

**DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA**

**TESIS DOCTORAL**

**Identificación y análisis de nuevos genes y mecanismos  
moleculares implicados en la Enfermedad de Hirschsprung**

**María del Valle Enguix Riego**

**Sevilla, 2015**





## DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA

Memoria realizada en la Unidad de Gestión Clínica de Genética, Reproducción y Medicina Fetal del Hospital Universitario Virgen del Rocío bajo la dirección de D<sup>a</sup>. Salud Borrego López, Doctora en Medicina y Cirugía, y la tutoría de D. Guillermo Antiñolo Gil, Doctor en Medicina y Cirugía, y Profesor Titular del Departamento de Cirugía de la Universidad de Sevilla, que presenta la Licenciada en Farmacia **María del Valle Enguix Riego** para optar al grado de Doctor.

La Directora,

El Tutor,

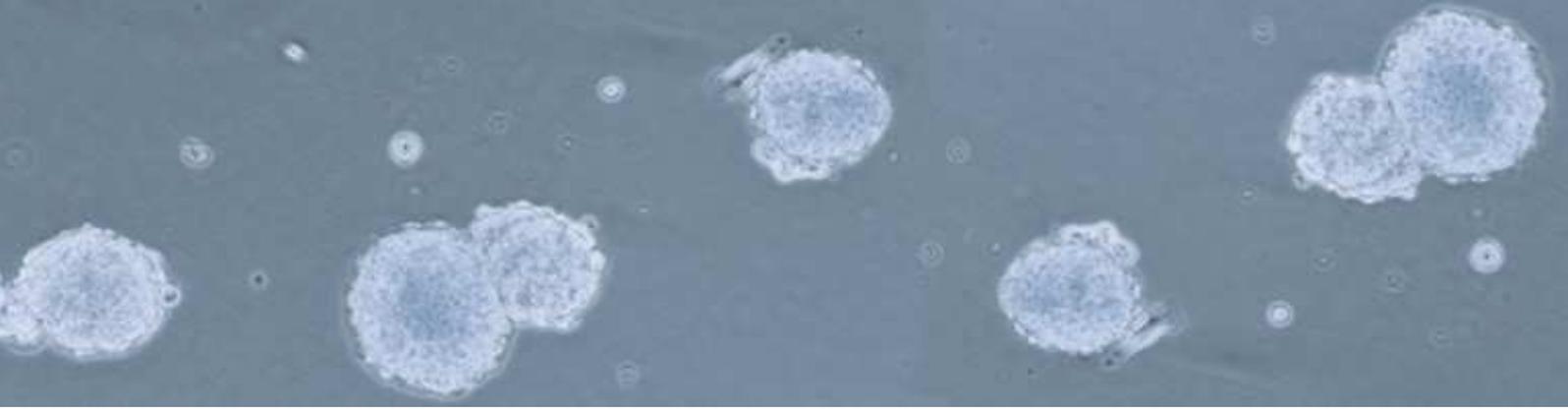
Fdo. Salud Borrego López  
Doctora en Medicina y Cirugía  
Hospital Universitario Virgen del Rocío

Fdo. Guillermo Antiñolo Gil  
Doctor en Medicina y Cirugía  
Profesor Titular Universidad de Sevilla

La Doctoranda,

Fdo. María del Valle Enguix Riego





# ÍNDICE







---

## Índice de Contenido

Índice de Contenido.....	i
Índice de Figuras .....	iv
Índice de Tablas .....	vii
<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>xiii</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>xvi</b>
1.1 El Sistema Nervioso Entérico .....	1
1.1.1 Principales rutas de señalización durante el desarrollo del SNE .....	5
1.1.2 Factores de transcripción implicados en el desarrollo del SNE .....	10
1.1.3 Regulación epigenética de las células de la cresta neural y su posible implicación en el desarrollo del SNE .....	18
1.2 Neurocristopatías.....	22
1.2.1 La enfermedad de Hirschsprung .....	23
1.2.2 Síndrome de Waardenburg.....	34
<b>2. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS .....</b>	<b>37</b>
2.1 Hipótesis de trabajo .....	39
2.2 Objetivos del estudio .....	40
<b>3. METODOLOGÍA .....</b>	<b>41</b>
3.1 Pacientes y Controles.....	43
3.1.1 Pacientes HSCR.....	43
3.1.2 Individuos Control .....	44
3.2 Animales de Experimentación .....	44
3.2.1 Ratones.....	44
3.2.2 Pez Cebra.....	44
3.3 Métodos.....	47

3.3.1 Técnicas generales utilizadas para estudios moleculares de ADN genómico	47
3.3.2 Extracción de precursores neurales crecidos como NLBs a partir del SNE humano y de ratón	55
3.3.3 Estudios en Pez-Cebra	68
3.3.4 Análisis estadístico	71
3.3.5 Herramientas Bioinformáticas	73
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>75</b>
4.1 Identificación de variantes patogénicas en dos pacientes con Síndrome de Waardenburg Tipo IV.	77
4.1.1 Historia clínica y eventos moleculares presentes en el Paciente 1.	77
4.1.2 Historia clínica y eventos moleculares presentes en el Paciente 2.	78
4.2 Implicación del gen <i>DNMT3B</i> en la patogénesis de la enfermedad de Hirschsprung	81
4.2.1 Análisis de la expresión diferencial de genes de pluripotencia en precursores neurales de SNE de pacientes HSCR <i>versus</i> controles	81
4.2.2 Expresión de la proteína DNMT3B en muestras de precursores neurales de SNE de pacientes HSCR <i>versus</i> controles.	86
4.2.3 Análisis de los niveles de metilación en precursores entéricos de pacientes HSCR <i>versus</i> controles.	87
4.2.4 Rastreo mutacional de la secuencia codificante de <i>DNMT3B</i> en la cohorte HSCR	88
4.2.5 Estudio de DNMT3B en Pez-cebra	92
4.3 Implicación del gen <i>PAX6</i> en la patogénesis de la enfermedad de Hirschsprung	101
4.3.1 Análisis de la expresión diferencial de factores de transcripción en precursores neurales de SNE de pacientes HSCR <i>versus</i> controles.	101
4.3.2 Expresión de la proteína PAX6 en muestras de precursores neurales de SNE de pacientes HSCR <i>versus</i> controles.	104
4.3.3 Estudio de expresión de las dos isoformas mayoritarias de PAX6	105

---

4.3.4 Rastreo mutacional de la secuencia codificante del factor de transcripción <i>PAX6</i> y análisis del SRT (AC)m(AG)n localizado en el promotor P1. ....	107
4.3.5 Evaluación de <i>PAX6</i> como diana de p300. ....	111
4.3.6 Evaluación de <i>PAX6</i> como diana de la metiltransferasa DNMT3B. ....	113
<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>117</b>
5.1 Identificación de dos variantes patogénica en Síndrome de Waardenburg Tipo IV. ....	119
5.2 Identificación de genes de pluripotencia que presentaban niveles de expresión diferencial en precursores neurales de SNE de pacientes HSCR <i>versus</i> controles..	124
5.2.1 Disminución de la expresión de DNMT3B en muestras de precursores neurales de SNE de pacientes HSCR <i>versus</i> controles .....	128
5.2.2 Niveles de metilación global anormalmente disminuidos en precursores entéricos de pacientes HSCR en comparación con controles.....	129
5.2.3 Identificación de variantes dentro de la secuencia de <i>DNMT3B</i> en la cohorte de pacientes HSCR.....	130
5.2.4 Estudio de DNMT3B en Pez-cebra .....	132
5.3. Identificación de factores de transcripción con diferencias en los niveles de expresión entre precursores neurales de SNE de pacientes HSCR <i>versus</i> controles. ....	135
5.3.1 El balance en la expresión de las dos isoformas mayoritarias de <i>PAX6</i> no parece ser necesario a nivel de precursor entérico.....	138
5.3.2 Diferente distribución alélica y genotípica del SRT (AC)m(AG)n localizado en el promotor P1 de <i>PAX6</i> , en pacientes HSCR <i>versus</i> controles. ....	139
5.3.3 <i>PAX6</i> es una diana de la metiltransferasa DNMT3B. ....	141
<b>6. CONCLUSIONES .....</b>	<b>143</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>147</b>
<b>8. ANEXO .....</b>	<b>175</b>
<b>9. PUBLICACIONES.....</b>	<b>179</b>

## Índice de Figuras

<b>Figura 1:</b> Sección esquemática del tracto gastrointestinal (GI) adulto.....	<b>1</b>
<b>Figura 2:</b> Formación de las células de la cresta neural.....	<b>3</b>
<b>Figura 3:</b> Diferentes tipos celulares a los que se diferencian las células de la cresta neural.....	<b>4</b>
<b>Figura 4:</b> Interacciones que se establecen entre los distintos ligandos, co-receptores GFR $\alpha$ y RET.....	<b>7</b>
<b>Figura 5:</b> Mecanismos de unión del complejo GFL/GFR $\alpha$ /RET, activación del receptor y elementos celulares participantes en la cascada de señalización. ....	<b>8</b>
<b>Figura 6:</b> Representación esquemática de la estructura genómica de <i>SOX10</i> y de la proteína que codifica.....	<b>12</b>
<b>Figura 7:</b> <i>SOX10</i> interactoma; RET y EDNRB como genes diana de <i>SOX10</i> .....	<b>13</b>
<b>Figura 8:</b> Diagrama de las diferentes marcas epigenéticas identificadas a nivel de la histona H3 y el ADN.....	<b>19</b>
<b>Figura 9:</b> Mantenimiento semi-conservativo de la metilación de citosina (5mC) en los sitios CpG, durante la embriogénesis.....	<b>20</b>
<b>Figura 10:</b> Esquema del intestino grueso con las distintas regiones anatómicas indicadas.....	<b>23</b>
<b>Figura 11:</b> Esquema del procedimiento quirúrgico <i>pull-through</i> .....	<b>25</b>
<b>Figura 12:</b> Generación de NLBs de células precursoras entéricas humanas a partir de intestino postnatal.....	<b>26</b>
<b>Figura 13:</b> Interacciones entre los diferentes genes implicados en la etiopatogenia de la enfermedad de Hirschsprung durante el desarrollo del SNE.....	<b>29</b>
<b>Figura 14:</b> Embrión de pez cebra tras 5 días postfertilización (dpf) perteneciente a la línea transgénica de pez cebra Tg(-8.3bp <i>hox2b</i> :Kaede).....	<b>45</b>
<b>Figura 15:</b> Esquema comparativo entre el epitelio intestinal en mamíferos y en pez cebra .....	<b>46</b>
<b>Figura 16 :</b> Cascada enzimática de la reacción de pirosecuenciación.....	<b>61</b>

---

<b>Figura 17:</b> Formato de 96 genes para la placa equivalente a 384 pocillos <i>TaqMan</i> <sup>®</sup> <i>Human Stem Cell Pluripotency</i> .....	<b>63</b>
<b>Figura 18:</b> Formato de 48 para la placa equivalente a 384 pocillos <i>TaqMan</i> <sup>®</sup> <i>Human Transcriptional Regulatory Network in Embryonic Stem Cell</i> .....	<b>63</b>
<b>Figura 19:</b> Producto final esperado tras el uso del morfolino oligonucleótido dirigido a la región de splicing situada entre el intrón y el exón 3 de <i>Dnmt4</i> .....	<b>69</b>
<b>Figura 20:</b> Segregación familiar del cambio c.1107ins19 hallado en <i>SOX10</i> en el primer caso de SW4.....	<b>78</b>
<b>Figura 21:</b> Segregación familiar del cambio c.915delG hallado en <i>SOX10</i> en el segundo caso de SW4.....	<b>79</b>
<b>Figura 22:</b> Mutaciones identificadas en <i>SOX10</i> en dos pacientes con sospecha de SW4. ....	<b>80</b>
<b>Figura 23:</b> Genes identificados en células pluripotentes que presentaban expresión positiva ( $\Delta Ct < 32$ ) en los precursores del SNE.....	<b>83</b>
<b>Figura 24:</b> Genes que presentaron niveles de expresión diferencial entre NLBs de pacientes frente a NLBs de controles.....	<b>84</b>
<b>Figura 25:</b> Estudio de expresión en tejido de los genes que presentaron niveles de expresión diferencial entre NLBs de pacientes frente a NLBs de controles. ....	<b>85</b>
<b>Figura 26:</b> Imágenes de microscopio confocal de inmunocitoquímica sobre NLBs flotantes de paciente HSCR y control.....	<b>86</b>
<b>Figura 27:</b> Representación de los niveles de metilación global en precursores entéricos de pacientes y controles.....	<b>87</b>
<b>Figura 28:</b> Representación esquemática del gen y la proteína DNMT3B .....	<b>89</b>
<b>Figura 29:</b> Segregación familiar de las variantes en heterocigosis halladas en el caso HSCR-1. ....	<b>90</b>
<b>Figura 30:</b> Segregación familiar de las variantes en heterocigosis halladas en los casos HSCR-2 y HSCR-3.....	<b>91</b>
<b>Figura 31:</b> Electroferogramas de los pacientes que portaban variaciones potencialmente patogénicas en la secuencia codificante de <i>DNMT3B</i> .....	<b>91</b>
<b>Figura 32:</b> Amplificación mediante RT-PCR del fragmento que comprende los exones 2, 3 y 4 de <i>Dnmt4</i> .....	<b>93</b>

<b>Figura 33:</b> Imagen de microscopía de fluorescencia de las larvas inyectadas con concentraciones de Mo control de 6 y 8ng/nl y control no microinyectado (CNM) tras 5 días postfertilización.....	<b>94</b>
<b>Figura 34:</b> Amplificación mediante RT-PCR del fragmento que comprende los exones 2, 3 y 4 de Dnmt4..	<b>94</b>
<b>Figura 35:</b> Imágenes de microscopía de fluorescencia de los fenotipos encontrados a diferentes concentraciones de Mo frente a Dnmt4.....	<b>95</b>
<b>Figura 36:</b> Porcentaje de expresión de Dnmt4 tras la microinyección de las diferentes concentraciones de Mo .....	<b>97</b>
<b>Figura 37:</b> Porcentaje de expresión de Dnmt3 y Dnmt7 tras la microinyección a diferentes concentraciones de Mo frente a Dnmt4.....	<b>98</b>
<b>Figura 38:</b> Número de células Phox2b positivas. ....	<b>99</b>
<b>Figura 39:</b> Imágenes de microscopía de fluorescencia de la inmunohistoquímica realizada en larvas de pez-cebra tras 3 y 6 días postfertilización frente a anticuerpo específico HuC/HuD.....	<b>100</b>
<b>Figura 40:</b> Factores de transcripción que presentaron expresión positiva en NLBs de controles frente a NLBs de pacientes.....	<b>102</b>
<b>Figura 41:</b> Factores de transcripción que presentaron expresión positiva en muestras de colon de pacientes y controles.....	<b>103</b>
<b>Figura 42:</b> Expresión de PAX6 en NLBs de pacientes HSCR y control.....	<b>104</b>
<b>Figura 43:</b> Representación de la expresión de las dos isoformas mayoritarias de PAX6 tras el estudio de expresión con SYBR. ....	<b>105</b>
<b>Figura 44:</b> Representación de la media de Ct de ambas isoformas de PAX6 en los grupos de pacientes HSCR y controles.....	<b>106</b>
<b>Figura 45:</b> Representación esquemática del gen <i>PAX6</i> y posición de la secuencia repetitiva (AC)m(AG)n .....	<b>107</b>
<b>Figura 46:</b> Distribución alélica del número de repeticiones dentro de la secuencia (AC)m(AG).....	<b>108</b>
<b>Figura 47:</b> Distribución de alelos de <i>PAX6</i> con >26 y ≤26 repeticiones dentro de la región del promotor P1 (AC)m(AG)n, en pacientes HSCR frente a controles.....	<b>109</b>
<b>Figura 48:</b> Distribución de individuos que presentaban al menos un alelo con >26 repeticiones dentro de la región (AC)m(AG)n del promotor P1 de <i>PAX6</i> .....	<b>110</b>

<b>Figura 49:</b> Mapa de interacción entre PAX6 y p300 obtenido mediante el uso de la herramienta on-line <i>GENEMANIA</i> .....	<b>111</b>
<b>Figura 50:</b> Inmunoprecipitación de cromatina con anticuerpo específico frente a p300 .....	<b>112</b>
<b>Figura 51:</b> Región de unión de la proteína p300 a la región del promotor de <i>PAX6</i> donde se encuentra la secuencia repetitiva (AC)m(AG)n. ....	<b>112</b>
<b>Figura 52:</b> Inmunoprecipitación de cromatina con anticuerpo específico frente a Dnmt3b.....	<b>113</b>
<b>Figura 53:</b> Alineamiento de las secuencias de ratón ( <i>mouse</i> ) y humano ( <i>human</i> ), correspondientes a los fragmentos inmunoprecipitados con anticuerpo específico frente a Dnmt3b .....	<b>114</b>
<b>Figura 54:</b> MSP para el fragmento 1 correspondiente a la Isla CpG dentro del promotor de <i>PAX6</i> .....	<b>115</b>
<b>Figura 55:</b> Porcentaje de metilación en pacientes versus controles de cada dinucleótido CG en el Fragmento 1, dentro de la Isla CpG en el promotor de <i>PAX6</i> .....	<b>116</b>

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1:</b> Síndromes asociados a HSCR.....	<b>28</b>
<b>Tabla 2:</b> Genes asociados a la aparición del fenotipo HSCR .....	<b>30</b>
<b>Tabla 3:</b> Reactivos utilizados en la PCR estándar .....	<b>48</b>
<b>Tabla 4:</b> Condiciones generales de amplificación .....	<b>48</b>
<b>Tabla 5:</b> Condiciones de amplificación de los exones de <i>RET</i> .....	<b>49</b>
<b>Tabla 6:</b> Condiciones de amplificación de los exones de <i>EDNRB</i> .....	<b>49</b>
<b>Tabla 7:</b> Condiciones de amplificación de los exones de <i>EDN3</i> .....	<b>49</b>
<b>Tabla 8:</b> Condiciones de amplificación de los exones de <i>SOX10</i> .....	<b>50</b>
<b>Tabla 9:</b> Condiciones de amplificación de los exones de <i>DNMT3B</i> .....	<b>50</b>
<b>Tabla 10:</b> Condiciones de amplificación de los exones de <i>PAX6</i> .....	<b>50</b>
<b>Tabla 11:</b> Reactivos utilizados en la reacción de secuenciación. ....	<b>52</b>

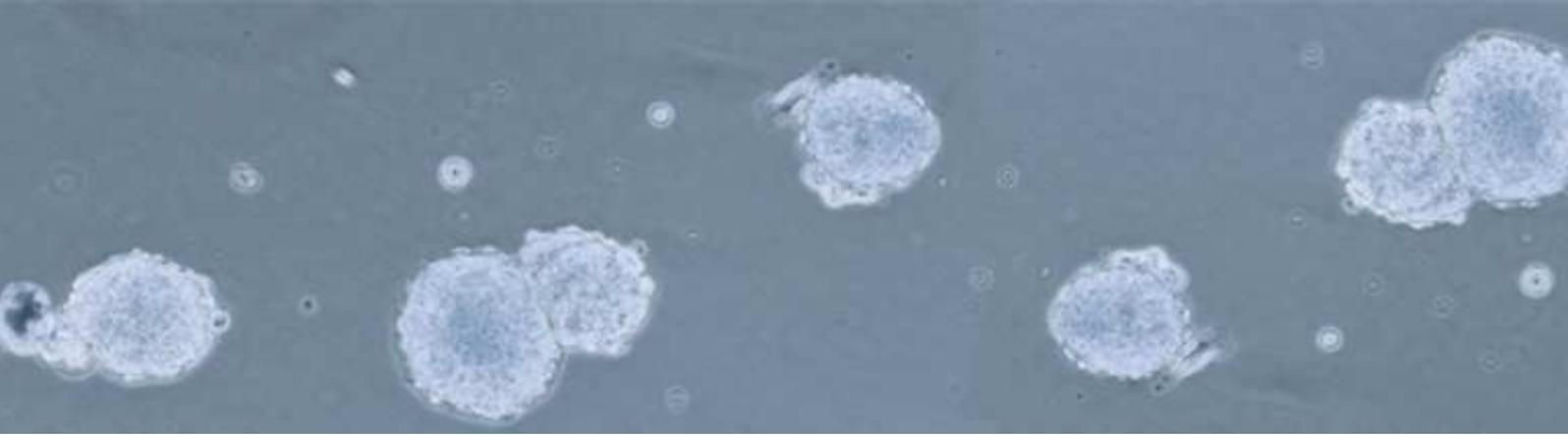
<b>Tabla 12:</b> Condiciones de la secuenciación por el método Sanger.....	<b>52</b>
<b>Tabla 13:</b> Condiciones de amplificación utilizadas para la reacción de Multiplex.....	<b>53</b>
<b>Tabla 14:</b> Programa de amplificación de la reacción de Multiplex.....	<b>54</b>
<b>Tabla 15:</b> Cebadores utilizados para la discriminación alélica en el promotor de <i>PAX6</i> .....	<b>54</b>
<b>Tabla 16:</b> Ejemplo de secuencia nucleotídica tratada con sales de Bisulfito sódico donde N es cualquier nucleótido. ....	<b>58</b>
<b>Tabla 17:</b> Condiciones de amplificación de los fragmentos de ADN tratado con sales de bisulfito.....	<b>59</b>
<b>Tabla 18:</b> Cebadores utilizados para la reacción PCR específica de metilación (MSP)..	<b>59</b>
<b>Tabla 19:</b> Cebadores utilizados para la reacción PCR previa a la pirosecuenciación.....	<b>60</b>
<b>Tabla 20:</b> Reactivos utilizados para la PCR previa a la pirosecuenciación con el PyroMark PCR Kit.....	<b>60</b>
<b>Tabla 21:</b> Condiciones de amplificación de los fragmentos de ADN tratado con sales de bisulfito.....	<b>60</b>
<b>Tabla 22:</b> Programa de amplificación PCR cuantitativa .....	<b>64</b>
<b>Tabla 23:</b> Secuencia y temperatura de hibridación de la pareja de cebadores para la amplificación del fragmento dentro del promotor de <i>PAX6</i> .....	<b>67</b>
<b>Tabla 24:</b> Parejas de cebadores y temperatura de hibridación para la amplificación mediante PCR de fragmentos localizados a lo largo del promotor y secuencia codificante de <i>Pax6</i> . ....	<b>68</b>
<b>Tabla 25:</b> Reactivos y programa utilizado para la síntesis de ADNc a partir de ARNm..	<b>71</b>
<b>Tabla 26:</b> Genes contenidos en la placa TLDA <i>TaqMan</i> <sup>®</sup> <i>Endogenous Control Assays</i> ..	<b>81</b>
<b>Tabla 27:</b> Genes contenidos en la Placa TLDA <i>TaqMan</i> <sup>®</sup> <i>Human Stem Cell Pluripotency Array</i> .....	<b>82</b>
<b>Tabla 28:</b> Cantidad de citocinas metiladas en las muestra de pacientes y controles....	<b>87</b>
<b>Tabla 29:</b> Variantes de secuencia detectadas en el rastreo mutacional del gen <i>DNMT3B</i> con un posible papel en la aparición del fenotipo HSCR.....	<b>88</b>
<b>Tabla 30:</b> Porcentaje de supervivencia tras la microinyección.....	<b>93</b>
<b>Tabla 31:</b> Porcentaje de supervivencia de los embriones microinyectados con las distintas concentraciones de Mo frente a <i>Dnmt4</i> .....	<b>96</b>

**Tabla 32:** Fenotipo resultante tras la microinyección de las diferentes concentraciones de Mo frente a Dnmt4..... **96**

**Tabla 33:** Factores de transcripción que presentaron expresión positiva en NLBs de pacientes y controles junto con el Ct de amplificación en controles y su función ..... **102**

**Tabla 34:** Factores de transcripción que presentaron unos niveles de expresión estadísticamente significativos entre NLBs de pacientes y controles..... **103**





## **ABREVIATURAS**



**5mC:** 5 metilcitosina  
**5hmC:** 5-hidroximetil-citosina  
**Aa:** Aminoácidos.  
**ADN:** Acido desoxinucleico.  
**ADNc:** ADN complementario  
**ARTN:** Artemina.  
**ARN:** Acido ribonucleico.  
**SMA:** Actina de musculo liso.  
**BHLH:** hélice-bucle-hélice  
**BMP:** Proteína morfogénicas óseas  
**BSA:** Albumina de suero bovino  
**CCN:** Célula de la cresta neural  
**ChIP:** Chromatin Immunoprecipitation  
**CNV:** Variaciones del número de copias.  
**Ct:** Ciclo umbral  
**DAG:** Di-acil-glicerol.  
**DAPI:** 4,6-diamidino-2-fenilindol  
**DMSO:** Dimetil Sulfóxido  
**DNMT:** ADN metiltransferasa  
**ddNTPs:** dideoxinucleótidos.  
**dNTPs:** Desoxinucleotidos trifosfato.  
**Dpf:** días postfertilización  
**ECE1:** Enzima convertidora de endotelinas tipo 1.  
**EDN3:** Endotelina 3  
**EDNRB:** Receptor de endotelina tipo B  
**EGF:** Factor de crecimiento epidérmico.  
**FGF:** Factor de crecimiento derivado de fibroblasto.  
**GDNF:** Factor neurotrófico derivado de glia.  
**GFAP:** Proteína ácida fibrilar glial.  
**GFLs:** Ligandos de RET.  
**GFR $\alpha$ :** Receptores  $\alpha$  de GDNF.  
**GI:** tracto gastrointestinal  
**GPI:** Glicosil-fosfatidil-inositol.  
**HTH:** Hélice-giro-hélice  
**HMG:** High mobility group  
**HSCR:** Enfermedad de Hirschsprung.  
**ICF:** Síndrome de inmunodeficiencia, inestabilidad de la región centromérica y anomalías faciales.  
**IP3:** Inositol tri-fosfato.  
**Ig:** Inmunoglobulina.  
**JNK:** Kinasa c-jun N-terminal.  
**KS:** Síndrome de Kallman.  
**L-HSCR:** HSCR de segmento largo.  
**LD-mapping:** Linkage Disequilibrium mapping.  
**MEN2A:** Neoplasia endocrina múltiple tipo 2A.  
**Mo:** Morfolino oligonucleótido  
**MSP:** PCR específica de metilación  
**NB:** Neuroblastoma  
**NLBs:** *Neuroespheres like bodies*  
**NMD-mRNA:** *Nonsense-mediated mRNA Decay*  
**NRG1:** Neuregulina 1  
**NRTN:** Neurturina.  
**NTF:** Neurotrofina.  
**NTRK:** Receptor de neurotrofina con actividad tirosin-kinasa  
**pb:** Pares de bases  
**PBS:** Tampón fosfato salino.  
**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa

**PCWH:** neuropatía desmielinizante periférica, leucodistrofia desmielinizante central, síndrome de Waardenburg y enfermedad de Hirschsprung.

**PLC-g:** Fosfolipasa C-g.

**PROK:** Prokineticina

**PROKR:** Receptor de prokineticina

**PSPN:** Persefina.

**RT-PCR:** PCR en transcripción reversa.

**S-HSCR:** HSCR de segmento corto.

**SAM:** S-adenosil-Lmetionina.

**SD:** Síndrome de Down

**SNC:** Sistema nervioso central.

**SNE:** Sistema nervioso entérico.

**SNP:** Sistema nervioso periférico.

**SNPs:** Polimorfismos de cambio de un solo nucleotido.

**STRs:** Microsatélites(*Short tandem repeats*)

**SW:** Síndrome de Waardenburg.

**TLDA:**TaqMan Low Density Array

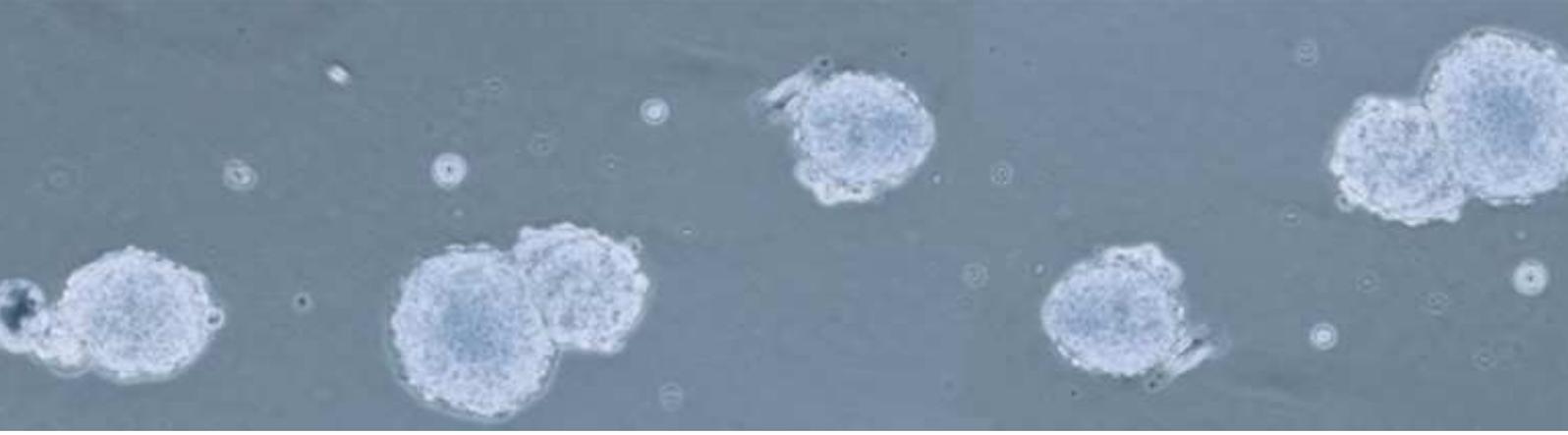
**TCA:** Aganglionsis total de colon.

**TDT:** Test de desequilibrio de transmisión.

**TEM:** Transición epitelio-mesénquima

**Tuj1:**  $\beta$ -III-tubulina.

**WNT:** Wingless-Type MMTV Integration Site Family



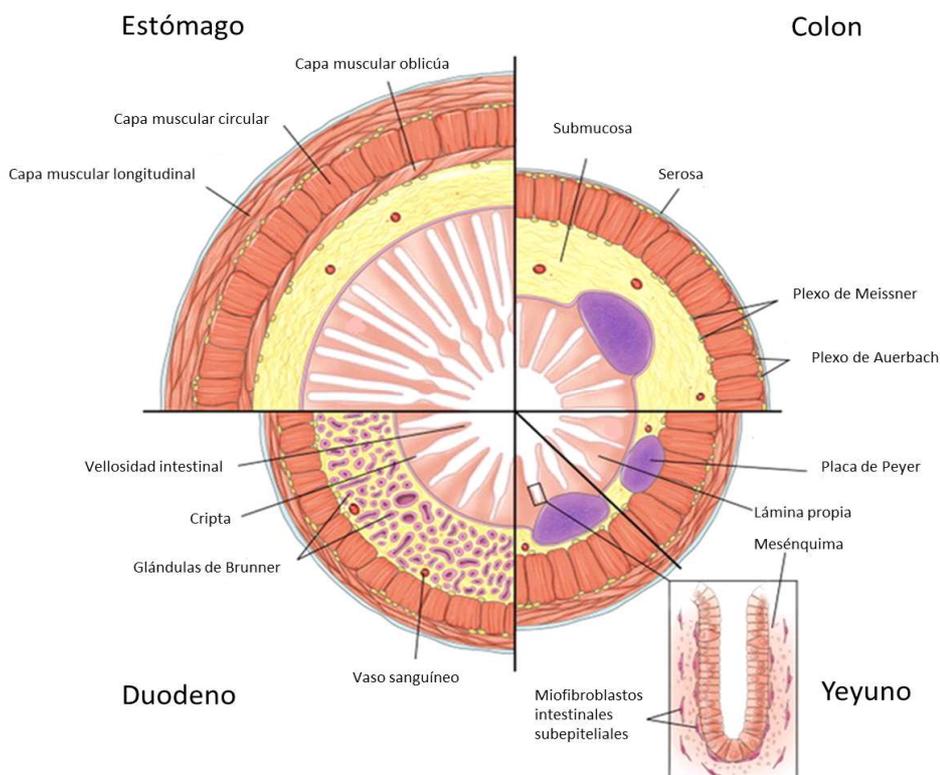
# 1. INTRODUCCIÓN



## 1.1 El Sistema Nervioso Entérico

El Sistema Nervioso Entérico (SNE), es la división más extensa en número de células del Sistema Nervioso Autónomo (SNA) y pertenece anatómicamente a la rama del sistema nervioso periférico (SNP). El SNE está formado por una amplia y compleja red de neuronas y células gliales localizadas en las paredes del tubo digestivo. Es capaz de actuar de forma independiente como un sistema nervioso intrínseco para el intestino, encargado de controlar la mayoría de las funciones del mismo.

Se organiza en dos anillos concéntricos de ganglios interconectados entre sí. El anillo exterior es el plexo mientérico o de Auerbach, situado entre las capas de músculo liso, circular y longitudinal, y se extiende a lo largo del tracto gastro-intestinal; mientras que el anillo interior es la submucosa o plexo de Meissner y se encuentra exclusivamente en intestino delgado y grueso (Figura 1).



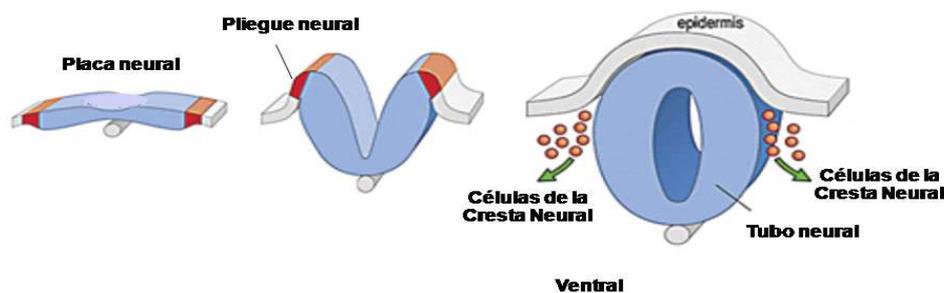
**Figura 1: Sección esquemática del tracto gastrointestinal (GI) adulto.** Cada cuadrante representa un segmento diferente del tracto GI, desde el estómago hasta el colon; las estructuras mesenquimales se muestran en detalle (Adaptada de McLin V.A. et al., 2009)

La función del SNE es activar y controlar los reflejos intrínsecos que generan la mezcla del bolo alimenticio y los movimientos peristálticos de propulsión, además de controlar el flujo sanguíneo y el transporte de agua y electrolitos a través del epitelio mucoso (Heanue et al., 2007). En esta región existen al menos 20 tipos de neuronas entéricas funcionalmente diferentes, que se clasifican en subtipos de acuerdo con las características morfológicas, propiedades electrofisiológicas o la expresión combinada de neurotransmisores y neuropéptidos generadas durante períodos específicos del desarrollo (Burzynski et al., 2009, Bergner et al., 2014). Asimismo, estas neuronas entéricas deben interactuar con otros tipos celulares como son las células intersticiales de Cajal, que proporcionan la actividad marcapasos a la pared intestinal y se cree que son las responsables de mediar los procesos de neurotransmisión entre las neuronas motoras y entéricas en el músculo liso. Además, existen células gliales que tradicionalmente se pensaba se encargaban únicamente de dar soporte mecánico a las neuronas. Sin embargo, cada vez existen más evidencias de que estas células también contribuyen a la regulación de la transmisión sináptica y la comunicación entre los sistemas nervioso e inmunológico, mostrando una notable plasticidad y siendo uno de los primeros tipos celulares en la respuesta a lesiones o invasión por patógenos (Coelho-Aguiar et al., 2015; Laranjeira et al., 2011). A su vez, las neuronas y células gliales entéricas también pueden influir en la respuesta de las células del sistema inmune innato y adaptativo. La capacidad de las neuronas entéricas para responder a citocinas inflamatorias y leucotrienos plantea la posibilidad de que los miembros de estas familias de moléculas de señalización pueden tener un papel importante en el desarrollo y maduración del SNE de los mamíferos (Muller et al., 2014).

Por último, el efecto de la microbiota en la formación de circuitos neurales en el intestino de los mamíferos toma cada vez más relevancia. Numerosos estudios tanto en invertebrados como en vertebrados, han establecido una conexión clara entre la flora microbiana y la fisiología intestinal. Este efecto se pone de manifiesto en la formación de circuitos neurales en el intestino de ratones libres de patógenos que mostraron alteraciones en la contractilidad muscular y una disminución en la densidad nerviosa en yeyuno e íleon, además de presentar reducción en la excitabilidad de neuronas sensoriales (Shin et al., 2011; Buchon et al., 2009).

Aunque la mayoría de los componentes anatómicos que forman el SNE se desarrollan durante la embriogénesis, las neuronas entéricas y glía continúan en su proceso de integración en circuitos neuronales funcionales durante varias semanas después del nacimiento. Esta observación sugiere que los cambios en la fisiología digestiva y el medio ambiente que están asociados con el establecimiento de la microflora luminal y con la maduración del sistema inmune de la mucosa, puedan afectar a la fase postnatal del desarrollo del SNE, y en particular a los subtipos de neuronas entéricas con un desarrollo más tardío (Kabouridis et al., 2015)

El SNE deriva, casi en su totalidad, de una estructura transitoria que aparece en los primeros estadios del desarrollo y formación del tubo neural, llamada Cresta Neural. (Yntema y Hammond, 1954). La progenie de la Cresta Neural son las células de la cresta neural (CCN), las cuales se forman a partir del ectodermo embrionario (Figura2).

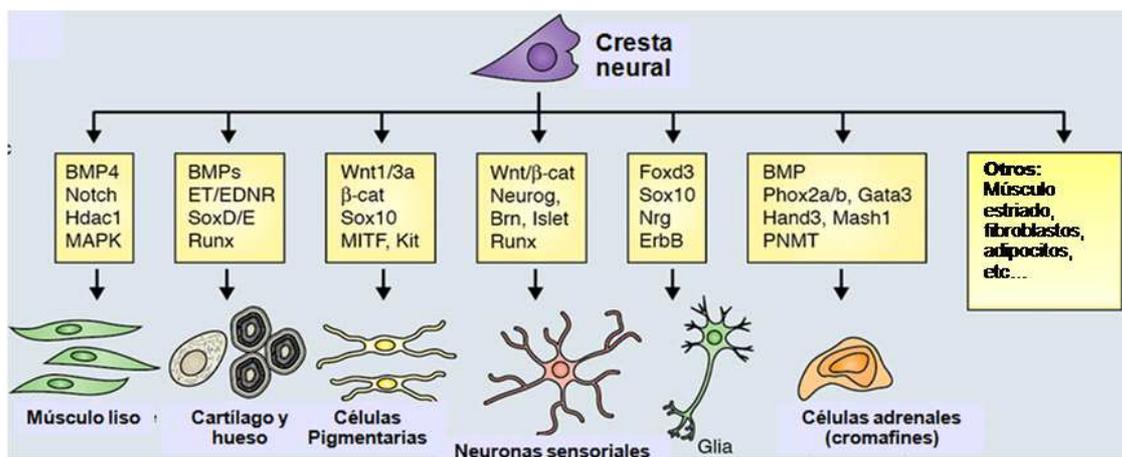


**Figura 2: Formación de las células de la cresta neural.** Los bordes de la placa neural formada a partir de las células neuroepiteliales empiezan a converger formando una ranura en forma de U. Los bordes se fusionan formando el tubo neural. La delaminación de la cresta neural tiene lugar una vez cerrado por completo el tubo neural. Es entonces cuando las células de la cresta neural sufren una serie de cambios perdiendo sus características epiteliales y transformándose en células mesenquimáticas, cambio que les permite abandonar el tubo neural y comenzar la migración, proceso conocido como transición epitelio-mesénquima (TEM).

La expresión combinada de un grupo de factores de transcripción (MSX1/2, PAX3/7, DLX5, AP2A, GBX2 Y ZIC1) confiere a la placa neural la capacidad de formar las células de la cresta neural. Las moléculas que controlan la morfogénesis durante el desarrollo del SNE son relativamente poco conocidas, aunque sí se conoce la acción de varios morfógenos clásicos. Las vías de señalización mediadas por BMP, FGF, WNT y

Notch/Delta y la expresión de factores de transcripción tales como AP2, n-Myc, Id, Snail, FoxD3, Ets-1, Sox8/9/10 son necesarios para mantener la multipotencia, promover la transición epitelio-mesénquima, e iniciar los procesos de delaminación y migración, afectando a la supervivencia y proliferación celular (Sauka-Spengler et al., 2008).

Los precursores derivados de la cresta neural son capaces de migrar por todo el embrión, proliferar, y por último diferenciarse dando lugar a una amplia variedad de tipos celulares y tejidos (Figura 3) (Lake et al., 2013).



**Figura 3: Diferentes tipos celulares a los que se diferencian las células de la cresta neural** (Adaptada de Mayor et al., 2013).

Sólo ciertas regiones bien definidas de la cresta neural darán lugar a las neuronas y células gliales que formarán los ganglios entéricos y desde los cuales las neuronas extenderán sus neuritas hacia sus dianas dando lugar a los complejos circuitos neuronales presentes en el SNE (Le Douarin et al., 1999)

Dichas células derivan de las regiones vagal, troncal y sacra de la cresta neural. Estas células precursoras entran en la región anterior del aparato digestivo del embrión, siguiendo unas rutas de migración definidas entre la séptima y la duodécima semana de gestación, en dirección rostro-caudal hasta colonizar por completo el intestino en desarrollo (Okamoto et al., 1967). Únicamente una pequeña porción del SNE procede de la región troncal de la cresta neural, limitada exclusivamente a estructuras anteriores al duodeno. Sin embargo, los precursores procedentes de la región vagal representan una aportación celular más amplia al tracto gastrointestinal,

colonizando las regiones más distales. Por último, se establece una segunda ola migratoria en la cual estarán implicadas las células de la cresta neural procedentes de la región sacra. Estas últimas, se encargarán de colonizar los ganglios pélvicos autónomos, y migrar más tarde hacia el intestino distal en dirección contraria (Kapur et al., 2000). El proceso migratorio se lleva a cabo en cadenas, en contacto unas con otras, que requerirá la presencia de diferentes niveles de expresión de moléculas de adhesión (McKeown et al., 2013). Aunque la ola migratoria se mueve en sentido rostro-caudal, dentro de ella cada célula de forma individual puede tomar una compleja e impredecible trayectoria.

Las células de la cresta neural que colonizan el tracto digestivo constituyen una población heterogénea multipotente, en algunos casos con capacidad de auto-renovarse, que incluye células con distinto grado de compromiso o diferenciación (Young et al., 2005). Es necesario que se establezcan unos correctos patrones de proliferación durante el desarrollo para que exista un número suficiente de precursores que aseguren la correcta formación del SNE. Estos precursores irán modificando de forma progresiva su fenotipo, según el estadio del desarrollo en que se encuentren, tanto durante su migración, como después de ella (Henion y Weston, 1997, Newgreen et al., 2002a, 2002b). Por ello, es necesario que estos precursores migren hasta el órgano diana y se diferencien a distintos tipos de neuronas y glía a lo largo del intestino para dar lugar al repertorio celular en número suficiente y correcta localización. Fallos en esta cadena de procesos restringen la fuente de precursores que más tarde dará lugar a las neuronas y glía entérica (Binder et al., 2008). Estos diferentes estadios son regulados por diversas vías de señalización que implican la secreción de moléculas por parte de las células del mesénquima intestinal, siendo crítica su ubicación y la ventana temporal en la que se expresan, con la consiguiente activación y represión de la expresión génica en la célula (Le Douarin et al, 1992).

### **1.1.1 Principales rutas de señalización durante el desarrollo del SNE**

Entre las principales vías de señalización y factores implicados en el control de la proliferación y la supervivencia de las CCN durante el desarrollo del SNE destacan la

ruta de RET y la ruta de EDNRB, aunque también existen otras vías también esenciales para un correcto desarrollo del SNE.

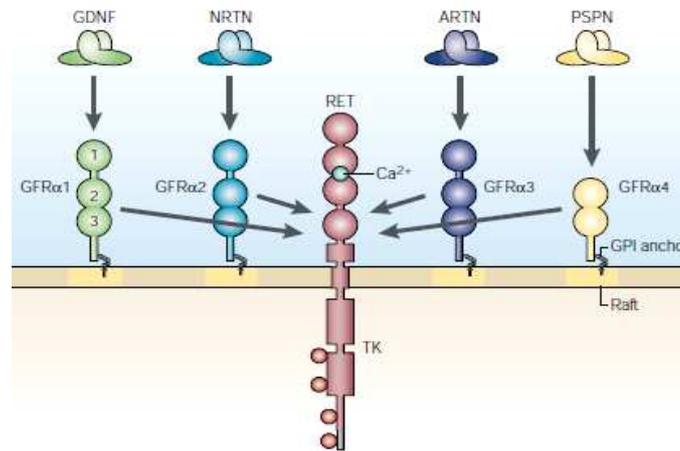
### **1.1.1. a) Ruta de señalización de RET**

El proto-oncogén *RET* (Rearranged during transfection) codifica para un receptor transmembrana con actividad tirosín-kinasa implicado en la activación de cascadas de señalización intracelular que median proliferación, diferenciación y supervivencia celular (Takahashi et al., 1988). *RET* se expresa mayoritariamente en la cresta neural, SNC, SNP y sistema excretor (Pachnis et al., 1993, Avantaggiato et al., 1994, Schuchardt et al., 1994, Tsuzuki et al., 1995). La proteína contiene un dominio intracelular, un dominio transmembrana y un dominio extracelular caracterizado por contener un péptido señal, así como una región con alta homología a la familia de moléculas de adhesión intercelular cadherinas, y una región rica en cisteínas muy conservadas entre especies (Takahashi et al., 1988, 1989). Dentro del dominio intracelular se incluye el dominio con actividad catalítica tirosín-kinasa, que se activa mediante fosforilación de residuos tirosínicos, desencadenando la activación de diversas rutas de señalización intracelular.

Existen tres isoformas proteicas de *RET*: *RET9* (1072 aa), *RET43* (1106 aa) y *RET51* (1114 aa) (Myers et al., 1995), de las cuales *RET9* y *RET51* son las dos isoformas mayoritarias, siendo *RET9* necesaria y suficiente para el desarrollo del SNE y sistema excretor (de Graaff et al., 2001).

La activación de *RET* requiere la formación de un complejo multimérico, en el que están implicados un ligando soluble de la familia de factores neurotróficos derivados de la glía (Glial Derived Neurotrophic Factors, GDNF), y un co-receptor anclado a la membrana celular a través de un enlace glicosil-fosfatidil-inositol (GPI) de la familia de receptores  $\alpha$  de GDNF ( $GFR\alpha$ ) (Treanor et al., 1996, Jing et al., 1996, Runeberg-Roos et al., 2007). Los ligandos de *RET* (GFLs) son 4 miembros de la superfamilia TGF- $\beta$ : GDNF, neurturina (NRTN), artemina (ARTN) y persefina (PSPN) (Lin et al., 1993), siendo todos ellos potentes factores de supervivencia neuronal (Figura 4) (Baloh et al., 2000). Su estructura proteica se caracteriza por la presencia de un dominio constituido por siete residuos de cisteína muy conservados y espaciados de

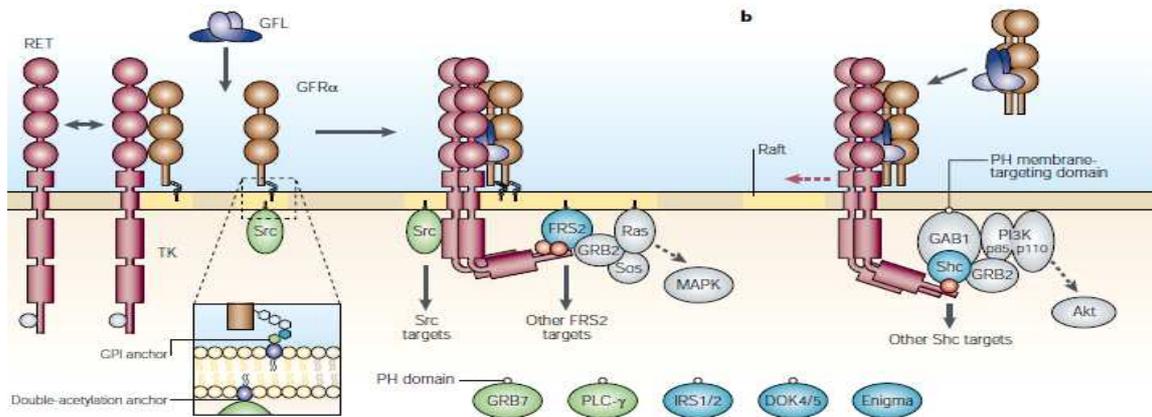
forma similar. Son moléculas sintetizadas como precursores proteicos, a partir de los cuales se obtendrá la proteína soluble homodimérica mediante rotura proteolítica.



