

Enfermedad de Hirschsprung: neurocristopatía de la migración y la diferenciación celular

Dr. Miguel Reyes Múgica*

* Departamentos de Patología y Pediatría. Escuela de Medicina, Universidad Yale New Haven, CT, EEUU.

Correspondencia: Miguel Reyes-Múgica MD Assistant Professor of Pathology and Pediatrics Yale University School of Medicine 310 Cedar Street, Rm LB20 New Haven, CT, 06520-8023, USA Tel: (203) 737-5097 Fax: (203) 785-3348 e-mail: Miguel.Reyes@Yale.Edu

RESUMEN La enfermedad de Hirschsprung o aganglionosis coli, es un padecimiento predominantemente pediátrico, en el que hay un defecto en la inervación del colon y se manifiesta por constipación intermitente crónica que alterna con evacuaciones explosivas. El segmento colónico involucrado carece de la capacidad de relajación y funciona como una zona de obstrucción, lo cual produce que el segmento proximal se dilate enormemente. El diagnóstico requiere de la participación de varias disciplinas, incluyendo la cirugía pediátrica, gastroenterología, radiología y anatomía patológica. El avance en los conocimientos relevantes en esta área ha sido significativo en los últimos años, especialmente en lo referente a la migración defectuosa de los precursores de las células ganglionares colónicas provenientes de las crestas neurales, así como los aspectos genéticos de la enfermedad. En este artículo se revisan los aspectos de la patología diagnóstica y los puntos más importantes de la biología de la enfermedad de Hirschsprung.

Palabras clave: Enfermedad de Hirschsprung, neurocristopatía, crestas neurales, constipación, megacolon.

SUMMARY Hirschsprung disease or aganglionosis coli, is a predominantly pediatric condition, in which there is an innervation defect of the colon, manifested by chronic intermittent constipation alternating with explosive evacuations. The involved colonic segment is unable to relax and acts as an area of obstruction, which causes the proximal segment to dilate enormously. The diagnosis requires participation from several specialties, including pediatric surgery, gastroenterology, radiology and anatomic pathology. In recent years, significant progress in relevant knowledge of this area has been obtained, in particular about defective migration of the neural crest-derived colonic ganglion cell precursors, as well as the genetic aspects of the disease. This article reviews the diagnostic anatomic pathology and the most relevant points about the biology of Hirschsprung disease.

Key words: Hirschsprung disease, neurocristopathy, neural crests, constipation megacolon.

Descrita originalmente por el pediatra danés, Dr. Harald Hirschsprung en 1888,¹ la enfermedad de Hirschsprung (EH) es un padecimiento generalmente congénito, de presentación más frecuentemente neonatal, caracterizado clínicamente por constipación, distensión abdominal, vómito y evacuaciones explosivas. Las manifestaciones clínicas varían en gravedad desde obstrucción intestinal neonatal que amerita cirugía inmediata, hasta retención meconial o fecal transitoria. La EH se presenta con una frecuencia de 1 en 5,000 nacidos vivos.² La mayoría de los casos son esporádicos, pero también los hay con agregación familiar, especialmente los de segmento largo (*vide infra*). Hay un marcado predominio del sexo mas-

culino (5:1), que tiende a disminuir en forma proporcional a la longitud del segmento intestinal afectado. La mayoría de los casos de EH afectan el recto-sigmoides (75%), seguidos de los casos de segmento largo donde la aganglionosis se extiende hasta el colon transverso (15%); aganglionosis total del colon (5%); y la forma de segmento corto o ultra corto que involucra la porción más distal del recto (3-5%).³ Aunque son más frecuentes los casos de presentación solitaria, existe asociación con muchos otros padecimientos tales como síndrome de Down, malformaciones cardíacas (especialmente tronco-conales), otras malformaciones del tubo digestivo, neurofibromatosis, síndrome de Waardenburg, maldición

de Ondine (síndrome de Haddad), neoplasia endocrina múltiple, neuroblastoma, etc.,³⁻⁷ muchos de ellos pertenecientes al grupo de las neurocristopatías.⁸

