



Enfermedad de Hirschsprung

La inmunohistoquímica como apoyo para el diagnóstico

Celestina Menchaca-Cervantes,^a Alicia Rodríguez-Velasco,^b
Guillermo Ramón-García,^a Mario Enrique Rendón-Macías^b

Hirschsprung's disease: the immunohistochemistry as ancillary method for the diagnosis

Background: the confirmatory diagnosis of Hirschsprung's disease is made by histopathological study. However, this procedure is limited with only hematoxylin and eosin staining, especially in biopsies of premature babies or when non-expert pathologists make the evaluation. The immunohistochemistry from ganglia cell calretinin has been used to reduce the risk of misdiagnosis. Our objective was to show the benefits of this antibody in diagnosis of Hirschsprung's disease in biopsy specimens.

Methods: we evaluated patients with histopathological diagnosis of Hirschsprung's disease made by hematoxylin and eosin staining. We determined if there was enough paraffin block for immunohistochemistry with two markers: calretinin and neurofilaments. Three controls of autopsy of children under 3 years of age with other diagnosis were included.

Results: of a total of 48 cases with histopathological diagnosis of Hirschsprung's disease only 13 had adequate tissue for immunohistochemistry. The immunohistochemistry confirmed the diagnosis in nine cases. In the other four cases there were initial misdiagnosis due to evidence of calretinin (ganglion cells) and, thus, Hirschsprung's disease was discarded.

Conclusions: the use of immunohistochemistry allows confirming the diagnosis of Hirschsprung's disease and reduce the risk of a false-positive result with only hematoxylin and eosin staining.

Key words

Hirschsprung disease
immunohistochemistry

Aunque poco frecuente (uno de cada 5000 recién nacidos vivos), la enfermedad de Hirschsprung es una de las primeras causas de obstrucción intestinal y cirugía abdominal en el recién nacido.^{1,2} Se define como la ausencia congénita de neuronas ganglionares en el plexo nervioso intestinal intrínseco, lo que condiciona sobrecontracción del segmento afectado.^{3,4} Actualmente se han establecido las bases patogénicas y los aspectos genéticos de la enfermedad, entre ellos se han descrito alrededor de 13 genes involucrados en la morfogénesis y diferenciación del sistema nervioso entérico.⁵

El diagnóstico inicial se basa en el cuadro clínico: constipación intermitente (en 66 % de los pacientes se inicia en el periodo neonatal), distensión abdominal y vómito. Si la constipación no tiene una causa mecánica (atresia intestinal, íleo meconial, malrotación o ano imperforado), debe pensarse en la enfermedad de Hirschsprung. El estudio radiológico simple y contrastado, en planos anteroposterior y lateral, permite apoyar el diagnóstico cuando hay un segmento estenosado (agangliónico), generalmente de recto y rectosigmoides (en 80 a 85 % de los casos), una zona de transición (más patente en el área rectosigmoidea) y una zona de dilatación proximal (gangliónica).⁶

La mayoría de los autores, no todos,⁷ acepta que antes de practicar la cirugía correctiva debe tenerse el diagnóstico de certeza, que se establece solo con la biopsia de la pared rectal, la cual tiene una sensibilidad y una especificidad cercana a 100 %, según el tipo y la calidad de las muestras, las técnicas histopatológicas y la experiencia del anatomopatólogo evaluador.

Durante el procedimiento de biopsia deben tomarse de dos a tres muestras, 2 o 3 cm por arriba de la línea dentada, para evitar la zona normal agangliónica y no pasar por alto los casos con segmento ultracorto (de 3 a 5 % de los casos). Para que pueda considerarse que la biopsia rectal por succión (recomendable por ser menos traumática para el paciente) se realizó de forma adecuada, la muestra debe contener submucosa; con la biopsia transmural generalmente se obtienen muestras que contienen todas las capas de la pared intestinal y se utiliza cuando no se tiene el equipo para la biopsia por succión.

