

REAL ACADEMIA DE MEDICINA Y CIRUGÍA DE SEVILLA

DE LA GENÉTICA CLÍNICA A LA MEDICINA GENÓMICA:

EL RETO DE LA ENFERMEDAD DE HIRSCHSPRUNG

Discurso de recepción de la Académica Electa

DRA. DÑA. SALUD BORREGO LÓPEZ

Contestación del Académico Numerario

ILMO. SR. DR. D. JOSÉ LUIS SERRERA CONTRERAS

Palabras finales

EXCMO. SR. PROF. D. JESÚS CASTINEIRAS FERNÁNDEZ

Presidente de la Real Academia de Medicina y Cirugía de Sevilla



Sevilla, 15 de Noviembre de 2015

**DE LA GENÉTICA CLÍNICA A LA MEDICINA GENÓMICA:
EL RETO DE LA ENFERMEDAD DE HIRSCHSPRUNG**

Discurso de recepción de la Académica Electa

DRA. DÑA. SALUD BORREGO LÓPEZ

Índice

Preámbulo	7
Introducción.....	10
Genética Clínica y Medicina Genómica	12
Aproximación Genómica al Diagnóstico Genético y Medicina personalizada	14
Medicina Computacional y Bioinformática Clínica	16
Situación de la Investigación en Genética Clínica y Medicina Genómica en España	17
Situación Internacional de la Investigación en Genética Clínica y Medicina Genómica	18
Enfermedades Raras	21
Enfermedad de Hirschsprung.....	25
Genética molecular de HSCR.....	26
Ruta de señalización de RET	28
<i>RET</i> y HSCR	29
Ligandos de la familia GDNF y sus co-receptores	33
Ruta de señalización de las Endotelinas	34
Ruta de señalización de NTF-3/TRKC	35
Ruta de señalización de las Prokineticinas	36
Ruta de señalización de las Neuregulinas.....	37
Ruta de señalización de las Semaforinas	38
Otros genes asociados a HSCR.....	39
<i>SOX10</i>	39
<i>PHOX2B</i>	40
<i>DNMT3B</i>	41
<i>PAX6</i>	42
Otros loci de susceptibilidad para HSCR.....	42
Asociación de genoma completo (GWAS)	43
Secuenciación de nueva generación (NGS)	44
HSCR síndromico.....	45
Anomalías cromosómicas	45
Síndromes y anomalías asociadas	47
Neurocristopatías	48
Síndrome de Neoplasia Endocrina Múltiple tipo 2	48
Neuroblastoma	49
Síndrome de Hipoventilación Central Congénita.....	49

Síndrome de Waardenburg y anomalías pigmentarias relacionadas	50
Otras neurocristopatías	51
Otras enfermedades que presentan HSCR como un signo relativamente frecuente	51
Síndrome de Mowat-Wilson	51
Síndrome de Goldberg-Shprintzen.....	52
HSCR con malformaciones de las extremidades	52
Síndrome de Bardet-Biedl y síndrome de McKusick-Kauffman	52
Síndrome de Smith-Lemli-Opitz.....	53
Síndrome de hipoplasia de cartílago y pelo	53
Espectro HSAS/MASA	53
Otros síndromes que se han asociado eventualmente a HSCR.....	54
Anomalías asociadas	54
Consejo genético.....	55
Epílogo.....	57
Referencias Bibliográficas	58
Discurso de Contestación.....	70
Palabras finales del Presidente de la Real Academia	70

Preámbulo

Excmo. Sr. Presidente de la Real Academia de Medicina y Cirugía de Sevilla

Excmas. e Ilmas. Autoridades y Representaciones

Excmos. e Ilmos. Sres. Académicos

Señoras y Señores

Amigos todos

En este acto me presento ante ustedes para dar lectura a mi Discurso de Recepción como miembro de número de la Real Academia de Medicina y Cirugía de Sevilla, pero antes de entrar en él quiero expresarles mi más sincero agradecimiento.

En la vida de una persona hay días trascendentes, para mí son dos, cuando pierdes un padre y cuando nace un hijo y la sorpresa de que las dos cosas te llevan a tu infancia otra vez y que de alguna manera ambas se parecen. Yo quiero enmarcar el día de ingreso en esta Real Academia como uno de esos días de especial relevancia, ya que llego a él después de un largo recorrido de madurez desde que fui nombrada académica electa.

En primer lugar mi agradecimiento a todos los miembros de esta corporación por haber ampliado el estrado de la Academia con un sillón dedicado a la Genética Médica y por haberme elegido para ocuparlo. Es razonable que esta especialidad ocupe un sitio en las Reales Academias de Medicina, ya que aunque es nueva, su importancia en la medicina actual es enorme. Con ello esta Real Academia hace honor al espíritu de su creación en 1693, la cual nace como sociedad de carácter vanguardista. El Dr. Juan Muñoz y Peralta, renunció a su cátedra en la Facultad de Medicina de Sevilla disconforme con los anticuados métodos universitarios. Abriendo nuevos horizontes al saber, a la investigación y a los medios diagnósticos y terapéuticos novedosos que ocupaban ya un lugar en el mundo avanzado.

Espero ser digna de esta distinción, trabajando en todo cuanto el Presidente y su Junta Directiva dictamine, siguiendo siempre los sabios consejos de los Ilustres académicos, a los que desde aquí pido ayuda para ser digna compañera y poder cumplir fielmente con las tareas que se me encomienden en esta corporación.

Muy especialmente quiero agradecer al Prof. Hugo Galera Davidson y al Dr. José Luis Serrera Contreras su confianza y estímulo para que me presentase a la plaza de académica.

Mi gratitud a los Académicos que me han presentado para formar parte de la nómina de numerarios de esta Academia, los doctores José López Barneo, Carlos Infantes Alcón y José Luis Serrera Contreras.

El Dr. Serrera con el que coincidí en el Hospital Universitario Virgen del Rocío y desde entonces le tengo un gran respeto, creando un gran departamento de laboratorio, cuando no existían los avances tecnológicos de los que hoy disponemos para ello. Él es un gran amigo y ha sido un apoyo constante durante los últimos tiempos y ha tenido el

expreso deseo de realizar por primera vez en sus años de Académico la contestación a un discurso, este que hoy presento.

También mi agradecimiento al Prof. Jesús Castiñeiras Fernández, presidente de la Real Academia de Medicina y Cirugía de Sevilla, por sus palabras para finalizar el acto.

No voy a hablar de mi predecesor en este sillón de Genética Médica, ya que por fortuna no ha quedado vacante por el fallecimiento de ningún académico. Esta circunstancia me permite traer a la consideración de Ustedes a un académico de esta casa, nuestro anterior presidente, Prof. Hugo Galera Davidson, mi maestro y mentor en los primeros años de mi carrera profesional, que junto con la Dra. Fernández Novoa, me introdujeron en el campo de la Genética. Su reconocida valía científica y profesional, se unen a su generosidad conmigo.

El profesor Galera facilitó mi estancia en el mejor Departamento de Genética que en los años 80 había en España, el de la Fundación Jiménez Díaz, dirigido por el Prof. Andrés Sánchez Cascos, cardiólogo y genetista, excelente persona y profesional, que supo ver ya en aquellos años la importancia de la Genética en la práctica clínica. Mi agradecimiento a mis maestros entonces, el Dr. Javier Benítez y la Dra. Carmen Ramos.

Al ser una especialidad nueva y de un desarrollo tan rápido durante estos años de mi carrera profesional, he aprendido tanto de mis jefes, como de mis compañeros y de las personas que han trabajado conmigo.

El profesor Guillermo Antiñolo, prestigioso científico y profesional de la medicina, que tanto ha aportado a la Genética y a la Cirugía Fetal en nuestro país, ha sido un compañero que con su estímulo y apoyo, me ha prestado una ayuda inestimable en el desarrollo de mi carrera profesional.

A lo largo de los años desde la puesta en marcha de lo que hoy es la Unidad de Gestión Clínica de Genética, Reproducción y Medicina fetal, han ido pasando por ella diferentes profesionales, que han ido dejando su impronta en ella, como el Dr. Javier Sánchez y la Dra. Irene Marcos, hoy día estrechos colaboradores, así como otros facultativos, técnicos de laboratorio, enfermeras y administrativas con los que he tenido la suerte de trabajar.

Mis compañeros genetistas de toda España con los que he trabajado más directamente en el desarrollo de la Genética Clínica en nuestro país, los doctores Carmen Ayuso, Pia Gallano, Eduardo Tizzano, José María Millán, Monserrat Baiget, Cristina Templado, Feliciano Ramos y tantos otros, que es difícil nombrarlos a todos.

He tenido el privilegio de dirigir un grupo de investigación compuesto de excelentes colaboradores, doctorandos e investigadores posdoctorales con quienes estoy en deuda por su dedicación al trabajo. Sus contribuciones están referenciadas a lo largo de este discurso. Especial mención a mis colaboradoras más cercanas, por la ayuda incondicional que me prestan en las diferentes facetas de mi vida profesional, las doctoras Macarena Ruiz Ferrer y Raquel Fernández.

Con todos mis compañeros tengo una gran deuda y quiero mostrar mi más sincero reconocimiento por lo que han contribuido al desarrollo de mi vida científica.

Agradezco el apoyo que me han dado a lo largo de toda mi carrera investigadora, al Instituto de Salud Carlos III, a la Junta de Andalucía y a la Unión Europea.

Mi doble vertiente asistencial e investigadora, me ha llevado a una estrecha colaboración por esta última faceta con el Instituto de Salud Carlos III, sobre todo desde

que en el año 2009, el Dr. Joaquín Arenas me llamó para presidir el área de Genética y Modelos de enfermedad. Allí he tenido la oportunidad de trabajar con excelentes profesionales de la investigación en nuestro país, que nos reunimos allí como en un único equipo. De ellos mi especial consideración a los doctores Ignacio Torres Alemán y Rafael Artuch.

Doy gracias a Dios por la familia que me ha dado, mi padre ya ausente, que tanto aportó a mi vida y siempre me acompaña, mi madre, mi primera maestra, por su cariño y dedicación, mis hermanos, con los que me siento muy unida y Juan, excelente persona y mejor hijo, que ha sabido comprender las ausencias de su madre a lo largo de su vida. Opte por seguir mi pasión, y no por encima de él, sino por él, para que así cada noche pudiera llevarle un pedazo de mundo, un mundo por el que yo me esfuerzo por cambiar para mejor.

Soy la primera mujer que ingresa en esta Real Academia. Y soy consciente que romper esa barrera es una gran responsabilidad. Quiero agradecer a todos los miembros de esta corporación, que me hayan abierto sus puertas, que es también abrirlas a la mujer y es un gran reconocimiento a lo que las mujeres han contribuido y contribuyen a la Medicina y a la Ciencia.

Introducción

He elegido como discurso de recepción compartir con ustedes la historia de la Genética, a través de nuestra principal línea de investigación. Una historia que ha sido apasionante y a la vez aleccionadora durante más de tres décadas, una historia que he tenido la suerte de ir viviendo intensamente a lo largo de mi carrera profesional hasta hoy mismo y que cada día nos va ofreciendo nuevas expectativas para mejorar la calidad de vida de los pacientes y sus familias, una historia de la que queda mucho por escribir, en definitiva, una historia que parece interminable.

El reconocimiento de la necesidad de una nueva visión de la investigación biomédica ha generado un interés creciente por la organización, facilitación y gestión de la traslación de conocimiento. La traslación de conocimiento ha sido definida por los Canadian Institutes of Health Research como un proceso dinámico e interactivo que incluye la síntesis, disseminación, intercambio y aplicación ética del conocimiento para mejorar la salud, proveer servicios y productos de salud más efectivos, así como para reforzar el sistema de salud. Esta definición ha sido adaptada por otros, incluyendo el National Center for Dissemination of Disability Research de los EE.UU. y la Organización Mundial de la Salud (OMS). El elemento común entre todos ellos es la convicción de la necesidad de pasar de la difusión de conocimiento al uso del conocimiento. Para ello, son necesarias intervenciones eficaces orientadas a cerrar la brecha actual en la traslación del conocimiento a la práctica clínica y para ser eficientes, orientando desde el inicio la creación del conocimiento en términos de innovación clínica.

La investigación traslacional supone investigación biomédica junto a capacidad interactiva, ambas necesarias para transformar un descubrimiento biológico en un medicamento, diagnóstico, tecnología o intervención que pudiera ser usado en pacientes para mejorar su atención y cuidados, lo que bien podría ser la definición de innovación clínica.

Los sistemas de salud se enfrentan hoy a retos clave: mejorar la calidad de la atención sanitaria y la seguridad de los pacientes, al tiempo que controlar sus costes para ser sostenibles. Por ello se necesita una visión de la investigación biomédica basada en un nuevo modelo de trabajo en equipo, que permita un intercambio continuo y bidireccional de conocimiento e información entre investigadores, clínicos, universidad e industria, siguiendo un sistema adhocrático y de innovación abierta. A medida que la investigación biomédica se ha vuelto progresivamente más compleja y especializada, ha surgido la necesidad de investigadores (biomédicos, clínicos, ingenieros,...) con diferentes habilidades y experiencia trabajando coordinados por un objetivo común: transformar la investigación biomédica en innovación clínica.

Aunque desde la investigación básica pueden surgir de forma ocasional importantes descubrimientos trasladables a la mejora de los cuidados médicos, ningún grupo tiene de forma individual la suficiente amplitud de conocimientos y los medios adecuados para llevar a cabo investigación traslacional eficazmente. No se puede esperar que los especialistas en ciencia y/o tecnología tengan suficiente experiencia en aplicaciones clínicas, y a menos que se asocien con aquellos que tienen este conocimiento, la investigación traslacional exitosa es poco probable. Debido a las limitaciones estructurales para desarrollar y financiar investigación centrada en trasladar un descubrimiento definido en un producto para su uso en un determinado contexto clínico,

muchos resultados de investigación y contribuciones científicas relevantes permanecen en un cierto limbo a no ser que sean de interés para la industria.

Además del objetivo general, compartido por todos, clínicos e investigadores biomédicos, de descubrir nuevos conceptos clínicamente relevantes o de inventar nuevas tecnologías clínicamente provechosas, la investigación traslacional en Medicina se ocupa, dentro de los dominios de la realidad humana, de transferir de forma segura los nuevos diagnósticos y terapias demostradas en un entorno experimental, y de comprobar su relevancia para los pacientes. Sólo un espectro único, continuo y bidireccional del conocimiento, puede hacer posible la transformación real de la investigación biomédica en asistencia sanitaria mejor y más sostenible. Es decir, transformar la investigación biomédica en conocimiento y “*saber hacer*” para generar innovación clínica. Con otros valores añadidos además, ya que mientras se llevan a cabo tareas científicas y clínicas, se actúa como un tutor de apoyo y se promueve la cooperación y la asociación entre las diferentes instituciones, evitando la inversión ineficiente, proporcionando transparencia y fomentando la educación sanitaria y la comprensión de sus objetivos.

El potencial de la investigación traslacional es tan amplio como su objetivo, en tanto que ayuda a validar la eficacia clínica de nuevos descubrimientos, incrementa la eficiencia en la cual nuevas estrategias diagnósticas, preventivas y/o terapéuticas pueden trasladarse de forma segura a sujetos humanos, proporciona retorno de información a los investigadores sobre los efectos de dichas estrategias, y desarrolla tecnologías para la caracterización del proceso de enfermedad. Es obvio que las instituciones sanitarias constituyen un escenario adecuado para su implementación, ya que disponen de una variable independiente crítica de la investigación traslacional: el paciente, alrededor del cual debería girar la investigación biomédica. También es verdad que para ello, se requiere un diseño adecuado y no disponible en muchos casos: áreas clínicas junto con áreas de investigación y laboratorio que permitan acometer proyectos orientados a comprobar hipótesis o generar conocimiento y aplicaciones derivadas de una observación clínica sólida; un buen equipamiento (infraestructura necesaria para una alta eficiencia y calidad en el laboratorio y en el trabajo clínico); apoyo para formación (soporte financiero suficiente de modo que se obtengan todos los reactivos y medicamentos necesarios, instalaciones para el mejor cuidado posible a los pacientes, apoyo en la formación de los investigadores clínicos, etc.); una buena *tutorización* (científicos altamente preparados y consultores clínicos con experiencia combinada en las arenas científicas y clínicas), y recursos formativos disponibles (buenas prácticas científicas y clínicas establecidas para la conducción de los planes experimentales y su traslación a ensayos clínicos); así como la integración de estos elementos en la gestión clínica. Estos son los componentes críticos necesarios que determinarán el éxito.

Para alcanzarlo es necesario fomentar una colaboración estrecha y tender puentes que conecten los espacios de trabajo e intelectuales clínicos y de investigación, y convencer a los servicios sanitarios, gestores de la investigación biomédica y a los inversores, de la necesidad de generar oportunidades y dar apoyo a estas iniciativas. También la Academia: a medida que en ciencia emergen nuevas fronteras, se necesita de un curriculum científico unificado, orientado a unir los huecos entre la investigación biomédica y los cuidados de salud. Por lo tanto, es vital educar a una nueva generación de científicos clínicos que adquirirán el conocimiento y competencias para tratar la investigación traslacional desde ambas orillas: la clínica y la experimental.

Genética Clínica y Medicina Genómica

En 1953 el físico británico Francis Crick anunció “*Hemos encontrado el secreto de la vida*”, cuando, junto con el biólogo estadounidense James Watson, propuso la estructura de doble hélice del ADN, hito científico que supuso un antes y un después en el avance de la ciencia que se ocupa de los mecanismos responsables del flujo de información en los seres vivos: la Genética (Watson y Crick, 1953).

Desde entonces, los importantes avances conceptuales y metodológicos que se han venido produciendo en esta área, culminados con la secuenciación completa del genoma humano, están haciendo de la Genética la piedra angular de la biomedicina.

De hecho, la presentación, en junio del año 2000, del primer borrador de la secuencia completa del genoma humano, se considera uno de los mayores hitos científicos en la historia de la humanidad (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001; Venter y cols., 2001). Este avance científico señala el inicio de un proceso de cambio sobre la forma actual de entender la medicina, que introduce nuevos paradigmas y genera grandes expectativas. En comparación con otros enfoques para el estudio de las enfermedades, la ventaja clave de la genética es que es uno de los pocos enfoques en biología que permiten discernir de forma fiable entre causa y efecto.

En el inicio del siglo XXI, el avance en el conocimiento sobre genética humana ha supuesto un cambio drástico en nuestra comprensión del desarrollo humano y de la causa de muchas enfermedades. El desarrollo de las tecnologías de análisis del ADN y de la citogenética molecular, junto al conocimiento derivado de la obtención y desarrollo de mapas genéticos y la identificación de nuevos genes y mecanismos moleculares, así como el uso cada vez más extendido de las metodologías de alto rendimiento, especialmente la secuenciación masiva, están abriendo nuevas vías para la planificación, diseño e implementación de estrategias diagnósticas, preventivas y terapéuticas más eficientes y efectivas en las enfermedades de base genética y en enfermedades complejas, dando origen a los nuevos conceptos de Medicina Genómica y Medicina Personalizada. La diversidad de fenotipos ligados a los cambios de un único gen en un gran número de trastornos genéticos, ha hecho del manejo correcto de la variabilidad clínica y la heterogeneidad genética elementos claves en el consejo genético, la referencia correcta para análisis genéticos, la toma de decisiones clínicas y la formación de cohortes homogéneas para ensayos terapéuticos. Así, la evolución del conocimiento ha conducido en la última década a un considerable desarrollo de las posibilidades de diagnóstico y prevención de los trastornos genéticos, y a una mayor esperanza y calidad de vida de muchos pacientes.

En la actualidad, la traslación de ese conocimiento a la práctica clínica está permitiendo notables avances en el conocimiento y manejo clínico de las denominadas enfermedades raras, consiguiendo, de este modo, una mayor esperanza y calidad de vida en las personas afectadas. Las enfermedades raras son aquellas patologías que afectan a menos de 5 individuos de cada 10.000. El 80 % de las enfermedades raras son enfermedades de base genética. Las enfermedades de base genética tienen, por tanto, una importante relevancia en términos de salud pública, a nivel asistencial y en cuanto a su repercusión en la calidad de vida de las personas que las padecen. Además, los pacientes, las familias y el sistema soportan grandes cargas sociales, lo que aumenta la ya de por sí elevada carga de enfermedad.

Pero la investigación en Genética Clínica y Medicina Genómica no sólo se ocupa de la investigación en enfermedades raras, sino que está permitiendo una mejor

comprensión de la etiopatogenia de enfermedades comunes como la diabetes o el cáncer, en las que junto a factores hereditarios se requiere la presencia de otros para que la predisposición genética se convierta en enfermedad. Sólo durante los últimos cinco años, más de 2000 nuevos loci han sido asociados a enfermedades comunes. Es decir, los avances de la investigación en estas áreas no sólo han supuesto un cambio drástico en nuestra comprensión del desarrollo humano y de la causa de muchas enfermedades de base genética. La traslación de los resultados de la investigación biomédica a la práctica clínica impulsan nuevos conceptos en medicina. Un nuevo escenario que se traduce en un mayor conocimiento sobre las causas de las enfermedades complejas, que nos acerca a un nuevo paradigma: la Medicina Personalizada.

La aplicación clínica de dicho conocimiento debe analizarse desde la perspectiva de la salud pública, por su potencial para preservar la salud y la vida de muchas personas. Por esa razón, es imprescindible que su desarrollo sea ordenado, racional y sostenible, integrando la investigación, los desarrollos tecnológicos y la asistencia a la población. Además, se debe garantizar la protección de los derechos individuales de la ciudadanía.

Hoy, después de la caracterización del genoma humano, es razonable esperar que a medida que progrese nuestro conocimiento sobre el genoma humano y su relación con la salud, susceptibilidad a la enfermedad y respuesta al tratamiento, tengamos una comprensión más completa de los mecanismos básicos de la vida, que nos acerque a los nuevos paradigmas de la Medicina del siglo XXI. Sin embargo, queda un largo camino por recorrer: encontrar la función de estos genes, descifrar cual es su asociación con las enfermedades y averiguar cómo se puede utilizar este conocimiento para desarrollar nuevas estrategias de diagnóstico, prevención y tratamiento.

No obstante, podemos predecir que, con toda probabilidad, el avance en la investigación biomédica, el desarrollo de la farmacogenética y la farmacogenómica, con su capacidad potencial para proporcionar terapias individualizadas, así como la disponibilidad de la información que nos permita anticipar el riesgo de desarrollar ciertas enfermedades y determinar las medidas preventivas más efectivas, cambiará la medicina, y probablemente también nuestras vidas.

En este escenario, el avance de la investigación biomédica y el desarrollo tecnológico no es, ni debe ser, el único objetivo. Debe ir paralelo al desarrollo de aquellos aspectos éticos, legales, sociales y de género que aseguren la accesibilidad y equidad de los cuidados médicos, e impulsen un uso no discriminatorio de la información genética.

Por otra parte, la necesidad de comprender la enorme cantidad de datos generados por el Proyecto Genoma Humano y los proyectos generados por el mismo, ha marcado los nuevos ámbitos de desarrollo en la investigación biomédica, así como el perfil de los nuevos profesionales de la investigación en Genética Clínica y Medicina Genómica orientada a la salud.

En definitiva, la investigación biomédica en estas áreas se abre a la innovación clínica mediante la búsqueda de nuevas posibilidades para llevar a cabo un diagnóstico más preciso, incluso presintomático, desarrollar terapias más seguras y eficientes adaptadas a grupos de población con características genéticas diferenciadas, reclasificar algunas enfermedades atendiendo a sus causas moleculares y posibilitar nuevos enfoques para la epidemiología y la salud pública.

Aproximación Genómica al Diagnóstico Genético y Medicina personalizada

Como se viene mencionando, la necesidad de implementar la aplicación de la genética en medicina supone un desafío para los sistemas de salud, pero es también una oportunidad para la integración racional y sostenible de la investigación, el desarrollo tecnológico, y los cuidados médicos en las enfermedades raras de base genética, así como para anticipar las futuras necesidades de la Medicina Genómica y la Medicina Personalizada.

La popularización de metodologías de alto rendimiento (microarrays, genotipado a gran escala, etc.) y en especial la aparición de nuevas metodologías aún más potentes, como la secuenciación de nueva generación (NGS de sus siglas inglesas *Next Generation Sequencing*), ha cambiado completamente el escenario en el que se va a desarrollar la biomedicina en las próximas décadas. Durante los últimos 30 años, el método de Sanger ha constituido la herramienta clásica en la secuenciación del ADN (Sanger y cols., 1977). El lanzamiento comercial en 2005 de la primera plataforma de pirosecuenciación masiva en paralelo marcó el comienzo de una nueva era de análisis genómico de alto rendimiento conocido ahora como NGS (Metzker, 2010). En el corto periodo de tiempo transcurrido desde 2005, la NGS ha modificado la investigación genómica y ha permitido a los investigadores llevar a cabo experimentos que anteriormente no eran viables o asequibles. Las tecnologías que constituyen este nuevo paradigma continúan evolucionando, y las mejoras previsibles en la robustez tecnológica y aumento de la eficiencia de los procesos están allanando el camino de su desarrollo clínico. Es fácil anticipar que la NGS va a convertirse en una práctica rutinaria en clínica en un plazo de pocos años. En ese contexto, la enorme cantidad de datos producidos en este sistema supondrá un enorme desafío bioinformático para su aplicación.

Los nuevos “omas” y el desarrollo de nuevas tecnologías de análisis genómico, como la NGS, han abierto grandes expectativas para la identificación de terapias más eficaces adaptadas a los pacientes: el nuevo paradigma de la medicina personalizada. Las tecnologías de alto rendimiento permiten a los investigadores estudiar las enfermedades humanas, contabilizando la variabilidad genética de pacientes individuales y la heterogeneidad de sus enfermedades. De otra parte, el análisis extensivo de “omas” individuales contribuiría a complementar la información relacionada al proceso de enfermedad en los niveles genético, funcional y post-traslacional.