**Figura 4: Interacciones que se establecen entre los distintos ligandos, co-receptores GFRα y RET**  
(Adaptada de Airaksinen et al, 2002)

GDNF, NRTN y ARTN están implicados en supervivencia de un amplio espectro de neuronas tanto periféricas como centrales, mientras que PSPN participa en la supervivencia de neuronas dopaminérgicas motoras y de la sustancia nigra tanto *in vivo* como *in vitro*, aunque se desconoce su implicación en supervivencia de neuronas periféricas (Takahashi et al., 2001). Hasta el momento se han identificado 4 co-receptores GFRα, de los cuales GFRα 1-3 poseen una secuencia con un elevado porcentaje de homología y una estructura proteica similar formada por tres dominios cisteínicos denominados GDNF/GAS1 (Airaksinen et al., 2002). Por último, GFRα4 presenta en su secuencia sólo un 40% de homología con el resto de co-receptores y su principal diferencia se encuentra en la ausencia del primer dominio cisteínico en el extremo N-terminal (Lindahl et al., 2000, 2001; Masure et al., 2000). Cada uno de los 4 ligandos de RET tiene una afinidad especial por un co-receptor GFRα concreto. Así GDNF se une preferentemente a GFRα1, NRTN a GFRα2, ARTN a GFRα3 y PSPN a GFRα4. Aun así, NRTN y ARTN pueden unirse a GFRα1, y GDNF puede unirse *in vitro* tanto a GFRα2 como a GFRα3, aunque con menor afinidad. A su vez, PSPN también

puede unirse a GFR $\alpha$ 4 y con menor afinidad a GFR $\alpha$ 1 (Figura 5) (Baloh et al., 1998; Sidorova et al., 2010).



**Figura 5: Mecanismos de unión del complejo GFL/GFR $\alpha$ /RET, activación del receptor y elementos celulares participantes en la cascada de señalización** (Adaptada de Airaksinen et al, 2002).

RET se sintetiza como monómero inactivo que requerirá para su activación la interacción con su ligando específico en la zona extracelular. Para dicha interacción es necesaria la presencia de un co-receptor (Runeberg-Roos et al., 2007). El ligando homodimérico se une a dos moléculas de GFR $\alpha$  y el complejo formado interactúa a su vez con dos moléculas de RET, induciendo la dimerización y autofosforilación de los residuos tirosínicos del dominio intracelular (Airaksinen et al., 1999) y desencadenando la activación de la cascada de señalización (Takahashi et al., 2001; Kawamoto et al., 2004). Se activan varias rutas de señalización intracelular como resultado de las interacciones de diferentes proteínas adaptadoras con las formas activas de RET. Las rutas mejor conocidas son RAS-ERK, PI3K/ARK, JNK y PLC- $\gamma$ .

Ratones knockout en los cuales han sido inactivadas las dos copias del gen *Gdnf* o *Gfr $\alpha$ 1* (*Gdnf*<sup>-/-</sup> y *Gfr $\alpha$ 1*<sup>-/-</sup>, respectivamente) presentan un fenotipo muy similar al de los ratones *Ret*<sup>-/-</sup>, con agenesia renal y ausencia de SNE (Schuchardt et al., 1994; Moore et al., 1996; Sánchez et al., 1996; Pichel et al., 1996; Enomoto et al., 1998) debido probablemente a fallos en la proliferación, migración y diferenciación de los precursores entéricos. Sin embargo, ratones *Nrtn*<sup>-/-</sup> o *Gfr $\alpha$ 2*<sup>-/-</sup> solamente presentan un descenso en la densidad de neuronas colinérgicas del SNE y no presentan anomalías

renales (Heuckeroth et al., 1999; Rossi et al., 1999). Por otra parte ratones Knockout en los cuales sólo ha sido inactivada una copia del gen *Ret* o *Gdnf* (*Ret*<sup>+/-</sup> y *Gdnf*<sup>+/-</sup>, respectivamente) no presentan ninguna alteración entérica o renal tanto al nacer como en la etapa adulta.

### ***1.1.1.b) Ruta de señalización de EDNRB-EDN3***

En mamíferos existen 3 tipos de endotelinas (EDN1, EDN2 y EDN3) codificadas por 3 genes independientes (Inoue et al., 1989). Estas proteínas actúan como mensajeros intercelulares de acción local a través de receptores de membrana unidos a proteína G (EDNR $\alpha$  y EDNR $\beta$ ). EDNR $\alpha$  tiene alta afinidad por EDN1 y EDN2, y baja afinidad por EDN3, mientras que EDNR $\beta$  tiene afinidad similar por los tres ligandos (Sakurai et al., 1992). Las endotelinas se secretan como preproendotelinas, es decir, precursores de mayor tamaño inactivos, que serán procesados por las proteasas ECE1 (Endothelin-Converting Enzyme 1) y furina, generando la proteína activa que es secretada al medio extracelular. Durante el desarrollo del SNE, EDN3 es la única proteína secretada por las células mesenquimáticas del tracto digestivo (Brand et al., 1998; Nataf et al., 1998; Leibl et al., 1999).

EDN3 es capaz de inhibir la quimioatracción que GDNF ejerce sobre los precursores entéricos (Kruger et al., 2003). Los niveles más elevados de expresión de EDN3 se producen próximos o previamente al momento en que el frente de precursores entéricos inicia su movimiento migratorio (Barlow et al., 2003).

El receptor EDNRB se expresa concretamente en cresta neural vagal y troncal y en varios linajes de células derivadas de la misma durante los estadíos iniciales del desarrollo, previo a la migración celular. Más tarde se mantiene su expresión en aquellas células que migran a lo largo de la ruta dorso-ventral, y tras la colonización por parte de estas células de los tejidos diana, principalmente se expresa en células adreno-medulares y de los ganglios del SNP incluyendo los ganglios del SNE (Nataf et al., 1996; Brand et al., 1998; Woodward et al., 2000).

EDNRB es un receptor de membrana unido a proteína G. Familia de receptores capaces de transducir señales al interior celular tras la unión del ligando iniciándose una cascada de señalización intracelular que implica la activación de fosfolipasa C- $\beta$

(PLC- $\beta$ ) dando lugar a un aumento en los niveles intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  mediado por el aumento en los niveles de Inositol trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG) (Kloog et al., 1989), evento necesario para la activación de la ruta ERK/MAPK (Crameret et al., 2001). EDNR $\beta$  es capaz de unirse a distintos tipos de proteína G, y esto podría explicar cierta plasticidad funcional a la hora de transmitir distintos tipos de señales (Takigawa et al., 1995; Liu et al., 2003).

Fallos en esta ruta de señalización, tienen consecuencias a nivel de diferenciación, migración, proliferación y supervivencia de los precursores de los melanocitos y de los ganglios entéricos. Ratones *Edn3*<sup>-/-</sup>, *EdnrB*<sup>-/-</sup>, ya sean mutantes espontáneos o dirigidos, presentan un fenotipo caracterizado por la ausencia de neuronas entéricas en la porción más distal del tubo digestivo, posiblemente debido a la parada prematura en la migración de las células procedentes de la región sacra (Hosoda et al., 1994; Baynash et al., 1994).

Es por ello que mutaciones en estos genes están relacionadas con defectos pigmentarios, sordera y enfermedad de Hirschsprung (HSCR, OMIM 142623), ya que se ve comprometida la integridad de melanocitos de piel y oído interno así como de las células de los ganglios entéricos (Edery et al., 1996; Puffenberger et al., 1994; Hofstra et al., 1996; Bidaud et al., 1997).

### **1.1.2 Factores de transcripción implicados en el desarrollo del SNE**

Existen numerosos estudios que muestran la participación de diferentes factores de transcripción en el desarrollo del SNE. Ratones knockout de los genes *Sox10* y *Phox2b* presentan ausencia de neuronas entéricas a lo largo del tracto gastrointestinal mientras que *Mash1* es esencial en el caso de supervivencia de neuronas que colonizan el esófago, estando en todo los casos su actividad relacionada con la regulación tanto de *Ret* como de *Ednrb*. Asimismo, la eliminación del factor de transcripción *Zfhx1b* en ratones frena el flujo migratorio de CCN hasta la región proximal del duodeno. Cada vez se conocen más factores de transcripción implicados en el desarrollo del SNE tales como *Hand2*, *Hox11L.1* o *Hoxb5* (Burzynski et al., 2009).

Otros ejemplos de fina regulación del desarrollo del SNE por parte de diferentes factores de transcripción se produce en el epitelio intestinal, donde una célula progenitora multipotente dará lugar a cuatro linajes de células diferentes (tres secretoras y una de absorción), dependiendo de las señales recibidas del medio y de los diferentes niveles de expresión de distintos factores de transcripción. Una vez que la célula se ha comprometido hacia el linaje secretor o de absorción, deberá entonces diferenciarse, en concreto, en este momento son los factores de transcripción Neurogenina3 y Pax6 los que promueven la diferenciación final a células enteroendocrinas. Klf4 da lugar a la diferenciación de células caliciformes (Zheng et al., 2009) y Elf-3 activa la expresión de TgfβRII promoviendo la diferenciación final de dichas células caliciformes y absortivas (Flentjar et al., 2007).

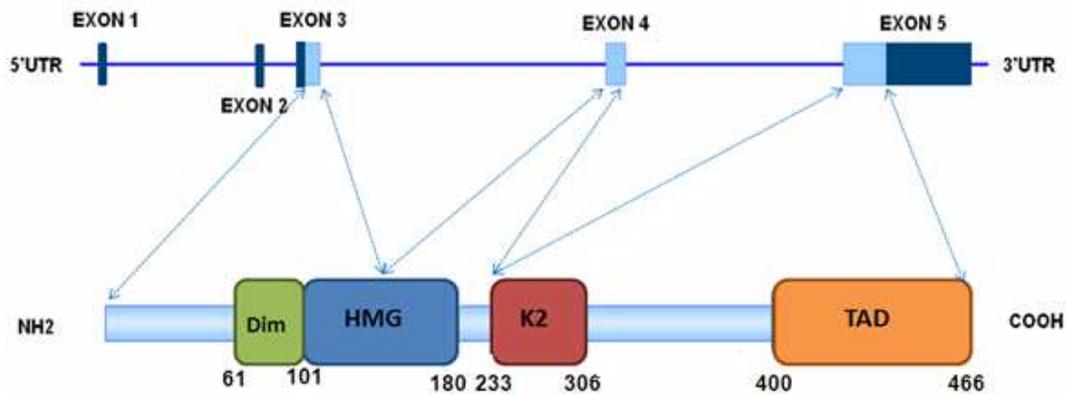
Algunos de los factores de transcripción más importantes descritos como moduladores de las CCN y cuya actividad está claramente relacionada con el desarrollo del SNE se detallan a continuación.

#### **1.1.2.a) SOX10**

*SOX10 (Sex determining region Y box 10)* es un gen que codifica para una proteína que pertenece a la familia de factores de transcripción SOX, familia proteica caracterizada por la presencia del dominio HMG (Hight mobility group) de unión al ADN.

Este gen consta de 5 exones, de los cuales, los exones 1 y 2 no son codificantes, el codón ATG e inicio de la transcripción se sitúa en el exón 3 y el codón de parada se encuentra en el exón 5. Codifica para una proteína de 466 aminoácidos, con diferentes dominios funcionales. El dominio HMG, es el dominio de unión a ADN, el cual presenta un núcleo hidrofóbico altamente conservado a través del cual es capaz de unirse al surco menor del ADN, y que además resulta esencial para el mantenimiento de la estructura terciaria de la proteína (Bondurand et al., 2013). Previo al dominio HMG se encuentra el dominio de dimerización, necesario para la dimerización de SOX10 en aquellos casos en que actúa como homodímero (Bowles et al., 2000). Otro de los dominios funcionales es el denominado K2 o Región-E, cuya delección en ratones ha revelado una función transactivadora dependiente de tejido durante el desarrollo (Schreiner et al., 2007).

Además, parece mediar la interacción con AP2 $\alpha$  (Activator Protein 2 alpha), sugiriendo una posible actividad como co-factor implicado en la interacción proteína-proteína (Wahlbuhl et al., 2012). Por último, en el extremo carboxi terminal, se encuentra el dominio de transactivación, necesario para la activación transcripcional que ejerce esta proteína (Figura 6).

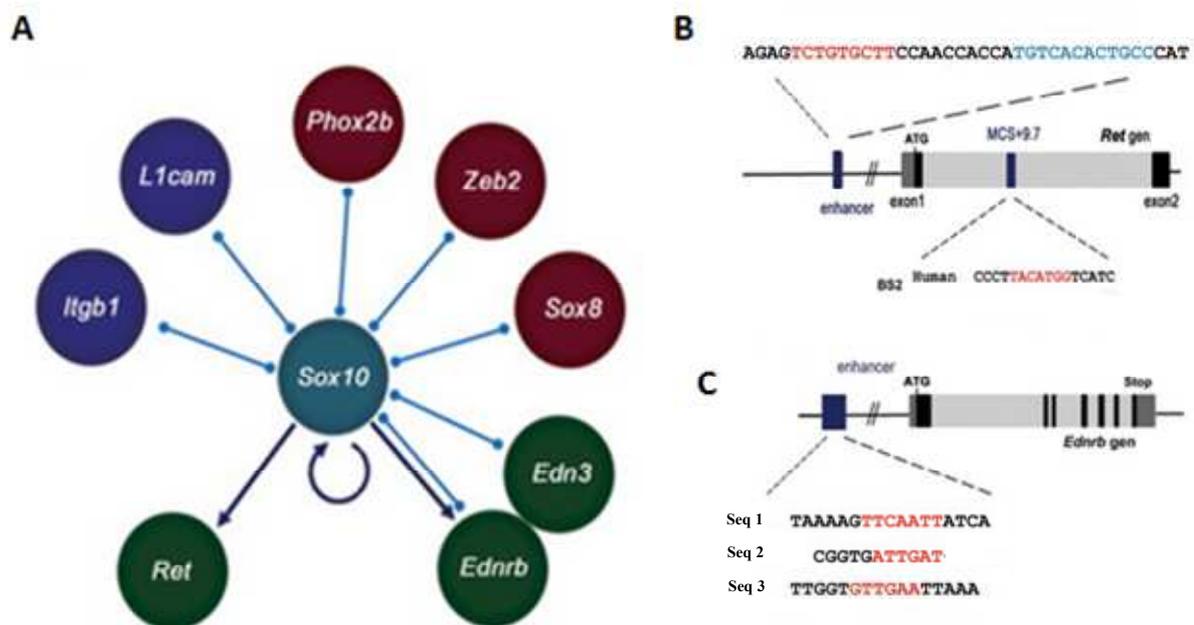


**Figura 6: Representación esquemática de la estructura genómica de *SOX10* y de la proteína que codifica.** Se muestran los dominios funcionales de la proteína. Dim: Dimerización. HMG: dominio de unión al ADN. TAD: dominio de transactivación y dominio K2.

En ratones, Sox10 se expresa en precursores entéricos comprometidos con la estirpe neuronal y glial y parece estar implicado en la supervivencia de éstos (Southard-Smith et al., 1998). En otras especies, se ha detectado su expresión en cresta neural craneal y en melanoblastos derivados de cresta neural (Cheng et al., 2000; Dutton et al., 2001; Aoki et al., 2003). En humanos, SOX10 se expresa tanto en las CCN en migración y sus derivados, como en ganglios craneales y espinales (Bondurand et al., 1998). Su expresión está relacionada con el mantenimiento de la pluripotencialidad de las CCN a bajas concentraciones, y con la inhibición de la diferenciación neuronal a dosis elevadas, favoreciendo la generación de glía periférica y melanoblastos (Kim et al., 2003; Paratore et al., 2001).

SOX10 puede ejercer su función uniéndose solo o en combinación con otros factores de transcripción. La unión de SOX10 a sus genes diana favorece en estos un cambio conformacional modulando así su expresión. Además, es capaz de mantener la estructura de la cromatina y puede reclutar la unión de otros factores de transcripción

para modular la expresión génica, no sólo por el cambio de topología en el ADN, sino también, por interacción directa proteína-proteína. Diferentes co-factores han sido identificados, incluyendo PAX3, MITF, SP1, EGR2, OCT6, NMI, AP2A, FOXD3 y SOX2. En algunos casos, la actividad cooperativa depende únicamente de la unión de SOX10 al ADN y el reclutamiento posterior del co-factor, como es el caso de *Foxd3*. Puede ocurrir también que sea necesaria la unión de ambos factores para dirigirse a secuencias reguladoras de genes como es el caso de la unión de SOX10 y PAX3 en los elementos reguladores de *MITF*; y en otros casos, la unión del co-factor es suficiente para reclutar SOX10 como en el caso de la activación de *RET* y *EDNRB* (Figura 7) (Bondurand et al., 2013).



**Figura 7: SOX10 interactoma; RET y EDNRB como genes diana de SOX10.** A) Diagrama del interactoma de SOX10 durante el desarrollo del SNE. Las flechas azul oscuro indican la regulación directa de *Ret*, *Ednrb* y el propio *Sox10* por *Sox10*. B) Esquemas de los genes *RET* y *EDNRB* en humano y secuencias reguladoras identificadas a las que se une SOX10 (Adaptada de Bondurand et al., 2013).

*RET* y *EDNRB* son dos de los genes diana de la regulación de SOX10, los cuales tienen una clara implicación en el desarrollo del SNE y de otras estructuras derivadas de la cresta neural (Lang et al., 2003; Zhu et al., 2004). En modelos animales se ha demostrado como *Sox10* es capaz de regular la expresión espacio-temporal tanto de *Ret* como de *Ednrb* en las CCN (Bondurand et al., 2006). SOX10 puede además

activar la transcripción de *RET* mediante la unión directa a una región reguladora (Emison et al., 2010) y su interacción con *PAX3* favorece la actividad transcripcional de *RET* con respecto a la unión en solitario de *PAX3* (Lang et al., 2003).

Durante el desarrollo de las neuronas entéricas la expresión de *SOX10* se pierde (Young et al., 2003), lo que parece ser una señal para la transición desde precursor neural no comprometido hacia precursor con cierto grado de compromiso con la estirpe neuronal. Por tanto, un aumento de la expresión de *SOX10* en progenitores entéricos, parece estar ligado a una disminución en la neurogénesis. Sin embargo, como resultado de estudios *in vivo* en ratón, parece que *Sox10* tendría un efecto antagonista sobre las CCN promoviendo tanto la expresión de receptores que inducen diferenciación como de receptores que están implicados en el mantenimiento de dichas células en su estado indiferenciado (Bondurand et al., 2006).

El fenotipo llamado megacolon dominante (Dom, Dominant megacolon), caracterizado por aganglionosis en el colon, defectos de pigmentación, así como pérdida de neuronas y glía en el SNP, se observa en ratones que portan una mutación de manera natural en uno de los alelos del gen *Sox10*, y se utiliza como modelo del síndrome de Waardenburg tipo 4 (SW4; OMIM 277580) en humanos (Herbarth et al., 1998; Southard-Smith et al., 1999). Estos ratones presentan de forma normal estructuras embrionarias derivadas de la cresta neural, poniendo de manifiesto que la expresión de *Sox10* no es necesaria durante las primeras especificaciones de la cresta neural, pero sí en estadios posteriores, ya que una vez que las CCN llegan al órgano diana son capaces de migrar a lo largo del mismo en ausencia de actividad *Sox10*, pero sufren apoptosis antes de poder diferenciarse, mostrando un papel en la supervivencia de estas células (Kim et al., 2003).

### **1.1.2.b) PHOX2B**

La proteína codificada por *PHOX2B* (*Paired-like Homeobox 2B*) es un miembro de la familia de proteínas homeobox localizadas en el núcleo. Junto con *PHOX2A*, entre otros, conforman una familia de proteínas llamadas en su conjunto HOX, las cuales están implicadas en el control del modelado de distintos órganos, incluyendo el sistema gastro-intestinal durante el desarrollo embrionario (Kapur et al., 2004). Se

expresa en SNC y SNP durante el desarrollo embrionario y en los ganglios entéricos en la fase adulta.

Se expresa en precursores entéricos procedentes de las regiones vagal y sacra de la cresta neural. Estudios en ratones knockout en *Phox2b* han mostrado su importancia en el desarrollo del SNE. Así, aquellos ratones *Phox2b*<sup>-/-</sup> carecen de sistema nervioso autónomo, implicando la ausencia de SNE a lo largo del tracto gastrointestinal. En estos ratones las células de la cresta neural llegan a la parte anterior del intestino, pero no son capaces de migrar más allá, dando lugar a un fenotipo muy similar al mostrado por ratones *Ret*<sup>-/-</sup> en estos estadios (Pattyn et al., 1999).

Esta función de *Phox2b* durante el desarrollo del SNE se mantiene en otras muchas especies, entre las cuales se encuentra el pez-cebra. En estos animales, *Phox2b* ha mostrado su implicación en el desarrollo de neuronas entéricas. Se expresa tanto en precursores de neuronas entéricas como en neuronas que están en estadios de diferenciación tempranos. La bajada de expresión de *Phox2b* (Knockdown *Phox2b*) en pez-cebra da como consecuencia una marcada reducción en el número de neuronas entéricas, debido a que los precursores entéricos sólo son capaces de migrar hasta el intestino anterior (Elworthy et al., 2005).

### **1.1.2.c) PAX3**

*PAX3* (*Paired-box-containing*) codifica para un factor de transcripción perteneciente a la familia de los denominados "*paired-box*", factores de transcripción caracterizados por la presencia de dos dominios de unión al ADN: el dominio bipartito emparejado (paired domain, PD) y el homeodominio tipo emparejado (homeodomain, HD). Se expresa en distintos tipos celulares derivados de la cresta neural, incluyendo neuronas entéricas. Los ratones *Pax3*<sup>-/-</sup> mueren durante el período de gestación debido a defectos a nivel cardíaco y en el tubo neural, y presentan ausencia de neuronas en el SNE (Lang et al., 2000). Parece esencial para iniciar la expresión de RET en los precursores entéricos y coopera con SOX10 para favorecer la activación de la transcripción de *RET* durante el desarrollo del SNE (Lang et al., 2003).

#### **1.1.2.d) MASH1**

*MASH1 (Mammalian achaete-scute homologue 1)* codifica para un miembro de la familia de factores de transcripción caracterizados por un dominio hélice-bucle-hélice (BHLH) y está implicado en la neurogénesis tanto del SNC como del SNP. Durante el desarrollo embrionario se expresa en diferentes células derivadas de la cresta neural, incluidas aquellas que van a colonizar el tubo digestivo. En ausencia de Mash1, las células de la cresta neural son capaces de migrar hasta su correcta localización, pero los precursores neuronales pierden su capacidad de diferenciación hacia neuronas de tipo serotoninérgicas (Sasselli et al., 2012). Debido a que su carencia da lugar a lesiones muy localizadas, se considera un factor de actuación tardía en el desarrollo del SNE

#### **1.1.2.e) HOX11L.1**

*HOX11L.1 (Homeobox transcription factor)* se expresa en neuronas entéricas tanto en etapas del desarrollo como en edad adulta. Ratones *Hox11L.1*<sup>-/-</sup> nacen sin fenotipo, pero se observan anomalías en el tamaño y distribución de ganglios y neuronas entéricas, desarrollando megacolon a las pocas semanas de vida. Esto sugiere que esta proteína es necesaria para un correcto mantenimiento y funcionamiento del SNE, estando implicada en la regulación de la apoptosis postnatalmente (Sasselli et al., 2012).

#### **1.1.2.f) ZFHX1B**

*ZFHX1B (Zinc Finger Homeobox 1B)* codifica para una proteína que es miembro de la familia Zfh1 de proteínas con dominio de unión dedos de zinc. Se expresa en los precursores entéricos vagales hasta el momento de la colonización del tubo digestivo y más tarde en el desarrollo en todo el SNE, siendo un factor de transcripción importante en la especificación neural (Nitta et al., 2007). Ratones *Zfhx1B*<sup>-/-</sup> muestran aganglionosis intestinal en el momento del nacimiento, entre otras malformaciones (Van de Putte et al., 2007). Además, es capaz de interactuar con Sox10 para una correcta formación del SNE (Stanchina et al., 2010).

### **1.1.2.g) HAND2**

*HAND2* (*Heart and neural crest derivatives expressed protein*) codifica para una proteína que pertenece a la familia de factores de transcripción caracterizados por un dominio hélice-bucle-hélice. Es esencial para la diferenciación tanto de estructuras extra-embrionarias como embrionarias, incluyendo el intestino y otros tejidos derivados de la cresta neural (D'Autreaux et al., 2004). Forma parte de una red de factores de transcripción capaces de regularse de una manera cruzada, incluyendo a MASH1, PHOX2A y PHOX2B, entre otros (Gershon et al., 2006). Ratones *Hand2*<sup>-/-</sup> contienen precursores neurales en todo el intestino, pero estos precursores aislados no son capaces de diferenciarse *in vitro* a neuronas ni a glía (D'Autreaux et al., 2004). Por ello, *HAND2* parece ser necesario para una correcta neurogénesis durante la formación del SNE y para el mantenimiento de las células gliales entéricas.

-----

Hasta el momento existen múltiples evidencias de factores de transcripción implicados en el desarrollo del SNE. Aún así, todavía existen muchas cuestiones sin resolver en relación a diferentes mecanismos subyacentes relacionados con la toma de decisiones de los precursores entéricos hacia los diferentes linajes de neuronas entéricas presentes en el tracto gastrointestinal maduro. Algunas de estas cuestiones como, cuáles son los circuitos que se establecen entre ellas, o cómo las CCN se integran espacial y temporalmente para dar lugar a la colonización uniforme del intestino y configurar los ganglios entéricos, cuál es el grado de implicación de estos factores de transcripción en relación con el desarrollo del SNE, y cuál sería su contribución en la aparición de diferentes trastornos intestinales en humanos, permanecen sin ser del todo esclarecidas.

El desarrollo del SNE es un complejo proceso que está finamente regulado por una gran cantidad de factores y moléculas de señalización tanto intrínsecas como extrínsecas a las células progenitoras derivadas de la cresta neural. Cada vez es mayor el número de estudios que apoyan que el amplio potencial de diferenciación que poseen las CCN deben de estar bajo una estricta regulación tanto genética como epigenética, siendo crítica en muchos aspectos del desarrollo de la cresta neural y

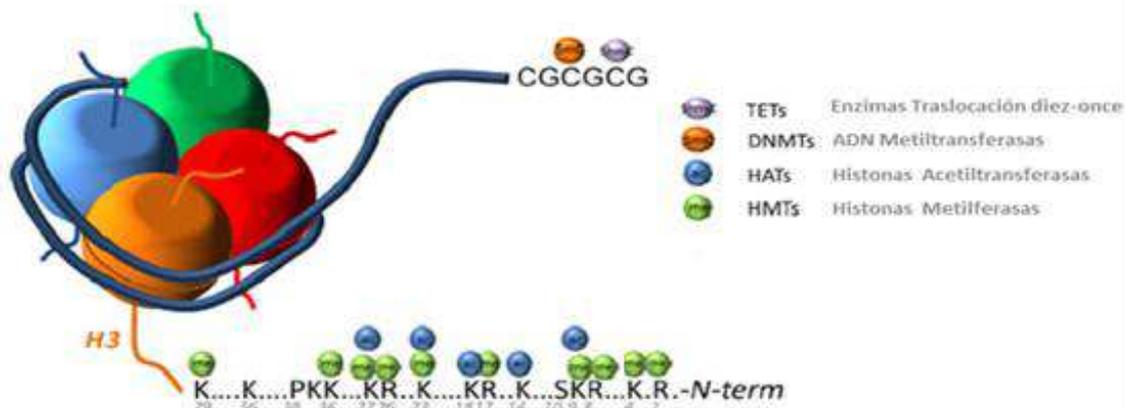
contribuyendo al mantenimiento de la expresión génica y la identidad celular (Hu et al., 2014).

### **1.1.3. Regulación epigenética de las células de la cresta neural y su posible implicación en el desarrollo del SNE**

El estudio de la epigenética comenzó a mediados del siglo pasado cuando se empezaron a establecer las primeras definiciones. Waddington introdujo la palabra '*epigenética*', derivada de la palabra aristotélica '*epigenesis*', como un nombre apropiado para la rama de la biología que estudiaba las interacciones causales entre los genes y sus productos dando como resultado fenotipos diferentes (Waddington CH. 1953).

Las modificaciones epigenéticas pueden alterar tanto la estructura de la cromatina como la función del genoma a través de diferentes procesos de modificación del ADN. Estas modificaciones epigenéticas pueden clasificarse según el papel que desempeñen en el establecimiento del código epigenético dando lugar a una mayor o menor actividad génica. Las más importantes incluyen eventos de remodelación de la cromatina, modificación de las histonas y metilación del ADN (Hu et al., 2014). Contribuyen de una manera muy importante en el correcto desarrollo de las células de la cresta neural, controlando diversos aspectos de forma tanto temporal como espacial dentro de su desarrollo. Son capaces de actuar tanto a nivel de promotor como de regiones potenciadoras o "*enhancers*" permitiendo que el ADN adquiriera una conformación accesible para la transcripción, o de manera contraria, eliminando las marcas activas promoviendo la represión de la transcripción (Liu et al., 2011).

Cada linaje celular vendrá determinado por un patrón epigenético específico para cada estadio del desarrollo (Figura 8). El conocimiento de los patrones específicos de las CCN es fundamental para la comprensión tanto del desarrollo de las estructuras derivadas de la cresta neural, como de las enfermedades relacionadas con malformaciones de dichas estructuras.



**Figura 8: Diagrama de las diferentes marcas epigenéticas identificadas a nivel de la histona H3 y el ADN** (Adaptada de Hu et al., 2014).

### **1.1.3.a) Metilación del ADN**

La metilación del ADN consiste en la adición de un grupo metilo en la posición 5' del anillo pirimidínico de las citosinas (5 metilcitosina o 5mC), siendo ésta una modificación del ADN muy conservada en la mayoría de plantas y animales (Law et al., 2010). En los mamíferos, alrededor del 60–90% de los residuos de citosina se encuentran metilados dentro de las llamadas islas CpG, definidas como regiones del ADN con un porcentaje del dinucleotido CG superior al 50%, las cuales tienden a concentrarse en la región promotora de aproximadamente un 60% de los genes codificantes en humanos (Gardiner-Garden et al., 1987; Namihira et al., 2004).

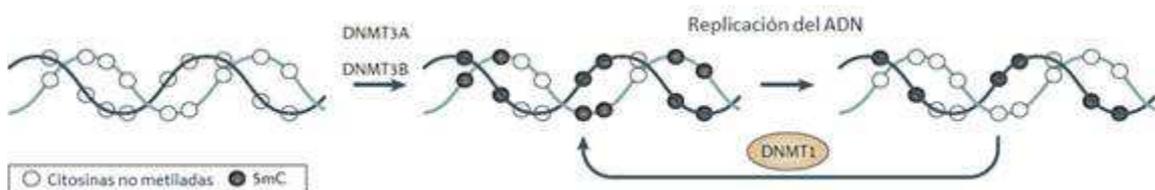
Durante el desarrollo embrionario, la metilación del ADN es uno de los procesos necesarios para la determinación de los distintos linajes celulares que conforman un organismo adulto (Cedar et al., 2008). Se relaciona principalmente con el silenciamiento génico, ya que la presencia de grupos metilo en el surco mayor de la doble hélice de ADN interfiere con la unión de factores de transcripción que activan la transcripción de un gen específico. Un número muy elevado de factores de transcripción tienen sus sitios de unión en secuencias ricas en CG, que en la mayoría de los casos corresponden a Islas CpG y por tanto, estos factores de transcripción serán incapaces de unirse a dichas regiones cuando éstas se encuentren metiladas.

Además, la metilación está implicada en procesos de impronta génica e inactivación del cromosoma X silenciado en el caso de las hembras (Ooi et al., 2009).

Por otro lado, la desmetilación del ADN tiene un papel importante a la hora de reprogramar células durante los estadios más tempranos del desarrollo, permitiendo que recuperen su capacidad pluripotente (Mayer et al., 2000).

La metilación del ADN es un proceso que está mediado por la familia de las ADN metiltransferasas (DNMTs): DNMT1, DNMT3A y 3B. Estas enzimas catalizan la transferencia de un grupo metilo desde la S-adenosil-L metionina (SAM) hasta la posición 5' del anillo de la citosina (Turek-Plewa et al., 2005). Por otro lado, los procesos de desmetilación activa del ADN están catalizados por la actividad de una familia de proteínas llamada TET (ten-eleven translocation), encargadas de la transformación de la 5mC en 5-hidroximetil-citosina (5hmC) (Tahiliani et al., 2009).

Atendiendo a su función, estas ADN metiltransferasas se pueden organizar en dos grupos principales: DNMT1, y las DNMT3 (DNMT3A, DNMT3B y DNMT3L). DNMT1, también denominada metiltransferasa de mantenimiento, actúa preferentemente durante la replicación del ADN, reparando y manteniendo los patrones de metilación de la hebra madre (Law et al., 2010). Esta enzima es capaz de metilar tanto ADN no metilado como hemimetilado, aunque presenta una marcada preferencia por este último (Okano et al., 1999). Una vez que se ha establecido un primer patrón de metilación *de novo* mediado por la actividad de DNMT3A y DNMT3B, DNMT1 será reclutada al núcleo a través de la interacción con PCNA (Proliferating cell nuclear antigen), uno de los componentes principales de la maquinaria de replicación (Figura 9) (Law et al., 2010).



**Figura 9: Mantenimiento semi-conservativo de la metilación de citosina (5mC) en los sitios CpG, durante la embriogénesis.** Los patrones de metilación del ADN se establecen inicialmente por la actividad de las metiltransferasas *de novo*, DNMT3A y DNMT3B. Después de cada ronda de replicación la metiltransferasa DNMT1 copia los patrones de metilación de la cadena parental sobre la cadena hija (Adaptada de Chen et al., 2014).

DNMT3A y DNMT3B son las metiltransferasas, encargadas de establecer los patrones de metilación *de novo* durante el desarrollo embrionario (Cheng y Blumenthal, 2008). La actividad tanto de DNMT3A como DNMT3B puede ser modulada por un miembro de la familia que es catalíticamente inactiva, DNMT3L, la cual actúa como co-factor de las anteriores y se relaciona con la represión epigenética (Jurkowska et al., 2011; Siddique et al., 2012; Wienholz et al., 2010). Aunque DNMT3A y DNMT3B presentan funciones comunes, sus patrones de expresión y las dianas sobre las que actúan son diferentes durante el desarrollo. 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 knockout de *Dnmt3a*<sup>-/-</sup> muere varias semanas tras su nacimiento, y los ratones *Dnmt3b*<sup>-/-</sup> presentan defectos a nivel del tubo neural y deterioro en el crecimiento, lo que sugiere que dichas proteínas son esenciales durante el desarrollo (Okano et al., 1999).

La metilación *de novo* juega un papel importante en la organización y compartimentación del genoma durante la diferenciación de tejidos, momento en el que se establecen los patrones de expresión específicos. 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). 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 (Ehrlich et al., 2008; Jaenisch et al., 2003; Linhart et al., 2007; Yan et al., 2011). En células embrionarias humanas la disminución de la expresión de DNMT3B acelera los procesos de diferenciación, lo que supone un incremento en la expresión de marcadores de diferenciación específicos de las CCN como son PAX3, PAX7, FOXD3, SOX10 y SNAI2 (Martins-Taylor et al., 2012). Además, DNMT3B es responsable de la metilación específica de pequeñas secuencias repetitivas centroméricas, siendo esencial en el mantenimiento de la estabilidad cromosómica. En humanos, mutaciones en *DNMT3B* son responsables del Síndrome de inmunodeficiencia, inestabilidad de la

región centromérica y anomalías faciales (ICF, OMIM 242860), el cual incluye dismorfias en la porción media de la cara, retraso del crecimiento y retraso psicomotor (Ehrlich et al., 2008; Jin et al., 2008).

La proteína DNMT3B consiste en un dominio N-terminal que posee la actividad reguladora y de unión al ADN que se ha denominado PWWP, así como un dominio rico en cisteína (Cys), y un dominio C-terminal catalítico conservado a lo largo de los miembros de la familia DNMT. Éste último contiene diez motivos aminoacídicos (I a X), seis de los cuales están altamente conservados en todas aquellas proteínas responsables de la metilación de la posición 5 de las citosinas. Los motivos I y X se pliegan juntos formando el sitio de unión AdoMetil, mientras que el motivo IV contiene el dipéptido prolina-cisteína que proporciona el tiolato al sitio activo. El motivo VI contiene el residuo glutamilo que protona la posición 3 de la citosina diana. Por último, el motivo IX se encarga de mantener la estructura del dominio de reconocimiento del ADN (normalmente situado entre los motivos VIII y IX).

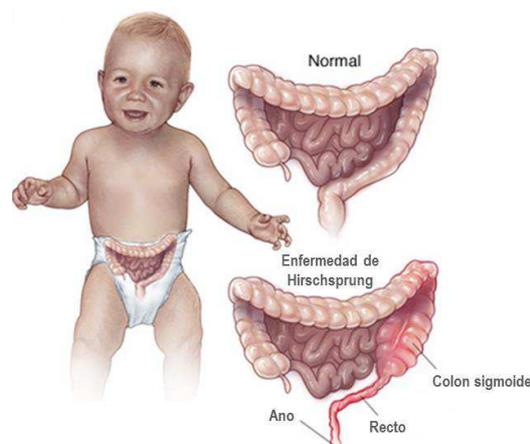
## **1.2 Neurocristopatías**

La cresta neural, como ya se ha descrito, es una estructura transitoria y pluripotente cuya progenie, las CCN, darán lugar a diferentes tipos celulares que formarán parte de diversos tejidos. El término neurocristopatía fue acuñado por primera vez en 1976 por Bolande y se utiliza para describir aquellas enfermedades que derivan de un defecto en los procesos de proliferación, diferenciación y/o migración de las CCN. Debido a la diversidad de estructuras que se originan a partir de las CCN, fallos en su desarrollo pueden ser múltiples y variados, manifestándose de forma aislada o formando parte de síndromes. Estos fallos, abarcan tumores, malformaciones y anomalías individuales o multifocales con diferentes combinaciones. Síndrome de neoplasia múltiple tipo 2 (MEN2), neuroblastoma (NB), malformaciones cono truncales, enfermedad de Hirschsprung (HSCR) y síndrome de Waardenburg (SW) son ejemplos de cada una de estas categorías.

## 1.2.1 La enfermedad de Hirschsprung

### 1.2.1.a) Etiopatogenia y características clínicas de HSCR

La enfermedad de Hirschsprung o megacolon agangliónico (OMIM 142623), es una neurocristopatía resultante de fallos en los procesos de migración, proliferación, diferenciación y/o supervivencia de las CCN entre la séptima y duodécima semana de gestación, durante el desarrollo del SNE, dando lugar a la ausencia de ganglios nerviosos en los plexos mientérico y submucoso en una porción variable del intestino grueso. La musculatura del colon pierde su inervación y por lo tanto su capacidad contráctil, de forma que la materia fecal se acumula en la región anterior a esta estenosis funcional provocando el megacolon característico en estos pacientes (Figura 10) (Okamoto et al., 1967; Amiel et al., 2008). Los pacientes presentan dificultad para expulsar el meconio durante las primeras 48 horas de vida, distensión abdominal, que sufre ligera mejoría con estimulación rectal o administración de enemas, además de vómitos y enterocolitis neonatal.



**Figura 10:** Esquema del intestino grueso con las distintas regiones anatómicas indicadas, en las que se muestra las diferencias entre un intestino normal y un intestino de un paciente HSCR en el que se observa megacolon (derecha).

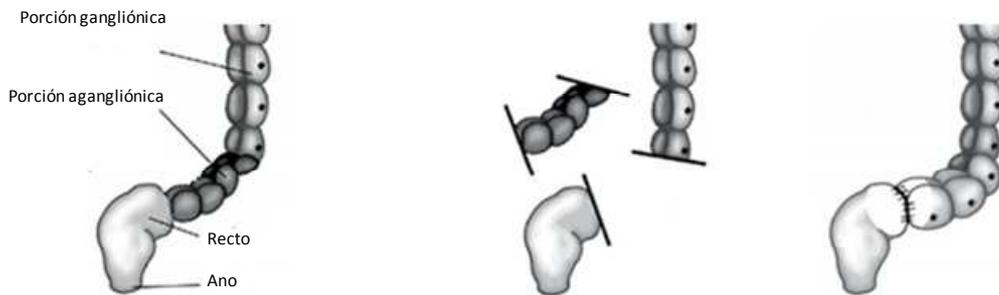
El diagnóstico de estos pacientes requiere estudios histológicos e inmunohistoquímicos, ya que existen otros trastornos como la displasia intestinal neuronal, ganglioneuromatosis intestinal, hipoganglionosis aislada, ganglios

inmaduros, acalasia del esfínter anal interno y trastornos congénitos de las células musculares lisas, que pueden confundirse con HSCR. Las principales técnicas diagnósticas incluyen radiodiagnóstico mediante enema opaco, manometría ano-rectal y biopsia de la pared rectal para análisis anatomopatológico. El diagnóstico se establece cuando en la biopsia rectal se observa ausencia de células ganglionares submucosas, lo cual se correlaciona con ausencia de células en los ganglios mientéricos. El diagnóstico se realiza normalmente en el período neonatal aunque en ocasiones puede diagnosticarse más tarde en la infancia o incluso en la etapa adulta (Amiel et al., 2001).

Esta enfermedad se presenta bajo dos formas fenotípicas diferentes: HSCR de segmento corto (S-HSCR: alrededor del 80% de casos), en la que la región agangliónica se extiende hasta el plexo esplénico; y HSCR de segmento largo (L-HSCR: alrededor del 20% de casos), en el cual la aganglionosis se extiende más allá del mismo. Dentro de ésta última, se encuentra la forma menos común (3-8% de los casos) y más severa de la enfermedad: aganglionosis total del colon (TCA), en la que la totalidad del colon se ve afectada (Chakravarti et al., 2002).

El único tratamiento hasta la fecha consiste en una o varias intervenciones quirúrgicas basadas en la resección de la región agangliónica y posterior anastomosis de la región gangliónica al ano, para así liberar la contracción tónica del esfínter anal interno (Figura 11). Es posible realizar esta intervención en un primer estadio, cuando el diagnóstico es temprano previo a la dilatación del colon, en caso contrario sería necesario realizar una colostomía. Una de las causas responsables de malos resultados terapéuticos es la localización de la zona de transición entre intestino gangliónico y agangliónico, ya que ésta puede ser hiper/hipogangliónica o parcialmente agangliónica y al incorporarse en la anastomosis anorectal puede hacer que la función gastrointestinal no se recupere correctamente (Langer et al., 2004). Por ello, es necesario que se analicen histopatológicamente aquellas piezas reseccionadas durante la intervención para así localizar adecuadamente la zona de transición. En la respuesta a la cirugía y complicaciones post-operatorias, tendrá un gran impacto la longitud del segmento agangliónico. Sin embargo, otros factores como el sexo o la edad no parecen tener efecto sobre las complicaciones postoperatorias, las cuales se pueden presentar con estreñimiento,

diarrea o enterocolitis (Prato et al., 2008; Kapur et al., 2009; Thapar et al., 2009).

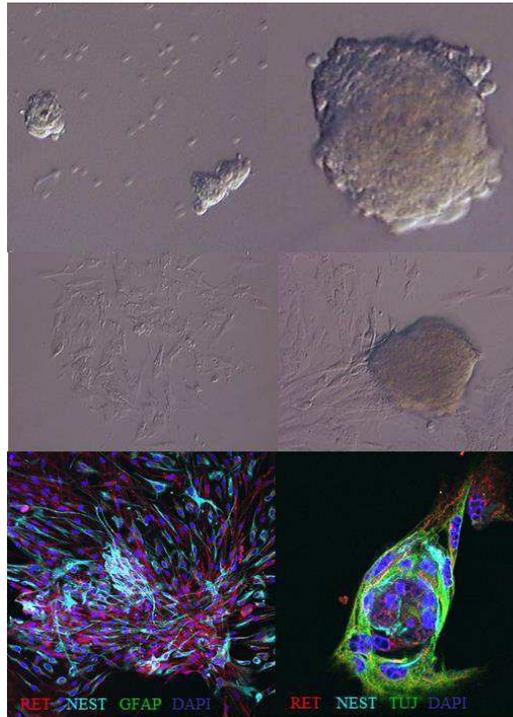


**Figura 11: Esquema del procedimiento quirúrgico *pull-through*.** Se extirpa el segmento que carece de ganglios y se conecta el segmento sano a la última porción del intestino.

En la última década se ha demostrado que el tracto gastrointestinal postnatal contiene células multipotentes que pueden colonizar el intestino y son capaces de diferenciarse en diferentes fenotipos neuronales entéricos cuando se trasplantan en la porción de intestino agangliónico o sin colonizar. Estas células derivadas de la cresta neural, se pueden cultivar generando cuerpos esféricos llamados Neurospheres like bodies (NLBs), a partir de tejido intestinal disociado o incluso a partir de muestras de biopsia de la mucosa obtenidos por procedimientos endoscópicos de rutina (Metzger et al., 2009).

Cuando los precursores entéricos procedentes del intestino de un paciente HSCR se aíslan y se cultivan bajo condiciones específicas, si se transplantan *in vitro* a intestinos explantados de ratón durante la fase embrionaria, estas células son capaces de diferenciarse en los diferentes fenotipos neuronales entéricos (Bondurand et al., 2003) y además, pueden migrar hacia las regiones agangliónicas de dichos segmentos intestinales (Almond et al., 2007; Metzger et al., 2009).

Estudios *in vivo* demuestran que estas células no sólo tienen la capacidad de migrar, proliferar y diferenciarse cuando se trasplantan en el colon de ratones postnatales, sino que además muestran propiedades morfológicas, neuroquímicas y electrofisiológicas típicas de neuronas entéricas, tales como entradas sinápticas y proyecciones de neuritas a las capas musculares y ganglios (Hotta et al., 2013).



**Figura 12: Generación de NLBs de células precursoras entéricas humanas a partir de intestino postnatal en la Unidad de Genética Reproducción y Medicina Fetal, Hospital Universitario Virgen del Rocío (Sevilla, España).**

La enfermedad de Hirschsprung proporciona considerables desafíos a la terapia celular debido a que la deficiencia a nivel de SNE es absoluta y extensa, es decir, es necesario que se reestablezcan todos los subtipos celulares presentes en el intestino maduro, así como conseguir que estas células se integren y formen las conexiones y circuitos necesarios para un correcto funcionamiento del intestino. Sin embargo, cabe señalar que la restauración completa del segmento agangliónico podría no ser necesaria. En el caso de pacientes HSCR la orientación de los trasplantes celulares hacia entidades anatómicas específicas, por ejemplo el esfínter anal aganglionar, no sería una terapia curativa, pero tendría el potencial de mejorar los resultados de las intervenciones quirúrgicas actuales (Burns et al., 2014).

Dado que es posible el cultivo de estas células en el laboratorio, además de ser útiles para una posible terapia celular en estos pacientes, presenta un gran potencial como modelo celular para el estudio de los mecanismos moleculares subyacentes responsables de la aparición del fenotipo HSCR.