Histopatológicamente, la enfermedad de Hirschsprung se caracteriza por la ausencia de células ganglionares parasimpáticas, frecuentemente acompañada de hipertrofia de los troncos nerviosos.⁸ Las dificultades de trabajar con muestras obtenidas mediante biopsia por succión estriban en que las células ganglionares en la submucosa son más pequeñas y están más esparcidas que en el plexo intramural y que la inmadurez normal del plexo nervioso en los neonatos (principalmente si son pretérmino) hace que se confundan con macrófagos, células de músculo liso o células de Schwann.⁹⁻¹¹

Introducción: el diagnóstico de certeza de la enfermedad de Hirschsprung es histopatológico, aunque puede ser erróneo si solo se utiliza hematoxilina y eosina, sobre todo en muestras de niños prematuros o evaluadas por patólogos inexpertos. Se ha recomendado la inmunohistoquímica para identificar las células ganglionares, lo que descarta la enfermedad. Nuestro objetivo es mostrar las ventajas de esta técnica.

Métodos: se evaluaron los casos de enfermedad de Hirschsprung con diagnóstico histopatológico mediante tinción con hematoxilina y eosina. Se realizó inmunohistoquímica para dos marcadores: la calretinina y los neurofilamentos. Se incluyeron tres muestras de tejido de autopsias de niños menores de tres años con colon sin alteraciones aparentes.

Resultados: de 48 casos con diagnóstico histopatológico de enfermedad de Hirschsprung, solo 13 tuvieron bloque de parafina con tejido suficiente. La inmunohistoquímica confirmó el diagnóstico en nueve. En los otros cuatro hubo error diagnóstico inicial, dada la evidencia de calretinina (células ganglionares) y con ello se descartó la enfermedad de Hirschsprung.

Conclusiones: el uso de la inmunohistoquímica para identificar calretinina permitió descartar el diagnóstico de enfermedad de Hirschsprung y evitar la emisión de diagnósticos falsos positivos.

Palabras clave

enfermedad de Hirschsprung
inmunohistoquímica

Resumen

En México, la técnica histopatológica más utilizada es la de tejido incluido en parafina y teñido solo con hematoxilina y eosina. Debido a la falta de uso de técnicas auxiliares que apoyen el diagnóstico histopatológico, es probable que entre los resultados existan algunos falsos positivos. En este punto es importante considerar que es más fácil descartar la enfermedad que confirmarla.

La histoquímica enzimática con acetilcolinesterasa, que tiene como propósito facilitar el reconocimiento de las células ganglionares, sigue siendo controvertida.^{12,13} Con el advenimiento de la inmunohistoquímica como técnica auxiliar en el diagnóstico histopatológico se han propuesto varios anticuerpos que permiten identificar con certeza las células ganglionares. Entre los marcadores que han demostrado más utilidad están los anticuerpos para calretinina, con los que se alcanzan sensibilidad y especificidad de 100 %.^{14,15}

El objetivo de la presente investigación fue valorar la utilidad de la inmunohistoquímica como recurso auxiliar para el diagnóstico de la enfermedad de Hirschsprung en muestras de biopsias de un hospital de tercer nivel de atención.

Métodos

Estudio retrospectivo, transversal y descriptivo. De los reportes quirúrgicos del Servicio de Patología del Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social, se seleccionaron los casos con diagnóstico de enfermedad de Hirschsprung establecido solo mediante tinción con hematoxilina y eosina, recibidos entre enero de 2005 y diciembre de 2011, que tuvieran bloque de parafina para realizar el análisis inmunohistoquímico con anticuerpos para calretinina y para neurofilamentos. La calretinina es positiva (y descarta la enfermedad)

cuando se tiñe el citoplasma de células localizadas en los plexos nerviosos. Los neurofilamentos son positivos cuando se marcan las fibras nerviosas de los plexos. Se incluyeron pacientes de uno y otro sexo y de edad menor de 17 años. Los datos demográficos y del tipo de procedimiento utilizado para la biopsia se obtuvieron de la solicitud del estudio. Como controles positivos se incluyeron tres muestras de colon conseguidas de autopsias a niños menores de tres años sin alteraciones histopatológicas. Se excluyeron las muestras con insuficiente tejido incluido en parafina o que eran de mala calidad (según la apreciación del patólogo). Todos los casos seleccionados fueron revisados simultáneamente por los tres patólogos.