El diagnóstico de la EH clásica requiere de la sospecha clínica, nacida ante un paciente con constipación neonatal, distensión abdominal y dilatación de un segmento de colon proximal a una zona terminal de constricción, demostrada mediante estudios radiológicos. Una vez que se sospecha la enfermedad, debe efectuarse el estudio histológico por medio de biopsias submucosas del colon. Si el diagnóstico histopatológico es de plexos agangliónicos (*vide infra*), debe procederse quirúrgicamente de manera inmediata a colocar una colostomía derivativa que alivia la distensión abdominal y permite que el segmento proximal dilatado mejore. Frecuentemente, en este acto quirúrgico se pueden tomar biopsias adicionales para evaluar la extensión de la enfermedad. Posteriormente se procede a una corrección definitiva cuya naturaleza dependerá de la preferencia del cirujano y las condiciones clínico-patológicas del caso. Durante este tiempo quirúrgico se requiere de la evaluación histopatológica transoperatoria de los plexos nerviosos del colon terminal, con cortes por congelación.

Desde el punto de vista histológico, se requiere de una amplia comunicación entre el cirujano y el patólogo, estableciendo una correlación clínico-patológica que permita hacer el diagnóstico con precisión, así como para lograr el procesamiento ideal de la biopsia y evitar la necesidad de repetir este procedimiento. Histopatológicamente la EH se caracteriza por una ausencia segmentaria distal de células ganglionares (CG) parasimpáticas en los plexos nerviosos entéricos, y esta alteración es la condición *sine qua non* para establecer el diagnóstico. Excelentes revisiones de los cambios histológicos en EH se encuentran disponibles.^{9,10}

La histología normal de la inervación colónica comprende tres plexos nerviosos: a) de Meissner (submucoso superficial); b) de Henle (submucoso profundo); c) de Auerbach (intramural, entre las dos capas de músculo de la *muscularis propria*). Estos plexos están formados por dos poblaciones distintas, ambas originadas por precursores que migran desde las crestas neurales: CG y células gliales especializadas de sostén (algunas veces llamadas «células de Schwann», aunque difieren de éstas).¹¹ Durante la evaluación histológica inicial, el objetivo es la identificación de CG en el plexo submucoso superficial de Meissner, o por el contrario confirmar su ausencia. Debe recordarse que la distribución tisular de CG es muy irregular, y en condiciones normales se encuentran aproximadamente 17 de ellas por mm² de intestino,¹² o 7/mm en cortes transversales y longitudinales del colon.¹³ Debido a lo irregular en la distribución de las CG, se necesitan cortes seriados para evitar

al máximo la posibilidad de pasar por alto alguna de ellas cuando se examina una biopsia al microscopio¹³ (Figura 1).



Figura 1A.



Figura 1. A) Vista panorámica de una biopsia submucosa rectal adecuada. La mucosa y la submucosa se encuentran bien orientadas. (Hematoxilina y Eosina, X40) B) Apariencia característica en forma de roseta de las células ganglionares en el plexo de Meissner de un paciente de un mes de edad; nótese el aspecto inmaduro. (Hematoxilina y Eosina, x 200).

En general es mucho más fácil descartar la EH al observar CG, que confirmar el diagnóstico ante la ausencia de éstas. Un hallazgo que apoya el diagnóstico de EH es la presencia de «troncos nerviosos hipertróficos» reemplazando los plexos normogangliónicos (*Figura 2*). Esto sin embargo no se encuentra en todos los casos, particularmente en aquellos de segmento largo, en la mayoría de los cuales simplemente no hay plexos^{9,12,14} (*Figura 3*). La identificación de CG es difícil cuando se carece de experiencia, o en recién nacidos, donde su morfología puede ser inmadura. En esos casos es recomendable el uso de tinciones inmunohistoquímicas con anticuerpos que se encuentran disponibles en el mercado para facilitar la búsqueda de CG: neurofilamentos, S-100, enolasa neuronal específica, y catepsina D entre otras.^{15,16}

Una técnica de histoquímica enzimática que ha revolucionado el estudio histológico de los casos en que se sospecha EH es la detección de acetilcolinesterasa. Esta enzima se encuentra aumentada en el colon agangliónico de los pacientes con EH, y su detección en un patrón anormal, aunada a la ausencia de CG es un elemento que apoya notablemente el diagnóstico de aganglionosis coli¹⁷⁻¹⁹ (*Figura 4*).