### **1.2.1.b) Epidemiología de la Enfermedad de Hirschsprung**

De los desórdenes primarios del SNE, la enfermedad de Hirschsprung es el que presenta un mayor impacto en la práctica clínica. Se estima que afecta a 1 de cada 5,000 nacidos vivos en población caucásica (Amiel et al., 2008). Normalmente aparece de forma aislada, sin una historia familiar previa, o HSCR esporádico, aunque existen casos familiares con patrones de herencia tanto autosómicos recesivos como dominantes, con penetrancia incompleta y expresión variable. El ratio hombre: mujer afecto es de 4:1, siendo éste significativamente mayor en pacientes HSCR de segmento corto que en casos más severos o L-HSCR (Amiel et al., 2001). Se estima que, aproximadamente el 70% de los pacientes no presentan manifestaciones clínicas adicionales, mientras que un 30% de los pacientes manifiestan el fenotipo asociado a otros desórdenes genéticos o malformaciones congénitas que afectan frecuentemente a estructuras derivadas de la cresta neural (HSCR sindrómico, Tabla 1) (Borrego et al., 2013). De ellos, el 18% presentan otras anomalías congénitas asociadas, tales como malformación gastrointestinal, paladar hendido, polidactilia, defectos a nivel del septum cardíaco y anomalías faciales entre otros. Existe una mayor tasa de anomalías asociadas en aquellos casos familiares en comparación con casos esporádicos (39% vs 21 %), siguiendo un modo de herencia mendeliana en estos casos sindrómicos (Amiel et al., 2008). Algunas asociaciones están bien caracterizadas, con una penetrancia de HSCR que va desde el 5 % a > 80 %. Sin embargo, para aquellos trastornos más raros, no es fácil discriminar si HSCR está realmente relacionado con la presentación de la enfermedad.

Alrededor de un 12 % de los casos sindrómicos descritos asociados a HSCR son anomalías cromosómicas, y dentro de ellas el síndrome de Down (SD, OMIM 190685), debido a la trisomía del cromosoma 21, es el más frecuente (90 %). En estos casos, el ratio varon:hembra (5: 1) y el predominio de S-HSCR son mayores que en HSCR aislado. Además, el riesgo de presentar HSCR en estos pacientes SD es 40 veces mayor que en población normal (Gabriel et al., 2002). La presencia de una copia adicional del cromosoma 21 parece aumentar la susceptibilidad de padecer HSCR, aunque no es responsable *per se* de la aparición del fenotipo, sería necesaria la presencia de algún otro mecanismo genético subyacente todavía no descrito (Arnold et al., 2009).

**Tabla 1: Síndromes asociados a HSCR (Adaptado de Borrego et al., 2013).**

	Síndromes	OMIM	Rasgos característicos
Otras Neurocristopatías	Síndrome de Shah-Waardenburg]	277580	Anomalías en la pigmentación (mechón blanco, iris bicolor, hipopigmentación irregular), y sordera
	Yemenite deaf-blind Hipopigmentación	601706	Pérdida de audición, anomalías oculares (microcornea, coloboma, nistagmo), anomalías en la pigmentación.
	BADS	227010	Pérdida de audición, hipopigmentación de la piel y retina
	Piebaldismo	172800	Hipopigmentación irregular de la piel
	Haddad o Enfermedad de Ondine	209880	Hipoventilación central congénita
	MEN2	171400	Carcinoma medular de tiroides, feocromocitoma, hiperparatiroidismo
	Riley-Day	223900	Anomalías del sistema nervioso autónomo
HSCR siempre asociado	Goldberg-Shprintzen	235730	Fisura palatina, hipotonía, microcefalia, retraso mental, rasgos faciales dismórficos
	HSCR con anomalías límbicas	235740	Polidactilia, agenesia renal unilateral, hipertelorismo, sordera
		235750	Polidactilia postaxial, defecto en el septo ventricular
		235760	Hipoplasia de las falanges distales y uñas, rasgos dismórficos
		604211	Polidactilia preaxial, defecto cardíaco, anomalías laríngeas
		306980	Braquidactilia tipo D
	BRESHEK	-	Anormalidades cerebrales, retraso, displasia ectodérmica, malformaciones esqueléticas, anomalías de ojo y oído, displasia renal
Mowat-Wilson	235730	Microcefalia, epilepsia, gestalt facial, hipospadias, anomalías renales ...	
HSCR Ocasionalmente asociado	Bardet-Biedl	209900	Retinopatía pigmentaria, obesidad, hipogenitalismo, leve retraso mental, polidactilia postaxial
	Kauffman-McKusick	236700	Hidrometrocolpo, polidactilia postaxial, defecto cardíaco congénito
	Smith-Lemli-Opitz	270400	Retraso en el crecimiento, microcefalia, retraso mental, hipospadia, sindactilia de 2-3 dedos de los pies, rasgos dismórficos
	Hipoplasia de cartilago y cabello	250250	Enanismo, displasia metafisaria, inmunodeficiencia
	HSAS/MASA	307000	Hidrocefalia, estenosis del acueducto, spasticidad aducidas, retraso mental...
HSCR raramente asociado	Distrofia muscular congénita de Fukuyama	253800	Distrofia muscular, polimicrogría, hidrocefalia, apopleja.
	Clayton-Smith	258840	Rasgos dismórficos, dedos y uñas hipoplásicas, ictiosis
	Kaplan	304100	Agénesia del cuerpo caloso, pulgares cortos, ptosis, debilidad muscular
	Okamoto	308840	Hidrocefalia, fisura palatina, agénesia del cuerpo caloso
	Displasia mesomélica de Werner	188770	Hipoplasia de la tibia con polidactilia
	Pitt-Hopkins	610954	Encefalopatía epiléptica, rasgos dismórficos faciales, episodios de hiperventilación, disautonomía
	Jeune	208500	Severamente restringido a caja torácica, extremidades cortas, baja estatura, y polidactilia
	Pierre Robin	261800	Glosoptosis, micrognatia y paladar hendido
Miscelánea	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	Baja estatura, hipertelorismo, y el escroto chal
	Displasia Fronto-nasal	136760	Hipertelorismo ocular, ampliación de la raíz nasal, paladar hendido y otros rasgos.
	Osteopetrosis	Various	Macrocefalia, sordera y ceguera progresiva, hepatoesplenomegalia y anemia severa
	Goldenhar	164210	Anomalías craneofaciales, cardíacas, vertebrales, y defectos del sistema nervioso central
	Lesch-Nyhan	300322	Retraso mental, parálisis cerebral espástica, coreoatetosis, cálculos urinarios de ácido úrico
	Rubinstein-Taybi	180849	Pulgares anchos y pies grandes, facies característica, y retraso mental
	Toriello-Carey	217980	Agnesia del cuerpo caloso, con anomalías faciales y secuencia robin
	SEMDIL	271640	Anomalías vertebrales y laxitud ligamentosa con resultado de muerte temprana
	OSCS	300373	Striata osteopathia con esclerosis craneal

### 1.2.1.c) Genética molecular de la enfermedad de Hirschsprung

HSCR especialmente las formas de segmento corto aisladas, presentan base genética compleja, con un patrón de herencia no mendeliano y multifactorial en la mayoría de los casos. La expresión de la enfermedad depende de la concurrencia de pequeñas diferencias alélicas en más de un gen que actúan de manera aditiva con baja penetrancia, expresión variable y dependiente de sexo (Amiel et al., 2008; Borrego et al., 2013).

Teniendo en cuenta el complicado proceso necesario para un correcto desarrollo del SNE, alteraciones en cualquiera de los genes que codifican las moléculas señalizadoras implicadas en este proceso podrían suponer una causa potencial de aganglionosis. El fenotipo HSCR puede aparecer debido a la presencia de una mutación patogénica severa en uno de estos genes o bien la suma de variaciones menos severas en uno o varios genes, o la combinación de ambos fenómenos. El análisis de pacientes HSCR ha permitido identificar diferentes genes asociados a la aparición del fenotipo (Figura 13 y Tabla 2) (Borrego et al., 2013).

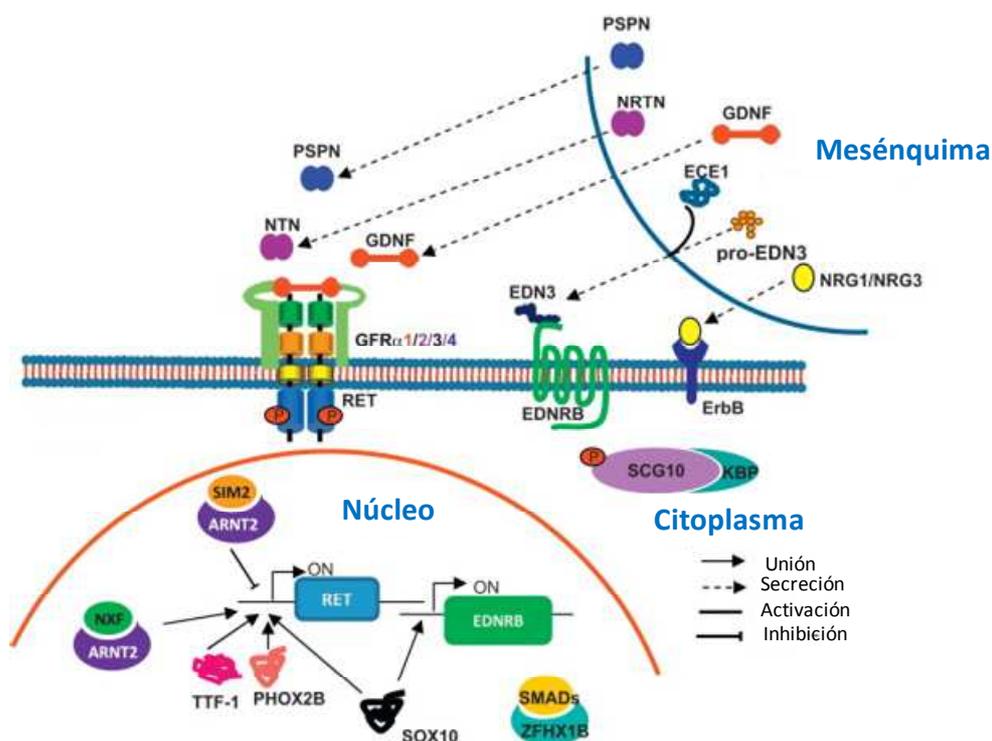


Figura 13: Interacciones entre los diferentes genes implicados en la etiopatogénesis de la enfermedad de Hirschsprung durante el desarrollo del SNE (Adaptada de Alves et al., 2013)

**Tabla 2: Genes asociados a la aparición del fenotipo HSCR**

Gen	Localización cromosómica	Fenotipo	Herencia	Modelo murino
<i>RET</i> <sup>a</sup>	10q11.2	HSCR/ HSCR-MEN2/FMTC	Dominante, penetrancia incompleta Dominante	ATI, agenesia renal
<i>GDNF</i> <sup>b</sup>	5p13.2	HSCR	Dominante, baja penetrancia	ATI, agenesia renal
<i>GFRA1</i> <sup>c</sup>	10q25.3	HSCR	Dominante, baja penetrancia	ATI, agenesia renal
<i>NRTN</i> <sup>d</sup>	19p13.3	HSCR	Dominante, baja penetrancia	Déficit moderado de neuronas entéricas
<i>PSPN</i> <sup>e</sup>	19p13.3	HSCR	Dominante, baja penetrancia	-
<i>EDNRB</i> <sup>f</sup>	13q22.3	Síndrome de Waardenburg 4/HSCR	Recesiva/Dominante	Aganglionosis, piel con manchas
<i>EDN3</i> <sup>g</sup>	20q13.32	Síndrome de Waardenburg 4/HSCR	Recesiva/Dominante	Aganglionosis, piel con manchas
<i>ECE-1</i> <sup>h</sup>	1p36	HSCR, defectos craneofaciales y cardíacos	Dominante	Anomalías cardíacas y craneofaciales y mortalidad embrionaria
<i>SOX10</i> <sup>i</sup>	22q13.1	Síndrome de Waardenburg 4/HSCR	Dominante	Aganglionosis, piel con manchas
<i>PHOX2B</i> <sup>j</sup>	4p12	Síndrome de Ondine/Neuroblastoma+HSCR	Dominante	ATI, Sin sistema nervioso autónomo , anomalías ventilatorias
<i>ZFXH1B</i> <sup>k</sup>	2q22.3	Síndrome de Mowat-Wilson	Dominante	Letal durante la gastrulación
<i>L1CAM</i> <sup>l</sup>	Xq28	Hidrocefalia obstructiva por estenosis del acueducto de Silvio/Síndrome de MASA +HSCR	Ligada al X	Hidrocefalia
<i>KIAA1279</i> <sup>m</sup>	10q22.1	Síndrome de Goldberg-Shprintzen	Recesiva	-
<i>NRG1</i> <sup>n</sup>	8p12	HSCR	Dominante, baja penetrancia	Defecto cardíaco letal
<i>NRG3</i> <sup>ñ</sup>	10q23.1	HSCR	Dominante, baja penetrancia	-
<i>NTF3</i> <sup>o</sup>	12p13.31	HSCR	Dominante, baja penetrancia	Déficit de neuronas entéricas
<i>NTRK3</i> <sup>p</sup>	15q25.3	HSCR	Dominante, baja penetrancia	Déficit de neuronas entéricas
<i>PROKR1</i> <sup>q</sup>	2p14-p13.3	HSCR	Dominante, baja penetrancia	-
<i>PROKR2</i> <sup>r</sup>	20p12.3	HSCR	Dominante, baja penetrancia	Hipoplasia del bulbo olfativo y el sistema reproductivo
<i>PROK1</i> <sup>s</sup>	1p13.3	HSCR	Dominante, baja penetrancia	-
<i>SEMA3A</i> <sup>t</sup>	7p12.1	HSCR	Dominante, baja penetrancia	Déficit de la inervación simpática cardíaca y malformación de los ganglios estrellados
<i>SEMA3D</i> <sup>u</sup>	7q21.11	HSCR	Dominante, baja penetrancia	-

<sup>a</sup>Ederly et al. (1994), Romeo et al. (1994), Angrist et al. (1995), Attie et al. (1995), Sancandi et al. (2000), Garcia-Barcelo et al. (2004), Amiel et al. (2008), Tamet al. (2009), Núñez-Torres et al. (2011).

<sup>b</sup>Angrist et al. (1996), Salomon et al.(1996), Ivanchuk et al. (1996), Amiel et al. (2008), Tam et al. (2009).

<sup>c</sup>Borrego et al. (2003a).

<sup>d</sup>Doray et al. (1998), Amiel et al. (2008), Tam et al. (2009).

<sup>e</sup>Ruiz-Ferrer et al. (2011).

<sup>f</sup>Puffenberger et al. (1994), Amiel et al. (1996), Auricchio et al. (1996), Chakravarti (1996), Kusafuka et al. (1996), Amiel et al. (2008), Tam et al. (2009).

<sup>g</sup>Ederly et al. (1996), Hofstra et al. (1996), Bidaud et al. (1997), Amiel et al. (2008), Tam et al. (2009).

<sup>h</sup>Hofstra et al. (1999), Amiel et al. (2008), Tam et al.,(2009).

<sup>i</sup>Southard-Smith et al. (1998), Pingault et al. (1998), Touraine et al. (2000), Sanchez-Mejias et al. (2010), Amiel et al. (2008), Tam et al. (2009).

<sup>j</sup>Trochet et al. (2005), Amiel et al. (2003), (2008), Tam et al. (2009), Fernández et al. (2013)

<sup>k</sup>Lurie et al. (1994), Mowat et al. (1998), Wakamatsu et al. (2001), Van de Putte et al. (2003), Amiel et al. (2008), Tam et al. (2009).

<sup>l</sup>Okamoto et al. (1997), Parisi et al. (2002), Okamoto et al. (2004), Basel-Vanagaite et al. (2006), Nakakimura et al. (2008), Fernandez et al. (2010), (2012).

<sup>m</sup>Brooks et al. (2005a), Amiel et al. (2008), Tam et al. (2009).

<sup>n</sup>Garcia-Barcelo et al. (2009), Tam et al., (2009), Tang et al. (2012), Luzon-Toro et al. (2012).

<sup>ñ</sup>Tang et al. (2012).

<sup>o</sup>Ruiz-Ferrer et al.(2008)

<sup>p</sup>Sánchez-Mejías et al. (2009), Fernández et al. (2009)

<sup>q, r, s</sup>Ruiz-Ferrer et al.(2011)

<sup>t, u</sup>Luzon-Toro et al. (2013)

En conjunto, las mutaciones encontradas en secuencia codificante en estos genes representan la causa molecular de alrededor del 50% de los casos de HSCR familiares y de alrededor un 15% de los casos esporádicos. De todos los genes descritos, *RET* es el principal gen de susceptibilidad, representando el 80% de las mutaciones encontradas en pacientes HSCR, incluyendo tanto variantes a nivel de secuencia codificante como no codificante.

#### 1.2.1.c-1) Mutaciones en *RET*

Se han identificado más de 100 mutaciones dentro de la secuencia de *RET* en pacientes HSCR. El análisis *in vitro* de algunas de estas mutaciones localizadas en la secuencia codificante de *RET*, ha demostrado que las consecuencias funcionales son muy variables: mutaciones que afectan a secuencias dentro del dominio extracelular tendrán como resultado alteraciones en el transporte de RET a la membrana plasmática; mutaciones que afecten al dominio rico en cisteínas darán como resultado la dimerización covalente de la proteína y con ello la reducción de su localización en la membrana plasmática; mutaciones presentes dentro del dominio quinasa provocarán la alteración de la actividad catalítica del receptor y por último, mutaciones localizadas en el extremo carboxi-terminal producen alteraciones en la unión de proteínas afectando al proceso de señalización. Aunque los efectos son variables, el mecanismo más probable que se ha propuesto es la haploinsuficiencia (Kashuk et al., 2005; Amiel et al., 2008).

Además de mutaciones en secuencia codificante de *RET*, se ha descrito la asociación de variantes comunes a la enfermedad. Nuestro grupo logró identificar las primeras variantes comunes asociadas a HSCR, localizadas en los exones 2 (A45A, c.135G>A) y 13 (L769L, c.2307T>G) de *RET* (Borrego et al., 1999). Posteriormente, el trazado de haplotipos basados en SNPs y el análisis de los resultados mediante TDT (Transmission Disequilibrium Test) y LD-mapping (Linkage Disequilibrium mapping) permitió la caracterización de un haplotipo genético claramente ligado a la aparición de HSCR (Borrego et al., 2000; Borrego et al., 2003b; Fernandez et al., 2005). Estos resultados desarrollaban el concepto de alelos de baja penetrancia en el origen de HSCR. En base a estos hallazgos, un estudio para refinar el intervalo de la secuencia de

RET asociado a la enfermedad (Emison et al., 2005) 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, la variante c.73+9277T ha mostrado ser un factor de susceptibilidad genético con una contribución a la aparición de HSCR, 20 veces mayor que las mutaciones codificantes (Emison et al., 2005) con un efecto funcional *per se*, capaz de reducir la habilidad de SOX10 para unirse al dominio *enhancer-like*, y disminuir la transcripción del proto-oncogén *RET*.

Otra variante común localizada muy próxima a la anterior y en completo desequilibrio de ligamiento con la misma (rs2506004), ha sido identificada como sitio de unión para *NXF / ARNT2* y *SIM2 - ARNT2*, genes identificados como moduladores de la expresión de *RET*, demostrando que puede existir más de un evento de este tipo que esté influyendo en la expresión de genes y en última instancia en la aparición de fenotipo HSCR (Sribudiani et al., 2011).

La presencia de variantes no codificantes es un evento común, éstas serán responsables del fenotipo en asociación con otras mutaciones más severas en *RET* u otros genes, en concordancia con el modelo aditivo de herencia propuesto para HSCR, en el que la expresión de la enfermedad dependerá de la contribución de distintos genes que actúan de forma multiplicativa modulando la penetrancia de mutaciones o la expresión de la enfermedad en individuos afectados.

#### 1.2.1.c-2) Mutaciones en la familia de ligandos GDNF

La relevancia de la vía de señalización de RET durante el desarrollo del SNE sugiere que los genes que codifican a sus ligandos y sus co-receptores podrían ser excelentes candidatos como genes implicados en la enfermedad. Diferentes rastreos mutacionales en pacientes HSCR han identificado varias mutaciones germinales en heterocigocis dentro de la secuencia de *GDNF*, aunque a menudo en combinación con mutaciones en *RET* u otras alteraciones genéticas (Salomon et al., 1996; Angrist et al., 1996; Ivanchuk et al., 1996; Martucciello et al., 2000; Hofstra et al., 2000; Ruiz-Ferrer et al., 2011). El análisis posterior del papel funcional de mutaciones localizadas en la región madura de *GDNF* no mostró ningún efecto sobre la fosforilación de RET, incluso

cuando se observó una reducción en la afinidad de unión a GFR $\alpha$ 1 (Eketjall et al., 1999; Borghini et al., 2002). Teniendo en cuenta estos hallazgos, estas mutaciones pueden considerarse como cambios genéticos con un efecto modulador que podrían contribuir a la enfermedad a través de la interacción con otros loci de susceptibilidad.

Por otro lado, han sido descritas tres mutaciones en *NRTN*, una en *ARTN* y otra en *PSPN*, por nuestro grupo. Estudios *in vitro* de dichas mutaciones mostraron en el caso de la variante R91C en *PSPN* una menor expresión y activación de RET. La variante F127L en *NRTN* sólo mostró una menor activación de dicho receptor, todo ello pone de manifiesto la implicación de ambos péptidos en la aparición del fenotipo HSCR (Ruiz-Ferrer et al., 2011). Generalmente, estas variantes en los genes GFL presentan penetrancia incompleta ya que también se encontraron en familiares no afectados.

#### 1.2.1. c-3) Mutaciones en *EDN3* y *EDNRB*

El número de mutaciones descritas dentro de la secuencia de *EDN3* como responsables del fenotipo HSCR aislado es bajo (Bidaud et al., 1997), siendo más prevalentes en casos sindrómicos (Hofstra et al., 1996; Bolk et al., 1996; Edery et al., 1996; Pingault et al., 2001; Sanchez-Mejias et al., 2010). Sin embargo, el rastreo mutacional de *EDNRB* en pacientes HSCR esporádicos reveló la presencia de mutaciones en aproximadamente un 5-7% de los pacientes HSCR, que daban lugar a una pérdida de función del receptor de endotelinas (Amiel et al., 2008, Sanchez-Mejías et al., 2010).

La penetrancia para las mutaciones encontradas en heterocigosis tanto en *EDN3* como *EDNRB* es incompleta y el fenotipo predominante es S-HSCR. Generalmente, mutaciones en heterocigosis o heterocigosis compuesta, dan lugar a la aparición de HSCR aislado mientras que aquellas que se encuentran en homocigosis se relacionan con el Síndrome de Waardenburg tipo 4 (OMIM 277580) (Attie et al., 1995; Edery et al., 1996; Hofstra et al., 1996; Verheij et al., 2002).

## 1.2.2 Síndrome de Waardenburg

### 1.2.2.a) *Etiopatogenia, características clínicas y epidemiología*

El Síndrome de Waardenburg (SW) fue descrito por primera vez por el oftalmólogo holandés que le dio su nombre (Waardenburg, 1951) y refirió la asociación entre sordera, despigmentación y dismorfología como el ahora conocido SW tipo I.

Se engloba dentro del grupo de las neurocristopatías ya que afecta al desarrollo de los melanocitos a partir de la cresta neural tanto en piel como en la estría vascular de la cóclea, por lo que se presenta con alteraciones pigmentarias y sordera en el mismo paciente. Su prevalencia se estima 1/42.000 y es responsable de 1-3 % de sordera congénita total (Read et al., 1997).

Los cuatro subtipos de SW se definieron atendiendo a la presencia o ausencia de manifestaciones clínicas (Read et al., 1997). Los criterios principales son: distopia canthorum (de los cantos internos), trastornos pigmentarios (mechón de pelo, pestañas, cejas o pelo corporal blanco; heterocromía del iris), y sordera coclear neurosensorial. Los criterios secundarios incluyen: anomalías cutáneas pigmentarias con zonas despigmentadas, sinofridia, raíz nasal prominente, ala de la nariz hipoplásica, color prematuramente gris del pelo. El tipo I y II son los más frecuentes.

Tipo I (OMIM 193500): se asocia a 1 o 2 criterios clínicos principales y por lo menos a 2 criterios secundarios. Su incidencia es de 1/270000 nacimientos/año.

Tipo II (OMIM 193510): ausencia de distopia canthorum, historia familiar de sordera congénita o anomalías de pigmentación en la mayoría de los casos.

Tipo III, Klein-Waardenburg (OMIM 148820): anomalías de las extremidades

Tipo IV, Waardenburg-Shah (OMIM 277580): asociación del síndrome de Waardenburg (anomalías de la pigmentación y sordera neurosensorial) y de la enfermedad de Hirschsprung. La variante neurológica del síndrome de Waardenburg-Shah, también llamada neuropatía desmielinizante periférica, leucodistrofia desmielinizante central, síndrome de Waardenburg y enfermedad de Hirschsprung (PCWH, OMIM 609136), se caracteriza por la asociación de las manifestaciones del síndrome de Waardenburg-Shah (sordera neurosensorial, anomalías en la

pigmentación y enfermedad de Hirschsprung) y signos neurológicos como: hipotonía neonatal, déficit intelectual de gravedad variable, nistagmo, espasticidad progresiva, ataxia y epilepsia. Más recientemente, estas características neurológicas también se ha encontrado en pacientes SW2 (Bondurand et al., 2007).

### **1.2.2.b) Genética molecular del Síndrome de Waardenburg**

El Síndrome de Waardenburg es una patología genéticamente heterogénea.

El SW1 se caracteriza por un patrón de herencia autosómica dominante. Mutaciones en heterocigosis en el gen que codifica para el factor de transcripción *PAX3* son la causa molecular responsable de la mayoría, si no todos, los casos SW1. Estas mutaciones pueden ser *de novo* en los casos esporádicos con expresividad variable. Mutaciones en homocigosis o heterocigosis compuesta en *PAX3* han sido descritas también como la causa molecular de SW3, con despigmentación extendida y defectos de las extremidades superiores, y que en ocasiones resulta en el fallecimiento de estos pacientes en la infancia o incluso dentro del útero

Los otros dos subtipos de SW son genéticamente heterogéneos, con varios genes implicados y diferentes modos de transmisión. En SW2, mutaciones en el factor de transcripción *MITF* son responsables de aproximadamente el 15% de los casos (con un modo de herencia dominante), mientras que mutaciones en el factor de transcripción *SOX10* serán responsables de otro 15% de los casos (con un modo de herencia dominante y posibilidad de características neurológicas, es decir, PCHW). También existe un pequeño porcentaje de casos que presentan mutaciones en *EDNRB* y *EDN3* (con un modo de herencia dominante con penetrancia incompleta), y otro pequeño porcentaje de los casos caracterizado por la presencia de mutaciones en *SNAIL2* con un modo de herencia recesiva (Pingault et al., 2010).

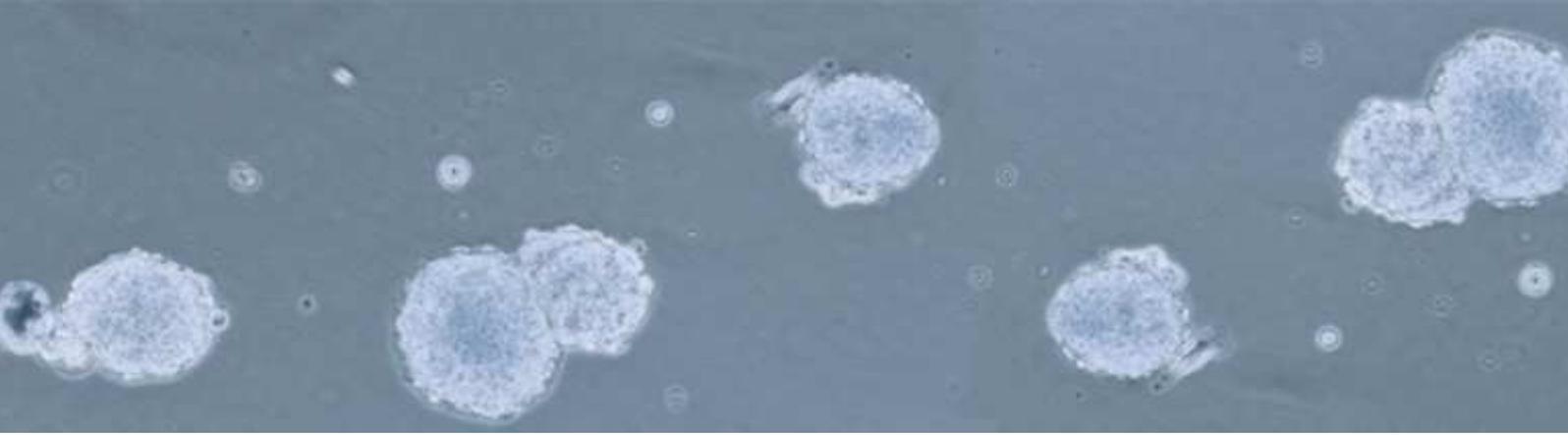
El SW4 se ha asociado en un 20-30 % de los casos a mutaciones en homocigosis en los genes *EDN3* y *EDNRB* (Puffenberger et al., 1994; Hofstra et al., 1994; Ederly et al., 1994), y también se ha relacionado con mutaciones en heterocigosis en *SOX10* representando el 45-55% de los casos (Pingault et al., 2008) y siendo también responsable de la forma más severa PCWH (Verheij et al., 2006; Bondurand et al., 2007). Sin embargo, queda entre un 15-35% de los casos de SW4 que no tienen una

causa conocida a nivel molecular, lo que sugiere que podrían estar involucrados otros genes o que las mutaciones en los genes conocidos se hayan omitido en cribados anteriores.

Las mutaciones descritas en *SOX10* son en su mayoría mutaciones truncantes, que normalmente producen la pérdida del dominio de transactivación y en algunas ocasiones incluso del dominio HMG (Pingault et al., 1998, 2010). Aquellas mutaciones que se encuentran a lo largo del dominio HMG darán como resultado proteínas mutantes que se distribuyen parcialmente a nivel citoplasmático y/o subnuclear, y que en la mayoría de los casos pierden su capacidad de unión a dianas específicas en el tejido (Chaoui et al., 2011). Aquellas mutaciones puntuales o deleciones grandes localizadas mayoritariamente en los dos últimos exones del gen, son responsables del fenotipo observado en los pacientes con SW4, de su variante neurológica PCWH, del SW2 y por último del síndrome de Kallmann que se presenta con sordera y en su forma dominante (Pingault et al., 1998; Inoue et al., 2004; Bondurand et al., 2007; Pingault et al., 2013).

Para todos estos genes, la alta variabilidad de fenotipo que existe tanto inter como intrafamiliar sugiere que, además de cierta variabilidad debido a la propia mutación, deben existir interacciones adicionales entre modificadores genéticos, factores ambientales y eventos estocásticos.

Dada la elevada heterogeneidad alélica observada y elevada frecuencia de mutaciones *de novo* en *PAX3*, *MITF*, y *SOX10*, es probable que la gran mayoría de mutaciones hayan surgido como eventos individuales en estos pacientes, por ello el número de casos familiares no es muy elevado.



## **2. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS**



## 2.1 Hipótesis de trabajo

Aproximadamente el 70% de los pacientes HSCR no presentan manifestaciones clínicas adicionales, mientras que el 30% restante manifiestan un fenotipo asociado a otros desórdenes genéticos o malformaciones congénitas que afectan frecuentemente a estructuras derivadas de la cresta neural, o también denominado HSCR sindrómico. La combinación de HSCR con otra neurocristopatía, el síndrome de Waardenburg, es bien conocida y se define como SW tipo 4. Debido a que la frecuencia de padecer Síndrome de Waardenburg se estima que es de 1/1.000 y la frecuencia de HSCR es aproximadamente 1/5.000, la incidencia esperada de que ambos eventos aparezcan juntos al azar es de alrededor de 1 en 5 millones. Es por ello que, la asociación de ambos fenotipos clínicos no aparece casualmente y por eventos moleculares independientes, como ha sido ampliamente demostrado. En este trabajo se plantea un análisis clínico y molecular de dos pacientes con sospecha de SW4 en nuestro Hospital, mediante el rastreo mutacional de los genes *SOX10*, *EDN3* y *EDNRB*.

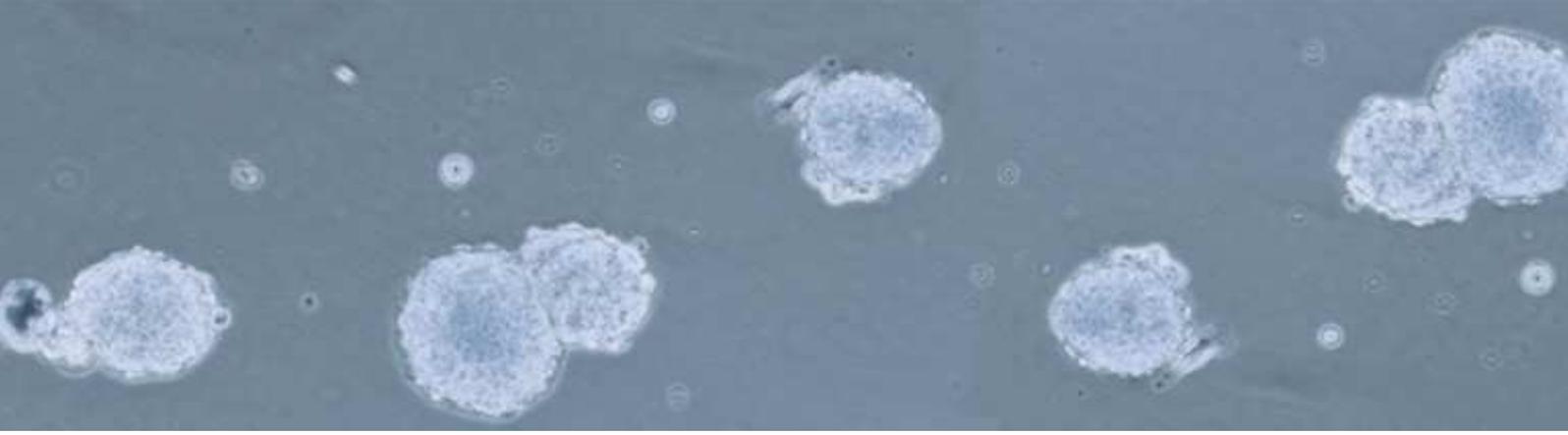
Por otro lado, HSCR se caracteriza por un patrón de herencia complejo, siendo paradigma de las enfermedades multigénicas. La expresión de la enfermedad parece depender de la co-existencia de distintos eventos mutacionales en un mismo paciente, que contribuirán de manera conjunta a la manifestación del fenotipo. El análisis molecular de pacientes HSCR ha permitido identificar diferentes genes/loci relacionados con la aparición de este fenotipo. Actualmente se conocen al menos 23 genes en los cuales se han encontrado mutaciones asociadas a HSCR, siendo el proto-oncogén *RET* el principal gen de susceptibilidad. Sin embargo, el mecanismo molecular causante de la enfermedad en la mayoría de los pacientes HSCR, especialmente en aquellos casos esporádicos, no está completamente esclarecido, lo que sugiere la existencia de otros genes implicados en la patogénesis de la enfermedad. Al tratarse de una enfermedad con una etiopatogenia establecida en las primeras etapas del desarrollo, el uso de células derivadas de la cresta neural para el estudio e identificación de nuevos genes implicados en el desarrollo del SNE, supone una herramienta muy útil. Estas células precursoras indiferenciadas persisten en intestino postnatal y se pueden extraer y cultivar a partir de tejido intestinal disociado o incluso

a partir de muestras de biopsia intestinal de pacientes HSCR y controles. Estos precursores entéricos de aspecto indiferenciado son capaces de autorreplicarse y diferenciarse dando lugar a los precursores ya comprometidos con la estirpe neuronal o bien glial. Nuestro grupo ha conseguido aislar y mantener en cultivo precursores neurales que forman unos cuerpos esféricos denominados NLBs, obtenidos a partir de la región gangliónica de intestinos de pacientes HSCR y de individuos sin alteraciones a nivel del SNE.

Por ello, se propone la realización de estudios de expresión en estos cultivos de precursores entéricos para profundizar en el conocimiento del desarrollo del SNE, en el contexto de HSCR, para así llevar a cabo una mejor caracterización de los mismos y realizar la búsqueda de nuevos genes implicados en la patología basándonos en diferencias de expresión de genes en estudios de pacientes y controles.

## **2.2 Objetivos del estudio**

1. Rastreo mutacional de la secuencia codificante de los genes *SOX10*, *EDN3* y *EDNRB* en dos pacientes con sospecha de SW4.
2. Análisis diferencial de los patrones de expresión de 96 genes, descritos en células madre pluripotentes humanas, en precursores entéricos y tejido intestinal procedente de pacientes HSCR y controles
3. Análisis diferencial de los patrones de expresión de 47 factores de transcripción, descritos en células embrionarias humanas, en precursores entéricos y tejido intestinal procedentes de pacientes HSCR y controles.



### **3. METODOLOGÍA**



### **3.1 Pacientes y Controles**

Todos los individuos incluidos en el presente estudio han firmado un consentimiento informado para cirugía, y estudios de genética clínica y molecular cumpliendo con las normas de protección de los sujetos humanos contenidas en la declaración de Helsinki, así como lo estipulado en la Ley de Investigación Biomédica (Ley 14/2007, del 3 de Julio de 2007), habiendo sido también aprobados por el Comité de Ética e Investigación Clínica del Hospital Universitario Virgen del Rocío (Sevilla, España).

#### **3.1.1 Pacientes HSCR**

Los pacientes HSCR incluidos en el estudio han sido remitidos a la Unidad de Gestión Clínica (UGC) de Genética, Reproducción y Medicina Fetal procedentes de la UGC de Cirugía Infantil del Hospital Universitario Virgen del Rocío, centro de referencia autonómico para esta patología, y de Servicios de Genética de otros hospitales españoles. El protocolo de estudio clínico de los pacientes HSCR incluye:

- Historia clínica.
- Estudio radiológico mediante enema opaco.
- Manometría anorrectal.
- Estudio anatomopatológico.
- Estudios de genética clínica mediante la realización del árbol genealógico, valoración de la transmisión familiar, clasificación de los sujetos en riesgo, análisis de la heterogeneidad clínica intra y extrafamiliar y extracción protocolizada de muestras de sangre del paciente índice y de sus familiares para el estudio molecular.

Para los distintos estudios incluidos en el presente trabajo se ha contado con muestras de ADN genómico de un total de 196 pacientes HSCR esporádicos (124 hombres/72 mujeres) y 2 casos familiares pertenecientes a la misma familia (hombres). De ellos, 159 presentan fenotipo de segmento corto (S-HSCR), 32 pacientes presentan fenotipo de segmento largo (L-HSCR) y 7 de ellos la forma más severa, aganglionosis total colónica.

Las muestras de intestino de pacientes HSCR, han sido remitidas a la Unidad de Genética por la UGC de Cirugía Infantil del Hospital Universitario Virgen del Rocío. Los pacientes intervenidos tienen una edad comprendida entre 3 meses y 5 años. Para el presente estudio se han obtenido precursores neurales a partir de tejido intestinal de 7 pacientes.

### **3.1.2 Individuos Control**

Para la evaluación de las variaciones identificadas como mutaciones se ha incluido un grupo de 200 individuos control no relacionados entre sí, agrupados según edad y sexo, y sin ningún antecedente personal o familiar relacionado con HSCR.

Las muestras de intestino que se han utilizado como controles para los estudios de expresión, se han obtenido de individuos en edades comprendidas entre 3 meses y 3 años sometidos a cirugía intestinal sin sospecha de HSCR remitidas a la Unidad de Genética por la UGC de Cirugía Infantil del Hospital Virgen del Rocío. Para el estudio se han obtenido precursores neurales extraídos a partir de tejido intestinal de 6 controles.

## **3. 2 Animales de Experimentación**

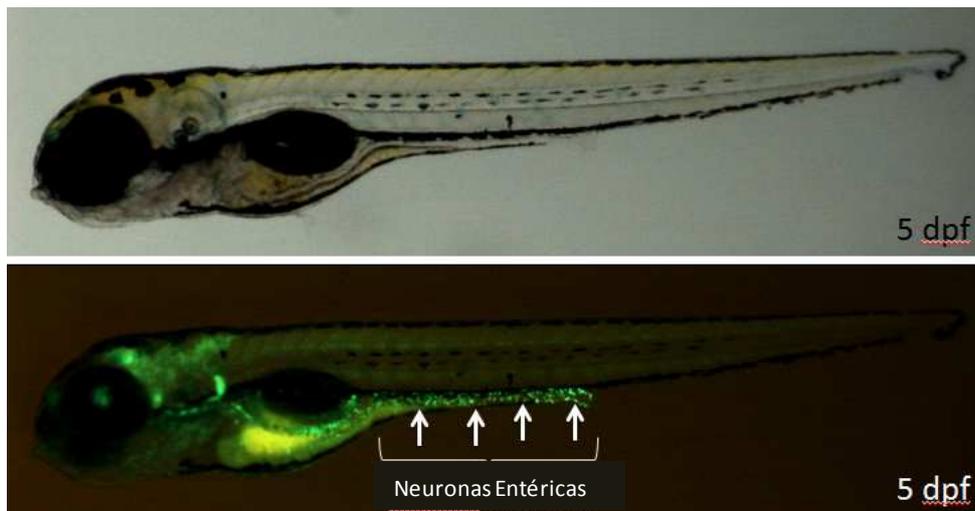
### **3.2.1 Ratones**

Los ratones silvestres que se han utilizado en este estudio pertenecen a la estirpe CD1, y han sido mantenidos y utilizados según la normativa del animalario del Instituto de Biomedicina de Sevilla, de acuerdo con las normativas españolas y de la Unión Europea (86/609/EU).

### **3.2.2 Pez Cebra**

Los estudios en pez cebra se han realizado en *Erasmus MC, University Medical Center* (Rotterdam), bajo la tutela del Profesor Robert Hofstra.

Se ha utilizado la línea transgénica de pez cebra *Tg(-8.3bphox2b:Kaede)*, cedida por el Dr. Iain Shepherd del Departamento de Biología de la Universidad de Emory (Atlanta, USA). Esta línea transgénica de pez cebra se ha obtenido generando un plásmido que contiene la proteína fluorescente Kaede bajo el control del Enhancer *8.3bphox2b* en el gen *Phox2B*, manteniendo una expresión estable de la proteína Kaede en células precursoras de neuronas entéricas durante tres generaciones (Figura 14).

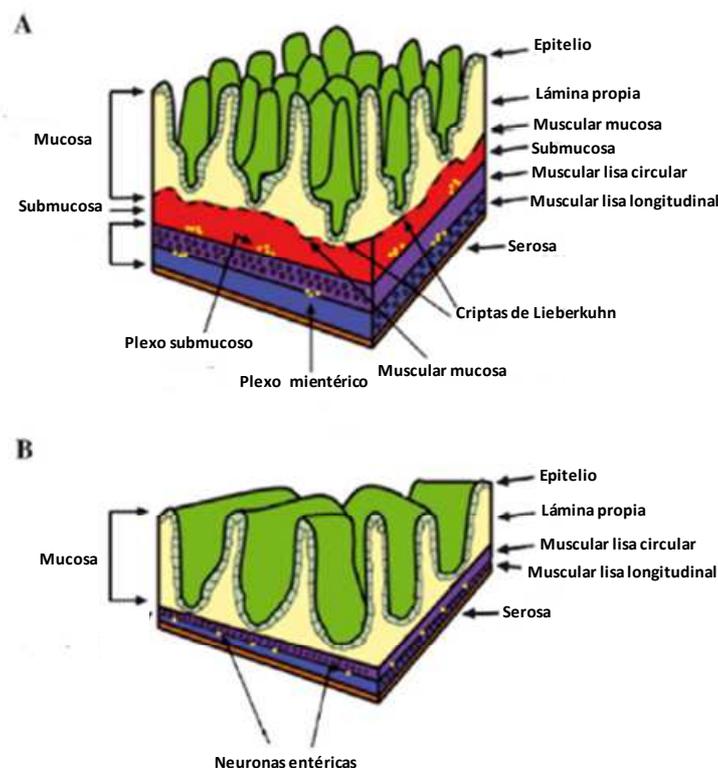


**Figura 14: Embrión de pez cebra tras 5 días postfertilización (dpf) perteneciente a la línea transgénica de pez cebra *Tg(-8.3bphox2b:Kaede)*.** Se puede observar *in vivo* la colonización del intestino en desarrollo por parte de los precursores entéricos que expresan *Phox2b*.

Los peces de esta línea se mantienen a 25° C en un ciclo de 14 horas luz/10h oscuridad y son alimentados 3 veces al día. El día antes de la fertilización, los peces machos y hembras se mantienen por separado usando un tanque de cría especial con dos compartimentos separados por una partición desmontable. Los embriones de pez cebra se recolectan a partir de desove espontáneo.

El intestino de los peces cebra se asemeja al intestino de los mamíferos, aunque siendo más simple en su estructura general, convirtiéndolo en un modelo comparativo conveniente para el estudio de trastornos asociados con el tracto gastrointestinal. A nivel anatómico comparando el intestino de mamíferos con el de teleosteos, en el pez cebra el esófago se conecta directamente al intestino sin la presencia de estómago

(Wallace et al., 2005). En ausencia de estómago, el intestino anterior embrionario se agranda y puede funcionar como una reserva de alimentos. Esta región intestinal anterior, conocida como el foco intestinal, también tiene motilidad retrógrada que difiere de la motilidad propulsiva anterógrada observada en el intestino posterior (Holmberg et al., 2007). El foco intestinal también contiene algunas células caliciformes dispersas que producen mucinas ácidas y neutrales (Ng et al., 2005). Además, los patrones de expresión de Sox2, Barx1, Gata5 y Gata6 en el intestino anterior del pez cebra se asemejan a las del estómago de mamífero durante el desarrollo (Munčan et al., 2007) y pueden permitir que esta sección del tracto gastrointestinal pueda desarrollar funciones adicionales de almacenamiento y mezcla del contenido luminal. La estructura del epitelio del intestino del pez cebra es también más simple. Carece de criptas y se organiza en amplios pliegues irregulares en lugar de formar las vellosidades intestinales (Ng et al., 2005; Wallace et al., 2005). A su vez, carecen de capa submucosa (Wallace et al., 2005) en su lugar poseen una gran cantidad de tejido conectivo y vasos sanguíneos y linfáticos.



**Figura 15: Esquema comparativo entre el epitelio intestinal en mamíferos (A) y en pez cebra (B).** (Adaptada de Wallace et al., 2005.)

### 3.3 Métodos

#### 3.3.1. Técnicas generales utilizadas para estudios moleculares de ADN genómico

##### **3.3.1. a) Extracción de ADN a partir de sangre periférica**

La extracción de ADN genómico se realiza de forma automática con el equipo MagNA Pure LC 1.0 (Roche Diagnostics) a partir de una muestra de sangre periférica de los pacientes y sus familiares, y de controles. La extracción de ácidos nucleicos se lleva a cabo mediante la tecnología de partículas magnéticas, combinada con el conjunto de tampones específicos del MagNA Pure LC ADN Isolation Kit- Large Volume (Roche Diagnostics, Alemania). El protocolo de extracción usado es el V3\_8\_ADN LV Blood 1000, siguiendo las recomendaciones del fabricante, que permite obtener a partir de 1 ml de sangre periférica 200µl de ADN puro a una concentración aproximada de 100 ng/µl.

##### **3.3.1.b) Espectrofotometría de ADN**

Una vez obtenido el ADN y con el fin de determinar su pureza y obtener una medida de su concentración, se utiliza el sistema de espectrofotometría NanoDrop 8000 (Thermo Scientific, USA) que permite medir la absorbancia a varias longitudes de onda (260nm para los ácidos nucleicos y 280 nm para las proteínas). Para estimar la pureza de la solución de ADN se utiliza el cociente 260nm/280nm. De esta forma, el cociente entre ambas medidas da una estimación de la pureza de la muestra, debiendo estar este valor entre 1,6 y 2.