Áreas como el diagnóstico y el pronóstico de enfermedades, la personalización de tratamientos tendrán que gestionar un cambio muy importante respecto a la obtención y manejo de datos. La capacidad de obtener, procesar y convertir en información útil el gran volumen de datos producido por estas tecnologías va a marcar la diferencia entre la investigación e innovación de calidad y la obsolescencia. Esta diferencia va a ser clave en la implementación de nuevos métodos de diagnóstico y protocolos terapéuticos, así como en desarrollo de tratamientos personalizados.

Es absolutamente predecible que, en los próximos años, la NGS realizará la transición al uso clínico. Elementos esenciales para hacer esta transición exitosa serán la necesidad de la mejora en la eficiencia de los procesos, especialmente en la preparación de las muestras, junto con el aumento de la robustez tecnológica y la caracterización de la precisión a través de estudios de validación, así como la introducción de la bioinformática en el área clínica.

Mientras nos movemos hacia ese escenario es factible proponer aplicaciones reales de la NGS que a día de hoy resulten tecnológica y económicamente viables, que tengan un uso directo en clínica y, lo que es más importante, que nos ayuden a preparar la futura introducción de la medicina personalizada. Los sistemas de captura usados para secuenciar el exoma pueden usarse de forma más dirigida y eficiente para capturar sólo un número de genes representativo de una enfermedad. Un diseño inteligente del sistema de captura orientado a enfermedades específicas abarata considerablemente el proceso de secuenciación sin renunciar a sus ventajas, permite observar todas las mutaciones de carácter diagnóstico, más otras mutaciones interesantes que pueden ser nuevas o tener un efecto modificador (con carácter diagnóstico o pronóstico aún no conocido). Finalmente, en el diseño se pueden incluir genes funcionalmente relacionados con los genes de enfermedad, lo que ampliaría el espectro de descubrimiento paralelo a la utilidad diagnóstica de estos diseños.

Hasta hace poco tiempo, la identificación de genes causantes de enfermedades se basaba en el mapeo genético de un fenotipo de enfermedad mediante marcadores genéticos altamente polimórficos (SNPs o marcadores microsatélites) que se han desarrollado de forma paralela al Human Genome Project (HGP). En general, se trata de un proceso extremadamente arduo que incluye la definición del fenotipo clínico de forma precisa, la recogida de un número suficiente de pacientes y familias, el mapeo cromosómico del locus, y, finalmente, la clonación del gen y la detección de mutaciones mediante secuenciación Sanger convencional. En la mayoría de los casos, este proceso implica años de trabajo y no siempre acaba en éxito, especialmente en casos de enfermedades raras donde el número de muestras disponibles para el análisis es siempre relativamente pequeño.

La disponibilidad de las nuevas plataformas de megasecuenciación hacen de la secuenciación de las regiones codificantes del genoma (exoma) o genomas completos en un período de tiempo razonablemente corto una perspectiva razonable. Esta aproximación constituye un cambio de paradigma en la forma en la que se ha enfocado tradicionalmente el estudio de las enfermedades genéticas.

Mediante el conocimiento y tecnología que se está generando está siendo posible detectar un número considerable de nuevos genes relacionados con enfermedades hereditarias, revolucionando por completo los paradigmas actualmente vigentes en el campo de la Genética Molecular Humana, la Genética Clínica y la Medicina Genómica.

Actualmente existe ya un catálogo de mutaciones y variaciones génicas que se ha demostrado que son causantes de un buen número de enfermedades y que, por lo tanto, pueden usarse como diagnóstico de estas. En algunas patologías, el número de genes y mutaciones implicadas es muy elevado, el diagnóstico genético usando secuenciación Sanger tradicional es altamente laborioso y requiere una gran inversión de tiempo y recursos. Contrariamente a los sistemas tradicionales basados en chips, en los que se analizan sólo las posiciones del genoma correspondientes a las mutaciones conocidas, la secuenciación proporciona información sobre todas las posiciones de los genes relacionados con la enfermedad. De esta manera, otras mutaciones aún no descritas de estos genes, que pudieran ser causantes de la enfermedad, se podrían inferir directamente del mismo sistema de diagnóstico. Además se pueden añadir genes funcionalmente relacionados con los genes de enfermedad para aumentar el espectro de detección de nuevas mutaciones (Mardis, 2008). Un buen diseño de captura de genes junto con un eficiente sistema bioinformático de procesamiento de resultados de la secuenciación ofrecerá para cada enfermedad:

1.la posibilidad de diagnosticar directamente si el paciente tiene una mutación conocida en alguno de los genes descritos como asociados a la enfermedad,

2.cuando el paciente no presente ninguna mutación conocida, la posibilidad de detectar nuevas mutaciones en los genes asociados a la enfermedad que puedan ser validadas y usadas en el futuro como nuevas mutaciones diagnósticas

3.cuando el paciente no presente ninguna mutación en ningún gen conocido asociado a la enfermedad, la posibilidad de detectar mutaciones potencialmente causantes de la misma en otros genes funcionalmente relacionados.

Cuando no se pueda detectar la causa genética de la enfermedad, habrá que recurrir a la secuenciación de exoma completo con el objetivo de caracterizar el gen causante.

El análisis de los datos que se generen por NGS de zonas exónicas y regiones adyacentes, permitirá establecer aquellos loci relacionados con las patologías estudiadas y establecer modelos de susceptibilidad génica.

La NGS se ha empezado a aplicar con un gran éxito en el descubrimiento de genes de enfermedades mendelianas y en cáncer, y es la herramienta ideal para hacer realidad las promesas de la medicina personalizada. Además del procesamiento de datos, la interpretación de los resultados de secuenciación requerirá una nueva caracterización de la variación genómica presente en las regiones analizadas. Otras cuestiones clave que necesitarán ser respondidas en esta transición incluirán la complejidad de los procesos técnicos, la robustez, la precisión y el coste.

Medicina Computacional y Bioinformática Clínica

Desde el punto de vista bioinformático, el volumen de datos generado por este tipo de aproximación genómica es de una magnitud incomparable a cualquier proyecto de secuenciación convencional, incluido el Proyecto Genoma Humano. Una idea del volumen de datos que se produce lo da el hecho de que 10 secuenciadores a pleno rendimiento secuenciarían en una sola semana tantos nucleótidos como había almacenados en las bases de datos EMBL o Genbank hasta 2006. En otras palabras, sólo una semana de trabajo de este número de equipos equivalen al esfuerzo combinado de toda la secuenciación convencional hasta el año 2006.

Obviamente el manejo de este volumen de datos presenta nuevos retos desde el punto de vista de su procesamiento y almacenamiento. El análisis primario de los datos necesita de herramientas bioinformáticas que puedan procesar este gran volumen de datos en una escala de tiempo razonable. Igualmente el almacenamiento y manejo de ficheros de gran tamaño (cientos de GB) supone un desafío, necesitándose para ello *software* específico así como hardware “*ad-hoc*”.

Un desafío aún mayor lo constituye el análisis secundario de los datos generados en este tipo de trabajo, mediante el cual se pretende detectar de forma comparativa aquellos cambios de secuencia nucleotídica responsables de un determinado cuadro clínico/fenotipo, es decir detectar de forma específica el gen y la mutación causal de una determinada patología de base genética para la que no se conozca su causa.

Por otra parte, es bien sabido que los genes no actúan aislados, sino que lo hacen de una manera conjunta mediante la formación de complejos moleculares o bien participan en una misma ruta de señalización celular o ciclo metabólico. La identificación y comparación de estas “redes” de genes son las que van a permitir descubrir el proceso o la función responsable del fenotipo donde habrá varios genes diferentes implicados. La

modelización matemática y bioinformática de estas redes de interacción permite entender las bases de la función celular y, consecuentemente, de los fallos en esta, que generarán la condición de enfermedad. Esta modelización permite comprender las bases de los mecanismos de enfermedad y es fundamental para el diseño de los sistemas de captura avanzados.

En muchas patologías que presentan fenotipos o cuadros clínicos similares, los genes responsables de las mismas pueden ser diferentes. Si se lleva a cabo un estudio de varios individuos con una de estas patologías, la simple comparación de las variaciones génicas para buscar mutaciones coincidentes en un mismo gen no es productiva, puesto que son varios genes los responsables del fenotipo. Es necesario ir más allá de la búsqueda de un simple gen. Para la implementación de una metodología que permita el análisis conjunto de redes de genes, se pueden utilizar una serie de herramientas bioinformáticas útiles, como son los algoritmos de *Pathway-Based Analysis* (PBA) y de *Network Analysis* (Wang y cols., 2007). En los algoritmos de PBA se usa como información de partida las definiciones de clases funcionales de *Gene Ontology* (GO), *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) y Biocarta, y para los *network analyses* se parte de información sobre el interactoma y sobre la red regulatoria. Se usa también la información sobre genes de la enfermedad conocidos para relacionar a los candidatos con ellos. Esta tarea requiere no sólo de potencia de cálculo para los tests, sino también de almacenamiento, para las bases de datos de conocimiento y mucha programación de interfaz gráfico para facilitar la interpretación de los resultados.

Situación de la Investigación en Genética Clínica y Medicina Genómica en España

En Abril de 2002 se publicó la primera convocatoria de ayudas para el desarrollo de Redes Temáticas de Investigación Cooperativa en Salud (RETICS), que dio lugar a proyectos de cooperación en el ámbito de la genética clínica y las enfermedades raras. La convocatoria de creación de Redes Temáticas de Investigación Cooperativa a través del Instituto de Salud Carlos III, permitió la creación de dos Redes de Centros en el área temática de Genética: RECGEN e INERGEN. Ambas Redes fueron desarrollando sus objetivos y planes estratégicos, encaminados a mejorar la eficacia del diagnóstico y tratamiento de las enfermedades genéticas, coordinar y validar el diagnóstico de laboratorio, potenciar la investigación integrada y traslacional, establecer la epidemiología de las enfermedades poco frecuentes y establecer programas formativos.

En noviembre de 2006, se constituyó en España el Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), uno de los nueve consorcios establecidos por iniciativa del Instituto de Salud Carlos III con el fin de coordinar y potenciar la investigación sobre las enfermedades raras en España y del cual formamos parte. Sus orígenes se encuentran en las Redes de Investigación de centros y grupos del ISCIII cuya temática se relacionaba con enfermedades raras. El CIBERER es un centro orientado al desarrollo y la aplicación de la investigación cooperativa, la realización de investigación básica, clínica y traslacional en el campo de la biomedicina, con especial énfasis en la transferencia de la investigación desde el laboratorio a la cabecera del paciente. Esta red actúa como un consorcio público de 29 instituciones, contando con más de 700 profesionales que integran 60 grupos de investigación, estando financiada principalmente por el Instituto de Salud Carlos III.

Los objetivos del CIBERER son:

- 1) mejorar los recursos disponibles para la investigación de enfermedades raras y medicamentos huérfanos;
- 2) promover la integración entre grupos de investigación biomédica básica y clínica;
- 3) desarrollar proyectos de cooperación en investigación que permitan la exploración de nuevas hipótesis científicas y desarrollos tecnológicos;
- 4) demostrar el valor de la investigación en enfermedades raras, y
- 5) establecer iniciativas de colaboración con la industria farmacéutica y biotecnológica.

El 1 de febrero de 2013 se aprobó por el Consejo de Ministros el Plan Estatal de Investigación Científica, Técnica y de Innovación 2013-2016, que representa el instrumento destinado a desarrollar y financiar las actuaciones de la Administración General del Estado en materia de I+D+i, para permitir la consecución de los objetivos y prioridades incluidos en la Estrategia Española de Ciencia, Tecnología e Innovación 2013-2020.

El Plan Estatal determina como una de sus actuaciones programáticas la Acción Estratégica en Salud 2013-2016 (AES) que tiene como principio fomentar la salud y el bienestar de los ciudadanos, y se estructura como un espacio de interacción, en el que se vertebran un conjunto de actuaciones instrumentales sinérgicas y complementarias, cuyos resultados han de contribuir a que el SNS se consolide como un referente mundial en cuanto a sus capacidades científicas, tecnológicas y de innovación. Contribuye, de esta manera a adaptarse a Europa, preparándose para el que sería el 8º Programa Marco, que en esta ocasión ha pasado a denominarse Horizonte 2020.

En las convocatorias correspondientes de concesión de ayudas de la AES, en el marco del Plan Nacional de I+D+I 2008-2011, así como en el marco del Plan Estatal de Investigación Científica, Técnica y de Innovación 2013-2016, las enfermedades raras se han contemplado de una manera explícita como una de las líneas prioritarias.

Situación Internacional de la Investigación en Genética Clínica y Medicina Genómica

Cuando el consorcio público internacional y el proyecto privado, liderado por la empresa estadounidense PE Celera Genomics, anunciaron conjuntamente en el año 2000 el primer borrador de la secuencia completa del genoma humano, se culminaba el Proyecto Genoma Humano, la gran apuesta de los EE.UU (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001; Venter y cols., 2001). Patrocinado e impulsado inicialmente por el Departamento de Energía a finales de los 80 y dotado con 3.000 millones de dólares. La contribución internacional y el avance del conocimiento en Genética Humana fueron clave, ya que impulsaron el desarrollo de las tecnologías de análisis genómico y citogenética molecular, la bioinformática y el acceso a la información “on line”, junto al avance del conocimiento derivado de la obtención y desarrollo de los mapas genéticos y la identificación de nuevos genes. Investigación, desarrollo e innovación sin los que no hubiera sido posible completar el Proyecto Genoma Humano en 2000.

Desde entonces, EE.UU. sigue destinando gran parte de los fondos públicos a la financiación de proyectos de investigación en el campo de la genética y la genómica; de hecho, los NIH de EE.UU., siguen englobando a la genómica como una de las áreas clave entre sus prioridades de inversión.

Conscientes de la repercusión de estas iniciativas, Europa apostó por la investigación en este campo en el VI Programa Marco (2002-2006), estableciendo un programa específico de *Ciencias biológicas, genómica y biotecnología aplicadas a la salud*. El presupuesto destinado a este programa fue de 2.255 millones de euros

De esta forma, el VI Programa Marco pretendía integrar la investigación genómica y postgenómica dentro de los enfoques biomédicos y biotecnológicos para el diagnóstico y tratamiento de las enfermedades raras, incluyendo los aspectos de “Genómica avanzada y su aplicación en el área de la Salud”.

En particular “Aplicación del conocimiento y de las tecnologías al campo de la genómica y la biotecnología para la salud”, dado que la investigación y el desarrollo de nuevas herramientas diagnósticas y terapéuticas son algunos de sus posibles resultados. En particular bajo el epígrafe “Combatiendo las principales enfermedades”, “Abordaje genómico del conocimiento médico y de la tecnología orientados a la aplicación”, sección “combatiendo enfermedades raras”.

El proyecto ERA-Net (*European Research Action Networks*), dedicado a enfermedades raras y financiado por la Comisión Europea dentro del 6PM, fomentó las actividades conjuntas y transnacionales. Dentro del mismo, E-Rare (*European Research Programmes on Rare Diseases*) es una Red constituida por nueve Estados Miembros incluyendo instituciones públicas, Ministerios y organizaciones gestoras de investigación, responsables del desarrollo y gestión de programas de investigación nacionales o regionales en enfermedades raras. Su objetivo es sentar las bases para la cooperación continua y duradera entre socios de los Estados Miembros de forma que se logre superar la fragmentación de la investigación sobre enfermedades raras y se potencie el carácter multidisciplinar de la misma.

En el VII Programa Marco (7PM, 2007-2013) Europa volvió a apostar por las investigaciones en materia de salud, haciendo hincapié en la investigación traslacional, la elaboración y validación de nuevas terapias, la comunicación de los resultados de las investigaciones, y el establecimiento de métodos de promoción de la salud y de prevención y de lucha contra la propagación de enfermedades, así como de instrumentos y tecnologías de diagnóstico y de sistemas de asistencia sanitaria sostenibles y eficaces (salud infantil y envejecimiento demográfico). En este caso, el presupuesto asignado a este ámbito temático se elevó a 6.100 millones de euros.

En el 7PM, Mediante la continuidad del E-Rare-1 con el ERare-2, se ha promovido así la cooperación transnacional. En concreto, la investigación se centra en la evolución natural y fisiopatología de las enfermedades y en el desarrollo de estrategias de prevención, medios diagnósticos y terapéuticos.

Los grupos de investigación españoles participan en proyectos financiados por el 7PM, desde la DG RESEARCH (*Directorate General for Research and Innovation*), mediante los programas COOPERATION, CAPACITIES y las acciones COST, entre las que destaca la convocatoria ya mencionada; Era-NET (E-Rare-1 y ERare-2). Así como en proyectos financiados desde la DG SANCO (*Directorate- General for Health and Consumers*); EUCERD *Joint Action*, E-IMD, EPIRARE, EURO-WABB,

ORPHANET *Joint Action*, EUROCAT, BURQOL-RD, RDPortal2, ENERCA 3, CARE-NMD o E-HOD, entre otros.

Asimismo, es necesario destacar la puesta en marcha del “*International Rare Diseases Research Consortium*” (IRDiRC), iniciativa promovida por el Consejo de Europa y por Estados Unidos para conseguir de aquí a 2020, 200 nuevas estrategias terapéuticas, innovaciones diagnósticas y una base de datos global en base a los registros estatales. El Instituto de Salud Carlos III es miembro fundador del Consorcio. El IRDiRC insta a los miembros fundadores, a través de sus agencias de financiación a constituir una cartera de proyectos alineados con sus metas estratégicas.

Enfermedades Raras

Según la definición de la Unión Europea, las enfermedades raras, minoritarias, huérfanas o enfermedades poco frecuentes son aquellas enfermedades con riesgo de muerte o de invalidez crónica que tienen una prevalencia igual o menor de 5 casos por cada 10.000 habitantes. Esta definición fue la adoptada por el 'Programa de Acción Comunitaria sobre Enfermedades Raras 1999-2003' y es utilizada también por la *European Medicines Agency* (EMA) para la declaración de medicamentos huérfanos, así como por varios estados miembros (Alemania, Francia, Italia, Países Bajos y España).

En los países de nuestro entorno las enfermedades raras de base genética tienen un gran impacto sobre la seguridad reproductiva, constituyen un importante componente de la morbilidad perinatal e infantil y de la morbilidad en la edad adulta, contribuyen de manera muy importante a la incidencia y prevalencia de anomalías congénitas, significan más del 5% de la carga de enfermedad, afectan al 2% de los recién nacidos vivos y representan entre el 30% y el 50% de los ingresos pediátricos.

Las enfermedades raras son crónicas y con frecuencia progresivas y degenerativas. Entre el 50% y el 75% de ellas afectan a la infancia y un 30% de los pacientes mueren antes de los 5 años. Las enfermedades raras tienen una causa genética en más del 80% de los casos, afectan a la seguridad reproductiva, son en general discapacitantes, comprometiendo la calidad de vida de las personas que las sufren, y sólo el 5% tienen actualmente algún tratamiento efectivo. Por dichas razones provocan un gran impacto negativo en los pacientes y en las familias que las sufren.

Aunque es difícil precisar el número de enfermedades raras (ER), se estima que podría oscilar entre 6.000 y 8.000, aunque tan solo unas 100 se acercan a las cifras de prevalencia que se establecen como límite para considerar una enfermedad como rara (*Orphanet*). Aunque se trata de enfermedades poco frecuentes de forma aislada, en su conjunto son importantes ya que afectan a un 6-8% de la población de países desarrollados, y en conjunto afectan a alrededor de 25 millones de individuos en los Estados Unidos, unos 30 millones en la Unión Europea y a más de 300 millones de personas en todo el mundo. En nuestro país, una enfermedad para ser considerada como rara no debe afectar a más de 24.000 personas, aunque en su conjunto unos 3 millones de ciudadanos españoles se ven afectados por alguna de ellas.

A pesar de constituir un grupo muy heterogéneo de entidades clínicas, las enfermedades raras comparten algunas características:

- En general, son enfermedades de base genética, que habitualmente se inician en la edad pediátrica.
- Tienen carácter crónico, en muchas ocasiones progresivo, contando con una elevada morbi-mortalidad y alto grado de discapacidad.
- Son de gran complejidad etiológica, diagnóstica y pronóstica.
- Requieren un manejo y seguimiento multidisciplinar.

De sus características se derivan los principales problemas a los que se enfrentan: el desconocimiento y la desinformación de los profesionales, la ausencia de terapias y la escasa disponibilidad de medicamentos, ya que suponen un elevado coste social y una escasa rentabilidad teórica para los sistemas sanitarios. Respecto al último punto, los datos nos dicen otra cosa. En el Reino Unido, el tratamiento y la atención sanitaria de los pacientes que padecen estos trastornos suponen un gasto para los servicios sanitarios

y sociales de más de 2 billones de libras anuales. En Andalucía, la información disponible sobre morbilidad obtenida a partir de la explotación de los datos del Conjunto Mínimo Básico de Datos al Alta Hospitalaria de Andalucía (CMBDA) puede ayudarnos a realizar una aproximación a la situación de las enfermedades raras. En el periodo 1999-2004 se han ingresado en los hospitales públicos de la comunidad una media anual de 23.495 casos, lo que se correspondería con una tasa media interanual de 31,73 casos por 10.000 habitantes. Debe destacarse especialmente que el número de casos atendidos crece anualmente, pasando de 21.451 en 1999 a 26.257 en 2004. En el periodo estudiado se han producido 65.304 altas por enfermedades raras con un total de 656.654 días de hospitalización por estas causas, si consideramos solo el diagnóstico principal. Estas altas y estancias por enfermedades raras representan el 1,92% y el 2,49% respectivamente del total de altas y estancias recogidas en el CMBDA. Si consideramos las enfermedades raras en cualquier posición diagnóstica son 178.740 altas (el 5,27% de las altas del CMBDA) y 2.069.824 días de estancia (el 7,85% de las estancias del CMBDA).

Las enfermedades raras de base genética constituyen un conjunto de patologías muy diversas. La complejidad, heterogeneidad clínica y genética hace difícil clasificar de forma estricta estas enfermedades, aunque los principales grupos incluirían:

- Anomalías cromosómicas que ocasionan anomalías congénitas y/o retraso mental.
- Trastornos monogénicos, que siguen una herencia mendeliana, como la fibrosis quística, atrofia muscular espinal, enfermedad de Huntington, enfermedades metabólicas hereditarias, trastornos neurosensoriales como hipoacusias y distrofias de retina, entre otros.
- Cánceres hereditarios y síndromes que predisponen al desarrollo de determinados tipos de cáncer hereditario, como el cáncer medular de tiroides, colorrectal o de mama.
- Anomalías congénitas y del desarrollo como la enfermedad de Hirschsprung.
- Problemas de aprendizaje y trastornos de atención e hiperactividad.
- Patología mitocondrial.

Para abordar el problema de las enfermedades raras es preciso un planteamiento global con el objetivo de prevenir la morbilidad significativa y evitar la mortalidad prematura, así como mejorar la calidad de vida o el potencial socioeconómico de las personas.

No en vano, en las conclusiones de la Comunicación de 11 de noviembre de 2008 se impulsa un planteamiento estratégico europeo sobre las enfermedades raras. En esta perspectiva, el Consejo insta a los Estados miembros a:

- Elaborar estrategias y planes de acción nacionales con el fin de garantizar el acceso universal y la calidad de la asistencia sanitaria.
- Adoptar una definición europea de enfermedades raras para facilitar sus referencias y codificación en los sistemas de asistencia médica y de reembolso.
- Identificar las prioridades de investigación y los proyectos en curso, especialmente en relación con la investigación básica, clínica y traslacional, y permitir que los pacientes se beneficien de los nuevos avances terapéuticos.
- Promover el desarrollo de centros especializados nacionales y regionales, de asistencia transfronteriza y de redes de expertos.
- Adoptar métodos comunes en materia de cribado, tratamiento y seguimiento de las técnicas terapéuticas.

- Apoyar la actividad de las asociaciones de padres.
- Garantizar la viabilidad de las infraestructuras de investigación a escala nacional y europea.

En España este planteamiento se desarrolla mediante la Estrategia en Enfermedades Raras del Sistema Nacional de Salud (Ministerio de Sanidad y Política Social, 2014) que presenta 7 grandes líneas estratégicas de actuación :

1. Información sobre las enfermedades raras
2. Prevención y detección precoz
3. Atención sanitaria
4. Terapias
5. Atención sociosanitaria
6. Investigación
7. Formación

Las líneas estratégicas se despliegan en objetivos generales que a continuación se detallan:

- 1.Habilitar la información sobre los recursos disponibles para la atención a las personas con enfermedades raras y sus familias.
- 2.Obtener la información epidemiológica necesaria que permita el desarrollo de políticas sociales, sanitarias y de investigación.
- 3.Reducir la incidencia de aquellas enfermedades raras susceptibles de beneficiarse de programas de prevención primaria.
- 4.Mejorar el diagnóstico prenatal de las enfermedades raras.
- 5.Mejorar los programas de cribado neonatal de enfermedades raras en el SNS.
- 6.Mejorar el acceso a pruebas diagnósticas y al consejo genético.
- 7.Agilizar el diagnóstico de sospecha de enfermedad rara en el ámbito de la Atención Primaria.
- 8.Mejorar la atención sanitaria que reciben los pacientes con una enfermedad rara, con el objetivo de que sea integral, continuada y coordinada entre los niveles asistenciales.
- 9.Potenciar la rehabilitación integral para las personas afectadas por una enfermedad rara, con el fin de optimizar, conservar y/o asegurar sus capacidades residuales.
- 10.Garantizar la atención psicológica a las personas afectadas de enfermedades raras y sus familiares.
- 11.Garantizar la accesibilidad en tiempo y forma de los medicamentos huérfanos necesarios para el tratamiento de las enfermedades raras en todo el territorio nacional.
- 12.Potenciar la investigación y el desarrollo de medicamentos huérfanos y tratamientos de alta complejidad.
- 13.Fomentar el acceso seguro de las personas afectadas por enfermedades raras a terapias avanzadas.
- 14.Coordinar los distintos organismos e instituciones involucradas en la atención de las enfermedades raras.
- 15.Potenciar la integración social, para mejorar la calidad de vida de las personas afectadas por una enfermedad rara y sus familiares.