Desde el punto de vista histopatológico, el abordaje diagnóstico inicial que se recomienda es el siguiente:¹²

1. Deben tomarse dos fragmentos de mucosa y submucosa colónica (biopsias por succión o por pellizcamiento) de la zona de constricción, por arriba de la línea pectínea (normalmente hipogangliónica), es decir, por lo menos 2 o 3 cm por encima de la margen del ano, dependiendo de la edad del paciente (2 cm en recién nacidos; 3 cm en lactantes).
2. Ambos fragmentos deben colocarse en papel filtro o «secante» orientados de tal manera que la submucosa esté en contacto con el papel y la mucosa represente la superficie libre, y transportarse inmediatamente, cubiertos con una gasa húmeda en solución fisiológica, al laboratorio de patología para su procesamiento.
3. El primer fragmento debe congelarse incluido en OCT[®] para posibles estudios de histoquímica enzimática para acetilcolinesterasa; el segundo fragmento debe orientarse de la misma manera que el cirujano lo hizo en el papel, fijarse en formalina y procesarse mediante la técnica de inclusión en parafina (se puede recurrir a la pre-inclusión en agar, aunque esto puede interferir con el ulterior procesamiento de la biopsia). Deben prepararse por lo menos 50 cortes seriados a partir del segundo fragmento, teñidos con H&E.

4. Una cuidadosa revisión histológica generalmente permite la identificación de CG en el plexo submucoso superficial (Meissner). En casos de aganglionosis y después de revisar los 50 cortes seriados, deben solicitarse cortes adicionales en el bloque, incluido en parafina y preparar aproximadamente 5 cortes por congelación del bloque en OCT[®] para tinción histoquímica de acetilcolinesterasa. Una vez que los cortes por congelación se han obtenido, el tejido congelado debe fijarse en formalina y cortarse previa inclusión en parafina para la obtención de secciones adicionales teñidas con H&E y tinciones de inmunohistoquímica, incluidas enolasa neuronal específica, S-100 y catepsina D.
5. La combinación de ausencia de CG, presencia de troncos nerviosos con aumento en la densidad estructural (hipertróficos) y patrón anormal de acetilcolinesterasa es diagnóstica de aganglionosis. La identificación de una sola célula ganglionar descarta el diagnóstico de aganglionosis (*vide infra*).

Cuando ya se ha establecido el diagnóstico de EH, debe planearse la colostomía derivativa, nuevamente en comunicación con el patólogo. En esa oportunidad, debe llevarse a cabo una evaluación transoperatoria de la zona de la colostomía para asegurarse de que es normogangliónica. Para tal efecto es conveniente teñir un corte fresco sin fijar, con azul de toluidina o Giemsa aplicados directamente a la laminilla agregando unas gotas de agua por 1 minuto, y lavar con agua corriente. La observación microscópica se hace en cortes frescos, sin aplicar medio de montaje.²⁰ Secciones adicionales teñidas con H&E deben prepararse para una más completa evaluación, aunque frecuentemente no son necesarias.

Existen variantes de EH que tienen características histológicas distintas de la forma clásica y que requieren cuidado especial durante la evaluación microscópica. Éstas incluyen la forma de segmento ultracorto y la de segmento largo. En la primera, el segmento agangliónico es generalmente muy corto y bajo, por lo que las biopsias tomadas a 3 cm por arriba del margen anorrectal frecuentemente son positivas para CG, y el diagnóstico generalmente requiere más de una biopsia. En la forma de segmento largo, usualmente no se observa la «hipertrofia» de troncos nerviosos y por el contrario, no hay elementos pertenecientes al plexo neural en absoluto. De manera excepcional se pueden observar casos de segmento largo en los que en medio del área agangliónica, se encuentra una zona con CG (referida en la literatura en inglés como «skip area»); estos casos son muy difíciles de diagnosticar y casi siempre se re-

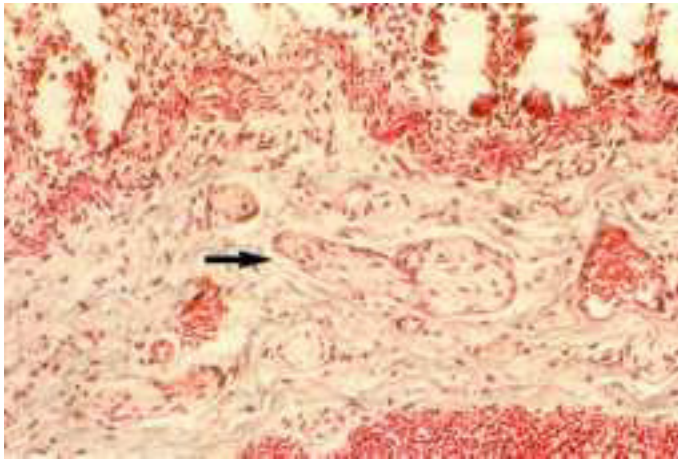


Figura 2. Paciente con enfermedad de Hirschsprung en el que los plexos nerviosos intestinales se encuentran reemplazados por «troncos nerviosos hipertróficos». (Tricrómico de Masson, x 200).