##### **3.3.1.c) Amplificación de ADN genómico mediante PCR**

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite la amplificación selectiva de una o varias secuencias específicas de ADN presentes en una mezcla compleja de secuencias. La PCR se desarrolla normalmente en tres pasos:

- **Desnaturalización:** Fase que se realiza a 94°C y consiste en la separación de la doble cadena de ADN. Cada una de estas cadenas actúa como molde para fabricar la hebra complementaria.
- **Hibridación:** Fase en la que los cebadores se unen a su región específica. La temperatura de hibridación es variable según los cebadores diseñados

dependiendo de la naturaleza de la secuencia, principalmente de su contenido en bases Guanina-Citosina.

- Extensión: Esta fase se realiza a 72°C y en ella la enzima ADN polimerasa incorpora los desoxinucleótidos disponibles en el medio y extiende la hebra que se está sintetizando.

A continuación se describen los reactivos (Tabla 3) y las condiciones de amplificación (Tabla 4) que han sido utilizadas de manera general.

**Tabla 3:** Reactivos utilizados en la PCR estándar

Reactivos	Cantidad
ADN genómico*	10ng
Tampón de MyTaq 10x (Bioline)	1X
Solución de cada primer (10µM)	0,2µM
MyTaq ADN polimerasa (Bioline)	1U
H2O csp	25µL

\*10ng de ADN genómico humano, equivalen a 7500 copias de cualquier segmento monocopia [Innis, 1990].

**Tabla 4:** Condiciones generales de amplificación

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	1'	
Desnaturalización	95	15''	25
Hibridación	Th*	15''	
Extensión	72	10''	
Conservación del Producto	4	∞	

\*Th: Temperatura de hibridación

No obstante, las condiciones de amplificación de cada fragmento dependen de la naturaleza del mismo, de forma que cada fragmento tiene unas condiciones específicas. Las reacciones de PCR se realizan de forma individual utilizando cebadores diseñados con el programa *Primer3*. A continuación se detallan las parejas de cebadores y temperaturas de hibridación utilizadas en el rastreo mutacional de cada gen en estudio (Tablas 5, 6, 7, 8, 9,10).

**Tabla 5:** Condiciones de amplificación de los exones de *RET*

Exón	Secuencia Forward (5'-3')	Secuencia Reverse (5'-3')	Tamaño (pb)	Th (°C)
1	CTAGCCGCAGTCCCTCCA	ACAGAAAGGCGATTCTGAAC	206	64
2	CCTTATTCTCACCATCCCTC	AGTGTCAGCGGCTGTGATAA	387	56
3	CCCCACAGACCTGACTTCTCT	AAGACCAGCAGTAGCAGGCA	375	57
4	GCCCCTGTCTGCTTGGTGC	GGACACTAAACCGACCGAG	342	64
5	ACTGACCAACGCCCTCTGC	GCACCTCATTTCTGGGGG	275	57
6	ATTGTTGTGCCCTACCTG	CCCAGACAGGCAATAGGTA	285	57
7	TCTACCCTCAGGCCATTACA	AACCATTTACTGCTGGGTCA	483	57
8	TGGTGCTGTCCCTGTCC	CCACCGGTGCCATCGCCCCT	262	57
9	AGCCTGTGTGTGTCCTGTG	CCATGCCCTGATTAAACCCT	160	59
10	GCGCCCCAGGAGGCTGAGTG	GGTGGTGGTCCCAGCCGCC	186	61
11	TGCCAAGCCTCACACCAC	TCCCTCCCTGGAAGGCAG	349	64
12	TTCTTCTCCCCTGTCATCCT	TCTTCAGGGTCCCATGCTG	307	59
13	GCAGGCCTCTCTGTCTGAACTT	GGAGAACAGGGCTGTATGGA	296	57
14	AAGACCCAAGCTGCCTGAC	GCTGGGTGCAGAGCCATAT	295	64
15	GTCTACCAGGCCGCTAC	ATGGTGCACCTGGGATCCCT	292	57
16	AGGGATAGGGCCTGGCCTTC	TAACCTCCACCCAAGAGAG	192	57
17	CACTGGTCTTTCACTCTCT	GGGAGGGAATGCACACAGAT	231	59
18	TGTGGTGGGCTGTCTTCTG	CTGGGGTGAGGCTGGAGTCT	235	63
19	AGTGACCGCCATCTCTGT	ATAGTGCAAAGGGGACAGC	229	57
20	AGTTTTGGTTCTTCAGTGC	GACTTTCATTCTCAGCAT	266	57
21	GCTTCTGTCAATTCTTATTGC	CTTGGCCTCACAAAATGC	268	61

**Tabla 6:** Condiciones de amplificación de los exones de *EDNRB*

Exón	Secuencia Forward (5'-3')	Secuencia Reverse (5'-3')	Tamaño (pb)	Th (°C)
5'UTR	TCGGTATCCGAGGAATTTTG	CTCAAATGGAGTGGGCAAGT	345	59
1*	GGGTTCATTTGAAGAGCGTAG	AACCGAAGCCCCAGAATAAG	470	58
1A	AGCTGACCCAAGTGCCTGT	CACAAGGCAGGACACAACC	428	57
1B	ATGACGCCACCCACTAAGAC	TTCTCATCTCCCCGTCTCC	418	57
2	AACCCCTAACAGAGCTTCG	GCTGGCATACTTAGTTTTATTGAA	254	57
3	TTGTATTTAAGCTGGCATACTT	GGGGAACAGGGGAAAAATAG	320	57
4	TGTTCAAGTAAGTGTGGCCTGA	CAAGAAAAAGGAAATATGCTCTGG	432	57
5	TGCTATGAGTAAATGAGCCATC	AAGATCGATGGAAACACTTCTGA	254	57
6	TTTCCTTACAAAAGCACAGAAGC	TTTTGAAAGCTTATATTTGAGCCATA	257	60
7	AAGGGCCCAAGAACTCCTAA	TTTGTTTGGCAAATGTTTCA	328	55

**Tabla 7:** Condiciones de amplificación de los exones de *EDN3*

Exón	Secuencia Forward (5'-3')	Secuencia Reverse (5'-3')	Tamaño (pb)	Th (°C)
1	GGTGCGCTGTGAGTGTG	CGGGCTTTTCTGGCTTCT	395	57
2	CAGTTCAGCCCCCTCTGG	CCCTGGGTCTTTTGTGTG	483	61
3	CCCCCTCTCAGGTGTTT	GCTGGGGTGGAGTGAGGT	403	59
4	TCTCGCTCCACACCCTTG	TCAGCACCTCTTTCTCTGG	396	59
5	AATTTGACACCGAAAAACCA	CAGAGCTACAAGGGATGCAAG	396	59
3'UTR	AGTTCCAATCAGGGAACAGG	TGTTAAGTGGGGACTCTTTGG	407	57

**Tabla 8:** Condiciones de amplificación de los exones de *SOX10*

Exón	Secuencia Forward (5'-3')	Secuencia Reverse (5'-3')	Tamaño (pb)	Th (°C)
1	CTCCCCCTCCTTCCTCC	AACGGGGTTTAGAGGAGAGC	375	61
2A	GTGCCACGTCCTGTCTC	CTGAGCACCTGGCTGACG	400	64
2B	AAGGTCAAGAAGGAGCAGCA	AGACAGTCCCGCTCTGAGGT	373	64
3	GAGTGTCTGGCATTACAG	CACCCTCAGCTCTGTCATCA	358	63
4A	CACCTGCCTCTAACCTGCTT	CATTGGGCGGCAGGTACT	275	61
4B	TTTGATGTGGCTGAGTTGGA	GCCGAGTAGAGGCCAGAG	398	61
5	TCAGCCCTCAGGACCCTATT	GGTCATCAGGGCAGTGAGC	350	61

**Tabla 9:** Condiciones de amplificación de los exones de *DNMT3B*

Exón	Secuencia Forward (5'-3')	Secuencia Reverse (5'-3')	Tamaño (pb)	Th (°C)
1	GGGGCTACAAGGGGAGTC	GACGCGTCCCTTCCTCTAGT	620	59
2	CTTGGGAACCTGGGACTCTG	TCCCTTCATGCTTTCCTGTG	661	58
3	GGCAAGAGCATCACCTAAG	CCCAGCTGAGATGAGAGTCC	490	58
4	GACGGACTGAGAGCAAAT	GGCAACCTCCATACATTTG	322	58
5	CACAGGCGATCAGTCTTTCA	CAGCACTTTAGGAGGCCAAG	647	56
6	CAGGCCTCCAGTCACCTAAG	AGCCACAACCAGTAGTGACAG	258	58
7	CTCTGGTCACCGACATCCTT	AGAAAGGTCCGTGGTGCATA	451	58
8	AGGGACAGTGGAGTGGACAG	TACAATCCCAGGCCTTTGTC	322	58
9	ATCCCAGGAATGGTCTCTT	TCTTGCTTCATCCCTGCTCT	289	59
10	GGTGCCTGCATGAAAAGATT	GTGGCTGACTCTCCCAAGA	438	59
11	AATTAGCCTGGTGTGCTTGG	CAGGGCACAGTCAAAAGACA	313	63
12-13	CTGGTACCCAGGCATAGCAT	TCCTCACCATACCCTTCCTG	601	59
14-15	CAAAAGCCACAACCCTGTTT	CCATGCCTAGGATTCCATTC	640	59
16	CACTGGGTCCAGGTGTTTCT	GGGAGCCTGTGGCTTACATA	213	59
17	CTTACCACCATGACCTCCT	GGTGGTTGAGAAGGTGGAGA	288	59
18	GCTGTGTGCTCAGCATCATT	ACATGTGGGTTTCAGGGTGT	275	59
19	AGTGGGTCCAGCTCTCTTTC	TCAGGTGACATAGGCTCTCC	202	58
20	CCTGCTGGTCTCAGGGAATA	GGATGGTGGCTCACATCTCT	680	58
21	CTGCAAAGGTCTGGTTGACA	CCACAGGTGGTCTGAAATCC	290	58
22	ACCTGTGCCTAGCAGAGGAC	TCACCAAGTGCATTTTTCCA	175	58
23	GGTCCCTCATTCTGTGCTC	TCTGCCATTTGTGTTTTGA	224	58

**Tabla 10:** Condiciones de amplificación de los exones de *PAX6*

Exón	Secuencia Forward (5'-3')	Secuencia Reverse (5'-3')	Tamaño (pb)	Th (°C)
1	GAGCTGTGCCAACTCTAGC	CTTTGATTTGGGGACAGCAG	338	61
2	CGCTGACAGCCCATTTTATT	AGGGGGAGACCTGTCTGAAT	292	61
3	TCCCCTTTTCTGGTTCTTT	AAAGCAGCCACCACAGAACT	383	59
4	GGTTGGGAGTTCAGGCCTAC	CGAAGTCCCAGAAAGACCAG	156	57
5	TGAGGATGCATTGTGGTTGT	ATGAAGAGAGGGCGTTGAGA	370	59
5a	CAGTAAGTTCTCATACATTGAAGG	GCATAGGGGAAGTGGACAGA	177	59
6	TCTGTCCACTTCCCCTATGC	AGAGAGGGTGGGAGGAGGTA	315	59
7	TGAGCTGAGATGGGTGACTG	AAGCCCTGAGAGGAAATGGT	324	59
8	AGACTACACCAGGCCCTTT	CACTGAAAAGATGCCAGAGA	388	57
9	AGGTGGGAACCAGTTTGATG	CGGTACCTGTATTCTTGCTTCA	191	57

10-11	GCTAACCTGTCCCACCTGAT	TCTCAAGGGTGCAGACACAG	491	57
12	GTGGCTGTGTGATGTGTTCC	TAAACACGCCCTCCATAAG	301	57
13	CATGTCTGTTTCTCAAAGGGA	AAGTCCATTCTTCCCAGT	307	57

### **3.3.1.d) Electroforesis en gel**

Tras la finalización de la PCR se realiza una electroforesis para comprobar la correcta amplificación de cada fragmento y su tamaño. Para ello, se utiliza la electroforesis convencional en geles de agarosa al 2 % p/v, teñidos con bromuro de etidio 10 mg/ml, visualizados bajo luz ultravioleta con el sistema *ChemIDoc™ MP System* (Biorad, USA) utilizando como referencia los marcadores de peso molecular V y VI de Roche Diagnostics (Alemania).

### **3.3.1.e) Secuenciación automática de los productos de PCR**

El proceso de secuenciación permite determinar la secuencia nucleotídica exacta de aquellos fragmentos amplificados previamente mediante PCR. Tras la PCR, se procede a la purificación enzimática de los cebadores y dNTPs no consumidos en la reacción utilizando ExoSAP-IT (USB Corporation, USA). Consiste en dos enzimas hidrolíticas: la Exonucleasa I, que degrada los cebadores y otros ADNs de cadena simple no específicos, y una fosfatasa alcalina que hidroliza los residuos de dNTPs. ExoSAP-IT se añade directamente al producto de PCR, se incuba a 37°C durante 15 minutos y continúa con la desactivación enzimática a una temperatura de 80°C. Una vez obtenido el producto purificado, se lleva a cabo la reacción de secuenciación basada en el método de Sanger (Sanger et al., 1977) utilizando el kit comercial BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, USA) según las condiciones de reacción y programa de amplificación que se detallan en las Tablas 11 y 12. La reacción se basa en el uso de dideoxinucleótidos (ddNTPs). Cada uno de los 4 dideoxinucleótidos está marcado con dos fluorocromos diferentes: un fluorocromo donador, la fluoresceína, y un fluorocromo aceptor que debe ser diferente para cada uno de los 4 dideoxinucleótidos. La fluoresceína actúa de forma que en el momento en que el láser incide sobre el capilar, ésta absorbe la energía y la transfiere al fluorocromo del mismo dideoxinucleótido. Cada fluorocromo aceptor emite a su correspondiente longitud de onda, de manera que dicha emisión es registrada por el

secuenciador, consiguiéndose así la detección e identificación del nucleótido terminador de cada fragmento obtenido en la reacción de secuenciación en función del rango de emisión registrado.

El producto de la reacción de secuenciación se purifica mediante el empleo de placas *Performa® DTR V3 96-Well Short Plate* (EdgeBio, USA), que contienen una matriz de filtración en gel hidratado que asegura la eliminación de aquellos reactivos residuales de bajo peso molecular que quedan tras la reacción de secuenciación. El producto purificado se introduce en el correspondiente dispositivo del secuenciador para proceder a la inyección en el secuenciador ABI Prism® 3730 de 48 capilares (Applied Biosystems). Las condiciones generales de inyección de voltaje y tiempo son 1,5 KV durante 15 segundos, aunque en función del producto a secuenciar, se pueden modificar los parámetros de tiempo y voltaje. La electroforesis se realiza dentro de cada uno de los capilares rellenos del polímero POP-7™ Performance Optimized Polymer (Applied Biosystems) bajo las siguientes condiciones generales de voltaje y tiempo: 9KV y 94 minutos (el tiempo de la carrera puede variar en función del tamaño de los productos). El tampón de electroforesis utilizado es 10X Buffer con EDTA (Applied Biosystems).

**Tabla 11: Reactivos utilizados en la reacción de secuenciación.**

Reactivos	Cantidad
Producto de la PCR purificado	2µl
Tampón de Secuenciación 5x (Applied Biosystems)	2,5µl
Solución de primer (10 µM)	0,5µl
BigDye® Terminator (Applied Biosystems)	0,5µl
H2O csp	10µl

**Tabla 12: Condiciones de la secuenciación por el método Sanger**

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	96	3'	
Desnaturalización	96	10''	35
Hibridación	50	5''	
Extensión	60	4''	
Conservación del Producto	4	∞	

Para el análisis de los datos obtenidos se realiza el alineamiento de las secuencias obtenidas del secuenciador con la secuencia de referencia obtenida de las diferentes bases de datos públicas ([www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/), [www.ensembl.org/index.html](http://www.ensembl.org/index.html)). La lectura e interpretación de la secuencia se lleva a cabo con el programa SeqScape v2.5 (Applied Biosystems).

### **3.3.1. e) Análisis de Microsatélites (SSRs y STRs)**

Las secuencias de tipo microsatélite (SSR o STR, Simple Sequence Repeats o Short Tandem Repeats) se caracterizan por la presencia de una secuencia común (motivo básico) repetida en tándem un elevado número de veces. Son secuencias muy variables entre individuos. Esta variabilidad se manifiesta como diferencias en la longitud entre los distintos alelos de un mismo locus. La tasa de mutaciones tipo deleción o inserción dentro de estas secuencias es muy elevada, utilizándose de forma habitual en el diagnóstico de diferentes patologías.

La utilización de la técnica PCR multiplex, es muy útil para la amplificación de microsatélites ya que permite amplificar varias secuencias específicas de ADN simultáneamente. Consiste en combinar en una única reacción todos los pares de cebadores de los STRs que se pretenden amplificar, junto con el resto de reactivos de la reacción. En el presente trabajo se ha utilizado el Kit *Multiplex PCR Master Mix* (QIAGEN, Holanda), con las siguientes condiciones y programa de amplificación (Tablas 13 y 14).

**Tabla 13: Condiciones de amplificación utilizadas para la reacción de Multiplex**

Reactivos	Cantidad
2x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix	25 $\mu$ l
Solución Q 5x (QIAGEN)	5 $\mu$ l
10x solución de cebadores, 2 $\mu$ M de cada cebador	5 $\mu$ l
ADN molde	1 $\mu$ g ADN/50 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O csp	50 $\mu$ l

**Tabla 14: Programa de amplificación de la reacción de Multiplex**

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	15'	
Desnaturalización	94	3''	
Hibridación	*Th	90''	35
Extensión	72	60''	
Extensión final	60	30'	

\*Th: Temperatura de hibridación

Los fragmentos son detectados mediante electroforesis capilar utilizando el secuenciador ABI Prism® 3730 de 48 capilares (Applied Biosystems). Por ello es necesario que los productos amplificados se encuentren marcados con diferentes fluorocromos. El marcaje se realiza en el extremo 5' del cebador directo o *forward* con el fluorocromo FAM-6 (Tabla 15). Las muestras se procesan de una en una, junto con un patrón interno, denominado estándar interno, que contiene fragmentos de ADN de tamaños conocidos, *GeneScan™ –500 LIZ® Size Standard* (Applied Biosystems).

**Tabla 15: Cebadores utilizados para la discriminación alélica en el promotor de PAX6**

Secuencia Forward (5'-3')	Secuencia Reverse (5'-3')	Tamaño (pb)	Th (°C)
[6FAM]GACACACGCTGACATAC	GATAAGAGGGGAGGGGGA	150	59

Con estos datos el programa informático mediante un cálculo de regresión y en base al tiempo de migración de los fragmentos del estándar interno, es capaz de determinar el tamaño en pares de bases de cada alelo.

### **3.3.1.f) Genotipación mediante tecnología Taqman**

Los estudios de discriminación alélica utilizando la tecnología Taqman, son ensayos que permiten, mediante PCR y la utilización de sondas, detectar las variantes de un SNP en una secuencia específica.

Cada una de las sondas que se utilizan poseen en su extremo 5' una molécula fluorescente ("*reporter*") distinta (FAM ó VIC), y una molécula no fluorescente en su extremo 3' denominada "*quencher*". Cuando la sonda está íntegra, la proximidad de "*reporter*" y "*quencher*" provoca el denominado efecto FRET (*Fluorescence Resonance*

*Energy Transfer*). El "*quencher*" capta la fluorescencia emitida por el "*reporter*" lo cual se traduce en la anulación de la fluorescencia de la sonda. Durante la PCR las sondas se unen específicamente a su secuencia complementaria y en el proceso de extensión la polimerasa gracias a su actividad 5' exónucleasa, elimina nucleótidos desde el extremo 5' provocando la liberación del "*reporter*" de la sonda que ha hibridado. Cuando se produce un desapareamiento, la eficiencia de la sonda para hibridar es menor y la polimerasa elimina la sonda en lugar de cortarla y liberar el "*reporter*". Esta rotura hace que se separen "*reporter*" y "*quencher*", lo que produce un aumento en la fluorescencia emitida por el "*reporter*". De esta manera, la fluorescencia generada durante la reacción de PCR indicará aquel alelo/s que están presentes en la muestra.

Para realizar la genotipación de la variante c.73+9277T>C (rs2435357) dentro del dominio *enhancer like* en el intrón 1 del gen *RET*, se realizó la reacción de PCR en el sistema 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Añadiendo sondas Taqman® (C\_\_16017524\_10) (Applied Biosystems) complementarias a cada uno de los alelos dentro de la variante.

El programa general de amplificación utilizado es: (95°-10')->[(92°-15'')->(60°-1')]x 40. Esta PCR se realiza a volumen final de 10µL, utilizando 15ng de ADN genómico y el kit comercial TaqMan 2x Genotyping PCR Master Mix (Applied Biosystems), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

### **3.3.2 Extracción de precursores neurales crecidos como NLBs a partir del SNE humano y de ratón**

Las muestras de intestino de pacientes HSCR, así como de individuos sometidos a cirugía intestinal sin sospecha de HSCR, son recibidas desde la Unidad de Cirugía del Hospital Infantil del Hospital Universitario Virgen del Rocío, en un tubo estéril envuelto en una gasa con suero salino, y procesadas en un plazo de tiempo no superior a 30 minutos.

El tejido se disecciona con ayuda de un bisturí estéril en PBS 1X (Phosphate Buffer, Gibco, Life Technologies) hasta aislar aproximadamente 1cm<sup>2</sup> de músculo liso. A partir de aquí se realizan cortes de unos 100µm para su posterior centrifugación a 1000 rpm durante 5 minutos. La muestras se incuban en una solución de Tripsina 0,26

mg/mL, Dispasa 5mg/mL, Hialuronidasa 0,28mg/mL, Elastasa 3,3 u/mL y Colagenasa 0,6 mg/mL en PBS durante 30 minutos a 37°C con agitación. La reacción enzimática se detiene con medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco, Life Technologies, USA) y FBS (Fetal Bovine Serum, Gibco, Life Technologies, California, USA) y se centrifuga. Finalmente se obtiene una suspensión celular que se cultiva en frascos *Ultra-Low attachment* (Corning® Ultra-Low attachment cell culture flasks, Sigma Aldrich, Alemania), en medio DMEM con penicilina 100U/mL, estreptomicina 100g/mL, 2mM, L-glutamina (Gibco, Life Technologies, California, USA), 0.05mM de 2-mercaptoetanol, 1% (v/v) de N1 (Sigma Aldrich, Alemania), 10% (v/v) de suero humano y suplementado con 20ng/mL de bFGF (basic Fibroblast Growth Factor), 20ng/mL de EGF (Epidermal Growth Factor) y 10ng/mL de GDNF (PeproTech, UK). A las 72 horas se pueden observar cuerpos esféricos flotantes denominados Neuroesferas o por su nombre en inglés "Neurospheres like bodies" (NLBs).

En el caso de los precursores entéricos obtenidos a partir de ratones CD1, se utiliza el tejido muscular obtenido a partir de intestinos de al menos dos ratones postnatales de siete días y se procede de la misma forma que en el caso del tejido humano, utilizando en su caso los mismos factores de crecimiento específicos de ratón.

Los cultivos se caracterizan mediante inmunocitoquímica. Para ello, se utilizan marcadores de precursores neurales (NESTINA), de neuronas (Tuj1), de glía (S100) y de músculo liso (SMA) (Ruiz-Ferrer et al., 2012)

### **3.3.2.a) Extracción de ADN de cultivos de precursores de SNE**

Para la extracción de ADN de cultivos celulares, los pellet de precursores neurales humanos congelados se resuspenden en tampón de lisis (Millipore, Darmstadt, Alemania) pipeteando vigorosamente. A continuación, se centrifugan a 13000 rpm (12054 g) durante 1 minuto, reservando el sobrenadante y desechando el pellet. Se añade Tris-HCl (pH 6,5), EDTA 0,5 M y Proteinasa K (10mg/ml) y se incuban a 45° durante 1 hora. Posteriormente, se añade v/v de una solución de Fenol/Cloroformo/Alcohol Isoamílico (Acros Organics, New Jersey USA), mezclando bien mediante vórtex y centrifugando finalmente durante 5 minutos a 13000 rpm. Se obtienen tres fases, de las cuales se traspara únicamente la fase acuosa superior a un

tubo limpio al que se añade Glicógeno (50µg/µl), Acetato sódico 3M y Etanol 100% frío. Se deja precipitar a -20 °C toda la noche. Por último, se centrifuga durante 5min a 13000 rpm, se desecha el sobrenadante y se lava el pellet con etanol al 70% dos o tres veces. Para finalizar, se resuspende el ADN en 20µl de agua de alto grado molecular.

### ***3.3.2.b) Estudio de Metilación del ADN obtenido de cultivos de precursores de SNE***

La metilación del ADN desempeña un papel importante en la regulación de la expresión génica. Alrededor del 70% de los dinucleótidos CpG presentes en el genoma de los mamíferos se encuentran metilados. Tanto la hipo como la hiper-metilación del genoma están relacionados con cambios en la expresión génica.

#### ***3.3.2. b.1) Metilación global***

Los niveles de metilación global de ADN extraído de precursores entéricos se obtienen con el uso del Imprint® Methylated DNA Quantification Kit (formato de placa de 48 pocillos, SIGMA) basado en la prueba de ELISA.

El ADN metilado se detecta mediante anticuerpos que reconocen las citocinas metiladas en la muestra (5mc) permitiendo cuantificar colorimétricamente la cantidad de citocinas metiladas en relación con un control positivo previamente metilado (5 mC + dC). La cantidad de ADN metilado presente en la muestra es proporcional a la absorbancia medida a 450 nm. Se utiliza ADN genómico a una concentración de 50 ng/µl y se realiza el ensayo por triplicado.

#### ***3.3.2. b.2) Transformación de ADN con Bisulfito Sódico y PCR específica de metilación (MSP)***

El estado de metilación de una secuencia específica de ADN puede determinarse utilizando sales de Bisulfito Sódico. La incubación del ADN diana con sales de Bisulfito Sódico da como resultado la desaminación de las citosinas no metiladas en residuos de uracilo, quedando las citocinas metiladas sin sufrir cambios (Tabla 16). Posteriormente, este ADN transformado se amplifica mediante PCR específica de metilación (MSP), que consiste en utilizar dos parejas de cebadores diferentes específicos para las secuencia metilada y no metilada. Esta técnica es muy óptima en muestras de ADN de baja concentración, siendo capaz de detectar un alelo metilado en una población de más de 10000 alelos no metilados (Herman et al., 1996).

**Tabla 16: Ejemplo de secuencia nucleotídica tratada con sales de Bisulfito sódico donde N es cualquier nucleótido.**

	Secuencia original	Después del tratamiento con Bisulfito
<b>ADN no metilado</b>	N-C-G-N-C-G-N-C-G-N	N-U-G-N-U-G-N-U-G-N
<b>ADN metilado</b>	N-C-G-N-C-G-N-C-G-N	N-C-G-N-C-G-N-C-G-N

Para la amplificación se utilizan cebadores modificados que se diseñan con el programa EpiDesigner (Sequenom, California, USA) en los cuales las citosinas no metiladas de la secuencia original son transformadas en timinas. Esto se debe a que una vez que se ha transformado el ADN con sales de Bisulfito sódico las hebras de ADN pierden su complementariedad, es por ello que sólo el cebador reverso podrá unirse al ADN diana, y entonces generará la plantilla para la unión del cebador directo.

Para incrementar la sensibilidad de la técnica, se realiza una doble PCR (*nested PCR*), utilizando inicialmente unos cebadores que amplifican un fragmento externo que no contenga dinucleótidos CG, es decir, reconocen una secuencia común a todas las muestras, es por ello que el fragmento se amplifica en caso de ADN tanto metilado como no metilado. A partir de este producto de amplificación, se realiza una segunda ronda de amplificación con unos cebadores internos (Tabla 18) capaces de distinguir entre la forma metilada (M) y la forma no metilada (U).

El tratamiento con sales de Bisulfito del ADN extraído de cultivos de precursores entéricos humanos se realiza con el EpiTect Bisulfite kit (QIAGEN, Holanda) siguiendo el protocolo "*Sodium Bisulfite Conversion of Unmethylated Cytosines in DNA from Low-Concentration Solutions*", siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se lleva a cabo la conversión de 100 ng de ADN de cada muestra.

Los fragmentos de ADN genómico que corresponden a las Islas CpG en estudio se amplifican mediante el *Multiplex PCR Kit* (QIAGEN, Holanda), siguiendo las siguientes condiciones (Tabla 17).

Por último, los productos amplificados se visualizan mediante un gel de agarosa al 2,5% y posterior tinción con bromuro de etidio. Como control de la cantidad de producto utilizado, se añaden a la PCR *Multiplex*, unos cebadores que amplifican ADN transformado independientemente de su estado de metilación.

**Tabla 17: Condiciones de amplificación de los fragmentos de ADN tratado con sales de bisulfito**

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Activación	95	15'	
Desnaturalización	94	30''	
Hibridación	*Th	90''	40
Extensión	72	90''	
Extensión final	72	10'	
Conservación del Producto	4	∞	

\*Th: Temperatura de hibridación

**Tabla 18: Cebadores utilizados para la reacción PCR específica de metilación (MSP). M corresponde a cebadores utilizados para la amplificación de ADN metilado y N a cebadores utilizados para la amplificación de ADN no metilado.**

Fragmento	Secuencia Forward (5'-3')	Secuencia Reverse (5'-3')	Tamaño (pb)	Th (°C)
1	TTGATATTTAAATTTGGGGTAGGTT	CATTTTACTACTTTTACAAAAAACACA	394	59
2	GGAGTTGGTAAGAAAGGATAGTATAGAAA	TAGGTGTGCTGGCTGCAGCCACTTC	616	59
1M	TATTTAAATTTGGGGTAGGTTTTC	CTTTAATTTAAAAACAACAATCGCT	216	55
1N	ATTTAAATTTGGGGTAGGTTTTTG	CTTTAATTTAAAAACAACAATCACT	215	55
2M	ATGTAGGCGAGCGTTAGAGTTC	TTACTTTATACAAAAACAACGCCGA	183	50
2N	GGAGATGTAGGTGAGTGTAGAGTTT	ATTACTTTATACAAAAACAACACAAA	186	57
Control	TGGATGATTGGAATTATTATTAGATTTT	AAAAAAATTTAAAAATTCTCAACCC	356	59

### 3.3.2. b.3) Análisis de metilación de Islas CpG mediante pirosecuenciación

La pirosecuenciación es una técnica capaz de cuantificar de forma directa el grado de metilación de fragmentos cortos de ADN amplificado. El análisis por pirosecuenciación se realiza igualmente a partir de ADN tratado con sales de bisulfito sódico. Inicialmente se lleva a cabo la amplificación de la región de interés por PCR, empleando una nueva pareja de cebadores en la cual uno de los cebadores está marcado con biotina, los cuales han sido diseñados con el programa *PyroMark Assay Design* (QIAGEN, Holanda) (Tabla 19), utilizando los reactivos del *PyroMark PCR Kit* (QIAGEN, Holanda) (Tabla 20) con las siguientes condiciones de amplificación (Tabla 21).

**Tabla 19: Cebadores utilizados para la reacción PCR previa a la pirosecuenciación**

Fragmento	Secuencia Forward (5'-3')	Secuencia Reverse (5'-3')	Tamaño (pb)	Th (°C)
1	TGATATTTAAATTTGGGGTAGGT	<i>Biotina</i> -TTAATTTAAAAACAACAATC	243	50

**Tabla 20: Reactivos utilizados para la PCR previa a la pirosecuenciación con el PyroMark PCR Kit.**

Reactivos	Cantidad
PyroMark PCR Master Mix	12.5µl
Coral Load Concentrate	2.5µl
Solución de cebador (10 µM)	1 µl
MgCl <sub>2</sub>	0.5 µl
ADN transformado	2 µl
H2O csp	5.5µl

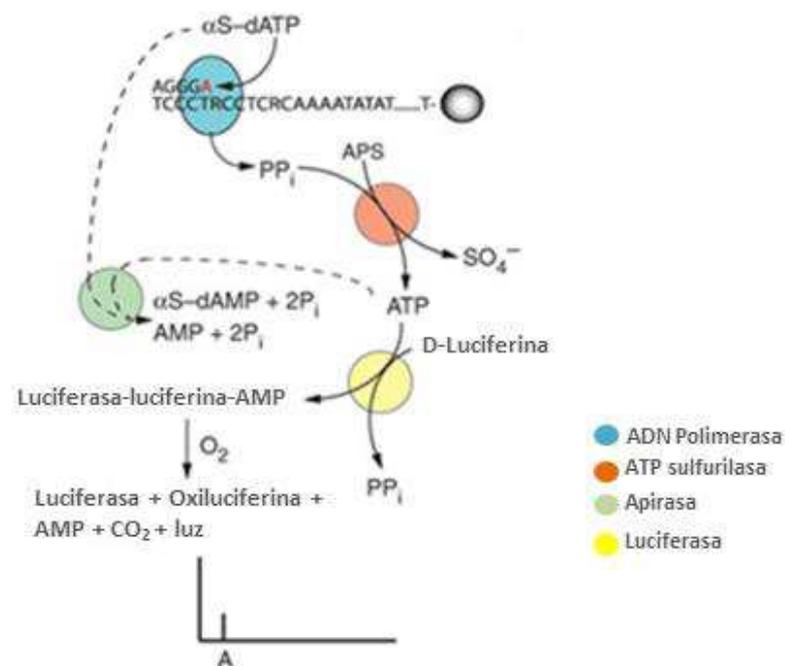
**Tabla 21: Condiciones de amplificación de los fragmentos de ADN tratado con sales de bisulfito**

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Activación	95	15'	
Desnaturalización	94	30''	
Hibridación	*Th	30''	40
Extensión	72	30''	
Extensión final	72	10'	
Conservación del Producto	4	∞	

\*Th: Temperatura de hibridación

El producto amplificado se emplea para la reacción de pirosecuenciación. A este producto se le añaden esferas de sefarosa disuelta en binding buffer que contienen en su superficie estreptoavidina, de forma que las cadenas que presentan un residuo de biotina en su extremo 5' se unirán a las mismas. Tras sucesivos lavados y ciclos de desnaturalización, se añade un tercer cebador de secuenciación complementario a la hebra molde (Secuencia (5'-3'): GTTAGGTTTATTTGTTTTT), a partir del cual se produce la elongación y cuantificación de nucleótidos (dNTPs) incorporados. La hebra complementaria se sintetiza en presencia de dos sustratos;

adenosina 5' fosfosulfato (APS) y luciferina, y de las enzimas ADN polimerasa, ATP-sulfurilasa, luciferasa y apirasa. El proceso de pirosecuenciación se inicia cuando uno de los cuatro deoxi-nucleótidosfosfato (dNTPs) complementario se incorpora a la cadena molde unida a las esferas de sefarosa, proceso que es catalizado por la ADN polimerasa, dando como resultado la liberación de pirofosfato (PPi) en una cantidad equimolar a la cantidad de dNTPs incorporados. La liberación de PPi desencadena la formación de ATP a partir de adenosina fosfosulfato (APS) en presencia de la ATP sulfurilasa. El ATP formado proporciona la energía necesaria para dar lugar a un complejo inestable luciferasa-luciferina-adenosin monofosfato (AMP), que en presencia de oxígeno da como resultado la liberación de luz en una cantidad proporcional al ATP disponible y por lo tanto al PPi (Figura 16).



**Figura 16: Cascada enzimática de la reacción de pirosecuenciación.** (Adaptada de Tost et al., 2007)

La enzima apirasa se encarga de degradar el ATP y los dNTPs no incorporados, tras cada reacción. La adición consecutiva de dNTPs genera un pirograma que representa la dispensación secuencial de dNTPs y la intensidad lumínica asociada que

permite su cuantificación. Los experimentos de pirosecuenciación se llevan a cabo en el equipo *Pyromark Q24* (QIAGEN, Holanda).

### **3.3.2.c Extracción de ARN mensajero (ARNm) y conversión a ADN complementario (ADNc) a partir de cultivos de precursores de SNE y tejido intestinal.**

Para la extracción de ARNm de tejido intestinal, se utiliza en un primer paso el sistema GentleMACS™ Dissociator para producir la disociación del tejido. Tras ello se utiliza el ThermoMACS™ Separator System (Miltenyi Biotech) a partir de tejido disociado y directamente de cultivos de precursores humanos de SNE. Para el aislamiento de ARNm y posterior transformación en ADNc se utiliza el  $\mu$ MACS™ One-step cDNA Kit (Miltenyi Biotech) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Con este sistema, la extracción de ARNm se consigue añadiendo Oligo(dT) superparamagnéticos al lisado celular y posteriormente se añade la mezcla a una columna con un imán quedando el ARN retenido gracias a las fuerzas de atracción electromagnéticas dependientes del aporte de temperatura que se establecen con el ThermoMACS™ Separator. Sobre esta columna se realizan diferentes lavados, y posteriormente la adición de la transcriptasa inversa para proceder con la reacción enzimática de síntesis de ADNc. Todo este proceso se realiza en la misma columna, lo cual minimiza la probabilidad de que exista contaminación de ADN. Por último, tras sucesivos lavados se eluye el ADNc sintetizado de la columna.

### **3.3.2. d PCR cuantitativa**

El sistema de PCR en tiempo real se basa en la detección y cuantificación de marcadores fluorescentes a lo largo de la reacción de PCR, permitiendo conocer la cantidad de fluorescencia emitida durante la fase exponencial de la reacción donde un aumento significativo del producto de PCR se correlaciona con la cantidad inicial de ADN o ADNc de estudio.

En el presente estudio se han empleado dos tipos de estrategias disponibles para realizar ensayos de cuantificación por PCR a tiempo real, Taqman y SYBR Green, utilizando los termocicladores 7500 y 7900HTFast Real-Time PCR System (Life Technologies, USA).

En el caso del termociclador 7900HT Fast Real-Time PCR System, el análisis de expresión de precursores entéricos y tejido intestinal se realizó mediante el uso de *TaqMan Low Density Arrays* (TLDA, Life Technologies, USA).

Estas placas permiten analizar mediante PCR cuantitativa a tiempo real la expresión de genes previamente seleccionados. En el presente trabajo se utilizaron dos tipos de placas prediseñadas; *TaqMan® Human Stem Cell Pluripotency Array* y *TaqMan® Human Transcriptional Regulatory Network in Embryonic Stem Cell Array Plate* (Life Technologies, USA). Las cuales contienen las sondas Taqman y los oligos de 96x4 ó 48x8 genes diferentes (Figuras 17 y 18 respectivamente).

Replicates	Part																								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	CTL	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	A
1	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	B
	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	C
	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	D
2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	CTL	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	E
	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	F
	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	G
3	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	CTL	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	I
	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	J
	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	K
4	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	CTL	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	M
	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	N
	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	O
	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	P

Figura 17: Formato de 96 genes para la placa equivalente a 384 pocillos *TaqMan® Human Stem Cell Pluripotency*

Replicates	Part																								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	CTL	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	A
1	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	B
	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	C
2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	CTL	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	E
	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	F
3	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	CTL	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	I
	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	J
4	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	CTL	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	M
	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	N
5	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	CTL	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	O
	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	P
6	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	CTL	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	E
	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	F
7	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	CTL	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	I
	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	J
8	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	CTL	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	M
	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	N

Figura 18: Formato de 48 para la placa equivalente a 384 pocillos *TaqMan® Human Transcriptional Regulatory Network in Embryonic Stem Cell*.

Para el procesamiento de los datos, se utiliza el software de Life Technologies SDS 2.1 usando el método  $\Delta\Delta Ct$  de cuantificación relativa (Livak et al., 2001). Estos valores denominados "Ct" (Ciclo umbral) equivalen al ciclo en el cual la emisión de la intensidad del marcador fluorescente se eleva por encima del ruido de fondo en la fase exponencial de la reacción de PCR. La media de los valores de cada gen normalizados frente a un control endógeno (gen de expresión constitutiva en la célula) se utiliza para calcular el valor de expresión relativa que se representa como  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (abundancia relativa).

En ambos casos se utiliza ADNc molde, a una concentración aproximada de 50ng/ $\mu$ l. Para la PCR a tiempo real se combina el ADNc con la mezcla de reacción TaqMan® Universal PCR Master Mix (2x) (Life Technologies, USA), con las siguientes condiciones de amplificación (Tabla 22).

**Tabla 22: Programa de amplificación PCR cuantitativa**

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Rampa	50	2'	
Desnaturalización inicial	94.5	10'	
Desnaturalización	97	30''	40
Hibridación	59.7	1'	

Los datos obtenidos se analizan mediante el programa *RQ Manager* (Life Technologies, USA). Los valores introducidos para cada gen son los  $\Delta Ct$  de cada experimento considerando como expresión positiva exclusivamente aquellos genes en los cuales el Ct es menor de 32, siguiendo las recomendaciones del fabricante. En aquellos casos en los que no se detecta expresión del gen, se asigna un valor Ct de 40 para hacer las comparaciones. Tras la normalización de los datos obtenidos con el control endógeno *GAPDH*, se aplica como algoritmo de agrupación, la distancia promedio (*average linkage clustering*), con un coeficiente de correlación asimétrico (*uncentered correlation*).

Por otro lado, se han realizado estudios de expresión utilizando *SYBR Green* (BioRad, USA) en el termociclador 7500HT Fast Real-Time PCR System. El colorante SYBR Green (Witter et al. 1997) detecta ADN bicatenario, que evita el uso de sondas

específicas. Este compuesto se une al ADN intercalándose en la doble hélice, y genera una señal fluorescente cuando la muestra es excitada por una fuente de luz. En este caso se utiliza el gen *BETA-ACTINA* como control endógeno, y se considera como valor de expresión positiva un  $\Delta Ct < 35$ , siguiendo las recomendaciones del fabricante. Cada reacción contiene 100ng/ $\mu$ l de ADNc de cada muestra y se utiliza adicionalmente un ADNc de cerebro comercial (cDNA, from adult human normal brain tissue, Life Technologies, USA) para medir la eficiencia de la reacción

### **3.3.2. e Inmunocitoquímica**

Para el estudio de marcadores celulares presentes en precursores neurales de SNE en cultivo se siembran las células en portaobjetos tratados para su adhesión con Poli-D-Lisina y Fibronectina y posterior fijación con 4% (p/v) de paraformaldehído en PBS 0,1M. Estos se incuban durante una hora en suero de bloqueo BSA (Bovine Serum Albumin) al 2,5% (p/v) y 0,1% de Triton. A continuación, se añade el anticuerpo primario disuelto en la solución de bloqueo a la concentración requerida y se incuba a 4°C durante 16-18h. Transcurrido ese tiempo, los cubres se someten a varios lavados con PBS 1x y tras ello, se añade el anticuerpo secundario específico a temperatura ambiente durante 1h en oscuridad. Finalmente, los portaobjetos tras varios lavados de nuevo con PBS 1x se montan con el medio de montaje acuoso *Fluoro-Gel II with DAPI* (EMS, USA). Los núcleos celulares se contratiñeron con DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol).

La señal fluorescente se detecta usando un microscopio confocal LeicaSpectra TCS SP2 (Leica Microsystems). El conteo de células se realiza tomando diez imágenes por condición en la cual se cuentan al menos un número de 700 células. Los resultados se expresan en porcentaje de células marcadas frente al número total de células.

Se han realizado dos estudios de inmunocitoquímica con condiciones diferentes en cada caso:

#### *3.3.2.e.1) Detección de la expresión de DNMT3B en precursores de SNE mediante inmunocitoquímica.*

El anticuerpo primario utilizado es anti-DNMT3B (conejo policlonal) a la dilución 1:100 (Santa Cruz Biotechnology, USA), y el anticuerpo secundario utilizado es anti-

conejo IgG, marcado con Alexa Fluor 568 (Life Technology, USA), y se utiliza a una dilución 1:200. Además, el núcleo de las células es teñido con DAPI.

3.3.2. e.2) Detección de la expresión de PAX6 en precursores de SNE mediante inmunocitoquímica.

El anticuerpo primario utilizado es anti-PAX6 (conejo policlonal) a la dilución 1:20 (Santa Cruz Biotechnology, USA), y el anticuerpo secundario utilizado fue anti-conejo IgG marcado con Cy2 a la dilución 1:200.

Para NESTINA, se utilizó anticuerpo primario de cabra (policlonal) a la dilución 1:400 (Santa Cruz Biotechnology, USA) y anticuerpo secundario anti-cabra IgG marcado con Cy5 (Jackson Immuno Research Laboratories, USA.), utilizando una dilución 1:200. Además, el núcleo de las células fue teñido con DAPI.

**3.3.2.f Inmunoprecipitación de Cromatina**

La Inmunoprecipitación de cromatina es una herramienta muy útil para el análisis de modificaciones epigenéticas y la identificación de proteínas reguladoras asociadas con regiones específicas del genoma, mediante el uso de un anticuerpo específico que reconoce la proteína en estudio. Consta de varios pasos.

En primer lugar se realiza la fijación, para ello se resuspenden los pellets de precursores neurales en 1 ml de formaldehído al 1% en PBS con el objetivo de fijar reversiblemente las células de interés provocando el entrecruzamiento proteína-ADN. Se incuban durante 10 minutos a 37°C y se centrifugan a 1000 rpm durante 5 minutos reservando el pellet. Posteriormente se procede a la fragmentación del ADN. Para ello se resuspende el pellet en Buffer de lisis pipeteando hasta que se forme espuma y se realiza la fragmentación en un sonicador Bioruptor® Standard Sonicator (Diagenode) durante una hora y 30 minutos con 6 ciclos encendido/apagado de 15 min cada uno. De esta forma se obtiene un tamaño de fragmentos entre 100-250 pb, óptimo para PCR convencional y secuenciación. A partir de aquí se separa la muestra en dos alícuotas dejando como control una de ellas a la cual no se añade anticuerpo (*Input*).

Posteriormente, se añade el anticuerpo a la concentración óptima y se deja incubando a 4°C en rotación durante toda la noche, tras ello se continúa con el uso

del Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) Assay Kit (Millipore, Darmstadt, Alemania), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Finalmente se purifica el ADN añadiendo v/v de una solución Fenol/Cloroformo/Alcohol Isoamílico (Acros Organics, USA), mezclando bien mediante vórtex y se centrifuga durante 5 minutos a 13000 rpm. Se obtienen tres fases, de las cuales se traspasa únicamente la fase acuosa superior que es la que contiene el ADN, a un tubo limpio y seguidamente se añade el Glicógeno (50µg/µl), Acetato sódico 3M y Etanol 100% frío. Se deja precipitar a -20º toda la noche. Por último, se centrifuga durante 5 min a 13000 rpm. Es necesario desechar el sobrenadante y lavar el pellet con etanol al 70% dos o tres veces. Se deja secar y para finalizar se resuspende el ADN en 20µl de agua de alto grado molecular.

En el presente trabajo se han realizado dos ensayos de inmunoprecipitación de cromatina seguidos de amplificación por PCR con las siguientes condiciones.

3.3.2. f.1) Inmunoprecipitación de Cromatina utilizando anticuerpo específico para p300.

Para el primer ensayo de ChIP se utiliza anticuerpo específico anti- p300 (ratón, monoclonal, *ChIP Grade*) a una cantidad de 2.5µg (Abcam, UK). Para posterior amplificación mediante PCR del fragmento de *PAX6* localizado en el promotor, se utiliza la siguiente pareja de cebadores y temperatura de hibridación (Tabla 23)

**Tabla 23: Secuencia y temperatura de hibridación de la pareja de cebadores para la amplificación del fragmento dentro del promotor de *PAX6***

Secuencia Forward (5'-3')	Secuencia Reverse (5'-3')	Tamaño (pb)	Th (°C)
CACGCTGACATACCGACATC	AGGGGAGATAAGAGGGGAGG	151	64

3.3.2. f.2) Inmunoprecipitación de Cromatina utilizando anticuerpo específico para DNMT3B

Para el segundo ensayo de ChIP se utiliza anticuerpo específico anti- Dnmt3b (ratón, monoclonal, *ChIP Grade*) a una cantidad de 5µg (Abcam, UK). Para posterior amplificación mediante PCR de fragmentos localizados a lo largo del promotor y la

secuencia codificante de *Pax6*, se han utilizado las siguientes parejas de cebadores y temperatura de hibridación (Tablas 24).