- 16.Fomentar las campañas de sensibilización hacia las enfermedades raras.
- 17.Potenciar el apoyo al asociacionismo y voluntariado.
- 18.Garantizar la atención integral a menores de tres años con una enfermedad rara en situación de dependencia o en riesgo de padecerla.
- 19.Apoyar las iniciativas en la investigación epidemiológica, clínica, básica y traslacional sobre enfermedades raras.
- 20.Mantener y mejorar las estructuras y los instrumentos necesarios para el desarrollo de la investigación en enfermedades raras.
- 21.Aumentar el conocimiento sobre las enfermedades raras en la formación de grado de las carreras de ciencias de la salud y ciencias sociales.
- 22.Profundizar en la noción y manejo de las enfermedades raras en la formación de posgrado.
- 23.Fomentar la formación continuada relacionada con las enfermedades raras en la Atención Primaria y Atención Hospitalaria.
- 24.Realizar programas de formación dirigidos a asociaciones, a los familiares y a las personas afectadas en materia de cuidados y autocuidados, así como en prevención de las situaciones de dependencia.

Los grandes avances que han tenido lugar en los últimos años en el campo de la investigación genómica permiten que enmarquemos hoy la investigación y la práctica clínica relativa a Enfermedades Raras en el ámbito de la Medicina Personalizada. Tanto las Enfermedades Raras como el nuevo paradigma de Medicina Personalizada están entre los objetivos estratégicos de los planes de Investigación, Desarrollo e Innovación a nivel autonómico, nacional, europeo e internacional.

Así, la aproximación genómica, la investigación biomédica, la gestión del conocimiento y la innovación clínica han confluído en la genética clínica y en la medicina genómica. Ambas fundamento en la aproximación a las enfermedades raras y la medicina personalizada. Y a su vez, objetivos estratégicos importantes de los diferentes sistemas públicos de salud de la Unión Europea y una de las prioridades de la Comisión Europea y el Consejo de Europa.

Enfermedad de Hirschsprung

Uno de los principales retos en el campo de la investigación en Genética Clínica y Medicina Genómica es el llegar a diseccionar completamente las bases moleculares de enfermedades genéticas complejas, ya que tendría un gran impacto en el tratamiento, seguimiento y pronóstico de los pacientes. Sin embargo, la identificación del conjunto de los mecanismos moleculares que dan lugar a una enfermedad de estas características es extraordinariamente complicada. Históricamente, se han ido llevando a cabo distintos abordajes para la identificación de genes implicados en este tipo de patologías no monogénicas. Esa actividad es la que ha centrado nuestro trabajo en la línea de investigación de nuestro grupo sobre la enfermedad de Hirschsprung.

La enfermedad de Hirschsprung (HSCR, OMIM: 142623), o megacolon agangliónico, es una patología congénita que se caracteriza por la ausencia de células ganglionares en los plexos submucoso y mientérico (plexos de Meissner y Auerbach, respectivamente) en una porción variable del intestino grueso, constituyendo la forma más común de obstrucción intestinal funcional en recién nacidos y niños. En 1888, el pediatra danés Harald Hirschsprung describió por primera vez este trastorno en dos niños varones no emparentados, que fueron tratados hasta los 7 y 11 meses por estreñimiento severo y distensión abdominal, dando lugar a megacolon congénito. Sin embargo, no fue hasta los años 40 cuando los estudios histológicos revelaron la ausencia de células ganglionares en la parte dilatada del colon descendente. HSCR se considera un fallo en la migración, proliferación, diferenciación y/o supervivencia de las células de la cresta neural que tiene lugar entre la quinta y la duodécima semana de gestación durante el desarrollo del sistema nervioso entérico (SNE) (Hirschsprung, 1888; Chakravarti y Lyonnet, 2001).

La clasificación de HSCR se realiza en función de la longitud del segmento agangliónico (Figura 1). El límite inferior constante es el esfínter anal interno, y los pacientes se pueden clasificar como HSCR de segmento corto (S-HSCR: 80% de los casos) cuando el segmento agangliónico no se prolonga más allá del sigmoides superior, y HSCR de segmento largo (L-HSCR: 20% de los casos) cuando la aganglionosis se extiende por encima del plexo esplénico. Una variedad menos común de HSCR es la aganglionosis total del colon (TCA, entre el 3% y el 8% de los casos), en la que la totalidad del colon y la porción terminal del íleon se ven afectada. Asimismo, existen otras tres variantes poco comunes de HSCR: (1) aganglionosis total del intestino, cuando la aganglionosis se extiende a lo largo de todo el intestino; (2) variedad de segmento ultracorto, en la que la porción agangliónica ocupa el recto distal, por debajo del suelo pélvico y el ano, de manera proximal a la zona agangliónica normal; (3) aganglionosis de segmentos salteados, un trastorno controvertido en el que aparecen partes gangliónicas entre zonas agangliónicas.

Se estima que la incidencia de HSCR es de 1 por cada 5000 nacidos vivos. No obstante, la incidencia varía de forma considerable dependiendo de la población analizada (1,0; 1,5; 2,1; y 2,8 por cada 10 000 nacidos vivos de origen hispano, caucásico-americano, afroamericano y asiático, respectivamente). La aparición de S-HSCR es mucho más frecuente que la de L-HSCR (80% y 20%, respectivamente). Existe un sesgo de sexo con un claro predominio de varones afectados y una tasa de hombres y mujeres de 4/1. Curiosamente, la proporción hombre-mujer resulta significativamente mayor en la variedad S-HSCR (4,2 – 4,4) que en la L-HSCR (1,2 – 1,9) (Passarge, 1967; Badner y cols, 1990).

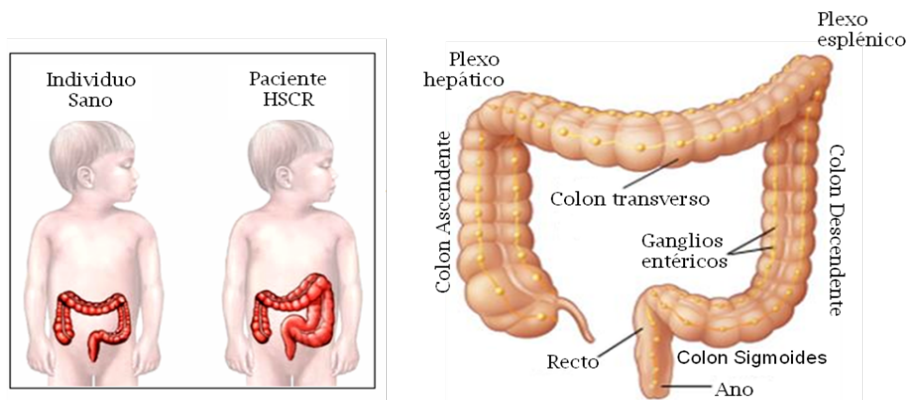


Figura 1. Esquema del intestino grueso con las distintas regiones anatómicas indicadas, mostrándose las diferencias entre intestino normal e intestino de un paciente HSCR.

Normalmente, HSCR aparece de forma esporádica, aunque también pueden encontrarse casos familiares en los que se observan patrones de herencia autosómicos dominantes y recesivos, con penetrancia y expresión variables. En el 70% de los casos HSCR tiene lugar como un rasgo aislado sin otras manifestaciones clínicas adicionales, mientras que en el 30% restante, se asocia con otros síndromes malformativos congénitos (Amiel y cols., 2008).

Genética molecular de HSCR

HSCR tiene una etiología genética compleja con varios genes asociados a formas aisladas o sindrómicas. Estos genes codifican para receptores, ligandos (en especial, los que participan en las vías de transducción de señales de RET y EDNRB), factores de transcripción u otros elementos de la célula involucrados normalmente en el desarrollo y la migración de las células de la cresta neural que dan origen al SNE (Figura 2, Tabla 1). No obstante, el protooncogén *RET* es el principal gen de susceptibilidad para HSCR (Borrego y cols, 2013a; Borrego y cols, 2013b; Alves y cols., 2013).

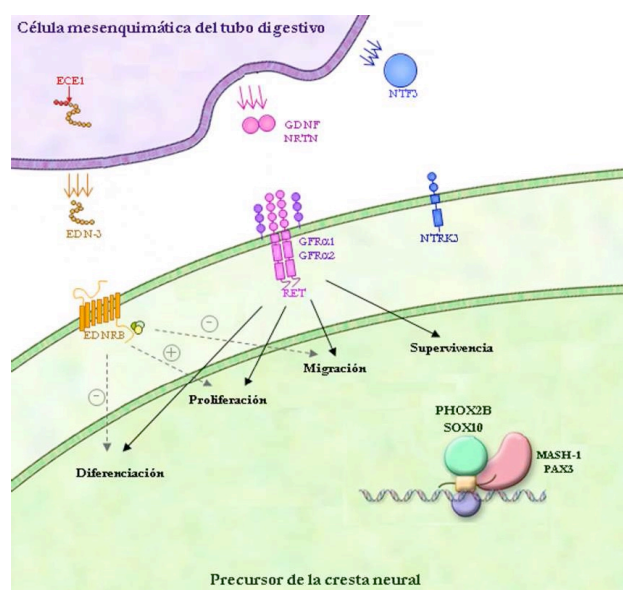


Figura 2. Principales rutas de señalización clave en el desarrollo del SNE.

Tabla 1. Genes asociados a la aparición del fenotipo HSCR.

Gen	Localización cromosómica	Fenotipo	Herencia	Modelo Murino
<i>RET</i>	10q11.2	HSCR/ HSCR-MEN2/FMTC	Dominante, penetrancia incompleta Dominante	ATI, agenesia renal
<i>GDNF</i>	5p13.2	HSCR	Dominante, baja penetrancia	ATI, agenesia renal
<i>NRTN</i>	19p13.3	HSCR	Dominante, baja penetrancia	Déficit moderado de neuronas entéricas
<i>PSPN</i>	19p13.3	HSCR	Dominante, baja penetrancia	-
<i>GFRA1</i>	10q25.3	HSCR	Dominante, baja penetrancia	ATI, agenesia renal
<i>EDNRB</i>	13q22.3	SW4/HSCR	Recesivo/ Dominante	Aganglioneosis, piel con manchas
<i>EDN3</i>	20q13.32	SW4/HSCR	Recesivo/ Dominante	Aganglioneosis, piel con manchas
<i>ECE1</i>	1p36.12	HSCR con defectos cardíacos, anomalías craneofaciales y disfunción del sistema nervioso autónomo	Dominante	Aganglioneosis, piel con manchas, defectos craneofaciales
<i>SOX10</i>	22q13.1	SW4/HSCR	Dominante	Aganglioneosis, coat spotting
<i>PHOX2B</i>	4p12	CCHS/Neuroblastoma+HSCR	Dominante	ATI, carencia de sistema nervioso autónomo, anomalías respiratorias
<i>NTF3</i>	12p13.31	HSCR	Dominante, baja penetrancia	Reducido número de neuronas entéricas
<i>NTRK3</i>	15q25.3	HSCR	Dominante, baja penetrancia	Reducido número de neuronas entéricas
<i>PROKR1</i>	2p14-p13.3	HSCR	Dominante, baja penetrancia	-
<i>PROKR2</i>	20p12.3	HSCR	Dominante, baja penetrancia	Hipoplasia del bulbo olfatorio y sistema reproductivo
<i>PROK1</i>	1p13.3	HSCR	Dominante, baja penetrancia	-
<i>SEMA3A</i>	7p12.1	HSCR	Dominante, baja penetrancia	Déficit de la innervación cardíaca simpática y malformación de los ganglios estrellados
<i>NRG1</i>	8p12	HSCR	Dominante, baja penetrancia	Defecto cardíaco letal
<i>ZFHX1B</i>	2q22.3	SMW	Dominante	Letal durante la gastrulación
<i>KIAA1279</i>	10q22.1	SGS	Recesivo	-
<i>LICAM</i>	Xq28	Espectro HSAS/MASA +HSCR	Ligado al X	Hidrocefalia

Ruta de señalización de RET

El protooncogén *RET* (*REarranged during Transfection*, OMIM +164761), localizado en la región cromosómica 10q11.2, codifica para un receptor transmembrana con un dominio extracelular tipo cadherina, una región rica en cisteína y un dominio intracelular tirosin-kinasa. Existen tres isoformas proteicas de RET generadas por maduración alternativa del extremo carboxi-terminal, y que difieren en el número de aminoácidos de su secuencia: RET 9 (1072aa), RET 43 (1106aa) y RET51 (1114aa).. Entre las dos isoformas mayoritarias (RET9 y RET51), RET9 resulta fundamental para el desarrollo del SNE y del sistema excretor. RET es activado por ligandos de la familia de factores neurotróficos derivados de la glia (ligandos de la familia de GDNF, o GFLs), una familia de factores neurotróficos que comprende cuatro miembros con aproximadamente un 40% de homología entre ellos: GDNF, neurturina (NRTN), artemina (ARTN), y persefina (PSPN) (Takahashi, 2001; Airaksinen y Saarma, 2002). Los GFLs actúan como homodímeros y activan *RET* a través de cuatro co-receptores anclados a la membrana celular a través de un enlace glicosil-fosfatidil-inositol (GPI) de la familia de receptores α de GDNF (GFR α 1-4) (Figura 3). Exhaustivos estudios *in vitro* e *in vivo* sostienen que cada ligando tiene preferencia por un co-receptor GFR α concreto, al cual se une con una mayor afinidad, y activa RET de la forma más potente. A pesar de que GFR α 4 se haya considerado el único co-receptor funcional de PSPN, estudios recientes han demostrado la capacidad de este ligando para interactuar también con GFR α 1. Según esto, existe una clara interacción entre los diferentes pares de ligandos y co-receptores. La formación de este complejo multimérico induce la dimerización transitoria de RET, teniendo como resultado la autofosforilación de residuos tirosínicos específicos y desencadenando la activación de un amplio espectro de vías de señalización (Figura 4). La activación de RET resulta crucial para el desarrollo del SNE, y se ha demostrado que tanto GDNF como NRTN favorecen la supervivencia, proliferación y diferenciación de las neuronas entéricas (Taraviras y cols., 1999). Los ratones que carecen de *Ret*, *Gdnf* o *Gfra1* muestran un fenotipo similar, presentando aganglioneosis intestinal total debido probablemente a fallos en la proliferación, migración y diferenciación de los precursores entéricos de la cresta neural, mientras que los ratones *Nrtn*^{-/-} o *Gfra2*^{-/-} muestran un fenotipo menos severo con déficit moderado de neuronas entéricas (Schuchardt y cols., 1994; Moore y cols., 1996; Heuckeroth y cols., 1999). Además, estudios recientes sugieren que la muerte celular y no una migración anómala de las células de la cresta neural es la causa principal de la aganglioneosis intestinal en ratones hipomórficos para *Ret*, reproduciendo las características fenotípicas de HSCR esporádico en humanos (Uesaka y Enomoto, 2010).

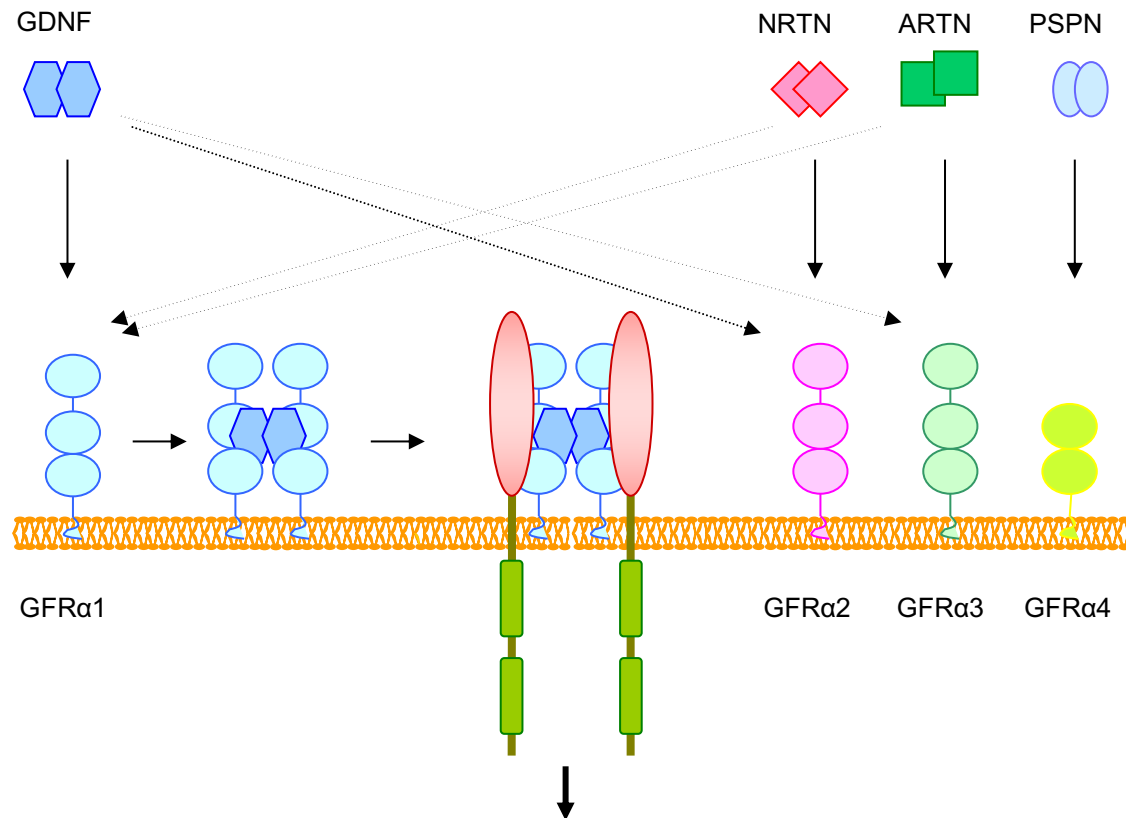


Figura 3. Formación del complejo multimérico de activación de RET. Interacciones entre los distintos ligandos, co-receptores GFR α y RET.

***RET* y HSCR**

El papel de *RET* en enfermedades humanas fue descrito por primera vez al detectar un reordenamiento de este gen a nivel somático en los carcinomas papilares de tiroides (PTC) (Grieco y cols., 1990). Todas las proteínas codificadas por los oncogenes RET/PTC son proteínas quiméricas que se componen de la región terminal NH₂ de diferentes proteínas unidas al dominio catalítico de RET y poseen actividad constitutiva tirosin-kinasa. La relevancia clínica de *RET* se acentuó cuando se descubrió que mutaciones de *RET* en línea germinal eran la causa del síndrome de neoplasia endocrina múltiple tipo 2 (MEN2) (Mulligan y cols., 1993). La coincidencia de MEN2A y HSCR en algunas familias y el hallazgo de deleciones en 10q11 en pacientes HSCR motivó la búsqueda del gen responsable de HSCR en esa región. Los análisis de ligamiento utilizando marcadores del cromosoma 10 en familias multigeneracionales que segregaban con la enfermedad con una herencia autosómica dominante y penetrancia incompleta, reveló la presencia de un locus de susceptibilidad para HSCR en la región pericentromérica del cromosoma 10 (Martucciello y cols., 1992; Angrist y cols., 1993; Lyonnet y cols., 1993). Además, la ausencia total de ganglios a lo largo del tracto intestinal observada en ratones *Ret*^{-/-} y la expresión de este gen en las células derivadas de la cresta neural llevó a la identificación definitiva de *RET* como el principal gen implicado en la aparición de HSCR.

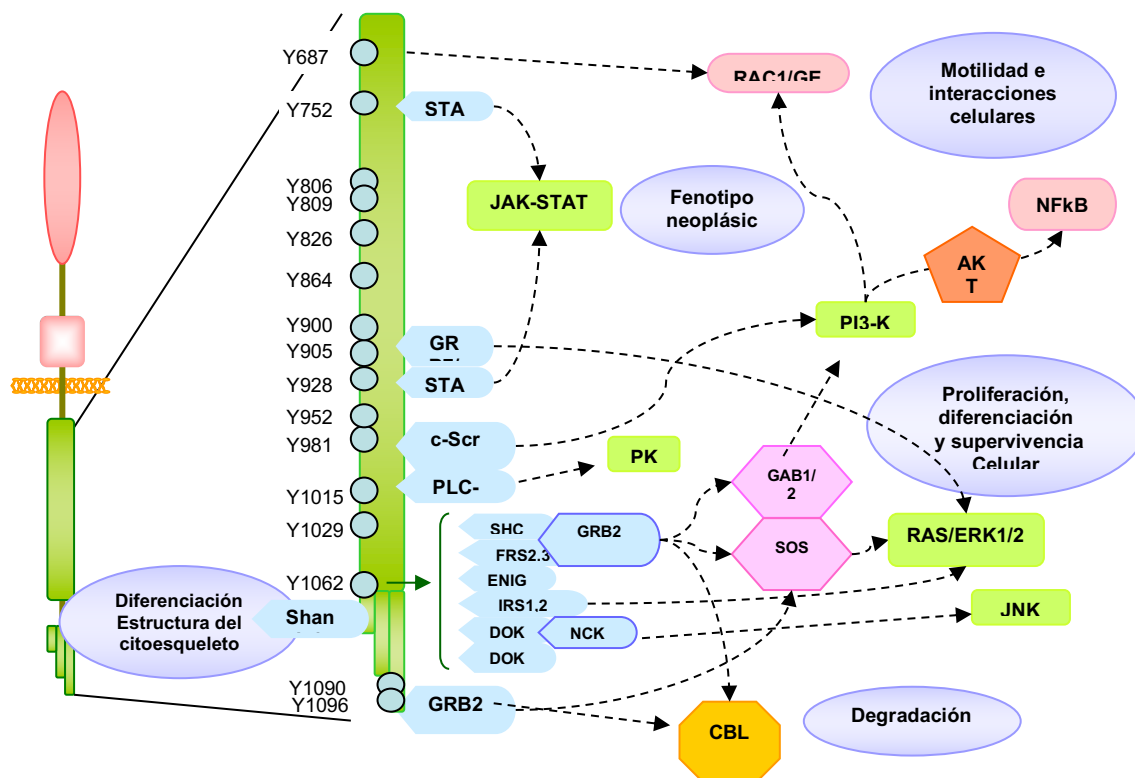


Figura 4. Dominio tirosín-quinasa de RET: tirosinas susceptibles de fosforilación, unión de moléculas adaptadoras y rutas de señalización celular.

El rastreo molecular de *RET* en distintas series de pacientes HSCR ha permitido identificar más de 100 mutaciones asociadas a este fenotipo. Estas mutaciones están distribuidas por todo el gen e incluyen grandes deleciones, microdeleciones, inserciones y mutaciones puntuales con cambio de sentido, sin sentido o que afectan al proceso de maduración de ARN mensajero (ARNm). (Edery y cols., 1994; Romeo y cols., 1994; Ruiz-Ferrer y cols., 2006; Núñez-Torres y cols., 2011; The Human Gene Mutation Database: <http://www.hgmd.org/>). No obstante, la variación en el número de copias (CNVs) de *RET* no es una causa molecular frecuente de la enfermedad de Hirschsprung (Núñez-Torres y cols., 2009). A diferencia de MEN2, donde las mutaciones se concentran preferentemente en una región, las mutaciones en *RET* identificadas en HSCR se localizan a lo largo de todo el gen. Estudios bioquímicos han demostrado distintas consecuencias funcionales: las mutaciones que afectan a la secuencia codificante del dominio extracelular de RET, tienen como resultado un fallo en el plegamiento y transporte de la proteína hasta la membrana plasmática; las mutaciones que afectan al dominio rico en cisteína de RET tienen como resultado la dimerización covalente de la proteína y una reducción de la localización de RET en la membrana plasmática; las mutaciones que afectan al dominio tirosin-quinasa de RET provocan la pérdida o la alteración de la actividad catalítica del receptor y las mutaciones que se encuentran en el extremo C-terminal alteran sitios de unión de proteínas adaptadoras y, por tanto, afectan a la señalización mediada por RET (Kashuk y cols., 2005). Mientras que las mutaciones identificadas en MEN2 han demostrado tratarse de mutaciones activadoras que provocan la dimerización constitutiva del receptor y su transformación, la haploinsuficiencia es el mecanismo más probable para las mutaciones descritas en HSCR (Santoro y cols., 1995; Pasini y cols., 1995).