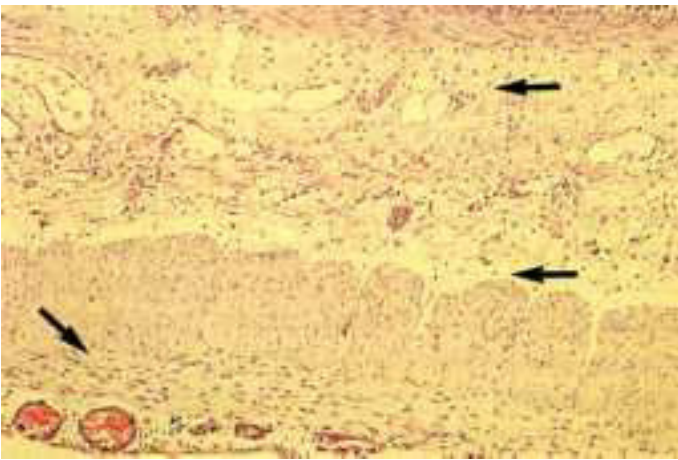


Figura 3. Paciente con enfermedad de Hirschsprung de «segmento largo». Hay ausencia total de plexos nerviosos intestinales. (Hematoxilina y Eosina, x 100).

quiere más de una biopsia, o bien la resección del segmento afectado para la adecuada documentación de la lesión.²¹

El diagnóstico de hipoganglionosis es muy controversial y poco reproducible. La zona de transición entre la porción dilatada y el área de constricción es frecuentemente hipogangliónica o muestra rasgos de displasia neuronal intestinal.

La displasia neuronal intestinal probablemente incluye varias anomalías de la inervación intestinal, cuyas manifestaciones clínicas son variadas y pueden simular notablemente EH. Sólo aquellos casos con un obvio incremento en CG, las cuales además tienen un patrón de distribución anormal (lámina propia, «ganglios gigantes») deben ser designados de esta manera, sin embargo, el hallazgo ocasional de una célula ganglionar



Figura 4. Biopsia submucosa de un paciente con enfermedad de Hirschsprung. La tinción de acetilcolinesterasa demuestra fibras anormalmente gruesas y bien definidas (en color café) en la muscularis mucosae y lámina propia. (Corte por congelación teñido con el método histoquímico para detectar acetilcolinesterasa, x 200).

en el espesor de la lámina propia no es suficiente para diagnosticar displasia neuronal intestinal.²²

ASPECTOS BIOLÓGICOS DE LA EH: PATOGENESIS

Las crestas neurales se dividen en cuatro territorios a partir de los cuales se derivan múltiples estructuras de muy diversa histología y función. Estos territorios son: cefálico, cardíaco, del tronco y, vagal y sacro. Las células indiferenciadas de las crestas neurales deben migrar largos trayectos hasta alcanzar sus destinos finales, donde terminan su proceso de diferenciación. En el caso de los plexos nerviosos entéricos, es el territorio vagal y sacro el que produce los elementos precursores migratorios.²³

Aunque los mecanismos que permiten la migración y diferenciación celular desde las crestas neurales hasta la pared intestinal se conocen solo parcialmente, ya existen evidencias de que defectos en ellos explican por lo menos algunos casos de EH, lo cual ha abierto una nueva avenida en la investigación enfocada al estudio de este campo.

La etiología de la EH es probablemente multifactorial, y se han postulado diversas teorías al respecto. De hecho es interesante hacer notar que, desde su descripción original hasta la publicación de Swenson y Bill en 1948 (ver referencia 24) no se conocía con certeza la relación entre la ausencia de CG y la característica dilatación colónica. Originalmente se pensaba que la aganglionosis era un efecto de la dilatación colónica y no su causa. De esto es prueba el hecho de que el tratamiento recomen-

dado por Whitehouse y cols. en 1943 consistía en la resección del segmento dilatado del colon.²⁴

