.
16. Meier-Ruge W, Lutterbeck PM, Herzog B, Morger R, Moser R, Schärli A. Acetylcholinesterase activity in suction biopsies of the rectum in the diagnosis of Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg.* 1972; 7(1): 11-7.
17. Holland SK, Ramalingam P, Podolsky RH, Reid-Nicholson MD, Lee JR. Calretinin immunostaining as an adjunct in the diagnosis of Hirschsprung disease. *Ann Diagn Pathol.* 2011; 15(5): 323-8.
18. de Arruda Lourenção PL, Takegawa BK, Ortolan EV, Terra SA, Rodrigues MA. A useful panel for the diagnosis of Hirschsprung disease in rectal biopsies: calretinin immunostaining and acetylcholinesterase histochemistry. *Ann Diagn Pathol.* 2013; 17(4): 352-6.
19. Karim S, Hession C, Marconi S, Gang DL, Otis CN. The identification of ganglion cells in Hirschsprung disease by the immunohistochemical detection of ret oncoprotein. *Am J Clin Pathol.* 2006; 126(1): 49-54.

20. Morris MI, Soglio DB, Ouimet A, Aspirot A, Patey N. A study of calretinin in Hirschsprung pathology, particularly in total colonic aganglionosis. *J Pediatr Surg.* 2013; 48(5):1037-43.
21. Bhargava R, Dabbs DJ. Immunohistology of metastatic carcinomas of unknown primary. En: Dabbs DJ, editor. *Diagnostic Immunohistochemistry.* Philadelphia: Saunders Elsevier; 2010. p. 206-255.
22. Bishop P. *Immunohistochemistry vade mecum.* Octubre 2012. Disponible en línea en: <http://www.e-immunohistochemistry.info/>
23. Hiradfar M, Sharifi N, Khajedaluee M, Zabolnejad N, Taraz Jamshidi S. Calretinin immunohistochemistry: an aid in the diagnosis of Hirschsprung's Disease. *Iran J Basic Med Sci.* 2012; 15(5):1053-9.
24. Kannaiyan L, Madabhushi S, Malleboyina R, Are NK, Reddy KR, Rao B. Calretinin immunohistochemistry: A new cost-effective and easy method for diagnosis of Hirschsprung's disease. *J Indian Assoc Pediatr Surg.* 2013; 18(2): 66-8.
25. Alexandrescu S, Rosenberg H, Tatevian N. Role of calretinin immunohistochemical stain in evaluation of Hirschsprung disease: an institutional experience. *Int J Clin Exp Pathol.* 2013; 6(12): 2955-61.
26. Gonzalo DH, Plesec T. Hirschsprung disease and use of calretinin in inadequate rectal suction biopsies. *Arch Pathol Lab Med.* 2013; 137(8): 1099-102.
27. Yang WI, Oh JT. Calretinin and microtubule-associated protein-2 (MAP-2) immunohistochemistry in the diagnosis of Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg.* 2013; 48(10): 2112-7.
28. Kapur RP. Calretinin-immunoreactive mucosal innervation in very short-segment Hirschsprung disease: a potentially misleading observation. *Pediatr Dev Pathol.* 2014; 17(1): 28-35.
29. Menchaca-Cervantes C, Rodríguez-Velasco A, Ramón-García G, Rendón-Macías ME. Hirschsprung's disease: the immunohistochemistry

- as ancillary method for the diagnosis. Rev Med Inst Mex Seguro Soc. 2013; 51(6):610-613.
30. Molinero LM. Medidas de concordancia para variables cualitativas. Actualizado Diciembre 2001. Disponible en línea en: <http://www.seh-lilha.org/concor2.htm>
 31. Lowry R. Kappa as a measure of concordance in categorical sorting. Vassar College, 2013. Disponible en línea en: <http://vassarstats.net/kappa.html>
 32. Weber-Estrada N. Enfermedad de Hirschsprung. . Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica 2012; 69: 251-256.
 33. Instituto Nacional de Estadística y Censos. Censo 2011. Disponible en línea en: <http://www.inec.go.cr/Web/Home/GeneradorPagina.aspx>