A pesar de los exhaustivos análisis, las mutaciones en la secuencia codificante de *RET* representan únicamente hasta el 50% de los casos familiares y entre el 7 y el 20% de los casos esporádicos (Amiel y cols., 2008). No obstante, la implicación de *RET* en la etiopatogenia de HSCR ha estado respaldada principalmente por la existencia de un haplotipo específico, constituido por variantes comunes de *RET*, el cual parece desempeñar un papel fundamental en la mayoría de las formas esporádicas. El punto de partida para la identificación de este haplotipo fue el hallazgo por parte de nuestro grupo de una familia en la que segregaban tanto HSCR como MEN2 y que portaba la mutación germinal C620S de *RET*. En esta familia, la expresión del fenotipo HSCR parecía producirse únicamente en presencia de la mutación C620S junto con el polimorfismo A45A (c.135G>A, rs1800858, exón 2) en homocigosis (Borrego y cols., 1998; Fernández y cols., 2003), lo cual llevó a analizar en mayor profundidad esta variante común, junto con otros 6 polimorfismos, en una serie de pacientes HSCR esporádicos y en un grupo de controles sanos (Borrego y cols., 1999). Como resultado, se detectó una sobrerrepresentación de los polimorfismos de *RET* A45A y L769L (c.2307T>G, rs1800861, exón 13) en pacientes HSCR en comparación con individuos control. Estos hallazgos fueron confirmados de manera independiente en otras series de pacientes HSCR de diferentes orígenes geográficos. Se sugirió la posibilidad de que los polimorfismos A45A y L769L pudieran actuar como alelos de baja penetrancia y/o factores modificadores de la expresión del fenotipo, o incluso de que se encontrasen en desequilibrio de ligamiento (LD) con una variante funcional desconocida (Borrego y cols., 1999). Además, el análisis de los haplotipos formados por la combinación de 7 SNPs en la secuencia codificante de *RET* corroboraron los resultados que obtuvimos previamente (Borrego y cols., 2000). Dado que ningún ensayo funcional confirmó la hipótesis de un efecto directo de A45A/L769L en la etiopatogenia de HSCR, la existencia de un locus funcional en desequilibrio de ligamiento (LD) con ambas variantes adquirió relevancia. De este modo, identificamos 3 nuevos SNPs en el extremo 3' del intrón 1 de *RET*, asociados de manera significativa a HSCR y en desequilibrio de ligamiento con A45A/L769L (Borrego y cols., 2003a). Estos resultados sugerían la existencia de un locus fundador de baja penetrancia que proporcionaba susceptibilidad a HSCR, ubicado en dirección 5' de estos marcadores y a una distancia alrededor de las 20-30 kb del polimorfismo A45A. Por ello se continuó con el rastreo mutacional sistemático a lo largo del intrón 1, exón 1 y el promotor de *RET*, revelándose un haplotipo específico, asociado de forma clara al fenotipo HSCR (Fernández y cols., 2005; García-Barceló y cols., 2005). El desequilibrio de ligamiento de las variantes analizadas se mantuvo a lo largo de toda la región examinada hasta la posición -1249. El haplotipo ancestral asociado con HSCR se caracterizaba por la presencia de dos SNPs específicos ubicados en las posiciones -5 y -1 desde el punto de inicio de la transcripción (-5 A>G, rs10900296 y -1 C>A, rs10900297). Mediante ensayos con luciferasa se demostró que el haplotipo asociado a HSCR (AC) disminuye la actividad del promotor de *RET* (Fernández y cols., 2005). Análisis funcionales posteriores demostraron que estos dos SNPs del promotor de *RET* asociados con HSCR estaban localizados en el sitio de unión para el factor de transcripción NKX2.1 (anteriormente, TTF-1) (García-Barceló y cols., 2005). El haplotipo AC reduce la afinidad de unión de TTF-1, y esto se traduce en una disminución de la actividad del promotor de *RET*. No obstante, se demostró que este efecto dependía de la línea celular utilizada para el estudio y, por lo tanto, resulta difícil concluir si ambas variantes son realmente las causantes. Otro aspecto que dificulta la interpretación es el hecho de que estas dos variantes se encuentren en una región con un fuerte desequilibrio de ligamiento, que podría ocultar las variantes funcionales reales.

En base a estos hallazgos, se realizó un estudio para refinar la región de *RET* en asociación con la enfermedad, integrando los resultados con un análisis genómico funcional comparativo para identificar los elementos conservados y funcionales. Se logró identificar un dominio conservado con potencial función reguladora de la transcripción (“*enhancer-like*”) situado entre las kilobases 9 y 10 del intrón 1. Dentro de este dominio, uno de los SNPs de *RET* asociado a HSCR (c.73+9277C>T, rs2435357) ha mostrado ser un factor de susceptibilidad genético con una contribución a la aparición de HSCR 20 veces mayor que las mutaciones codificantes de *RET*. Nuevos estudios apoyaron esta idea con ensayos de luciferasa y demostramos que la región MCS+9.7, que contiene la variante asociada con la enfermedad (alelo T), redujo la actividad del promotor al compararla con la secuencia silvestre (alelo C). Otros estudios funcionales posteriores demostraron que la variante T interrumpe el punto de unión de SOX10 dentro de MCS+9.7, comprometiendo la transactivación de *RET* (Emison y cols., 2005; 2010). Curiosamente, la frecuencia del alelo T asociado a enfermedad varía en función de la prevalencia de HSCR en varios grupos étnicos. El alelo T tiene una frecuencia en controles entre el 20% y el 30% y una frecuencia en afectados entre el 54% y el 62% en población europea y una frecuencia en controles del 47% y una frecuencia en afectados del 88% en la población china. La alta frecuencia del alelo T en la población control resalta, según se especula en el modelo oligogénico, el papel clave de *RET* en la susceptibilidad a HSCR a pesar de su baja penetrancia. La penetrancia del alelo T en HSCR depende de la dosis, mayor en hombres que en mujeres y también mayor en pacientes con mutaciones codificantes en *RET* poco frecuentes (Emison y cols., 2010; Núñez-Torres y cols., 2011). Recientemente, un SNP situado cerca del rs2435357 y en completo desequilibrio de ligamiento con él (c.73+9494A>C, rs2506004) ha sido identificado como punto de unión para NXF/ARNT2 y SIM2-ARNT2 y modifica la expresión de *RET*, demostrando que puede existir mas de un evento de este tipo que esté influyendo en la expresión de genes y en última instancia en la aparición del fenotipo HSCR (Sribudiani y cols., 2011). En resumen, la combinación de variantes comunes, como las localizadas en los dominios “*enhance-like*”, y variantes poco frecuentes, como las mutaciones en secuencia codificante de *RET*, contribuyen al riesgo de aparición de HSCR y parece explicar parcialmente la complejidad de la enfermedad. Además, hay un efecto de sexo que afecta tanto a la transmisión como a la distribución de mutaciones causantes de HSCR, tanto comunes como codificantes raras. De este modo, observamos un origen parental asimétrico para las mutaciones en las secuencias codificantes de *RET* con una mayor herencia materna debido a una tasa reproductiva diferencial entre portadores masculinos y femeninos (Jannot y cols., 2012). Por otro lado, también cabe destacar que los dos SNPs G691S (c.2071G>A, rs1799939, exón 11) y S904S (c.2712C>G, rs1800863, exón 15), los cuales no están vinculados al mencionado «haplotipo de riesgo», se encuentran sub-representados en los pacientes HSCR vs controles (Borrego y cols., 1999). Finalmente, se ha observado una sub-representación de la variante S836S (c.2439 C>T, rs1800862, exón 14) en una serie de familias italianas con HSCR, lo cual sugiere un efecto protector de esta variante ante la enfermedad. Se consiguieron evidencias genéticas sobre el papel protector en la patogénesis de HSCR que desempeña el haplotipo de *RET* que contiene esta variante. Sin embargo, con posterioridad se demostró que el efecto protector de este haplotipo provenía de una variante localizada en la región 3’ de *RET* (c*587T>C, rs3026785), la cual ralentiza el deterioro fisiológico del ARNm de los transcritos del gen (Griseri y cols., 2002; 2007). No obstante, este fenómeno parece estar limitado a la población italiana, ya que no se encontró ninguna

distribución diferente de estas variantes que resultase significativa en otras series de pacientes (Borrego y cols., 1999; 2000; 2003a; Fernández y cols., 2009a).

Ligandos de la familia GDNF y sus co-receptores

La importancia de la ruta de señalización del RET durante el desarrollo del SNE y el papel fundamental que desempeña este receptor en la patogénesis de HSCR sugieren que los genes que codifican para sus ligandos y co-receptores podrían ser excelentes candidatos como genes implicados en la aparición de la enfermedad. Con respecto a los genes que codifican para los co-receptores (*GFR1-4*), no se han identificado mutaciones en pacientes con HSCR, excepto en una familia en la que nuestro grupo identificó una gran deleción en *GFR1* (OMIM *601496) (Borrego y cols., 2003b; Sánchez-Mejías y cols., 2010a). Sin embargo, con respecto a los genes que codifican para los ligandos, mediante diferentes rastreos mutacionales realizados en pacientes HSCR se han identificado varias mutaciones germinales en heterocigosis dentro de la secuencia de *GDNF* (OMIM *600837) aunque, a menudo, en combinación con mutaciones en *RET* u otras alteraciones genéticas (Ruiz-Ferrer y cols., 2011a), lo cual indica que tales mutaciones podrían no ser necesarias o suficientes para originar el fenotipo. Análisis posteriores sobre la función de las mutaciones localizadas en *GDNF* demostraron que no se producía ningún efecto en la fosforilación de RET, incluso en los casos en los que se observó una reducción en la afinidad de unión a $GFR\alpha 1$. Teniendo en cuenta estos hallazgos, estas mutaciones podrían considerarse cambios genéticos con un efecto modulador que podrían contribuir al desarrollo de la enfermedad a través de la interacción con otros locus de susceptibilidad.

Por otra parte, han sido descritas por nuestro grupo tres mutaciones en *NRTN* (OMIM *602018), una en *ARTN* (OMIM *603886) y otra en *PSPN* (OMIM *602921) (Ruiz-Ferrer y cols., 2011a). Realizamos estudios funcionales *in vitro* de estas mutaciones que revelaron una disminución del nivel de secreción del péptido procesado correctamente para la variante R91C en *PSPN* y una menor activación de RET por una reducción significativa de la autofosforilación también para esta variante y la variante F127L en *NRTN*, poniendo de manifiesto la implicación de ambos genes en la aparición del fenotipo HSCR. Sin embargo, las variantes encontradas en los genes de los ligandos de RET se comportan normalmente con penetrancia incompleta, dado que también las portan miembros sanos de las familias. Esto encajaría completamente con el modelo aditivo de herencia propuesto para HSCR, en el cual la expresión de la enfermedad parece depender de la contribución de diferentes combinaciones de genes actuando de un modo aditivo o multiplicativo. Según este modelo, estas variantes genéticas podrían modular la penetrancia de las mutaciones localizadas en otros genes, o bien modificar la expresión de la enfermedad en los individuos afectados. Estas variantes pueden contribuir al fenotipo final actuando en combinación con eventos mutacionales adicionales en otros genes, como la variante del dominio “enhancer-like” del intrón 1 de *RET*, ya que la mayoría de los pacientes han heredado estas variantes de diferentes progenitores. Probablemente ninguna de estas mutaciones provoque la aparición de HSCR de forma independiente, pero la coincidencia de ambos episodios mutacionales en el mismo paciente podría contribuir a la aparición del fenotipo.

Ruta de señalización de las Endotelinas

Una segunda ruta de señalización involucrada en HSCR es la del receptor de la endotelina tipo B (EDNRB). EDNRB y EDNRA son receptores de membrana unidos a proteína G que se encargan de la transducción de señales a través de las endotelinas (EDN1, 2, 3). Las endotelinas se sintetizan como proteínas de mayor tamaño, y son fragmentadas por dos metaloproteasas ligadas a membrana, las enzimas convertidoras de endotelina (ECE1, 2), para producir un péptido activo. En intestinos de embriones de ratón *Ednrb* se expresa en las células migratorias derivadas de la cresta neural, mientras que *Edn3* se expresa principalmente en el intestino medio y en el tejido mesenquimal del intestino posterior durante las primeras fases de migración de las células entéricas derivadas de la cresta neural, así como a altos niveles en el ciego y el colon proximal cuando las células entéricas derivadas de la cresta neural colonizan la región terminal de los intestinos (Barlow y cols., 2003). Este patrón de expresión sugiere que, con respecto a la señalización de GDNF-RET, la señalización de EDN3-EDNRB juega un papel importante en la migración de las células entéricas derivadas de la cresta neural. También se sugiere que EDN3-EDNRB intervienen en la proliferación de las células, ya que ratones con mutaciones en *Edn3* cuentan con menor número de células progenitoras en la cresta neural que el ratón *wt*. Además, la diferenciación celular es inhibida por la señalización de EDN3-EDNRB. De forma conjunta, estos estudios han demostrado que la señalización de EDN3-EDNRB resulta importante para la migración y proliferación de las células entéricas derivadas de la cresta neural, así como para mantenerlas en el mismo estado de diferenciación durante el desarrollo del SNE. Además, ratones *Edn3*^{-/-}, *EdnrB*^{-/-} y *Ece1*^{-/-} presentaban aganglionosis y alteraciones de pigmentación (Hosoda y cols., 1994; Baynash y cols., 1994; Yanagisawa y cols., 1998), similares a las alteraciones fenotípicas detectadas en pacientes con el síndrome de Waardenburg-Shah (SW4), un trastorno congénito que se caracteriza por pérdida auditiva y alteraciones de pigmentación debido a la proliferación, supervivencia, migración o diferenciación anómalas de los melanocitos de la cresta neural en combinación con HSCR.

El papel crítico que desempeña la ruta de señalización de la endotelina en HSCR se demostró a partir de estudios de asociación realizados en una comunidad Menonita. La existencia de múltiples casos de HSCR aislados y SW4 en la comunidad facilitó el mapeo del segundo gen principal de susceptibilidad para HSCR en la región cromosómica 13q22, y se identificó una mutación en *EDNRB* (OMIM *131244) (W276C, c.828G>T) (Puffenberger y cols., 1994a). No obstante, esta mutación no resultó ser ni completamente dominante ni completamente recesiva. La mutación W276C en homocigosis (CC) presentaba mayor penetrancia que en heterocigosis (WC), y esta penetrancia era sexo dependiente. Los individuos homocigotos (CC) mostraban características de SW4, mientras que los heterocigotos (WC) mostraban características de HSCR aislado. Además, algunos miembros de la familia sin mutaciones W279C eran afectados, lo cual implica la presencia de otros genes de predisposición en este grupo estrechamente relacionado. Posteriormente, el rastreo de mutaciones en *EDNRB* realizado en pacientes con HSCR aislado y WS4 revelaron que las mutaciones de *EDNRB* en homocigosis estaban asociadas con WS4 (Attie y cols., 1995; Hofstra y cols., 1996), mientras que las mutaciones en heterocigosis se asociaban con HSCR aislado (Sánchez-Mejías y cols., 2010b). Análisis funcionales de las mutaciones de *EDNRB* mostraron una incorrecta activación de la señalización intracelular [118, 123, 124]. En conjunto, las mutaciones identificadas en *EDNRB* representan sólo el 5% del fenotipo HSCR aislado

Los pacientes HSCR también fueron analizados para la detección de mutaciones en *EDN3* (OMIM *131242) y *ECE-1* (OMIM *600423). Únicamente se identificó una mutación en heterocigosis en *ECE-1* en un paciente que presentaba HSCR en combinación con anomalías craneofaciales y cardíacas (R742C, c.2224C>T) (Hofstra y cols., 1999). Se han descrito pocas mutaciones en *EDN3* y, de manera excepcional, se ha observado un comportamiento genético similar a las mutaciones de *EDNRB*. A este respecto, la asociación de mutaciones en homocigosis con SW4 y en heterocigosis con HSCR aislado puede indicar que los melanocitos y los ganglios entéricos difieren en la susceptibilidad a diferentes niveles de señalización de *EDNRB* (McCallion y Chakravarti, 2001). *EDN3* se considera un raro gen asociado a susceptibilidad a HSCR, ya que existe un número limitado de pacientes con mutaciones puntuales en este gen, en especial en las formas aisladas. Por otra parte, la evaluación de *EDN3* como gen asociado a susceptibilidad a HSCR empleando polimorfismos nos reveló la asociación de un SNP (rs6064764) con la enfermedad. Los resultados obtenidos nos han sugerido que este gen puede considerarse más un gen de susceptibilidad a HSCR esporádico con una baja penetrancia, que un gen poco relevante para la enfermedad, tal y como se le había considerado hasta ahora (Sánchez-Mejías y cols., 2010b).

Ruta de señalización de NTF-3/TRKC

El gen *Neurotrofina 3* (*NTF-3*, OMIM *162660) codifica para una proteína de 257 aminoácidos miembro de una familia altamente conservada de factores neurotróficos que son sintetizados como precursores y mediante digestión enzimática se convierten en las proteínas maduras homodiméricas que comparten al menos un 50% de identidad de secuencia. La vía de transducción de señales de las neurotrofinas se inicia con la unión al dominio extracelular del receptor tirosin- kinasa TRK. La unión de las neurotrofinas lleva a la activación de los receptores TRK mediante dimerización, dando como resultado la autofosforilación de los residuos de tirosina intracelulares. Esto desencadena los pasos posteriores de la cascada de transducción de señales que participan en la supervivencia o diferenciación celular, entre otras funciones neuronales (Arevalo y Wu, 2006). Cada receptor TRK tiene preferencia por una neurotrofina, aunque a veces puede producirse reactividad cruzada. A este respecto, se ha demostrado que las concentraciones fisiológicas de NTF-3 no activan la TRKA ni TRKB cuando estos receptores son coexpresados en las células derivadas de la cresta neural. Por consiguiente, parece que las señales mediadas por NTF-3 en las neuronas se transmiten específicamente por la TRKC.

Varios estudios realizados en ratones han demostrado que NTF-3 es secretado por células mesenquimales no derivadas de la cresta, favoreciendo el desarrollo y/o supervivencia de las neuronas y glía de las células entéricas derivadas de la cresta neural que expresan el receptor TrkC (Chalazonitis y cols., 1994; Chalazonitis, 2004). Además, se ha demostrado que hay una pérdida neuronal en los plexos mientérico y submucoso en aquellos ratones que carecían de NTF-3 o de su receptor TrkC y una hiperplasia selectiva en el plexo mientérico en ratones que sobre-expresaban NTF-3. Por otra parte, el análisis de la localización de las neurotrofinas y sus receptores en intestino humano postnatal, tanto de individuos sanos como de pacientes HSCR, reveló la ausencia de NTF-3 en el colon agangliónico y una presencia reducida en el segmento transitorio (Hoehner y cols., 1996). Por todo ello, la necesidad de la vía de señalización NTF-3/TrkC para el correcto desarrollo del SNE junto con las pruebas presentadas en los

modelos murinos, nos llevaron al estudio de la posible implicación de NTF-3 y TRKC en la enfermedad de Hirschsprung.

Así, nuestro grupo ha realizado el rastreo mutacional de los genes *NTF-3* y *NTRK3* (también conocido como *TRKC*, OMIM *191316) (Ruiz-Ferrer y cols., 2008; Fernández y cols., 2009b). Los hallazgos más relevantes fueron la identificación de una nueva variante en la secuencia de *NTF-3*, G76R (c.226G>A), presente en 2 pacientes no relacionados entre si y una variante nueva dentro del dominio tirosin-kinasa de *NTRK3*, R645C (c.1933 C>T), en una familia con dos hermanos afectos portadores también de una mutación en *RET*. En este sentido, parece que las mutaciones de *RET* y de *NTRK3* actúan juntas, resultando necesarias y suficientes para la aparición de la enfermedad. Curiosamente, la detección de una nueva mutación de *EDN3* en el paciente con aganglionosis que se extiende al íleo, y no en su hermano afecto con fenotipo menos severo, sugiere que el gen *EDN3* actúa como factor modificador del fenotipo en esta familia en particular, y que la acumulación de variantes de los genes con predisposición a HSCR tiene un mayor impacto en la expresión de la enfermedad (Sánchez-Mejías y cols., 2009). Por lo tanto, estos resultados determinan la importancia de la vía de señalización de NTF-3/NTRK3 en los trastornos del SNE y respalda el modelo aditivo de herencia compleja propuesto previamente para la enfermedad de HSCR.

Ruta de señalización de las Prokineticinas

Las prokineticinas (PROK1 y PROK2) pertenecen a la recientemente identificada familia proteica AVIT, una familia de proteínas secretadas ricas en cisteína, que comparten una secuencia amino terminal idéntica, crucial para el desempeño de sus funciones biológicas. Estas proteínas se unen y activan dos receptores de membrana unidos a proteínas G estrechamente relacionados, PROKR1 y PROKR2, dando lugar a la movilización intracelular de calcio, la estimulación del recambio de fosoinositol 3-kinasa y la activación de la vía de señalización de la proteína quinasa MAPK p44/p42. Las prokineticinas fueron identificadas por primera vez en el tracto gastrointestinal como potentes agentes que actuaban como mediadores de las contracciones de los músculos lisos. No obstante, estas también actúan como factores de supervivencia en células endoteliales, neuronas, linfocitos y células madre hematopoyéticas. La expresión de *PROKR1* se había demostrado previamente en las células entéricas derivadas de la cresta neural en ratones, mientras que se vio que Prok-1 trabajaba de forma coordinada con GDNF en el desarrollo del SNE (Ngan y cols., 2007). En primer lugar, GDNF y Prok-1 comparten elementos comunes, principalmente las vías de señalización MAPK y Akt, las cuales proporcionan múltiples puntos de inserción entre estos dos factores y los hacen manifestar funciones biológicas similares. Además, GDNF potencia los efectos de proliferación y diferenciación de Prok-1 mediante el aumento de la expresión de PROKR1 en las células entéricas derivadas de la cresta neural (Ngan y cols., 2008). Esta redundancia funcional de la señalización de PROKR1/Prok-1 y RET/GFRa1/GDNF respalda la idea de que Prok-1/PROKR1 proporcionan una vía compensatoria para garantizar el desarrollo adecuado del SNE.

Recientemente, nuestro grupo empleando cultivos de neuroesferas obtenidos a partir de células humanas derivadas del SNE, ha demostrado que no solo PROKR1 se encontraba presente en precursores neurales y neuronales, sino también el receptor PROKR2 (Ruiz-Ferrer y cols., 2011b). Los resultados obtenidos sugieren que PROKR2 desempeñaría un papel importante mediante la inhibición de la apoptosis en los precursores neurales entéricos, tal y como había sido descrito previamente en las

células de neuroblastoma derivadas de la cresta neural. Por lo tanto, PROKR2 podría mediar en la protección neuronal o en la supervivencia, no solo en el sistema nervioso central, sino también durante el desarrollo del SNE. Según esto, y basándonos en la etiopatogenia de la enfermedad, *PROKR1* (OMIM *607122), *PROK1* (OMIM *606233), *PROKR2* (OMIM *607123) y *PROK2* (OMIM *607002) fueron evaluados como genes de susceptibilidad para HSCR (Ruiz-Ferrer y cols., 2001b). Detectamos diversas variantes en los genes *PROKR1*, *PROK1* y *PROKR2*, la mayoría de las cuales afectaban a residuos aminoacídicos altamente conservados y localizados en dominios funcionales de ambos receptores, lo cual sugiere un posible efecto deletéreo en su función biológica. Curiosamente, se ha observado que la presencia de variantes en la secuencia de estos genes en pacientes HSCR se asocia frecuentemente a mutaciones en *RET* o *GDNF*, lo cual contribuye a la manifestación de los fenotipos más severos. En resumen, estos resultados aportan las primeras pruebas para que se les considere genes de susceptibilidad para HSCR.

Ruta de señalización de las Neurregulinas

NRG1 (OMIM *142445) fue identificado como un nuevo gen candidato para HSCR mediante estudios de GWAS (Garcia-Barcelo y cols., 2009). *NRG1* es un factor trófico que contiene un dominio similar al del factor de crecimiento epidérmico (EGF) que actúa mediante la estimulación del receptor tirosin-kinasa ErbB. La mayoría de las isoformas de *NRG1* son sintetizadas como precursores anclados a membrana plasmática denominados pro-*NRG1*s, que posteriormente tras rotura enzimática se liberan al medio extracelular, en el cual pueden actuar activando las vías mediadas por ErbB. La señal que desencadena la unión de las proteínas NRG con sus receptores ErbB afecta a algunos procesos celulares como la proliferación, la diferenciación, la migración, la apoptosis y la supervivencia celular. Se ha descrito que los receptores de *NRG1*, ErbB2/ErbB3, se expresan tanto en las células vagales de la cresta neural que invaden el intestino en desarrollo en embriones de ratón, como en el epitelio intestinal adulto de humanos y ratones (Britsch, 2007). Además, *NRG1* también se expresa en la mucosa intestinal y en los ganglios entéricos de humanos y ratones. Para definir con mayor precisión el locus ligado a la enfermedad en 8p12, se llevó a cabo tanto en pacientes HSCR como en controles un extenso genotipado de SNPs (Tang y cols., 2011). El posterior análisis restringió la región asociada a HSCR a seis SNPs que mapeaban en el promotor de *NRG1*. Además, se detectaron diferencias significativas en los niveles de expresión de *NRG1* entre pacientes e individuos control portadores del mismo genotipo de riesgo rs10088313, lo cual parece indicar que resulta probable que los efectos de las variantes comunes de *NRG1* dependan de otros alelos o factores epigenéticos presentes en pacientes y darían lugar, entre otros factores, a la variabilidad en la predisposición genética a HSCR. Finalmente, la implicación de *NRG1* en HSCR también ha sido demostrada a través de la identificación de mutaciones codificantes cuyo papel patogénico fue demostrado mediante diversos enfoques funcionales realizados por nuestro grupo entre otros (Tang y cols., 2012a; Luzón-Toro y cols., 2012).

Por otro lado, con la información obtenida mediante GWAS, también se evaluó la contribución de las variaciones en el número de copias (CNV) en HSCR, permitiendo la identificación de un gran número de variaciones génicas poco habituales exclusivas de los pacientes. Cabe destacar la detección de una delección que afecta al gen *NRG3* (OMIM *605533), parálogo de *NRG1*. Este hecho dio lugar a un seguimiento posterior de *NRG3*, lo cual reveló la existencia tanto de delecciones como de duplicaciones dentro

del gen asociadas a HSCR. La clasificación de los pacientes según presencia/ausencia de síndromes asociados a HSCR demostró que, mientras que los pacientes con HSCR síndromico presentaban CNVs significativamente mayores que los pacientes con HSCR aislado o los individuos control, el número de CNVs en los pacientes no síndromicos era mayor en comparación con los controles o los pacientes síndromicos. Estos resultados sugieren un papel para *NRG3* en la etiología de HSCR y proporciona datos de la contribución relativa de las variantes estructurales tanto en HSCR síndromico como no síndromico (Tang y cols., 2012b).