**Tabla 24: Parejas de cebadores y temperatura de hibridación para la amplificación mediante PCR de fragmentos localizados a lo largo del promotor y secuencia codificante de *Pax6*.**

Fragmento	Secuencia Forward (5'-3')	Secuencia Reverse (5'-3')	Tamaño (pb)	Th (°C)
Promotor	GGAGGACAATACCAGCCAGA	TCGGGGAGGGTTTCTATGAC	485	64
1	CCCGGTTGCAGATCTGCTA	ATCCGCAGCAACTCCTCTAC	271	64
2	TGCGGAGTGATTAGTGGGTT	CGGCTGGAGAGTGAGAGATA	255	63
3	TGCATATAATTGAACCTGGGACA	TCGAAGACACACTCTACCTTTT	157	62
4	AGGAAACCATGATCGACAAGA	GTGTGTGTTGTCCCAGGTTC	150	63
5	GGTGCTGGACAATGAAAACG	CTTGGCTTACTCCCTCCGAT	202	64

### 3.3.3. Estudios en Pez-Cebra

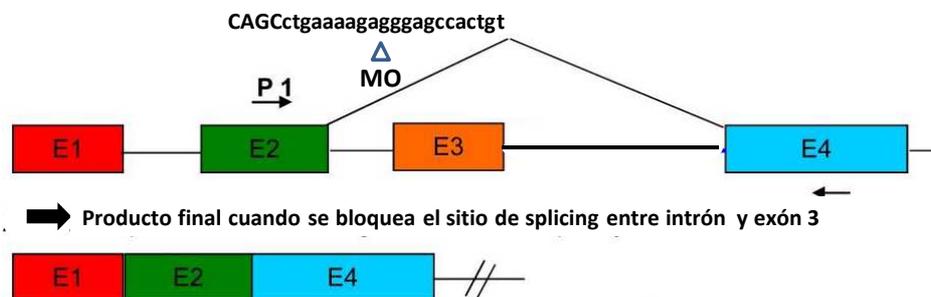
#### 3.3.3.a Knockdown de Pez cebra *Tg(-8.3bp $hox2b$ :Kaede)*

Para el estudio del efecto de la bajada de expresión de DNMT3B en el desarrollo del SNE en un contexto fisiológico, se ha realizado el knockdown de pez cebra en la línea transgénica *Tg(-8.3bp $hox2b$ :Kaede)* mediante la microinyección de morfolino (Mo) frente a *Dnmt4*. Los morfolininos son moléculas sintéticas capaces de bloquear el proceso de traducción del ARN. En términos de estructura, la diferencia entre los morfolininos y el ADN es, que los primeros tienen bases unidas a anillos de morfolino en lugar de a anillos de desoxirribosa y a su vez están unidos a través de grupos fosfordiamidos en lugar de fosfatos. Normalmente son secuencias de unas 25 pares de bases que se unirán a secuencias complementarias del ARN.

Para el diseño de morfolino, *Dnmt4* es el gen dentro del genoma del pez cebra que, según herramientas bioinformáticas (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/homologene>), presenta un mayor porcentaje de homología con DNMT3B en humanos. Ambas proteínas presentan el dominio denominado PWWP de unión al ADN y el dominio metiltransferasa, que en el caso del pez cebra se denomina dominio AdoMetil\_Metilasa responsable de catalizar los procesos de metilación utilizando S-

adenosil-L-metionina como sustrato. Además, este gen se expresa en intestino entre las 48 y las 72 horas posteriores a la fertilización (Takayama et al. 2014).

En el presente trabajo se ha diseñado dos tipos de Mo. Un primer Mo frente a la secuencia de Dnmt4 en el sitio de splicing entre el intrón y el exón 3, el cual bloquea el sitio de splicing dando lugar a la eliminación del exón 3 y la formación de un codón de parada prematuro tras el exón 4 (Figura 19). Por otro lado, se ha diseñado un segundo Mo que consiste en la misma secuencia nucleotídica elegida para el Mo anterior pero en este caso con un desapareamiento de 5 bases. El objeto de este segundo Mo es que sirva como control para testar la especificidad del Mo diseñado para producir la disminución de expresión de Dnmt4.



**Figura 19:** Producto final esperado tras el uso del morfolino oligonucleótido dirigido a la región de splicing situada entre el intrón y el exón 3 de *Dnmt4*.

Ambos fueron sintetizados por *GeneTools* (<http://www.gene-tools.com/>). Las secuencias son: *dnmt4-ex3F-SB* CAGCCTGAAAAGAGGGAGCCACTGT; *control-SB* CACCCTCAAAGACGGAGCAACTCT.

Se ha descrito que una de las limitaciones generales que presenta el uso de Mos es que estos son capaces de inducir efectos *off-target* en un 15-20% de los casos dando lugar a muerte neuronal por apoptosis siendo la activación de p53 el mecanismo más común implicado en este proceso. Es por ello que realizando la coinyección con el Mo frente a p53 se disminuye este efecto. La bajada de expresión de p53 por sí solo no induce defectos importantes, ya que p53 no es necesario para el desarrollo normal de los peces. Este Mo no afecta a la eficacia de otros Mo frente a genes específicos, ya que se ha demostrado que no interfiere con la penetrancia de

fenotipos específicos debidos a la bajada de expresión de otros genes (Robu et al., 2007).

Es por ello que se co-inyectó con el morfolino frente a p53 (secuencia p53 Mo: GCGCCATTGCTTTGCAAGAATTG).

Los Mos se preparan a una concentración stock de 10mM en “Danieau's buffer” 1x (58 mM NaCl, 0.7 mM KCl, 0.4 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.6 mM Ca (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 5 mM Hepes, pH 7.6). Las diferentes diluciones se realizan en “Danieau's buffer” añadiendo 0,05% de Phenol Red (Sigma) y se microinyectan en el saco vitelino del pez cebra en el estadio de desarrollo de 1-4 células usando un microinyector *Pneumatic Picopump* observando a través de un estereoscopio Leica MZ6. Se ha microinyectado a diferentes cantidades de Mo para determinar la concentración óptima (0,5-8ng). Una vez microinyectados, los embriones se incuban en agua con azul de metileno a 25° C.

### **3.3.3.b Extracción de ARNm y conversión a ADNc en Pez-Cebra**

Para la extracción de ARN de pez cebra se utilizó un número de treinta larvas lo que supone alrededor de 10mg de tejido animal. A las 48 horas postfertilización estas larvas se congelan a -80º con el propósito de detener el desarrollo de las mismas. Tras ello se procede a la extracción de ARN mediante el kit *RNeasy Mini Kit* (QIAGEN, Holanda), basado en el uso de columnas que poseen una membrana de sílice con una capacidad de unión de 100µg de ARN. Las muestras se lisan y homogenizan inicialmente, y tras ello se utiliza etanol de una pureza del 70% para proporcionar una condición mejor de unión. El lisado se añade a la membrana y posteriormente se realizan sucesivos lavados según las recomendaciones del fabricante y el tratamiento con ADNasa para eliminar cantidades residuales de ADN genómico. El ARN puro se eluye en 30µl de agua de alto grado molecular, libre de ARNasa. Por último, se cuantifica la concentración y se determina su pureza con el sistema de espectrofotometría NanoDrop.

Se realiza la síntesis de ADNc a partir de 1 µg de ARN obtenido de pez cebra mediante el uso de la transcriptasa inversa iScript (iScript™ cDNA Synthesis Kit, BioRad), siguiendo las siguientes condiciones de amplificación (Tabla 25).

Tabla 25: Reactivos y programa utilizado para la síntesis de ADNc a partir de ARNm

Reactivos	Cantidad
5x iScript buffer	4 $\mu$ l
Transcriptasa inversa iScript	1 $\mu$ l
ARN molde	1 $\mu$ g
H2O csp	20 $\mu$ l

Etapas	Temperatura ( $^{\circ}$ C)	Tiempo
Incubación	25	5'
	42	30'
	85	5'
Conservación del producto	4	$\infty$

### 3.3.3.c Inmunohistoquímica

Para la inmunohistoquímica en pez cebra se han utilizado larvas enteras en estadios de 3 y 6 días, es decir, previamente a la colonización total del intestino por parte de los precursores entéricos y posteriormente a dicha colonización. Las larvas se fijan en PFA 4% en PBS durante dos horas a temperatura ambiente. Tras ello se lavan tres veces en agitación durante diez minutos cada una de ellas con PBS, y se incuban con agitación en solución de bloqueo (BSA, DMSO, Saponina, Suero de cabra, y PBS10x). Se incuban con anticuerpo primario anti- HuC/D (Life Technologies, USA) a una dilución 1/200 a una temperatura de 4 $^{\circ}$ C con agitación y durante toda la noche. Por último tras sucesivos lavados con PBS se añade el anticuerpo secundario anti-ratón Cy2 a una dilución 1/1000, durante dos horas a temperatura ambiente y bajo agitación.

Para contar el número de células presentes en el intestino se utiliza el software *Fiji* (Just ImageJ, <http://fiji.sc/Fiji>).

### 3.3.4 Análisis estadístico

#### 3.3.4. a) Expresión de los datos y significación estadística

Los datos obtenidos de los diferentes estudios de expresión (Taqman y SYBR), estudio de metilación global del ADN, inmunocitoquímica, y número de células

presentes en el intestino de pez-cebra, se han expresado como la media  $\pm$  error estándar de la media (SEM) de los valores obtenidos en un mínimo de 3 experimentos. El método paramétrico de la t de “Student”, pareado o no, de dos colas, se ha utilizado cuando se compararon dos grupos de datos, considerándose significativas las diferencias cuando el valor de p es menor a 0,05.

#### **3.3.4. b) Aplicación de la ley de Hardy-Weinberg**

Para las variantes de secuencia analizadas se ha calculado la frecuencia alélica y genotípica en los grupos de pacientes y controles. El modelo de Hardy-Weinberg se utiliza para calcular las frecuencias genotípicas esperables a partir de las frecuencias alélicas observadas. Si se considera en una población la pareja alélica A1 y A2 de un locus dado, donde “p” es la frecuencia del alelo A1 y “q” la frecuencia del alelo A2 y que  $p + q = 1$ . Entonces se cumple que  $(p + q)^2 = p^2 + 2pq + q^2 = 1$ , donde:

$p^2$  = frecuencia del genotipo A1 A1

$2pq$  = frecuencia del genotipo A1 A2

$q^2$  = frecuencia del genotipo A2 A2

Para verificar el cumplimiento de la ley de Hardy-Weinberg en cada uno de los grupos de estudio y para las variantes en estudio, se ha utilizado el test de  $\chi^2$  con la corrección de Yates comparando los valores de frecuencias genotípicas esperables frente a los valores observados. Si el valor de  $\chi^2$  es significativo no se cumple el equilibrio de Hardy-Weinberg, lo cual es indicativo de consanguinidad, selección, evento mutacional, u otro fenómeno que estuviera alterando el equilibrio, como un fallo en la genotipación.

#### **3.3.4. c) Test de $\chi^2$ y test de Fisher**

Con el fin de evaluar la posible asociación de una determinada variante de secuencia a la enfermedad estudiada, se han realizado estudios de casos y controles. En este tipo de estudios, las asociaciones entre enfermedades y marcadores se hallan comparando las frecuencias de un alelo particular de un marcador en una serie de pacientes con las de una serie de controles sanos. Se ha utilizado el test estadístico  $\chi^2$  de Pearson para detectar diferencias en las distribuciones de los polimorfismos entre dos grupos de estudio. Para su aplicación es necesario el uso del paquete informático

---

SPSS versión 18.0 para Windows. El valor de p que se considera límite para afirmar que dos variables están asociadas es  $p < 0,05$ .

### **3.3.5. Herramientas Bioinformáticas**

#### **3.3.5.a) Bases de datos**

Las secuencias génica, proteica y el transcrito de los genes, así como la información de las mutaciones y polimorfismos descritos, se han obtenido a través del buscador del genoma humano UCSC (<http://genome.ucsc.edu/>), del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y la base de datos Ensembl (<http://www.ensembl.org>).

#### **3.3.5.b) Nomenclatura de las variantes de secuencia**

La nomenclatura empleada para la descripción de las variantes de secuencia identificadas en el presente trabajo se encuadra dentro de las recomendaciones de la “Human Genome Variation Society” (<http://www.hgvs.org/mutnomen/>) (Dunnen y Antonarakis, 2001).

#### **3.3.5.c) Análisis de secuencias**

-El alineamiento de secuencias nucleotídicas o proteicas da información sobre la similitud de las secuencias analizadas. Esta información es muy útil para ver la conservación inter-especie, así como la búsqueda de regiones con un alto grado de homología. Para este tipo de análisis se ha utilizado la herramienta CLUSTAL OMEGA ([www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/)).

-Para la identificación de dominios funcionales como ayuda para entender la funcionalidad de la proteína, así como, definir la secuencia consenso de un dominio funcional se ha utilizado la herramienta *ScanProsite* la cual realiza una búsqueda de dominios, patrones o motivos proteicos incluidos en la base de datos PROSITE (de Castro et al., 2006) (<http://expasy.org/tools/scanprosite/>).

-La herramienta BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) encuentra regiones similares entre secuencias biológicas en distintas bases de datos. Esta herramienta, además, es de gran utilidad a la hora de diseñar cebadores y analizar la especificidad de secuencia que presentan estos.

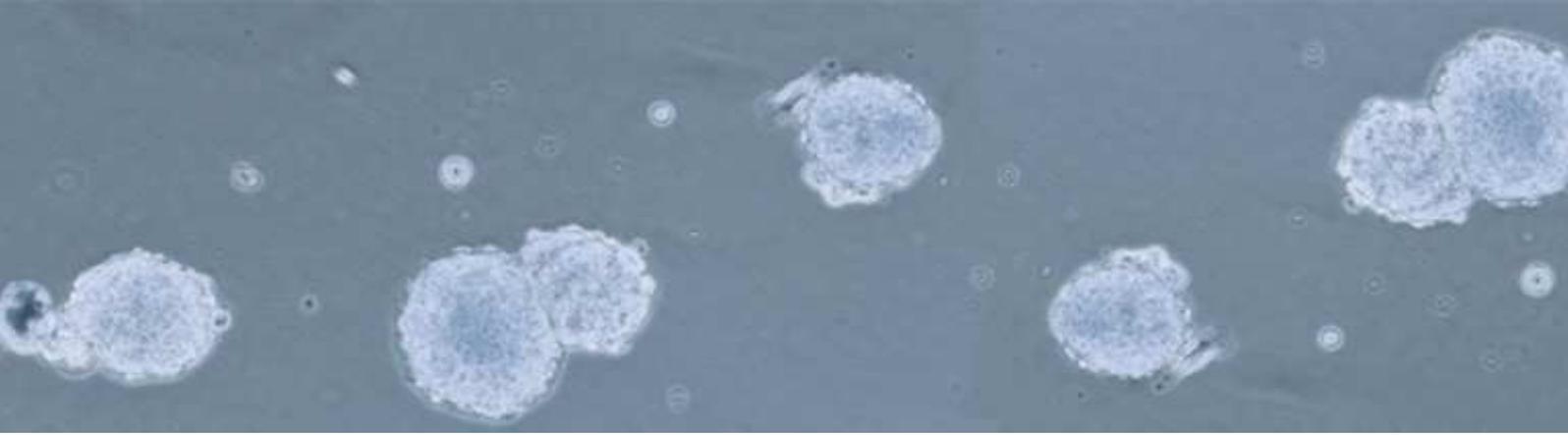
#### **3.3.5.d) Análisis de la patogenicidad de las variantes de secuencia**

- Alteración del splicing.- Para analizar el efecto de una variante en la aparición o pérdida de sitios donadores o aceptores del splicing se han utilizado las herramientas disponibles en: [http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/splice.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html) y [http://www.tigr.org/tdb/GeneSplicer/gene\\_spl.html](http://www.tigr.org/tdb/GeneSplicer/gene_spl.html)

- Alteración de sitios de unión de factores de transcripción.- Para analizar si una variante altera el sitio de unión de factores de transcripción en la secuencia promotora del gen se han utilizado las herramientas disponibles en: PROMO [http://alggen.lsi.upc.es/cgi-bin/promo\\_v3/promo/promoinit.cgi?dirDB=TF\\_8.3](http://alggen.lsi.upc.es/cgi-bin/promo_v3/promo/promoinit.cgi?dirDB=TF_8.3) y TF-SEARCH <http://diyhpl.us/~bryan/irc/protocol-online/protocol-cache/TFSEARCH.html>

- Predicción de la influencia de un cambio de aminoácido en la función de la proteína.- El programa SIFT (<http://blocks.fhcrc.org/sift/SIFT.html>), predice si una determinada sustitución aminoacídica en una proteína es tolerada o no desde el punto de vista de conservación de su funcionalidad. Para ello se basa en homologías de secuencias con otras especies y en las propiedades físico-químicas de los aminoácidos (Ng y Henikoff, 2003). La herramienta PolyPhen (<http://coot.embl.de/PolyPhen>) es capaz de estimar el posible impacto de una sustitución aminoacídica en la estructura y función de una proteína usando parámetros similares a los de SIFT (Ramensky, 2002).

-Interacciones, co-expresión, co-localización y similitud de dominios proteicos. La herramienta bioinformática GeneMANIA (<http://www.genemania.org/>) permite introducir una serie de genes de interés a partir de los cuales se obtiene una red interactiva de asociación funcional generada entre los genes de interés y diferentes conjuntos de datos (Mostafavi et al., 2008).



## 4. RESULTADOS



#### **4.1 Identificación de variantes patogénicas en dos pacientes con Síndrome de Waardenburg Tipo IV.**

En el presente trabajo se incluyeron un paciente con Síndrome de Shah-Waardenburg o SW4, el cual se caracteriza por la presencia de HSCR junto a otros rasgos clínicos como sordera y alteraciones pigmentarias en piel, pelo y ojos, y un segundo paciente que presentaba la variante neurológica de SW4 llamada neuropatía desmielinizante periférica, leucodistrofia desmielinizante central, síndrome de Waardenburg y enfermedad de Hirschsprung (PCWH).

Con el objetivo de determinar la causa molecular de la aparición del fenotipo en estos dos pacientes sindrómicos, se realizó el rastreo mutacional mediante secuenciación directa de la región codificante completa, las uniones intrón-exón y las regiones intrónicas flanqueantes de los genes *EDN3* (NM\_000114.2), *EDNRB* (NM\_000115.1), *SOX10* (NM\_006941.3) y *RET* (NM\_020975.4). Adicionalmente, se analizó mediante sondas PCR-FRET, la presencia o ausencia de la variante localizada en el dominio *Enhancer* de *RET* (c.73+9277T>C, rs2435357), que está fuertemente asociada a HSCR.

##### **4.1.1. Historia clínica y eventos moleculares presentes en el Paciente 1.**

El paciente 1 es un varón de origen portugués, primer hijo de padres sanos, no consanguíneos, nacido a término con un peso de 3190 g. Durante el período neonatal acudió al hospital en dos ocasiones con episodios de distensión abdominal, vómitos y diarrea. A los 2 años de edad, fue ingresado presentando estreñimiento crónico severo. El examen físico mostró una notoria distensión abdominal con un fecaloma gigante en la fosa ilíaca izquierda. También presentaba heterocromía del iris, mechón blanco y una profunda pérdida de la audición neurosensorial bilateral. El enema de bario que se realizó mostró estenosis a nivel del recto, colon sigmoide y dilatación en el segmento proximal del colon. La manometría anorrectal reveló ausencia del reflejo inhibitor del esfínter rectal y finalmente la aganglioneosis fue confirmada mediante análisis anatomopatológico de la biopsia rectal.

En cuanto a la historia familiar, la madre presentaba pérdida auditiva unilateral moderada mientras que la abuela materna presentaba amplia hipopigmentación de la piel que afectaba a brazos, piernas y pared abdominal anterior, siendo el resultado de la prueba de respuesta auditiva del tronco cerebral fue normal.

El rastreo mutacional reveló la presencia de una mutación en heterocigosis, no descrita previamente, en el tercer exón codificante del gen *SOX10*. Se trataba de una inserción de 19 nucleótidos, c.1107ins GCTGGGGCCCCCAGACTAC (c.1107ins19, p.Thr370Serfs\*38), que generaba una alteración de la pauta de lectura a partir de la posición aminoacídica 370, y un codón de parada prematuro 38 residuos después. Dicha mutación estaba presente en el paciente así como en la madre y abuela del mismo (Figura 20).

El rastreo mutacional de los genes *RET*, *EDN3* y *EDNRB* no reveló la presencia de ninguna variante deletérea.

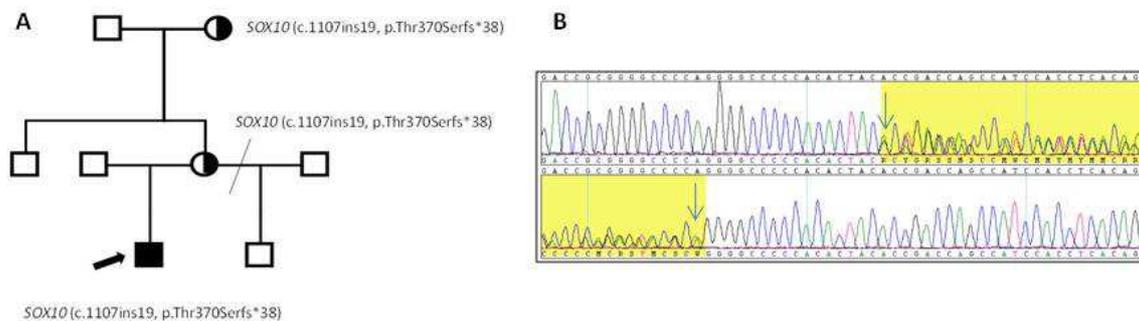


Figura 20: A) Segregación familiar del cambio c.1107ins19 hallado en *SOX10* en el primer caso de SW4. B) Cromatograma de la secuencia del exón 5 de *SOX10*; la flecha indica el inicio de la inserción.

#### 4.1.2. Historia clínica y eventos moleculares presentes en el Paciente 2.

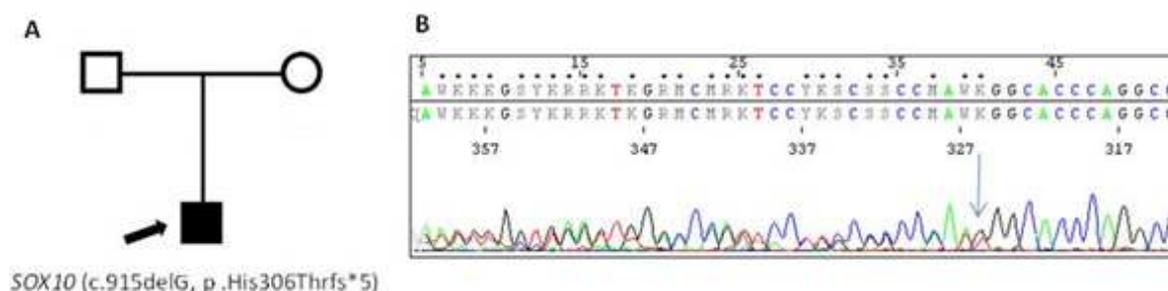
El paciente 2 es un varón de origen español, primer hijo de padres sanos, no consanguíneos, nacido a término con un peso de 2550 g. Tres días tras su nacimiento el paciente fue ingresado presentando pérdida de apetito y vómitos biliosos. El examen físico más detallado reveló signos de deshidratación e ictericia, así como una grave distensión abdominal. Tras la administración de enema de bario se encontró una

importante distensión intestinal que llevó a identificar la presencia de microcolon. Posteriormente la laparotomía confirmó tanto el microcolon como el microíleon (80 cm) con dilatación proximal, que llevó a proceder con la ileostomía. El examen anatomopatológico de varias biopsias intestinales recogidas durante la intervención confirmó la presencia de aganglionosis a lo largo del recto, sigma, colon descendente y microíleon. El paciente tuvo que permanecer ingresado en el hospital durante sus primeros meses de vida debido a episodios repetidos de enterocolitis y malabsorción intestinal. Finalmente, a los cuatro meses de edad fue sometido a una anastomosis primaria del colon. A raíz de las sucesivas revisiones médicas a las que fue sometido, se detectaron también hipoacusia bilateral y retraso psicomotor.

Por último, las imágenes de resonancia magnética que se le realizaron a los dos años de edad confirmaron la presencia de una alteración difusa de la mielinización. El paciente presentaba pelo rubio, iris azules brillantes y nistagmo horizontal rotatorio. No presentaba antecedentes familiares de HSCR, sordera o cualquiera de las características clínicas de SW4.

Tras el rastreo mutacionales identificó una mutación *de novo*, no presente en los padres, en heterocigosis en el tercer exón codificante del gen *SOX10*: c.915delG. Se trata de la delección de una guanina en la posición 915 que genera un desplazamiento en el marco de lectura, dando lugar a la aparición de un codón de parada prematuro 5 aminoácidos después (p .His306Thrfs\*5) (Figura 21). Esta mutación había sido previamente descrita por Viñuela et al. 2009.

Por otro lado, tanto el paciente como los padres portaban la variante localizada en el dominio *Enhancer* del intrón 1 de *RET* (c.73+9277T>C, rs2435357) en heterocigosis.



**Figura 21: A) Segregación familiar del cambio c.915delG, hallado en *SOX10* en el segundo caso de SW4. B) Cromatograma de la secuencia del exón 5 de *SOX10*; la flecha indica donde se produce la delección.**

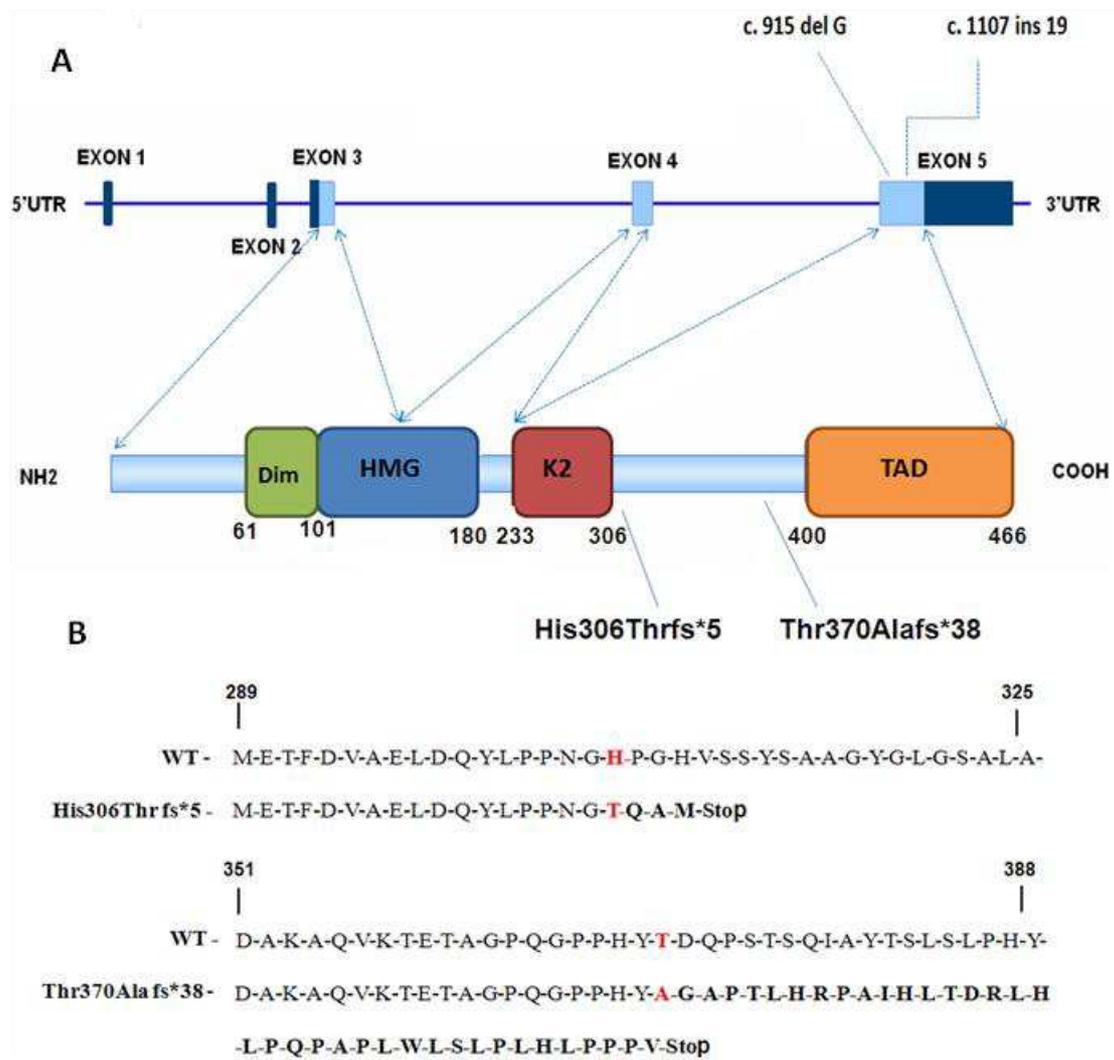


Figura 22: Mutaciones identificadas en *SOX10* en dos pacientes con sospecha de SW4. A: Representación esquemática del gen *SOX10* y la proteína, indicando las posiciones específicas afectadas por las mutaciones. B: Secuencia proteica normal (WT) y secuencia de ambas proteínas mutantes.

## 4.2 Implicación del gen *DNMT3B* en la patogénesis de la enfermedad de Hirschsprung

### 4.2.1 Análisis de la expresión diferencial de genes de pluripotencia en precursores neurales de SNE de pacientes HSCR *versus* controles

En este trabajo se realizó por primera vez un análisis global del perfil de expresión de genes de pluripotencia en precursores neurales del SNE procedentes de pacientes HSCR *versus* controles. Para dicho estudio se utilizaron arrays de baja densidad con sondas TaqMan (TLDA) que permiten analizar mediante PCR cuantitativa un gran número de genes de forma simultánea.

La PCR cuantitativa es una de las técnicas de cuantificación de expresión de genes más sensible y reproducible, si bien, para llevar a cabo la interpretación de los datos de una manera exacta y fiable, es necesario el uso de genes de referencia o controles endógenos para eliminar o minimizar la variación entre las muestras debido a la cantidad y calidad de ADNc inicial, y a la eficiencia enzimática.

Con el propósito de utilizar el mejor control endógeno que se ajustara a las condiciones de las muestras en estudio, se utilizó una placa TLDA que contenía 40 genes anotados como controles endógenos en diferentes tipos celulares y tejidos (Tabla 26).

Tabla 26: Genes contenidos en la placa TLDA TaqMan® *Endogenous Control Assays*

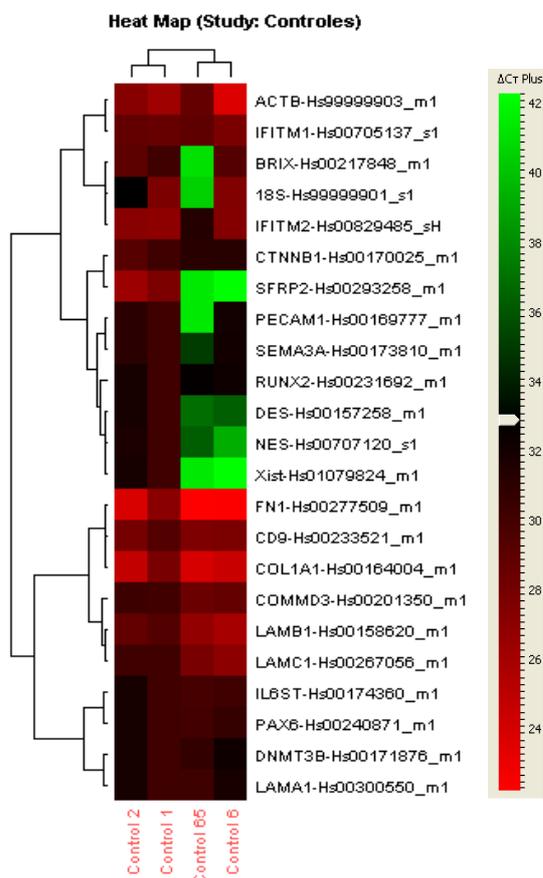
Gen	ID del ensayo	Gen	ID del ensayo
GAPDH	Hs99999905_m1	CDKN1A	Hs00355782_m1
HPRT1	Hs99999909_m1	CDKN1B	Hs00153277_m1
GUSB	Hs99999908_m1	GADD45A	Hs00169255_m1
ACTB	Hs99999903_m1	PUM1	Hs00206469_m1
B2M	Hs99999907_m1	PSMC4	Hs00197826_m1
HMBS	Hs00609297_m1	EIF2E1	Hs00426752_m1
IPO8	Hs00183533_m1	PES1	Hs00362795_g1
PGK1	Hs99999906_m1	ABL1	Hs00245445_m1
RPLP0	Hs99999902_m1	ELF1	Hs00152844_m1
TBP	Hs99999910_m1	MT-ATP6	Hs02596862_g1
TFRC	Hs99999911_m1	MRPL19	Hs00608519_m1
UBC	Hs00824723_m1	POP4	Hs00198357_m1
YWHAZ	Hs00237047_m1	RPL37A	Hs01102345_m1
PPIA	Hs99999904_m1	RPL30	Hs00265497_m1
POLR2A	Hs00172187_m1	RPS17	Hs00734303_g1
CASC3	Hs00201226_m1		

Se utilizó ADNc procedente de cultivos de precursores entéricos de seis pacientes HSCR y cuatro controles, realizando el análisis por triplicado. Con el programa *DataAssist* se obtuvieron las gráficas de dispersión para evaluar el grado de similitud de cada muestra mediante el coeficiente de correlación de Pearson(r). De ellos se seleccionó *GAPDH* como el gen cuyos niveles de expresión transcripcional eran más reproducibles a lo largo de las diferentes muestras de ADNc, tanto de pacientes como de controles. Para los pacientes se obtuvo una correlación positiva entre 0,9984 y 0,9962. Mientras que para los controles los valores se situaban entre 0,9983, 0,99851. Una vez seleccionado el control endógeno, se llevó a cabo el estudio de los niveles de expresión transcripcional de los 96 genes contenidos en la placa TLDA comercial; *TaqMan® Human Stem Cell Pluripotency Array* (Tabla 27).

**Tabla 27: Genes contenidos en la Placa TLDA: *TaqMan® Human Stem Cell Pluripotency Array***

ACTB	AFP	CD34	CDH5	CGB	18S
FN1	FOXD3	GAL	GATA4	GBX2	GCM1
ISL1	KRT1	LAMB1	LEFTB	LIN28	MYOD1
POU5F1	PTF1A	REST	SEMA3A	SFRP2	SOX2
ACTC	BRIX	CD9	CDX2	COL1A1	COL2A1
FOXA2	GABRB3	GAPD	GATA6	GCG	GDF3
KIT	LAMA1	LAMC1	LIFR	MYF5	Nanog
PTEN	RAF1	RUNX2	SERPINA1	SOX17	SST
COMMD3	CTNNB1	DES	EBAF	EOMES	FGF5
GFAP	HBB	HLXB9	IFITM1	IL6ST	INS
NES	NODAL	NPPA	NR6A1	PAX4	PECAM1
SYCP3	T	TDGF1	TFCP2L1	UTF1	Xist
CRABP2	DDX4	DNMT3B	EEF1A1	FGF4	FLT1
GRB7	HBZ	IAPP	IFITM2	IMP2	IPF1
NEUROD1	NOG	NR5A2	OLIG2	PAX6	PODXL
SYP	TAT	TERT	TH	WT1	ZFP42

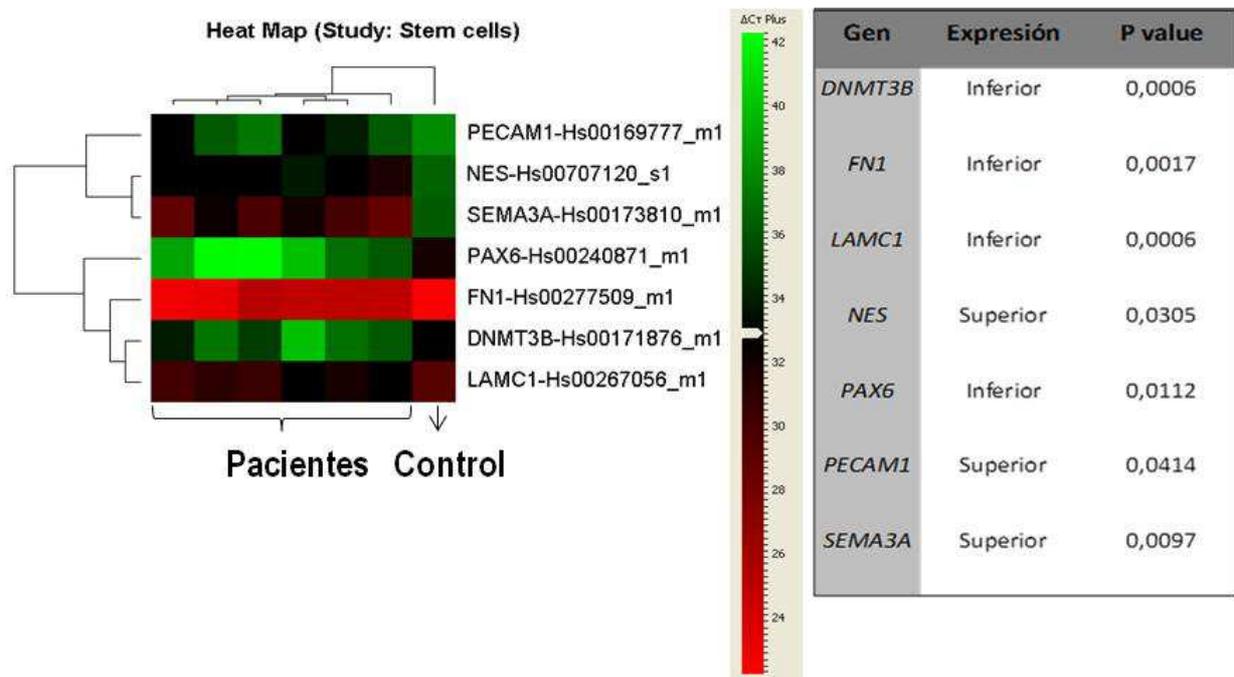
En cada placa de ocho puertos se añadieron una muestra de paciente y otra de control, cada una de ellas por duplicado. Se utilizó el programa *RQ Manager 1.2* para obtener los valores crudos de Ct, aplicando una línea base automática y el umbral definido como automático. Del análisis de expresión de los 96 genes incluidos en la placa se obtuvo expresión positiva (Ct≤32) de 24 genes identificados en células pluripotentes (Figura 23).



Genes	Ct	Función
ACTB	27	Implicado en varios tipos de movilidad celular.
BRIX	28	Necesario para la biogénesis de la subunidad 60S del ribosoma.
CD9	25	Participa en adhesión celular, movilidad y metástasis tumoral.
COL1A1	28	Colágeno tipo I perteneciente al grupo d el colágeno formador de fibras (grupo I).
COMMD3	27	Regulador de la activación de NF-kappa-B
CTNNB1	29	Implicado en la regulación de la adhesión celular.
GAPDH*	24	Control endógeno
DES	32	Desmina:filamentos intermedios de clase III de las células musculares.
DNMT3B	29	ADN metil -transferasa, esencial para el establecimiento de de los patrones de metilación durante el desarrollo.
FN1	19	Participa en adhesión celular, movilidad, opsonización cicatrización y mantenimiento de la forma celular.
IFITM1	25	Implicada en el control del crecimiento celular.
IFITM2	30	Inductor de la parada del ciclo celular y mediador de la apoptosis.
IL6ST	28	Molécula transductora en procesos de señalización.
LAMA1	30	Media en procesos de anclaje, migración y organización de las células en tejidos durante el desarrollo embrionario a través de la interacción con otros componentes de la matriz extracelular.
LAMB1	28	Participa en el anclaje, migración y organización de las células en tejidos durante el desarrollo embrionario.
LAMC1	25	Media en procesos de anclaje, migración y organización de las células en tejidos durante el desarrollo embrionario a través de la interacción con otros componentes de la matriz extracelular.
18S	26	ARN ribosómico 18S
NES	32	Implicado en el desarrollo del cerebro y del ojo.
PAX6	31	Factor de transcripción que desempeña un papel importante en el desarrollo del ojo, nariz, sistema nervioso central y páncreas.
PECAM1	32	Implicado en la migración celular (concretamente, en la migración transendotelial de los leucocitos).
RUNX2	31	Factor de transcripción implicado en la diferenciación de los osteoblastos y morfogénesis esquelética.
SEMA3A	31	Ligando que guía a los conos de crecimiento a través de un mecanismo de inhibición de la motilidad.
SFRP2	32	Regulador del crecimiento celular y de la diferenciación en tipos celulares específicos.
XIST	32	Participa en el silenciamiento transcripcional de uno de los cromosomas X.

**Figura 23: Genes identificados en células pluripotentes que presentaban expresión positiva ( $\Delta Ct < 32$ ) en los precursores del SNE.** El HeatMap se generó utilizando el software DataAssist™ (Life Technologies) y representa los niveles de expresión de ADnc de 24 genes que se expresaban en cultivos de NLBs en controles. Los genes fueron agrupados jerárquicamente usando promedio de vinculación con coeficiente de correlación de Pearson. La escala de colores a la derecha representa el  $\Delta Ct$ . El color verde indica genes con relativa disminución de la expresión, mientras que el rojo indica los genes con una mayor expresión relativa.

De ellos, se obtuvieron diferencias de expresión estadísticamente significativas, con el 95% de confianza y variación en la expresión de las muestras con respecto a los controles de 2 veces o superior (tasa de cambio=2), en siete genes (valor de  $p \leq 0,05$ ) (Figura 24).



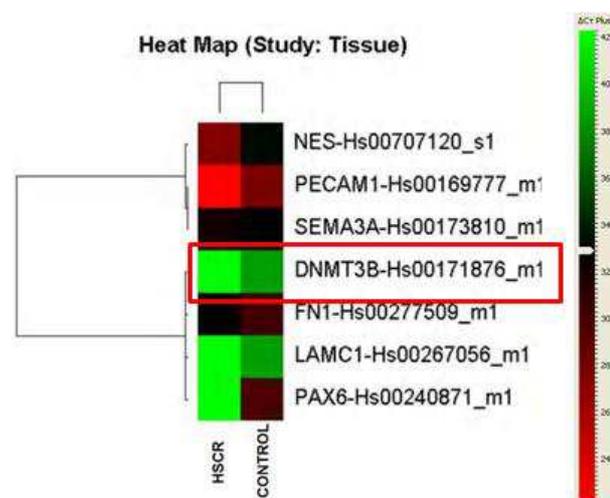
**Figura 24: Genes que presentaron niveles de expresión diferencial entre NLBs de pacientes frente a NLBs de controles.** El *HeatMap* se generó utilizando el software *DataAssist™* (Life Technologies) y representa los niveles de expresión de ADNC de 7 genes con un perfil de expresión diferencial ( $p$  value < 0,05). Los genes fueron agrupados jerárquicamente usando promedio de vinculación con coeficiente de correlación de Pearson. La escala de colores representa el  $\Delta C_t$ . El color verde indica genes con relativa disminución de la expresión, mientras que el rojo indica los genes con una mayor expresión relativa.

Se obtuvieron niveles de expresión anormalmente reducidos en pacientes con respecto a controles para cuatro genes presentes en células pluripotentes (*DNMT3B*, *FN1*, *LAMC1*, *PAX6*) y niveles de expresión anormalmente elevados en otros tres genes (*NESTINA*, *PECAM*, *SEMA3A*).

Dado los resultados anteriormente mencionados, se decidió centrar el estudio en el gen *DNMT3B*, atendiendo a las diferencias de expresión entre pacientes y controles y a la importante función que desarrolla dicho gen durante el desarrollo.

*DNMT3B* presentó un  $\Delta Ct$  de 36.8 en pacientes y 29 en controles, lo que se traduce en una reducción de 3.6 veces en los niveles de expresión transcripcional de los precursores entéricos de pacientes *versus* controles (valor de  $p = 0.0006$ ).

Se ha descrito que la expresión de *DNMT3B* tiene lugar en el desarrollo durante una estrecha ventana de tiempo. Con el fin de comprobar este hecho, se repitió el mismo estudio de expresión utilizando muestras de ADNc obtenidas de tejido intestinal de los mismos pacientes y controles en los cuales se había realizado el estudio de expresión previo. Como resultado se encontró que efectivamente los patrones de expresión de *DNMT3B* se perdían, con unos  $\Delta Ct$  de 38,5 y 40 para controles y pacientes respectivamente, lo que refleja que no existía expresión positiva de este gen en tejido (Figura 25).

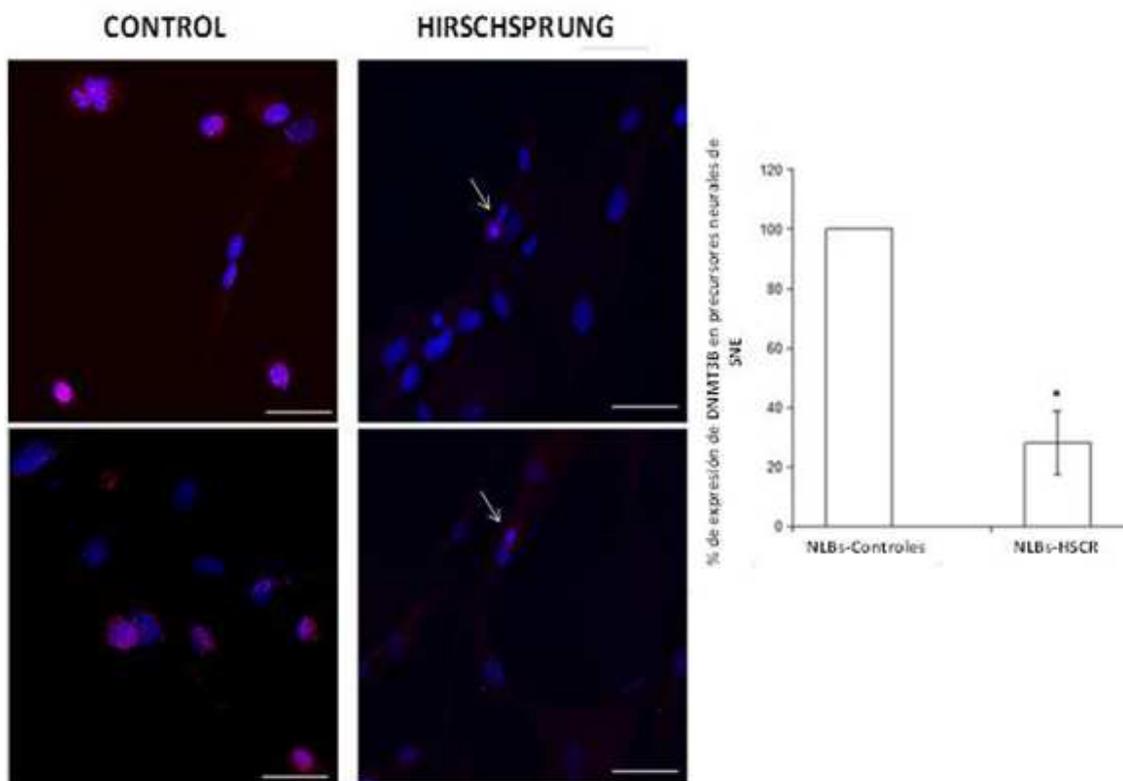


**Figura 25: Estudio de expresión en tejido de los genes que presentaron niveles de expresión diferencial entre NLBs de pacientes frente a NLBs de controles.** El *HeatMap* se generó utilizando el software *DataAssist*™ (Life Technologies) y representa los niveles de expresión de ADNc de 7 genes con especial atención a los niveles de expresión de *DNMT3B* en muestras de tejido. Los genes fueron agrupados jerárquicamente usando promedio de vinculación con coeficiente de correlación de Pearson. La escala de colores representa el  $\Delta Ct$ . El color verde indica genes con relativa disminución de la expresión, mientras que el rojo indica los genes con una mayor expresión relativa.

#### 4.2.2 Expresión de la proteína DNMT3B en muestras de precursores neurales de SNE de pacientes HSCR *versus* controles.

Con el objetivo de caracterizar mejor la bajada de expresión observada en los cultivos de precursores entéricos procedentes de pacientes HSCR, se decidió estudiar la expresión y distribución de DNMT3B a nivel celular mediante inmunocitoquímica.