ANEXOS

Anexo N° 1: Estadística

		KAPPA			
		P2			
		Positivo	Negativo	Inadecuado	
P1	Positivo	34	0	0	
	Negativo	9	23	1	
	Inadecuado	1	0	0	
		44	23	1	68
		P3			
		Positivo	Negativo	Inadecuado	
P1	Positivo	33	0	1	
	Negativo	2	29	2	
	Inadecuado	0	0	1	
		35	29	4	68
		P4			
		Positivo	Negativo	Inadecuado	
P1	Positivo	32	1	1	
	Negativo	2	28	3	
	Inadecuado	1	0	0	
		35	29	4	68
		Diagnóstico			
		Positivo	Negativo	Inadecuado	
P1	Positivo	33	1	0	
	Negativo	1	32	0	
	Inadecuado	0	1	0	
		34	34	0	68
		P3			
		Positivo	Negativo	Inadecuado	
P2	Positivo	35	5	4	
	Negativo	0	23	0	
	Inadecuado	0	1	0	
		35	29	4	68
		P4			
		Positivo	Negativo	Inadecuado	
P2	Positivo	35	6	3	
	Negativo	0	22	1	

	Inadecuado	0	1	0		
		35	29	4	68	
		Diagnóstico				
		Positivo	Negativo	Inadecuado		
P2	Positivo	34	10	0		
	Negativo	0	23	0		
	Inadecuado	0	1	0		
		34	34	0	68	
		P4				
		Positivo	Negativo	Inadecuado		
P3	Positivo	34	1	0		
	Negativo	0	28	1		
	Inadecuado	1	0	3		
		35	29	4	68	
		Diagnóstico				
		Positivo	Negativo	Inadecuado		
P3	Positivo	33	2	0		
	Negativo	0	29	0		
	Inadecuado	1	3	0		
		34	34	0	68	
		Diagnóstico				
		Positivo	Negativo	Inadecuado		
P4	Positivo	32	3	0		
	Negativo	1	28	0		
	Inadecuado	1	3	0		
		34	34	0	68	

Patólogo 1 vs. Patólogo 2

Unweighted Kappa

Observed Kappa	Standard Error	.95 Confidence Interval	
		Lower Limit	Upper Limit
0.6841			
<u>Method 1</u>	0.0872	0.5132	0.855
<u>Method 2</u>	0.0811	0.5251	0.8431

0.7128	maximum possible unweighted kappa, given the observed marginal frequencies
0.9597	observed as proportion of maximum possible

Patólogo 1 vs. Patólogo 3

Unweighted Kappa

Observed Kappa	Standard Error	.95 Confidence Interval	
		Lower Limit	Upper Limit
0.8625			
<u>Method 1</u>	0.0592	0.7465	0.9785
<u>Method 2</u>	0.0569	0.751	0.974

0.89	maximum possible unweighted kappa, given the observed marginal frequencies
0.9691	observed as proportion of maximum possible

Patólogo 1 vs. Patólogo 4

Unweighted Kappa

Observed Kappa	Standard Error	.95 Confidence Interval	
		Lower Limit	Upper Limit
0.78			
Method 1	0.0731	0.6368	0.9232
Method 2	0.0683	0.6462	0.9138

0.89	maximum possible unweighted kappa, given the observed marginal frequencies
0.8764	observed as proportion of maximum possible

Patólogo 2 vs. Patólogo 3

Unweighted Kappa

Observed Kappa	Standard Error	.95 Confidence Interval	
		Lower Limit	Upper Limit
0.7182			
Method 1	0.0823	0.5569	0.8795
Method 2	0.0758	0.5697	0.8667

0.7464	maximum possible unweighted kappa, given the observed marginal frequencies
0.9622	observed as proportion of maximum possible