Ruta de señalización de las Semaforinas

Mediante otro estudio de GWAS, se identificaron un grupo importante de SNPs en una región del cromosoma 7 significativamente asociados a HSCR con un efecto alélico independiente de *RET*, localizados entre las proteínas SEMA3D (7q21.11; OMIM 609907) y SEMA3A (7p12.1; OMIM 603961), SEMA3E (7q21.11; OMIM 608166) y SEMA3C (7q21-q31; OMIM 602645). En este estudio se analizó el significado de los SNPs de SEMA en tríos S-HSCR (padre, madre, hijo), y se definió con mayor precisión su localización. Los cuatro miembros de la familia SEMA presentaban patrones de expresión espacio-temporal muy similares a lo largo del intestino y co-expresaban con *RET*, respaldando la posibilidad de que uno o todos pudieran modificar la función de *RET* en el desarrollo del SNE. Recientemente, la tecnología NGS ha permitido la detección de diversas mutaciones en los genes de SEMA, involucrados posiblemente en HSCR (Jiang y cols., 2012).

Diversos estudios han sugerido la implicación de los miembros de la familia *SEMA* en defectos del desarrollo de las células entéricas derivadas de la cresta neural como la proliferación, la migración y/o la diferenciación, siendo posible causante de la aparición de HSCR (Anderson y cols., 2007). A pesar de que los precursores del SNE derivados de las células de la cresta neural expresen al receptor neuropilina1 (NP1), aún resulta necesario comprobar si SEMA3A actúa en la migración: tanto por efecto directo de los precursores del SNE, o bien por acción indirecta sobre los axones extrínsecos que acompañan a las células durante la colonización del intestino y que son repelidos en caso de presencia de SEMA3A en los segmentos exteriores del tejido mesenquimal intestinal. Recientemente, se ha propuesto que un aumento de la expresión de *SEMA3A* puede ser un factor de riesgo para HSCR en un subconjunto de pacientes con la enfermedad, debido a una sobre-regulación de la capa agangliónica del músculo liso del colon (Wang y cols., 2011). Además, en un trabajo realizado dentro del Consorcio Internacional de HSCR (ICHSCR) ha sido validada la asociación entre dos polimorfismos de *SEMA3A* (rs7804122 y rs797821) y el riesgo a la aparición de HSCR en una población del noroeste de China, previamente demostrada en la población caucásica. Posteriormente, nuestro grupo realizó una evaluación exhaustiva de los genes *SEMA3A* y *SEMA3B* en el contexto de la enfermedad. Como resultado se identificaron una serie de nuevas variantes para las que se demostró funcionalmente su efecto patogénico, confirmando por consiguiente la asociación de estos genes con HSCR. Es más, en un alto número de casos, las mutaciones de estos genes aparecían en pacientes que también portaban mutaciones en *RET*, apoyando una vez más el modelo aditivo propuesto para HSCR (Luzón-Toro y cols., 2013).

Por último, también el seno del ICHSCR se han analizado ratones *wt* para *Ret* y ratones *Ret*^{-/-} y se demostró la expresión específica de Sema 3a, 3c y 3d en SNE. También se observó que 7 receptores candidatos de las proteínas Sema3 se expresaban

en SNE de ratón, perdiéndose la expresión de estos en los embriones que no expresan Ret. Por otra parte, embriones de pez cebra que no expresaban Sema3 mostraron reducción de precursores migratorios del SNE. Dado que con estos ensayos se demostraba la implicación de las semaforinas de clase 3 en el desarrollo del SNE, se realizó la secuenciación de SEMA3A, SEMA3C y SEMA3D en 254 pacientes HSCR con el fin de encontrar variantes en estos genes que pudiesen explicar la aparición del fenotipo. Posteriormente se realizó el análisis in silico de modelación de estructura de la proteína y el análisis funcional, en el que se identificaron 5 alelos asociados a la enfermedad cuya pérdida de función afectaba en la dimerización de semaforina y a la unión a sus receptores neuropilina y plexina. Por lo tanto, la vía de señalización de semaforina 3C/3D es un regulador evolutivamente conservado del desarrollo del SNE, cuya disregulación parece ser una de las causas de la aganglioneosis entérica (Jiang y cols., 2015).

Otros genes asociados a HSCR

SOX10

SOX10 (OMIM *602229) es un gen que codifica para una proteína perteneciente a la familia de factores de transcripción SOX, caracterizada por la presencia de un dominio central HMG (Hight mobility group) de unión al ADN y un dominio C-terminal de transactivación. De forma similar a todos los miembros de esta familia, SOX10 ejerce su función mediante la unión a los promotores o activadores de sus genes diana, tanto solos como junto con otros factores de transcripción. SOX10 es un factor de transcripción clave durante los procesos de migración y diferenciación de las células de la cresta neural, y se conoce que los genes *MITF*, *TYR*, *TRP2*, *MPZ*, *GJB1*, *RET* y *EDNRB* son genes diana para la regulación de SOX10 (Bondurand y cols., 2000; Lang y Epstein, 2003; Ludwig y cols., 2004; Zhu y cols., 2004). SOX10 se expresa tanto en las células de la cresta neural en migración, como en ganglios craneales y espinales. Su expresión está relacionada con el mantenimiento de la pluripotencialidad de las células de la cresta neural a bajas concentraciones, y con la inhibición de la diferenciación neuronal a dosis elevadas, favoreciendo la generación de la glia periférica y de los melanoblastos.

La importancia de SOX10 en HSCR fue descubierta mediante el análisis de un modelo de ratón para síndrome de Waardenburg tipo 4 (SW4) en humanos (*megacolon dominante*, *Dom*) (Lane y Liu, 1984). El defecto molecular de los ratones Dom era una mutación del gen *SOX10* (Pingault y cols., 1997; Southard-Smith y cols., 1999). Ratones Dom heterocigotos presentan aganglioneosis del colon distal e hipomelanosis cutánea y capilar localizada (características similares a las del SW), lo cual indica que los melanocitos derivados de la cresta neural y las neuronas entéricas se veían afectadas por las mutaciones de *SOX10*. Sin embargo, los embriones de ratones Dom homocigotos eran letales.

Se ha descrito que en el 45-55% de los pacientes SW4 el fenotipo es debido a mutaciones puntuales de *SOX10*, así como a delecciones de gran tamaño (Pingault y cols., 1998; Touraine y cols., 2000). Según esto, en un principio no se sospechaba que HSCR no sindrómico estuviera asociado a mutaciones en este locus en particular. No obstante, en el intestino agangliónico de los pacientes con HSCR aislado se podía observar la expresión anómala de *SOX10* (Chan y cols., 2003), lo que sugería su

implicación en HSCR. Recientemente, hemos llevado a cabo un estudio en una serie de 196 pacientes con HSCR, la cual constituye la mayor serie de pacientes evaluados hasta la fecha (Sánchez-Mejías y cols., 2010c). Detectamos una mutación truncante de *SOX10* en un paciente con HSCR aislado sin ningún síndrome adicional. Esta es la primera vez que se describe una mutación de *SOX10* en un paciente con HSCR aislado, poniendo de manifiesto la asociación de este gen con la patogénesis de HSCR *per se*, y no únicamente como parte de un rasgo sindrómico.

En un estudio posterior presentamos dos pacientes con SW4 con mutaciones en *SOX10*. Una de las familias SW4 porta una inserción de 19 nucleótidos en el exón 5, que se traduce en fenotipos distintos a lo largo de tres generaciones diferentes: hipopigmentación en la abuela materna, pérdida de audición en la madre, y SW4 en el hijo. El mosaicismo no sería la explicación para distintas características dentro del fenotipo SW observadas en esta familia, por ello proponemos la existencia de acontecimientos moleculares adicionales que actuarían de manera aditiva o multiplicativa en genes o regiones reguladoras no identificadas hasta el momento. En el otro paciente SW4 se identificó una delección de novo en el exón 5 del gen. Nuestros resultados evidencian la necesidad de aunar esfuerzos para desentrañar los mecanismos subyacentes implicados en la variabilidad fenotípica intrafamiliar observada en las familias afectadas, con el objetivo de identificar nuevos genes responsables de los casos aún no resueltos de SW4 (Fernández y cols., 2014).

Por último, los patrones de expresión de algunos enhancers conocidos de *SOX10* en modelos animales nos permitieron especular que algunos endofenotipos de WS4 podrían estar ligados a mutaciones en estas secuencias. Nuestro estudio investigó las delecciones y mutaciones puntuales en cuatro enhancers de *SOX10* en pacientes con HSCR esporádico sin causa genética descrita. Se identificaron una delección y dos mutaciones puntuales que afectaban a lugares de unión de factores de transcripción relacionados con la cresta neural. Los análisis funcionales *in vitro* revelaron que la primera mutación altera la autorregulación por *SOX10* mientras que la segunda afecta a la actividad sinérgica de *AP2a* y *SOX10*. Los presentes descubrimientos sugieren que las mutaciones en los enhancers de *SOX10* contribuyen al desarrollo de HSCR esporádico (Lecerf y cols., 2014).

PHOX2B

PHOX2B (OMIM *603851) codifica un factor de transcripción que se expresa en SNC y SNP durante el desarrollo embrionario y en los ganglios entéricos en fase adulta. En el modelo murino, la expresión de *Phox2b* comienza tan pronto como los enteroblastos invaden el tejido mesenquimal del intestino proximal y se mantiene durante su desarrollo hasta formar las neuronas entéricas, de modo que alteraciones en homocigosis de *Phox2b* en ratones lleva a la ausencia de ganglios entéricos (Pattyn y cols., 1999). Además, no existe expresión de Ret en los embriones mutantes de *Phox2b*, indicando que la regulación de Ret mediante *Phox2b* podría ser el motivo por el cual no se produce el desarrollo del SNE. La homología de *PHOX2B* que se observa en humanos y ratones, así como las pruebas convincentes sobre su función, clave en el desarrollo de las células derivadas de la cresta neural, lo han convertido en un objetivo atractivo para el estudio como un gen potencialmente involucrado en las neurocristopatías humanas. En este sentido, se conoce bien el importante papel que desempeña el gen en la patogénesis del síndrome de hipoventilación central congénita (CCHS, síndrome de Ondine), un trastorno poco habitual que se asocia normalmente

con varias neurocristopatías como los neuroblastomas, los ganglioneuromas y, sobre todo, con la enfermedad de Hirschsprung (20% de los casos, síndrome de Haddad). Esto sugiere que la haploinsuficiencia de *PHOX2B* puede predisponer a la aparición del fenotipo HSCR. Se ha visto que el polimorfismo c.429+100A>G está asociado a HSCR y que la interacción entre *PHOX2B* y los SNPs de *RET* asociados a HSCR aumenta la susceptibilidad a la aparición de la enfermedad (García-Barceló y cols., 2003; Miao y cols., 2007). El análisis de *PHOX2B* por parte de nuestro grupo permitió identificar mutaciones en este gen en pacientes HSCR sin CCHS o neuroblastoma, lo que ofrece una nueva perspectiva de la implicación de este gen en la etiopatogenia de la enfermedad. (Fernández y cols., 2013a)

DNMT3B

DNMT3B (OMIM *602900) codifica para la *de novo* metiltransferasa 3B, una proteína con un dominio N-terminal que posee la actividad reguladora y de unión al ADN, así como un dominio rico en cisteína, y un dominio C-terminal catalítico conservado a lo largo de los miembros de la familia. DNMT3B junto con DNMT3A son las encargadas de establecer los patrones de metilación *de novo* del ADN durante el desarrollo embrionario (Cheng y Blumenthal, 2008). Aunque DNMT3A y DNMT3B presentan funciones comunes, sus patrones de expresión y las dianas sobre las que actúan son diferentes durante el desarrollo. Dnmt3a se expresa ampliamente en diferentes tejidos y se mantiene en los últimos estadios embrionarios e incluso en ratones adultos, mientras que Dnmt3b se expresa a niveles muy bajos en la mayoría de los tejidos, exceptuando algunos tipos celulares específicos, siendo su expresión más temprana durante el desarrollo (Okano et al., 1999). La inactivación conjunta de Dnmt3a y Dnmt3b es letal en ratón, dando lugar a la muerte del embrión en los estadios iniciales, lo que pone de manifiesto la importancia que tiene la metilación *de novo* en el desarrollo de los mamíferos. Sin embargo, la inactivación de estos genes por separado, tiene efectos diferentes. El ratón Dnmt3a^{-/-} muere varias semanas tras su nacimiento, y los ratones Dnmt3b^{-/-} presentan defectos a nivel del tubo neural y deterioro en el crecimiento, lo que sugiere que dichas proteínas son esenciales durante el desarrollo. Por tanto, DNMT3B juega un papel importante en la diferenciación de células progenitoras durante estadios embrionarios, y DNMT3A es esencial para los procesos de maduración. En humanos, mutaciones en DNMT3B son responsables del Síndrome de inmunodeficiencia, inestabilidad de la región centromérica y anomalías faciales (ICF, OMIM 242860).

Nuestro grupo ha realizado recientemente un análisis global del perfil de expresión de genes de pluripotencia, observándose una disminución de los niveles de expresión de DNMT3B en los precursores entéricos aislados de intestino de pacientes HSCR comparado con los casos control (Torroglosa y cols., 2014). La bajada de expresión de DNMT3B observada se tradujo a una hipometilación del DNA extraído de dichos precursores de pacientes HSCR. Por otra parte, el rastreo mutacional del gen *DNMT3B* en nuestra cohorte de pacientes HSCR reveló la presencia de mutaciones potencialmente patogénicas en dicho gen (p.Gly25Arg, p.Arg190Cys y p.Gly198Trp) y un efecto sinérgico junto con mutaciones en otros genes anteriormente implicados en dicha patología, contribuyendo a la aparición del fenotipo más severo de HSCR. En resumen, podemos concluir que DNMT3B parece estar regulando el desarrollo del sistema nervioso entérico (SNE) a través de la metilación *de novo* del DNA de las

células de la cresta neural, y por tanto patrones de metilación aberrantes causarían la aparición de dicha patología.

PAX6

PAX6 (OMIM *607108) codifica para un factor de transcripción altamente conservado que pertenece a la familia de los “paired-box”, con un papel importante en el desarrollo del ojo, sistema nervioso central (SNC) y páncreas. En concreto, se ha visto que *PAX6* es un regulador de la proliferación y diferenciación de los precursores neurales durante los estadios iniciales del desarrollo del SNC (Jang y Goldman, 2011).

En nuestro grupo se ha llevado a cabo un estudio de expresión diferencial de una serie de factores de transcripción que potencialmente podrían participar en la regulación de los procesos celulares de los precursores entéricos, en el contexto del desarrollo del SNE y de la enfermedad de HSCR. En dicho estudio se ha identificado una bajada de la expresión de *PAX6* en los precursores entéricos procedentes de intestino de pacientes HSCR frente a controles. Profundizando en el estudio de los mecanismos por los que la expresión de dicho gen está disminuida en HSCR, por una parte se ha identificado una región altamente repetitiva en el promotor de *PAX6* que muestra una evidente representación de un número mayor de repeticiones en los pacientes HSCR lo que se tradujo a una pérdida de señal para la transcripción mediada por EP300. Por otro lado, se ha demostrado que *PAX6* es un gen diana de DNMT3B, por lo que su expresión estaría regulada por su estado de metilación. Teniendo en cuenta todos estos hallazgos podemos decir que la bajada de expresión de *PAX6* podría influir en la correcta puesta en marcha de las vías de señalización requeridas para el correcto desarrollo del SNE y por tanto en la aparición de la enfermedad de HSCR (Enguix-Riego y cols., enviado a publicar)

Otros loci de susceptibilidad para HSCR

Se han llevado a cabo diversos estudios de ligamiento genómico en familias HSCR con el objetivo de identificar otros loci de susceptibilidad para HSCR. En primer lugar, se realizó un análisis de ligamiento de 12 familias con tres o más individuos afectados en dos o más generaciones, en las cuales predominase la variedad L-HSCR. De este modo, se identificó un nuevo locus de susceptibilidad en la región cromosómica 9q31 que, en conjunción con *RET*, podría actuar como locus modificador para el desarrollo de HSCR. Recientemente, el mapeo detallado de este locus reveló una asociación con el gen *SVEP1*. Sin embargo, este resultado no se pudo confirmar en 107 pacientes independientes procedentes de los Países Bajos. No obstante, en una cohorte de pacientes HSCR de población china se detectó una asociación con el gen *IKBKAP*, confirmada en otra población diferente y sugiriendo que la asociación con el cromosoma 9 era específica de cada población (Bolk y cols., 2000; Tang y cols., 2010). En otro estudio, Gabriel y cols. realizaron un análisis de asociación genómica en 49 familias con S-HSCR, demostrando la existencia de tres loci de susceptibilidad localizados en 10q11, donde se localiza *RET*, 19q12 y 3p21 (Gabriel y cols., 2002). Para validar estos datos, se realizó un rastreo mutacional de *RET* en estas familias. Sorprendentemente, sólo se identificaron mutaciones en la secuencia codificante de *RET* en el 40% de las familias, lo que sugiere la importancia de las variantes en secuencia no codificante. Por lo tanto, los tres loci resultaban necesarios y posiblemente suficientes para el desarrollo de S-HSCR. Por tanto, el mejor modelo genético que se propuso fue

el de un efecto multiplicativo con la mayoría de los individuos afectos heterocigotos para los tres loci.

Se identificó un cuarto locus tras realizar otro estudio similar de genómica en 43 trios de grandes familias Menonitas (Carrasquillo y cols., 2002). Resultaron asociados a HSCR tres loci, dos de los cuales eran ya conocidos: 10q11.21, donde se localiza el gen *RET* y 13q22.3-q31.1, que contiene el gen *EDNRB*, previamente descrito como factor de susceptibilidad de la enfermedad en estas familias (Puffenberger y cols., 1994b). El nuevo locus identificado fue localizado en 16q23.3 y los autores sugirieron la existencia en esta región de dos genes candidatos a estar involucrados en el desarrollo del SNE (*CDH13* y *PLCG2*). No obstante, hasta la fecha no se ha publicado ningún estudio de asociación entre estos genes y HSCR. Posteriormente, se realizó un análisis de ligamiento mediante genotipado de 4244 SNPs en 35 familias Menonitas con HSCR (Lin y cols., 2004). Los loci 10q11 y 13q22 aparecieron de nuevo asociados con la enfermedad, pero se identificó por primera vez el locus 21q21, donde se localiza el gen *NCAM2* (“*neural cell adhesion molecules 2*”), considerándose una región interesante dada la asociación entre HSCR y el síndrome de Down. Finalmente, durante el estudio de una larga familia multigeneracional holandesa con fenotipo HSCR aislado, se identificó un nuevo locus de susceptibilidad en 4q31-32 (Brooks y cols., 2006). La baja penetrancia del locus en la familia sugiere que la mutación resulta necesaria, pero no suficiente para el desarrollo de la enfermedad.

Por otra parte, también se realizó un estudio piloto utilizando un array CGH diseñado para detectar CNVs en 18 pacientes HSCR. Empleando criterios estrictos, fue posible identificar CNVs en tres nuevos loci (*MAPK10*, *ZFHX1B*, *SOX2*), los cuales contienen secuencias regulatorias y codificantes de genes de desarrollo neuronal y muestran una asociación con HSCR en combinación con otras anomalías congénitas. Este tipo de estudios vuelve a sugerir el papel de los CNVs en HSCR y hace hincapié en el papel que desempeñan las variaciones en las secuencias reguladoras. No obstante, resulta necesario realizar estudios más amplios tanto para replicar estos resultados como para identificar del espectro completo de los efectos de los pequeños CNVs (Jiang y cols., 2011).

Actualmente, la identificación de nuevos genes de susceptibilidad para HSCR se realiza según diversos enfoques como el estudio de asociación de genoma completo (GWAS), el estudio de expresión de genoma completo (GWES) y sobre todo la secuenciación de nueva generación (NGS).

Asociación de genoma completo (GWAS)

Nuestro grupo llevó a cabo un análisis de pathways (Pathway-Based analysis, PBA) sobre los resultados de un GWAS realizado en el contexto de una serie española de 53 trios HSCR. Este análisis reveló una fuerte asociación a HSCR de 11 módulos Gene Ontology (GO), relacionados fundamentalmente con la transducción de señales y su regulación y la formación del sistema nervioso entérico. Entre los genes preseleccionados siguiendo esta estrategia, se consiguió validar la asociación de cuatro de ellos a la enfermedad, relacionados todos con procesos de migración y transducción de señales: *RASGEF1A*, *IQGAP2*, *DLC1* y *CHRNA7*. Mediante network analysis (NA) se observó que estos cuatro genes están relacionados de forma directa o indirecta con genes descritos previamente como asociados a HSCR, y mediante estudios inmunohistoquímicos demostramos que todos ellos se expresan en SNE, por lo que son

excelentes genes candidatos para ser estudiados en profundidad en el contexto de HSCR. (Fernández y cols, 2012a)

Basándonos en el trabajo anterior, realizamos una extensión del análisis de GOs aplicado a una cohorte internacional de trios HSCR aportados por el ICHSCR, con el fin de validar la base funcional de los mecanismos previamente descritos para la enfermedad. Procedimos a comparar los perfiles funcionales de asociación en los grupos de pacientes de diferentes países. Observamos que mientras que las asociaciones génicas diferían en cada serie, las principales asociaciones funcionales eran idénticas en las cuatro poblaciones (España, Italia, Francia y Holanda). Estos hallazgos podrían explicar la baja reproductibilidad de las asociaciones de genes con la enfermedad que se han observado en los estudios de diferentes poblaciones. (Fernández y cols., 2013b).

Secuenciación de nueva generación (NGS)

Los últimos estudios realizados para la búsqueda de nuevos genes asociados a HSCR han sido realizados por nuestro grupo y se basan en la aplicación de esta tecnología (Luzón-Toro, *en prensa a*). Se ha secuenciado el exoma completo en 8 familias con 16 pacientes HSCR (2 pacientes cada una de ellas) y 32 familiares sanos. En primer lugar analizamos la co-segregación de variantes con el fenotipo según cada árbol familiar y se observó segregación completa de distintas variantes en 3 de estas familias. De todas estas variantes, priorizamos las que aparecían en heterocigosis compuesta para el gen *AHNAK*, así como las que se ajustaban a un modelo de herencia dominante en los genes *DYPD* y *CNTN5*, debido a su papel en neurodesarrollo. A continuación analizamos si había algún gen que contribuyese a la aparición de la enfermedad, común en todas estas familias mediante análisis de asociación de variantes raras en genes que estuviesen mutados en al menos dos familias. *FAT3* fue el único gen que mostró una asociación significativa con el fenotipo HSCR, encontrándose en 5 familias 6 variantes diferentes. Estas variantes no las compartían necesariamente los individuos afectados de una misma familia por lo que mediante análisis de interacción proteína-proteína y rutas biológicas se examinó la existencia de variantes en otros genes que pudiesen explicar la segregación incompleta de *FAT3*. Esta aproximación nos llevó a detectar variantes de forma conjunta en los genes *PLAU* y *FBNI*; *CREBBP* y *TSC2*; *NTF3*, *IRAK3* y *KDR*; *GFRA1*, *ZHX2* y *TPCNI*, respectivamente, que siguiendo un modo de herencia poligénico podrían contribuir a la aparición del fenotipo en estas 5 familias.

Estos resultados proporcionados por nuestro estudio muestran un notable grado de heterogeneidad génica tanto inter- como intrafamiliar. Uno de los criterios necesarios para la priorización de genes fue la aparición de variantes compartidas por los individuos afectados de una misma familia y, sin embargo, esto no siempre fue posible debido a la heterogeneidad encontrada dentro de cada familia. Por tanto, ha sido necesario encontrar variantes en genes diferentes para poder explicar las diferencias entre pacientes de una misma familia. Además, nuestros hallazgos de nuevo muestran que los genes asociados a HSCR suelen presentar mutaciones con penetrancia incompleta y variaciones interfamiliares. En conclusión, nuestros resultados han llevado a la identificación de varios genes nuevos que podrían jugar un papel en la aparición de HSCR o el desarrollo del sistema nervioso entérico, aunque la complejidad de los casos familiares de HSCR revelada por este estudio resalta las dificultades actuales para el consejo genético en esta enfermedad.

Por otra parte, la aplicación de NGS dirigida a regiones genómicas de interés en el contexto de HSCR (como son los genes ya descritos como asociados a la enfermedad) permite acelerar el laborioso proceso de búsqueda de mutaciones responsables de la aparición del fenotipo en cada paciente (Luzón-Toro, *en prensa b*). Al ser posible analizar la secuencia de varios genes en un paciente al mismo tiempo, se reducen notablemente los costes y el tiempo de obtención de resultados. En este sentido, nuestro grupo ha diseñado y validado un panel de genes asociados a HSCR, como una rápida y eficiente herramienta para realizar un cribado genético preliminar en pacientes. Para ello, se realizó el diseño de sondas para captura selectiva basado en la información genómica de los exones y regiones intrónicas de interés para 26 genes conocidos como asociados a HSCR, o candidatos por función. En el estudio de validación del panel se incluyó un grupo de 11 pacientes HSCR seleccionados del total de nuestra cohorte por presentar variantes en distintos genes asociados a la enfermedad, identificadas previamente mediante secuenciación Sanger. Además de las variantes previamente identificadas en estos pacientes se han encontrado un total de 3 nuevas variantes codificantes, lo que demuestra el potencial del panel. Como conclusión, nuestro panel validado para NGS constituye un método óptimo para la identificación de nuevas variantes de genes seleccionados, pudiendo ser usado para un rápido, fiable y más profundo cribado genético en futuros pacientes, y pudiendo ser actualizado con la incorporación de los nuevos genes que se vayan describiendo para la enfermedad.

HSCR sindrómico

Aproximadamente el 30% de los casos HSCR se presenta de forma sindrómica, incluyendo los casos con alguna anomalía cromosómica (12%) y los asociados a anomalías congénitas (18%) como malformaciones gastrointestinales, paladar hendido, polidactilia, defectos del septo cardíaco o anomalías craneofaciales entre otras (Spouge y Baird, 1985). El hecho de que se haya detectado un mayor número de anomalías asociadas en los casos familiares que en los aislados (39% frente a 21%) respalda la herencia mendeliana para los casos sindrómicos (Amiel y cols., 2008).