No fue necesario disponer del consentimiento informado de los padres de los pacientes por tratarse de material indispensable para el diagnóstico.

Cuadro I Características de 13 pacientes con obstrucción intestinal según resultado del análisis inmunohistoquímico con anticuerpos para calretinina

	Con Hirschsprung (calretinina -) n = 9 (69 %)*	Sin Hirschsprung (calretinina +) n = 4 (31 %)	p**
Sexo			
Masculino	5	2	
Femenino	4	2	
Edad (años)			
< 1	2	2	
1	2	1	(0.87)
2-3	2	1	
5-6	3	0	
Tipo de biopsia			
Transmural	5	2	
Endoscópica	4	2	

*Valor predictivo positivo para el diagnóstico con hematoxilina y eosina, IC 95 % = 38.6-90.1. ** χ^2

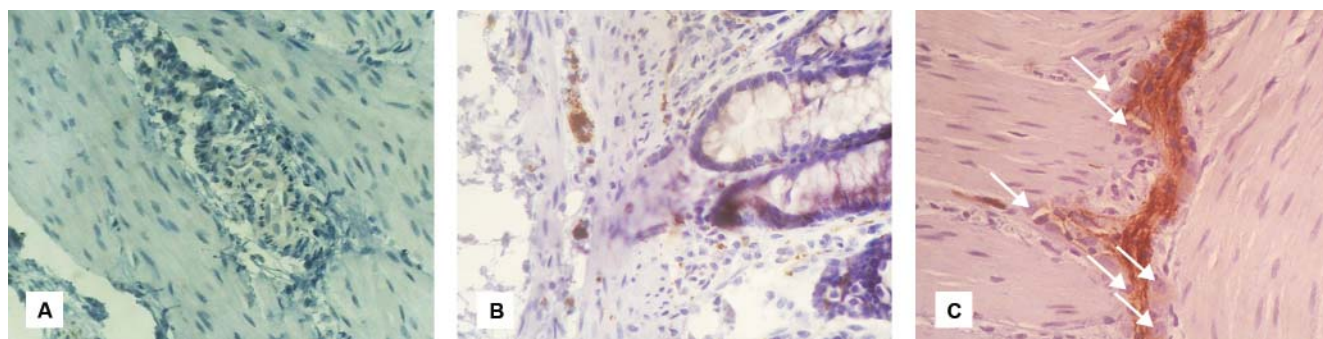


Figura 1 Análisis inmunohistoquímico. A) Con los anticuerpos para calretinina se confirma la enfermedad de Hirschsprung por la ausencia de células ganglionares y la hipertrofia del plexo nervioso intramural. B) Con los anticuerpos para calretina se descarta enfermedad cuando hay positividad intensa de las células ganglionares en el plexo nervioso submucoso. C) La marcación intensa de los neurofilamentos evidencia neuronas adyacentes (flechas)

Se llevó a cabo el análisis estadístico descriptivo con frecuencias simples y porcentajes. Se calculó el valor predictivo positivo y su intervalo de confianza de 95 % y se utilizó χ^2 de tendencia para contrastar las diferencias en los grupos etarios entre los casos con confirmación y los descartados por inmunohistoquímica. Los datos fueron analizados con el programa SPSS versión 20. Se consideró una significación estadística con una probabilidad de error alfa menor de 5 %.