Patólogo 2 vs. Patólogo 4

Unweighted Kappa

Observed Kappa	Standard Error	.95 Confidence Interval	
		Lower Limit	Upper Limit
0.69			
Method 1	0.0856	0.5223	0.8577
Method 2	0.0783	0.5366	0.8434

0.7464	maximum possible unweighted kappa, given the observed marginal frequencies
0.9244	observed as proportion of maximum possible

Patólogo 3 vs. Patólogo 4

Unweighted Kappa

Observed Kappa	Standard Error	.95 Confidence Interval	
		Lower Limit	Upper Limit
0.9197			
Method 1	0.0453	0.8309	1
Method 2	0.0446	0.8323	1

1	maximum possible unweighted kappa, given the observed marginal frequencies
0.9197	observed as proportion of maximum possible

Patólogo 1 correlación con Diagnóstico H&E

Unweighted Kappa

Observed Kappa	Standard Error	.95 Confidence Interval	
		Lower Limit	Upper Limit
0.913			
Method 1	0.0491	0.8168	1
Method 2	0.0484	0.8181	1

0.971	maximum possible unweighted kappa, given the observed marginal frequencies
0.9403	observed as proportion of maximum possible

Patólogo 2 correlación con Diagnóstico H&E

Unweighted Kappa

Observed Kappa	Standard Error	.95 Confidence Interval	
		Lower Limit	Upper Limit
0.6812			
Method 1	0.088	0.5087	0.8537
Method 2	0.0824	0.5198	0.8426

0.6812	maximum possible unweighted kappa, given the observed marginal frequencies
1	observed as proportion of maximum possible

Patólogo 3 correlación con Diagnóstico H&E

Unweighted Kappa

Observed Kappa	Standard Error	.95 Confidence Interval	
		Lower Limit	Upper Limit
0.8333			
Method 1	0.065	0.706	0.9606
Method 2	0.0611	0.7136	0.953

0.8611	maximum possible unweighted kappa, given the observed marginal frequencies
0.9677	observed as proportion of maximum possible

Patólogo 4 correlación con Diagnóstico H&E

Unweighted Kappa

Observed Kappa	Standard Error	.95 Confidence Interval	
		Lower Limit	Upper Limit
0.7778			
Method 1	0.0738	0.6332	0.9224
Method 2	0.0695	0.6417	0.9139

0.8611	maximum possible unweighted kappa, given the observed marginal frequencies
0.9033	observed as proportion of maximum possible

Anexo Nº 2: Hoja de Recolección de datos

Estudio: Correlación diagnóstica usando calretinina como instrumento adyuvante en resecciones intestinales por Enfermedad de Hirschsprung recibidas en el Servicio de Patología del Hospital Nacional de Niños de enero del año 2008 a diciembre del año 2012

Patólogo #:

#	Positivo	Negativo	Inadecuado para Diagnóstico, explique
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			
27			
28			
29			
30			
31			
32			
33			
34			
35			
36			
37			
38			
39			

