

FUNDAÇÃO FACULDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS MÉDICAS DE PORTO ALEGRE

Departamento de Ciências Morfológicas

Disciplina de Genética Humana

DOENÇA DE HIRSCHSPRUNG

Ana Francisca T. Mazzotti *
Andréia W. Vilaverde *
Diana Margarita C. Valiente *
Diogo E. dos Santos *
Eduardo G. Vieira *
Eduardo Z. Migon *
Felipe W. De Bacco *
Niara B. Oliveira **
Claudio Osmar P. Alexandre ***
Elizabeth De C. Castro ****

* Acadêmicos da 4º série da FFFCMPA

** Monitora da disciplina de Genética Humana

*** Professor adjunto

**** Professora assistente e responsável pela disciplina

Porto Alegre, novembro de 2002.

ÍNDICE

Resumo	04
Abstract	06
Introdução	08
Conceito e classificação	10
Histórico	14
Epidemiologia	18
Apresentação Clínica	20
Diagnóstico	22
Diagnóstico Diferencial	26
Síndromes e Anomalias Associadas	27
Anomalias Cromossômicas Associadas à Doença de Hirschsprung	35
Alterações Moleculares Envolvidas no Desenvolvimento da Doença de Hirschsprung	37
Fisiopatologia	64
Interação Genótipo- Fenótipo	69
Padrões de Herança	72

Diagnóstico Molecular	80
Tratamento	89
Aconselhamento Genético	91
Conclusão	93
Bibliografia	95
Anexos	108

RESUMO

A doença de Hirschsprung (HSCR), ou aganglionose intestinal congênita, é uma doença com ampla variação fenotípica e de padrão de herança complexa. Além disso, a definição do fenótipo dessa moléstia tem sido complicada pelo fato de que as mutações que a causam, em geral, também estão associadas com muitas outras anomalias sindrômicas. Mutações envolvendo RET, GDNF, EDNRB, EDN3 e SOX10 levam à L-HSCR (HSCR que acomete longo segmento intestinal) e à HSCR sindrômica, mas falham em explicar a transmissão da S-HSCR (segmento curto), muito mais comum. Mutações no gene RET são responsáveis por aproximadamente metade dos casos familiares e alguns casos esporádicos, sugerindo fortemente a importância de variações nesses genes e a necessidade de se descobrir novos genes relacionados ao desenvolvimento do sistema nervoso entérico. Para maioria dos genes relacionados à suscetibilidade para o desenvolvimento de HSCR, há penetrância incompleta, provavelmente pelo fato de haver loci modificadores. Conseqüentemente, HSCR tornou-se um modelo de desordem complexa multigênica na qual a relação entre diferentes genes cria um padrão de herança não mendeliana que ainda deve ser esclarecido.

Palavras-chave: Hirschsprung, aganglionose, RET, GDNF, EDNRB

ABSTRACT

Hirschsprung disease (HSCR), or congenital intestinal aganglionosis, is a common hereditary disorder causing intestinal obstruction, thereby showing considerable phenotypic variation in conjunction with complex inheritance. Moreover, phenotypic assessment of the disease has been complicated since a subset of the observed mutations is also associated with several additional syndromic anomalies. Coding sequence mutations in e.g. RET, GDNF, EDNRB, EDN3, and SOX10 lead to long-segment (L-HSCR) as well as syndromic HSCR but fail to explain the transmission of the much more common short-segment form (S-HSCR). Furthermore, mutations in the RET gene are responsible for approximately half of the familial and some sporadic cases, strongly suggesting, on the one hand, the importance of non-coding variations and, on the other hand, that additional genes involved in the development of the enteric nervous system still await their discovery. For almost all of the identified HSCR genes incomplete penetrance of the HSCR phenotype has been reported, probably due to modifier loci. Therefore, HSCR has become a model for a complex multigenic disorder in which the relationship between different genes creating a non-mendelian inheritance pattern still remains to be elucidated.

Key words: Hirschsprung, aganglionosis, RET, GDNF, EDNRB

INTRODUÇÃO

A primeira descrição clínica de megacólon congênito foi apresentada em 1886 por Harald Hirschsprung. A Doença de Hirschsprung (HSCR), ou aganglionose intestinal, é uma doença congênita relativamente comum, caracterizada pela ausência das células ganglionares nos plexos intermuscular (Auerbach) e submucosos, profundo (Henle) e superficial (Meissner), conseqüente a uma falha na migração da crista neural no intestino distal.

Na maioria dos casos o diagnóstico da doença HCSR é clínico, feito no recém nascido que apresenta manifestações relativas à obstrução intestinal causada pelo aperistaltismo . Análises do DNA por estudos de ligação em famílias com múltiplos afetados com HSCR revelaram que múltiplas mutações, em diferentes genes, possam ser a causa dessa enfermidade.

Nosso trabalho tem como objetivo principal revisar a Doença de Hirschsprung, seus aspectos históricos, conceituais, epidemiológicos, clínicos, diagnósticos e terapêuticos, abordando com maior ênfase suas características genéticas: alterações cromossômicas e

moleculares associadas, padrões de herança, diagnóstico molecular, mecanismo de ação dos genes envolvidos, correlação genótipo e fenótipo, anomalias congênitas associadas, aconselhamento genético e diagnóstico pré-natal.

CONCEITO E CLASSIFICAÇÃO

A motilidade intestinal é controlada por uma rede nervosa complexa, organizada em três plexos entéricos distintos: o plexo mioentérico de Auerbach, entre as camadas musculares longitudinal e circular da muscular própria, e dois plexos submucosos, um superficial, ou plexo de Meissner, logo abaixo da muscular da mucosa, outro profundo, ou plexo de Henle. Esse último parece ser análogo ao plexo de Auerbach.⁽¹⁾

Normalmente as células ganglionares do plexo mioentérico estão concentradas em leitos neurais longitudinais e áreas nodulares, formando uma rede de fibras nervosas não mielinizadas. Os troncos nervosos são de origem vagal e, em sua maioria, acetilcolinesterase-positivos. Entretanto, parece existir uma heterogeneidade morfológica e histoquímica, e as complexidades das propriedades anatômicas e fisiológicas dos plexos entéricos ainda não são plenamente compreendidas.⁽²⁾

As células ganglionares intestinais intramurais atingem o trato digestivo por migração a partir da crista neural cefálica entre a sexta e a décima segunda semana da embriogênese.^(3,4,5) Essa migração ocorre conforme uma seqüência definida com um gradiente cranial-caudal. Na quinta semana de gestação, fibras vagais prolongam-se,

pareadas, pelo esôfago superior e, apesar de já existirem algumas tênues fibras dos plexos aórtico e pélvico, as células ganglionares são ainda ausentes. Na sexta semana neuroblastos podem ser vistos no esôfago e no estômago, enquanto que na oitava, já estão no intestino delgado e no reto, porém ainda não nos cólons. Ao final da décima segunda semana a inervação está completa, provavelmente por migração caudal dos neuroblastos. Ocorre, então, a distribuição desses para as camadas mais superficiais e profundas da parede intestinal e a sua maturação a células ganglionares.⁽⁶⁾ O período mais crítico parece ser entre a oitava e a décima segunda semana, quando a maior parte do plexo distal se desenvolve.

Os neuroblastos que primeiro alcançam o tubo alimentar formam o plexo mioentérico. O plexo submucoso é formado por neuroblastos que migram do plexo de Auerbach pela camada muscular circular para a submucosa.⁽⁴⁾ O plexo submucoso também é formado na direção caudal, mas tardiamente, durante o terceiro e quarto meses de gestação. A camada muscular longitudinal se desenvolve de tecido mesenquimal embrionário depois que o plexo mioentérico já foi organizado ao final da décima segunda semana.⁽⁴⁾

A doença de Hirschsprung é uma malformação congênita do intestino caracterizada pela ausência das células ganglionares nos plexos intermuscular (Auerbach) e submucosos, profundo (Henle) e superficial (Meissner),⁽⁷⁾ conseqüente a uma falha na migração craniocaudal das células vagais da crista neural no intestino distal entre a quinta e a décima

segunda semana de gestação para a formação do sistema nervoso entérico. É considerada uma neurocristopatia.^(8,9) Secundariamente, a zona aganglionar é aperistáltica, sendo um obstáculo ao trânsito intestinal, havendo, portanto, dilatação dos segmentos proximais de inervação intacta, bem como progressiva hipertrofia muscular e espessamento da parede.

Havendo um limite inferior constante do tubo digestivo, o esfíncter anal interno, a doença de Hirschsprung pode ser classificada conforme a extensão do comprometimento como de segmento curto ou de segmento longo. A primeira perfaz oitenta por cento dos casos e ocorre quando o segmento agangliônico não ultrapassa o limite superior do sigmóide, enquanto na segunda a ausência de gânglios se estende proximalmente pelo intestino, ultrapassando o sigmóide.⁽¹⁰⁾ Quatro variantes dessa divisão foram descritas^(11,12): (1) aganglionose colônica total (TCA, em três a oito por cento dos casos), (2) doença de Hirschsprung em todo o intestino, (3) doença de Hirschsprung de segmento ultra-curto envolvendo o reto distal abaixo do assoalho pélvico e o ânus, e (4) quando há um segmento de cólon agangliônico interposto entre duas porções normais, condição de etiologia controversa, geralmente atribuída a acidente vascular.

Outro sistema de classificação da doença de Hirschsprung, apresentado em 1972 por Passarge, sugere a divisão em aganglionose tipo I – quando a ausência de células ganglionares não ultrapassa o ângulo esplênico do cólon – e tipo II, quando a ausência se estende rostralmente além desse ponto.⁽¹³⁾

HISTÓRICO

A primeira descrição clínica de megacólon congênito foi apresentada à Sociedade de Pediatria de Berlim em 1886 por Harald Hirschsprung.⁽¹⁴⁾ À época, a doença era atribuída à dilatação congênita do cólon, como se pode notar pelo título de sua apresentação: “Constipação em neonatos devido à dilatação e hipertrofia do cólon”, relato dos casos de dois meninos que faleceram por megacólon congênito, os quais apresentavam constipação crônica severa e distensão abdominal. Assim, a partir dessa abordagem, as conseqüências dessa anormalidade mereceram, por algum tempo, maior atenção do que a sua fisiopatologia, e a zona dilatada era considerada a única parte doente dos cólons.

Estudos anatomopatológicos subseqüentes começaram a esclarecer a verdadeira patogenia da doença de Hirschsprung. Em 1901, Tittel⁽¹⁵⁾ identificou em um segmento intestinal a ausência de células ganglionares e em 1924 Dalla Valle⁽¹⁶⁾ descreveu a inexistência completa de células ganglionares intramurais no cólon sigmóide de dois irmãos com doença de Hirschsprung com inervação normal do cólon proximal dilatado.

Em 1946 Ehrenpreis⁽¹⁷⁾ propôs que a dilatação colônica seria uma condição adquirida que ocorreria secundariamente a um distúrbio de motilidade do segmento intestinal distal, contrariando o pensamento anterior de que a porção dilatada seria o sítio primário da doença.

A patologia doença de Hirschsprung foi definitivamente determinada como decorrente da ausência de gânglios mioentéricos no segmento não dilatado distal do cólon a partir das publicações de Whitehouse e Kernohan⁽⁷⁾, Bodian, Stephens e Ward⁽¹⁸⁾ e Zuelzer e Wilson⁽¹⁹⁾. Os primeiros descreveram a anormalidade neurológica em uma compilação de relatos de casos prévios e seus onze próprios casos nos quais as células ganglionares do plexo mioentérico estavam ausentes, enquanto Bodian e colaboradores realmente identificaram a inexistência de células ganglionares no segmento estreitado de cólon.

Swenson e Bill⁽²⁰⁾, em 1948, indicaram a biópsia retal, em toda a sua espessura, como método diagnóstico bem como a cirurgia para a cura da moléstia. Essa consistiria na ressecção do segmento intestinal agangliônico e a anastomose com o intestino proximal não afetado, ou seja, com inervação preservada. Desde então, inúmeras novas técnicas e modificações têm sido propostas para a terapêutica de neonatos com obstrução intestinal e crianças cronicamente constipadas, algumas das quais serão oportunamente discutidas mais adiante.

A biópsia retal ganhou ainda maior credibilidade como método diagnóstico quando das publicações de Meier-Ruge e colaboradores⁽²¹⁾ e Lake e colaboradores⁽²²⁾ a respeito do emprego da pesquisa histoquímica da atividade da acetilcolinesterase.

Em 1973, Bolande⁽⁸⁾ propôs o termo neurocristopatia para síndromes e tumores que envolvessem as células oriundas da crista neural. Considerando que anomalia primária da doença de Hirschsprung está no sistema nervoso entérico, cuja origem embriológica é a crista neural, a doença foi enquadrada como uma neurocristopatia.

Estudos recentes têm lançado alguma luz no entendimento do complexo padrão genético da doença de Hirschsprung. Em 1993, Angrist e cols.⁽²³⁾ e Lyonnet e cols.⁽²⁴⁾ definiram uma região cromossômica da doença de Hirschsprung (HSCR) no braço longo do cromossomo 10, no locus 10q11.1, em um linhagem com doença de Hirschsprung com herança autossômica dominante.

Um ano depois, Romeo e cols.⁽²⁵⁾ e Edery e cols.⁽²⁶⁾ localizaram na HSCR um intervalo de 250 Kb de DNA na qual também está presente o proto-oncogene RET. Verificaram, ainda, mutações pontuais no proto-oncogene RET em pacientes com doença de Hirschsprung autossômica dominante.^(25,27)

Em 1994, outro locus no cromossomo 13q22 foi verificado em pacientes com doença de Hirschsprung com herança autossômica recessiva.⁽²⁸⁾ O delineamento de pelo menos três loci gênicos para doença de Hirschsprung constituem uma forte evidência para a herança poligênica.⁽²⁹⁾ Isso abre a possibilidade da melhor compreensão da herança, mais ainda não resolve o problema do aconselhamento genético para indivíduos acometidos

isoladamente. Alguns estudos mais antigos, sugeriram herança multifatorial, o que poderia explicar a ocorrência familiar.^(2,13)

EPIDEMIOLOGIA

A incidência da doença de Hirschsprung é de 1:5000 nascidos vivos, sem predileção racial.⁽³⁰⁾ Entre grupos étnicos, contudo, há significativa variação, com taxas de 1,5, 2,1 e 2,8 por 10000 nascidos vivos nos caucasianos, afro-americanos e asiáticos, respectivamente.⁽³¹⁾ A doença de Hirschsprung de segmento curto é muito mais freqüente que a de segmento longo, a primeira ocorre em 80% dos casos enquanto a segunda em 20%.^(2, 27) Há predominância para o sexo masculino numa proporção de 4:1, porém esse índice difere nas duas formas de apresentação: na doença de segmento curto a relação masculino:feminino é de cerca de 5:1 e na de segmento longo de aproximadamente 1:1.⁽³¹⁾

A doença de Hirschsprung ocorre como característica isolada em 70% dos casos. Anomalias cromossômicas, porém, existem em até 12% dos casos, sendo a trissomia do 21 a alteração mais freqüente - perfaz 90% dos casos de anomalias cromossômicas associadas à doença de Hirschsprung.⁽³²⁾

Anomalias congênitas associadas ao Hirschsprung ocorrem em até 18% dos casos, sendo malformações gastrointestinais, fenda palatina, polidactilia, defeitos septais cardíacos e anomalias craniofaciais as mais freqüentes. A ocorrência de anomalias associadas é maior em casos familiares em comparação a casos isolados (39% e 21%, respectivamente).^(29,33)

APRESENTAÇÃO CLÍNICA

Geralmente a doença de Hirschsprung é diagnosticada em neonatos que se apresentam com obstrução intestinal baixa, com ou sem sepse, associada aos seguintes sinais: falha na passagem do mecônio nas primeiras 48 horas de vida, distensão abdominal que é aliviada por estimulação retal ou enemas, vômitos e, em alguns casos, enterocolite neonatal. Diarréia é sintoma raro.^(34, 35)

Apesar de a incidência ser variável a enterocolite faz o diagnóstico e o tratamento precoce da doença de Hirschsprung tornar-se urgente. Na maioria dos casos moderados a única anormalidade é a falha da passagem do mecônio.