Anomalías cromosómicas

En los pacientes con HSCR se han detectado un gran número de anomalías cromosómicas diferentes. Varios de estos reordenamientos cromosómicos hallados permitieron identificar algunos de los genes de predisposición a HSCR descritos hasta la fecha. Tal es el caso de la delección intersticial 10q11.2 observada en varios pacientes con L-HSCR o TCA, cuyo hallazgo condujo al mapeo e identificación del proto-oncogén *RET* como el gen más importante relacionado con HSCR (Martucciello y cols., 1992; Fewtrell y cols., 1994). La identificación de la delección intersticial 13q22.1-32.1 en pacientes con S-HSCR dio lugar al mapeo del segundo gen relacionado con HSCR (*EDNRB*) (Lamont y cols., 1989). El síndrome de microdelección intersticial 2q22-23 en pacientes con síndrome de anomalías congénitas múltiples y retraso mental (MCA-MR) junto con HSCR o estreñimiento crónico agudo, denominado posteriormente síndrome de Mowat-Wilson (Mowat y cols., 1998), hizo posible la identificación de los genes *ZFHX1B* y *SIP1* (Wakamatsu y cols., 2001).

En al menos una ocasión se han observado las siguientes anomalías cromosómicas junto a HSCR: síndrome de DiGeorge, trisomía 8 en mosaico, trisomía 2 en mosaico, dotación cromosómica XXY, duplicación parcial del cromosoma 2q, tetrasomía 9p,

deleción 20p, triplicación de 4q32.1-q32.2 o translocación equilibrada t(3;17)(p12;q11) (Amiel y cols., 2008; Borrego y cols., 2013a). Se ha descrito un paciente que presentaba S-HSCR, trastorno del crecimiento postnatal, retraso de desarrollo leve, dismorfia facial y deleción 4p12 que incluye el gen *PHOX2B* (Benaïly y cols., 2003). Además, recientemente hemos descrito el caso de un paciente con encefalopatía neonatal severa y HSCR que presentaba una duplicación Xq28 incluyendo al gen *LICAM*, presumiblemente responsable del fenotipo entérico (Fernández y cols., 2010).

No obstante, dentro del grupo de pacientes con HSCR sindrómico, el síndrome de Down (SD) debido a la presencia de una copia extra del cromosoma 21 (trisomía 21) resulta con gran diferencia la asociación más frecuente (90%), y afecta a entre el 2% y el 10% de los casos confirmados de HSCR (Amiel y cols., 2008; Borrego y cols., 2013a). En estos casos, tanto el desequilibrio entre la tasa de hombres y mujeres (5,5–10,5:1 hombres:mujeres) como el predominio de las formas de segmento corto resultan incluso mayores que en los casos HSCR aislados. Por otra parte, se conoce que la tasa de riesgo de HSCR en pacientes con SD es mayor que el riesgo que confiere cualquier otra mutación genética asociada a la enfermedad (Gabriel y cols., 2002). Se ha hipotetizado que esto podría deberse a la existencia de genes ubicados en el cromosoma 21 cuya sobreexpresión por efecto de la dosis extra de la tercera copia podría conferir predisposición a HSCR. Esta hipótesis fue apoyada por la identificación de un gen de susceptibilidad para la enfermedad en la región 21q22 en una familia Menonita (Puffenberger y cols., 1994b), aunque posteriormente no se pudo validar la asociación de este gen a la enfermedad (Carrasquillo y cols., 2002). Siguiendo la misma línea, un análisis de alta resolución reveló una región crítica <13 Mb que podría estar involucrada en HSCR como una característica particular de esta presentación sindrómica (Korbel y cols., 2009). Esta región contiene un gen candidato, *DSCAM*, que ya había sido propuesto anteriormente como candidato a HSCR por su expresión predominante en el desarrollo de la cresta neural intestinal, aunque aún se necesitan análisis que lo confirmen (Yamakawa y cols., 1998). Por otro lado, mientras que las mutaciones codificantes en *RET* se han detectado rara vez en pacientes con SD+HSCR, la variante común de *RET* que proporciona susceptibilidad a HSCR (*RET*+9.7T) se encuentra sobrerrepresentada en pacientes con SD+HSCR en comparación con pacientes con SD sin HSCR (de Pontual y cols., 2007). Propusimos la asociación e interacción entre *RET* y la dosis genética del cromosoma 21 debido a que la frecuencia del alelo *RET*+9.7T resulta significativamente diferente entre individuos que padecen únicamente SD, únicamente HSCR, o bien pacientes con ambas patologías SD+HSCR (Arnold y cols., 2009). Finalmente, aunque documentamos la presencia predominante de algunas variantes de *EDNRB* en pacientes con SD+HSCR frente a los que padecen únicamente HSCR, estos resultados no se han podido confirmar hasta ahora en otras poblaciones (Sánchez-Mejías y cols., 2010b).

Nuestro grupo en colaboración con el ICHSCR realizó un estudio de asociación dosis-dependiente en pacientes con SD+HSCR. Para ello llevamos a cabo un GWAS en el contexto de estos pacientes y sus padres, centrándonos en el análisis de 10.895 SNPs del cromosoma 21 por TDT (*Transmission Disequilibrium Test*), que nos permitió la identificación de dos SNPs claramente asociados a este fenotipo, ubicados en el gen *DSCAM*. El estudio fue replicado con posterioridad en una cohorte de pacientes con HSCR no sindrómico obteniéndose la misma asociación. Además mediante *network analysis* proporcionamos evidencias del papel de *DSCAM* en la patogénesis de la enfermedad. Nuestros resultados por tanto revelan la implicación del gen *DSCAM*, tanto en SD+HSCR como en HSCR aislado (Jannot y cols., 2013).

Síndromes y anomalías asociadas

Hasta la fecha, se han registrado una amplia variedad de síndromes asociados con HSCR. Algunas de estas asociaciones se encuentran bien caracterizadas, con una penetrancia de HSCR que oscila entre el 5% y más del 80% (Tabla 2). En otras ocasiones, en relación con los trastornos poco habituales, no se puede distinguir con claridad si HSCR está vinculado realmente con la existencia de la enfermedad o si, por el contrario, se ha desarrollado por casualidad.

Tabla 2: Síndromes asociados con HSCR

	Síndromes	MIM	Rasgos clínicos
Síndromes relacionados con alteraciones de la cresta neural	SW4 (Shah-Waardenburg)	277580	Anomalías pigmentarias (mechón blanco, hipoplasia de iris, hipopigmentación de piel)
	Hipopigmentación, sordera-ceguera yemenita	601706	Pérdida de audición, anomalías en ojo (microcórnea, coloboma, nistagmo), anomalías pigmentarias
	BADS	227010	Pérdida de audición, hipopigmentación de piel y retina
	Piebaldismo	172800	Hipopigmentación de la piel en parches
	Haddad	209880	Hipoventilación central congénita
	MEN2	171400	Cáncer medular de tiroides, feocromocitoma, hiperparatiroidismo
	Riley-Day	223900	Anomalías del sistema nervioso autónomo
Síndromes asociados siempre a HSCR	Goldberg-Shprintzen	235730	Retraso mental, polimicrogiria, microcefalia, coloboma, rasgos faciales dismórficos
	Hirschsprung con anomalías de las extremidades	235740	Polidactilia, agenesia renal unilateral, hipertelorismo, sordera
		235750	Polidactilia postaxial, defecto del septo ventricular
		235760	Hipoplasia de las falanges distales y uñas, rasgos dismórficos
		604211	Polidactilia preaxial, defectos cardíacos, anomalías de la laringe
		306980	Braquidactilia tipo D
	BRESHEK	-	Anomalías cerebrales, Retraso, displasia ectodérmica, malformaciones esqueléticas, Hirschsprung, anomalías de oído y ojo, displasia renal
Síndromes asociados a HSCR eventualmente	Mowat-Wilson	235730	Retraso mental, microcefalia, epilepsia, hipospadias, anomalías renales...
	Bardet-Biedl syndrome	209900	Retinopatía pigmentaria, obesidad, hipogenitalismo, retraso mental leve, polidactilia postaxial
	Kauffman-McKusick	236700	Hidrometrocolpos, polidactilia postaxial, defectos cardíacos congénitos
	Smith-Lemli-Opitz	270400	Retraso del crecimiento, microcefalia, retraso mental, hipospadias, sindactilia de 2-3 dedos de los pies
	Hipoplasia de cartilago y cabello	250250	Enanismo con acortamiento de extremidades, inmunodeficiencia displásica
Síndromes asociados a HSCR rara vez	HSAS/MASA	307000	Hidrocefalo, estenosis acueductal, pulgares aductos, retraso mental
	Distrofia muscular congénita de Fukuyama	253800	Distrofia muscular, polimicrogiria, hidrocefalo, retraso mental, convulsiones
	Clayton-Smith	258840	Rasgos dismórficos, dedos de los pies y uñas hipoplásicas, ictiosis
	Kaplan	304100	Agenesia de cuerpo calloso, pulgares aductos, ptosis, debilidad muscular
	Okamoto	308840	Hidrocefalo, paladar hendido, agenesia de cuerpo calloso
	Displasia mesomélica de Werner	188770	Hipoplasia de la tibia con polidactilia
	Pitt-Hopkins	610954	Encefalopatía epiléptica, rasgos faciales dismórficos, episodios de hiperventilación, disautonomía
	Jeune	208500	Constricción severa de la caja torácica, estatura corta, acortamiento de extremidades y polidactilia
Síndromes asociados a HSCR rara vez	Pierre Robin	261800	Glosptosis, micrognatia y paladar hendido

Asociaciones misceláneas	Pallister-Hall (CAVE)	146510	Hamartoma hipotalámico, disfunción pituitaria, polidactilia central y malformaciones viscerales
	Fryns	229850	Hernia diafragmática, cara anormal y anomalías de las extremidades distales
	Aarskog	100050	Estatura baja, hipertelorismo, y escroto en chal
	Displasia frontonasal	136760	Hipertelorismo ocular verdadero, ensanchamiento de la raíz nasal, paladar hendido
	Osteopetrosis	Various	Macrocefalia, sordera y ceguera progresivas, hepatoesplenomegalia, y anemia severa
	Goldenhar	164210	Anomalías craneofaciales, y eventualmente defectos cardiacos, vertebrales, y del sistema nervioso central
	Lesch-Nyhan	300322	Retraso mental, parálisis cerebral espástica, coreoatetosis, cálculos de ácido úrico
	Rubinstein-Taybi	180849	Pulgares anchos y dedos de los pies grandes, facies característica y retraso mental
	Toriello-Carey	217980	Agenesia del cuerpo calloso con anomalías faciales y secuencia robin
	SEMDJL	271640	Anomalías vertebrales y laxitud de ligamentos resultando en muerte temprana
	OSCS	300373	Osteopatía estriada con esclerosis craneal

Adaptado de Scriver CM et al. The metabolic and molecular bases of inherited diseases. 8th ed. McGraw-Hill, pp 6231-55. Updated from Amiel et al., 2008

Neurocristopatías

El término neurocristopatía fue acuñado por Bolande en 1974 y se utiliza para describir una serie de patologías que derivan de un defecto en los procesos de proliferación, diferenciación y/o migración de la células de la cresta neural durante la embriogénesis (Bolande, 1974). Las células de la cresta neural dan lugar a múltiples líneas celulares, entre ellas los melanocitos, el cartílago y hueso craneofacial, el músculo liso, el sistema nervioso entérico y periférico y la glía. A continuación se describen algunas neurocristopatías importantes asociadas a HSCR.

Síndrome de Neoplasia Endocrina Múltiple tipo 2

El síndrome de neoplasia endocrina múltiple tipo 2 (*Multiple Endocrine Neoplasia type 2*, MEN2) es un síndrome canceroso con modo de herencia autosómica dominante que se caracteriza por una penetrancia extremadamente alta y por manifestaciones clínicas variables. Dicho síndrome se puede dividir en tres subtipos clínicos en función de los órganos afectados: MEN 2A (MIM 171400), MEN 2B (MIM 162300) y cáncer medular de tiroides familiar (*Familial Medullary Thyroid Cancer*, FMTC; MIM 155240). MEN 2A se caracteriza por la triada clásica de MTC, feocromocitoma en aproximadamente el 50% de los casos e hiperparatiroidismo (HPT) en el 15 al 30% de los casos (Eng, 1999). Las características de MEN 2B son similares a las de MEN 2A con las diferencias de que la edad media en la que se manifiestan los tumores es más temprana (alrededor de 10 años antes), no hay afectación de las glándulas paratiroides y va acompañado de anomalías del desarrollo, como la ganglioneuromatosis y el hábito marfanoide. Por último, el subtipo FMTC se caracteriza por cáncer medular de tiroides como único fenotipo de la enfermedad. Los tres subtipos de MEN 2 se producen debido a mutaciones activadoras en línea germinal del protooncogén *RET*, que codifica para el

receptor de membrana tirosín-kinasa RET. Esas mutaciones conducen a una ganancia de función del receptor, y por tanto a una mayor activación de las rutas metabólicas dependientes del mismo (Sánchez y cols., 1998; Sánchez y cols., 1999).

En ocasiones se ha descrito la co-segregación de MEN 2 con la enfermedad de Hirschsprung. Hasta la fecha se han identificado alrededor de 20 familias afectadas por MEN 2 y HSCR (Ito y cols., 1997; Borrego y cols., 1998; Fernández y cols., 2003) y en la mayoría de los casos ambos fenotipos se han asociado a mutaciones en los codones 609, 618 y 620 del gen *RET*. La coexistencia de los dos fenotipos causados por la misma mutación se podría explicar por medio de un mecanismo patogénico doble. En este sentido, los resultados de los estudios funcionales sugieren que las mutaciones en los codones 609, 618 y 620 aumentan la actividad transformadora de RET, aunque de igual forma interfieren en el transporte del receptor hacia la membrana plasmática. De este modo, la mayor activación de las rutas metabólicas dependientes de RET conduciría a la aparición de MEN 2, mientras que la expresión disminuida del receptor de membrana en la superficie celular daría lugar a la haploinsuficiencia y a HSCR. Aunque la posible explicación del doble efecto de estas mutaciones de *RET* era bastante satisfactoria, nuestro grupo puso en tela de juicio esta hipótesis cuando observamos que la mutación de *RET* p.Cys620Ser (C620S) era la desencadenante de MEN 2, pero no la responsable de HSCR, en una familia en la que cosegregaban ambos fenotipos (Fernández y cols., 2003). No obstante, a raíz de esto surgió la cuestión de si todos los individuos con HSCR, independientemente de si tienen antecedentes familiares o no, deben realizarse un análisis para detectar las mutaciones en el gen *RET*, especialmente en los exones 10 y 11, para poder descartar una predisposición a MEN 2.

Neuroblastoma

El neuroblastoma (NB, MIM 256700), un tumor embrionario derivado de las células de la cresta neural, es considerado uno de los tumores sólidos más comunes en niños, con una incidencia de 1/10 000. Existen varias evidencias que sostienen la implicación de factores genéticos en el neuroblastoma, como son la existencia de casos familiares raros, y la asociación del NB a otras malformaciones congénitas de base genética como HSCR y/o el Síndrome de Hipoventilación Central Congénita (CCHS). Curiosamente, en estos casos específicos de NB familiar y NB sindrómico se han identificado mutaciones en heterocigosis del gen *PHOX2B*, mientras que estas siguen siendo infrecuentes en el NB aislado y esporádico (Trochet y cols., 2004).

Síndrome de Hipoventilación Central Congénita

El Síndrome de Hipoventilación Central Congénita (*Congenital Central Hypoventilation Syndrome*, CCHS; MIM 209880) o enfermedad de Ondine es una enfermedad rara y potencialmente mortal que se manifiesta en recién nacidos en forma de (1) clara hipoventilación con respiración poco profunda y frecuencia respiratoria monótona, ya sea únicamente durante el sueño o también en vigilia; (2) disfunción del sistema nervioso autónomo (DSNA); y (3), en algunos individuos, neurocristopatías como HSCR y/o tumores derivados de la cresta neural, como neuroblastoma, ganglioneuroma o ganglioneuroblastoma. La asociación entre HSCR y CCHS, conocida también como síndrome de Haddad (MIM 209880), aparece en torno al 20% de los pacientes con CCHS (Haddad y cols., 1978; Verloes y cols., 1993). A diferencia de lo que ocurre en HSCR aislado, en la mayoría de los casos con síndrome de Haddad, la aganglioneosis del colon es de segmento largo o incluso total, y la proporción de

varones y mujeres es aproximadamente de 1:1. *PHOX2B* es el único gen identificado hasta la fecha del que se sabe con total seguridad que sus mutaciones producen CCHS. Los dos tipos de mutaciones de *PHOX2B* observadas en CCHS son: (1) expansiones de polialaninas ubicadas en el tercer exón codificante del gen (*PolyAlanine Repeat expansion Mutations*, PARMs), entre 24 y 33 repeticiones (Weese-Mayer y cols., 2003); y (2) mutaciones puntuales y mutaciones que generan alteración de la pauta de lectura, que suelen ser pequeñas delecciones o duplicaciones de aproximadamente entre 1 y 38 nucleótidos (*Non PolyAlanine Repeat expansion Mutations*, NPARMs) (Berry-Kravis y cols., 2006). Un dato a destacar es que los estudios genotipo-fenotipo han demostrado que las personas con PARMs ≥ 27 tienen un riesgo más elevado de padecer HSCR asociado a su cuadro de CCHS, y que la mayoría de personas con NPARMs padecen dicha enfermedad (Trochet y cols., 2005).

En la mayor parte de pacientes con CCHS, las mutaciones de *PHOX2B* responsables de su cuadro aparecen como eventos *de novo*. Sin embargo, los padres de los pacientes con CCHS demostrado a nivel molecular deben estudiarse y recibir asesoramiento genético, ya que aproximadamente el 10% de ellos presenta un mosaicismo a nivel germinal o somático, e incluso es posible que algunos de ellos puedan presentar CCHS de aparición tardía (Weese-Mayer y cols., 2003; Trochet y cols., 2005; Berry-Kravis y cols., 2006). Por último, se han reportado mutaciones en pacientes con CCHS ubicadas en genes distintos a *PHOX2B* como *RET*, *GDNF*, *EDN3*, *BDNF*, *HASH1*, *PHOX2A*, *GFR α 1*, *BMP2* o *ECE1*; sin embargo, su importancia y su implicación real en la enfermedad se desconoce. No obstante, sí que se ha comprobado que la variante *enhancer* del gen *RET* (*RET*+9.7T) puede considerarse un factor de riesgo para la aparición del fenotipo HSCR asociado a CCHS (de Pontual y cols., 2007).

Síndrome de Waardenburg y anomalías pigmentarias relacionadas

El síndrome de Waardenburg (MIM 193500, MIM 148820, MIM 193510) es una patología muy heterogénea tanto clínica como genéticamente, que se presenta con un patrón hereditario autosómico dominante (Waardenburg, 1951). Es con diferencia la enfermedad más frecuente que combina alteraciones pigmentarias con sordera neurosensorial (1/50 000 recién nacidos vivos y 2-5% del total de personas que padecen sordera congénita). La combinación de SW y HSCR conforma el SW tipo 4 (SW4) o síndrome de Shah-Waardenburg (MIM 277580). En los pacientes con SW4 se han identificado mutaciones puntuales en los genes *EDN3* y *EDNRB* en homocigosis (Puffenberger y cols., 1994a; Attie y cols., 1995; Hofstra y cols., 1996), o mutaciones puntuales del tipo de sustituciones o pequeñas delecciones en el gen *SOX10* en heterocigosis (Pingault y cols., 1998; Sánchez-Mejías y cols., 2010c; Bondurand y cols., 2007). Además, también se han detectado grandes delecciones que abarcan las secuencias reguladoras de la expresión del gen *SOX10* (Bondurand y cols., 2012). No obstante, para el 15-35% de los casos con SW4 no se ha identificado la causa molecular, lo que sugiere que podrían estar implicados otros genes aún no identificados, y/o que las mutaciones en los genes conocidos hayan pasado desapercibidas en screenings anteriores. Por otro lado, se ha analizado el papel de la variante *enhancer* de *RET* (*RET*+9.7T) en el contexto de pacientes con SW, y se ha llegado a la conclusión de que no se considera relevante para la manifestación del fenotipo HSCR en pacientes con SW4 (de Pontual y cols., 2007).

Los pacientes portadores de mutación patogénica en *SOX10* pueden también presentar una variante más grave del SW4 caracterizada por afectación del SNC en forma de convulsiones, ataxia y neuropatías desmielinizantes periféricas y centrales (*Peripheral demyelinating neuropathy, Central dysmyelinating leukodystrophy, Waardenburg syndrome, and Hirschsprung disease*, PCWH, OMIM 609136). Las mutaciones en *SOX10* también han sido consideradas como causantes de HSCR de forma aislada o de SW4 sin HSCR (Sánchez-Mejías y cols., 2010c). Por último también se han identificado mutaciones de *SOX10* en otro tipo de síndromes que asocian alteraciones pigmentarias y HSCR: (1) el Síndrome de hipopigmentación, sordera-ceguera yemenita (MIM 601706); (2) el síndrome BADS (MIM 227010); (3) megacolon agangliónico asociado a piebaldismo familiar (MIM 172800); (4) HSCR y sordera congénita profunda, aunque sin otras características del SW.

Otras neurocristopatías

Hoy día no se ha podido determinar aún el impacto real de otras asociaciones de HSCR con neurocristopatías más raras que se han reportado eventualmente (Amiel y cols., 2008; Borrego y cols., 2013a). Este es el caso del síndrome de disautonomía familiar (*Familial Dysautonomia Syndrome*, FDS) o síndrome de Riley-Day (MIM 223900), para el que sólo se ha reportado una vez su asociación con HSCR. Aunque la aparición de ambos fenotipos en el mismo individuo podría haber surgido por mera casualidad, resulta interesante destacar que FDS está ligado al locus 9q31, donde se ha mapeado un locus de susceptibilidad para HSCR (Bolk y cols., 2000). Otras asociaciones esporádicas que se han indicado hasta la fecha son el labio leporino con o sin paladar hendido, defectos del tubo neural como el mielomeningocele y la neurofibromatosis tipo 1.

Otras enfermedades que presentan HSCR como un signo relativamente frecuente

Síndrome de Mowat-Wilson

El síndrome de Mowat-Wilson (SMW, MIM 235730) es una patología que se presenta con microcefalia, epilepsia, rasgos faciales distintivos y retraso mental severo. El espectro de posibles anomalías asociadas es amplio y abarca, en orden de frecuencia descendiente, hipospadias, anomalías renales, anomalías cardíacas congénitas, agenesia/hipoplasia del cuerpo calloso y HSCR (Mowat y cols., 1998; Zweier y cols., 2005; de Pontual y cols., 2007). Se han descrito más de 100 mutaciones en el gen *ZFHX1B* en pacientes con clínica de SMW. Dichas mutaciones incluyen delecciones del gen completo o mutaciones truncantes (tipo nonsense o pequeñas delecciones) que conducen a la aparición de un codón de parada prematuro a nivel cDNA, sugiriendo que la haploinsuficiencia de este gen constituye la base molecular de MWS. A día de hoy no se ha encontrado una correlación clara entre genotipo y fenotipo, pero sí que se han reportado fenotipos atípicos con mutaciones missense o de splicing en *ZFHX1B* (Wakamatsu y cols., 2001; Amiel y cols., 2001; Dastot-Le Moal y cols., 2007).

El gen *ZFHX1B* codifica la proteína-1 de interacción SMAD1 (SMADIP1 o SIP1), un co-represor transcripcional que participa en la vía de señalización del TGFβ. Se trata de un gen altamente conservado evolutivamente, con una amplia expresión y con

funciones clave en el desarrollo embrionario temprano, como se ha manifestado en modelos animales. Por último, el análisis de la distribución de la mutación *enhancer* en el gen *RET* (*RET*+9.7T) en el contexto de pacientes con MWS no reveló ninguna asociación con la manifestación del fenotipo HSCR en estos pacientes (de Pontual y cols., 2007).

Síndrome de Goldberg-Shprintzen

El síndrome de Goldberg-Shprintzen (SGS, MIM 609460) se caracteriza por múltiples anomalías congénitas y presenta un modo de herencia autosómico recesivo. Se manifiesta con la aparición de HSCR, retraso mental moderado, microcefalia, polimicrogria, rasgos dismórficos (hipertelorismo, nariz prominente, sinofridia, cabello ralo, paladar hendido y coloboma del iris) (Goldberg y Shprintzen, 1981; Brooks y cols., 1999). *KIAA1279* es el único gen relacionado con esta enfermedad, el cual codifica para una proteína (KBP) cuya función se desconoce (Brooks y cols., 2005). Mediante estudios en modelos animales se ha observado que dicha proteína tiene un carácter regulador que es fundamental durante el desarrollo axonal y que los defectos del citoesqueleto axonal son la base de los defectos del sistema nervioso en este síndrome. Otra hipótesis que se ha propuesto es que la proteína KBP está implicada en el proceso de diferenciación neuronal y que probablemente los defectos del sistema nervioso central y entérico presentes en el SGS se produzcan como consecuencia de defectos relacionados con los microtúbulos.

El SGS se considera una enfermedad rara dentro del grupo de pacientes con retraso mental y HSCR.

HSCR con malformaciones de las extremidades

Se han descrito algunos síndromes raros en los que HSCR se asocia con malformaciones de las extremidades distales. Estos son los siguientes: (1) HSCR con polidactilia, agenesia renal unilateral, hipertelorismo y sordera congénita (MIM 235740); (2) HSCR, polidactilia postaxial y defectos del septo ventricular (MIM 235750); (3) HSCR, hipoplasia de las falanges distales y uñas y rasgos dismórficos leves (MIM 235760); (4) HSCR con polidactilia preaxial, defecto cardíaco y anomalías laríngeas (MIM 604211); (5) HSCR con braquidactilia tipo D (MIM 306980); (6) HSCR con braquidactilia, macrocefalia y anomalías vertebrales; (7) Síndrome de BRESHEK, recientemente descrito asociado a mutaciones en el gen *MBTPS2*; y (8) displasia mesomélica de Werner (Borrego y cols., 2013a).