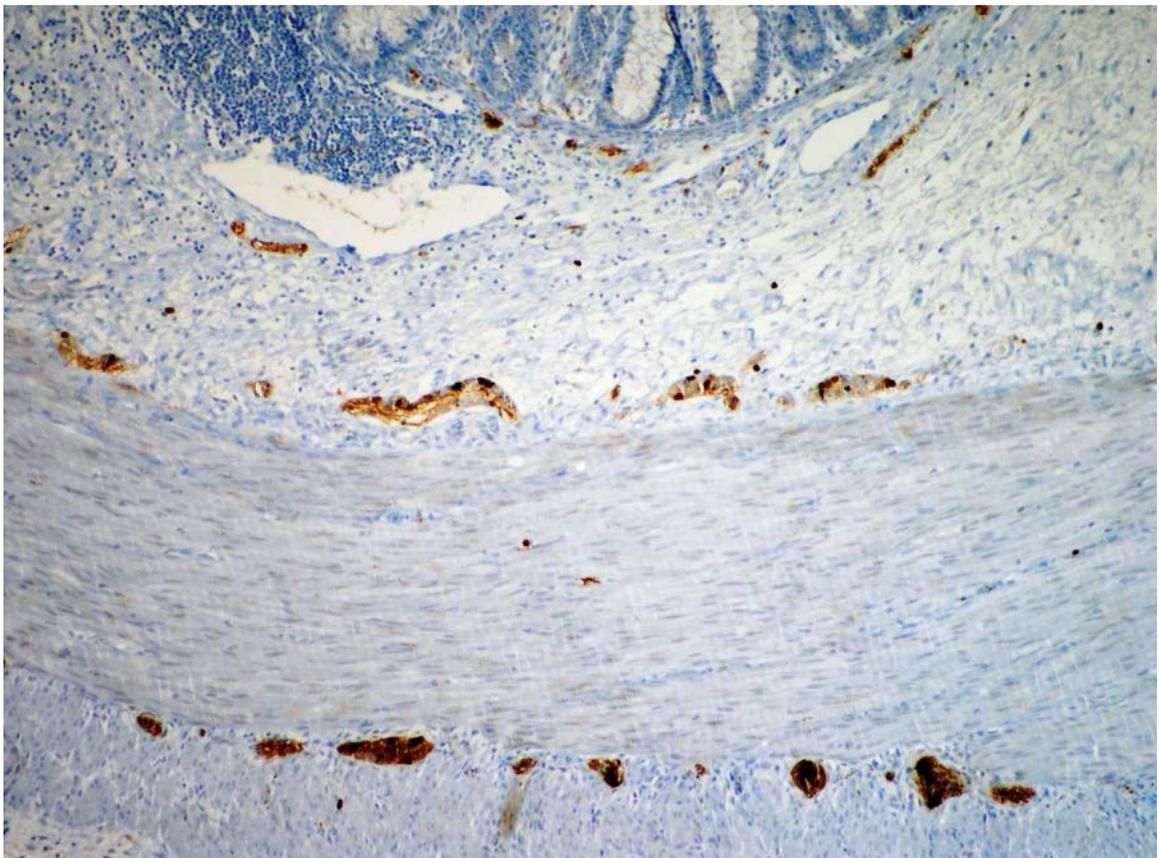
40			
41			
42			
43			
44			
45			
46			
47			
48			
49			
50			
51			
52			
53			
54			
55			
56			
57			
58			
59			
60			
61			
62			
63			
64			
65			
66			
67			
68			

Estudio: Correlación diagnóstica usando calretinina como instrumento adyuvante en resecciones intestinales por Enfermedad de Hirschsprung recibidas en el servicio de Patología del Hospital Nacional de Niños de enero del año 2008 a diciembre del año 2012