Em casos fulminantes, os neonatos podem apresentar quadro séptico generalizado extremamente grave. A sepse neonatal pode atrapalhar o diagnóstico porque quase constantemente é acompanhada por disfunção intestinal. Essa apresentação clínica demanda toda atenção, configurando-se uma urgência médica.⁽³⁵⁾

Quando acompanhada de sepse a apresentação clássica da doença de Hirschsprung é alterada por outros achados, como falência respiratória progressiva, hipovolemia, choque, oligúria, instabilidade da temperatura corporal e coagulopatia com plaquetopenia.

Finalmente, um pequeno número de recém-nascidos apresenta peritonite devido a uma perfuração intestinal, freqüentemente no ceco ou no apêndice.

Alguns pacientes têm diagnóstico tardio na infância ou até na vida adulta, quando apresentam-se severamente constipados com distensão abdominal e vômitos crônicos, desnutridos e com peristaltismo visível à inspeção abdominal.

A extensão de parede intestinal agangliônica tem relação direta com a precocidade da sintomatologia dos pacientes. Logo quanto mais curto o segmento agangliônico de cólon mais tardios serão os sintomas.⁽³⁴⁾

DIAGNÓSTICO

Na maioria dos casos o diagnóstico da doença HCSR é feito no recém nascido com obstrução intestinal que apresenta as seguintes características: 1 - falha na passagem do mecônio nas primeiras 48 horas de vida, 2 - distensão abdominal que é aliviada por estimulação retal ou enemas, 3 - vômitos, e 4 - enterocolite neonatal.⁽³²⁾

Alguns pacientes são diagnosticados no fim da infância ou na adolescência com constipação severa, distensão abdominal crônica, vômitos, e falha no crescimento. Finalmente, embora de apresentação rara, perfuração inexplicada de ceco ou apêndice podem ser considerados para um diagnóstico.⁽³²⁾

No raio-X abdominal, uma pequena distensão intestinal e de cólon proximal com o reto vazio são achados comuns. A imagem clássica é de um cólon proximal dilatado com um cone agangliônico estreitando-se através do intestino distal. No enema com bário um reto pequeno com contrações descoordenadas é visto. A zona de transição representa o local onde o intestino agangliônico estreito se encaixa com o intestino dilatado ganglionótico.⁽³²⁾ Alguns autores questionam o uso de enema com bário no recém nascido devido a uma ausência da zona de transição. Kolsloske questionou a validade do enema de bário mostrando um diagnóstico acurado de apenas 74%. Berman registrou que apenas 4 de

19 casos estudados com enema com bário foram diagnosticados no primeiro mês de vida . Num raio-X feito depois, evacuação com bário é observada.⁽³²⁾

Manometria ano-retal mostra ausência de relaxamento do esfíncter interno em resposta a distensão retal.⁽³²⁾ Esse teste é mais difícil em recém nascidos devido à sensibilidade do equipamento e à facilidade de um mau posicionamento dos balões; no entanto, no estudo de Loening-Baucke houve apenas um falso negativo dos 21 casos estudados, sugerindo uma alta utilidade da manometria em excluir o diagnóstico da doença de HSCR.

A confiabilidade destes testes se torna excelente a partir do décimo segundo dia de nascimento quando o reflexo normal reto-entérico está presente.⁽³²⁾

Biópsia retal por sucção confirma o diagnóstico na maioria dos casos, mas uma biópsia retal de espessura grossa é necessária para o diagnóstico de HSCR. Além disso, biópsias seriadas de extramucosa podem ser necessárias durante a laparotomia para definir o limite proximal do segmento agangliônico.⁽³²⁾

A característica da lesão do intestino distal na anátomo-patologia é a ausência de células ganglionares no plexo intermuscular e em ambos os plexos submucosos. O esfíncter interno também é agangliônico. Adicionalmente, fibras nervosas muito grandes, finas e não

mielinizadas são encontradas na muscular da mucosa, lâmina própria, submucosa, e plexo intermuscular de Auerbach.

Técnicas de imuno-histoquímica são úteis para se fazer o diagnóstico. A presença de quantidades aumentadas de Acetilcolinesterase (AChE) nas fibras nervosas da lâmina própria e da muscular da mucosa em pacientes com HSCR é a base desse teste, que num estudo apresentou 95% de acurácia *versus* 85% com a coloração hematoxilina-eosina . O desenvolvimento da técnica de imuno-histoquímica para acetilcolinesterase permite uma rápida identificação na lâmina própria de hipertrofia extrínseca de fibras nervosas, onde a acetilcolinesterase tem proliferação na ausência de células ganglionares intrínsecas. Cortes da congelação agora permitem um *screening* dos gânglios normais do plexo mioentérico das biópsias seromusculares durante a terapêutica definitiva. Esse serviço, entretanto, requer uma infraestrutura significativa e um patologista experiente, não largamente disponível.⁽³⁶⁾

Outros neurotransmissores peptinérgicos (peptídeo intestinal vasoativo, PYY, substância P) têm sido mais recentemente descritos na doença de HSCR, mas sua significância fisiopatológica ainda é incerta .

Anticorpos antineurofilamentos monoclonais e enolase neuroespecíficos também têm sido usados para aumentar a acurácia do diagnóstico, principalmente em recém nascidos cujas células ganglionares podem estar mais escassas e imaturas.

DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

Outras causas de obstruções intestinais podem ser consideradas quando distensão abdominal e falha da passagem do mecônio ocorrem no recém nascido: 1- íleo meconial resultantes de fibrose cística, 2- malformação intestinal , tal atresia colônica ou intestinal baixa, isolado ou ocasionalmente associado com HSCR, má rotação intestinal, ou duplicação, 3- anomalias do sistema nervoso entérico agrupadas como síndrome da pseudo-obstrução intestinal crônica, 4- obstrução intestinal funcional resultante de infecção materna, intoxicação materna, ou hipotireoidismo congênito⁽³²⁾, sepse, hemorragia intracraniana, hemorragia adrenal, hipermagnesemia e hipocalcemia , e 5- obstrução mecânica por hérnia encarcerada, secundária à duplicação do intestino, atresia jejunoileal e intussuscepção.

SÍNDROMES E ANOMALIAS ASSOCIADAS

O reconhecimento de entidades patológicas agregadas à doença de Hirschsprung é muito importante para o delineamento do prognóstico, aconselhamento genético, e procura por genes envolvidos. As síndromes associadas com HSCR podem ser classificadas em: patologias pleiotrópicas da crista neural; síndromes com HSCR como característica predominante; em associação ocasional com síndromes reconhecíveis e observações variadas. (anexo 1)

Patologias pleiotrópicas da crista neural

A crista neural é uma estrutura pluri-potente e transitória que origina os tecidos neuronal, endócrino, paraendócrino, craniofacial, pigmentar e cardíaco. As patologias que acometem essa estrutura englobam tumores, malformações e anormalidades únicas ou multifocais dos vários tecidos mencionados acima. Abaixo, segue-se uma rápida explicação das principais neurocristopatias associadas à HSCR.

Neoplasia Endócrina Múltipla tipo 2 (NEM2): Essa síndrome inclui três tipos de suscetibilidade a cânceres de herança autossômica dominante: Carcinoma Medular da Tireóide Familiar (CMTF), NEM tipo 2A e 2B. NEM 2A é definida como uma idade com predisposição para se desenvolver Carcinoma Medular de Tireóide (MTC, sendo que 70% dos casos surgem a partir dos 70 anos), feocromicitoma (50% dos casos) e hiperplasia das

glândulas paratireóides (15-35%). Em adição à MTC e ao feocromocitoma, pacientes com NEM 2B apresentam-se com neuromas orais e outras alterações. Mutações *missense* da linhagem germinativa do gene RET foram identificadas em pacientes com NEM 2A e 2B e CMTF. Ambos, CMTF e NEM 2A, podem estar presentes em pacientes com HSCR em algumas famílias. Interessantemente, essas famílias apresentam uma mutação do RET compatível com a dessas duas doenças. Isso levanta a questão de se todos os pacientes com HSCR, independente de uma história familiar negativa, deveriam ser submetidos a *screening* de possíveis mutações dos exon 10 e 11 do gene RET para descartar predisposição a neoplasias. Em um estudo, foram encontrados 3 pacientes com predisposição entre 160⁽³²⁾.

Síndrome de Waardenburg (SW) e anomalia pigmentares correlatas: A SW, uma condição autossômica dominante, é de longe a mais comum desordem combinando anomalias pigmentares e surdez sensitiva neural (1 de cada 50000 nascidos vivos e 2-5% de todas as causas de surdez congênita), resultante da ausência de melanócitos na pele e de estrias vasculares na cóclea. Essa doença é clínica e geneticamente heterogênea. A combinação de HSCR com SW define o tipo SW4 (*Shah-Waardenbur syndrome*). Mutações homozigóticas da via da endotelina e mutações heterozigóticas do SOX10 foram identificadas em pacientes com SW4. Pacientes que carregam uma mutação no gene SOX10 também podem ter envolvimento do Sistema Nervoso Central.

Síndromes pigmentares correlatas que podem estar associadas a HSCR: Síndrome da amaurose, surdez e hipopigmentação *Yemenite*; HSCR e surdez profunda, mas sem outras características de SW; e outras.

Síndrome da Hipoventilação Central Congênita (SHCC): essa é uma síndrome rara, que causa um sério risco de vida, caracterizada por uma resposta ventilatória anormal à hipóxia e hipercapnia, devido à falha no sistema nervoso autônomo, controlador da respiração. Esses pacientes geralmente apresentam sintomas resultantes de uma extensa disfunção do sistema nervoso autônomo, e tumores derivados de células da crista neural também têm sido relatados. SHCC pode ser uma desordem poligênica, com um locus maior sendo envolvido. O risco de recorrência entre irmãos é de 5%, com poucos casos familiares relatados. A combinação entre HSCR e SHCC é denominada de Síndrome de Haddad, representando 14-20% dos pacientes com SHCC. Nesses casos, L-HSCR é muito mais freqüentemente encontrado, e a prevalência entre os sexos é igual, diferentemente do que ocorre com HSCR isolado. Mutações do RET e da via da endotelina foram identificados em raros casos de pacientes com SHCC: mutação do RET herdada de um pai saudável, em dois indivíduos com Síndrome de Haddad⁽³⁸⁾; uma mutação no GNDF herdado de uma mãe saudável, em um paciente com SHCC; mutação no EDN3, em um paciente com SHCC⁽³⁹⁾.

Outra patologias da crista neural: Síndrome da Disautonomia Familiar(SDF) já foi associada com HSCR. É interessante notar que o gene da SDF foi mapeado no locus 9q31, o mesmo que garante suscetibilidade à HSCR. Podem ocorrer em associação com HSCR

neuroblastomas, ganglioneuroblastomas, defeitos de fechamento do tubo neural (mielomeningocele) e neurofibromatose tipo 1. A significância dessas associações não foi ainda estabelecida.

Síndromes com HSCR como característica predominante

Síndrome de Golgberg-Shprintzen: é rara, provavelmente de caráter autossômico dominante, com retardo mental congênito múltiplo, combina-se com HSCR, hipotonia, fenda palatina, microcefalia e retardo mental com ou sem características faciais dismórficas (hipertelorismo, nariz proeminente, calvície). A observação de ventrículos cerebrais dilatados e esparsa quantidade de substância branca em estudos imagéticos podem sugerir defeito na migração neuronal. Muitos relatos com associação variável de microcefalia, problemas na íris, fenda palatina e retardo mental podem ser variantes dessa síndrome. Na opinião de alguns autores, pacientes com mutação do gene SIP1 têm uma condição diferente⁽³⁸⁾.

HSCR com alteração nos membros: uma série de síndromes com HSCR e anomalias das porções distais dos membros (polidactilia ou hipoplasia) foram referidos. Eles podem ser os seguintes: HSCR com polidactilia, agenesia renal unilateral, hipertelorismo e surdez congênita; HSCR, polidactilia pós-axial e defeitos dos septos ventriculares; HSCR, hipoplasia das falanges distais e unhas, e fáscties dismórfica de média intensidade; HSCR com polidactilia pré-axial, defeitos cardíacos e laríngeos; HSCR com braquidactilia tipo D;

HSCR com braquidactilia, macrocefalia e anormalidades vertebrais; Síndrome de BRESHEK; e displasia mesomiélica, do tipo Werner.

Associação ocasional com síndromes reconhecíveis

A associação ocasional de HSCR com três síndromes, ou grupos delas, com caráter de herança autossômico recessivo pode ser de interesse para identificação de genes para suscetibilidade na doença de Hirschsprung.

Síndrome de McKusic-Kauffman (SMKK) e Síndrome de Bardet-Biel (SBB). SMKK é uma condição rara caracterizada por defeitos cardíacos congênitos, polidactilia pós-axial. HSCR é encontrada em 10% dos casos. O gene da MKKS foi mapeado no locus 20p12, que contém traduz a proteína *chaperonin*^(40,41). SBB é caracterizada por uma retinopatia pigmentar progressiva, obesidade, hipogonadismo, envolvimento renal, retardo mental leve e polidactilia pós-axial das mãos e dos pés. É uma doença geneticamente heterogênea, com no mínimo cinco loci envolvidos, mapeados nos braços cromossômicos 2q, 3p, 11q, 15q e 16q. HSCR foi relatada em muitos casos com SBB. Recentemente, mutações no gene MKKS foram identificadas em alguns pacientes com SBB confirmando a superposição clínica a partir de distúrbios moleculares.

Síndrome de Smith-Lemli-Opitz (SLO): é caracterizada por retardo de crescimento pré e pós-natal, microcefalia, retardo mental severo, fâcies dismórfica, hipospádia e

sindactilia entre o segundo e o terceiro dedos do pé. SLO resulta de alteração do metabolismo do colesterol, com mutação no gene da enzima 7-dihidro-colesterol redutase. HSCR foi observada em um considerável número de pacientes com SLO severa.

Síndrome da Hipoplasia da Cartilagem e Cabelo (SHCC): Essa displasia esquelética, primeiramente descrita em antigas comunidades Amish, combina membros diminuídos de tamanho, cabelos loiros, finos e esparsos, anemia macrocítica transitória e imunodeficiência. HSCR está associada em aproximadamente 10% dos casos. O gene foi mapeado no cromossomo 9p14. Interessantemente, HSCR foi reportada na Síndrome de Holmgren-Connor, a qual pode ser alélica à SHCC.

Observações variadas

Existem várias outras síndromes que acometem indivíduos com doença de Hirschsprung. As séries variam de 5-30% em relação à percentagem de associação entre essas síndromes. Nenhum padrão é constantemente observado. Defeitos cardíacos, principalmente defeitos de septos atriais ou ventriculares, são encontrados em 5% dos casos de HSCR, excluindo aqueles pacientes com trissomia do cromossomo 21. Displasia ou agenesia renal é encontrada em 4,4% dos pacientes com HSCR. Isso é interessante, pois ratos homozigóticos para mutações no gene RET apresentam-se com megacolon e uma dessas alterações renais. Malformações intestinais, como divertículo de Meckel, estenose pilórica, hérnias inguinais também podem ser encontradas.

Considerações finais

Todos esses dados expostos acima ressaltam a importância de um cuidado especial do clínico treinado em dismorfologia para recém-nascidos diagnosticados com HSCR. Radiografias de esqueleto e ecografia urogenital e cardíaca deveriam ser sistematicamente usadas. A observação de uma anormalidade adicional ao quadro da HSCR deveria estimular estudos citogenéticos.

ANOMALIAS CROMOSSÔMICAS ASSOCIADAS À DOENÇA DE HIRSCHSPRUNG

Um grande número de anomalias cromossômicas tem sido descrito em pacientes com HSCR. A trissomia do cromossomo 21 (Síndrome de Down) é a mais freqüente, envolvendo 2-10% dos casos verificados de HSCR. Nesses casos, tanto o desequilíbrio na incidência entre os sexos (5,5:10,5 - homens:mulheres) como o predomínio do S-HSCR são maiores do que na HSCR isolada. A expressão aumentada dos genes do cromossomo 21 predispondo para a HSCR tem sido sugerida e a suscetibilidade para mapear o gene para o 21q22 postulada nas famílias Mennonite. Entretanto, este dado não foi confirmado em outras populações. Até o momento, mutações nos genes que predispoem para HSCR, chamados RET, EDNRB e GDNF têm sido encontradas em somente três pacientes com Síndrome de Down e HSCR.