Síndrome de Bardet-Biedl y síndrome de McKusick-Kauffman

El síndrome de Bardet-Biedl (SBB, MIM 209900) se caracteriza por retinosis pigmentaria, obesidad, hipogenitalismo, anomalías renales, retraso mental leve y polidactilia postaxial de manos y pies. Se han descrito al menos 16 loci relacionados con la enfermedad (*BBS1* - *BBS16*) y se han identificado 14 genes, la mayoría de ellos implicados en la función de cilios (Tobin JL, Beales, 2007). HSCR se ha asociado en varios casos a SBB. Además, se ha visto que la variante *enhancer* en el gen *RET* (*RET*+9.7T) puede ser considerada un factor de riesgo para la aparición de HSCR en SBB (de Pontual y cols., 2007). Asimismo, un estudio realizado a tres familias diferentes con SBB y HSCR ha indicado que las mutaciones responsables del primero

pueden potenciar el efecto de los alelos *RET* que confieren predisposición a HSCR, pero que no son suficientes por sí mismos para producir la enfermedad. Estos genes probablemente interactúan genéticamente *in vivo* para modular la innervación del intestino mediante vías complementarias, aunque independientes, que convergen en el mismo proceso biológico (de Pontual y cols., 2009).

El síndrome de McKusick-Kauffman (SMKK, MIM 236700) es una enfermedad rara que se caracteriza por hidrometrocolpos, polidactilia postaxial y defectos cardíacos congénitos, y HSCR en el 10% de los casos (Davenport y cols., 1989). Mutaciones en el gen *MKKS/BBS6* han sido descritas en algunos pacientes con SBB lo que confirma que en verdad el SMKK es una variante de SBB.

Por último, en varias ocasiones se ha asociado HSCR con el síndrome de Jeune, que también es considerada una ciliopatía (Aurora y Wallis, 1999).

Síndrome de Smith-Lemli-Opitz

El Síndrome de Smith-Lemli-Opitz (SLO, MIM 270400) se caracteriza por trastornos del crecimiento pre- y postnatal, microcefalia, retraso mental severo, anomalías faciales, hipospadias y sindactilia del 2º y 3º dedos de los pies. Este síndrome es debido a mutaciones en el gen 7-dehidrocolesterol reductasa (*7DHCR*, cromosoma 11q12-q13) (Wassif y cols., 1998). HSCR ha sido detectada en un número considerable de pacientes con SLO grave (Patterson y cols., 1983).

Síndrome de hipoplasia de cartílago y pelo

El síndrome de hipoplasia de cartílago y pelo (SHCP, MIM 250250), fue descrito por primera vez en la comunidad Amish, y en él se asocia la aparición de displasia metafisaria con enanismo de las extremidades, cabello fino, escaso y rubio, anemia macrocítica transitoria e inmunodeficiencia. HSCR se asocia a este síndrome en el 10% de los casos. El gen *RMRP*, responsable del mismo, se mapeó en el cromosoma 9p13 (Sulisalo y cols., 1993). Cabe señalar que se ha observado la asociación de HSCR al síndrome de Holmgren-Connor (MIM 211120), que se puede considerar una variante de SHCP.

Espectro HSAS/MASA

Entre los síndromes asociados a HSCR existen algunas presentaciones clínicas con anomalías del sistema nervioso central, incluido el espectro de HSAS (hidrocefalia por estenosis del acueducto de Silvio, MIM 307000) atribuido a mutaciones en el gen *LICAM* (Okamoto y cols., 2004). Dicho gen codifica para una molécula de adhesión celular neuronal con funciones esenciales en el desarrollo del sistema nervioso. Hasta la fecha se han detectado mutaciones patogénicas en el gen *LICAM* en al menos 11 pacientes que han manifestado una asociación de la hidrocefalia ligada al cromosoma X (*X-linked hydrocephalus*, XLH) o del síndrome acrosallosa y HSCR, uno de ellos presentado por nuestro grupo (Fernández y cols., 2012b). Se hipotetiza que en aquellos casos en los que XLH se presenta junto con HSCR, el gen *RET* o cualquier otro gen relacionado con HSCR contribuiría a la aganglioneurosis bajo la influencia de un *LICAM* defectuoso y dicho gen puede actuar como gen modificador para el desarrollo de HSCR (Parisi y cols., 2002). Estudios en modelos animales han demostrado que el

L1cam es necesario para la migración de las células de la cresta neural durante el desarrollo embrionario, aunque la pérdida por sí sola de dicho gen no es suficiente para producir aganglioneosis, lo que sugiere que L1cam actúa únicamente como un gen modificador. Por otra parte, se ha demostrado que la interacción entre los genes *L1cam* y *Sox10* altera de manera considerable la migración de la cresta neural en el intestino en desarrollo (Wallace y cols., 2010). Concretamente, parece ser que el gen *L1cam* actúa como gen modificador de *Sox10*, que es uno de los genes asociados a HSCR. Por último, también se ha demostrado que *L1cam* actúa como gen modificador de la vía de señalización de la ruta de las endotelinas durante el desarrollo del SNE (Wallace y cols., 2011), lo que constituye otra evidencia del papel de *L1CAM* en HSCR.

Otros síndromes que se han asociado eventualmente a HSCR

Otras asociaciones clínicas con HSCR incluyen síndromes con miopatía y síndromes con manifestaciones dermatológicas. Asociaciones más raras incluyen HSCR con el síndrome de Fryns, el síndrome de Arskog, el síndrome de Jeune o la distrofia torácica asfixiante, el síndrome de Joubert, la displasia frontonasal, la osteopetrosis, los síndromes de Goldenhar, de Lesch-Nyhan, de Rubinstein-Taybi, de Toriello-Carey y de Pallister-Hall, la displasia espondiloepifisaria con fragilidad ósea (DEMFO, MIM 271640), el síndrome de persistencia del conducto de Müller, asplenia con anomalías cardiovasculares y la osteopatía estriada con esclerosis craneal (OEEC) (Amiel y cols., 2008; Borrego y cols., 2013a).

Anomalías asociadas

Se han descrito junto con HSCR, un amplio espectro de anomalías aisladas adicionales, con una incidencia que varía del 5 al 30% según las series (Amiel y cols., 2008). No se ha observado ningún patrón constante y se incluyen anomalías en extremidades distales, neurosensoriales, en piel, sistema nervioso central, genitales o riñón, y malformaciones cardíacas. Se han detectado defectos cardíacos, principalmente defectos del septo ventricular y comunicación interauricular, en el 5% de los casos de HSCR, una vez excluidos los pacientes con trisomía 21. Asimismo, se han asociado malformaciones renales graves, como el tumor de Wilms y HSCR (Blatt y Nakayama, 2007). Displasia o agenesia renal han sido reportadas en casos de FMTC (Lore y cols., 2000), y en un 4,4% en una serie de 160 casos HSCR, aunque es posible que esta frecuencia esté subestimada. Este aspecto resulta interesante, ya que los ratones *knockout* para genes implicados en la vía de señalización de RET presentan signos de agenesia o displasia renal además de megacolon (Schuchardt y cols., 1994). Por otra parte, existen indicios de la asociación entre el síndrome de microdelección en el cromosoma 16p11.2 (*Congenital Anomalies of Kidney and Urinary tract*, CAKUT MIM 610805), caracterizado por anomalías congénitas del riñón y tracto urinario, y la enfermedad de Hirschsprung (Sampson y cols., 2010).

Anomalías genitales, incluyendo las hipospadias, están presentes hasta en el 2 o 3% de pacientes con HSCR. También se han observado malformaciones gastrointestinales, como el divertículo de Meckel, la estenosis pilórica, la arteria umbilical única, la hernia inguinal o la atresia del intestino delgado. Por último, también se han detectado con bastante frecuencia rasgos dismórficos faciales. Todo ello pone de relieve la importancia de una profunda evaluación clínica por parte de algún médico

debidamente formado en dismorfología en recién nacidos diagnosticados de HSCR. Sería necesario, por tanto, que se sometieran sistemáticamente a una radiografía del esqueleto, a una ecocardiografía y a una ecografía urológica. La detección de una anomalía adicional a HSCR debería dar lugar a estudios cromosómicos y/o a estudios de citogenética molecular.

Consejo genético

En HSCR el asesoramiento genético sigue siendo todo un reto debido a la base genética compleja de la enfermedad en una gran parte de los casos. A fecha de hoy, la imposibilidad de desentrañar completamente la intrincada red de eventos genéticos responsables de la aparición del fenotipo en la inmensa mayoría de los pacientes (especialmente aquellos con HSCR aislado, esporádico y de segmento corto), hace que no se puedan llevar a la práctica intervenciones terapéuticas en muchos de los casos. Básicamente, en el consejo genético se debe ser capaz de describir al menos los factores de riesgo hereditarios y adquiridos en las familias afectadas. Asimismo, investigar e interpretar los antecedentes personales y familiares para evaluar el riesgo de recurrencia de HSCR, además de considerar las posibles ventajas y desventajas de los análisis genéticos. De igual forma, se debe ser capaz de ayudar en la evaluación de los aspectos psicosociales y de identificar los recursos educativos y de apoyo tanto para pacientes como para familiares.

Se presupone que HSCR es una enfermedad multifactorial modificada por el sexo, y que el efecto de los genes desempeña un papel primordial en comparación con los factores ambientales (riesgo relativo de 200). En este sentido, se ha estimado que el riesgo global de recurrencia en hermanos de un probandus con HSCR se sitúa en torno a un 4%. En HSCR aislado es necesario proporcionar cifras de riesgo relativas teniendo en cuenta el sexo y la longitud del segmento agangliónico en el probandus y el sexo del hermano (2-33%). Por tanto, se puede evaluar un riesgo de recurrencia relativamente preciso adaptado a cada familia en función de las estimaciones proporcionadas por Badner (Badner y cols., 1990). Según la paradoja de Carter, el riesgo más alto de recurrencia sería para un hermano varón de un probandus femenino con L-HSCR (Tabla 3). No obstante, actualmente, la baja penetrancia de las mutaciones asociadas a HSCR dificulta el hecho de predecir y evaluar el riesgo real de la enfermedad para familiares de los pacientes de forma segura. Es de esperar, no obstante, que este panorama cambie drásticamente gracias a los enormes avances tecnológicos en estudios genéticos de los últimos tiempos que permitirán, no sólo la identificación de la red de procesos biológicos alterados causantes de la enfermedad en cada caso, sino también el impacto específico de cada evento molecular en la aparición del fenotipo, facilitando así la estimación de riesgo de recurrencia para la familia y posibilitando por tanto un consejo genético y reproductivo apropiados.

Por último, hay que hacer mención especial de los casos en los que HSCR aparece asociado a otras anomalías congénitas. En estos casos, el pronóstico a largo plazo depende, en su mayoría, del diagnóstico del cuadro clínico y de la gravedad de las anomalías asociadas. Varios síndromes conocidos asociados a HSCR tienen herencia puramente mendeliana, con mutaciones de alta penetrancia, por lo que el consejo genético es más sencillo y el riesgo de recurrencia para familiares está perfectamente establecido.

Tabla 3: Epidemiología y riesgo de recurrencia en HSCR (12)

	L-HSCR	S-HSCR
% probandus	19	81
Proporción Varones:Hembras	1.75	5.5
Modelo de herencia	Dominante	Multifactorial or recesiva
Penetrancia (%) (varones:mujeres)	52:40	17:4
Riesgo de recurrencia para hermanos* (%)		
Probandus varón	17/13	5/1
Probandus hembra	33/9	5/3

Riesgo relativo=200 *se muestra el riesgo relativo para hermanos varones/hembras, respectivamente.

Epílogo

Hoy no he hablado sólo por mí. Este no es sólo un discurso de recepción. He querido representar y contar el esfuerzo y la dedicación de tantas mujeres y hombres, compañeros. Hombres y mujeres que han dedicado una gran parte de su vida y de su esfuerzo a mejorar la vida de las personas y del conjunto de la sociedad a través de la investigación biomédica y de su traslación para mejorar la Salud.

Para que el concepto de Medicina Traslacional tenga éxito, es extremadamente importante crear las condiciones óptimas en las que se pueda desarrollar el trabajo de la forma más eficaz. Las oportunidades e importancia de alcanzar el éxito en esta tarea son lo suficientemente importantes como para que sea obligatorio una re-evaluación crítica de los obstáculos y las oportunidades de la integración de la investigación biomédica y la innovación clínica. Científicos, clínicos, ingenieros, informáticos y, en general, todos los profesionales involucrados en esta tarea deben aprender a cooperar y a centrarse en el objetivo final: el diagnóstico y el tratamiento de las enfermedades que afectan a todos: hombres, mujeres y niños. El progreso probablemente vendrá de aquellas personas y organizaciones con liderazgo, visión y recursos para generar nuevos modelos de organización y gestión que permitan propiciar equipos interdisciplinarios de científicos y clínicos, trabajando en equipo y centrados en el diseño, desarrollo y traslación de la investigación biomédica en productos o innovaciones para aplicaciones clínicas que impulsen mejores y más eficientes cuidados de salud y más riqueza para el conjunto de la sociedad.

He dicho

Referencias Bibliográficas

- Airaksinen MS, Saarma M. The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. *Nat Rev Neurosci*, 2002;3:383-94.
- Alves MM, Sribudiani Y, Brouwer RW, Amiel J, Antiñolo G, Borrego S, et al. Contribution of rare and common variants determine complex diseases-Hirschsprung disease as a model. *Dev Biol*, 2013;382:320-9.
- Amiel J, Espinosa-Parrilla Y, Steffann J, Gosset P, Pelet A, Prieur M, et al. Large-scale deletions and SMADIP1 truncating mutations in syndromic Hirschsprung disease with involvement of midline structures. *Am J Hum Genet*, 2001;69:1370-7.
- Amiel J, Sproat-Emison E, Garcia-Barceló M, Lantieri F, Burzynski G, Borrego S, et al; Hirschsprung Disease Consortium. Hirschsprung disease, associated syndromes and genetics: a review. *J Med Genet*, 2008;45:1-14.
- Anderson RB, Bergner AJ, Taniguchi M, Fujisawa H, Forrai A, Robb L, et al. Effects of different regions of the developing gut on the migration of enteric neural crest-derived cells: A role for *Sema3A*, but not *Sema3F*. *Dev Biol*, 2007;305:287-99.
- Angrist M, Kauffman E, Slaugenhaupt SA, Matise TC, Puffenberger EG, Washington SS, et al. A gene for Hirschsprung disease (megacolon) in the pericentromeric region of human chromosome 10. *Nat Genet*, 1993;4:351-6.
- Arevalo JC, Wu SH. Neurotrophin signaling: many exciting surprises! *Cell Mol Life Sci*, 2006;63:1523-37.
- Arnold S, Pelet A, Amiel J, Borrego S, Hofstra R, Tam P, et al. Interaction between a chromosome 10 *RET* enhancer and chromosome 21 in the Down syndrome-Hirschsprung disease association. *Hum Mutat*, 2009;30:771-5.
- Attie T, Till M, Pelet A, Amiel J, Edery P, Boutrand L, et al. Mutation of the endothelin-receptor B gene in Waardenburg-Hirschsprung disease. *Hum Mol Genet*, 1995;4:2407-9.
- Aurora P, Wallis CE. Jeune syndrome (asphyxiating thoracic dystrophy) associated with Hirschsprung disease. *Clin Dysmorphol*, 1999;8:259-63.
- Badner JA, Sieber WK, Garver KL, Chakravarti A. A genetic study of Hirschsprung disease. *Am J Hum Genet*, 1990;46:568-80.
- Barlow A, de Graaff E, Pachnis V. Enteric nervous system progenitors are coordinately controlled by the G protein-coupled receptor EDNRB and the receptor tyrosine kinase RET. *Neuron*, 2003;40:905-16.
- Baynash AG, Hosoda K, Giaid A, Richardson JA, Emoto N, Hammer RE, et al. Interaction of endothelin-3 with endothelin-B receptor is essential for development of epidermal melanocytes and enteric neurons. *Cell*, 1994;79:1277-85.
- Benailly H, Lapierre J, Laudier B, Amiel J, Attie T, De Blois M, et al. PMX2B, a new candidate gene for Hirschsprung's disease. *Clin Genet*, 2003;64:204-9.
- Berry-Kravis EM, Zhou L, Rand CM, Weese-Mayer DE. Congenital central hypoventilation syndrome: PHOX2B mutations and phenotype. *Am J Respir Crit Care Med*, 2006;174:1139-44.

Blatt J, Nakayama D. Wilms tumor associated with hirschsprung disease. *J Pediatr Hematol Oncol*, 2007;29:858-9.

Bolande RP "The neurocristopathies: a unifying concept of disease arising in neural crest maldevelopment". *Human Pathology*, 1974;5:409-29.

Bolk S, Pelet A, Hofstra RM, Angrist M, Salomon R, Croaker D, et al. A human model for multigenic inheritance: phenotypic expression in Hirschsprung disease requires both the *RET* gene and a new 9q31 locus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000;97:268-73.

Bondurand N, Pingault V, Goerich DE, Lemort N, Sock E, Le Caignec C, et al. Interaction among *SOX10*, *PAX3* and *MITF*, three genes altered in Waardenburg syndrome. *Hum Mol Genet*, 2000;9:1907-17.

Bondurand N, Dastot-Le Moal F, Stanchina L, Collot N, Baral V, Marlin S, et al. Deletions at the *SOX10* gene locus cause Waardenburg syndrome types 2 and 4. *Am J Hum Genet*, 2007;81:1169-85.

Bondurand N, Fouquet V, Baral V, Lecerf L, Loundon N, Goossens M, et al. Alu-mediated deletion of *SOX10* regulatory elements in Waardenburg syndrome type 4. *Eur J Hum Genet*, 2012;20:990-4.

Borrego S, Eng C, Sánchez B, Sáez ME, Navarro E, Antiñolo G. Molecular analysis of the *RET* and *GDNF* genes in a family with multiple endocrine neoplasia type 2A and Hirschsprung disease. *J Clin Endocrinol Metab*, 1998;83:3361-4.

Borrego S, Saez ME, Ruiz A, Gimm O, Lopez-Alonso M, Antinolo G, et al. Specific polymorphisms in the *RET* proto-oncogene are over-represented in patients with Hirschsprung disease and may represent loci modifying phenotypic expression. *J Med Genet*, 1999;36:771-4.

Borrego S, Ruiz A, Saez ME, Gimm O, Gao X, Lopez-Alonso M, et al. *RET* genotypes comprising specific haplotypes of polymorphic variants predispose to isolated Hirschsprung disease. *J Med Genet*, 2000;37:572-8.

Borrego S, Wright FA, Fernández RM, Williams N, López-Alonso M, Davuluri R, et al. A founding locus within the *RET* proto-oncogene may account for a large proportion of apparently sporadic Hirschsprung disease and a subset of cases of sporadic medullary thyroid carcinoma. *Am J Hum Genet*, 2003a;72:88-100.

Borrego S, Fernández RM, Dziema H, Niess A, López-Alonso M, Antiñolo G, et al. Investigation of germline *GFRA4* mutations and evaluation of the involvement of *GFRA1*, *GFRA2*, *GFRA3*, and *GFRA4* sequence variants in Hirschsprung disease. *J Med Genet*, 2003b;40:e18.

Borrego S, Ruiz-Ferrer M, Fernández RM. Genetic basis of Hirschsprung's disease. In: Constipation in children. Diagnosis and treatment. *Nova Science Publishers, Inc*, 2013a;p.33-78.

Borrego S, Ruiz-Ferrer M, Fernández RM, Antiñolo G. Hirschsprung's disease as a model of complex genetic etiology. *Histol Histopathol*, 2013b;28:1117-36.

Brooks AS, Breuning MH, Osinga J, vd Smagt JJ, Catsman CE, Buys CH, et al. A consanguineous family with Hirschsprung disease, microcephaly, and mental retardation (Goldberg-Shprintzen syndrome). *J Med Genet*, 1999;36:485-9.

Brooks AS, Bertoli-Avella AM, Burzynski GM, Breedveld GJ, Osinga J, Boven LG, et al. Homozygous nonsense mutations in KIAA1279 are associated with malformations of the central and enteric nervous systems. *Am J Hum Genet*, 2005;77:120-6.

Brooks AS, Leegwater PA, Burzynski GM, Willems PJ, de Graaf B, van Langen I, et al. A novel susceptibility locus for Hirschsprung's disease maps to 4q31.3-q32.3. *J Med Genet*, 2006;43:e35.

Carrasquillo MM, McCallion AS, Puffenberger EG, Kashuk CS, Nouri N, Chakravarti A. Genome-wide association study and mouse model identify interaction between RET and EDNRB pathways in Hirschsprung disease. *Nat Genet*, 2002;32:237-44.

Chakravarti A, Lyonnet S: Hirschsprung disease. In: Scriver CR, Beaudet AL, Valle D, Sly WS, Childs B, Kinzler K, Vogelstein B. (Eds). The Metabolic and Molecular Bases of Inherited disease. 8th Edition. New York: McGraw-Hill, 2001;p. 6231-55.

Chalazonitis A, Rothman TP, Chen J, Lamballe F, Barbacid M, Gershon MD. Neurotrophin-3 induces neural crest-derived cells from fetal rat gut to develop in vitro as neurons or glia. *J Neurosci*, 1994;14:6571-84.

Chalazonitis A. Neurotrophin-3 in the development of enteric nervous system. *Prog Brain Res*, 2004;46:246-63.

Chan KK, Wong CK, Lui VC, Tam PK, Sham MH. Analysis of *SOX10* mutations identified in Waardenburg–Hirschsprung patients: differential effects on target gene regulation. *J Cell Biochem*, 2003;90:573-85.

Cheng X, Blumenthal RM. Mammalian DNA methyltransferases: a structural perspective. *Structure*, 2008;16:341-50.

Dastot-Le Moal F, Wilson M, Mowat D, Collot N, Niel F, Goossens M. ZFHXB mutations in patients with Mowat-Wilson syndrome. *Hum Mutat*, 2007;28:313-21.

Davenport M, Taitz LS, Dickson JA. The Kaufman-McKusick syndrome: another association. *J Pediatr Surg*, 1989;24:1192-4.

Edery P, Lyonnet S, Mulligan LM, Pelet A, Dow E, Abel L, et al. Mutations of the *RET* proto-oncogene in Hirschsprung's disease. *Nature*, 1994;367:378-80.

Emison ES, McCallion AS, Kashuk CS, Bush RT, Grice E, Lin S, et al. A common sex-dependent mutation in a *RET* enhancer underlies Hirschsprung disease risk. *Nature*, 2005;434:857-63.

Emison ES, Garcia-Barceló M, Grice EA, Lantieri F, Amiel J, Burzynski G, et al. Differential contributions of rare and common, coding and non coding *RET* mutations to multifactorial Hirschsprung disease liability. *Am J Hum Genet*, 2010;87:60-74.

Eng C. *RET* proto-oncogene in the development of human cancer. *J Clin Oncol*, 1999;17:380-93.

Enguix-Riego MV, Torroglosa A, Fernández RM, Moya-Jiménez MJ, de Agustín JC, Antiñolo G, et al. PAX6 down-regulation as a potential event contributing to the onset of Hirschsprung disease. *Sci Rep*, enviado a publicar.

Estrategia en Enfermedades Raras del Sistema Nacional de Salud. Ministerio de Sanidad y Política Social. Actualización aprobada por el Consejo Interterritorial del Sistema Nacional de Salud, 2014.

Fernández RM, Antiñolo G, Eng C, Borrego S. The *RET* C620S mutation causes multiple endocrine neoplasia type 2A (MEN2A) but not Hirschsprung disease (HSCR) in a family cosegregating both phenotypes. *Hum Mutat*, 2003;22:41241-5.

Fernández RM, Boru G, Pecina A, Jones K, Lopez-Alonso M, Antinolo G, et al. Ancestral *RET* haplotype associated with Hirschsprung's disease shows linkage disequilibrium breakpoint at -1249. *J Med Genet*, 2005;42:322-7.

Fernández RM, Sánchez-Mejías A, Navarro E, López-Alonso M, Antiñolo G, Borrego S. The *RET* functional variant c.587T>C is not associated with susceptibility to sporadic medullary thyroid cancer. *Thyroid*, 2009a;9:1017-8.

Fernández RM, Sánchez-Mejías A, Mena MD, Ruiz-Ferrer M, López-Alonso M, Antiñolo G, et al. A novel point variant in *NTRK3*, R645C, suggests a role of this gene in the pathogenesis of Hirschsprung disease. *Ann Hum Genet*, 2009b;73:19-25.

Fernández RM, Núñez-Torres R, González-Meneses A, Antiñolo G, Borrego S. Novel association of severe neonatal encephalopathy and Hirschsprung disease in a male with a duplication at the Xq28 region. *BMC Med Genet*, 2010;11:137.

Fernández RM, Bleda M, Núñez-Torres R, Medina I, Luzón-Toro B, García-Alonso L, et al. Four new loci associations discovered by pathway-based and network analyses of the genome-wide variability profile of Hirschsprung's disease. *Orphanet J Rare Dis*, 2012a;7:103.

Fernández RM, Núñez-Torres R, García-Díaz L, de Agustín JC, Antiñolo G, Borrego S. Association of X-linked hydrocephalus and Hirschsprung disease: report of a new patient with a mutation in the *L1CAM* gene. *Am J Med Genet A*, 2012b;158A:816-20.

Fernández RM, Mathieu Y, Luzón-Toro B, Núñez-Torres R, González-Meneses A, Antiñolo G, et al. Contributions of *PHOX2B* in the pathogenesis of Hirschsprung disease. *PLoS One*, 2013a;8:e54043.

Fernández RM, Bleda M, Luzón-Toro B, García-Alonso L, Arnold S, Sribudiani Y, et al. Pathways systematically associated to Hirschsprung's disease. *Orphanet J Rare Dis*, 2013b;8:187.