DNMT3B se localizaba principalmente en el núcleo celular como se observa en la imagen (Figura 26), y en particular, el número de células DNMT3B positivas en los cultivos de precursores entéricos de pacientes HSCR fue significativamente menor que en controles, representando una bajada del 72%, hallazgo que corrobora el descenso en los niveles de expresión obtenidos previamente en el estudio de expresión.



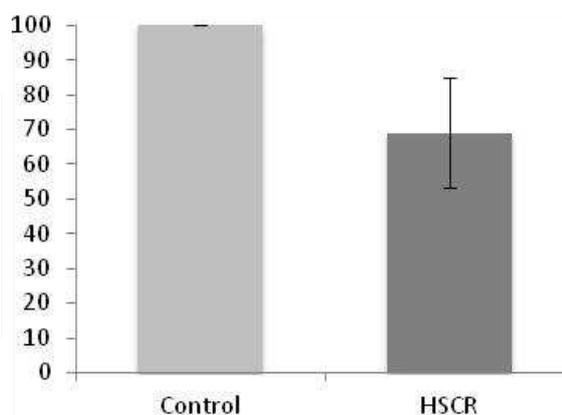
**Figura 26:** Imágenes de microscopio confocal de inmunocitoquímica sobre NLBs flotantes de paciente HSCR y control. Se analizó mediante inmunocitoquímica el número de células positivas para la expresión de DNMT3B (en rojo), co-tinción del núcleo con DAPI (azul). Barra de calibración 25µm

#### 4.2.3 Análisis de los niveles de metilación en precursores entéricos de pacientes HSCR versus controles.

En relación con los resultados obtenidos tanto en el estudio de expresión como en la inmunocitoquímica sobre los niveles disminuidos de DNMT3B en pacientes, se podría esperar que dicha disminución se correlacionara con una disminución en los niveles de metilación. Con el objetivo de comprobar posibles cambios en los niveles de metilación en genoma completo, se extrajo ADN de los cultivos de precursores entéricos de pacientes y controles utilizados en el estudio de expresión descrito anteriormente, añadiendo dos muestras más de controles, y haciendo un total de seis pacientes y seis controles. El estudio de metilación global se basa en un test de ELISA como se detalla en el apartado de *Metodología* 3.3.2.b.1. La tabla 28 contiene la media de las medidas de absorbancia a 450nm obtenidas para pacientes y controles tras realizar el ensayo por triplicado. El control positivo utilizado formaba parte del Kit y servía como referencia de genoma metilado.

Una vez normalizados los valores, se obtuvo una hipometilación global en precursores entéricos de pacientes HSCR, presentando unos niveles de metilación de aproximadamente el 69% +/- 15 con respecto a los niveles de metilación de los precursores entéricos procedentes de controles (100%), con un p value= 0,04358865.

Control positivo	Controles sanos	Pacientes HSCR
0,746	0,2735	0,1528
0,742	0,26	0,215
0,871	0,44665	0,11765
0,841	0,32165	0,11765
0,797	0,36515	0,25025
0,841	0,34035	0,21263



**Tabla 28:** Cantidad de citocinas metiladas en las muestra de pacientes y controles; **Figura 27:** Representación de los niveles de metilación global en precursores entéricos de pacientes y controles, considerando 100% para controles

#### 4.2.4 Rastreo mutacional de la secuencia codificante de *DNMT3B* en la cohorte HSCR

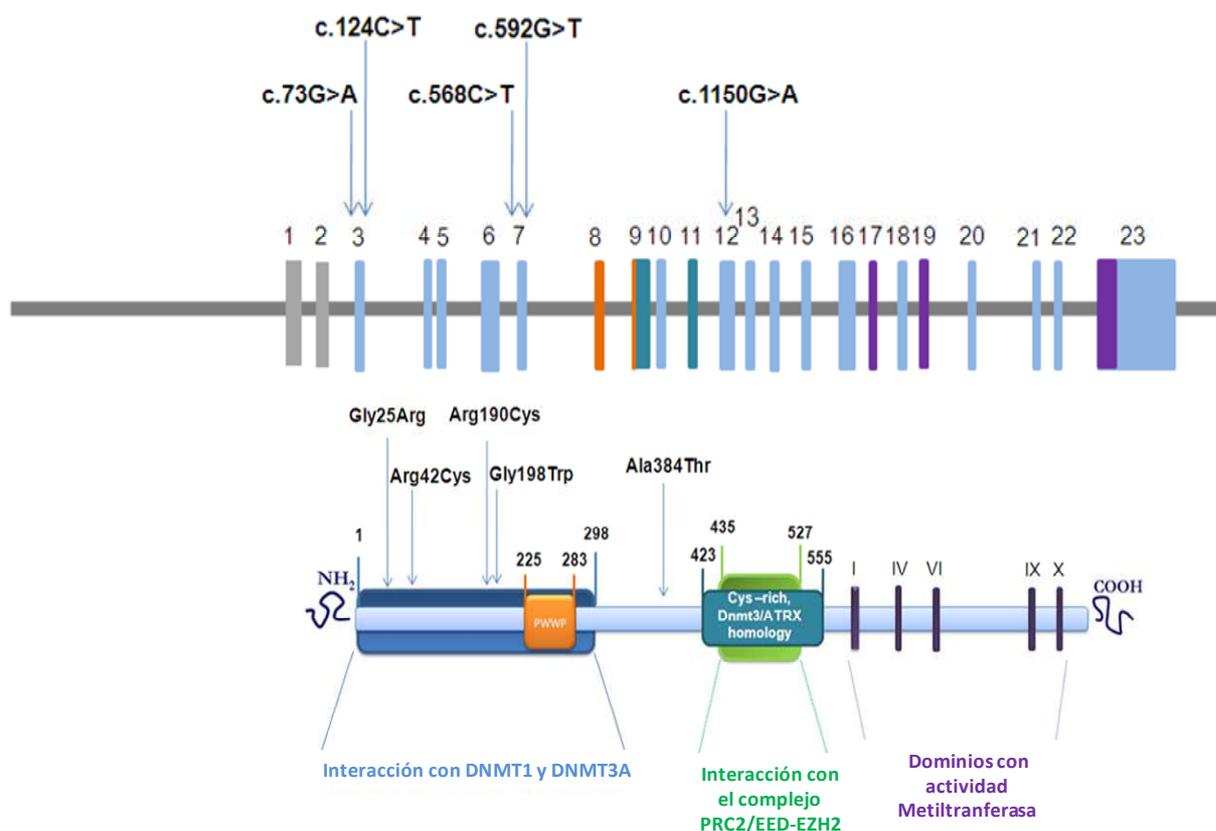
Con el fin de evaluar la implicación de *DNMT3B* en la aparición de la enfermedad de HSCR mediante otros posibles mecanismos, se realizó el rastreo mutacional en 168 pacientes HSCR esporádicos (106 hombres/62 mujeres) y 2 pacientes HSCR familiares (hombres), pertenecientes a la misma familia. De ellos, 134 presentaban fenotipo de segmento corto (S-HSCR), 29 pacientes presentaban fenotipo de segmento largo (L-HSCR) y 7 de ellos la forma más severa, aganglionosis total colónica.

Mediante secuenciación directa se analizó la región codificante completa, las uniones intrón-exón y las regiones intrónicas flanqueantes de dicho gen. El rastreo reveló la presencia de diversas variantes de secuencia que habían sido previamente descritas y que incluían sustituciones sinónimas o bien se localizaban en regiones no codificantes del gen. No se encontraron evidencias de que ninguna de las variantes sinónimas o localizadas en la región no codificante produjeran alteraciones en los procesos de transcripción, maduración o traducción, al someterlas a distintas herramientas bioinformáticas (Tabla 1, Anexo). Además, también se identificaron 5 variantes de secuencia en heterocigosis presumiblemente patogénicas (Tabla 29). Aunque se trataba de variantes previamente descritas en las bases de datos, no estaban asociadas a ninguna patología y debido a su bajo MAF (*minor allele frequency*), se decidió analizar la presencia de las mismas en un grupo de 150 controles sanos y proceder al estudio de la patogenicidad potencial de las mismas realizando estudios *in silico* con las herramientas bioinformáticas Polyphen y SIFT.

**Tabla 29: Variantes de secuencia detectadas en el rastreo mutacional del gen *DNMT3B* con un posible papel en la aparición del fenotipo HSCR.**

Exón	Sustitución Nucleotídica	Sustitución Aminoacídica	Herencia	Referencia	MAF
3	c.73 G>A	<b>Gly25Arg</b>	<i>De novo</i>	rs151128145	A=0.001/1
3	c.124C>T	<b>Arg42Cys</b>	<i>De novo</i>	rs150200553	T=0.001/3
7	c.568C>T	<b>Arg190Cys</b>	Materna	rs140395707	NA
7	c.592G>T	<b>Gly198Trp</b>	<i>De novo</i>	rs61758433	T=0.001/2
12	c.1150G>A	<b>Ala384Thr</b>	Paterna	rs150682895	A=0.006/14

La ubicación de las variantes en los dominios funcionales de la proteína se puede observar en la Figura 28.



**Figura 28: Representación esquemática del gen y la proteína DNMT3B.** Se detalla tanto la posición a nivel genómico como la ubicación dentro del dominio proteico funcional correspondiente, de las variantes encontradas en el estudio

Las variantes p.Gly25Arg (c.73G>A), p.Arg190Cys (c.568C>T) y p.Gly198Trp (c.592G>T) fueron catalogadas como probablemente dañinas para la proteína, según consideraciones físicas y comparativas. Además, ninguna de estas variantes fue detectada en los 150 controles analizados, lo que permite descartarlas como posibles polimorfismos. Sin embargo, las variantes p.Arg42Cys y p.Ala384Thr fueron catalogadas como posiblemente benignas y p.Ala384Thr se encontró con una frecuencia del 2% en controles.

Las tres mutaciones posiblemente patogénicas se encontraban dentro del dominio de interacción con DNMT1 y DNMT3A, necesario para el establecimiento de los correctos patrones de metilación durante el desarrollo embrionario.

La mutación p.Gly25Arg se encontró en dos pacientes diferentes no relacionados entre sí, presentando ambos fenotipo de segmento largo (HSCR1 y HSCR2). Cabe destacar que ambos pacientes portaban mutaciones en otros genes relacionados con HSCR.

Específicamente, el primer caso, es un caso familiar en el que el paciente HSCR-1 portaba además una mutación en *RET* (p. Ser148del) heredada del padre sano. Mientras que un familiar también afecto con fenotipo de segmento corto, portaba la misma mutación en *RET* heredada de su madre no afecta, y no portaba ninguna mutación en *DNMT3B* (Figura 29).

El segundo caso, HSCR-2, presentaba dos mutaciones en *DNMT3B* (p.Gly25Arg y p.Gly198Trp). Se trata de una paciente con fenotipo de segmento largo que además de las mutaciones en *DNMT3B* presentaba una mutación en *NTF3*, heredada de la madre no afecta. Al no disponer del ADN paterno, no se pudo comprobar si las mutaciones en *DNMT3B* eran heredadas por vía paterna.

Por último, el tercer caso HSCR-3, se trata de un paciente también con fenotipo de segmento largo que portaba la mutación p.Arg190Cys, heredada de la madre no afecta (Figura 30).

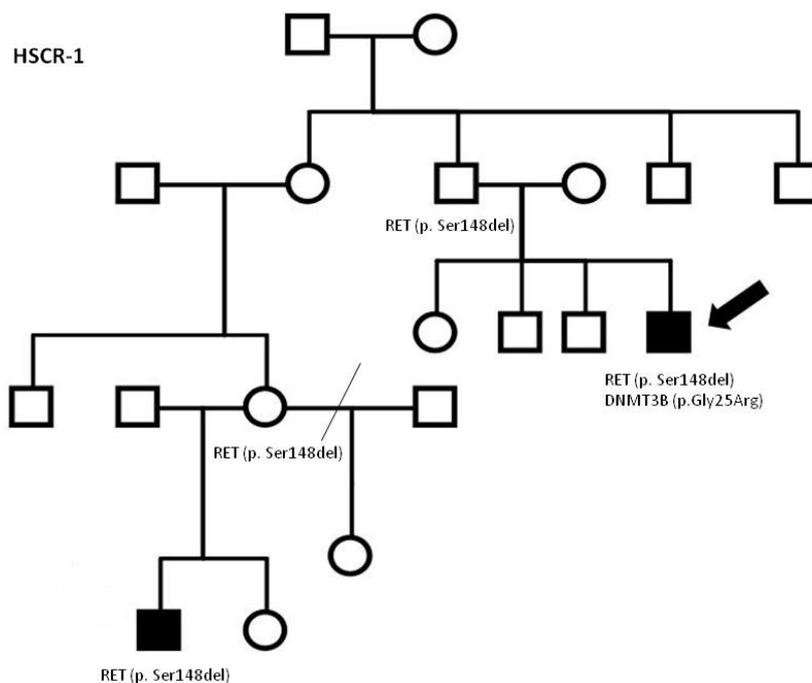


Figura 29: Segregación familiar de las variantes en heterocigosis halladas en el caso HSCR-1.

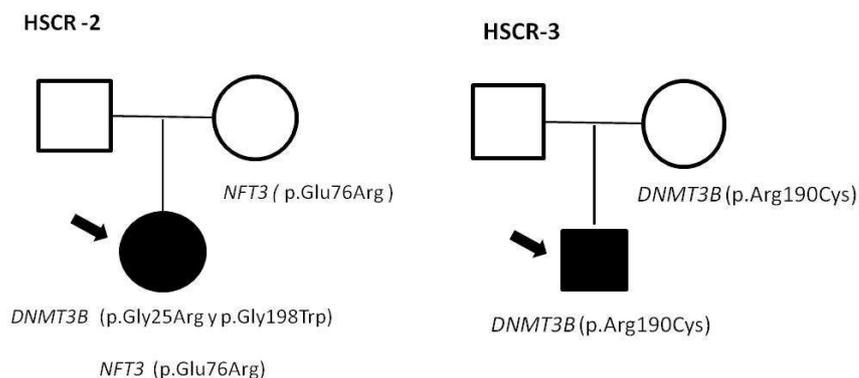
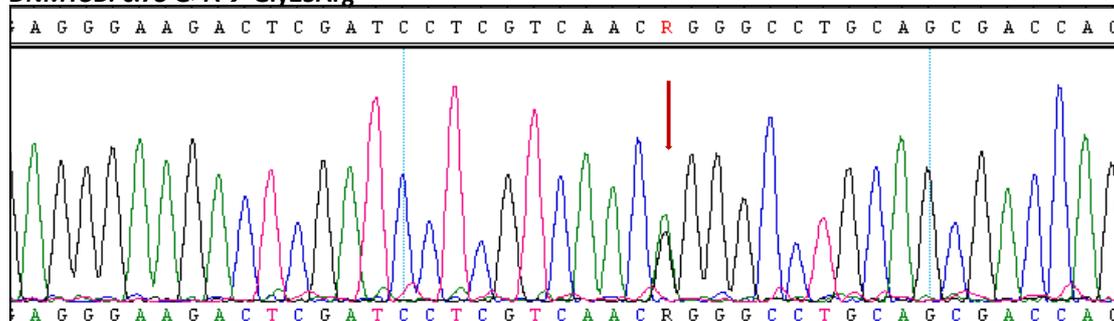
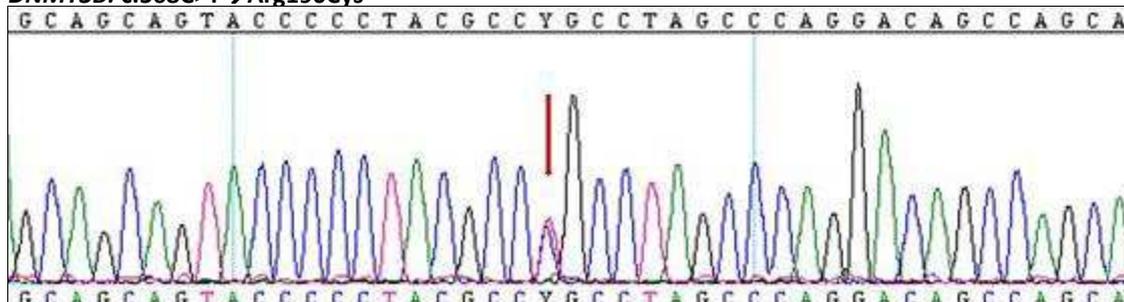


Figura 30: Segregación familiar de las variantes en heterocigosis halladas en los casos HSCR-2 y HSCR-3.

**DNMT3B: c.73 G>A → Gly25Arg**



**DNMT3B: c.568C>T → Arg190Cys**



**DNMT3B: c.592G>T → Gly198Trp**

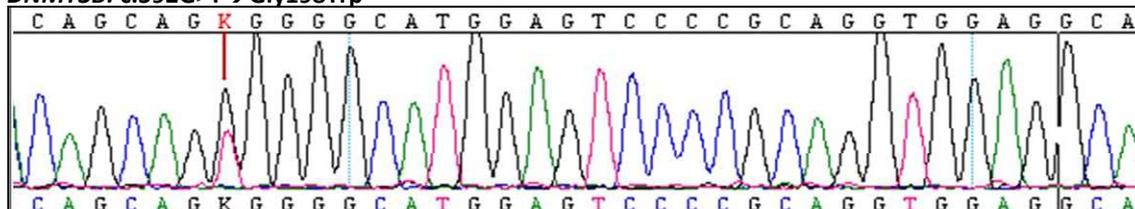


Figura 31: Electroferogramas de los pacientes que portaban variaciones potencialmente patogénicas en la secuencia codificante de *DNMT3B*

#### **4.2.5 Estudio de DNMT3B en Pez-cebra**

Dado los hallazgos encontrados en humanos, se quiso estudiar si una bajada de expresión de DNMT3B daba como consecuencia una pérdida o reducción del número de neuronas entéricas, generando el Knockdown de dicho gen en pez cebra. El interés en este modelo animal reside en que el pez cebra representa un modelo de vertebrado ideal para el estudio del desarrollo embrionario ya que se desarrolla fuera del cuerpo de la madre y además es transparente. Todas las etapas del desarrollo, incluida la organogénesis, son claramente visibles en el embrión y al ser su desarrollo ex útero los embriones pueden cultivarse en una placa de cultivo, teniendo una elevada tasa de fecundidad y obteniéndose alrededor de 100-150 huevos de cada pareja.

Gracias a la presencia de cresta neural, el intestino del pez cebra, aún siendo más simple, se asemeja estrechamente al de los mamíferos lo que hace que sea un modelo comparativo adecuado para trastornos relacionados con el desarrollo del SNE y por tanto para la enfermedad de HSCR.

Para realizar el knockdown de DNMT3B en pez cebra, se seleccionó *Dnmt4* como gen dentro del genoma de estos animales que presenta un mayor porcentaje de homología con el gen de interés en humano, según las bases de datos *HomoloGene* ([www.ncbi.nlm.nih.gov/homologene](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/homologene)) y *Ensembl* ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)).

##### **4.2.5.a Microinyección de morfolino frente a *Dnmt4* en la línea transgénica de pez cebra *Tg(-8.3**b**phox2b:Kaede)*.**

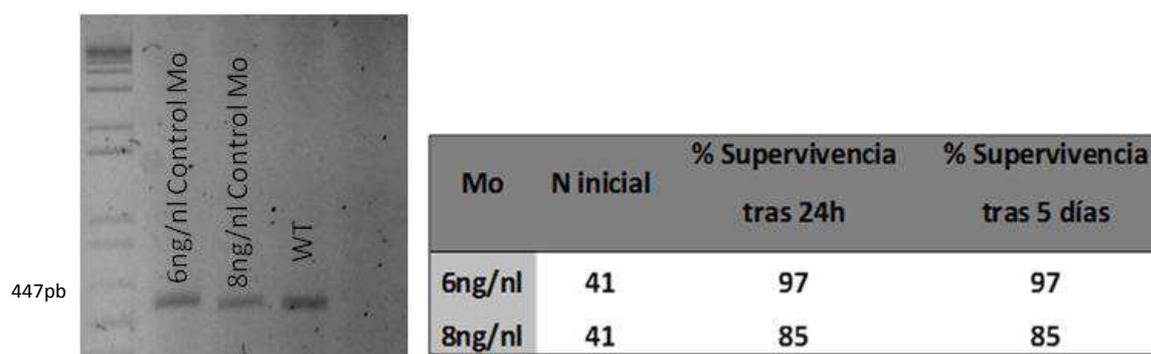
Se llevaron a cabo microinyecciones del morfolino diseñado frente a *Dnmt4* utilizando concentraciones de 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8ng/nl, directamente en el saco embrionario de huevos en estadio de entre 1-4 células procedentes de la línea transgénica *Tg(-8.3**b**phox2b:Kaede)*. A partir de 4ng/nl la cantidad de morfolino inyectado resultó ser letal, presentando un porcentaje de supervivencia menor al 10%.

Se microinyectó además un control específico de Mo diseñado frente a *Dnmt4* que presentaba un desapareamiento de cinco bases. Este tipo de Mo se utiliza con el fin de comprobar la especificidad del Mo diseñado frente a la secuencia diana dentro del gen en estudio, y que el Mo como tal no es el causante del fenotipo.

Se microinyectaron dosis elevadas del control Mo (6 y 8ng/nl), y en ninguno de los casos se encontró fenotipo (Figura 33). A partir de ARNm obtenido de estos peces se amplificó mediante RT-PCR la zona que englobaba exones 2, 3 y 4 de *Dnmt4* (fragmento de 447 pb) para comprobar que no se había producido la delección del exón 3 tras la inyección del Control-Mo frente a la zona de splicing entre el intrón y el exón 3 de la secuencia del gen. Tras la amplificación se realizó la electroforesis en gel de agarosa al 2% con el objetivo de comprobar si se producía el bloqueo en la zona de splicing y por tanto la pérdida del exón 3 (Figura 32, Tabla 30).

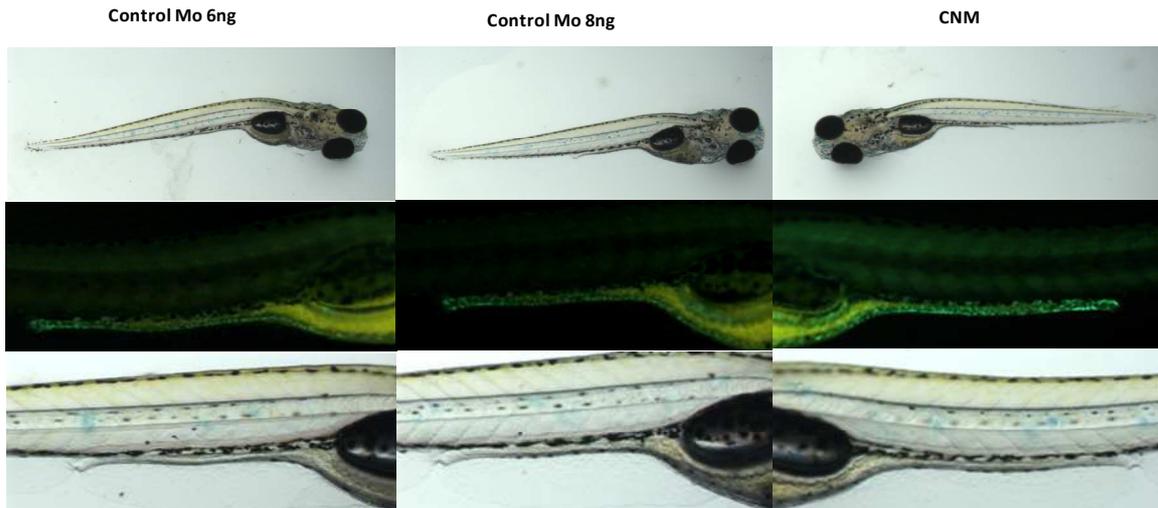
Del mismo modo se realizó la RT-PCR en ADNc de aquellos peces microinyectados con diferentes concentraciones de Mo frente a *Dnmt4* tras 48h postfertilización. En este caso, se observó que existían problemas en el proceso de splicing a partir de la inyección de 1ng/nl de Mo, apareciendo una banda adicional que correspondía al producto en caso de proceso de splicing aberrante debido a la acción de Mo en la región donde se produce la pérdida del exón 3 de *Dnmt4* (Figura 34).

Se cuantificó el porcentaje de supervivencia de las larvas tras 24h y 5 días postfertilización. En el estadio larvario de 5 días el intestino se encuentra totalmente colonizado por los precursores entéricos, y es en este momento cuando se realiza la observación y conteo del número de células presente a lo largo del intestino mediante microscopio de fluorescencia (Figura 35).



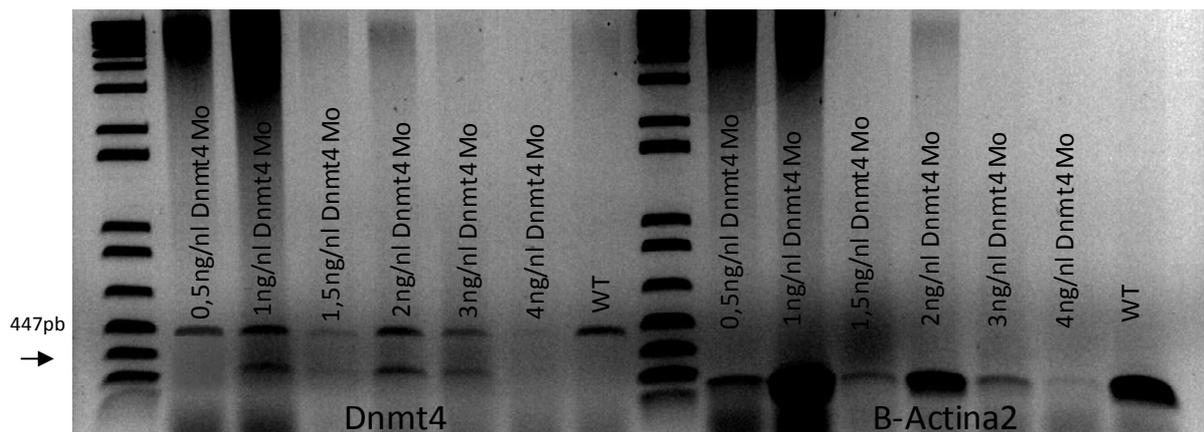
**Figura 32: Amplificación mediante RT-PCR del fragmento que comprende los exones 2, 3 y 4 de *Dnmt4*.** La electroforesis en gel indica que el tamaño de la banda observada corresponde al tamaño del fragmento esperado tras inyectar los controles Mo a concentraciones de 6 y 8 ng/nl

**Tabla 30: Porcentaje supervivencia tras la microinyección.** La supervivencia de estos embriones estaba por encima del 50% después de 24h y 5 días postfertilización.

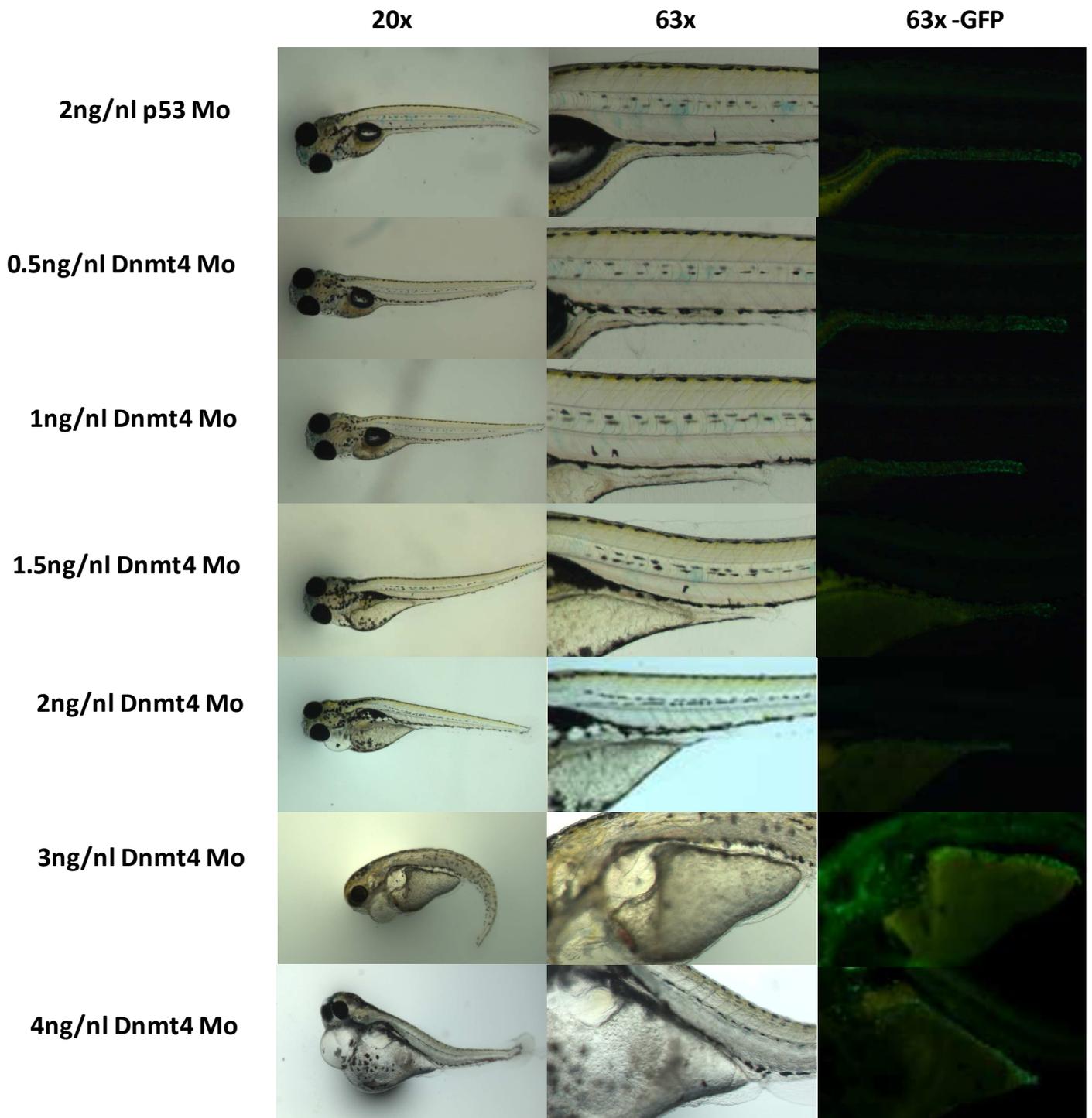


**Figura 33:** Imagen de microscopía de fluorescencia de las larvas inyectadas con concentraciones de Mo control de 6 y 8ng/nl y control no microinyectado (CNM) tras 5 días postfertilización. Primera fila de imágenes (20x) en la cual se puede comprobar que las larvas presentaban un fenotipo normal tras la microinyección. En la segunda fila (63x) con filtro de fluorescencia GFP para visualizar las neuronas Phox2b marcadas. Tercera fila de imágenes (63x) en la que se puede comprobar que la formación del intestino es normal, así como la apertura anal.

El número de células Phox2b positivas presentes en el intestino tras 5 días postfertilización, resultó ser normal en aquellos casos en que se inyectó el Control-Mo, en comparación con aquellos embriones que no habían sido microinyectados.



**Figura 34:** Amplificación mediante RT-PCR del fragmento que comprende los exones 2, 3 y 4 de **Dnmt4**. La electroforesis en gel indica que existe splicing aberrante a partir de la inyección de 1ng/nl de Mo frente a **Dnmt4**.



**Figura 35: Imágenes de microscopía de fluorescencia de los fenotipos encontrados a diferentes concentraciones de Mo frente a Dnmt4.** Como control se utilizaron aquellos embriones que habían sido únicamente microinyectados con 2ng/nl de Mo frente a p53. Columna de la izquierda imagen sin filtro aumento 20x, columna central imagen sin filtro aumento 63x, columna de la derecha imagen con filtro GFP (verde) aumento 63x.

Tras la co-inyección del Mo frente a p53 junto con el Mo frente a *Dnmt4* se obtuvo un porcentaje de supervivencia por encima del 50% (Tabla 31) con las concentraciones de *Dnmt4* Mo: 0.5; 1; 1.5; 2; 3 y 4 ng/nl. Concentraciones superiores se consideraron letales al obtener porcentajes de supervivencia menores y por tanto no se contemplaron en el estudio fenotípico (Tabla 32).

**Tabla 31: Porcentaje de supervivencia de los embriones microinyectados con las distintas concentraciones de Mo frente a *Dnmt4***

[Dnmt4 Mo]ng/nl	N inicial	% Supervivencia tras 24h	% Supervivencia tras 5 días
0,5	40	87,5	87,5
1	40	87,5	87,5
1,5	41	78,05	78,05
2	40	75	75
3	40	57,5	57,5
4	40	52,5	52,5

**Tabla 32: Fenotipo resultante tras la microinyección de las diferentes concentraciones de Mo frente a *Dnmt4*.**

[Dnmt4 Mo]ng/nl	Ausencia de vejiga natatoria	Edema pericárdico	Edema en el saco vitelino	Intestino corto	Edema intestinal	Retraso en el desarrollo ocular	Exceso de curvatura
0,5	-	-	-	-	-	-	-
1	-	-	-	-	-	-	-
1,5	100%	35,29%	-	50%	-	-	-
2	100%	100%	80%	50%	68.65%	68.75%	43.75%
3	100%	100%	100%	72%	66.6%	62.5%	50%
4	100%	100%	100%	100%	70.2%	75.7%	70%

#### 4.2.5.b Estudio de la bajada de expresión mediante PCR cuantitativa tras la microinyección con Mo frente a Dnmt4.

Para la cuantificación relativa de los cambios en los niveles de expresión a las distintas concentraciones que se inyectaron de Mo frente a *Dnmt4* y comprobar su efectividad, se realizó PCR cuantitativa a tiempo real.

Para la extracción de ARNm se utilizó un número de aproximadamente 30 larvas que habían sido previamente inyectadas con las diferentes concentraciones del Mo y que fueron congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  para detener su crecimiento a las 48h post-fertilización. Para la normalización de la expresión de *Dnmt4* se eligió como control endógeno  $\beta$ -Actina2 y se utilizó como método de cuantificación el  $\Delta\text{Ct}$ .

Asimismo, se testaron también los niveles de expresión de otros genes *Dnmts* (*Dnmt3*, *Dnmt5* y *Dnmt7*) presentes en el genoma del pez-cebra, que presentan unos patrones de expresión y función similares a DNMT3B en mamífero. El objetivo era discernir si el fenotipo observado se debía únicamente a la bajada de expresión de *Dnmt4* o a un efecto cruzado sobre el resto de *Dnmts* posiblemente debido a la no especificidad del Mo.

Como resultado se obtuvo bajada de la expresión de *Dnmt4* a partir de una concentración de Mo de 1ng/nl (Figura 36). Con una concentración de 4ng/nl se obtuvo la mayor bajada de expresión de *Dnmt4* siendo ésta de un 78%.

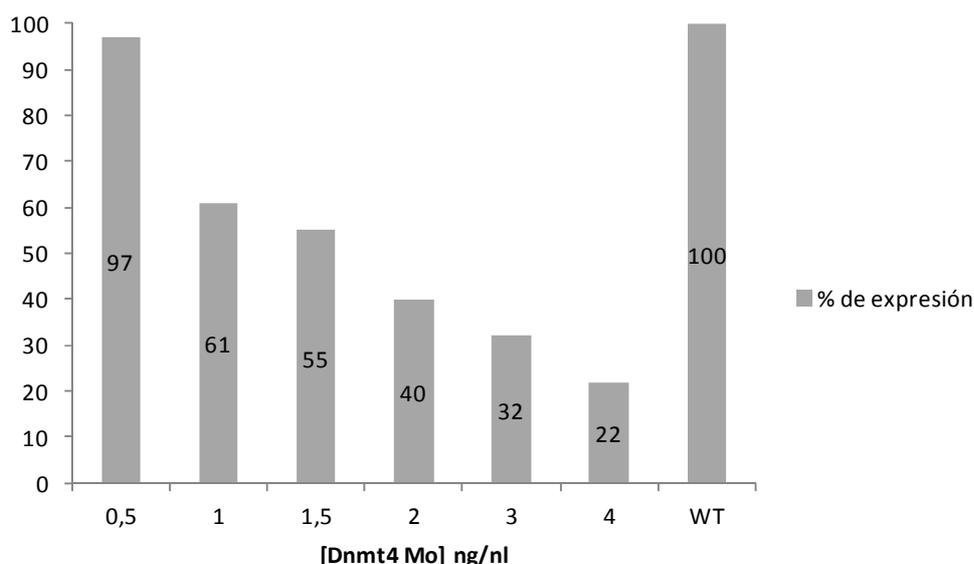
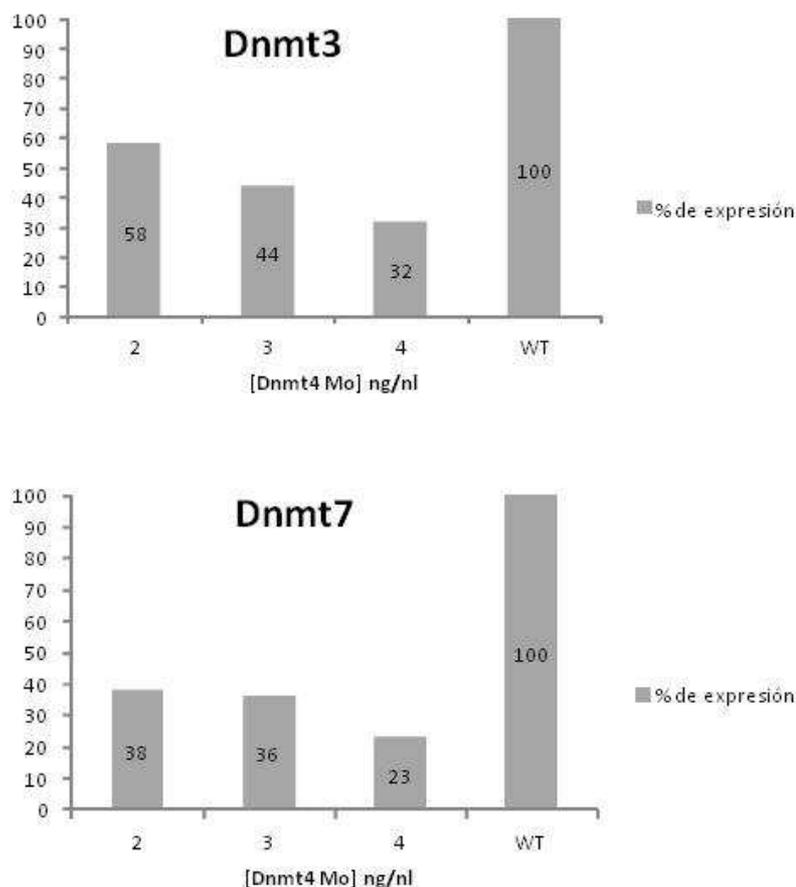


Figura 36: Porcentaje de expresión de *Dnmt4* tras la microinyección de las diferentes concentraciones de Mo

En cuanto a los niveles de expresión del resto de Dnmts utilizando el Mo frente a Dnmt4, se obtuvieron niveles alterados en la expresión de Dnmt3 y Dnmt7 a partir de 2ng/nl de Mo, mientras que Dnmt5 no presentó ningún tipo de alteración en sus niveles de expresión (Figura 37).

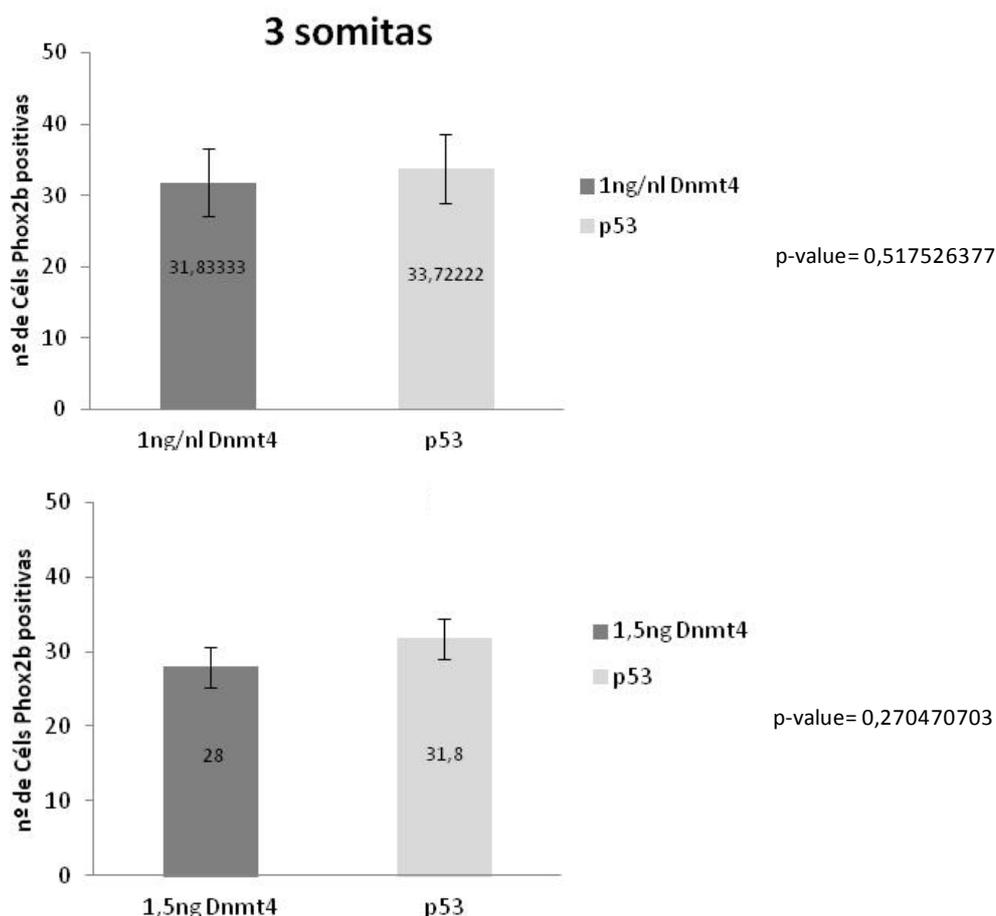


**Figura 37: Porcentaje de expresión de Dnmt3 y Dnmt7 tras la microinyección a diferentes concentraciones de Mo frente a Dnmt4**

Tras este hallazgo no se podría concluir que el fenotipo observado a concentraciones mayores de 1,5 ng/nl sea debido únicamente a la bajada de expresión de Dnmt4. No existe una secuencia homóloga al Mo diseñado en ninguna de las secuencias nucleotídicas de ambos genes, sin embargo su expresión se ve afectada, lo cual hace sospechar que sea debido a un efecto inespecífico del Mo. Es por ello que a partir de aquí sólo se considerarán las concentraciones 1 y 1,5 ng/nl para posteriores experimentos.

#### 4.2.5.c Cuantificación del número de neuronas Phox2b positivas presentes en el intestino.

La línea transgénica *Tg(-8.3bp $hox2b$ :Kaede)* es una poderosa herramienta para el estudio del desarrollo del SNE, permitiendo observar *in vivo* el desarrollo del mismo, así como contabilizar directamente el número de células Phox2b que han sido etiquetadas de forma selectiva. Tras la microinyección, a simple vista, parecía observarse una disminución en el número de células en la porción final del intestino de las larvas microinyectadas con 1 y 1.5 ng/nl del Mo frente a Dnmt4, en comparación con los controles que habían sido microinyectados únicamente con el Mo frente a p53. Sin embargo, esta disminución no resultó ser estadísticamente significativa cuando se realizó el conteo de células mediante el software FIJI (Figura 38).



**Figura 38: Número de células Phox2b positivas.** Número de células Phox2b positivas en la porción comprendida entre el ano y el tercer somita en aquellos peces microinyectados con 1 y 1,5 ng/nl de Mo frente a Dnmt4.

#### 4.2.5.d Inmunohistoquímica en intestino de Pez-Cebra.

En la línea transgénica de pez-cebra utilizada en este trabajo, se encuentran marcadas todas aquellas células que expresen Phox2b, factor de transcripción que se expresa tanto en precursores de neuronas entéricas como en neuronas en estadios de diferenciación tempranos.

Debido al papel que juega DNMT3B durante la neurogénesis, se decidió estudiar mediante inmunohistoquímica en peces no transgénicos, el número de neuronas presentes en el intestino durante la colonización (3 días postfertilización) y posteriormente a la colonización total del intestino (6 días postfertilización) por parte de los precursores entéricos. Para ello se utilizó un anticuerpo específico frente a proteínas neuronales, que reconocía los miembros de la familia ELAV: HuC, 2 HuD 1 y HEL- N1,3.

La inmunohistoquímica se realizó en 6 larvas que habían sido microinyectadas con 1,5ng del Mo frente a Dnmt4 (Figura 39). Tras analizar el número de células marcadas con el programa de análisis FIJI, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el número de neuronas marcadas en ninguno de los estadios del desarrollo.

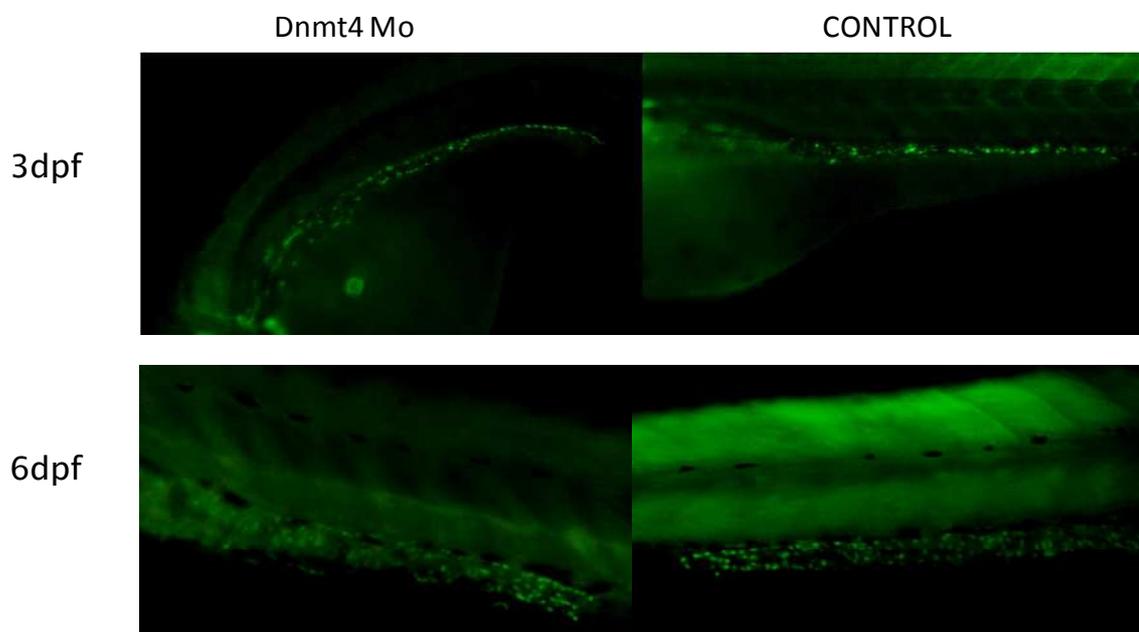


Figura 39: Imágenes de microscopía de fluorescencia de la inmunohistoquímica realizada en larvas de pez-cebra tras 3 y 6 días postfertilización frente a anticuerpo específico HuC/HuD.