Algumas deleções intersticiais de cromossomos relatadas em combinação com a HSCR têm sido importantes para a identificação de genes que predispoem à HSCR. (1) A deleção intersticial 10q11.2 observada em poucos pacientes com L-HSCR ou com TCA (Aganglionose Colônica Total), levou até o mapeamento e identificação do primeiro gene da HSCR – RET - está associada a retardo mental. (2) A deleção intersticial 13q22.1-32.1 em pacientes com S-HSCR abrangendo um segundo gene – EDNRB - e está associada a retardo mental e do crescimento, além de dismorfismos. (3) A deleção intersticial 2q22-23

em pacientes com síndrome caracterizada por retardo do crescimento pós-natal e microcefalia, retardo mental, epilepsia e dismorfismo associada à HSCR, levando a identificação do gene SIP1(SMAD interagindo com a proteína 1).

Existem outras raras anomalias cromossômicas associadas à HSCR: síndrome de DiGeorge, mosaico trissômico do cromossomo 8, conjunto cromossômico XXY, duplicação parcial do cromossomo 2q, tetrassomia do 9p, deleção do cromossomo 20q, cada um observado em apenas um caso de HSCR. A duplicação do 17q21-23 (MCA/MR) e a trissomia do 22pter-q11 (síndrome do Olho de Gato) também podem estar associadas a esta doença⁽³²⁾.(anexo 2)

ALTERAÇÕES MOLECULARES ENVOLVIDAS NO DESENVOLVIMENTO DA DOENÇA DE HIRSCHSPRUNG ISOLADA

Usando diferentes métodos, Angrist et cols.(1994)⁽²³⁾ e Lyonnet et cols.(1994) demonstraram uma região cromossômica para a doença de Hirschsprung (HSCR) no braço longo do cromossomo 10, com o locus em 10q11.1. Esse locus foi mapeado por estudos de ligação com marcadores de DNA em famílias com herança autossômica dominante para essa doença. A importância dessa região foi fortemente corroborada pela descoberta de uma deleção intersticial em dois pacientes com aganglionose intestinal total ou doença de Hirschsprung de longo segmento. Outros estudos localizaram a região de suscetibilidade para HSCR como um intervalo de DNA de 250 kb, que também contém o proto-oncogene RET.

Carrasquillo et al. ⁽⁴²⁾ notaram que, embora oito genes com mutações, que possivelmente causem HSCR, tenham sido descobertos, mutações em loci individuais não são necessários nem suficientes para causar doença clínica. Eles encontraram loci suscetíveis em 10q11, 13q22, 16q23; mostraram também que o gene EDNRB (*gene that encodes endothelin-B receptor*) está em 13q22 e o RET, em 10q11. A associação de transmissão conjunta de RET E EDNRB mutados em indivíduos afetados demonstra que a interação entre esses formam um dos mecanismos responsáveis por essa doença.

Análise do DNA por estudos de ligação em famílias com múltiplos indivíduos com doença de Hirschsprung revelaram que diversas mutações, em diferentes genes, possam ser a causa dessa enfermidade. A condição mais comumente encontrada é a mutação no locus do gene RET, 10q11.2, que traduz RET, uma proteína transmembrana tirosina quinase. Uma pequena minoria dos pacientes com HSCR tem mutações no gene que produz um dos ligantes que se acopla ao RET, o GDNF (*glial cell line-derived neurotrophic factor*). Outros indivíduos têm sido descritos como sendo portadores de mutações em um par de genes, o EDNRB (*endothelin B receptor*), cujo locus está em 13q22, e o EDN3, gene que traduz o seu ligante, endotelina 3, no locus 20q13. O envolvimento da endotelina 3 e seu receptor em HSCR foi tido como uma surpresa, pois se pensava que essas moléculas atuavam na formação de vasos sanguíneos, não na do sistema nervoso autônomo. A relação entre as vias EDNRB e RET é obscura, porém ambas parecem funcionar em paralelismo, antes que em série, para promover o desenvolvimento das células ganglionares colônicas.

PARÁGRAFO!!!

Embora as mutações no RET sejam a principal causa de HSCR afetando múltiplos indivíduos em uma mesma família, a penetrância dos alelos do RET está longe de ser completa. Em algumas famílias, a penetrância é intensificada se os pacientes apresentarem também mutações nos genes para os ligantes que sinalizam para o RET, como o GDNF; em outras famílias, alelos alterados em um locus ainda não bem determinado, o 19q31, levavam a uma maior penetrância dos alelos RET. A explicação mais plausível para esse fenômeno é que alguns alelos mutantes do RET ainda possibilitariam alguma função

residual para prevenir o desenvolvimento da doença, a menos que disfunções adicionais em outros componentes também ocorressem.

Similarmente, observou-se que a expressão do fenótipo da HSCR devido a mutações no EDNRB era fortemente influenciada pelo genótipo individual no locus do RET. Apesar dessa evidência genética implicando RET na penetrância da mutação no EDNRB, a seqüência do gene que codifica RET falhou em revelar uma mutação deletéria óbvia. A falha em achar uma mutação óbvia nessa região serve para ilustrar que mutações ou polimorfismos responsáveis por modificar a expressão de um traço multifatorial podem ser tênues no modo como eles exercem seus efeitos na expressão gênica, e como conseqüência, na penetrância da doença.

A teoria da natureza multifatorial da HSCR foi postulada quando as bases gênicas da forma mais comum de HSCR, envolvendo apenas um segmento curto de cólon, foram analisadas em gêmeos concordantes para HSCR em famílias que não mostravam caráter de herança autossômica dominante óbvia. Análise por estudos de ligação em 67 irmãos gêmeos concordantes para HSCR revelou significativo compartilhamento de alelos de 3 loci: 10q11.2, onde o RET está alocado e dois loci não identificados em 3p21 e 19q12. A maioria dos gêmeos concordantes para HSCR (55 dos 67) compartilhavam alelos nos 3 loci, enquanto 12 compartilhavam alelos em 2 dos 3 loci. Nenhum compartilhou alelos em só um loci ou em loci algum. A conclusão disso é que certos alelos para RET, locus no cromossomo 3p21 e no 19q12 conferem maior suscetibilidade para doença de Hirschprung,

mas não causam esse distúrbio *per se*. HSCR é uma doença multifatorial que resulta de efeitos aditivos de alelos suscetíveis e em um número de loci. Assim, o mecanismo genético subjacente para essa malformação congênita bem definida tem se tornado surpreendentemente complexo. Conseqüentemente, HSCR tornou-se um modelo de desordem complexa oligo/poligênica na qual a relação entre diferentes genes criando uma padrão de herança não mendeliana ainda deve ser esclarecida ⁽⁴³⁾.

Muitos genes, incluindo a maior suscetibilidade induzida pelo gene RET, têm efeitos no desenvolvimento da HSCR. Resultados da análise genética por estudos de ligação em pacientes com doença de fenótipos segmento curto e longo, ambos de caráter familiar, mostraram ligação com o locus RET. Um estudo ⁽⁴⁴⁾ tentou demonstrar se mutações ou polimorfismos do RET contribuiriam para o polimorfismo fenotípico da doença de Hirschsprung. Foi seqüenciada as regiões de todos os 21 exons do proto-oncogene RET de 76 caucasianos com HSCR. Foram encontradas 20 diferentes mutações em 18 pacientes. Mutações foram sub-representadas em pacientes com doença de segmento curto, homozigóticos para o genótipo RET c135A/A. A doença de segmento curto também surgiu se mutações do RET ocorressem no alelo c135A; ao contrário, uma mutação no RET nas linhagens germinativas no alelo c135G resultaram em doença de segmento longo, particularmente em pacientes heterozigotos c135G/A. Essas observações deram suporte a idéia de que ambos alelos têm um papel na patogênese da HSCR, de uma maneira dose-dependente. Os autores também demonstraram que polimorfismos no c135G/A modificam o fenótipo por uma interação intra-gene entre uma variante c135A e uma mutação.

Em 1993, Pachnis et cols repararam que aquelas células da crista neural não migram para o intestino quando o gene RET não é totalmente expresso. O locus do RET, na doença de Hirschprung, está associado a deleções e mutações frameshift, *nonsense* e *missense*. É assumido que mutações *missense* no HSCR causam aganglionose do cólon pela perda de um mecanismo com um efeito negativo dominante.

O GDNF é um potente fator neurotrófico e de sobrevivência para células neuronais dos gânglios entéricos. Mutações ou expressões deficientes do GDNF contribuem, via sinalização do RET, para a patogênese da HSCR⁽⁴⁵⁾. O GDNF e seu receptor alfa GFR α -1 interagem com o receptor RET desencadeando a atividade da tirosina quinase. O GDNF e o RET tem sido associados com o desenvolvimento da HSCR, também o GFR α -1 parece estar ligado à suscetibilidade desta doença. Um novo candidato para suscetibilidade ao HSCR é representado pelo homólogo humano do DOM (Megacólon dominante) mutante em ratos, mapeado no cromossomo 15, para o qual o gene não foi ainda identificado. Tem sido pesquisado se o GFR α -1 poderia ser o gene DOM ou seu representante como uma nova possibilidade de locus para a HSCR.

Mais recentemente, outro locus, no cromossomo 13q22, para doença de Hirschprung autossômica recessiva (HSCR2) foi definido em parentesco consanguíneo, demonstrando a identidade da mutação homozigótica de descendente comum. O gene

traduz o receptor B-endotelina (EDBRB). Uma mutação *missense* (Guanina→Timina) no exon 4 causa a alteração. Essa mutação é dosagem-sensível, já que homozigotos tem 74% de chance de desenvolver doença de Hirschprung, enquanto heterozigotos, 21%.

O conhecimento de, pelo menos, 3 loci gênicos para a doença de Hirschprung constitui um importante achado numa desordem assumida como sendo de herança poligênica. Enquanto isso abre a possibilidade para uma precisa avaliação genética em famílias, ainda não se resolve o problema de aconselhamento genético em pacientes isolados. Aparentemente outro gene de suscetibilidade HSCR exista, conforme classificação da doença de Hirschprung no anexo 3.

Estudos antigos já apontavam a herança multifatorial como a possível causa da ocorrência familiar. Particularmente, a maior proporção de mulheres afetadas, que representa o sexo menos afetado na população, poderia representar o “efeito Carter”, visto em estenose pilórica congênita. No entanto, pelo menos em algumas famílias o risco de recorrência correspondia a uma desordem monogênica⁽³⁰⁾. Infelizmente, não existem critérios confiáveis para distinguir uma situação de alto risco para uma de baixo, a não ser que se tenha um heredograma, A eventual utilidade da análise direta das mutações ainda espera para ser determinada.

A incidência familiar pode ser esperada mais alta quando o segmento aganglionar for longo. Apesar disso, em algumas famílias, tanto o envolvimento de segmentos longos e curtos foram observados em parentes afetados.

Recentemente, mutações do RET têm sido identificadas em 50% e 15-20% das HSCR hereditárias e esporádicas, respectivamente. Estas mutações incluem deleções, inserções, mutações frameshift, mutações *nonsense* e mutações *missense* espalhadas por toda a sequência que codifica o gene RET. Para investigar seus efeitos na função do RET sete mutações *missense* foram introduzidas a cada 1114 - aminoácidos selvagens do RET isofórmico (RET 51) ou da forma constitutivamente ativada do RET 51 (RET – MEN2A). Nesse trabalho, nós observamos uma mutação afetando o domínio caderina extracitoplasmático (R231H) e duas mutações localizadas no domínio tirosina quinase (K907E, E921K) que prejudicaram a atividade biológica do RET – MEN2A quando testadas em fibroblastos Rat1 e células PC12 do feocromocitoma. Entretanto, os mecanismos que resultaram na inativação do RET diferem desde a presença de mutação do receptor extracelular R231H, resultado da ausência da proteína RET na superfície celular até a mutação no E921K localizada dentro do domínio catalítico que abole a atividade enzimática. Em contraste, nenhuma das três mutações localizadas no domínio intracitoplasmático modificou a capacidade do RET- MEN2A e nenhuma estimulou a atividade catalítica enzimática no sistema de sítios-independentes (S767R, P1039L, M1064T). E, por último, a mutação C609W da HSCR exerce um efeito duplo no RET, desde a vantagem para uma diminuição do receptor celular superficial até a conversão da

isoforma RET 51 para uma forma constitutivamente ativada pela quinase para a formação do dissulfato-ligado homodímero. Baseando-se em nossos dados, a heterogeneidade alélica do locus RET para a HSCR está associada com vários mecanismos moleculares responsáveis pela disfunção do RET⁽³⁷⁾.

O Proto-Oncogene RET

Descrição

O proto-oncogene RET é um dos receptores tirosina quinase, que são moléculas da superfície celular que traduzem sinais para crescimento e diferenciação celular. Esse gene pode ser ativado de modo a um oncogene por rearranjo citogenético ⁽⁴⁶⁾. Mutações nesse gene estão associadas com várias doenças, entre elas, Neoplasia Endócrina Múltipla tipo 2A e 2B, doença de Hirschsprung e Carcinoma Medular da Tireóide. Essas são desordens expressas em células derivadas da crista neural, bem como as células ganglionares intestinais o são.

Clonagem

RET (REarranged during Transfection), foi clonado como um oncogene quimérico durante uma experiência de transformação NIH 3T3 clássica ⁽⁴⁷⁾.

Estrutura do gene

Pasini et al.⁽⁴⁸⁾ clonaram totalmente o gene RET e estabeleceram a posição de seus 20 exons com respeito a um detalhado mapa de restrição baseado em oito endonucleases. Uma seqüência de CA polimórfica altamente repetitiva foi descoberta no intron 5. O tamanho estimado desse gene é de 55 kb. O intron tem aproximadamente 24 kb, enquanto a seqüência do exon 2 ao 20 perfazem está contida numa região de 31 kb. Não foi encontrada nenhuma evidência que demonstrasse genes relacionados ao RET ou pseudogenes RET no locus 2 da região 11 do braço longo do cromossomo 10 (10q11.2) ou em qualquer outra região do genoma.

O Receptor Ret: Função no desenvolvimento e disfunção na malformação congênita

Mutações nas linhagens germinativas do proto-oncogene RET são responsáveis por duas desordens da crista neural não relacionadas: Doença de Hirschsprung, uma ausência congênita do sistema nervoso entérico do intestino posterior embriológico, e a Neoplasia Endócrina Múltipla tipo 2, uma síndrome cancerígena herdada dominantemente. Além disso, rearranjos somáticos do RET foram causalmente envolvidos na gênese do carcinoma papilar de tireóide. O receptor tirosina quinase decodificado pelo gene RET atua como uma subunidade de um complexo multimolecular que acopla quatro sítios distintos que ativam uma rede de sinalização vital para o desenvolvimento neural e renal. Passados poucos anos,

o modo de ativação do RET e seu papel multivariado tem tornado-se mais claro. Esses achados têm fornecido novos indícios do mecanismo molecular, tendo como base a disfunção da sinalização do RET na Doença de Hirschsprung.⁽⁴⁹⁾

Em 1985, o gene RET foi identificado como um novo oncogene, seguindo translocação do NIH3T3 celular com o DNA humano dos linfócitos T⁽⁴⁷⁾. A transformação do gene resultou da recombinação entre duas seqüências de DNA não ligadas, a qual ocorreu durante o processo de translocação. Daí o nome RET (rearranjo durante a translocação)⁽⁴⁷⁾. O resultado molecular do gene codificou uma união protéica consistindo em uma região amino-terminal que expôs *zinc finger* de ligação para o domínio da tirosina quinase. Subseqüentemente, o nome RET tem sido conservado para designar o gene codificador da tirosina quinase. Entretanto, o papel do RET no câncer humano tem sido confirmado pela caracterização da reorganização somática do RET no carcinoma de tireóide (chamado de RET/PTC), o qual justapõe a região genômica codificando o domínio da tirosina quinase com as regiões 5'-terminal de uma variedade de genes não relacionados. O código dos oncogenes RET/PTC para a união protéica apresenta uma atividade constitutiva da tirosina quinase.

A importância clínica do RET foi reforçada, quando isso foi mostrado que as mutações da linhagem germinativa deste gene são responsáveis por duas desordens herdadas: Neoplasia Endócrina Múltipla tipo 2 e Doença de Hirschsprung^(50,51). Desde então, a procura do RET tem determinado mecanismos sem precedentes para ativação do

receptor da tirosina quinase, isto tem fornecido precioso conhecimento nas interações moleculares que formam o sistema nervoso e os rins, e tem elucidado a etiologia dos eventos genéticos no desenvolvimento do câncer e de malformações congênitas.