Fernández RM, Núñez-Ramos R, Enguix-Riego MV, Román-Rodríguez FJ, Galán-Gómez E, Blesa-Sánchez E, et al. Waardenburg syndrome type 4: report of two new cases caused by *SOX10* mutations in Spain. *Am J Med Genet A*, 2014;164A:542-7.

Fewtrell MS, Tam PK, Thomson AH, Fitchett M, Currie J, Huson SM, et al. Hirschsprung's disease associated with a deletion of chromosome 10 (q11.2q21.2): a further link with the neurocristopathies? *J Med Genet*, 1994;31:325-7.

Gabriel SB, Salomon R, Pelet A, Angrist M, Amiel J, Fornage M, et al. Segregation at three loci explains familial and population risk in Hirschsprung disease. *Nat Genet*, 2002;31:89-93.

Garcia-Barceló M, Sham MH, Lui VC, Chen BL, Ott J, Tam PK. Association study of *PHOX2B* as a candidate gene for Hirschsprung's disease. *Gut*, 2003;52:563-7.

Garcia-Barceló M, Ganster RW, Lui VC, Leon TY, So MT, Lau AM, et al. TTF-1 and *RET* promoter SNPs: regulation of *RET* transcription in Hirschsprung's disease. *Hum Mol Genet*, 2005;14:191-204.

Garcia-Barcelo MM, Tang CS, Ngan ES, Lui VC, Chen Y, So MT, et al. Genome-wide association study identifies *NRG1* as a susceptibility locus for Hirschsprung's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009;106:2694-9.

Goldberg RB, Shprintzen RJ. Hirschsprung megacolon and cleft palate in two sibs. *J Craniofac Genet Dev Biol*, 1981;1:185-9.

Goldberg EL. An epidemiological study of Hirschsprung's disease. *Int J Epidemiol*, 1984;13:479-85.

Grieco M, Santoro M, Berlingieri MT, Melillo RM, Donghi R, Bongarzone I, et al. PTC is a novel rearranged form of the ret proto-oncogene and is frequently detected in vivo in human Thyroid papillary carcinomas. *Cell*, 1990;60:557-63.

Griseri P, Sancandi M, Patrone G, Bocciardi R, Hofstra R, Ravazzolo R, et al. A single-nucleotide polymorphic variant of the *RET* proto-oncogene is underrepresented in sporadic Hirschsprung disease. *Eur J Hum Genet*, 2000;8:721-4.

Griseri P, Pesce B, Patrone G, Osinga J, Puppo F, Sancandi M, et al. A rare haplotype of the *RET* proto-oncogene is a risk-modifying allele in hirschsprung disease. *Am J Hum Genet*, 2002;71:969-74.

Griseri P, Lantieri F, Puppo F, Bachetti T, Di Duca M, Ravazzolo R, et al. A common variant located in the 3'UTR of the *RET* gene is associated with protection from Hirschsprung disease. *Hum Mutat*, 2007;28:168-76.

Haddad GG, Mazza NM, Defendini R, Blanc WA, Driscoll JM, Epstein MA, et al. Congenital failure of automatic control of ventilation, gastrointestinal motility and heart rate. *Medicine (Baltimore)*, 1978;57:517-26.

Heuckeroth RO, Enomoto H, Grider JR, Golden JP, Hanke JA, Jackman A, et al. Gene targeting reveals a critical role for neurturin in the development and maintenance of enteric, sensory, and parasympathetic neurons. *Neuron*, 1999;22:253-63.

Hirschsprung H. Stuhlträghheit neugeborener infolge von dilatation und hypertrophic des colons. *Jb inderheilk*, 1888;27:1.

Hoehner JC, Wester T, Pahlman S, Olsen L. Alterations in neurotrophin and neurotrophin-receptor localization in Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg*, 1996;31:1524-9.

Hofstra RM, Osinga J, Tan-Sindhunata G, Wu Y, Kamsteeg EJ, Stulp RP, et al. A homozygous mutation in the endothelin-3 gene associated with a combined Waardenburg type 2 and Hirschsprung phenotype (Shah-Waardenburg syndrome). *Nat Genet*, 1996;12:445-7.

Hofstra RM, Valdenaire O, Arch E, Osinga J, Kroes H, Loffler BM, et al. A loss-of-function mutation in the endothelin-converting enzyme 1 (ECE-1) associated with Hirschsprung disease, cardiac defects, and autonomic dysfunction. *Am J Hum Genet*, 1999;64:304-8.

Hosoda K, Hammer RE, Richardson JA, Baynash AG, Cheung JC, Giaid A, et al. Targeted and natural (piebald-lethal) mutations of endothelin-B receptor gene produce megacolon associated with spotted coat color in mice. *Cell*, 1994;79:1267-76.

Hu H, Roach JC, Coon H, Guthery SL, Voelkerding KV, Margraf RL, et al. A unified test of linkage analysis and rare-variant association for analysis of pedigree sequence data. *Nat Biotechnol*, 2014;32: 663-669.

International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 2001;409:860-921.

Ito S, Iwashita T, Asai N, Murakami H, Iwata Y, Sobue G, et al. Biological properties of Ret with cysteine mutations correlate with multiple endocrine neoplasia type 2A, familial medullary thyroid carcinoma, and Hirschsprung's disease phenotype. *Cancer Res*, 1997;57:2870-2.

Jang ES, Goldman JE. Pax6 expression is sufficient to induce a neurogenic fate in glial progenitors of the neonatal subventricular zone. *PLoS One*, 2011;6:e20894.

Jannot AS, Amiel J, Pelet A, Lantieri F, Fernandez RM, Verheij JB, et al. Male and female differential reproductive rate could explain parental transmission asymmetry of mutation origin in Hirschsprung disease. *Eur J Hum Genet*, 2012;20:917-20.

Jannot AS, Pelet A, Henrion-Caude A, Chaoui A, Masse-Morel M, Arnold S, et al. Chromosome 21 scan in Down syndrome reveals DSCAM as a predisposing locus in Hirschsprung disease. *PLoS One*, 2013;8:e62519.

Jiang Q, Ho YY, Hao L, Nichols Berrios C, Chakravarti A. Copy number variants in candidate genes are genetic modifiers of Hirschsprung disease. *PLoS One*, 2011;6:e21219.

Jiang Q, Turner T, Sosa MX, Rakha A, Arnold S, Chakravarti A. Rapid and efficient human mutation detection using a bench-top next-generation DNA sequencer. *Hum Mutat*, 2012;33:281-9.

Jiang Q, Arnold S, Heanue T, Kilambi KP, Doan B, Kapoor A, et al. Functional loss of semaphorin 3C and/or semaphorin 3D and their epistatic interaction with ret are critical to Hirschsprung disease liability. *Am J Hum Genet*, 2015;96:581-96.

Kashuk CS, Stone EA, Grice EA, Portnoy ME, Green ED, Sidow A, et al. Phenotype-genotype correlation in Hirschsprung disease is illuminated by comparative analysis of the RET protein sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005;102:8949-54.

Korbel JO, Tirosh-Wagner T, Urban AE, Chen XN, Kasowski M, Dai L, et al. The genetic architecture of Down syndrome phenotypes revealed by high-resolution analysis of human segmental trisomies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009;106:12031-6.

Lamont MA, Fitchett M, Dennis NR. Interstitial deletion of distal 13q associated with Hirschsprung's disease. *J Med Genet*, 1989;26:100-4.

Lane PW, Liu HM. Association of megacolon with a new dominant spotting gene (Dom) in the mouse. *J Hered*, 1984;75:435-9.

Lang D, Epstein JA. Sox10 and Pax3 physically interact to mediate activation of a conserved c-RET enhancer. *Hum Mol Genet*, 2003;12:937-45.

Lecerf L, Kavo A, Ruiz-Ferrer M, Baral V, Watanabe Y, Chaoui A, et al. An impairment of long distance SOX10 regulatory elements underlies isolated Hirschsprung disease. *Hum Mutat*, 2014;35:303-7.

Lin S, Chakravarti A, Cutler DJ. Exhaustive allelic transmission disequilibrium tests as a new approach to genome-wide association studies. *Nat Genet*, 2004;36:1181-8.

Lore F, Di Cairano G, Talidis F. Unilateral renal agenesis in a family with medullary thyroid carcinoma. *N Engl J Med*, 2000;342:1218-9.

Ludwig A, Rehberg S, Wegner M. Melanocyte-specific expression of dopachrome tautomerase is dependent on synergistic gene activation by the Sox10 and Mitf transcription factors. *FEBS Lett*, 2004;556:236-44.

Luzón-Toro B, Torroglosa A, Núñez-Torres R, Enguix-Riego MV, Fernández RM, de Agustín JC, et al. Comprehensive Analysis of *NRG1* Common and Rare Variants in Hirschsprung Patients. *PLoS One*, 2012;7:e36524.

Luzón-Toro B, Fernández RM, Torroglosa A, de Agustín JC, Méndez-Vidal C, Segura DI, et al. Mutational spectrum of semaphorin 3A and semaphorin 3D genes in Spanish Hirschsprung patients. *PLoS One*, 2013;8:e54800.

Luzón-Toro B, Gui H, Ruiz-Ferrer M, Tang C, Fernández RM, Sham PC, Torroglosa A, Tam P, Espino-Paisán L, Cherny S, Bleda M, Enguix-Riego MV, Dopazo J, Antiñolo G, García-Barceló MM, Borrego S. Exome sequencing reveals a high genetic heterogeneity on familial Hirschsprung disease. *Sci Rep*, en prensa a.

Luzón-Toro B, Espino-Paisán L, Fernández RM, Martín-Sánchez M, Antiñolo G, Borrego S. Next-generation-based targeted sequencing as an efficient tool for the study of the genetic background in Hirschsprung patients. *BMC Med Genet*, en prensa b.

Lyonnet S, Bolino A, Pelet A, Abel L, Nihoul-Fekete C, Briard ML, et al. A gene for Hirschsprung disease maps to the proximal long arm of chromosome 10. *Nat Genet*, 1993;4:346-50.

Mardis ER. Next-generation DNA sequencing methods. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2008;9:387-402.

Martucciello G, Biocchini M, Doderio P, Cirillo M, Puliti A, Gimelli G. Total colonic aganglionosis associated with interstitial deletion of the long arm of chromosome 10. *Pediatr Surg Int*, 1992;7:308.

McCallion AS, Chakravarti A. EDNRB/EDN3 and Hirschsprung disease type II. *Pigment Cell Res*, 2001;14:161-9.

Metzker ML. Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet*, 2010;11:31-46.

Miao X, Garcia-Barceló MM, So MT, Leon TY, Lau DK, Liu TT, et al. Role of *RET* and *PHOX2B* gene polymorphisms in risk of Hirschsprung's disease in Chinese population. *Gut*, 2007;56:736.

Moore MW, Klein RD, Fariñas I, Sauer H, Armanini M, Phillips H, et al. Renal and neuronal abnormalities in mice lacking GDNF. *Nature*, 1996;382:76-9.

Mowat DR, Croaker GD, Cass DT, Kerr BA, Chaitow J, Ades LC, et al. Hirschsprung disease, microcephaly, mental retardation, and characteristic facial features: delineation of a new syndrome and identification of a locus at chromosome 2q22-q23. *J Med Genet*, 1998;35:617-23.

Mulligan LM, Kwok JB, Healey CS, Elsdon MJ, Eng C, Gardner E, et al. Germ-line mutations of the *RET* proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A. *Nature*, 1993;363:458-60.

Ngan ES, Lee KY, Sit FY, Poon HC, Chan JK, Sham MH, et al. Prokineticin-1 modulates proliferation and differentiation of enteric neural crest cells. *Biochim Biophys Acta*, 2007;1773:536-45.

Ngan ES, Shum CK, Poon HC, Sham MH, Garcia-Barcelo MM, Lui VC, et al. Prokineticin-1 (Prok-1) works coordinately with glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) to mediate proliferation and differentiation of enteric neural crest cells. *Biochim Biophys Acta*, 2008;1783:467-78.

Núñez-Torres R, Fernández RM, López-Alonso M, Antiñolo G, Borrego S. A novel study of copy number variations in Hirschsprung disease using the multiple ligation-dependent probe amplification (MLPA) technique. *BMC Med Genet*, 2009;10:119.

Núñez-Torres R, Fernández RM, Acosta MJ, Enguix-Riego M del V, Marbá M, Carlos de Agustín J, et al. Comprehensive analysis of *RET* common and rare variants in a series of Spanish Hirschsprung patients confirms a synergistic effect of both kinds of events. *BMC Med Genet*, 2011;12:138.

Okamoto N, Del Maestro R, Valero R, Monros E, Poo P, Kanemura Y, et al. Hydrocephalus and Hirschsprung's disease with a mutation of L1CAM. *J Hum Genet*, 2004;49:334-7.

Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*, 1999;99:247-257.

Parisi MA, Kapur RP, Neilson I, Hofstra RM, Holloway LW, Michaelis RC, et al. Hydrocephalus and intestinal aganglionosis: is L1CAM a modifier gene in Hirschsprung disease? *Am J Med Genet*, 2002;108:51-6

Pasini B, Borrello MG, Greco A, Bongarzone I, Luo Y, Mondellini P, et al. Loss of function effect of RET mutations causing Hirschsprung disease. *Nat Genet*, 1995;10:35-40.

Passarge E. The genetics of Hirschsprung's disease. Evidence for heterogeneous etiology and a study of sixty-three families. *N Engl J Med*, 1967;276:138-43.

Patterson K, Toomey KE, Chandra RS. Hirschsprung disease in a 46,XY phenotypic infant girl with Smith-Lemli-Opitz syndrome. *J Pediatr*, 1983;103:425-7.

Pattyn A, Morin X, Cremer H, Goridis C, Brunet Jf. The Homeobox Gene Phox2b Is Essential For The Development Of Autonomic Neural Crest Derivatives. *Nature*, 1999;399:366-70.

Pingault V, Puliti A, Prehu MO, Samadi A, Bondurand N, Goossens M. Human homology and candidate genes for the Dominant megacolon locus, a mouse model of Hirschsprung disease. *Genomics*, 1997;39:86-95.

Pingault V, Bondurand N, Kuhlbrodt K, Goerich DE, Prehu MO, Puliti A, et al. SOX10 mutations in patients with Waardenburg-Hirschsprung disease. *Nat Genet*, 1998;18:171-3.

de Pontual L, Pelet A, Clement-Ziza M, Trochet D, Antonarakis SE, Attie-Bitach T, et al. Epistatic interactions with a common hypomorphic RET allele in syndromic Hirschsprung disease. *Hum Mutat*, 2007;28:790-796.

de Pontual L, Zaghloul NA, Thomas S, Davis EE, McGaughey DM, Dollfus H, et al. Epistasis between RET and BBS mutations modulates enteric innervation and causes syndromic Hirschsprung disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009;106:13921-6.

Puffenberger EG, Hosoda K, Washington SS, Nakao K, de Wit D, Yanagisawa M, et al. A missense mutation of the endothelin-B receptor gene in multigenic Hirschsprung's disease. *Cell*, 1994a;79:1257-66.

Puffenberger EG, Kauffman ER, Bolk S, Matise TC, Washington SS, Angrist M, et al. Identity-by-descent and association mapping of a recessive gene for Hirschsprung disease on human chromosome 13q22. *Hum Mol Genet*, 1994b;3:1217-25.

Romeo G, Ronchetto P, Luo Y, Barone V, Seri M, Ceccherini I, et al. Point mutations affecting the tyrosine kinase domain of the *RET* proto-oncogene in Hirschsprung's disease. *Nature*, 1994;367:377-8.

Ruiz-Ferrer M, Fernandez RM, Antiñolo G, Lopez-Alonso M, Eng C, Borrego S. A complex additive model of inheritance for Hirschsprung disease is supported by the contribution of both *RET* coding sequence mutations and specific predisposing *RET* haplotypes. *Genet Med*, 2006;8:704-10.

Ruiz-Ferrer M, Fernandez RM, Antiñolo G, Lopez-Alonso M, Borrego S. *NTF-3*, a gene involved in the enteric nervous system development, as a candidate gene for Hirschsprung disease. *J Pediatr Surg*, 2008;43:1308-11.

Ruiz-Ferrer M, Torroglosa A, Luzón-Toro B, Fernández RM, Antiñolo G, Mulligan LM, et al. Novel mutations at RET ligand genes preventing receptor activation are associated to Hirschsprung's disease. *J Mol Med*, 2011a;89:471-80.

Ruiz-Ferrer M, Torroglosa A, Núñez-Torres R, de Agustín JC, Antiñolo G, Borrego S. Expression of PROKR1 and PROKR2 in Human Enteric Neural Precursor Cells and Identification of Sequence Variants Suggest a Role in HSCR. *PLoS One*, 2011b;6:e23475.

Sampson MG, Coughlin CR 2nd, Kaplan P, Conlin LK, Meyers KE, Zackai EH, et al. Evidence for a recurrent microdeletion at chromosome 16p11.2 associated with congenital anomalies of the kidney and urinary tract (CAKUT) and Hirschsprung disease. *Am J Med Genet A*, 2010;152A:2618-22.

Sánchez B, Antiñolo G, Navarro E, Japón MA, Conde AF, Astorga R, Borrego S. Cys 634 mutations in the RET proto-oncogene in Spanish families affected by MEN 2A. *Hum Mutat*, 1998;Suppl 1:S72-3.

Sánchez B, Robledo M, Biarnes J, Sáez ME, Volpini V, Benítez J, et al. High prevalence of the C634Y mutation in the RET proto-oncogene in MEN 2A families in Spain. *J Med Genet*, 1999;36:68-70.

Sánchez-Mejías A, Fernández RM, López-Alonso M, Antiñolo G, Borrego S. Contribution of *RET*, *NTRK3* and *EDN3* to the expression of Hirschsprung disease in a multiplex family. *J Med Genet*, 2009;46:862-4.

Sánchez-Mejías A, Núñez-Torres R, Fernández RM, Antiñolo G, Borrego S. Novel MLPA procedure using self-designed probes allows comprehensive analysis for CNVs of the genes involved in Hirschsprung disease. *BMC Med Genet*, 2010a;11:71.

Sánchez-Mejías A, Fernández RM, López-Alonso M, Antiñolo G, Borrego S. New roles of EDNRB and EDN3 in the pathogenesis of Hirschsprung disease. *Genet Med*, 2010b;12:39-43.

Sánchez-Mejías A, Watanabe Y, M Fernández R, López-Alonso M, Antiñolo G, Bondurand N, et al. Involvement of *SOX10* in the pathogenesis of Hirschsprung disease: report of a truncating mutation in an isolated patient. *J Mol Med*, 2010c;88:507-14.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1977;74:5463-7.

Santoro M, Carlomagno F, Romano A, Bottaro DP, Dathan NA, Grieco M, et al. Activation of RET as a dominant transforming gene by germline mutations of MEN2A and MEN2B. *Science*, 1995;267:381-3.

Schuchardt A, D'Agati V, Larsson-Blomberg L, Costantini F, Pachnis V. Defects in the kidney and enteric nervous system of mice lacking the tyrosine kinase receptor Ret. *Nature*, 1994;367:380-3.

Southard-Smith EM, Angrist M, Ellison JS, Agarwala R, Baxevas AD, Chakravarti A, et al. The Sox10(Dom)mouse: modeling the genetic variation of Waardenburg-Shah (WS4) syndrome. *Genome Res*, 1999;9:215-25.

Spouge D, Baird PA. Hirschsprung disease in a large birth cohort. *Teratology*, 1985;32:171-7.

Sribudiani Y, Metzger M, Osinga J, Rey A, Burns AJ, Thapar N, et al. Variants in *RET* associated with Hirschsprung disease affect binding of transcription factors and gene expression. *Gastroenterology*, 2011;140:572-82.

Sulisalo T, Sistonen P, Hastbacka J, Wadelius C, Makitie O, de la Chapelle A, et al. Cartilage-hair hypoplasia gene assigned to chromosome 9 by linkage analysis. *Nat Genet*, 1993;3:338-41.

Takahashi M. The GDNF/RET signaling pathway and human diseases. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2001;12:361-73.

Tang CS, Sribudiani Y, Miao XP, de Vries AR, Burzynski G, So MT, et al. Fine mapping of the 9q31 Hirschsprung's disease locus. *Hum Genet*, 2010;127:675-83.

Tang CS, Tang WK, So MT, Miao XP, Leung BM, Yip BH, et al. Fine mapping of the *NRG1* Hirschsprung's disease locus. *PLoS One*, 2011;6:e16181.

Tang CS, Ngan ES, Tang WK, So MT, Cheng G, Miao XP, et al. Mutations in the *NRG1* gene are associated with Hirschsprung disease. *Hum Genet*, 2012a;131:67-76.

Tang CS, Cheng G, So MT, Yip BH, Miao XP, Wong EH, et al. Genome-Wide Copy Number Analysis Uncovers a New HSCR Gene: *NRG3*. *PLoS Genet*, 2012b;8:e1002687.

Taraviras S, Marcos-Gutierrez CV, Durbec P, Jani H, Grigoriou M, Sukumaran M, et al. Signalling by the RET receptor tyrosine kinase and its role in the development of the mammalian enteric nervous system. *Development*, 1999;126:2785-97.

Tobin JL, Beales PL. Bardet-Biedl syndrome: beyond the cilium. *Pediatr Nephrol*, 2007;22:926-36.

Torroglosa A, Enguix-Riego MV, Fernández RM, Román-Rodríguez FJ, Moya-Jiménez MJ, de Agustín JC, et al. Involvement of DNMT3B in the pathogenesis of Hirschsprung disease and its possible role as a regulator of neurogenesis in the human enteric nervous system. *Genet Med*, 2014;16:703-10.

Touraine RL, Attie-Bitach T, Manceau E, Korsch E, Sarda P, Pingault V, et al. Neurological phenotype in Waardenburg syndrome type 4 correlates with novel *SOX10* truncating mutations and expression in developing brain. *Am J Hum Genet*, 2000;66:1496-503.

Trochet D, Bourdeaut F, Janoueix-Lerosey I, Deville A, de Pontual L, Schleiermacher G, et al. Germline mutations of the paired-like homeobox 2B (PHOX2B) gene in neuroblastoma. *Am J Hum Genet*, 2004;74:761-4.

Trochet D, Hong SJ, Lim JK, Brunet JF, Munnich A, Kim KS, et al. Molecular consequences of PHOX2B missense, frameshift and alanine expansion mutations leading to autonomic dysfunction. *Hum Mol Genet*, 2005;14:3697-708.

Uesaka T, Enomoto H. Neural precursor death is central to the pathogenesis of intestinal aganglionosis in Ret hypomorphic mice. *J Neurosci*, 2010;30:5211-8.

Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG et al. The sequence of the human genome. *Science*, 2001;291:1304-51.

Verloes A, Elmer C, Lacombe D, Heinrichs C, Rebuffat E, Demarquez JL, et al. Ondine-Hirschsprung syndrome (Haddad syndrome). Further delineation in two cases and review of the literature. *Eur J Pediatr*, 1993;152:75-7.

Waardenburg PJ. A new syndrome combining developmental anomalies of the eyelids, eyebrows and nose root with pigmentary defects of the iris and head hair and with congenital deafness. *Am J Hum Genet*, 1951;3:195-253.

Wakamatsu N, Yamada Y, Yamada K, Ono T, Nomura N, Taniguchi H, et al. Mutations in SIP1, encoding Smad interacting protein-1, cause a form of Hirschsprung disease. *Nat Genet*, 2001;27:369-70.

Wallace AS, Schmidt C, Schachner M, Wegner M, Anderson RB. L1cam acts as a modifier gene during enteric nervous system development. *Neurobiol Dis*, 2010;40:622-33.

Wallace AS, Tan MX, Schachner M, Anderson RB. L1cam acts as a modifier gene for members of the endothelin signalling pathway during enteric nervous system development. *Neurogastroenterol Motil*, 2011;23:e510-22.

Wang K, Li M, Bucan M. Pathway-based approaches for analysis of genomewide association studies. *Am J Hum Genet*, 2007;81:1278-1283.

Wang LL, Fan Y, Zhou FH, Li H, Zhang Y, Miao JN, et al. Semaphorin 3A Expression in the Colon of Hirschsprung Disease. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, 2011;91:842-7.

Wassif CA, Maslen C, Kachilele-Linjewile S, Lin D, Linck LM, Connor WE, et al. Mutations in the human sterol delta7-reductase gene at 11q12-13 cause Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Am J Hum Genet*, 1998;63:55-62.

Watson JD and Crick FH. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 1953;171:737-8.

Weese-Mayer DE, Berry-Kravis EM, Zhou L, Maher BS, Silvestri JM, Curran ME, et al. Idiopathic congenital central hypoventilation syndrome: analysis of genes pertinent to early autonomic nervous system embryologic development and identification of mutations in PHOX2b. *Am J Med Genet*, 2003;123A:267-78.

Yamakawa K, Huot YK, Haendelt MA, Hubert R, Chen XN, Lyons GE, et al. DSCAM: A novel member of the immunoglobulin superfamily maps in a Down syndrome region and is involved in the development of the nervous system. *Hum Mol Genet*, 1998;7:227-37.

Yanagisawa H, Yanagisawa M, Kapur RP, Richardson JA, Williams SC, Clouthier DE, et al. Dual genetic pathways of endothelin-mediated intercellular signaling revealed by targeted disruption of endothelin converting enzyme-1 gene. *Development*, 1998;125:825-36.

Zhu L, Lee HO, Jordan CS, Cantrell VA, Southard-Smith EM, Shin MK. Spatiotemporal regulation of endothelin receptor-B by SOX10 in neural crest-derived enteric neuron precursors. *Nat Genet*, 2004;36:732-7.

Zweier C, Thiel CT, Dufke A, Crow YJ, Meinecke P, Suri M, et al. Clinical and mutational spectrum of Mowat-Wilson syndrome. *Eur J Med Genet*, 2005;48:97-111.

Discurso de Contestación

Palabras finales del Presidente de la Real Academia