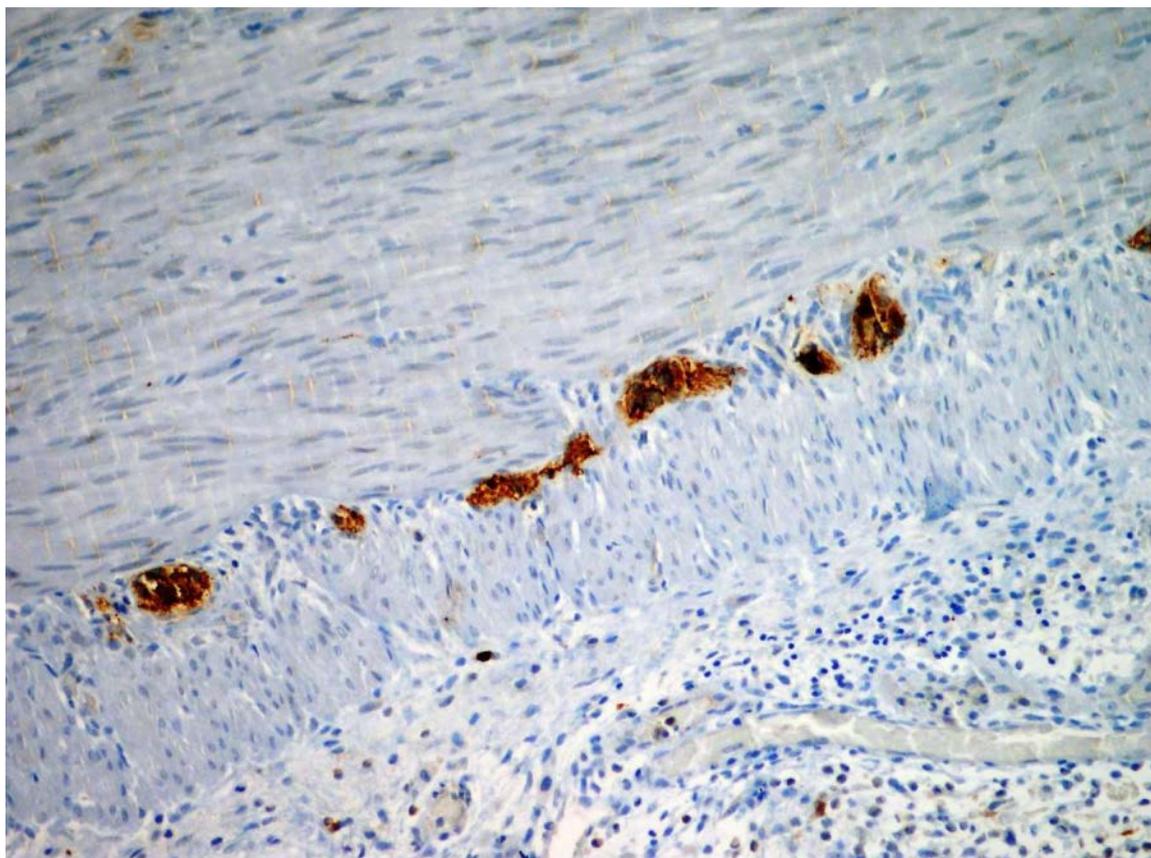
Llenar una hoja para cada caso (investigador principal)

Código de Caso	
Edad al momento del diagnóstico	
Sexo	
Provincia de residencia	
Número de biopsias necesarias para el diagnóstico original	
Número de niveles realizados a la biopsia diagnóstica original	
Tipo de procedimiento quirúrgico usado para la resección (DERTA, Duhamel)	