A proteína RET: o excêntrico receptor tirosina quinase com um domínio de caderina

A proteína RET tirosina quinase transmembrana tem uma estrutura similar aos outros receptores de tirosina quinase (RTKs), mas diferencia-se pela presença do domínio de caderina na região extracelular⁽⁵²⁾. As caderinas são proteínas de adesão célula-célula, Ca⁺-dependentes. Suas propriedades adesivas dependem de um domínio de 110 aminoácidos repetidos na região extracelular. A ligação do cálcio entre cada domínio caderina serve para induzir a linearização e a rigidificação de toda região extracelular. Desta maneira, protegendo as caderinas da degradação proteolítica. Isto também atua na dimerização de duas moléculas de caderina. Alinhamentos de seqüência múltipla e análises modeladas têm revelado recentemente que o domínio extracelular do RET é composto por quatro seqüências de repetição conjunta associadas aos domínios caderina. O domínio extracelular do RET é específico para íons de cálcio, confirmando a associação do RET com a superfamília das caderinas.

Observa-se, que o RET não forma exatamente uma prega interna no retículo endoplasmático quando o cálcio extracelular é esgotado, este é relativamente resistente pela ação da tripsina na presença de íons cálcio⁽⁴⁷⁾ ligados a sítios cálcio-dependentes. Ao

mesmo tempo, estes resultados indicam que a fixação do cálcio através dos domínios de caderina do RET induz e/ou estabiliza uma mudança conformacional no domínio extracitoplasmático que é necessário para a interação com seus ligantes naturais.⁽⁴⁹⁾

O gene RET codifica várias isoformas de proteínas expressadas como resultado do *splicing* alternativo do RNAm. A grande isoforma de 1114 aminoácido (RET51) contém 51 aminoácidos na carboxila-terminal que são substituídos por 43 aminoácidos no RT43 e por nove no RET9. A RET51 possui duas tirosinas acrescentadas (Tyr 1090 e Tyr 1096) dentro da extensão de 51 aminoácidos⁽⁵³⁾.

Produtos transcritos na região 5' do RNAm do RET carregam informações para duas isoformas putativas transmembrana que contêm um domínio extracelular e uma terceira variante que é supostamente codificadora de uma forma solúvel de RET⁽⁵¹⁾.

A relativa expressão das isoformas do RET tem sido investigada pelo nível e quantidade de RNA analisado e mostra que o RNA do RET9 e o RET51 são geralmente co-expressados e são a maior parte das transcrições observadas nos tecidos estudados. Além disso, até agora somente as proteínas do RET9 e do RET51 foram detectadas nas células, e ainda faltam evidências para que outras isoformas do RET sejam expressadas.⁽⁴⁹⁾

Mecanismos de ativação do RET

RET associado com $GFR\alpha$ e formas de receptores da família GDNF.

A família dos sítios do fator neurotrófico das células de linhagem glial (GFLs) consiste de quatro homólogos intimamente relacionados: fator neurotrófico das células de linhagem glial (GDNF), neurturina (NRTN), artemina (ARTN) e persefina (PSPN)^(54,55). Eles representam uma nova subclasse da superfamília de fatores de crescimento Beta (TGF- β). Semelhantemente aos membros desta família, GFLs são dímeros de disulfato-ligados escondidos que contêm três dissulfatos de ligação organizados em uma típica configuração de “nó cisteína”⁽⁴⁹⁾. GDNF foi descrito originalmente como um fator trófico de neurônios dopaminérgicos, mas ele agora parece promover a sobrevivência de um largo espectro de neurônios, incluindo neurônios motores, noradrenérgicos, entéricos, parassimpáticos, simpáticos e sensitivos. NRTN, ARTN e PSPN fazem parte no efeito neurotrófico do GDNFs, no entanto o PSPN não promove a sobrevivência de neurônios periféricos. Interessantemente demonstrou-se que o efeito trófico do GDNF em vários tipos de neurônios necessita a presença do TGF- β , entretanto, o mecanismo molecular e a importância de sua cooperação *in vivo* não se sabe. Os sítios de ação dos GFLs através de um complexo de multisubunidades compreendendo o RET e qualquer um dos quatro glicosil-fosfatidilinositol (GPI) associados a proteínas da família de receptores α do GDNF ($GFR\alpha$ 1-4)^(54,55). Eles definem uma subfamília estruturalmente relacionada, embora as formas alternativas de $GFR\alpha$ têm sido associadas à para codificação transmembrana e de isoformas solúveis. $GFR\alpha$ 1, 2, 3 e 4 interagem preferencialmente com GDNF, NRTN, ARTN e

PSPN, respectivamente, mas há uma grau significativo de cruzamento-específico entre as diferentes membros da subfamília GFR α .

Recrutamento do RET para carregadores lipídicos e ação do GDNF.

Carregadores lipídicos são esfingolipídios - e colesterol - ricos em domínios de membrana que achava-se agirem como andaimes centrais para mediar um conjunto específico de transdutores de sinal. Moléculas GPI-ancoradas são localizadas dentro dos carregadores e baseado nisso, o GFR α -1 recruta RET para dentro dos carregadores na presença de GDNF. A diminuição de colesterol causa ruptura da estrutura do carregador e decréscimo da sinalização GDNF, indicando que a compartilhamento do RET e GFR α -1 nos carregadores lipídicos é crucial para transdução do sinal de GDNF. Também é provável que outras proteínas GFR α tenham a capacidade de recrutar o RET para o carregador interagindo com seus GFLs naturais, mas a questão ainda não está consolidada⁽⁴⁹⁾.

Originalmente, o modelo para ativação positiva do RET através de um complexo receptor-ligante é constituído por passos bem estabelecidos⁽⁵⁶⁾. No primeiro passo, uma molécula dímera do GDNF liga-se a dois monômeros de GFR α -1, no segundo passo, ocorre homodimerização e ativação pelos complexos contatos do RET e seus promotores⁽⁵⁶⁾. Esta hipótese foi baseada na observação da incapacidade do RET ligar-se ao GDNF na ausência de GFR α -1 e pela afinidade entre o GDNF e o GFR α -1 não ser aparentemente

modificada pela presença do RET⁽⁵⁶⁾. Entretanto, dois recentes desafios foram lançados para esta hipótese proposta: a ligação RET e GFR α 1 pode ser uma forma complexa de pré-associação para antecipação da ligação. Contudo, a pré-formação desse complexo RET e GFR α 1 é localizado inicialmente, o que aparentemente se opõe a idéia de recrutamento do RET para os carregadores lipídicos. Esta contradição aparente pode ser resolvida se nós supormos que o RET tem uma afinidade intrínseca moderada para os carregadores e que a associação do RET-GFR α -1 é instável. Nesse contexto, a ligação do GDNF estabilizaria o complexo e induziria a mudança conformacional, levando à ativação do RET.

Sinalização Cis contra Trans e RET independente da sinalização do GFL.

Estudos anteriores têm demonstrado que as formas solúveis do GFR α são capazes de ligar-se ao GFL e ativar o RET (na forma *trans*)⁽⁵⁶⁾. Uma forma solúvel biologicamente ativa de GFR α -1, divisão da metade GPI, foi detectada recentemente em um condicionado meio de cultura de células gliais e neuronais. A estimulação do RET em *trans* leva a uma ativação duradoura de vias de sinalização a jusante e potencializa os efeitos biológicos do GDNF⁽²⁷⁾. Surpreendentemente, a forma solúvel de GFR α -1 recruta RET a ser transportada, esse processo é dependente da atividade catalítica do RET, devendo ser considerado que o recrutamento do RET em *cis* a ser transportado (associação de RET com GFR α -1 ligado a GPI) é independente de tirosina quinase.⁽⁴⁹⁾

A observação de que GDNF engatilha a sinalização em células de origem neuronal que expressam GFR α -1, mas não RET⁽⁵⁷⁾ providenciaram um novo entrelaço para o enredo do RET. GDNF traz à tona a ativação da família quinase Src e fosfolipase C γ (PLC- γ); isso estimula um aumento rápido na transcrição do *c-fos* e promove a sobrevivência de vários neurônios que não apresentam RET detectável⁽⁵⁷⁾. Esses achados sugerem que a ligação de GDNF do GFR α -1 engatilha um sinal em células sem RET, possivelmente por meio de um aglomerado de GFR α -1 transportados em forma dependente de GDNF, ativando Src quinases. Além disso, essas observações dão suporte a uma explicação plausível para a complexa observação de que RET e GFR α s não estão sempre localizadas nos mesmo tecidos.

RET: um indutor de apoptose?

Alguns estudos observaram, recentemente, que a expressão de RET induz apoptose e que esse efeito independente de ligantes é bloqueado em presença de GDNF⁽⁴⁹⁾. Esse efeito apoptótico deve haver perda da capa protetora de um fragmento intracelular do RET e ainda a perda ou exposição de um fragmento de RET envolvidos na morte celular⁽⁴⁹⁾. Mesmo assim, os mecanismos moleculares que permitem o RET promover a ativação da capa protetora e a relevância desse processo *in vivo* são desconhecidos. Esses são assuntos que ainda devem ser examinados.⁽⁴⁹⁾

Ativação mediada pelo RET a jusante do caminho de sinalização.

É assumido que a ligação GFL une duas partes intracelulares do RET homodímero bem próximas e limitadas, portanto provavelmente liberando a tirosina quinase auto-inibitória e permitindo a trans-autofosforilação. RET51 contém 18 resíduos intracelulares de tirosina, sobre fosforilação, quatro delas (Tyr905, Tyr1015, Tyr1062, Tyr1096) são sítios de ancoragem para proteínas contendo módulos de interação específica⁽⁵⁸⁾ (tais como Src homólogo 2 [SH2] e domínios de ligação da fosfotirosina [PTB]). Proteínas contendo o SH2, GRB7, GRB10, PLC- γ GRB2 ligam-se às fosforiladas Tyr905, Tyr1015 e Tyr1096 respectivamente. Uma vez fosforilada, a Tyr1062 tem a capacidade de amarrar vários efetores de transdução, tais como SHC, FRS2 e IRS1⁽⁴⁹⁾. Este trio de proteínas reconhece a Tyr1062 fosforilada através do seu domínio PTB, embora o SHC também possa interagir com Tyr1062 do RET09 através do seu módulo SH2⁽⁴⁹⁾. Além disso, a proteína enigma que mostra um domínio amino-terminal PDZ e três domínios carboxi-terminal LIM (domínio *zinc-finger* rico em cisteína), liga-se à Tyr1062 independente do seu estado de fosforilação⁽⁴⁹⁾. O caminho de ativação a jusante do RET tem sido estudado usando diferentes abordagens. Para uma revisão mais clara, a ênfase será dada aos sinais do RET dependentes de GFL⁽⁵⁹⁾. O GDNF estimula o caminho da ativação da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) e da proteína quinase mitogênica ativada (MAPK), envolvendo, depois, a quinase extracelularmente regulada (ERKs), proteína quinase amino-terminal c-Jun (JNKs), o p38 MAPK e a grande quinase MAP (BMK1) ERK5⁽⁵⁹⁾. A estimulação do caminho da PI3K leva a ativação de múltiplos passos da proteína serina/treonina quinase (AKT/PKB, uma efetora central do PI3K. A transmissão do sinal dependente de PI3K resulta na

fosforilação competitiva das proteínas com adesões focais, a adesina quinase focal (FAK), p130CAS, e Paxilin, e também causa ativação do NF- κ B⁽⁴⁹⁾. Impressionantemente, a mutação da Tyr1062 impede a ativação do PI3K, Ras/ERK, JNKs, p38 e BMK1/ERK5 enfatizando o papel chave desses sítios de ancoragem. Estudos recentes sugerem que o sinal do GDNF bifurca a jusante do Shc, dada a observação de que adaptador pode formar distintos complexos moleculares incluindo ou Shc-GRB2-SOS-Ras, que ocasiona a ativação do ERKs, ou SHC-GRB2-GAB1-PI3K ou SHC-GRB2-GAB2-PI3E, os quais levam à estimulação do PI3K⁽⁴⁹⁾. A contribuição deste diferente caminho para efeito trófico do GDNF continua ainda pouco conhecido.

Entretanto, a estimulação do caminho do PI3K dependente de GDNF se faz necessária para este sinal neurotrófico, bem como para formação da lamellipodia. A tirosina quinase do Src ativa é necessária para GDNF resgatar as células da apoptose e promover que Src medie seu efeito neurotrófico na via PI3K.

Processo de sinalização do GFL durante o desenvolvimento

Hibridização *In Situ* e análises imunohistoquímicas em embriões de roedores e humanos revelaram que a expressão de RET é fundamental para ao desenvolvimento dos sistemas nervoso e urogenital⁽⁶⁰⁾.

Desenvolvimento do sistema nervoso periférico: papel do RET e GFL

Em estágios precoces do desenvolvimento do sistema nervoso periférico, RET é expressado numa população cranial de células da crista neural. RET é também expresso nas células vagais da crista neural, as quais povoam todo o intestino e o gânglio simpático cervical superior. Células RET positivas são detectadas durante sua migração rostro-caudal pelo mesênquima intestinal e subseqüentemente são observadas nos plexos mioentérico e submucoso, que formam a parte intestinal do sistema nervoso entérico. Sua expressão é também detectada nos gânglios autonômicos e do sensorio e nas células enterocromafins adrenais. No desenvolvimento do sistema nervoso central, células RET positivas são encontradas em neurônios motores na metade ventral da medula espinhal, na neuroretina e também no epitélio olfatório⁽⁶⁰⁾.

Estudos recentes apontam que o GDNF é um potente fator trófico e mitogênico para precursores entéricos derivados da crista neural⁽¹⁴⁾. GDNF é expresso no mesenquima gastrointestinal embrionário. GFR α -1 é amplamente expressado no intestino em estágios precoces do desenvolvimento e, em estágios tardios, fica confinado a precursores do sistema nervoso entérico. Ratos homozigotos para a mutação (*null mutations*) em RET, GDNF ou GFR α -1 morrem poucos dias após o nascimento e apresentam falha no desenvolvimento do sistema nervoso entérico em todo o intestino⁽⁶⁰⁾. Em ratos que não apresentam RET, progenitores do sistema nervoso entérico sofrem apoptose maciça durante sua migração ao intestino⁽⁶¹⁾. Além disso, GDNF promove a diferenciação e a sobrevivência de precursores do sistema nervoso entérico *in vitro*⁽⁶¹⁾, e esses efeitos são potencializados pelo GFR α -1. Em estágios mais avançados, GDNF promove tanto os

efeitos neurotróficos quanto os de diferenciação nos precursores do sistema nervoso entérico⁽⁶¹⁾. Esses resultados estão em concordância com a idéia de que os sinais promovidos por GDNF/RET exercem poder sobre o desenvolvimento dos progenitores pluripotentes desse sistema durante a sua infiltração na parede intestinal e após estimulam diferenciação desse sistema. Os fenótipos dos ratos deficientes de RET, GDNF ou GFR α -1 são similares, sugerindo que os sinais do GDNF derivam através do RET e GFR α -1. No entanto, esses fenótipos não são iguais, por exemplo, a cadeia ganglionar cervical superior está completamente ausente em ratos sem RET, enquanto ratos com deficiência de GDNF e GFR α -1 apresentam, respectivamente, 35% de perda e ausência de perda neuronal⁽⁶⁰⁾. Esses resultados favorecem a hipótese de que GDNF pode mediar seus efeitos via outras proteínas GFR α e que outros membros GFL são requisitados durante a formação da cadeia cervical em questão. De acordo com essa hipótese, ratos sem GFR α -3 têm falta ou redução drástica da cadeia cervical, devido a defeitos de migração e sobrevivência de seus precursores. Isso sugere que artemina (ARTN) é um fator crucial para o desenvolvimento de neurônios ganglionares cervicais superiores⁽⁴⁹⁾.

Ratos sem neurturina (NRTN) ou GFR α -2 são viáveis e não apresentam defeitos visíveis ao nascimento, embora a deficiência desta leve a crescimento retardado pós-natal⁽⁶⁰⁾. Análise desses ratos demonstrou números reduzidos de uma subpopulação de neurônios mioentéricos no intestino delgado. Esses ratos também apresentam uma redução dramática da inervação colinérgica nas glândulas salivares e lacrimais e de fibras nervosas que produzem óxido nítrico, que contribui para a inervação peniana. A similaridade do fenótipo

dos ratos com essas diferentes mutações reforça a noção de que NRTN age através de $GFR\alpha-2$; isso também indica que NRTN é um fator fundamental para o tropismo para neurônios parassimpáticos craniais e sacrais. Finalmente, o fato de que $GFR\alpha-2$ é eminentemente expressado depois do nascimento no trato gastrointestinal sugere que NRTN é requerido para manutenção dos neurônios entéricos adultos, enquanto GDNF exibiria seus efeitos durante a neurogênese entérica.