En la actualidad se acepta que la causa de la EH está relacionada con factores que regulan la migración y diferenciación de las células de las crestas neurales que dan origen a las CG parasimpáticas del colon. Estos elementos precursores migran desde el territorio vagal y sacro de las crestas neurales e invaden la pared del colon, donde finalmente alcanzan su diferenciación terminal mediante la interacción con elementos del tejido conectivo, especialmente con laminina y otras moléculas de adhesión.^{11,26} Anormalidades en los procesos migratorios, o en el ambiente extracelular del intestino que permita el establecimiento, la diferenciación de CG en este sitio, o su supervivencia dan lugar a la aganglionsis con el consecuente efecto patológico en la función peristáltica. Del mismo modo, otras células provenientes de las crestas neurales pueden verse afectadas y en un mismo paciente pueden observarse defectos más complejos de migración o diferenciación de la cresta neural, produciendo asociaciones de EH con alteraciones pigmentarias (síndrome de Waardenburg), neuroblastoma, y otras entidades.

En el humano, por lo menos tres genes han sido involucrados en EH: el proto-oncogén C-RET, el gen del receptor B de endotelina y el gen de la endotelina 3. Mutaciones de diversos tipos se han encontrado en estos genes en casos familiares y esporádicos de EH. No se conoce exactamente el mecanismo mediante el cual estas mutaciones producen el fenotipo anormal, pero con base en observaciones hechas en modelos experimentales, se puede sugerir que tanto las células migratorias de las crestas neurales, como el medio ambiente celular e intercelular que las rodea durante su migración, deben expresar proteínas que forman complejos ligando-receptor, que permiten la adecuada distribución y diferenciación de las CG.

En el caso del proto-oncogén C-RET (REarranged during Transfection), localizado en el cromosoma 10 (10q11,2), el producto codificado es una proteína de membrana con estructura de kinasa de tirosina, que se expresa en derivados de las crestas neurales y cuya mutación se ha identificado en varias formas de carcinoma tiroideo y familias con neoplasia endocrina múltiple 2 (MEN2). Mutaciones en C-RET son responsables del 50% de casos familiares de EH y 15-20% de casos esporádicos.^{27,28} La destrucción experimental específica del C-RET («knock-out» genético) en embriones de ratón, produce un fenotipo con agenesia/displasia renal y aganglionsis coli.²⁹ Por otro lado, recientemente el fac-

tor neurotrópico derivado de línea celular glial (glial cell line-derived neurotrophic factor) (GDNF), miembro de la superfamilia TGF B (transforming growth factor) y cuyo gen se localiza en el cromosoma 5 (5p12-p13.1)³⁰ se ha identificado como el ligando del producto de C-RET, ya que la destrucción selectiva experimental del gen GDNF origina un fenotipo muy similar al del «knock-out» de C-RET, con agenesia/displasia renal asociada a aganglionsis coli.³¹⁻³³ Obviamente, GDNF (y una molécula asociada, el GDNF a) es un candidato ideal para buscar mutaciones asociadas a EH, ya que tanto C-RET como GDNF parecen ser indispensables para el desarrollo renal normal y la adecuada inervación colónica, y se puede predecir que será posible detectar mutaciones en GDNF en pacientes con EH. En un estudio preliminar realizado en nuestra institución, de 8 casos histológicamente comprobados de EH examinados para identificar mutaciones del gen GDNF, ninguno ha resultado positivo (Iyengar S, Lin P, Kidd KK, Reyes-Múgica M, observaciones no publicadas). Actualmente nos encontramos acumulando un mayor número de pacientes y familiares de estos para ampliar la búsqueda de mutaciones tanto en GDNF como en otros genes potencialmente afectados. Muy recientemente, dos grupos han descrito de manera independiente 3 mutaciones en el gen GDNF en pacientes con EH, sin embargo, hasta este momento parece que las mutaciones en este gen no son suficientes para causar la enfermedad.^{34,35} Estudios adicionales sobre GDNF y otras moléculas asociadas son necesarios para establecer mejor su papel en EH.

En este contexto, es interesante mencionar que aunque la EH no se asocia comúnmente a malformaciones del riñón, Sinnassamy y cols. describieron una serie de 4 pacientes con EH y anomalías renales asociadas,³⁶ aunque en la época de su publicación se desconocían los elementos genéticos que involucran al RET y al GDNF. Así mismo, el autor ha tenido recientemente la oportunidad de estudiar un caso de autopsia con EH asociada a displasia quística renal, mismo que está siendo analizado para detectar mutaciones genéticas (Reyes-Múgica M, manuscrito en preparación).