Resultados

De 48 casos, solo en 14 (29 %) se dispuso de bloque de parafina; se eliminó un caso por no tener tejido suficiente. En el cuadro I se detallan las características de la población. Las muestras se obtuvieron por biopsia endoscópica en seis casos y por biopsia transmural en siete. Mediante inmunohistoquímica se descartó enfermedad de Hirschsprung en cuatro (31.7 %) de los 13 pacientes (figuras 1A y 1B), con lo que se estableció que el valor predictivo positivo para la enfermedad de Hirschsprung con biopsia teñida con hematoxilina y eosina es de 69.2 % (IC 95 % = 38.6-90.1). La inmunohistoquímica para neurofilamentos (utilizada para valorar la viabilidad del tejido) fue positiva en 12 casos, con lo cual se consideró que el tejido era adecuado para la evaluación con anticuerpos para calretinina (figura 1C)

Discusión

La enfermedad de Hirschsprung debe sospecharse si durante los primeros meses de vida se presenta estreñimiento persistente u obstrucción intestinal. De la misma manera como se refiere en la literatura, la mayoría de los casos (61 %) se diagnosticó en el primer año de vida. Se ha indicado que la forma clá-

sica (rectosigmoidea) es más frecuente en varones, con una proporción de 4:1; en nuestra muestra fue de 1.2:1. Dado que no se dispuso de la información de la variante clínica de cada caso, no fue posible comparar la frecuencia por sexo con lo referido en la literatura.

De los casos con diagnóstico histopatológico mediante tinción con hematoxilina y eosina en un lapso de seis años, solo en 29 % se dispuso de muestras suficientes para realizar también el análisis inmunohistoquímico con anticuerpos para calretinina. De los 13 pacientes analizados, en cuatro (31 %) se descartó la enfermedad de Hirschsprung. Kapur *et al.*,¹⁵ en un estudio con 31 casos, identificaron que no hubo discrepancias cuando compararon las muestras analizadas con una y otra técnica. En nuestra serie, el valor predictivo positivo para el diagnóstico de enfermedad de Hirschsprung en biopsias evaluadas solo con hematoxilina y eosina fue de 69 %, lo que también contrasta con lo informado por Guinard *et al.*,¹⁶ quienes señalan que la tasa de error diagnóstico fue nula entre los patólogos expertos.

Además de la falta de procedimientos auxiliares, el error diagnóstico en las biopsias se ha atribuido a los siguientes factores:

- El tipo de biopsia (por succión o transmural) y el tamaño de las muestras. Cuando se hacen procedimientos endoscópicos, las muestras deben contener submucosa y se recomienda obtener más de una. En los casos estudiados no hubo relación entre el error diagnóstico y el tipo de biopsia, ya que se identificaron dos casos falsos positivos para cada tipo.
- La experiencia de quien interpreta la muestra, relacionada con el tiempo de ejercicio profesional y con el número de casos estudiados. Cada uno de los cinco patólogos del hospital donde se llevó a cabo el estudio no ve más de dos casos por año, porque se trata de un hospital de referencia de ter-

cer nivel de atención donde solo se atiende a niños cuyo tratamiento no ha sido posible en el segundo nivel de atención.

En un caso hubo ausencia de células ganglionares y de troncos nerviosos o “aganglionosis total”, una forma particular de la enfermedad de Hirschsprung.¹⁷

Conclusiones

El aspecto relevante de este trabajo fue demostrar que es necesario utilizar un método complementario al estudio histopatológico con hematoxilina y eosina

para el diagnóstico de la enfermedad de Hirschsprung. Aunque aquí se utilizaron los anticuerpos para calretinina, podría emplearse cualquier otro que permita visualizar las células ganglionares.

Esta estrategia fue costo-efectiva, dada las implicaciones terapéuticas de diagnosticar o descartar la enfermedad de Hirschsprung, principalmente en un hospital de alta especialidad.

Declaración de conflicto de interés: los autores han completado y enviado la forma traducida al español de la declaración de conflictos potenciales de interés del Comité Internacional de Editores de Revistas Médicas, y no fue reportado alguno en relación con este artículo.