As mortes de ratos associadas ao RET e ao GDNF exibem ambas completa aganglionose intestinal e defeito renal. Recentemente, GDNF e GFRA1 (receptor da família GDNF, também conhecido como $GDNFR-\alpha$) e correceptores GPI-ligados, foram caracterizados como componente de um sítio funcional do RET. Além disso, GDNF tem sido implicado em casos raros de HSCR. Um estudo têm mapeado o GFRA1 em humanos no cromossomo 10q25, foi isolado em clones de genomas de humanos e ratos, determinado os limites entre exons e introns, isolado um microsatélite polimórfico muito grande que é marcador adjacente para o exon 7, e é encontrado em mutações para o GFRA1 presente em um grande painel de pacientes com HSCR. Esta evidência não foi encontrada em todos os casos da HSCR, logo suas seqüências variantes não foram significativas em todos os pacientes. Estes dados sugerem que o GFRA1 tem um papel na neurogênese entérica necessária para a sobrevivência humana. Presente junto ao RET atua sinalizando uma via alternativa para originar o intestino, mecanismo semelhante ao que foi recentemente descrito pela presença de um correceptor GFRA1-like ou GFRA2.

Um estudo⁽⁶²⁾ introduziu 5 mutações do HSCR nos domínios extracelulares do RET cDNA humano. As 5 mutações envolvendo os domínios extracelulares do RET inibiam o transporte da proteína RET para a membrana plasmática (assim, a expressão na superfície celular é baixa). Os autores concluíram que suficientes níveis de expressão do RET na superfície celular são requeridos para migração ganglionar na porção distal do colon ou para diferenciação completa.

RET e a Doença de Hirschsprung

Mutações no RET são responsáveis pela metade dos casos familiares de HSCR. Estão dispersas na seqüência codificadora e podem ser deleções, inserções, *frameshift*, *nonsense*, *missense*. A natureza dessas mutações indicam que HSCR resulta de haploinsuficiência do RET, uma idéia que vai ao encontro do fato de que a maioria das mutações *missense* envolvidas na HSCR prejudica a função do RET. As conseqüências funcionais das mutações da HSCR correlacionam-se com a posição na seqüência codificadora e tentou-se agrupá-las em quatro classes⁽⁴⁹⁾.

Mutações da classe I localizam-se no domínio extracitoplasmático, impedem a maturação do RET e inibem a sua translocação na membrana plasmática.

Mutações da classe II causam a substituição de uma dos quatro resíduos extracitoplasmáticos de cisteína (Cys609, 611, 618 e 620) por um aminoácido diferente. Mutações na linhagem germinativa das mesmas posições ocupadas pela cisteína também foram identificadas nas Neoplasias Endocrinológicas Múltiplas tipo 2A (NEM2A) e no Carcinoma Medular da Tireóide Familiar (CMTF), duas doenças herdadas de forma

dominante. NEM2A/CMTF e HSCR segregam-se em famílias e afetam indivíduos que carregam uma única mutação em uma das quatro posições da cisteína. Muitos grupos têm aventado a possibilidade de que essas mutações têm um duplo impacto funcional sobre o RET: ativação constitutiva do RET pela formação de homodímeros de RET ligados por dissulfida associado a uma diminuição drástica do RET na superfície celular. Esses achados suportam a idéia de que mutações únicas têm efeitos opostos, dependendo do tecido em que RET é expressado, podendo resultar em proliferação descontrolada de células endócrinas afetadas nas NEM2A ou no CMTF (ganho de função) e apoptose nos neurônios entéricos (perda de função).⁽⁴⁹⁾

As mutações da classe III afetam o domínio tirosina quinase (TK) e perturbam a sua atividade catalítica. Entretanto, mutações alterando aminoácidos conservados entre membros da TK impede a atividade quinase do RET, enquanto mutações envolvendo resíduos não conservados não abolem completamente a atividade da TK, mas parecem reduzir significativamente a atividade das vias sinalizadoras do PLC- γ .

As mutações da classe IV não fazem decrescer a atividade da TK mas interferem especificamente na ligação de efetores transduccionais com RET⁽⁶³⁾. Por exemplo, duas mutações independentes ocorrendo proximalmente de Tyr1062 inibe a fixação de Shc, IRS-1 e FRS2 no RET⁽⁶³⁾, indicando que esses adaptadores estimulam as vias sinalizadoras requeridas durante a neurogênese entérica. Outros mecanismos adicionais da perda da função do RET podem estar implicadas na etiologia do HSCR. Foi proposto que certas

mutações missense envolvidas em HSCR poderiam ter um efeito dominante negativo, ou converter RET em um indutor de apoptose.

O *screening* dos genes $GFR\alpha$ -1, -2 e -3 em pacientes com HSCR não conseguiu encontrar mutações relacionadas. Ao contrário, mutações em heterozigose do GDNF e do NRTN foram identificadas na linhagem germinativa de uma pequena fração de pacientes com HSCR⁽²⁸⁾. Entretanto, análise genética mantém a noção de que essas mutações não são suficientes para causar HSCR, mas contribuem para a doença quando associadas com mutações ou no RET ou em outros loci associados com a doença⁽²⁸⁾. Os achados que o locus 9q31 contribui para HSCR em conjunção a mutações hipomórficas do RET, e que outros dois loci adicionais, em 3p21 e 19p12, agem como gene modificadores dependentes de RET, são consistentes com o fato de que HSCR não é apenas um simples traço mendeliano, mas preferentemente devem ser descritos como um tipo de herança poligênica.

A maioria dos casos familiares e esporádicos de HSCR são devidos a mutações do proto-oncogene RET. Cinco mutações no GDNF (*glial cell-line-derived neurotrophic factor*) foram detectadas em pacientes com HSCR. A análise de heredogramas e a observação da associação entre alterações do GDNF e variantes do RET em um mesmo tipo de paciente levantou a questão de se o gene GDNF participa como causa na patogênese dessa doença. Em um estudo⁽⁴⁹⁾, foi estudada a habilidade de proteínas GDNF, cada uma representante de uma das mutações, de ativar RET, em teste com cultura de células de neuroblastoma. Com

a falta de correlação genótipo/fenótipo em humanos, os resultados indicaram ausência de ativação do RET pelas alterações dos GDNF mutados.

FISIOPATOLOGIA

A Doença de Hirschsprung (HSCR) decorre de alteração na migração das células da crista neural em direção ao intestino distal. A parada de migração pode ocorrer em qualquer parte do intestino, mas em cerca de 80% das vezes ocorre ao nível do retossigmóide. No embrião de cinco semanas, é possível identificar precursores de neuroblastos no intestino primitivo anterior; uma semana após, podem ser vistos no esôfago; na oitava semana, no cólon transversal e no fim da décima segunda semana de gestação, no reto. Após a migração caudal dos neuroblastos, ocorrem a distribuição e a migração dos mesmos para camadas mais superficiais e mais profundas da parede intestinal, seguidas de maturação dos neuroblastos para células ganglionares. ⁽³⁴⁾ A citocina-endotelina 3 é necessária para o sucesso da colonização do intestino distal, mas o local de sua interação com as células derivadas da crista neural ainda precisa ser estabelecida. Outra hipótese admite que, nesta fase, fatores microambientais destruiriam as células ou impediriam sua agregação. Foi demonstrado aumento de antígeno classe II na zona aganglionar em segmentos intestinais com displasia neuronal. Não se sabe o valor deste achado, mas parece estar relacionado com fatores imunológicos na destruição de células ganglionares. Outros estudos que objetivavam identificar a natureza das anormalidades não-neuronais no segmento colônico que poderiam ser responsáveis pela falha migratória encontraram elevados níveis de

glicoproteínas na matriz extracelular, laminina e colágeno tipo IV. ^(64,65) Essas e outras glicoproteínas, como a fibronectina e o ácido hialurônico, têm um papel importante na neurogênese entérica na vida embriológica precoce e essa evidência sugere que uma anormalidade no microambiente da parede do cólon impede a migração normal das células da crista neural, podendo ser um dos fatores na patogênese do HSCR. Estudos sugerem que as células da crista neural que expressam o RET falham na migração para seus sítios no intestino quando o RET não é totalmente expressado.

A patogenia fundamental do HSCR é a ausência de células ganglionares nos plexos intermuscular (Auerbach) e submucosos profundo (Meissner) e superficial (Henle) do intestino. Como consequência, a zona aganglionar é aperistáltica e constitui um obstáculo ao trânsito intestinal. Os segmentos proximais ganglionares se dilatam, há progressiva hipertrofia muscular e a parede se torna espessada. A hipertrofia das camadas musculares ocorre nos casos de mais longa duração e são caracteristicamente visíveis fibras nervosas hipertrofiadas na submucosa, muscular da mucosa e ao nível do plexo intermuscular. As fibras hipertrofiadas são pré-ganglionares colinérgicas, provenientes da cadeia parassimpática paravertebral. Imagina-se que essas fibras pré-ganglionares, não encontrando as células ganglionares para sinapse, sofram, inicialmente, hipertrofia; continuando na procura de uma célula ganglionar, dicotomizam-se e se espalham desordenadamente pelas várias camadas da parede intestinal. As fibras invadem inclusive a lâmina própria, local onde normalmente não há inervação colinérgica. Tais fibras hipertrofiadas e dispersas são histoquimicamente identificadas como colinérgicas. A

hipertrofia de fibras colinérgicas faz supor uma atividade parassimpática exacerbada, isto é, atividade motora colinérgica funcionalmente isolada, sem inibição da atividade relaxadora simpática. Essa hipótese não encontra explicação completa se lembrarmos que na zona aganglionar há escassez ou ausência de fibras simpáticas adrenérgicas. As formas com manifestações clínicas intensas e precoces são aquelas nas quais se identifica maior quantidade de grossos troncos nervosos não-colinérgicos através da pesquisa da acetilcolinesterase.⁽³⁴⁾ Um estudo demonstrou que os níveis elevados de acetilcolinesterase no HSCR são devidos, principalmente, ao aumento forma globular tetramérica hidrofóbica que é o mesmo tipo encontrado em tecidos nervosos em diferenciação antes da formação das sinapses.⁽⁶⁶⁾

As fibras nervosas presentes no segmento aganglionar parecem utilizar transmissores responsáveis pela contração e não utilizar transmissores para o relaxamento, sendo que a causa da constrição nesse segmento poderia ser a predominância de elementos neuronais que produzem contração e a diminuição daqueles responsáveis pelo relaxamento.⁽³⁴⁾ A inervação inibitória do intestino inclui fibras intrínsecas não-adrenérgicas, não-colinérgicas (NANC) em menor grau fibras extrínsecas adrenérgicas.

Ainda não há certeza sobre qual é o neurotransmissor fundamental no sistema de controle inibitório NANC; porém, evidências recentes sugerem que esse transmissor seja o óxido nítrico (NO), sintetizado a partir da L- arginina pela óxido nítrico sintetase, que foi identificado como importante mediador para o relaxamento da musculatura do intestino. Estudos recentes demonstraram que NO está ausente no segmento aganglionar no HSCR.

Pesquisas que realizaram aplicação tópica de NO tiveram sucesso no tratamento da acalasia, o que pode significar uma possibilidade para um futuro manejo terapêutico do HSCR. ⁽⁶⁸⁾ A inervação NANC inclui diferentes populações de fibras nervosas que contêm peptídeos. Defeitos nessa inervação podem estar presentes em até 20% das crianças que persistem com disfunção intestinal após a remoção do segmento aganglionar. Estudos sobre a inervação peptídica do segmento aganglionar têm revelado redução ou ausência de uma grande variedade de neuropeptídeos, incluindo peptídeo intestinal vasoativo (VIP) polipeptídeo pituitário ativador da adenilato ciclase encefalina, peptídeo relacionado à gastrina e substância P. A importância funcional desses neuropeptídeos no controle da motilidade intestinal não é conhecida. No entanto, um efeito sinérgico no controle da motilidade entre o VIP e o NO foi demonstrado e sugere que a falta de um deles nas fibras nervosas no segmento aganglionar do HSCR pode contribuir ou ser responsável pela incapacidade de relaxamento da musculatura lisa, impedindo, então, as ondas peristálticas. ⁽⁶⁷⁾ Outro estudo sugere que além do NO, o monóxido de carbono (CO) pode estar envolvido na disfunção da motilidade no HSCR porque enzimas necessárias para suas sínteses estão ausentes nas regiões mioentéricas e submucosas do segmento aganglionar do cólon. ⁽⁶⁹⁾

A fisiopatologia do HSCR se resume na falta de propulsão do segmento aganglionar, que não permite que a onda peristáltica prossiga. Estudos manométricos mostram que esse segmento, além de não ter peristaltismo, é espástico e se contrai em bloco, independentemente da onda peristáltica crânio-caudal. Isto provavelmente é o resultado de uma atividade colinérgica exacerbada, da ausência de atividade óxido-

nitrérgica relaxadora e da ausência da atividade inibidora adrenérgica e não-adrenérgica. Não está estabelecido o peso de cada um desses fatores na espasticidade final do segmento aganglionar.⁽³⁴⁾

INTERAÇÃO GENÓTIPO-FENÓTIPO

A Doença de Hirschsprung tem sido associada com múltiplos genes, sugerindo heterogeneidade genética. Mutações em apenas um entre vários genes são suficientes para a expressão genotípica da doença. Além disso, HSCR se trata de uma enfermidade multigênica complexa, na qual o efeito cumulativo das mutações em múltiplos genes contribui para o fenótipo de um determinado indivíduo. Apesar de as análises genético-moleculares terem identificado múltiplos genes envolvidos na causa do HSCR, o gene maior de suscetibilidade é o RET. Resultados de estudos de ligação demonstraram substancial segregação do locus do RET com o fenótipo do HSCR. Entretanto, mutações na linhagem germinativa do proto-oncogene RET podem ser identificadas em apenas 50% dos casos familiares e em 20% dos casos esporádicos de HSCR. Alterações genéticas adicionais, penetrância e severidade de fenótipo variáveis podem explicar essa discrepância. Especificamente, essas alterações podem incluir seqüências modificadoras do RET, outras mutações além daquelas que codificam a seqüência do RET, genes localizados perto do locus do RET e outros genes de suscetibilidade. ⁽⁷⁰⁾

Fitze e colaboradores ⁽⁴⁴⁾ confirmaram que outras mutações estão associadas significativa e mais freqüentemente com o fenótipo de longo-segmento do que com o de

curto-segmento, o que concorda com achados de estudos anteriores. Estudos recentes mostraram que o silencioso polimorfismo c135G/A no proto-oncogene RET é fortemente associado com o fenótipo do HSCR. Sugere em seu estudo que a variante c135G com a mutação do RET em um cromossomo, combinado com o alelo c135A no outro cromossomo resulta no fenótipo de longo-segmento; porém três mutações localizadas no alelo c135A resulta no fenótipo de curto-segmento. Esse estudo sugere, também, que a variante c135A protege contra o severo fenótipo do HSCR causado por uma mutação no RET quando a variante c135A e a mutação no RET estão localizadas no mesmo alelo.

Um estudo experimental em ratos realizou a deleção de parte do RET, incluindo o domínio da tirosina-quinase, resultando na perda completa da função do RET. Apesar de os animais heterozigotos não terem demonstrado sinais histopatológicos de aganglionose, os homozigotos para as deleções do RET tiveram aganglionose severa se estendendo até o estômago e morreram nas primeiras 24 horas após o nascimento.⁽⁷¹⁾ De acordo com esse modelo, é necessária alteração em ambos os alelos do RET para que ocorra o HSCR. Se os seres humanos, assim como os ratos, não sobreviverem, após o nascimento, à deleção completa do RET, poderia se explicar a baixa frequência de casos com mutações combinadas. Além disso, combinações variáveis do alelo mutado do RET com outros haplótipos do RET poderiam explicar a penetrância incompleta e a severidade variável da doença observada freqüentemente em famílias que carregam uma mutação no RET.⁽⁷²⁾

O envolvimento das cópias do gene RET de ambos cromossomos na patogênese da Doença de Hirschsprung ocorre de forma dose-dependente nos casos da doença associados ao RET. Além disso, o polimorfismo c135G/A ou variantes ligadas parecem modular o fenótipo do HSCR derivado de mutações através de interação dentro do gene entre a mutação e o polimorfismo.⁽⁴⁴⁾

PADRÕES DE HERANÇA

Como anteriormente descrito, o RET é o principal gene envolvido na doença de HSCR isolada. No entanto, a presença de mutações em outros genes suscetíveis para a doença também pode contribuir na determinação das características fenotípicas. o que ainda não está bem definido é a interação entre o RET e os demais genes, não só os genes suscetíveis para HSCR, como também os outros genes que podem atuar como modificadores.