La participación de proteínas del tejido conectivo (laminina y colágena tipo IV) en la adecuada diferenciación y supervivencia de la CG una vez que alcanzan su destino al final del proceso migratorio, parece ser muy importante. Rothman y colaboradores³⁷ han sugerido que hay un defecto intrínseco en la regulación de estas proteínas en los intestinos agangliónicos de ratones *Is/Is*, que representan uno de los modelos animales experimentales de EH en los que hay mutación del gen de

endotelina 3. En estos animales hay un incremento en la expresión de ambas proteínas, mismo que no se observa en animales con destrucción experimental selectiva (knockout) de C-RET, otro de los modelos experimentales de EH.³⁷ Del mismo modo Kapur y colaboradores, quienes han caracterizado el patrón de migración de las células de las crestas neurales en otro más de los modelos experimentales de EH, el ratón Dom (dominant megacolon), han sugerido que señales anormales del microambiente participan en la aganglionosis intestinal.³⁸

El hallazgo de anomalías genéticas en EH no solamente abre nuevas posibilidades para entender los mecanismos responsables del desarrollo de las crestas neurales, sino que proporciona un método nuevo que podría permitir el diagnóstico del padecimiento, e incluso su detección prenatal y eventualmente su tratamiento por medios distintos a la cirugía.

Una excelente revisión actualizada sobre la patología y patogénesis de la EH, ha aparecido recientemente.³⁹