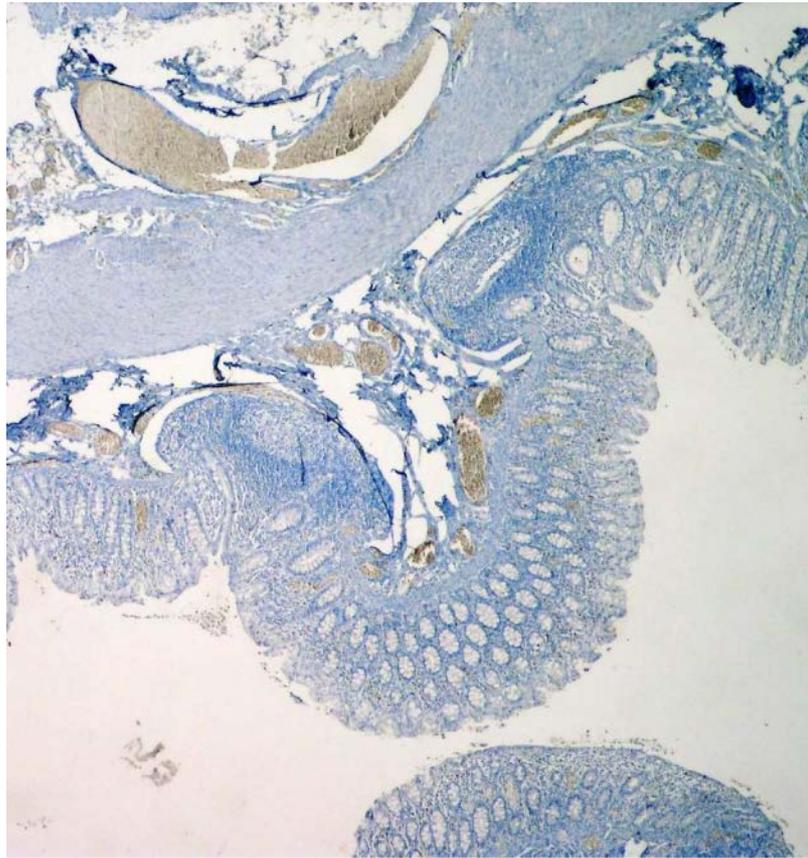
Anexo N° 3: Fotografías



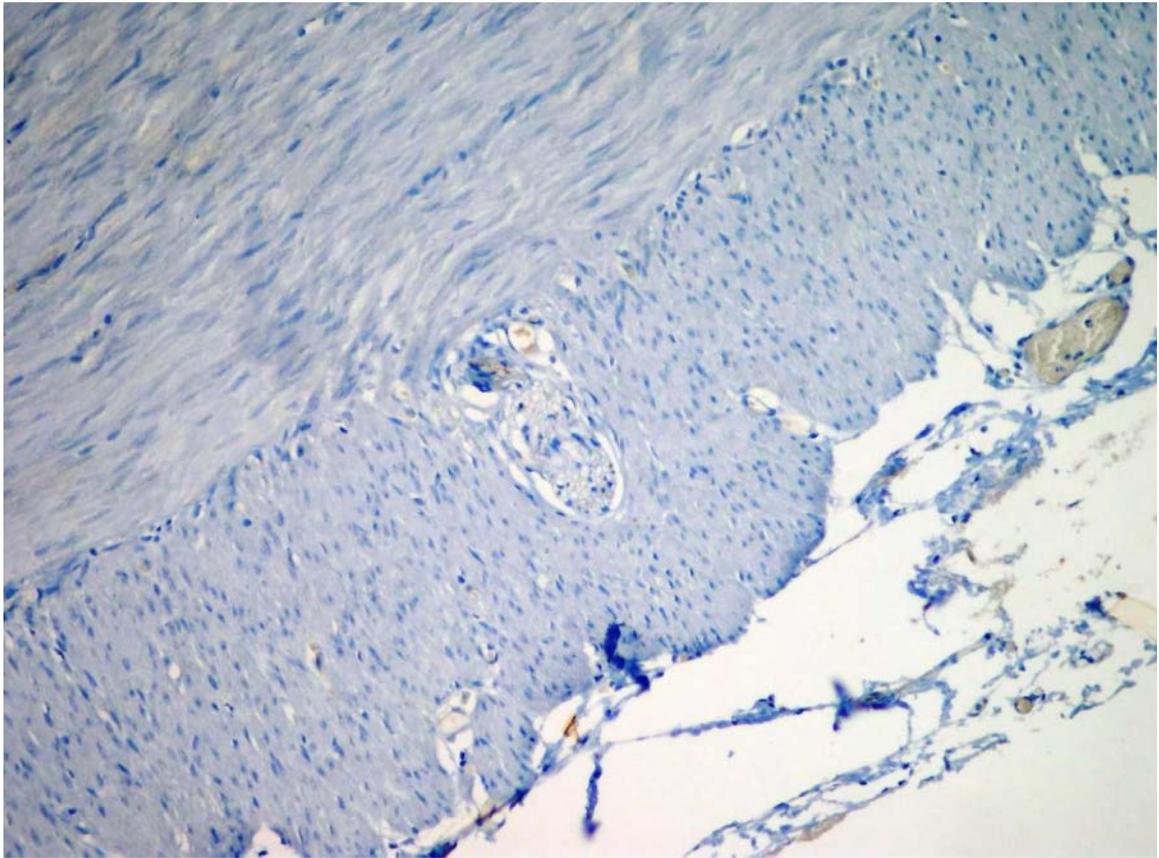
Tinción del calretinina en caso control, con positividad en plexo submucoso y en plexo mientérico, con extensión de neuritas a la lámina propia. 100x.