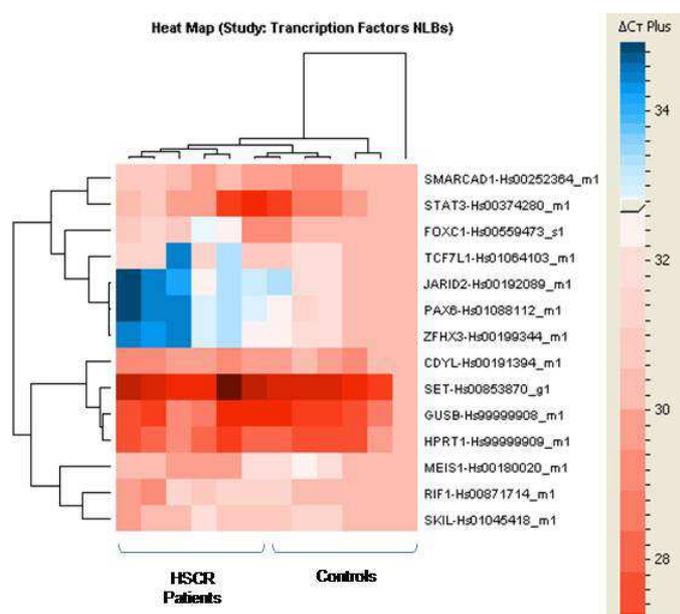
### 4.3 Implicación del gen *PAX6* en la patogénesis de la enfermedad de Hirschsprung

#### 4.3.1 Análisis de la expresión diferencial de factores de transcripción en precursores neurales de SNE de pacientes HSCR versus controles.

El complejo desarrollo del Sistema nervioso entérico está finamente regulado por una serie de moléculas de señalización y factores de transcripción que confieren distintas características a la célula en cada momento del desarrollo. Fallos en este tipo de eventos regulatorios pueden tener consecuencias drásticas en el curso normal de los procesos celulares siendo determinantes en el establecimiento de los correctos patrones de proliferación, migración y diferenciación celular y por tanto en la aparición de HSCR. Es por ello que se decidió evaluar el perfil de expresión de 47 factores de transcripción que habían sido previamente descritos por su papel durante el desarrollo embrionario, principalmente en procesos de proliferación y diferenciación celular.

Para dicho estudio se utilizó ADNc extraído de cultivos de precursores entéricos de seis pacientes HSCR y seis controles y se realizó el análisis mediante PCR cuantitativa de la misma forma que en el apartado de *Resultados 4.2.1*, utilizando en este caso la placa TLDA “*TaqMan® Human Transcriptional Regulatory Network in Embryonic Stem Cell Array Plate*”. Como control endógeno se utilizó *GAPDH*. En cada placa de ocho puertos se añadió un paciente y un control por cuadruplicado. Los genes contenidos en la placa se describen en la (Tabla 2, Anexo).

Del análisis de expresión de los 47 genes incluidos en la placa se obtuvo expresión positiva ( $C_t \leq 32$ ) para 14 factores de transcripción (Figura 40, Tabla 33).



**Figura 40: Factores de transcripción que presentaron expresión positiva en NLBs de controles frente a NLBs de pacientes.** El *HeatMap* se generó utilizando el software *DataAssist™* (Life Technologies) y representa los niveles de expresión de ADNc de 14 genes con expresión positiva. Los genes fueron agrupados jerárquicamente usando promedio de vinculación con coeficiente de correlación de Pearson. La escala de colores a la derecha representa el  $\Delta Ct$ . El color azul indica genes con relativa disminución de la expresión, mientras que el rojo indica los genes con una mayor expresión relativa.

**Tabla 33: Factores de transcripción que presentaron expresión positiva en NLBs de pacientes y controles junto con el Ct de amplificación en controles y su función ([www.genecards.org](http://www.genecards.org))**

Gen	Ct	Función
CDYL	29	Implicado en la acetilación de histonas y supresión génica.
FOXC1	30	Desempeña un importante papel durante el desarrollo embrionario y ocular.
GUSB	26	Este gen codifica para una hidrolasa que degrada glicosaminoglicanos , incluyendo el sulfato de heparán, sulfato de dermatán , y la condroitina -4,6-sulfato
HPRT1	27	La proteína codificada por este gen es una transferasa que juega un papel central en la generación de nucleótidos de purina a través de la vía de recuperación de purina.
JARID2	31	La proteína codificada por este gen es una proteína de unión a ADN que funciona como un represor transcripcional
MEIS1	31	Este gene codifica para una de las proteínas con dominio "homeobox", crucial en el correcto desarrollo embrionario.
PAX6	30	Factor de transcripción con una importante función en el desarrollo del Sistema Nervioso Central, ojo y páncreas.
RIF1	30	Proteína implicada en la reparación del ADN.
SET	25	La proteína codificada por este gen inhibe la acetilación de los nucleosomas, especialmente la histona H4, dando lugar a silenciamiento transcripcional.
SKIL	30	Proteína que regula el crecimiento celular y la diferenciación a través de factor de crecimiento transformante beta (TGFB).
SMARCAD1	30	La proteína codificada por este gen juega un papel crítico en la restauración de la organización de la heterocromatina y la propagación de los patrones epigenéticos.
STAT3	28	Los miembros de la familia STAT son fosforilados por las quinasas asociadas a receptores y, a continuación, se translocan al núcleo celular donde actúan como activadores de la transcripción.
TCF7L1	31	Estos factores de transcripción se activan por la beta catenina, y se antagoniza por la vía de señalización del factor de crecimiento transformante beta.
TRIM24	31	Mediador del control de la transcripción, esta proteína se localiza en cuerpos nucleares y se cree que se asocia con la cromatina.
ZFH3	31	Regulador de la miogénesis y la diferenciación neuronal.

Cuatro de ellos presentaron patrones de expresión que resultaron ser estadísticamente significativos, considerando la variación en la expresión de las

muestras de los pacientes con respecto a los controles 2 veces o superior (tasa de cambio=2) con un valor de confianza del 97% y un p value  $\leq 0,05$  (Tabla 34).

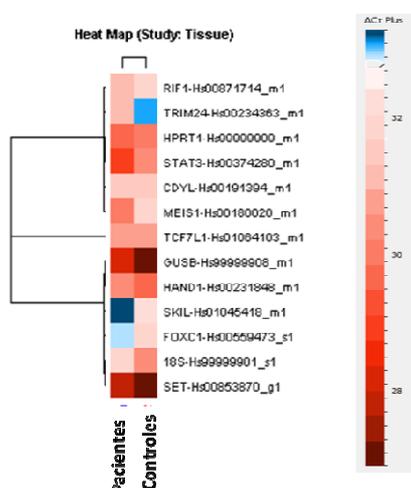
Gen	Expresión	P value
CDYL	Superior	0.02
MEIS1	Superior	0.008
STAT3	Superior	0.006
PAX6	Inferior	0.0006

**Tabla 34:** Factores de transcripción que presentaron unos niveles de expresión estadísticamente significativos entre NLBs de pacientes y controles.

Estos resultados confirman la bajada de expresión de PAX6 que se había obtenido previamente en el estudio de expresión descrito en el apartado de *Resultados 4.2.1*. Los niveles de expresión de PAX6 en pacientes presentaban una reducción de 4,76 veces.

Tras el estudio de expresión de factores de transcripción en NLBs, se realizó el mismo estudio en tejido. Para ello se utilizaron muestras de colon de los mismos pacientes y controles empleados en el ensayo anterior.

De los 47 genes contenidos en la placa, presentaron expresión positiva 13 de ellos, pero ninguno mostró diferencias estadísticamente significativas entre pacientes y controles (Figura 41). PAX6 no se encontraba entre los genes que se expresaban en muestras de colon, resultado que apoya una vez más la importancia y utilidad de estudios en cultivos de precursores neurales de SNE en enfermedades cuya etiopatogenia reside en cambios en mecanismos que se producen en el desarrollo.

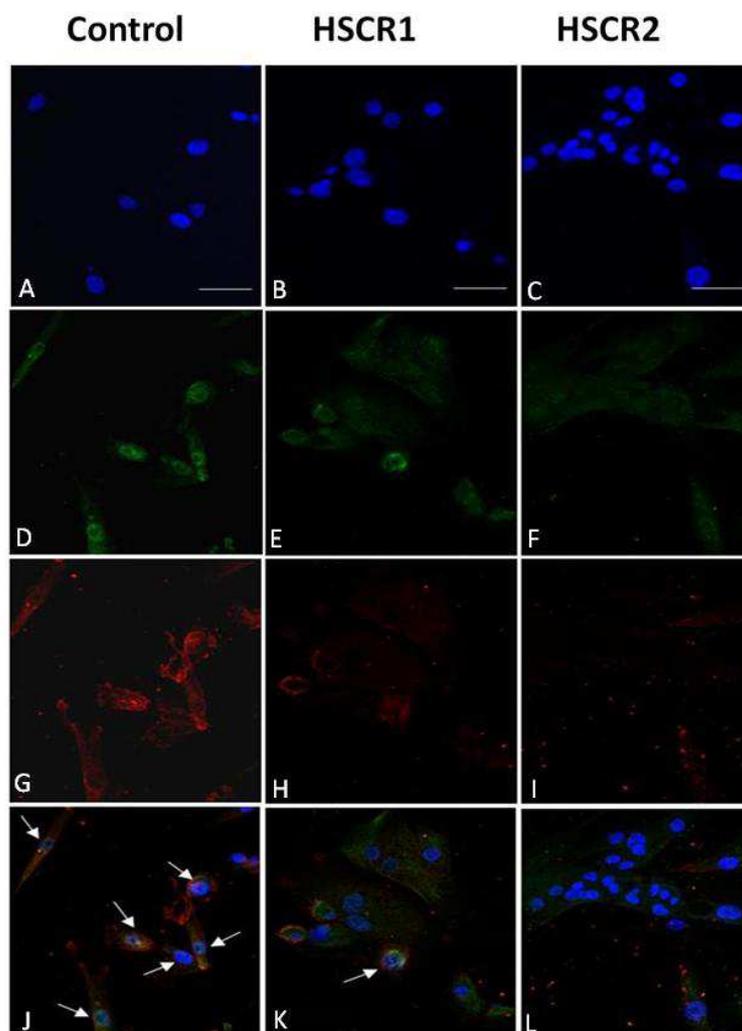


**Figura 41:** Factores de transcripción que presentaron expresión positiva en muestras de colon de pacientes y controles.

#### 4.3.2 Expresión de la proteína PAX6 en muestras de precursores neurales de SNE de pacientes HSCR versus controles.

Mediante inmunocitoquímica, se estudió la presencia y distribución de la proteína PAX6 en los precursores entéricos procedentes de pacientes HSCR y controles con el propósito de dilucidar si la bajada de expresión obtenida se encontraba también a nivel proteico.

Se realizó una co-tinción con PAX6 y NESTINA. La expresión de PAX6 se localiza principalmente en el núcleo, y la reducción del número de células PAX6 positivas en HSCR fue significativamente acusada, representando una bajada del 64% con respecto a los controles (Figura 42).



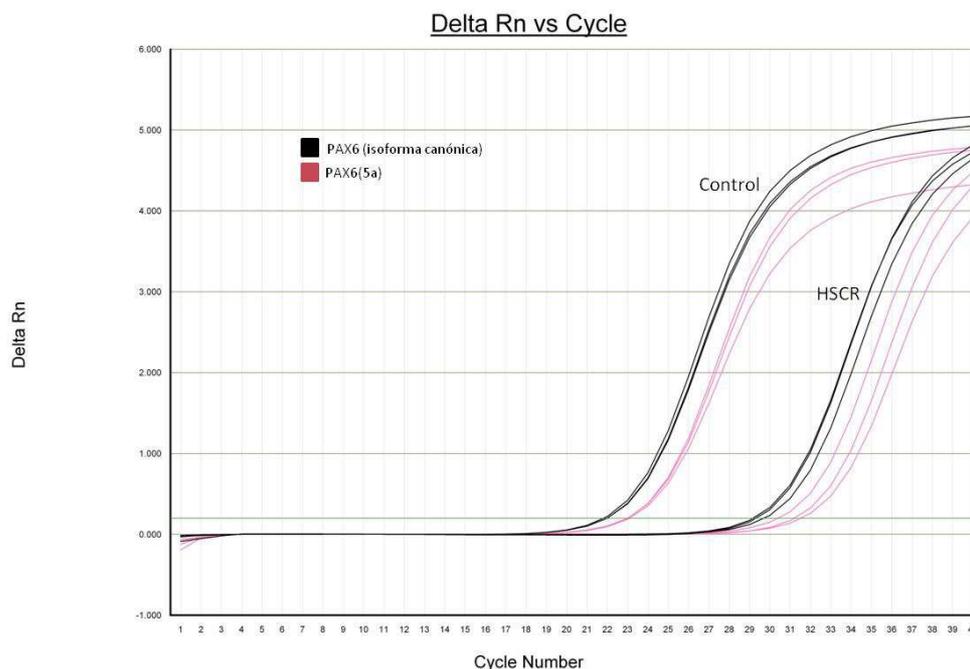
**Figura 42: Expresión de PAX6 en NLBs de pacientes HSCR y control.** Imágenes de microscopio confocal de la expresión de la proteína PAX6 en precursores entéricos derivados de controles (A, D, G, J) y pacientes HSCR (B, C, E, F, H, I, K, L). La tinción para PAX6 es verde, para NESTINA roja y el núcleo de las células fue teñido con DAPI en azul. Escala = 25  $\mu$ M.

### 4.3.3 Estudio de expresión de las dos isoformas mayoritarias de PAX6

Existen dos isoformas mayoritarias de PAX6 descritas en modelos animales, son PAX6 o isoforma canónica y PAX6 (5a) debido al exón 5a adicional que posee.

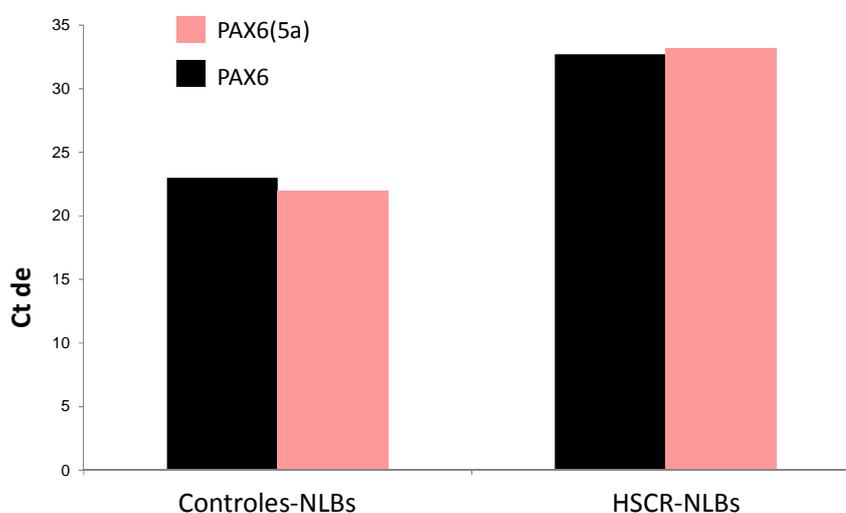
La importancia de la expresión de dichas isoformas radica en que presentan diferentes propiedades de unión al ADN, por ello podrían regular diferentes conjuntos/grupos de genes. Los estudios plantean la posibilidad de que cambios durante el desarrollo en las concentraciones relativas de estas dos isoformas y concretamente durante la neurogénesis, resultarían en cambios en las funciones de los genes directamente regulados.

Para el estudio de la expresión de las isoformas mayoritarias de PAX6 mediante PCR cuantitativa, se utilizó ADNc procedente de cuatro pacientes HSCR y cuatro controles. En cada experimento se realizó un triplicado de cada muestra, como aparece en la gráfica (Figura 43) y se utilizó como control endógeno  $\beta$ -ACTINA. Así mismo el ensayo se hizo por triplicado.



**Figura 43: Representación de la expresión de las dos isoformas mayoritarias de PAX6 tras el estudio de expresión con SYBR, basado en el número de ciclos de amplificación o Ct.** El control analizado presentaba un Ct menor tanto en la isoforma canónica (negro) como en la isoforma PAX6(5a) (rosa) lo que corresponde con una mayor expresión, mientras que el paciente presentaba unos Ct más elevados también en ambos casos lo que supone unos niveles de expresión menores.

No se detectaron cambios significativos en los niveles de expresión relativa entre isoformas. Los datos de amplificación representados en forma de Ct fueron similares entre isoformas. En el grupo de los pacientes la media de Ct para la isoforma canónica fue 32,7 y para PAX6(5a) fue 33,16. En el grupo de controles, la media de Ct en la isoforma canónica fue 23 y 22 para PAX6(5a) (Figura 44). La fracción PAX6/PAX6(5a) en pacientes y controles tras la normalización fue 1,0175 y 1,09 respectivamente.



**Figura 44: Representación de la media de Ct de ambas isoformas de PAX6 en los grupos de pacientes HSCR y controles.** Media del Ct de amplificación de las dos isoformas mayoritarias de PAX6 observada en NLBs de pacientes HSCR y controles, que demuestra unos mayores niveles de expresión (Ct más bajo) en el caso de los controles, pero no se hallaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a los niveles de expresión entre ambas isoformas.

Es de interés mencionar que en este nuevo estudio se confirma la bajada de expresión de PAX6 en pacientes frente a controles, como ya se había obtenido previamente en el apartado *Resultados 4.3.1*. El hecho de que exista un balance relativo entre isoformas no parece necesario para el desarrollo de los precursores entéricos como se había demostrado en otros tejidos.

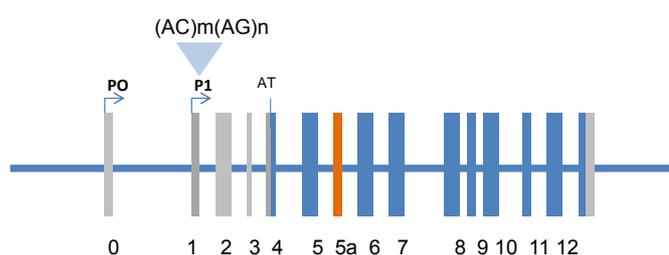
#### 4.3.4 Rastreo mutacional de la secuencia codificante del factor de transcripción *PAX6* y análisis del SRT (AC)m(AG)n localizado en el promotor P1.

Con el fin de evaluar la implicación de *PAX6* en la aparición de la enfermedad de HSCR, se realizó el rastreo mutacional en un total de 196 pacientes HSCR esporádicos (124 hombres/72 mujeres). De ellos, 158 presentaban fenotipo de segmento corto (S-HSCR), 31 pacientes presentaban fenotipo de segmento largo (L-HSCR) y 7 de ellos la forma más severa, aganglionosis total colónica.

El rastreo mutacional se realizó mediante secuenciación directa. Se analizó la región codificante completa, las uniones intrón-exón y las regiones intrónicas flanqueantes de *PAX6* (NM-001127612).

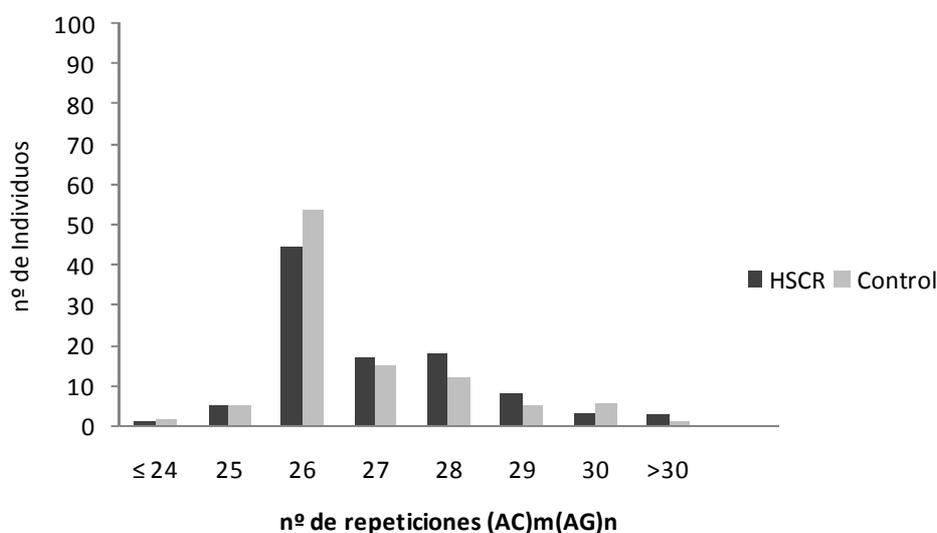
Como resultado del rastreo, se encontraron dos variantes sinónimas (Val320Val y Gln291Gln) y once variaciones intrónicas. No se encontraron evidencias de que ninguna de las variantes sinónimas o localizadas en la región no codificante produjera alteraciones en los procesos de transcripción, maduración o traducción, al someterlas a distintas herramientas bioinformáticas (Tabla 3, Anexo). Dada la ausencia de variantes patogénicas en la cohorte de pacientes, se descarta por lo tanto, la presencia de mutaciones deletéreas en este gen como uno de los mecanismos que conduce a la aparición de HSCR.

Por otro lado, se realizó la genotipación de la secuencia repetitiva (AC)m(AG)n localizada aproximadamente 1 kb aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción y que se encuentra asociada con el promotor P1 de *PAX6* (Figura 45).



**Figura 45: Representación esquemática del gen *PAX6* y posición de la secuencia repetitiva (AC)m(AG)n** en azul los diferentes exones que se transcriben, en gris aquellos exones que no se transcriben y en naranja el exón adicional de la isoforma *PAX6*(5a)

El análisis de la distribución alélica para (AC)m(AG)n reveló la presencia de 13 alelos diferentes en pacientes HSCR que van desde 23 hasta 35 repeticiones, y 10 alelos diferentes en el caso de los controles, que van desde 24 a 33 repeticiones. En general, la distribución alélica resultó estadísticamente significativa entre pacientes HSCR y controles ( $\chi^2 = 21,00$ ,  $p = 0,0072$ ). El alelo más común para ambos grupos fue el de 26 repeticiones, aunque su frecuencia fue 11,8 % menor en pacientes HSCR (44,9 % HSCR, frente a 56,7 % controles)(Figura 46).



**Figura 46: Distribución alélica del número de repeticiones dentro de la secuencia (AC)m(AG)n.**

Adicionalmente, el análisis de distribución de cada alelo específico fue significativo, mostrando una escasa representación del alelo de 26 repeticiones ( $\chi^2 = 8,98$ ,  $p = 0,0027$ ) y la sobre-representación del alelo de 29 repeticiones ( $\chi^2 = 10,23$ ,  $p = 0,0014$ ) en el grupo de pacientes HSCR. Estos resultados permiten establecer como punto de corte el alelo equivalente a 26 repeticiones. Los alelos con 26 o menor número de repeticiones representaron el 52,29 % de los pacientes y el 63,76 % de los controles. Aquellos alelos con más de 26 repeticiones, representaron el 47,71 % de los pacientes y el 36,24 % de los controles ( $\chi^2 = 8,63$ ,  $p = 0,0033$ ). Estos resultados muestran una sobre-representación en el grupo de pacientes, de individuos que portan al menos un alelo o ambos con más de 26 repeticiones (73,47 %) siendo relativamente menor en el caso de los controles (57,05 %)(Figura 47).

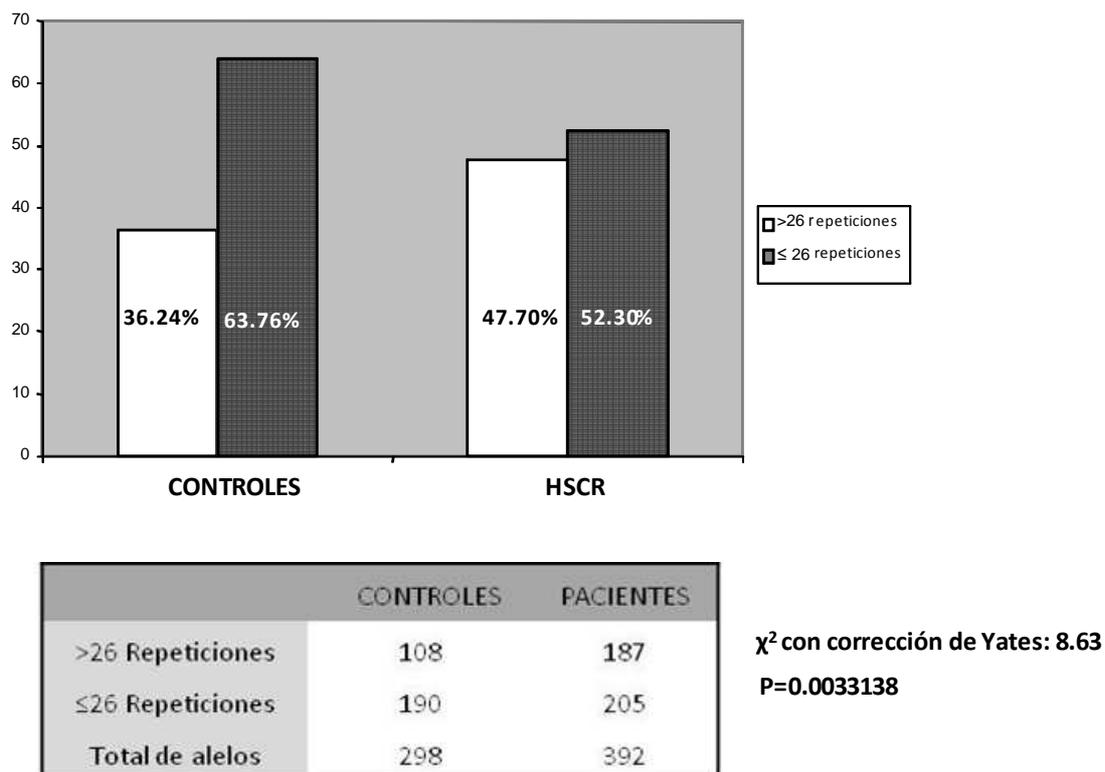
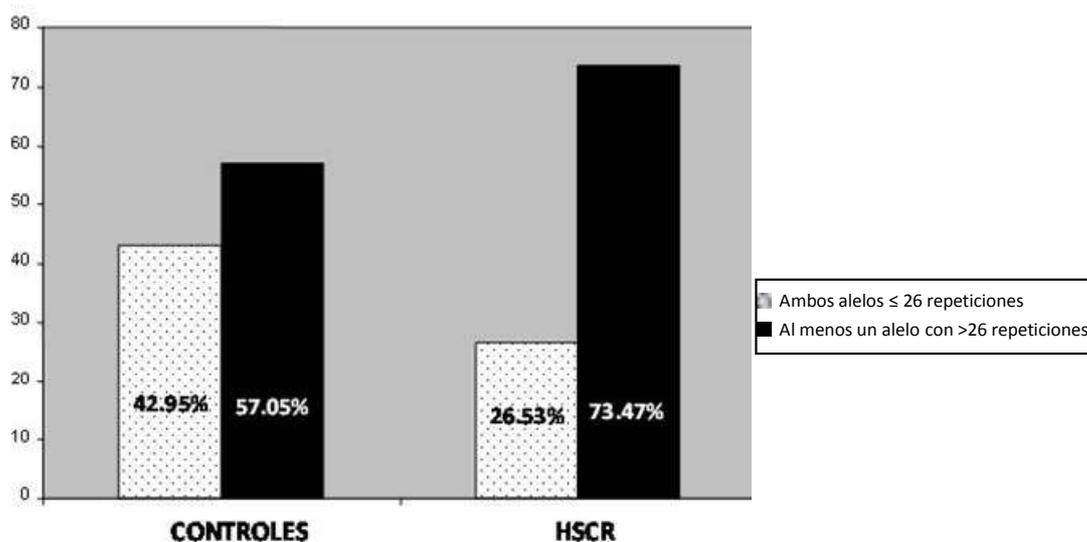


Figura 47: Distribución de alelos de *PAX6* con >26 y ≤26 repeticiones dentro de la región del promotor P1 (AC)m(AG)n, en pacientes HSCR frente a controles.

El análisis de distribución genotípica entre ambos grupos dio como resultado que un mayor número de individuos dentro del grupo de controles eran homocigotos portando ambos alelos con un número ≤26 repeticiones frente al grupo de pacientes (HSCR: 26,53 %, controles: 42,95 %). En el caso de individuos heterocigotos con alelos con un número ≤26 repeticiones, seguía habiendo diferencias entre ambos grupos muestrales (HSCR: 51.53 %, controles: 41.61 %), así como en el caso de individuos homocigotos que portaban alelos con >26 repeticiones (HSCR: 21,94 %, controles: 15,44 %) ( $\chi^2 = 10.42$ ,  $p = 0,0055$ ). Igualmente, la significación estadística se mantuvo en el análisis de la distribución genotípica de los individuos heterocigotos y homocigotos que portaban alelos con más de 26 repeticiones ( $\chi^2 = 9,51$ ,  $p = 0,0020$ ) (Figura 48).



	CONTROLES	PACIENTES
Ambos alelos ≤ 26 repeticiones	64	52
Al menos un alelo con >26 repeticiones	85	144
Total de Individuos	149	196

$\chi^2$  con corrección de Yates: 9.51  
P= 0.0020473

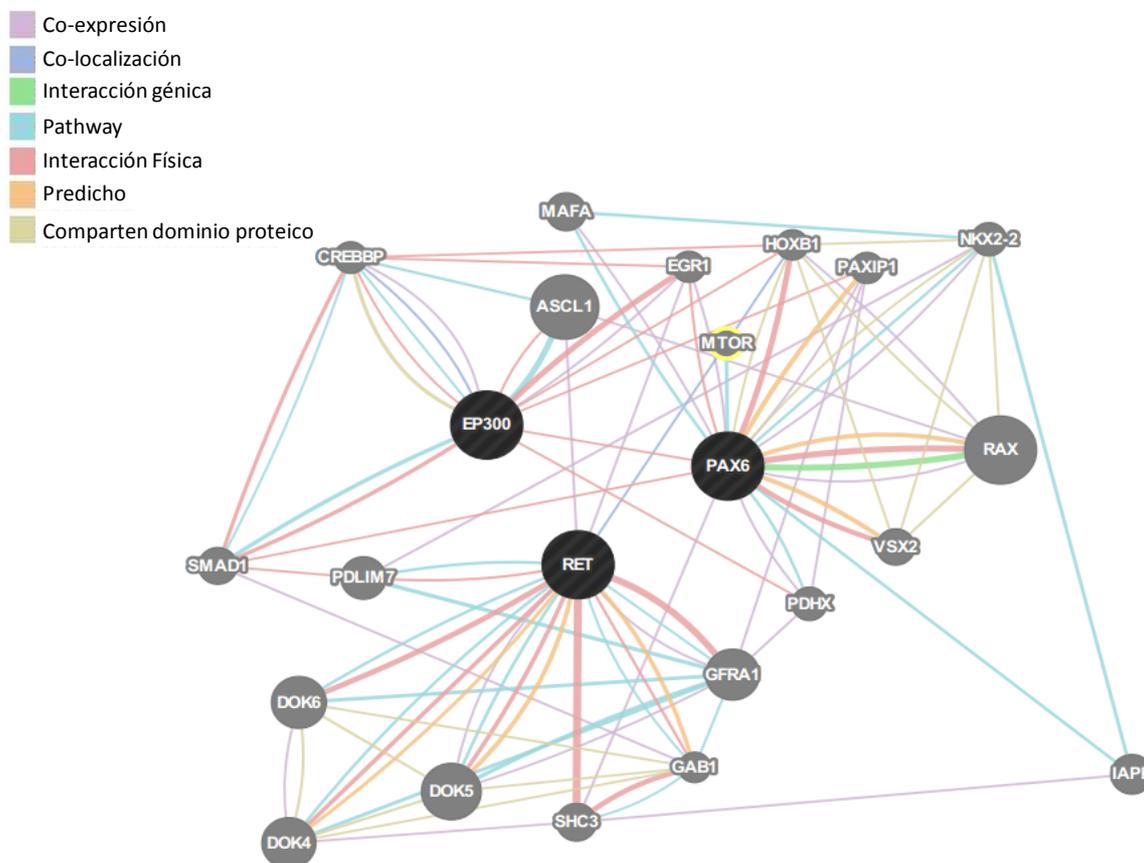
**Figura 48:** Distribución de individuos que presentaban al menos un alelo con >26 repeticiones dentro de la región (AC)m(AG)n del promotor P1 de PAX6. Se agruparon los individuos con al menos un alelo con > 26 repeticiones.

Con el objetivo de profundizar más en el posible impacto de la representación diferencial de la repetición (AC)m(AG)n dentro del promotor P1 de PAX6, se utilizaron diferentes herramientas bioinformáticas para el análisis de posibles moléculas reguladoras que tengan un sitio de unión en dicha repetición.

Utilizando la herramienta bioinformática *TFSEARCH*, se observó que tras presentar diferentes combinaciones de los dinucleótidos (AC) y (AG) que daban lugar a alelos de 29 o más repeticiones, se producía la pérdida de la unión de la proteína EP300 (*E1A binding protein p300*) a su sitio de unión. Esta proteína presenta una actividad Histona-acetiltransferasa encargada de regular el proceso de transcripción a través de la remodelación de la cromatina, siendo esencial en los procesos de proliferación y diferenciación celular.

A continuación se utilizó la herramienta bioinformática *GeneMANIA* para el análisis de interacciones entre PAX6 y p300. Las predicciones revelaron una interacción

física directa entre ambas proteínas y cuando se añadió al análisis otras proteínas previamente asociadas con la patología, se encontró relación indirecta, entre otras, con RET(Figura 49).



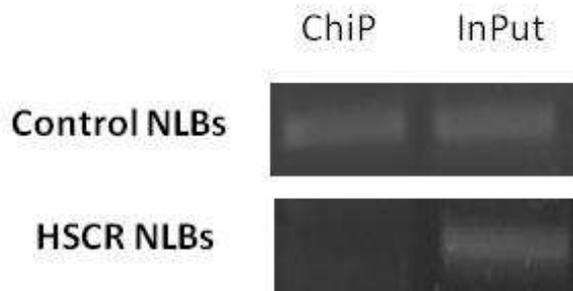
**Figura 49:** Mapa de interacción entre PAX6 y p300 obtenido mediante el uso de la herramienta on-line GENEMANIA

#### 4.3.5 Evaluación de PAX6 como diana de p300.

Tras el hallazgo mediante herramientas bioinformáticas de la interacción directa que se establece entre PAX6 y p300, se decidió realizar un ensayo de Inmunoprecipitación de cromatina o ChIP en ADN extraído de cultivo de NLBs utilizando anticuerpo específico frente a p300. Tras realizar el ChIP, se amplificó el fragmento del promotor que contenía la secuencia repetitiva en estudio.

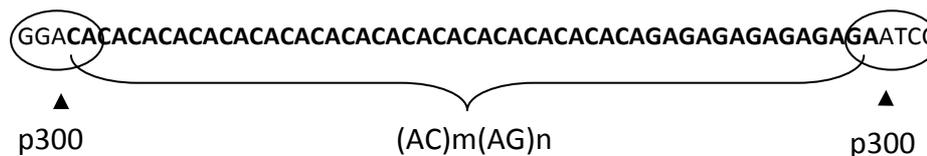
El ensayo se realizó a partir de ADN extraído de cultivo de precursores entéricos de un control y un paciente que fueron genotipados para el número de repeticiones existente dentro del tándem (AC)m(AG)n presente en el promotor de PAX6. El control

portaba un alelo con 26 repeticiones y otro alelo con 27 repeticiones mientras que el paciente portaba ambos alelos con 28 repeticiones. En el caso del paciente al aumentar el número de repeticiones se producía una drástica bajada en la unión de p300 (Figura 50).



**Figura 50: Inmunoprecipitación de cromatina con anticuerpo específico frente a p300.** Amplificación mediante PCR del fragmento de ADN inmunoprecipitado con anticuerpo frente a p300 (ChiP) y control donde no se utilizó anticuerpo (Input). En el paciente que presenta un número de 28 repeticiones se produce una drástica bajada de la intensidad de la banda en el ChiP.

Mediante la herramienta bioinformática *PROMO* se identificaron dos secuencias consenso predichas como sitios de unión específicos para p300. Estas secuencias se encuentran flanqueando la región repetitiva dentro del promotor de *PAX6* (Figura 51). La capacidad de p300 para interactuar con *PAX6* podría verse comprometida por la distancia entre sitios de unión. Un aumento en el número de repeticiones podría influir en la conformación de esa secuencia en particular, modificando el acceso de la proteína a su sitio de unión. Este hecho explicaría las diferencias encontradas entre paciente y control en cuanto a la afinidad de unión de p300.

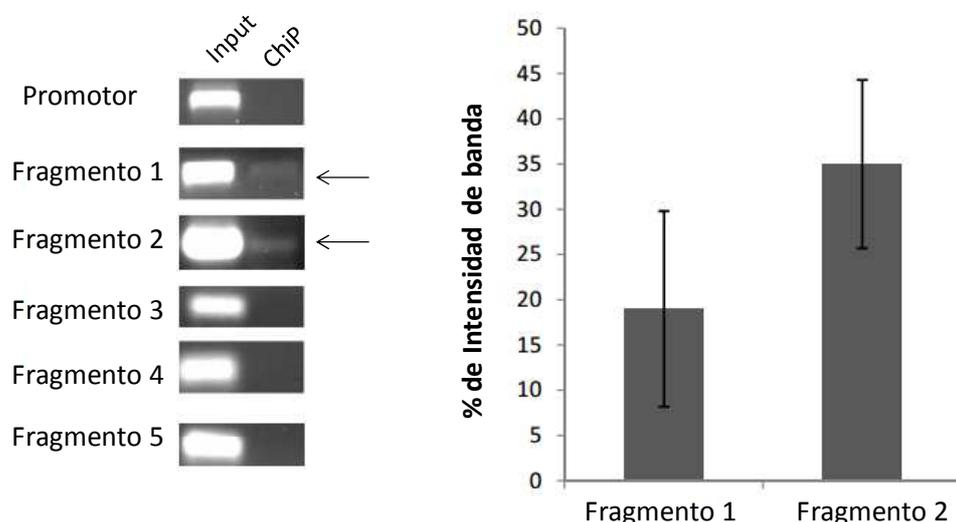


**Figura 51: Región de unión de la proteína p300 a la región del promotor de *PAX6* donde se encuentra la secuencia repetitiva (AC)m(AG)n.**

#### 4.3.6 Evaluación de *PAX6* como diana de la metiltransferasa DNMT3B.

Continuando con el estudio de posibles mecanismos que conlleven una disminución en la expresión de *PAX6* en pacientes HSCR, y puesto que se obtuvieron previamente unos patrones aberrantes de metilación global del genoma de pacientes, se estudió la posibilidad de que *PAX6* fuera una diana directa de la metiltransferasa *de novo* DNMT3B, siendo la metilación uno de los mecanismos epigenéticos más importantes implicados en la regulación y el silenciamiento transcripcional.

Para ello se realizó un nuevo estudio de inmunoprecipitación de cromatina. Para este estudio, debido a las limitaciones de muestras humanas, se utilizaron NLBs procedentes de cultivos de intestino de ratones postnatales CD1. Una vez purificado el ADN inmunoprecipitado mediante anticuerpo específico frente a *Dnmt3b*, se amplificó dicho ADN con diferentes parejas de cebadores que habían sido diseñados a lo largo del promotor y secuencia codificante de *Pax6*. Entre ellos, se encontraron dos fragmentos en la muestra de ADN inmunoprecipitada, que tras posterior comprobación mediante secuenciación directa, correspondían a la secuencia de *Pax6* (Figura 52).



**Figura 52: Inmunoprecipitación de cromatina con anticuerpo específico frente a *Dnmt3b*.** Amplificación mediante PCR de diferentes fragmentos de ADN inmunoprecipitado con anticuerpo frente a *Dnmt3b* (ChIP) y control donde no se utilizó anticuerpo (Input). Identificando dos regiones de la secuencia de *Pax6* donde se une *Dnmt3b*.

En concreto, los fragmentos encontrados como sitios de unión de Dnmt3b, corresponden a regiones que muestran un porcentaje de homología entre humano y ratón del 59,75% para el fragmento 1 y del 85,18% para el fragmento 2, obtenidos mediante el uso de la herramienta *Clustal Omega*.

Estos fragmentos se analizaron mediante la herramienta bioinformática *Cpgplot*, resultando ser regiones de elevado porcentaje en CG o Islas CpG, y por tanto susceptibles de sufrir procesos de metilación, que se situaban dentro del promotor de *PAX6* en humanos (Figura 53).

**Fragmento 1**

```

Mouse -----CCCGGTT
Human CCCTCTTTTCTTATCATTGACATTTAAACTCTGGGGCAGGTCTCGCGTAGAACCGGGCT
          *  ***  *

Mouse GTCAGATCTGCTACTTCCC-----CCCCAGAAGCGGCTTT
Human GTCAGATCTGCCACTTCCTTGATATTTAAATTTTGGGGTAGGTTCTCGCCGAGCGGGCT
          *****  *****  **  *  .  *****  *

Mouse GACAAGTGTGGGAACCAGCGCCACCAGACTCACCTGACACCCACCCCTCGGCTCACAGGT
Human GACAAGTGTGGGAACCAGCGCTGCCAGGCTCACCTGCCTCCCCGCCCTCCGCTCCCAGGT
          *****  .***  .***  .*****  *  :***  .*****  ****  .*****

Mouse AACCGCTTTGATTCTAGCC-AGACTCACCCCAAGACTAGCGGCGCCCTCTCCGACGTGC
Human AACCGCCCGGGTCCGGCCCGGGCCGGCTCGGGCCCGGGGGCTCTCCGCTGCCAGC
          *****  *  **  .***  .**  *  *  *  .**  .*****  ***  ***  *  .  :**

Mouse AACCTGTGTGTTGAGTGCATAGAAACCCCTCCCCGAGTGGCCCGGGCTTGATTTTTTCT
Human GACTGCTGTCCCA---AATCAAAGCCCGCCCAAGTGGCCCGGGCTTGAT-----T
          .**  ***  **  .**  .**  .***  *****  .*****  *  .  :*  *
    
```

**Fragmento 2**

```

Mouse -----TGCGGAGTGATTAGTGGGTTGAAAAGCGAACCG
Human TGAGAGCGAGCGGTGCATTTGCATGTTGCGGAGTGATTAGTGGGTTGAAAAGCGAACCG
          *****  .*****  .*****

Mouse TGGCTCGGCCTCATTTCGGCTCTGTTTCAGGCGCAGGAGGAAGTGTTCCTGGAGGAT
Human TGGCTCGGCCTCATTTCGGCTCTGTTTCAGGCGCAGGAGGAAGTGTTCCTGGAGGAT
          *****  .*****  .*****

Mouse GATGACAGAGGTCAGGCTTCGGCTAATGGGCCACTGAGGAGCGGTGGAGGCGAGGCCGGGC
Human GATGACAGAGGTCAGGCTTCGGCTAATGGGCCACTGAGGAGCGGTGGAGGCGAGGCCGGGC
          *****  .*****  .*****

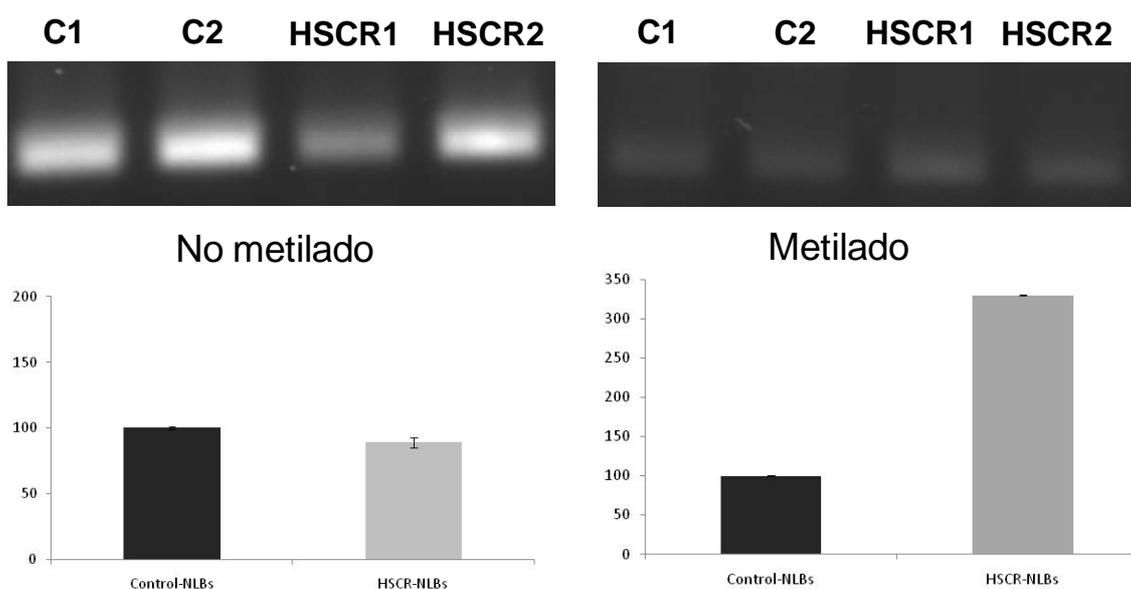
Mouse GCCGGCACACACATTAAACACACTTGAGCCATCACCAATCAGCATAGGTGTGCTGGCTG
Human GCCGCA-----
          *****
    
```

**Figura 53:** Alineamiento de las secuencias de ratón (*mouse*) y humano (*human*), correspondientes a los fragmentos inmunoprecipitados con anticuerpo específico frente a Dnmt3b.

Debido a que el estudio se había realizado en NLBs de ratón, se procedió a extraer ADN de NLBs de pacientes HSCR y controles y realizar el análisis del estado de metilación en dichas Islas CpG.

Para ello, se transformó ADN extraído de cultivo de precursores entéricos de dos pacientes HSCR y dos controles, y se realizó el análisis semicuantitativo del estado de metilación de ambos fragmentos mediante PCR de metilación específica (MSP).

En cuanto al fragmento 1, para aquellos alelos metilados, los pacientes mostraron una banda más intensa en comparación con los controles. Este incremento resultó ser tres veces mayor. El tamaño de banda se obtuvo midiendo el área correspondiente y la cantidad de píxeles, con el *Image Lab™ Software* de *ChemiDoc™* (BioRad, USA). Para aquellos alelos no metilados, no se encontraron diferencias entre pacientes y controles (Figura 54).



**Figura 54: MSP para el fragmento 1 correspondiente a la Isla CpG dentro del promotor de *PAX6*.** Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 2.5%, teñido con bromuro de etidio

Con los resultados obtenidos a partir del estudio de MSP, que reflejaban la existencia de diferencias en el estado de metilación del fragmento 1 en pacientes con respecto a controles, se decidió realizar un análisis cuantitativo por pirosecuenciación,

analizando una región dentro del fragmento 1 en el cual se localizaban 11 dinucleótidos CG (Figura 55).

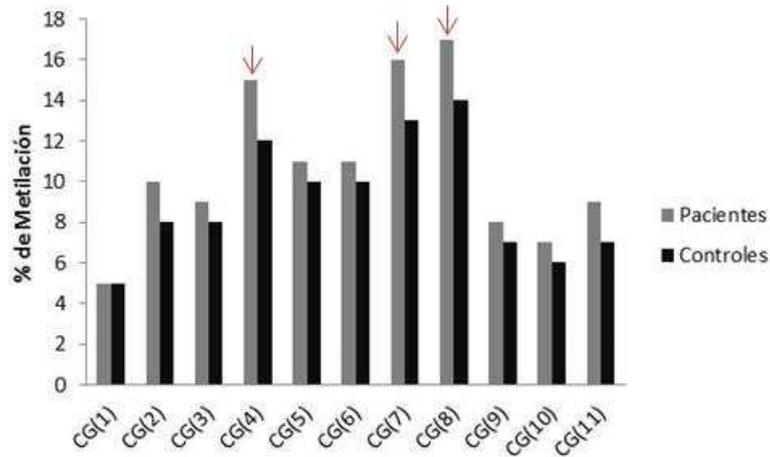
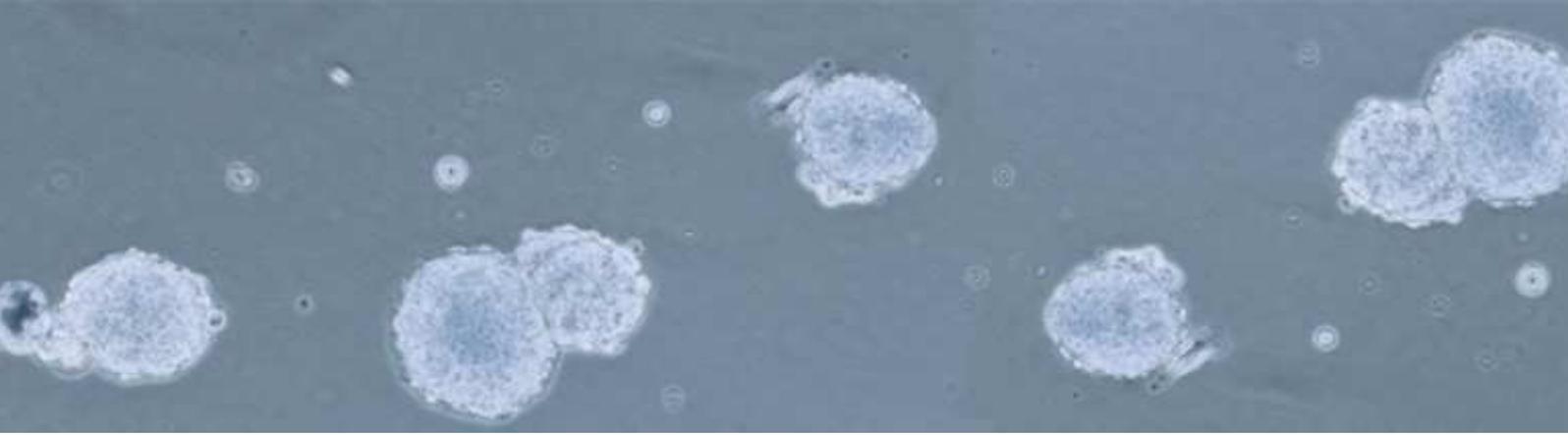


Figura 55: Porcentaje de metilación en pacientes *versus* controles de cada dinucleótido CpG en el Fragmento 1, dentro de la Isla CpG en el promotor de *PAX6*.