Assim, há dois mecanismos para explicar a doença de HSCR:

- 1) heterogeneidade genética, isto é, a mutação em qualquer um dos diferentes genes é suficiente para a expressão fenotípica da doença;
- 2) sinergismo, onde o efeito cumulativo das mutações em diferentes genes contribui para a determinação do fenótipo em um indivíduo.

Assumindo essas hipóteses como verdadeiras, podemos ter dois tipos de padrão de herança diferentes:

- padrão de herança mendeliana monogênica – se pensarmos que a mutação em um gene determina a doença de HSCR, e então esse gene pode ser herdado de maneira autossômica recessiva ou dominante.
- Padrão de herança multifatorial – se pensarmos que é necessário o efeito aditivo de diferentes mutações, associado ao efeito do ambiente, para a expressão da doença. Nesse caso, todas as mutações contribuem igualmente para a determinação de uma característica.

No entanto, estudos observacionais falharam no propósito de determinar um ou outro padrão como verdadeiro. A doença de HSCR, então, fez com que se criasse uma nova classificação.

A doença de HSCR isolada é considerada uma Doença de Herança Complexa. Nesse padrão assume-se que existe um gene principal, envolvido no desenvolvimento da doença, que pode atuar só ou em conjunto com outros genes de menor importância para a determinação da expressão fenotípica final. O gene principal pode, então, apresentar um padrão de herança mendeliana monogênica ou multifatorial, sendo este determinado somente após extensa análise do heredograma da família.

Nos casos de HSCR isolada familiar, se o gene estiver segregando de maneira autossômica dominante, há penetrância incompleta e expressividade variável. Se a herança é multifatorial, estudos observacionais demonstram que a influência gênica predomina sobre os efeitos do ambiente. Nos casos de HSCR isolada esporádica, é difícil prever o padrão de herança e, por consequência, o risco de recorrência.

Assim, a interação entre os mecanismos de heterogeneidade genética e sinergismo determina todas as expressões fenotípicas em uma população com doença de HSCR.

HSCR se tornou um modelo de desordem multigênica complexa cuja relação entre os diferentes genes cria um padrão de herança não-mendeliana que ainda precisa ser elucidado.⁽⁷⁴⁾

Análises Genéticas dos traços qualitativos e quantitativos da doença

Como parentes compartilham uma grande proporção dos seus genes com outros que não parentes na população, a primeira característica das doenças com herança complexa é que indivíduos afetados tendem a se agrupar em famílias (agregado familiar). O inverso, entretanto, não é necessariamente verdadeiro: agregado familiar de uma doença não significa que essa deva ter uma contribuição genética. Membros de uma família podem desenvolver a mesma doença, principalmente se esta for comum na população. Famílias compartilham mais do que seus genes: por exemplo, eles frequentemente têm atitudes culturais, comportamento, dieta, e exposição ambiental em comum.

Doenças com herança complexa resultam de um impacto de fatores ambientais e individuais com certos genótipos. Discordância (quando apenas um dos membros da família não é afetado) de fenótipos entre parentes que dividem um genótipo de um loci que predis põem uma doença pode ser explicada se o indivíduo não afetado não tiver experiência com outros fatores necessários para desencadear o processo da doença e fazê-la manifestar. Ao contrário, concordância (dois indivíduos de uma mesma família tem a mesma doença) para um fenótipo pode ocorrer até quando dois parentes afetados apresentam genótipos predisponentes diferentes, se a doença em um dos parentes for uma genocópia ou fenocópia da doença do outro. A penetrância incompleta e freqüentes genocópias e fenocópias contribuem para obscurecer o padrão de herança multifatorial.

Concordância e compartilhamento de alelos entre familiares

Quanto mais próximo o parentesco de indivíduos em uma família, mais alelos eles terão em comum, herança de seus ancestrais comuns. Para se distinguir as influências genéticas dos efeitos ambientais em uma doença multifatorial, compara-se a concordância da doença em parentes que tem maior ou menor parentesco com o ancestral.

Doenças com concordância menor de 100% em gêmeos monozigóticos são uma forte evidência de que fatores não genéticos fazem parte de doença. Concordância completa em monozigotos *versus* gêmeos dizigóticos é uma forte evidência de um componente genético.

Características das doenças com herança complexa:

- 1- Doenças com herança complexa não são desordens de um único gene e não demonstram um padrão de herança simples mendeliano.

- 2- Doenças com herança complexa demonstram agregado familiar, porque parentes de um indivíduo afetado mais provavelmente têm alelos predisponentes da doença em comum com a pessoa afetada do que indivíduos não parentes.

- 3- Dois parentes que dividem genótipos predisponentes de uma doença de loci relevantes podem ainda discordar do fenótipo pela regra crucial dos fatores não genéticos na causa da doença. Os exemplos mais extremos de penetrância incompleta apesar de genótipos idênticos são os genes monozigóticos discordantes.

- 4- A doença é mais comum quanto mais próximos os parentes forem de um mesmo ancestral, e se torna menos comum em parentes que tenham parentesco mais distante. Concordância perfeita é esperada entre monozigotos *versus* gêmeos dizigóticos.

DIAGNÓSTICO MOLECULAR

O diagnóstico definitivo da doença de HSCR é realizado apenas com exame anátomo e histopatológico; no entanto, o diagnóstico molecular dessa doença é importante pois permite estudos e pesquisas sobre essa malformação.

Mapeamento genético dos traços complexos

Uma vez que a herança de uma doença com um traço complexo é mostrada como tendo um componente hereditário importante, o próximo passo é mapear os genes envolvidos e os identificar.

Dois principais métodos têm sido usados para localizar e identificar genes que predisõem doenças complexas ou contribuem para a variância genética dos traços quantitativos.

O primeiro é um tipo de estudo de ligação que depende de dois membros de uma família, tal como irmãos, que sejam concordantes para o fenótipo. Irmãos, em média, tem 50 % de seus alelos em comum (idênticos) em qualquer locus pela descendência dos pais comuns. Se uma região do genoma é compartilhada mais freqüentemente que o esperado

por parentes concordantes para um fenótipo particular, infere-se que existam alelos que predisõem esse fenótipo em um ou mais loci nessa região.

A segunda maneira é a associação, a qual procura por frequências aumentadas de determinados alelos em afetados comparados com indivíduos não afetados na população.

Ambos métodos apresentam vantagens e desvantagens em situações especiais, como descritas adiante.

Estudo de ligação livre de modelos de doenças com traços complexos

O estudo de ligação padrão é um poderoso método para se mapear desordens de um único gene, mas é raramente aplicável para traços complexos.

O estudo de ligação depende do modelo assumido de herança e depois da quantidade de proles recombinantes e não-recombinantes em famílias para (1) determinar se existe evidência para um locus gênico que recombinem com o locus da doença com uma frequência θ que é menor do que os 50% esperados de loci não-ligados, e (2) estimar o valor do parâmetro θ que dá o mais alto *lod-score* θ_{\max} . Essa aproximação do estudo de ligação é chamada de estudo de ligação baseada em modelos (ou paramétrica), porque pressupõe que existe um modelo particular de herança (autossômica dominante,

autossômica recessiva, ou ligada ao X) que explica o padrão de herança. Por suas várias naturezas, doenças herdadas com traços complexos não são usualmente acessíveis a uma análise que depende do conhecimento da mutação em um único gene, herdado por um padrão de herança mendeliano específico. Em vez disso, métodos livres de modelos (ou não paramétricos) têm sido desenvolvidos para não se fazer suposições a respeito do número de loci ou da função do meio ambiente e provável causa por penetrância incompleta. Preferivelmente, métodos livres de modelos dependem somente da suposição de que dois parentes afetados deverão ter alelos predisponentes para doença em comum.

Um tipo de análise livre de modelos é o “método dos gêmeos afetados”. Apenas irmãos concordantes quanto a doença são usados, eliminando assim o problema de determinar se um indivíduo não afetado é carreador de alelos não penetrantes que predis põe a doença ou simplesmente não os herda. Não é necessário fazer suposições sobre o número de loci envolvidos ou o padrão de herança, em vez disso, os irmãos são analisados para determinar se existem alelos compartilhados no loci dos dois irmãos afetados mais frequentemente do que os 50% esperados sozinhos. O que acontece se centenas de irmãos gêmeos concordantes para uma doença são sistematicamente estudados pela divisão alélica no loci através do genoma?

Supõe-se que possam haver muitos loci que predis põem a doença, porém nem todos os irmãos concordantes para uma doença irão compartilhar alelos nos mesmos loci; entretanto, se um determinado locus tem uma contribuição importante para a doença

significativamente maior de que a esperada de alelos compartilhados serão encontrados um grau no locus de irmãos gêmeos.

Se o grau de alelos compartilhados diverge significativamente dos 50% esperados herdados sozinhos, pode-se avaliar usando a razão máxima de probabilidade, como um estudo de ligação baseado em modelos usando *lod score*, para avaliar que se a frequência de recombinação for menor que 50% é significativa.

No “método dos irmãos gêmeos”, o DNA dos irmãos afetados é sistematicamente analisado usando-se centenas de marcadores polimórficos por todo o genoma (uma exploração do genoma) a procura de regiões que são compartilhadas pelos dois irmãos significativamente mais frequentes do que o esperado puramente pela randomização das bases.

Quando graus elevados de alelos compartilhados são encontrados por um marcador polimórfico, isso sugere que o locus envolvido na doença está perto do marcador. Entretanto, considerando-se que, quanto mais polimórfico os loci estudados, mais provavelmente este locus apresentará o que parece ser uma alta taxa de alelos compartilhados por chance única. Para entender porque, considere o exemplo da moeda arremessada. Embora não se pareça que um simples experimento de arremessar uma moeda 5 vezes irá dar 5 caras, é muito provável que, se um experimento é repetido centenas de vezes, pelo menos uma dessas vezes o experimento renderá 5 caras. Níveis elevados e um

correspondente *lod score* pelo aumento dos alelos compartilhados na exploração do genoma usando aproximadamente 400 marcadores tem sido proposto para reduzir o risco de designar uma significância inapropriada para o que é apenas uma flutuação aleatória dos níveis de alelos compartilhados esperados. Nesse cenário, um bom *lod score* de aproximadamente 3.6 por alelos compartilhados em um locus pode ocorrer com uma probabilidade menor do que 2 em 20 em *chance alone*; um bom *lod score* de 5.4 pode ocorrer em apenas um de cada 1000 estudos.

Embora o método dos “irmãos gêmeos afetados” evite a possibilidade de suposições incorretas sobre quantos loci estão envolvidos e quais alelos nesses vários loci interagem para causar a doença, ele o faz ao custo de ser insensível e impreciso. A insensibilidade é refletida no fato de que grandes números de irmãos são necessários para detectar um desvio significativo dos 50% de alelos compartilhados esperados. Suponha, por exemplo, que um alelo de um locus de uma doença tenha uma frequência de 10% na população e o risco de que a doença aumente é de 4 vezes em heterozigotos e de 16% em homozigotos. Nessa situação, sob as melhores condições, estima-se que se pode pegar 185 irmãos gêmeos para detectar um aumento dos alelos compartilhados próximo aos 60%. Se o locus tem uma contribuição relativamente infrequente para a doença ou causa muito menos do que um aumento no risco da doença de 4 vezes em heterozigotos, um aumento dos alelos compartilhados maior do que 50% pode ser proporcionalmente menor e muito, muito mais gêmeos, milhares ou dezenas de milhares seriam necessários para se detectar o locus. Então falando de maneira mais prática “o método dos irmãos gêmeos afetados” não é o ideal, para

se identificar loci quando uns poucos e raros alelos fazem apenas uma pequena contribuição para a doença.

Métodos livre de modelos também são imprecisos. Porque um não presume que um único gene ou um determinado padrão de herança está envolvido, não se pode determinar definitivamente se a recombinação ocorreu entre um possível locus predisponente da doença e um fenótipo da doença. Em estratégias de ligação modelo-baseadas no mapeamento delicado de doenças com gene único, descobriu-se que marcadores próximos de cada lado do gene que faz a recombinação pelo menos uma vez com o gene da doença define os limites da estreita região criticamente delimitada em cujo gene da doença deve residir. Métodos livres de modelo podem apenas identificar as amplas regiões de alelos compartilhados aumentadas e não as estreitas regiões críticas, delimitando a localização do gene que contribui com um traço complexo.

Estudo de ligação livre de modelos de traços quantitativos

Métodos de ligação livres de modelo baseados no compartilhamento de alelos também podem ser usados para mapear os loci envolvidos em traços complexos quantitativos. Embora um número de aproximações sejam avaliados, um exemplo interessante é o “método dos irmãos gêmeos altamente discordantes”. Mais uma vez, nenhuma suposição precisa ser feita sobre o número de loci envolvidos ou sobre o padrão de herança. Irmãos gêmeos altamente discordantes para um traço quantitativo – isto é, com

valores de uma medida fisiológica que estão em finais opostos de uma curva em forma de sino (*bell-shaped*) - , são supostamente menos prováveis de compartilhar alelos nos loci que contribuem para o traço.

A alta discordância do DNA de irmãos é então sistematicamente analisada usando-se marcadores polimórficos por todo o genoma a procura de regiões que são compartilhadas pelos dois irmãos significativamente menos freqüentes do que o esperado puramente pela randomização das bases. Quando níveis reduzidos de alelos compartilhados são encontrados por um marcador polimórfico, isso sugere que o marcador está ligado ao locus cujos alelos contribuem para qualquer medida fisiológica do estudo.

Associação de doenças

O fato de um determinado alelo num locus apresentar uma freqüência aumentada em pacientes afetados isolados comparado com controles é conhecida como uma doença associada. Métodos de associação são uma forma de estudo de caso e controle em que a freqüência de determinados alelos em um locus é comparada entre indivíduos afetados e não afetados da população. A força de uma associação é medida pela “*odds ratio*” que é calculada pela freqüência de um alelo específico em pacientes e controles.

Uma diferente, mas relacionada, medida de associação é o risco relativo que compara o risco de se desenvolver a doença quando um indivíduo portador de um alelo específico relativo ao risco se o outro não é portador.

Risco relativo é aproximadamente igual a “*odds ratio*” quando o alelo da doença é rara . (Não confundir risco relativo (RR) com razão de risco relativo (λ_r) previamente discutido nesse trabalho. λ_r é a prevalência de um fenótipo específico em parentes afetados *versus* a população geral.)

A maioria das células ganglionares do plexo colônico podem ser facilmente e especificamente identificadas por imunoensaio do marcador neuronal NeuN. A distância entre as células ganglionares solitárias vizinhas ou grupos de células ganglionares varia de 0.18 a 4.0 mm, em média 1.0 mm, em segmentos ganglionares do cólon de pacientes com doença de HSCR, e de 0.3 a 6.3 mm, em média 1.43 mm, no cólon de pacientes pediátricos com constipação de várias etiologias. Nenhuma célula ganglionar foi detectada em segmentos colônicos aganglióticos de pacientes com doença de HSCR por este método.⁽⁷⁵⁾

TRATAMENTO

O tratamento da HSCR é cirúrgico⁽³²⁾, tendo como terapêutica adjuvante à cirurgia definitiva a limpeza mecânica do colo e a colostomia descompressiva. O sucesso terapêutico está diretamente ligado ao diagnóstico precoce e pronto início do tratamento⁽³⁵⁾. A cirurgia tem como objetivo a reconstrução do trânsito intestinal, com exclusão do segmento aganglionar e manutenção da continência fecal.⁽³⁴⁾ A primeira técnica cirúrgica descrita foi em 1948 por Swenson⁽⁷⁶⁾, sendo válidos os seus princípios cirúrgicos independentemente da técnica empregada: remoção ou desvio do segmento aganglionar e abaixamento do cólon com gânglios até a linha pectínea⁽²⁰⁾. Desde o surgimento da técnica de Swenson e sua aceitação como técnica primária no tratamento de HSCR até os dias atuais, inúmeras técnicas foram desenvolvidas, tais como a de Soave e Duhamel^(77,78), no intuito de diminuir as complicações e simplificar a cirurgia, tendo em vista que os resultados obtidos por Swenson não são uniformemente obtidos por outros autores⁽³⁴⁾. Atualmente tem sido desenvolvidas técnicas laparoscópicas para o tratamento de HSCR⁽⁷⁹⁾.