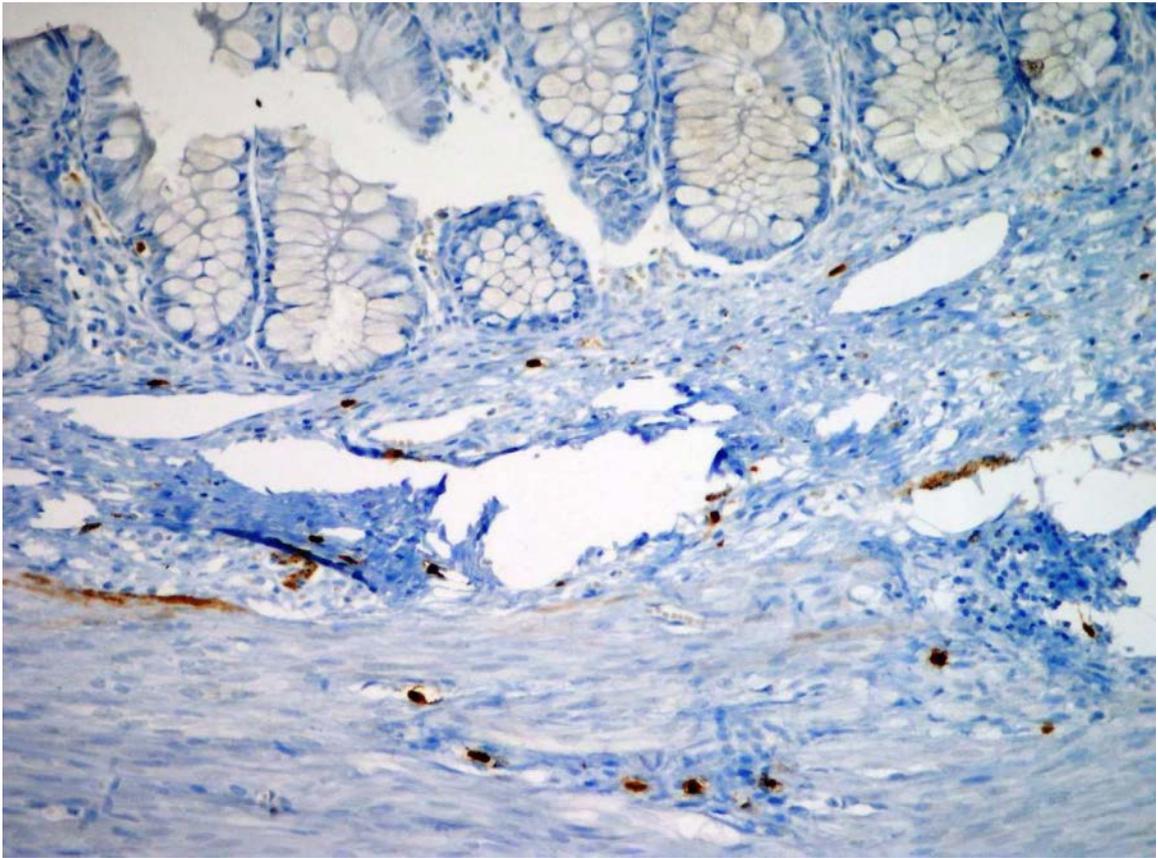
Tinción de calretinina en caso control, con positividad en plexo mientérico. 200x.