^aServicio de Patología

^bUnidad de Investigación de Epidemiología Clínica, Coordinación de Investigación

^{a,b}Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Distrito Federal, México

Comunicación con: Alicia Rodríguez-Velasco

Teléfono: (55) 5627 6900, extensión 22350

Correo electrónico: alirove0101@gmail.com

Referencias

- Grosfeld JL. Hirschsprung's disease: a historical perspective 1961-2005. En: Holschneider AM, Puri P, editores. Hirschsprung's disease and allied disorders. Third edition. New York: Springer; 2008.
- Belkind-Gerson J, Madrazo-de la Garza JA, Coello-Ramírez P, García-Aranda A, Heller S, Lorría A. Enfermedad de Hirschsprung. Bol Med Hosp Infant Mex. 2002;59(12):800-9.
- Hart J, Wilcox R, Weber CR. The gastrointestinal tract. En: Stocker JT, Dehner LP, editores. Pediatric pathology. Third edition. USA: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins; 2011. p. 592-96.
- Reyes MM, Ponce CMA. Enfermedad de Hirschsprung: diagnóstico anatomopatológico y patogenia. Patología. 1998;36:157-63.
- Meir-Ruge W. Hirschsprung's disease: its aetiology, pathogenesis and differential diagnosis. Curr Top Pathol. 1974;59:131-79.
- Diamond IR, Casadiego G, Traubici J, Langer JG, Wales PW. The contrast enema for Hirschsprung disease: predictors of a false-positive result. J Pediatr Surg. 2007;42(5):792-5.
- Lewis NA, Levitt MA, Zallen GS, Zafar MS, Iacono KL, Rossman JE, et al. Diagnosing Hirschsprung's disease: increasing the odds of a positive rectal biopsy result. J Pediatr Surg. 2003;38(3):412-6.
- Weinberg AG. Hirschsprung's disease. A pathologist's view. Perspect Pediatr Pathol. 1975;2: 207-39.
- Fenoglio-Preiser CM. Gastrointestinal pathology: an atlas and text. Third edition. USA: Lippincott Williams & Wilkins; 2008. p. 643-52.
- Kapur RP. Immunohistochemistry and the diagnosis of Hirschsprung disease. Am J Clin Pathol. 2006; 126:9-12. Texto libre en <http://ajcp.ascpjournals.org/content/126/1/9.full.pdf>
- Memarzadeh M, Talebi A, Edalaty M, Hosseinpour M, Vahidi N. Hirschsprung's disease diagnosis: comparison of immunohistochemical, hematoxylin and eosin staining. J Indian Assoc Pediatr Surg. 2009;14 (2):59-62.
- Qualman SJ, Jaffe R, Bove KE, Monforte-Muñoz H. Diagnosis of Hirschsprung disease using the rectal biopsy: multi-institutional survey. Pediatr Dev Pathol. 1999;2(6):588-96.
- De la Torre-Mondragón L. Enfermedad de Hirschsprung. Mitos y realidades a 120 años de su descripción. Acta Pediatr Mex. 2008;29(3):139-46.
- Barshack I, Fridman E, Goldberg I, Chowder Y, Kopolovic J. The loss of calretinin expression indicates aganglionosis in Hirschsprung disease. J Clin Pathol. 2004;57(7):712-6. Texto libre en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1770342/>
- 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.
- Guinard VS, Bonnard A, De Lagausie P, Pascale PC, Alberti C, El Ghoneimi A, et al. Calretinin immunohistochemistry: a simple and efficient tool to diagnose Hirschsprung disease. Mod Pathol. 2009;22(10):1379-84. Texto libre en <http://www.nature.com/modpathol/journal/v22/n10/full/modpathol2009110a.html>
- Altamirano E, Drut R. Aganglionosis total segmentaria combinada con aganglionosis clásica. Patol Rev Latinoam. 2009;47(4):351-3.