Em geral os resultados com o tratamento cirúrgico da doença de HSCR são satisfatórios. Em um seguimento de 25 anos, Swenson relatou que 90% dos seus pacientes tinham hábito intestinal normal e que não haviam casos de impotência ou incontinência urinária no seguimento tardio⁽⁸⁰⁾. Soave, analisando sua experiência em seguimento de mais

de 15 anos, referiu igualmente hábito intestinal normal na maioria dos doentes e ausência de impotência ou incontinência a longo prazo⁽⁸¹⁾. Já com o procedimento de Duhamel, apesar de não haver problemas com impotência ou alterações urinárias, são relativamente frequentes os casos de esvaziamento incompleto da ampola retal, com conseqüente estase fecal a esse nível⁽⁸²⁾. Em estudos mais recentes foram descritas como complicações pós-operatórias fístulas ou estenoses da anastomose e enterocolites⁽⁸³⁾. Complicações A longo prazo incluem constipação crônica e estase fecal^(84,85). A mortalidade é de 6% desde 1980 e está relacionado à malformações associadas e complicações pós-operatórias⁽⁸⁴⁾. O tratamento de pacientes com aganglionose colônica total continua sendo difícil e com resultados frustrantes^(86,87).

ACONSELHAMENTO GENÉTICO

O aconselhamento genético consiste em passar para a prática médica diária o conhecimento científico sobre doenças, padrões de herança, riscos de transmitir a doença para a prole, manifestações clínicas e possibilidades terapêuticas para pessoas afetadas e seus familiares, no intuito de ajudar a tomar decisões pessoais com o maior número de informações possíveis⁽⁸⁸⁾.

Numa proporção significativa dos pacientes com HSCR a mutação identificada no probando também é identificada num parente não afetado. Em poucos estudos foi aventada a hipótese de que a presença de duas mutações em genes diferentes relacionados à doença fosse a causadora, sendo herdados um de cada progenitor^(89,90,91,92). Além disso, embora o progenitor com mutação na linha germinativa tenha até 50% de chance de transmitir o alelo mutante, é difícil prever se a criança desenvolverá a doença clínica. Geralmente, o risco de ter uma criança doente é aumentado com sucessivas gravidezes para os pais do probando, porém estimativas precisas são difíceis de serem feitas⁽⁹⁴⁾.

Os irmãos têm risco aumentado de HSCR se comparado com a população em geral; o risco de recorrência é de 4% (vs 0,02%)^(30,93). Segundo estudos puramente observacionais, o risco de recorrência é maior em famílias com HSCR em longos segmentos do cólon que está associada com um padrão de herança dominante e penetrância

incompleta. Famílias com HSCR em segmento curto tem padrão de herança recessivo ou multifatorial.⁽⁹⁴⁾ (anexo 6)

A prole de um paciente com HSCR tem aumentado risco de desenvolver a doença baseado no padrão de herança multigênica. Se o probando tiver uma mutação num gene associado a HSCR, tal como o gene *RET*, com padrão de herança dominante, o risco de transmissão será de 50%. Entretanto, devido à penetrância incompleta, o descendente que herdar um alelo mutante poderá não desenvolver a doença. Já para o descendente que desenvolver a doença, não é possível prever a severidade da doença.

Dado o padrão de herança, é muito difícil o aconselhamento genético na Doença de HSCR isolada, principalmente nos casos esporádicos. Pode-se levar em consideração uma série de fatores, mas, mesmo nas famílias onde há um padrão de herança bem estabelecido, ainda assim a variabilidade fenotípica é muito grande, não nos permitindo calcular adequadamente o risco de recorrência.

De forma geral, podemos dizer que o risco de recorrência global para a irmandade do probando é de 4% (32).

O exame pré-natal feito através de testes genéticos moleculares não é oferecido na clínica diária⁽⁹⁴⁾. Devido à pobreza da correlação fenótipo-genótipo na HSCR, o screening para mutações não está indicado, exceto a testagem de mutações nos éxons 10 e 11 do gene *RET* que está associado à predisposição à síndrome MEN 2A⁽³²⁾. Testes como ultrassonografia podem auxiliar no diagnóstico pré-natal⁽⁹⁴⁾.

CONCLUSÃO

A Doença de Hirschsprung (HSCR), ou aganglionose intestinal, é uma doença congênita relativamente comum, com incidência de 1:5000 nascidos vivos, caracterizada pela ausência das células ganglionares nos plexos intermuscular (Auerbach) e submucosos, profundo (Henle) e superficial (Meissner), conseqüente a uma falha na migração craniocaudal das células vagais da crista neural no intestino distal. HSCR ocorre como característica isolada em 70% dos casos. Anomalias cromossômicas, porém, existem em até 12% dos casos, sendo a trissomia do 21 a mais freqüente. Anomalias congênitas associadas ao Hirschsprung ocorrem em até 18% dos casos.

Na maioria dos casos o diagnóstico da doença HCSR é clínico, feito no recém nascido com falha na passagem do mecônio nas primeiras 48 horas de vida, distensão abdominal que é aliviada por estimulação retal ou enemas, vômitos e enterocolite neonatal.

Análise do DNA por estudos de ligação em famílias com múltiplos indivíduos com HSCR revelaram que múltiplas mutações, em diferentes genes, possam ser a causa dessa enfermidade. A condição mais comumente encontrada é a mutação no locus do gene RET,

10q11.2, que traduz RET, uma proteína transmembrana tirosina quinase. Uma pequena minoria dos pacientes com HSCR tem mutações no gene que produz um dos ligantes que se acopla ao RET, o GDNF (*glial cell line-derived neurotrophic factor*). Outros indivíduos têm sido descritos como sendo portadores de mutações em um par de genes, o EDNRB (*endothelin B receptor*), cujo locus está em 13q22, e o EDN3, gene que traduz o seu ligante, endotelina 3, no locus 20q13. Por essas características, HSCR tornou-se um modelo de Doença de Herança Complexa, que ainda deve ser melhor elucidado.

BIBLIOGRAFIA

1. BAUMGARTEN HG, HOLSTEIN AF, STELZNER F. Nervous elements in the human colon of Hirschsprung`s disease. Archives of Pathological Anatomy, 358:113-9, 1973.:
2. PASSARGE E. The genetics of Hirschsprung`s disease: evidence for heterogeneous etiology and a study of sixty-three families. New England Journal of Medicine. 276:138-43, 1967.
3. HÜTHER W. Die Hirschsprung`sche krankheit as folge einer entwicklungsstörung der intramuralen ganglien. Beitr Pathol Anat Allg Pathol 114:161-7, 1954.
4. OKAMOTO E, UEDA T. Embryogenesis of intramural ganglion of the gut and its relation to Hirschsprung`s disease. Journal of Pediatric Surgery, 2:437-41, 1967.
5. ANDREW A. The origin of intramural ganglia. Journal of Anatomy, 108:169-72, 1971.

6. SMITH B. Pre- and postnatal development of the ganglion cells of the rectum and its surgical implications. *Journal of Pediatric Surgery*, 3:386-92, 1968.
7. WHITEHOUSE R, KERNOHAN JW. Myenteric plexus in congenital megacolon; study of 11 cases. *Archives of Internal Medicine*, 82:75-9, 1948.
8. BOLANDE RP. The neurocristopathies; a unifying concept of disease arising in neural crest maldevelopment. *Human Pathology*, 5:409-29, 1973.
9. TARAVIRAS S, PACHNIS V. Development of the mammalian enteric nervous system. *Current Opinion in Genetical Development*, 9:321, 1999.
10. PASSARGE E. Genetics of Hirschsprung`s disease. *Clinical Gastroenterology*, 2:507-17, 1973.
11. NIHOUL-FÉKÉTÉ C, RICOUR C, MARTELLI H, LORTAT JACOB S, PELLERIN D. Total colonic aganglionosis (with or without ileal involvement): a review of 27 cases. *Journal of Pediatric Surgery*, 21:251-4,1986.
12. NEILSON IR, YAZBECK S. Ultrashort Hirschsprung`s disease: myth or reality. *Journal of Pediatric Surgery*, 25:1135-8, 1990.
13. PASSARGE E. Genetic heterogeneity and recurrence risk of congenital intestinal aganglionosis. *Birth Deffects*, 8:63-7, 1972.
14. HIRSCHSPRUNG H. Stuhlträgheit neugeborener in folge von dilatation und hipertrophic des colons. *Jahrb Kinderheilkd*, 27:1-27, 1888.
15. TITTEL K. Über eine angeborene Mißbildung des Dickdarms. *Wien Klin Wochenschr*, 14:903-9, 1901.

16. DALLA VALLE A. Contributo alle conoscenze della forma familiare del megacolon congenito. *Pediatria*, 32:569-78, 1924.
17. EHRENPREIS T. Megacolon in the newborn: a clinical and roentgenological study with special regard to the pathogenesis. *Acta Chir Scand*, 112:94-107, 1946.
18. BODIAN M, STEPHENS FD, WARD BLH. Hirschsprung's disease and idiopathic megacolon. *Lancet*, 1:6-11, 1949.
19. ZUELZER WW, WILSON JL. Functional intestinal obstruction on a congenital neurogenic basis in infancy. *American Journal of Diseases of the Child*, 75:46-54, 1948.
20. SWENSON O, BILL AH. Resection of rectum and rectosigmoid with preservation of the sphincter for benign spastic lesions producing megacolon: an experimental study. *Surgery*, 24:212-18, 1948.
21. MEIER-RUGE W, LUTTERBECK PM, HERZOG B. Acetylcholinesterase activity in suction biopsies of the rectum in the diagnosis of Hirschsprung's disease. *Journal of Pediatric Surgery*, 7:11-7, 1972.
22. LAKE BD, PURI P, NIXON HH. Hirschsprung's disease – an appraisal of histochemically demonstrated acetylcholinesterase activity in suction rectal biopsy specimens as an aid to diagnosis. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 102:244-58, 1978.

23. ANGRIST M, KAUFFMAN E, SLAUGENHAUPT SA. A gene for Hirschsprung disease (megacolon) in the pericentromeric region of human chromosome 10. *Nature Genetics*, 4:351-6, 1993.
24. LYONNET S, BOLINO A, PELT A. A gene for Hirschsprung disease maps to the proximal long arm of chromosome 10. *Nature Genetics*, 4:346-50, 1993.
25. ROMEO G, RONCHETTO P, LUO Y. Point mutations affecting the tyrosine kinase domain of the RET proto-oncogene in Hirschsprung's disease. *Nature*, 367:377-86, 1994.
26. EDERY P, LYONNET S, MULLIGAN LM. Mutations of the RET proto-oncogene in Hirschsprung's disease. *Nature*, 367:388-96, 1994.
27. EDERY P, PELET A, MULLIGAN LM. Long segment familial Hirschsprung's disease: variable clinical expression at the RET locus. *Journal of Medical Genetics*, 31:602-13, 1994.
28. PUFFENBERGER EG, KAUFFMAN ER, BOLK S. Identity-by-descent and association mapping of a recessive gene for Hirschsprung disease on human chromosome 13q22. *Human Molecular Genetics*, 3:1217-25, 1994.
29. PASSARGE E. Wither polygenic inheritance: mapping Hirschsprung disease. *Nature Genetics*, 4:325-6, 1993.
30. BADNER JA, SIEBER WK, GARVER KL, CHAKRAVARTI A. A genetic study of Hirschsprung disease. *American Journal of Human Genetics*, 46:568-76, 1990.

31. TORFS CP. An epidemiological study of Hirschsprung disease in a multiracial California population. The Third International Meeting: Hirschsprung disease and related neuro-cristopathies. Evian, France, 1998.
32. AMIEL J, LYONNET S. Hirschsprung disease, associated syndromes, and genetics: a review. *Journal of Medical Genetics*, 38:729-39, 2001.
33. BROOKS AS, BREUNING MH, MEIJERS C. Spectrum of phenotypes associated with Hirschsprung disease: an evaluation of 239 patients from a single institution. The Third International Meeting: Hirschsprung disease and related neuro-cristopathies. Evian, France, 1998.
34. MAKSOUD, JG. Moléstia de Hirschsprung. In *Cirurgia Pediátrica*, Ed Revinter I ed. 68:781-94, 1998.
35. ROWE MI, O'NEILL JA, GROSFELD JL, FONKALSRUD EW, CORAN AG. Hirschsprung disease. In *Essential of Pediatric Surgery*, Ed. Mosby, I ed. 67:586-95, 1995.
36. LALL A, GUPTA DK, BAJPAI M. Neonatal Hirschsprung's disease. *Indian Journal of Pediatrics*. 67(8):583-8, 2000.
37. PELET A., GENESTE O, EDERY P, PASINI A, CHAPPUIS S, ATTIE T, MUNNICH A., LENOIR G, LYONNET S, BILLAUD M.: Various mechanisms cause RET-mediated signaling defects in Hirschsprung's disease. *J. Clin. Invest.* 101: 1415-23, 1998.

38. AMIEL J, SALOMON R, ATTIE T, PELET A, TRANG H, MOKHTARI M, GAULTIER C, MUNNIC A, LYONNET S: Mutations of the RET–GDNF signaling pathway in Ondine’s curse. *Am J Hum Genet* 1996; 62:715-7.
39. BOLK S, ANGRIST M, XIE J, YANAGISAWA M, SILVESTRI JM, WEESE-MATER DE, CHAKRAVARTI A: Endothelin-3 frameshift mutations in congenital central hypoventilation syndrome. *Nat Genet* 1996;13:395-6.
40. DAVENPORT M, TAITZ LS, DICKSON JA: The Kauffman-McKusick syndrome: another association. *J Pediatr Surg* 1989;24:1192-4.
41. STONE DL, SLAVOTINECK A, BOUFFARD GG, BANERJEE-BASU S, BAXEVANIS AD, BARR M, BIESECKER LG: Mutations of a gene encoding a putative chaperonin causes McKusick-Kauffman syndrome. *Net Genet* 2000;25:79-82.
42. CARRASQUILLO, M. M.; MCCALLION, A. S.; PUFFENBERGER, E. G.; KASHUK, C. S.; NOURI, N.; CHAKRAVARTI, A. : Genome-wide association study and mouse model identify interaction between RET and EDNRB pathways in Hirschsprung disease. *Nature Genet.* 32: 237-44, 2002.
43. PUSCH CM, SASIADEK MM, BLIN N: Hirschsprung, RET-SOX and beyond: The challenge of examining non-mendelian traits. *Int J Mol Med* 2002 Oct;10(4):367-70.
44. FITZE G, CRAMER J, ZIEGLER A, SCHIERZ M, SCHREIBER M, KUHLISCH E, ROESNER D, SCHACKERT HK: Association between c135G/A genotype and RET proto-oncogene germline mutations and phenotype

- of Hirschsprung's disease. Department of Paediatric Surgery, University of Technology Dresden, Fetscherstrasse 74, D-01307 Dresden, Germany. *Lancet* 2002 Apr 6;359(9313):1200-5.
45. MARTUCCIELLO G, THOMPSON H, MAZZOLA C, MORANDO A, BERTAGNON M, NEGRI F, BRIZZOLARA A, ROCCHETTI L, GAMBINI C, JASONNI V: GDNF deficit in Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg.* 1998 Jan;33(1):99-102.
46. GRIECO, M.; SANTORO, M.; BERLINGIERI, M. T.; MELILLO, R. M.; DONGHI, R.; BONGARZONE, I.; PIEROTTI, M. A.; DELLA PORTA, G.; FUSCO, A.; VECCHIO, G. : PTC is a novel rearranged form of the ret proto-oncogene and is frequently detected in vivo in human thyroid papillary carcinomas. *Cell* 60: 557-63, 1990.
47. TAKAHASHI, M.; RITZ, J.; COOPER, G. M. : Activation of a novel human transforming gene, ret, by DNA rearrangement. *Cell* 42: 581-88, 1985.
48. PASINI, B.; HOFSTRA, R. M. W.; YIN, L.; BOCCIARDI, R.; SANTAMARIA, G.; GROOTSCHOLTEN, P. M.; CECCHERINI, I.; PATRONE, G.; PRIOLO, M.; BUYS, C. H. C. M.; ROMEO, G. : The physical map of the human RET proto-oncogene. *Oncogene* 11: 1737-43, 1995.
49. MANIÉ S., SANTORO M., FUSCO A. AND BILLAUD M.: The RET receptor: function in development and dysfunction in congenital malformation. *Trends in Genetics* Vol.17 N° 10 October 2001.