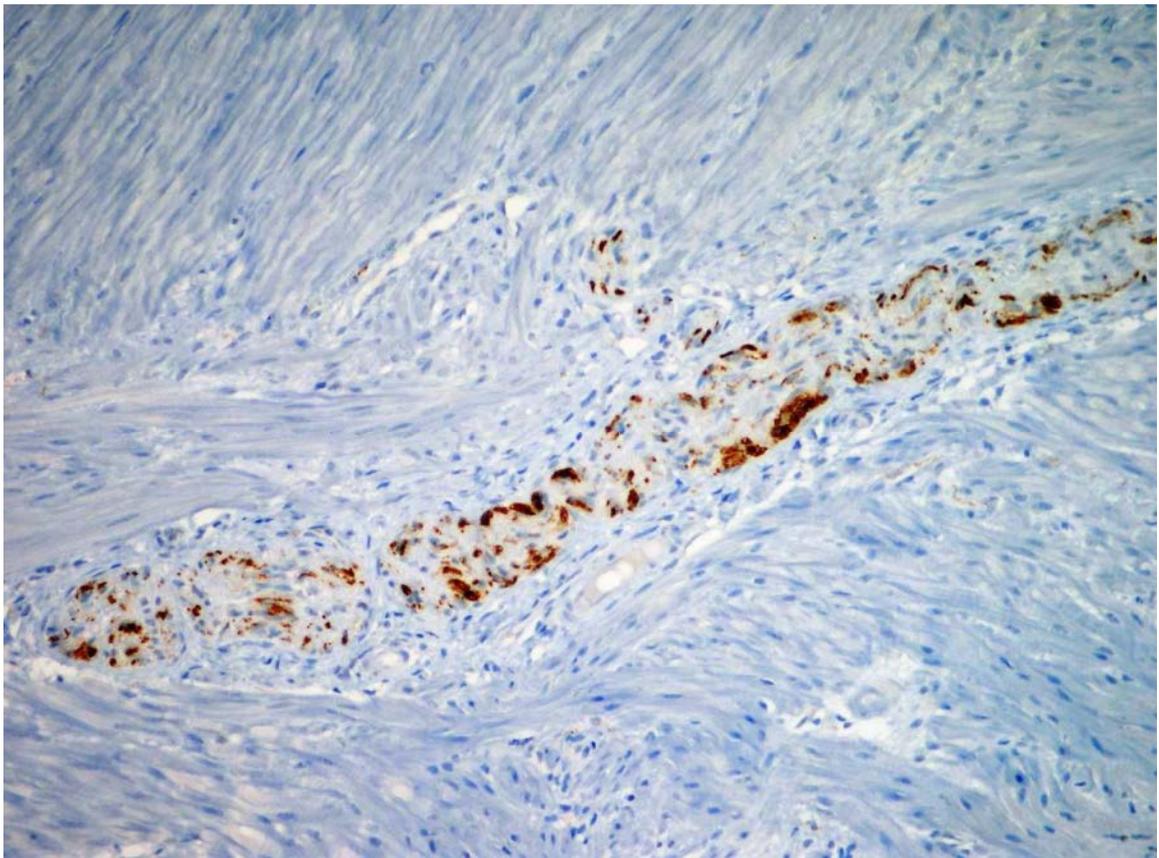
Caso de Enfermedad de Hirschsprung. Nótese la negatividad para calretinina.
40x.



Caso de enfermedad de Hirschsprung. Negatividad en el plexo mientérico.
200x.



Caso interpretado como inadecuado, el cual corresponde a un caso control, sin embargo a pesar de tener positividad en los filetes nerviosos, no presentaba positividad en submucosa ni en neuritas de la lámina propia. Esto podría corresponder fisiológicamente a zona de transición. 200x.



Caso interpretado como inadecuado, el cual corresponde a una porción que se valoró como agangliónica en hematoxilina eosina, sin embargo se puede observar tinción granular en los filetes nerviosos del plexo mientérico. Esto fisiológicamente podría corresponder a zona de transición a pesar de no encontrarse neuronas en la H&E. 200x.

Anexo N° 4: Aprobación del CLOBI