REFERENCIAS

- Hirschsprung H. Stuhltragheit Neugeborener in Folge von Dilatation und Hypertrophie des Colons. *Jahrb Kinderh* 1888; 27: 1-7.
- Loening-Baucke V. Encopresis and soiling. *Pediatr Clin North Am* 1996; 43: 279-298.
- Dahms BB. The gastrointestinal tract. In: Stocker JT & Dehner LP. *Pediatric Pathology*, Philadelphia: Lippincott Co, 1992: 653.
- Joshi VV. *Common problems in pediatric pathology*, Igaku-Shoin, Nueva York: 1994: 202.
- Haddad GG et al. Congenital failure of automatic control of ventilation, gastrointestinal motility and heart rate. *Medicine* 1978; 57: 517-526.
- Verloes A et al. Ondine-Hirschsprung syndrome (Haddad syndrome). *Eur J Pediatr* 1993; 152: 75-77.
- Stovroff M, Dykes F, Teague G. The complete spectrum of neurocristopathy in an infant with congenital hypoventilation, Hirschsprung's disease and neuroblastoma. *J Pediatr Surg* 1995; 30: 1218-1221.
- Bolande RP. The neurocristopathies: a unifying concept of disease arising in neural crest maldevelopment. *Hum Pathol* 1974; 5: 409-429.
- Meier-Ruge W. Hirschsprung's disease: Its aetiology, pathogenesis and differential diagnosis. *Curr Top Pathol* 1974; 59: 131.
- Weinberg A. Hirschsprung's disease- A pathologist's view. *Perspect Pediatr Pathol* 1975; 2: 207-39.
- Gershon MD, Chalazonitis Alcmène, Rothman TP. From neural crest to bowel: development of the enteric nervous system. *J Neurobiol* 1993; 24: 199-214.
- Qualman SJ, Murray R. Aganglionosis and related disorders. *Hum Pathol* 1994; 25: 1141-1149.
- Smith VV. Intestinal neuronal density in childhood: a baseline for the objective assessment of hypo- and hyperganglionosis. *Pediatr Pathol* 1993; 13: 225-237.
- Kapur RP. Contemporary approaches toward understanding the pathogenesis of Hirschsprung disease. *Pediatr Pathol* 1993; 13: 83-100.
- Robey SS, Kuhajda FP, Yardley JH. Immunoperoxidase stains of ganglion cells and abnormal mucosal nerve proliferations in Hirschsprung's disease. *Hum Pathol* 1998; 19: 432-437.
- Abu-Alfa AK, Kuan S, West AB, Reyes-Múgica M. Cathepsin D in intestinal ganglion cells: a potential aid to diagnosis in suspected Hirschsprung's disease. *Am J Surg Pathol* (in press).
- Lake BD, Puri P, Nixon HH, Claireaux AE. Hirschsprung's disease. An appraisal of histochemically demonstrated acetylcholinesterase activity in suction rectal biopsy specimens as an aid to diagnosis. *Arch Pathol Lab Med* 1978; 102: 244-247.
- Wakely PE, McAdams AJ. Acetylcholinesterase histochemistry and the diagnosis of Hirschsprung's disease: a 3 1/2 year experience. *Pediatr Pathol* 1984; 2: 35-46.
- Kobayashi H, O'Briain S, Hirakawa H, Wang Y, Puri P. A rapid technique of acetylcholinesterase staining. *Arch Pathol Lab Med* 1994; 118: 1127-1129.
- Weinberg AG. Toluidine blue stain for ganglion cells. *Pediatr Pathol* 1995; 15: 829.
- Kapur RP, deSa DJ, Luquette M, Jaffe R. Hypothesis: pathogenesis of skip areas in longsegment Hirschsprung's disease. *Pediatr Pathol & Lab Med* 1995; 15: 23-37.
- Schofield DE, Yunis EJ. What is intestinal neuronal dysplasia. *Pathol Ann* 1992; 1: 249-262.
- Gilbert SF. *Developmental biology*, 4a. ed, Sunderland, MA: Sinauer, 1994: 272.
- Swenson O. My early experience with Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg* 1989; 24: 839-845.
- Delannet M, Martin F, Bossy B, Cheresse DA, Reichardt LF, Duband JL. Specific role of the α VB1, α VB3 and α VB5 integrins in avian neural crest cell adhesion and migration on vitronectin. *Development* 1994; 120: 2687-2702.
- Parikh DH, Tam PKH, Van Velzen D, Edgar D. Abnormalities in the distribution of laminin and collagen type IV in Hirschsprung's disease. *Gastroenterol* 1992; 102: 1241-1246.
- Eng C. The RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2 and Hirschsprung's disease. *N Engl J Med* 1996; 335: 943-951.
- Iwashita T, Murakami H, Asai Naoya, Takahashi M. Mechanism of RET dysfunction by Hirschsprung mutations affecting its extracellular domain. *Hum Mol Genet* 1996; 10: 1577-1580.
- Schuchardt A, D'Agati V, Larsson-Blomberg L, Costantini F, Pachnis V. Defects in the kidney and enteric nervous system of mice lacking the tyrosine kinase receptor RET. *Nature* 1994; 367: 380-383.
- Schindelhauer D, Schuffenhauer S, Gasser T, Steinkasserer A, Meitinger T. The gene coding for glial cell line derived neurotrophic factor (GDNF) maps to chromosome 5p 12-p 13.1. *Genomics* 1995; 28: 605-607.
- Sánchez MP, Silos-Santiago I, Frisén J, He B, Lira SA, Barbacid M. Renal agenesis and the absence of enteric neurons in mice lacking GDNF. *Nature* 1996; 382: 70-73.
- Pichel JG, Shen L, Sheng HZ y cols. Defects in enteric innervation and kidney development in mice lacking GDNF. *Nature* 1996; 382: 73-76.
- Moore MK, Klein RD, Fariñas I y cols. Renal and neuronal abnormalities in mice lacking 19 GDNF. *Nature* 1996; 382: 76-83.
- Angrist M, Bolk S, Halushka M, Lapchak PA, Chakravarti A. Germline mutations in glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) and RET in a Hirschsprung's disease patient. *Nature Genet* 1996; 14: 341-344.
- Salomon R, Attié T, Pelet A y cols. Germline mutations of RET ligand GDNF are not sufficient to cause Hirschsprung disease. *Nature Genet* 1996; 14: 345-347.
- Sinnassamy P, Yazbeck S, Brochu P, O'Regan S. Renal anomalies and agenesis with total intestinal aganglionosis. *Int J Pediatr Nephrol* 1986; 7: 1-2.
- Rothman TP, Chen, J, Howard MJ y cols. Increased expression of laminin-1 and collagen (IV) subunits in the aganglionic bowel of 1s/1s, but not C-RET^{-/-} mice. *Dev Biol* 1996; 178: 498-513.
- Kapur RA, Livingston R, Doggett B, Sweetser DA, Siebert JR, Palmiter RD. Abnormal microenvironmental signal underlie intestinal aganglionosis in Dominant megacolon mutant mice. *Dev Biol* 1996; 174: 360-369.
- Kapur RP. Hirschsprung's disease: pathology and molecular pathogenesis. *Adv Pathol Lab Med* 1995; 8: 201-221.