50. JIANG SM: The RET proto-oncogene in human cancers. *Oncogene* 19:5590-7, 2000.
51. HANDSFORD JR AND MULLIGAN LM: Multiple endocrine neoplasia type 2 and RET: from neoplasia to neurogenesis. *J Med Genet* 37, 817-27, 2000.
52. R. SCHNEIDER , The human protooncogene ret: a communicative cadherin?. *Trends Biochem. Sci.* 17:468–9,1992.
53. IKEDA I: Specific expression of the RET proto-oncogene in human neuroblastoma cell lines. *Oncogene* 5:1291-6, 1990.
54. AIRAKSINEN MS: GDNF family neurotrophic factor signaling: four masters, one servant? *Mol Cell Neurosci* 13:313-25,1999.
55. BALOH, RH: The GDNF family ligands and receptors – implications of neural development. *Curr Opin Neurobiol* 10, 103-10,2000.
56. S. JING: GDNF-induced activation of the ret protein tyrosine kinase is mediated by GDNFR-alpha, a novel receptor for GDNF. *Cell* 85:1113–24,1986.
57. WAKAMATSU N : Mutations in SIP1, encoding Smad interacting protein-1, cause a form of Hirschsprung disease. *Nat Genet* 27:369-70, 2001.
58. X. LIU : Oncogenic RET receptors display different autophosphorylation sites and substrate binding specificities. *J. Biol. Chem.* 271:5309–12,1996.
59. D.H. VAN WEERING AND J.L. BOS , Signal transduction by the receptor tyrosine kinase Ret. *Recent Results Cancer Res.* 154: 271–81,1998.
60. ATTIE-BITACH, T: Expression of the RET proto-oncogene in human embryos. *Am J Med Genet*:80: 481-6,1998.

61. TARAVIRAS S: Signaling by the RET receptor tyrosine kinase and its role in the development on the mammalian enteric nervous system. *Development* 126:2785-97,1999.
62. IWASHITA, T.; MURAKAMI, H.; ASAI, N.; TAKAHASHI, M. : Mechanism of Ret dysfunction by Hirschsprung mutations affecting its extracellular domain. *Hum. Molec. Genet.* 5: 1577-80, 1996.
63. GENESTE O: Two distinct mutations of the RET receptor causing Hirschsprung disease impair the binding of signaling effectors to a multifunctional docking site. *Hum Mol Genet* 8, 1989-9, 1999.
64. PAYETTE RF, TENNYSON VM, POMENAMZ HD: Accumulation of components of basal laminae: association with the failure of neural crest cells to colonize the presumptive aganglionic bowel of ls/ls mutant mice. *Dev Biol*; 125: 341-60,1998
65. PARIKH DH, TAM PK, LLPYD DA: Quantitative and qualitative analysis of the extracellular matrix protein, laminin, in Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg*; 27: 911-6,1992.
66. JOHNSON G, MOORE SW: Acetylcholinesterase of human intestinal affected by Hirschsprung's disease: effect of magnesium chloride on isoforms. *Clinica Chimica Acta* :243: 115-128,1995.
67. SULLIVAN PB: Hirschsprung's disease. *Archives of Disease in Childhood*: 74: 5-7,1996.

68. BEALER JF, NATUZZI ES, FLAKE AW: Effect of nitric oxide on the colonic smooth muscle of patients with Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg* :29: 1025-9,1994.
69. CHEN Y, LUI VC, SHAM MH, TAM PK: Distribution of carbon monoxide-producing neurons in human colon in Hirschsprung's disease patients. *Hum Pathol*:33: 1030-6,2002.
70. BOLK S, PELET A, HOFSTRA RDW A human model for multigenic inheritance, phenotypic expression in Hirschsprung's disease requires both RET gene and a new 9q31 locus. *Proc Natl Acad Sci USA*: 97 268-73,2000.
71. SCHUCHARDT A, D'AGATI V, LARSSON-BLOMBERGL, CONSTANTINI F: Defects in the kidney and enteric nervous system of mice lacking the tyrosine kinase receptor RET. *Nature*: 367: 380-3,1994.
72. BORREGO S, SAEZ ME, RUIZ A: RET genotypes comprising specific haplotypes polymorphic variants predispose to isolated Hirschsprung's disease. *J Med Genet*: 37: 572-78,2000.
73. PARISI MA, KAPUR RP. Genetics of Hirschsprung's disease. *Current Opinion in Pediatrics*: 12(6): 610-7,2000.
74. PUSCH CM, SASIADEK MM, BLIN N. Hirschsprung, RET-SOX and beyond: The challenge of examining non-mendelian traits (review). *Int J Mol Med*: 10(4):367-70,2002.
75. YANG S, DONNER LR. Detection of ganglion cells in the colonic plexuses by immunostaining for neuron-specific marker neuN: an aid for the diagnosis of

- Hirschsprung disease. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*;10(3):218-20,2002.
76. SWENSON O. Early history of the therapy of Hirschsprung's disease: facts and personal observations over 50 years. *J Pediatr Surg* 1996;31:1003-8.
77. SOAVE F. Hirschsprung's disease. Technique and results of Soave's operation. *Br F Surg* 1966;53:1023-7.
78. NEWBERN WR. Hirschsprung's disease – the Duhamel modification. *Am F Gastroenterol* 1967;47:61-8.
79. ALBANESE CT, JENNINGS RW, SMITH B, BRATTON B, HARRISON MR. Perineal one-stage pull-through fo Hirschsprung's disease. *F Pediatr Surg* 1999;34:377-80.
80. SWENSON O, SHERMAN JO, FISHER JH, COHEN E. The treatment and postoperative complication of congenital megacolon: A 25 year follow-up. *Ann Surg* 1975;182:266-73.
81. SOAVE F. Endorectal pull-through: 20 years experience. Address of the guest speaker, APSA, 1984. *J Pediatr Surg* 1985;20:568-79.
82. DAVIES MRQ, CYWES S. Inadequate pouch emptying following Martin's pull-through procedure for intestinal aganglionosis. *J Pediatr Surg* 1983;18:14-20.
83. HACKAM DJ, FILLER RM, PEARL RH. Enterocolitis after the surgical treatment of Hirschsprung's disease: risk, factors and financial impacts. *J Pediatr Surg* 1998;33:830-3.

84. YANCHAR NL, SOUCY P. Long-term outcome after Hirschsprung's disease: patients' perspectives. *J Pediatr Surg* 1999;34:1152-60.
85. MOORE SW, ALBERTYN R, CYWES S. Clinical outcome and long-term quality of life after surgical correction of Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg* 1996;31:1496-502.
86. JASONNI V, MARTUCCIELLO G. Total colonic aganglionosis. *Semin Pediatr Surg* 1998;7:174-80.
87. TSUJI H, SPITZ L, KIELY EM, DRAKE DP, PIERRO A. Management and long-term follow-up of infants with total colonic aganglionosis. *J Pediatr Surg* 1999;34:158-62.
88. URL: www.noah.com/geneticcounseling
89. ANGRIST M, BOLK S, HALUSHKA M, LAPCHAK PA, CHAKRAVARTI A. Germline mutations in glial cell line-derived neurotrophicfactor (gdnf) and RET in a hirschprung disease patient. *Nat Genet* 1996; 14:341-4.
90. SALOMON R, ATTIE T, PELET A, BIDAUD C, ENG C, AMIEL J, SARNAKI S. Germline mutations of the RET ligand GDNF are not sufficient to cause Hirschsprung disease. *Nat Genet* 1996; 14:345-7.
91. HOFSTRA RMW, OSINGA J, TAN-SINDJUNATA G. A homozygous mutation in the endothelin-3 gene associated with a combined Waardenburg type 2 and Hirschsprung phenotype (Shah-Waardenburg syndrome). *Nat genet* 1996; 12:445-447.

92. HOFSTRA RMW, WU Y, STULP RP, ELFFERICH P, OSINGA J. RET and GDNF gene scanning in Hirschsprung patients using two dual denaturing gel systems. *Hum Mutat* 2000; 15:418-29.
93. BODIAN M, CARTER CO. A family study of Hirschsprung's disease. *Ann Hum Genet* 1963; 26:261-77.
94. URL: www.geneclinics.com/hirschsprung
95. ROWE MI, O'NEILL JÁ, GROSFIELD JL, FONKALSRUD EW, CORAN AG (eds). *Essentials of Pediatric Surgery*, 1st ed., St Louis, Missouri, Mosby, 1995.
96. NUSSBAUM RL, MCINNES RR, WILLARD HF. *Thompson & Thompson genetics in medicine*. 6th ed. WB Saunders Company, Philadelphia, 2001.

ANEXO 1 (32)

Síndromes associadas com HSCR

<i>Syndromes</i>	<i>MIM</i>	<i>Key features</i>	<i>References</i>
<i>Neurocristopathy syndromes</i>			
WS4 (Shah-Waardenburg)	277580	Pigmentary anomalies (white forelock, iris hypoplasia, patchy hypopigmentation), deafness	53–57
Yemenite deaf-blind-hypopigmentation	601706	Hearing loss, eye anomalies (microcornea, coloboma, nystagmus), pigmentary anomalies	60
BADS	227010	Hearing loss, hypopigmentation of the skin and retina	61
Piebaldism	172800	Patchy hypopigmentation of the skin	62, 63
Haddad	209880	Congenital central hypoventilation	70, 71
MEN2A	171400	Medullary thyroid carcinoma, pheochromocytoma, hyperplasia of the parathyroid	43–50
Riley-Day	223900	Autonomic nervous system anomalies	
<i>HSCR mandatory</i>			
Goldberg-Shprintzen	235730	Cleft palate, hypotonia, microcephaly, mental retardation, dysmorphic facial features	79
	235740	Polydactyly, unilateral renal agenesis, hypertelorism, deafness	82
HSCR with limbs anomalies	235750	Postaxial polydactyly, ventricular septal defect	83
	235760	Hypoplasia of distal phalanges and nails, dysmorphic features	84
	604211	Preaxial polydactyly, heart defect, laryngeal anomalies	85
	306980	Brachydactyly type D	86
BRESHEK		Brain abnormalities, Retardation, Ectodermal dysplasia, Skeletal malformation, Hirschsprung disease, Ear/eye anomalies, Kidney dysplasia	87
Mesomelic dysplasia, Werner type		Mesomelia, polydactyly	170
<i>HSCR occasionally associated</i>			
Bardet-Biedl and/or	209900	Pigmentary retinopathy, obesity, hypogenitalism, mild mental retardation, postaxial polydactyly	91, 92
Kauffman-McKusick	236700	Hydrometrocolpos, postaxial polydactyly, congenital heart defect	89
Smith-Lemli-Opitz	270400	Growth retardation, microcephaly, mental retardation, hypospadias, 2–3 toes syndactyly, dysmorphic features	96
Cartilage-hair hypoplasia	250250	Short limb dwarfism, metaphyseal dysplasia, immunodeficiency	97
<i>HSCR rarely associated</i>			
Fukuyama congenital muscular dystrophy	253800	Muscular dystrophy, polymicrogyria, hydrocephalus, MR, seizures	99, 100
Clayton-Smith	258840	Dysmorphic features, hypoplastic toes and nails, ichthyosis.	101
Kaplan	304100	Agnesis of corpus callosum, adducted thumbs, ptosis, muscle weakness	102
Okamoto	308840	Hydrocephalus, cleft palate, corpus callosum agnesis	103
<i>Miscellaneous associations</i>			
Pallister-Hall (CAVE)	140510		
Fryns	229850		
Aarskog	100050		
Jeune asphyxiating thoracic dystrophy	208500		
Frontonasal dysplasia	136760		
Osteopetrosis			
Goldenhar	164210		
Lesch-Nyhan	308000		
Rubinstein-Taybi	180849		
Toriello-Carey	217980		
SEMDJL	271640		

ANEXO 2 ⁽³²⁾

Epidemiologia e risco de recorrência na doença de HSCR

<i>Chromosome</i>	<i>Key features</i>	<i>Number of reports</i>	<i>Gene</i>	<i>References</i>
Tri 21	Down syndrome, S-HSCR, 5.5 to 10.5 male:female sex ratio	2 to 10% of HSCR cases	?	5, 9–13
Del 10q11	Mental retardation, L-HSCR	2 cases	<i>RET</i>	33, 34
Del 13q22	Mental retardation, growth retardation, dysmorphic features, S-HSCR	7 cases	<i>EDNRB</i>	35–37
Del 2q22-q23	Postnatal growth retardation and microcephaly, mental retardation, epilepsy, dysmorphic features, HSCR*	3 cases	<i>SIP1</i>	38–41
Del 17q21		4 cases	?	
Dup 17q21-q23	MCA/MR	4 cases	?	
Tri 22pter-q11	Cat eye syndrome		?	

*Both S-HSCR and L-HSCR have been observed. Several patients presenting the same pattern of congenital malformations and normal chromosomes have been reported.³⁹

ANEXO 3 ⁽⁹⁶⁾ –

Genes envolvidos na doença de Hirschsprung

Tipo	Gene	Locus	Herança
HSCR1	RET	10q11.2	Autos. Dominante
HSCR2	EDNRB	13q22	Autos. Recessiva
HSCR3	EDN3	20q13.2	Variável
HSCR4	???	???	Autos. Dominante

ANEXO 4 ⁽³²⁾

Anomalias cromossômicas recorrentes com HSCR como característica

	<i>L-HSCR</i>	<i>S-HSCR</i>
% probands	19	81
Sex ratio (male:female)	1.75	5.5
Genetic model	Dominant	Multigenic or recessive
Penetrance (%) (male:female)	52:40	17:4
Recurrence risk to sibs* (%)		
Male proband	17/13	5/1
Female proband	33/9	5/3

*Recurrence risk are given for male/female sibs respectively.

ANEXO 5 ⁽³²⁾

Genes envolvidos no HSCR em humanos e conhecidos em modelos de ratos com megacolon – Modelo de herança

Gene	Human					Mouse		
	Map location	Mode of inheritance	Phenotype in mutants	Frequency of mutation in heterozygotes	Refs	Natural mutant	Knock-out	Refs
<i>RET</i>	10q11.2	AD	HSCR	50% familial cases 15% sporadic cases	119	—	L Renal agenesis	108
<i>GDNF</i>	5p13	AD	HSCR	5 cases	31, 142, 143	—	L Renal agenesis	132–134
<i>NTN</i>	19p13	AD	HSCR	1 case	144	—	—	164
<i>SOX10</i>	22q13	AD	WS4		57, 59, 165	<i>Dom</i> (AD)	L	164
<i>EDNRB</i>	13q22	AR/AD	WS4/HSCR	5%	53, 157–160	<i>s</i> ' (AR)	S Coat spotting	154
<i>EDN3</i>	20q13	AR/AD	WS4/HSCR	<5%	156	<i>ls</i> (AR)	S Coat spotting	155
<i>ECE1</i>	1p36	AD	HSCR CF and cardiac defect	1 case	162	—	S Coat spotting CF defects	161
<i>SIP1</i>	2q22	Spo	HSCR, MR, facial dysmorphism	6 cases	38, 39, 41	—	—	—

AD: autosomal dominant, AR: autosomal recessive, Spo: sporadic, *s*': *Piebald lethal*, *ls*: *lethal spotting*, S: short segment megacolon, L: long segment megacolon, CF: craniofacial, MR: mental retardation.

ANEXO 6 ⁽⁹⁴⁾

Risco de recorrência para HSCR em irmãos baseado no tamanho do segmento colônico envolvido

Probando	Irmão	Risco em irmão para HSCR quando o probando tem:	
		Segmento longo do cólon	Segmento curto do cólon
Masculino	Masculino	17%	5%
	Feminino	13%	1%
Feminino	Masculino	33%	5%
	Feminino	9%	3%