Debido al pequeño tamaño muestral, no se podría concluir si existen diferencias estadísticamente significativas en cuanto al estado de metilación entre pacientes y controles. Aún así, se mantienen los resultados obtenidos en el análisis anterior, habiendo obtenido de nuevo un mayor porcentaje de metilación en pacientes con respecto a los controles, tanto de forma global como de forma individual dentro de cada dinucleótido CpG, lo que implicaría un mayor porcentaje de metilación de esta región dentro del promotor de *PAX6*.

En cuanto al fragmento 2, se realizó el mismo análisis semicuantitativo, pero no se obtuvieron diferencias entre pacientes y controles en aquellos alelos metilados así como en los correspondientes alelos no metilados.



## 5. DISCUSIÓN



### 5.1 Identificación de dos variantes patogénica en Síndrome de Waardenburg Tipo IV.

El síndrome de Waardenburg es una patología hereditaria, clínica y genéticamente heterogénea, que afecta al desarrollo de los melanocitos a partir de la cresta neural tanto en piel como en la estría vascular de la cóclea, dando lugar a un fenotipo caracterizado por alteraciones pigmentarias y sordera. Se han descrito mutaciones en heterocigosis relacionadas con dicho fenotipo en diferentes factores de transcripción y entre ellos *SOX10* como uno de los genes principales implicados especialmente en SW4 que es el subtipo que cursa con HSCR (Pingault et al., 2010).

*SOX10* es clave durante el desarrollo de la cresta neural. En el intestino en desarrollo se encuentra expresado en todos los precursores entéricos que migran en dirección rostro-caudal hasta colonizar el intestino anterior, intestino medio e intestino grueso, formando los plexos ganglionares del SNE (Bondurand et al., 1998, 2003; Kuhlbrodt et al., 1998; Paratore et al., 2002; Southard-Smith et al., 1998; Young et al., 2004, 2003). Sin embargo, su expresión es mucho más amplia durante el desarrollo del sistema nervioso periférico incluyendo células que forman parte del tejido esquelético craneofacial y los melanocitos presentes en la piel y el oído interno (Le Douarin et al., 1999), lo cual se correlaciona con el fenotipo observado en pacientes Waardenburg.

La proteína *SOX10* presenta diferentes dominios funcionales esenciales para su correcta actividad. Las mutaciones descritas en *SOX10* son en su mayoría mutaciones truncantes, que normalmente producen la pérdida del dominio de transactivación y en algunas ocasiones incluso del dominio HMG (Pingault et al., 2010). Aquellas mutaciones que se encuentran a lo largo del dominio HMG dan como resultado proteínas mutantes que se distribuyen parcialmente a nivel citoplasmático y/o subnuclear, y que en la mayoría de los casos pierden su capacidad de unión a dianas específicas en el tejido (Chaoui et al., 2011). Aquellas mutaciones puntuales o deleciones grandes localizadas mayoritariamente en los dos últimos exones del gen, son responsables del fenotipo observado en los pacientes con SW4, de su variante neurológica PCWH, del SW2 y por último del síndrome de Kallmann (Pingault et al., 1998, Inoue et al., 2004, Bondurand et al., 2007, Pingault et al., 2013).

En el presente trabajo se han identificado dos mutaciones que generaban la aparición de un codón de parada prematuro en *SOX10* (p.Thr370Serfs\*38 y p.His306Thrfs\*5), siendo responsables del fenotipo SW4 y PCWH en dos pacientes respectivamente. Este tipo de mutaciones deletéreas que originan codones de parada prematuros presentes en los exones finales del gen representan, en la mayoría de los casos, la causa molecular responsable del fenotipo. Asimismo, la severidad del fenotipo, en cuanto a presencia o ausencia de manifestaciones neurológicas, viene condicionada por la localización específica del codón que se vea afectado (Inoue et al., 2004; Bondurand et al., 2013). En este sentido, según diferentes estudios *in vitro*, las consecuencias funcionales de distintas mutaciones a lo largo de la secuencia de *SOX10* pueden ser muy diferentes. La mayor parte de mutaciones sin sentido (*nonsense*) que afectan a los primeros exones del gen dan lugar a pequeños ARNm aberrantes que deben ser eliminados antes de ser traducidos mediante el mecanismo celular *Nonsense-mediated mRNA Decay* (NMD-mRNA), generando haploinsuficiencia en la célula que es la responsable del fenotipo SW4 (Hilleren et al., 1999; Inoue et al., 2004; Verheij et al., 2006). Sin embargo, la presencia de mutaciones en el exón 5 o final del exón 4, que afectan el dominio de transactivación, podrían dar lugar a ARNm aberrantes capaces de escapar de este mecanismo de protección celular, mostrando un efecto negativo al competir por la unión del promotor con aquellas proteínas normales, y dando como resultado fenotipos más agresivos como el observado en PCWH (Inoue et al., 2004). El hipotético límite que se ha establecido para que se produzca este evento es posiciones próximas al codón 234, donde se ha descrito que la mutación p.Gln234X da como resultado una proteína truncada muy probablemente responsable del fenotipo PCWH (Pingault et al., 2002).

Por otro lado, existe una correlación entre la localización específica de la mutación dentro de la secuencia de *SOX10* y la longitud del segmento agangliónico en el colon. Así, mutaciones que afectan al dominio HMG, conducen a una hipoganglioneosis, mientras que mutaciones en el dominio de transactivación llevan a una aganglioneosis total del colon (Sham et al., 2001).

Considerando las mutaciones encontradas en los pacientes en estudio, el cambio *de novo* c.915delG (p.His306Thrfs5) encontrado en el segundo paciente,

se ajustaría a la hipótesis previamente descrita de un modelo de actividad dominante negativo de la proteína truncada, que daría como consecuencia afectación neurológica dado que este paciente presentaba una alteración difusa de la mielinización y un marcado retraso psicomotor. Además, esta delección ya había sido asociada anteriormente (Viñuela et al., 2009) al fenotipo PCWH, sugiriendo la existencia de una correlación genotipo-fenotipo para esta mutación en concreto. También cabe mencionar, que la presencia de delecciones completas en SOX10, descritas en pacientes que presentaban el síndrome PCWH, sugiere que podrían existir mecanismos adicionales al de NMD-mRNA que podrían explicar esta variabilidad fenotípica (Bondurand et al., 2007).

Por otro lado, en el caso del primer paciente, se ha encontrado la mutación c.1107ins19 (p.Thr370Alafs\*38), que había sido heredada por vía materna y estaba presente a lo largo de tres generaciones con fenotipos diferentes. En el caso de la abuela materna del paciente, se manifestaba con hipopigmentación y en el caso de la madre del paciente, con pérdida de la audición. No son comunes los casos familiares de SW4, sin embargo existen algunos previamente descritos en los cuales también se presenta una elevada variabilidad fenotípica entre individuos que portan la misma mutación (Pingault et al., 1998; Southard-Smith et al., 1999). En estas familias, la penetrancia es incompleta ya que estas mutaciones están presentes en miembros dentro de la familia con signos que no son los típicamente característicos del síndrome. La ausencia de grandes familias afectadas impide el estudio de la correlación genotipo-fenotipo, por lo que no es fácil explicar la relación que pueda existir entre las mutaciones encontradas y el fenotipo observado. Existe la hipótesis de que la presencia de mosaicismo en estos pacientes sea responsable de la penetrancia incompleta de alguna de las características, dando lugar por tanto a la elevada variabilidad entre fenotipos observada (Pingault et al., 2010). En este sentido, el mosaicismo podría explicar el hecho de que en algunas ocasiones padres sanos porten las mismas mutaciones que sus hijos afectados (Bondurand et al., 2013). Sin embargo, en el caso familiar que se describe en el presente trabajo, no es el mosaicismo el evento responsable o capaz de explicar la variabilidad fenotípica encontrada entre los miembros de esta familia.

Una explicación para este hallazgo podría ser que, la expresión de la enfermedad dependa de la contribución de diferentes eventos moleculares adicionales, genes o regiones reguladoras que todavía no han sido descritas, que estén actuando de una forma aditiva o multiplicativa modulando la penetrancia de mutaciones o la expresión de la enfermedad en individuos afectados. En este sentido, recientemente se ha descrito un caso en el cual tres miembros de tres generaciones dentro de una misma familia presentaban fenotipo HSCR, y uno de ellos además heterocromía del iris. En este caso el fenotipo HSCR puede deberse al efecto conjunto de mutaciones en heterocigosis en *EDNRB* y *EDN3*, mientras que la heterocromía del iris sea debida a eventos genéticos independientes, como podría ser un número de copias inadecuado (CNV) del gen *DACH1* (Cui et al., 2013).

Basándonos en esta hipótesis se decidió estudiar la presencia de la variante *Enhancer* (rs2435357), localizada en el intrón 1 de *RET*, para evaluar su posible participación en la manifestación del fenotipo a nivel entérico. Dicha variante se encuentra en un dominio que se ha demostrado como uno de los principales reguladores de la expresión de *RET*, potenciándola específicamente en el SNE (Grice et al., 2005). La capacidad de la variante *Enhancer* para alterar la expresión de *RET* se debe a que interrumpe un sitio de unión de *SOX10* de forma que éste no es capaz de unirse y activar adecuadamente la transcripción de *RET* (Emison et al, 2010). Sin embargo, ninguno de ellos portaba dicho cambio, lo cual está en concordancia con los hallazgos previamente descritos por Pontual et al. En 2007, donde sugiere que la frecuencia del alelo que produce la predisposición a la enfermedad no es significativamente diferente en pacientes con SW4. También se analizó la secuencia codificante de los genes *EDN3* y *EDNRB*, ya que este fenotipo se ha visto también asociado a mutaciones en estos genes (Puffenberger et al., 1994; Hofstra et al., 1994; Ederly et al., 1994), pero en ninguno de los casos se identificaron mutaciones, lo cual evidencia la necesidad de buscar nuevos genes y eventos regulatorios que puedan estar relacionados con la enfermedad. En este sentido, Bondurand et al., 2012, ha descrito una delección a nivel de las repeticiones *Alu* que daba lugar a un fenotipo SW4 en uno de los pacientes de los 22 analizados, confirmando la importancia de estas secuencias en el control de la expresión génica y sugiriendo su implicación en la regulación de la expresión de *SOX10* en humanos.

Es necesario destacar que, al contrario del resto de mutaciones localizadas dentro de la región 3' del gen, no se encontró ningún tipo de manifestación neurológica en el paciente que portaba la inserción de 19 nucleótidos, c.1107ins GCTGGGGCCCCCACTAC, se trataba de una inserción de 19 nucleótidos, c.1107ins que generaba una alteración de la pauta de lectura a partir de la posición aminoacídica 370, y un codón de parada prematuro 38 residuos después. En casos similares en los cuales se añaden largas colas de aminoácidos debido a las mutaciones que se producen, como es el ejemplo de la mutación c.780delG (p.Arg261Alafs\*25), o c.1077\_1078delGA (p.Glu359Aspfs\*42), y no dan lugar a la aparición de manifestaciones neurológicas, se ha propuesto que la presencia de estas colas podría afectar el correcto plegamiento de la proteína teniendo consecuencias sobre su procesamiento proteolítico. La importancia que la secuencia de aminoácidos tiene en el plegamiento de proteínas es debido a que existe un equilibrio fisiológico entre la forma desplegada y nativa de una proteína y los cambios que se produzcan sobre la misma pueden generar pequeños cambios en la energía libre de los estados intermediarios dentro del proceso de plegamiento de la proteína. Por tanto, un plegamiento incorrecto produciría que la maquinaria proteolítica degradara dichas proteínas erróneas evitando el efecto negativo dominante (Viñuela et al., 2009). En el caso de la mutación p.Thr370Ala\*fs38, podría estar teniendo lugar este evento, y por tanto no resultaría en un fenotipo PCWH, aunque estudios funcionales adicionales serían necesarios para comprobar esta hipótesis de forma definitiva.

Los resultados obtenidos apoyan la importancia de realizar análisis genético en caso de sospecha de SW4, como una herramienta útil para evaluar el riesgo de recurrencia de la enfermedad y poder ofrecer un consejo genético adecuado a las familias afectas. Además, los resultados obtenidos a partir del caso familiar, descartan el mosaicismo como el único evento molecular responsable de la variabilidad fenotípica intrafamiliar. Serían necesarios estudios adicionales para dilucidar por completo la causas de la mencionada variabilidad fenotípica, así como identificar nuevos genes implicados en SW4 / PCWH que sean responsables de los casos restantes sin resolver.

## **5.2 Identificación de genes de pluripotencia que presentaban niveles de expresión diferencial en precursores neurales de SNE de pacientes HSCR versus controles**

El estudio del desarrollo embrionario del SNE es de gran interés ya que supone un modelo idóneo para el estudio de los procesos celulares de proliferación, migración y diferenciación de células precursoras de la cresta neural. Fallos en estos eventos dan lugar a la aparición de diferentes patologías, entre ellas HSCR. Durante dicho desarrollo las células que van a colonizar el tracto digestivo constituyen una población pluripotente y heterogénea, que a lo largo de los distintos estadios del desarrollo embrionario se van a ir comprometiendo con los diversos fenotipos celulares presentes en el SNE (Henion et al., 1997, Newgreen et al., 2002a, 2002b). Este proceso se encuentra finamente regulado por el nicho entérico, que consiste en factores de crecimiento y elementos de la matriz extracelular secretados por las células del mesénquima intestinal y que van a actuar sobre receptores de los precursores de la cresta neural, con la consiguiente activación y represión de la expresión génica (Le Douarin et al., 1992). Por tanto, la interacción entre los precursores derivados de la cresta neural y el microambiente en términos de factores tanto intrínsecos como extrínsecos a dichas células, será crucial para un correcto desarrollo del SNE.

Un punto clave para aclarar las bases genéticas de la enfermedad de HSCR sería entender cuáles son los mecanismos subyacentes que dan lugar a los patrones de expresión génica selectiva durante el desarrollo del SNE. Para este tipo de estudios una de las mejores herramientas son las células progenitoras entéricas. Estas células persisten en mamíferos adultos y se han conseguido aislar y posteriormente amplificar en cultivo, mediante la generación de neuroesferas o NLBs a partir de intestino postnatal tanto de ratones (Bondurand et al., 2003; Schafer et al., 2003) como de humanos (Rauch et al., 2006). La progenie de estas células entéricas la constituyen los precursores neurales entéricos que son células de aspecto indiferenciado capaces de autorreplicarse y generar precursores ya comprometidos con la estirpe neuronal (neuroblastos) o bien glial (glioblastos). Esto supone un método muy efectivo para el estudio del comportamiento de dichas células precursoras bajo distintas condiciones experimentales *in vitro*.

Aunque se conocen diversos genes implicados en el desarrollo del SNE y en HSCR, en el presente trabajo se han realizado estudios de expresión en precursores entéricos con el objetivo de identificar nuevos genes candidatos para así mejorar nuestro conocimiento sobre las causas y mecanismos moleculares que producen la aparición del fenotipo HSCR.

Mediante tecnología *Taqman* y utilizando un array de expresión que contenía 96 genes descritos previamente en células madre pluripotentes de humanos (*TaqMan® Human Stem Cell Pluripotency Array*), se determinó la expresión de 24 genes en dichos precursores entéricos. De ellos, 7 genes presentaron diferencias estadísticamente significativas entre precursores procedentes de controles y pacientes HSCR. Estos genes fueron *NESTINA*, *FN1*, *LAMC1*, *PECAM*, *SEMA3A*, *PAX6* y *DNMT3B*. Se obtuvieron niveles de expresión anormalmente elevados en el grupo de pacientes para los genes *NESTINA*, *PECAM* y *SEMA3A*, los cuales son genes que están implicados en procesos de migración y proliferación celular. Mientras que se observó una bajada en los niveles de expresión de los genes *FN1* y *LAMC1* (también implicados en adhesión celular y migración), de *PAX6* (factor de transcripción esencial en procesos de neurogénesis en el SNC), y por último *DNMT3B* (una metiltransferasa *de novo* con un importante papel en los pasos iniciales de la diferenciación de células progenitoras) (Singh et al., 2009; Sundberg et al., 2011).

Cabe destacar que resultados similares habían sido descritos previamente en cuanto a la posible implicación de *SEMA3A* en HSCR y los patrones de expresión del gen *XIST*, lo que supuso la validación de los resultados obtenidos. Por una parte, se ha descrito el papel de las Semaforinas en el desarrollo del SNE, tanto en la formación de la red neuronal como en la migración de los precursores neurales, regulando la entrada de las células derivadas de la cresta neural sacra en la región distal del intestino en formación (Anderson et al., 2007). Este gen ya había sido asociado a HSCR aislado y esporádico, donde se obtuvieron niveles elevados en cuanto a su expresión en la capa muscular lisa del colon (Wang et al., 2011). Además, nuestro grupo describió por primera vez la existencia de mutaciones en la secuencia codificante de *SEMA3A* que podrían estar actuando como un factor modificador de la penetrancia de mutaciones en *RET*, confirmando el papel funcional de estas moléculas durante la formación del SNE (Luzón-Toro et al., 2013). Por otro lado, la expresión de *XIST*

(*X-inactive specific transcript*), esencial para iniciar el silenciamiento del cromosoma X, sólo se observó en muestras que procedían de pacientes y controles XX, ya que en aquellos que eran XY sólo existen niveles de expresión baja y de forma transitoria de *XIST* durante la embriogénesis en el cromosoma X de origen materno, que nunca se inactivará ya que el mecanismo de conteo detecta la presencia de un solo cromosoma X (Pontier et al., 2011).

Atendiendo a aquellos genes que se encontraron alterados en pacientes HSCR, uno de ellos es *FN1*. Este gen codifica para una glicoproteína presente, en su forma multimérica, tanto en la superficie celular como en la matriz extracelular, promoviendo procesos de migración y adhesión celular en muchos tipos celulares entre ellos las CCN. En este sentido, FN1 en presencia de la integrina  $\beta 1$ , controla y promueve la migración de los precursores neurales del SNE así como la adhesión de los progenitores indiferenciados SOX10 positivos en el intestino en desarrollo (Breau et al., 2009). La migración de las células derivadas de la cresta neural, a través del intestino en formación, se lleva a cabo en cadenas, en contacto unas con otras, lo que favorece dicha migración (Gershon et al., 2006). El estudio de la dinámica de la migración de los precursores entéricos ha revelado que existen complejos patrones de movimiento en el frente migratorio de dichas células y que estos son diferentes atendiendo a la porción intestinal en que se encuentren. Teniendo en cuenta que los precursores entéricos de los pacientes HSCR en estudio presentaban niveles de expresión de FN1 anormalmente disminuidos en comparación con los controles, podemos asumir que dicha alteración podría interferir con el proceso migratorio de los precursores neurales del SNE y suponer una causa potencial de aganglionosis.

*LAMC1* (Laminin, gamma 1) es un gen que codifica para una glicoproteína que pertenece a la familia de las Lamininas. Cada cadena de laminina es una proteína multidominio codificada por un gen distinto. La laminina-1 ( $\alpha 1\beta 1\gamma 1$ ) constituye un sustrato favorable para la adhesión de los precursores derivados de la cresta neural (Lallier et al., 1994). Además, promueve la migración de estas células fuera de la cresta neural hacia los distintos órganos diana, tanto *in vitro* como *in vivo* (Bronner-Fraser, 1986; Bilozur et al., 1988). Otra evidencia de la importancia de la laminina-1 sobre el desarrollo del SNE, es que su expresión está regulada negativamente por EDN3, ya que un exceso de laminina-1 provocada por la falta de

EDN3 podría impedir la migración de los precursores (Gershon y Ratcliffe, 2006). Finalmente se ha visto que la laminina-1, junto a otros factores, está implicada en la señalización de parada de las células durante su migración, favoreciendo la correcta localización y diferenciación de los ganglios entéricos (Gershon et al., 2006). Concretamente, la laminina-1 previene que las células derivadas de la cresta neural alcancen la mucosa intestinal cuando son atraídas por las netrinas, y permanezcan en la capa submucosa (Höpker et al., 1999). Un estudio en ratones recientemente publicado, sugiere que dichas lamininas, podrían estar promoviendo la migración de los precursores neurales del SNE (Nakazawa N et al., 2013) y por tanto, ante todas las evidencias comentadas, alteraciones en los patrones de expresión de estos genes podrían ser una causa potencial en la aparición de la enfermedad de Hirschsprung.

Aunque en plaquetas se ha descrito que existe una regulación negativa de PECAM sobre las lamininas, esta hipótesis a nivel de SNE no está esclarecida. La proteína para la que codifica este gen se encuentra en la superficie de plaquetas, monocitos, neutrófilos, y algunos tipos de células T, probablemente participando en la migración de leucocitos, en la angiogénesis y constituyendo una gran parte de las uniones intercelulares de células endoteliales participando en procesos de adhesión celular (Wang et al., 2005).

*PAX6* es un gen que codifica para una proteína muy conservada en vertebrados e invertebrados perteneciente a la familia de las denominadas "*paired-box*". Es un factor de transcripción que desempeña un papel fundamental en varios procesos del desarrollo del SNC, entre los que destacan la configuración del tubo neural, migración neuronal y establecimiento de los circuitos neurales. Además, está implicado en el desarrollo de los ojos, nariz, páncreas e hipófisis. En cada uno de estos tejidos actúa como un regulador multifuncional de la proliferación y la diferenciación, mostrando un patrón de expresión espacio-temporal altamente complejo (Osumi et al., 2008; Shaham et al., 2012). Hasta el momento, los estudios que se han llevado a cabo se centran en la función de *PAX6* en la neurogénesis del SNC y no existen evidencias acerca de su función a nivel del desarrollo del SNE. Sin embargo, los resultados obtenidos muestran que existe expresión en precursores neurales obtenidos de tejido intestinal y que, concretamente en los pacientes HSCR, ésta se encuentra significativamente disminuida. Por tanto, *PAX6* se

postula como candidato para ser, además de en SNC, regulador de la neurogénesis en SNE, aunque este hecho será discutido más adelante.

NESTINA, marcador de precursores neurales, muestra un aumento en los niveles de expresión en pacientes HSCR. Dicho aumento induce a pensar que en el caso de los pacientes, los precursores entéricos se encontrarían en un estadio de diferenciación que no les corresponde en ese momento del desarrollo, lo cual pondría en compromiso la capacidad de estas células para dar lugar a patrones de proliferación y migración correctos y obtener finalmente un número adecuado de células en su correspondiente estadio final (Bel-Vialar et al., 2007).

Por último, DNMT3B es una metiltransferasa *de novo*, que desempeña un papel importante durante las primeras etapas de la metilación del ADN y está implicado en la diferenciación de los progenitores neurales durante el desarrollo del SNE (Okano et al., 1999; Singh et al., 2009). Debido a la importante función de este gen en el establecimiento de los patrones de metilación del genoma y dado que por primera vez se describe un mecanismo epigenético con implicación en HSCR, se decidió estudiar más en profundidad cuál era el papel de esta metiltransferasa en el desarrollo del SNE y en concreto, en el contexto de la enfermedad de Hirschsprung.

### **5.2.1 Disminución de la expresión de DNMT3B en muestras de precursores neurales de SNE de pacientes HSCR versus controles**

Se obtuvieron niveles reducidos de DNMT3B en pacientes HSCR en relación con los controles, tanto en el estudio de expresión mediante PCR cuantitativa como en la inmunocitoquímica. Cuando se realizó el mismo estudio de expresión a partir de ARNm extraído de muestras de colon de los mismos pacientes y controles, no se obtuvo expresión de DNMT3B en ninguno de los dos grupos muestrales. Este resultado va en concordancia con estudios previos en los cuales se muestra que la expresión de DNMT3B es mayoritariamente durante etapas tempranas del desarrollo, y los niveles de expresión son muchos mayores en aquellas células con capacidad totipotente y pluripotente (Okano et al., 1999). Durante la neurogénesis embrionaria en ratones, Dnmt3b se expresa predominantemente en las células embrionarias tempranas y en células progenitoras neuronales, especialmente células precursoras neuronales en proliferación dentro de la corteza cerebral,

---

células de la retina, epitelio olfatorio embrionario y médula espinal (Watanabe et al., 2006). Es por ello que DNMT3B debe desempeñar un papel importante durante los estadios iniciales de la diferenciación de células progenitoras.

Además, este resultado pone de manifiesto la importancia y validez de este tipo de cultivos para establecer los fundamentos conceptuales que nos ayuden a entender mejor la estructura y funcionamiento de los circuitos neuronales entéricos y con ello la etiopatogenia de HSCR y otras neurocristopatías.

### **5.2.2 Niveles de metilación global anormalmente disminuidos en precursores entéricos de pacientes HSCR en comparación con controles.**

En modelos animales y experimentos *in vitro*, se ha demostrado que la disminución de la actividad de las DNMTs, una o combinaciones de ellas, está asociado a hipometilación del genoma e inestabilidad cromosómica (Karpf et al., 2005, Dodge et al., 2005). Teniendo en cuenta los niveles de expresión reducidos de DNMT3B en precursores entéricos de pacientes HSCR, se decidió estudiar los niveles de metilación del ADN extraído de estos precursores, obteniendo hipometilación en pacientes en comparación con los controles.

La desmetilación o la hipometilación global del genoma, potencialmente puede inducir alteraciones en la activación de factores de transcripción, activación de transposones que pueden dar lugar a la aparición de mutaciones o recombinación cromosómica anómala, así como sobreexpresión de genes críticos en la regulación del crecimiento celular (Wilson et al., 2007).

Además, DNMT3B es capaz de interactuar con una gran variedad de proteínas reguladoras a través de circuitos de retroalimentación que pueden, directa o indirectamente, producir cambios en la estructura de la cromatina. La cromatina activa se caracteriza por su estructura abierta en presencia de un ADN no metilado, mientras que un ADN metilado se asocia con una cromatina inactiva y modificación de histonas específicas que incluyen la metilación de las Lisinas H3Lys9 y H4Lys20 (Wilson et al., 2006). Por tanto, cabría esperar que unos niveles de metilación aberrantes como los obtenidos en los precursores entéricos de pacientes HSCR, se sucederían con unos patrones de expresión también anómalos que resultarían en cambios en procesos celulares tales como supervivencia y/o proliferación, migración y diferenciación, dando

lugar a una pérdida de la identidad celular de estos precursores presentando un fenotipo que no corresponde con el momento del desarrollo en el que se encuentran.

### **5.2.3 Identificación de variantes dentro de la secuencia de *DNMT3B* en la cohorte de pacientes HSCR**

Hasta el momento sólo se habían relacionado mutaciones en *DNMT3B* con el Síndrome ICF (OMIM 242860), el cual se caracteriza por hipometilación en la región pericentromérica de los cromosomas 1, 9 y 16.

En el presente trabajo se ha realizado el primer análisis mutacional de la secuencia codificante de *DNMT3B* en el contexto de HSCR, el cual reveló la presencia de tres cambios en tres pacientes diferentes, que según herramientas bioinformáticas, resultaban potencialmente patogénicos (p.Gly25Arg, p.Arg190Cys, p.Gly198Trp). Aunque estas variantes habían sido previamente descritas dentro del Proyecto 1000 genomas, los valores de MAF eran muy bajos y no se encontró ninguna de las tres variantes en el grupo de controles analizado, lo que llevó a descartarlas como posibles polimorfismos. Las tres variantes se encuentran en una región de la proteína que interactúa con DNMT1.

Los patrones de metilación del ADN que se establecen durante la gametogénesis y el desarrollo temprano son fielmente copiados a las células hijas a través de lo que se conoce como “metilación de mantenimiento”. Durante la replicación semi-conservativa del ADN estos patrones de metilación son copiados desde la hebra madre a la hija, por ello debe existir una metiltransferasa que presente una mayor afinidad por el ADN hemimetilado. Ésta es DNMT1, enzima que es capaz de metilar tanto ADN no metilado como hemimetilado, aunque presenta una marcada preferencia por este último (Okano et al., 1999). Una vez que se ha establecido una primera ola de metilación *de novo* mediada por la actividad de DNMT3A y DNMT3B, DNMT1 es reclutada al núcleo para catalizar la metilación de la otra hebra de ADN y que así se establezcan unos correctos patrones de metilación. Es por ello, que es necesario que exista cooperación e interacciones entre ambos tipos de metiltransferasas (*de novo* y mantenimiento). Una vez que DNMT1 es transportada al núcleo y colocaliza con DNMT3B, se obtienen los patrones finales de metilación *de novo* y mantenimiento (Kim et al., 2002). Por tanto, mutaciones en esta región de

interacción de la proteína, podrían obstaculizar este proceso de metilación, dando lugar a un fracaso en la regulación de la expresión génica, que durante el desarrollo del SNE sería una causa potencial para la aparición de HSCR en estos pacientes.

Vale la pena mencionar que, en dos pacientes, las mutaciones en *DNMT3B* co-segregaban con mutaciones en otros loci relacionados previamente con la enfermedad, de acuerdo con un modelo de herencia complejo y multigénico previamente propuesto para HSCR. Actualmente se acepta que la aparición del fenotipo no depende sólo de mutaciones “raras” con efecto funcional y elevada penetrancia sino, también de variaciones “comunes” y con baja penetrancia que en combinación serán responsables de la enfermedad. Asimismo, la longitud del segmento agangliónico, se sugiere que es el resultado de la contribución de una serie de eventos moleculares que afectan a procesos de proliferación, migración y / o diferenciación durante la formación del SNE: cuanto mayor es el número de variaciones en los genes clave en el desarrollo del SNE, mayor severidad presentarán. En este trabajo, se presenta un caso familiar en el cual existe un efecto sinérgico de mutaciones en *DNMT3B* y *RET* en dos pacientes. Ambos pacientes presentaban la mutación en *RET* p.Ser148del, aunque distinto fenotipo (S-HSCR y L-HSCR), mientras que la mutación en *DNMT3B* p. Gly25Arg aparece exclusivamente en el paciente con el fenotipo más severo (L-HSCR), lo cual sugiere que la variante encontrada en *DNMT3B* podría estar actuando como un elemento modificador de fenotipo. Se podría sugerir que la mutación encontrada en *RET* sería la causa principal de la aparición de la enfermedad en esta familia, aunque como la gran mayoría de mutaciones en *RET*, con penetrancia incompleta, mientras que la variante “rara” *DNMT3B* contribuiría con un efecto más sutil, siendo ambas responsables del fenotipo final.

En cuanto al segundo caso, sólo la mutación en *NTF3* era heredada de la madre no afecta, mientras que las variantes en *DNMT3B* podrían ser *de novo* en el paciente afecto o heredadas por vía paterna, hecho que no se pudo discriminar por no disponer del ADN paterno para realizar el análisis. Los resultados obtenidos, apoyan de nuevo el modelo aditivo de herencia en el que contribuyen distintos genes que actúan de forma multiplicativa modulando la penetrancia de otras mutaciones o la expresión de la enfermedad en aquellos individuos afectados.

#### 5.2.4 Estudio de DNMT3B en Pez-cebra

En relación a la implicación de DNMT3B en el desarrollo del SNE en el contexto de HSCR, se quiso estudiar el fenotipo resultante al realizar el Knockdown de DNMT3B en pez cebra. Para ello se utilizó una línea transgénica de pez cebra que tenía una expresión estable de la proteína Kaede en células precursoras de neuronas entéricas que expresan *Phox2b* durante tres generaciones, lo que facilita visualizar los precursores entéricos que van colonizando el intestino en formación. El intestino de los peces cebra se asemeja al intestino de los mamíferos, aunque siendo más simple en su estructura general, convirtiéndolo en un modelo comparativo conveniente para el estudio de trastornos asociados con el tracto gastrointestinal que afectan su motilidad y función, como es HSCR.

En cuanto a DNMT3B, el pez cebra difiere de los mamíferos en que presenta seis genes *Dnmt* en lugar de los dos que se encargan de la metilación *de novo* en mamíferos. Los genes *Dnmt6* y *Dnmt8*, se asemejan más estrechamente a la secuencia genómica de *Dnmt3a* en mamíferos, y muestran un patrón de expresión que es más similar al de *Dnmt3a*. Por el contrario, los otros cuatro genes, *Dnmt3*, *Dnmt4*, *Dnmt5*, y *Dnmt7*, muestran un patrón de expresión más similar a *Dnmt3b*, sugiriendo que los seis genes *Dnmt* en el genoma del pez cebra pueden ser análogos a los dos genes de la familia *Dnmt3* presentes en mamíferos (Smith et al., 2011). En el presente trabajo, se eligió *Dnmt4* para realizar el knockdown por su mayor porcentaje de homología con *Dnmt3b* en mamíferos.

Se ha descrito que los Mo independientemente del gen diana al que vayan dirigidos pueden inducir apoptosis dependiente de la activación de p53, además de interacciones con otros genes o efecto "off-target", que darán lugar a cambios en la expresión génica resultando en fenotipos que no son debidos a la bajada de la expresión del gen en estudio (Robu et al., 2007; Kok et al., 2015). Para disminuir el primer efecto, se co-inyectó con un Mo frente a p53, pero en el segundo caso es más difícil prever si el Mo es suficientemente específico. En ese caso se pueden utilizar controles que presentan la misma secuencia específica al Mo diseñado para el estudio con la única diferencia de que exista un desapareamiento de cinco bases. Al inyectar dicho Mo, no debería aparecer ningún tipo de fenotipo, lo cual significaría que el Mo es suficientemente específico. Sin embargo, en este trabajo se ha comprobado que a

dosis elevadas de Mo control se seguía sin obtener ningún fenotipo, mientras que cuando se incrementaba 0.5ng/nl la concentración de Mo frente a Dnmt4 se alteraba también la expresión de otros genes y el fenotipo era mucho más severo. Utilizando una concentración de 1,5ng/nl de Mo se conseguía una bajada de la expresión selectiva de Dnmt4, pero esta disminución resultó ser sólo del 55%, por lo que podría existir suficiente cantidad de proteína funcional de manera que la diferenciación de los precursores entéricos no se vería comprometida. Tras la inyección con diferentes concentraciones de Mo, se analizó el número de precursores entéricos que existían en el intestino del pez cebra, no encontrando diferencias en el número de neuronas entéricas, en la línea transgénica utilizada ni en la inmunohistoquímica realizada. A partir de esta concentración, se producía la alteración de la expresión de Dnmt3 y Dnmt7, por lo que la unión del Mo parece no ser selectiva, y a pesar de que no existe una secuencia con elevado porcentaje de homología en los otros genes Dnmt y la microinyección con el control del Mo, como se detalló anteriormente, daba lugar a peces con un fenotipo normal. El bajo porcentaje de bajada de expresión selectiva de Dnmt4 con una concentración de Mo de 1.5ng/nl y su poca especificidad puede deberse a diferentes razones. Al tratarse de un Mo diseñado para bloquear un sitio de splicing, cabría esperar que se produjera la eliminación del exón flanqueante al sitio activo, desencadenando un desplazamiento del marco de lectura que produzca un codón de stop prematuro, dando lugar a un ARNm que se degradaría por la ruta *NM Decay*. Como se muestra en el gel existe un problema en el splicing tras la inyección con el Mo, apareciendo una banda normal y otra más pequeña que corresponde a la secuencia carente del exón 3. Sin embargo, estos Mo en muchas ocasiones producen modificaciones en el splicing que no son las esperadas y la bajada de expresión resulta ser menos eficiente. Esto puede ocurrir cuando el Mo en lugar de unirse a la región de splicing para eliminar el exón y ambos intrones flanqueantes como cabría esperar, se une de tal manera que sólo se llega a eliminar el intrón al que se ha unido, lo que se denomina "*splice stopped*". En este caso si hubiera un codón de parada en el marco de la secuencia intrónica, esto probablemente provocaría que el ARNm se degradará por la vía *NM decay* después de una ronda de traducción, en otro caso podría escapar a esta regulación. Otra posibilidad es que el Mo se una a un sitio de splicing "*críptico*" (*cryptic splice site*) lo cual daría lugar a deleciones o inserciones parciales (Draper et al.,

2001). Además, debido a que la actividad de estos oligos se basa en un mecanismo de bloqueo estérico, no se deben diseñar frente a secuencias que por ejemplo, afecten al posterior mecanismo de traducción, o bloqueen sitios de unión de proteínas reguladoras (Draper et al., 2001). El genoma del pez-cebra ha sido secuenciado y bien anotado, sin embargo, existen numerosos mecanismos regulatorios que se encuentran aún en estudio, por lo que resulta difícil evitar bloquear regiones reguladoras si no contamos aún con esa información.

Por lo tanto, aunque el uso de Mos proporciona, en principio, un método sencillo y accesible para producir el knockdown de genes en el pez cebra, en el caso de *Dnmt4* no ha resultado ser así, y se deberían utilizar otras aproximaciones para llegar a producir la disminución de la expresión de *Dnmt4* de una forma eficiente y comprobar si la bajada de expresión resulta en aganglionosis en estos animales. Recientemente se están incorporando enfoques genéticos en el pez cebra que solucionan estos problemas produciendo un bloqueo selectivo y definitivo del gen en estudio. Técnicas basadas en nucleasas de dedos de Zinc (*zinc finger nucleases, ZFNs*) o *TALENs* (*Transcription activator-like effector nucleases*) basada en la utilización de un activador de la transcripción similar a nucleasa efectora (Gaj et al., 2013). En ambos casos, los ARNm que codifican para los heterodímeros *ZFN* o *TALEN* se inyectan en los embriones en fase unicelular, donde se unen a su diana induciendo una rotura de la doble hebra. La reparación incorrecta de esta rotura conlleva la introducción de pequeñas deleciones o inserciones que pueden dar lugar a codones de parada prematuro cuando estos cambios se producen en la secuencia codificante. Más recientemente, las nucleasas bacterianas progamables Cas9 (CRISPR/Cas) se han aplicado con éxito para introducir lesiones en el genoma del pez cebra con un elevado rendimiento (Hwang et al., 2013).

Dado que se obtuvieron diferentes defectos a nivel intestinal en un alto porcentaje de los embriones microinyectados con el Mo frente a *Dnmt4*, aunque no se observó una disminución en el número de precursores entéricos que expresaban *Phox2b*, sería de interés producir una disminución específica de *Dnmt4* con alguna de las técnicas anteriormente mencionadas, para así obtener un fenotipo claro debido a la bajada de expresión de este gen y comprobar su implicación real a nivel del desarrollo del SNE.

### 5.3. Identificación de factores de transcripción con diferencias en los niveles de expresión entre precursores neurales de SNE de pacientes HSCR versus controles.

La diferenciación de las CCN durante la migración es uno de los procesos clave necesarios para alcanzar un circuito dinámico y complejo de neuronas y glía durante el desarrollo del SNE. Este complejo proceso está finamente regulado por un gran número de factores de transcripción y señalización y alteraciones en los mismos pueden ser una causa potencial de aganglionosis. Por ello, se decidió estudiar los patrones de expresión de diferentes factores de transcripción en pacientes HSCR versus controles, en busca de nuevos genes implicados en la patogénesis de la enfermedad.

Para dicho estudio se utilizó una placa TLDA que contenía 47 factores de transcripción descritos previamente en células embrionarias humanas (*TaqMan® Human Transcriptional Regulatory Network in Embryonic Stem Cell Array Plate*). Dicho estudio mostró la expresión de 14 factores de transcripción en los precursores entéricos extraídos a partir de intestino de humanos, de los cuales cuatro tenían una expresión diferencial estadísticamente significativa entre pacientes y controles. Estos genes fueron *CDYL*, *MEIS1*, *STAT3* y *PAX6*. Los tres primeros presentaban niveles de expresión anormalmente elevados en pacientes HSCR, mientras que *PAX6* presentaba niveles de expresión anormalmente disminuidos, hallazgo que confirmaba el resultado obtenido en la placa TLDA utilizada en el experimento anterior.

*CDYL* es un co-represor transcripcional que reconoce las lisina di- y trimetilada de la histona H3K27, y contribuye maximizando la actividad enzimática del complejo Polycomb dando lugar un estado represivo de la cromatina y por tanto una inhibición de la expresión génica (Zhang et al 2011). Junto a las histonas desacetilasas *Hdac1* y *Hdac2*, forma parte de un complejo transcripcional capaz de producir la represión transcripcional de la E-caderina (Shi et al., 2003). La caderinas son proteínas multifuncionales de señalización y adhesión. Controlan la motilidad de las CCN durante su delaminación y migración, funciones que están reguladas por su escisión proteolítica específica durante el desarrollo. Un proceso de migración preciso de las CCN requiere un control estricto de la dinámica del citoesqueleto y la adhesión y motilidad celular. Además, un estudio reciente en ratones sugiere que durante el

desarrollo neural *Cdyl* podría estar inhibiendo la diferenciación neuronal de las células madre pluripotentes inducidas (iPS) (Wan et al., 2013). Sin embargo, aunque está implicado principalmente en la remodelación de la cromatina y su efecto como represor de la expresión génica, su función no está del todo esclarecida. A nivel de CCN y desarrollo del SNE no tenemos datos suficientes para determinar cuál podría ser su función y si los niveles de expresión aberrantes que observamos son consecuencia de genes efectores aguas arriba o realmente tiene un efecto directo en los precursores entéricos interfiriendo con unos correctos patrones de diferenciación, proliferación y/o migración.

*MEIS1* presentaba unos niveles de expresión anormalmente elevados en precursores entéricos de pacientes HSCR. Se trata de un gen muy conservado entre vertebrados, que codifica para una proteína de la familia *Homeobox* con un homeodominio *TALE*. Los miembros de esta familia proteica se encargan de la regulación de la diferenciación celular durante el desarrollo embrionario temprano. Se expresa mayoritariamente en el ojo en desarrollo, mesencéfalo, y regiones del romboencéfalo. En células madre neurales de ratón, *Meis1* promueve la diferenciación neuronal. La expresión ectópica de *Meis1* induce la formación de grandes neuroesfera que expresan marcadores de progenitores neuronales y generan neuronas  $\beta$ -III tubulina positivas y astrocitos GFAP / S100 $\beta$  positivos. Los niveles de expresión a nivel tanto de ARNm como proteína de *Sox2* y *Pax6* son inducidos de forma dosis dependiente por la expresión transitoria de *Meis1*, sugiriendo que ambos están involucrados en la generación de neuroesferas formadas por células madre neurales y células neurales progenitoras dentro de la vía de señalización de *Meis1* (Yamada et al, 2013). En relación a todo lo descrito podríamos plantear que los precursores entéricos cuya expresión de *MEIS1* esta elevada estarían viendo afectada su capacidad de diferenciación a los distintos fenotipos maduros presente en el SNE.

*STAT3* fue otro gen cuya expresión se encontró anormalmente elevada en pacientes HSCR. Este gen codifica una proteína que es un miembro de la familia de proteínas STAT que forman parte de la ruta de señalización *JAK/STAT*. La activación del complejo por fosforilación en respuesta a citocinas y factores de crecimiento, produce la translocación al núcleo dirigiéndose directamente a los promotores de genes en el núcleo, proporcionando un mecanismo de regulación transcripcional sin necesidad de

---

segundos mensajeros cuya activación estimula procesos de proliferación, diferenciación y migración celular además de apoptosis (Aaronson DS. Et al., 2002).

Como se comentó en la introducción, para la activación de RET es necesaria la formación de un complejo multimérico, en el cual participa uno de los ligandos solubles de la familia GDNF (GDNF, NRTN, ARTN y PSPN) y un co-receptor anclado a la membrana (GFR $\alpha$ ). Recientemente se ha demostrado que NRTN es capaz de inducir la fosforilación de la Ser 727 de STAT3 en neuronas corticales primarias y líneas de células neuronales. La fosforilación de STAT3 es mediada específicamente por GFR $\alpha$ 2c y la isoforma RET9, lo que pone de manifiesto el papel de STAT3 como mediador aguas abajo de la función de NRTN (Zhou et al., 2013) promoviendo el crecimiento de las neuritas y la diferenciación neuronal.

PAX6 cuya expresión estaba anormalmente disminuida en los precursores entéricos. Corresponde a un factor de transcripción altamente conservado en vertebrados e invertebrados perteneciente a la familia de los denominados "*paired-box*". La proteína contiene dos dominios de unión al ADN: el dominio bipartito emparejado (paired domain, PD) y el homeodominio tipo emparejado (homeodomain, HD), los cuales pueden unirse al ADN de forma independiente o cooperativa (Zhang et al. 2010; Georgala et al. 2011) y están separados por una región rica en glicina. El extremo C-terminal se encuentra enriquecido en residuos de prolina, serina y treonina (PTS) susceptibles de ser fosforilados. Éste último actúa como domino de transactivación (Xu et al. 1999; Shaham et al. 2012). Su actividad principal es regular la proliferación y diferenciación celular, modulando de forma directa la expresión de diferentes moléculas efectoras.

Dentro del desarrollo del SNC desempeña un papel fundamental en diferentes procesos, entre los cuales destacan la configuración del tubo neural, migración neuronal y establecimiento de los circuitos neuronales Pax6 es esencial en la generación de nuevas neuronas a partir de células madre y progenitores neurales durante los estadios iniciales del desarrollo del SNC, así como en los nichos neurogénicos en estadios más tardíos (Osumi et al., 2008), siendo capaz de promover la diferenciación neuronal de una forma dependiente de contexto (Kamachi et al., 2001; Scardigli et al., 2003). Además, está implicado en el desarrollo de los ojos, páncreas e hipófisis, actuando como un regulador multifuncional de la proliferación y

la diferenciación, mostrando un patrón de expresión espaciotemporal muy complejo, así como una gran variabilidad en los niveles en que se expresa (Osumi et al., 2008; Shaham et al., 2012). Esta capacidad que le permite desempeñar diversas funciones según el tejido donde se esté expresando, es posible gracias a la existencia de varios dominios funcionales que median la unión al ADN y las interacciones proteína-proteína, así como, interactuar con otros factores de transcripción y, de forma sinérgica, regular la expresión de los genes diana (Chauhan et al., 2002; Wolf et al., 2009).

Sin embargo, no hay evidencia sobre el papel de PAX6 en el desarrollo del SNE. Nuestros resultados muestran que PAX6 se expresa en precursores entéricos y específicamente en pacientes su expresión estaba muy disminuida, lo que nos llevó a intentar dilucidar cuál es la función de PAX6 en el desarrollo del SNE en el contexto de la enfermedad HSCR, y cuáles podrían ser las causas de la bajada en los niveles de expresión observada en los pacientes.

### **5.3.1 El balance en la expresión de las dos isoformas mayoritarias de PAX6 no parece ser necesario a nivel de precursor entérico**

La isoforma de PAX6 más abundante es la conocida como "canónica", existiendo una forma alternativa de PAX6 que se obtiene por el splicing alternativo del exón 5a (PAX6(5a)), dando lugar a una inserción de 14 aminoácidos en el dominio PD. Este dominio está compuesto, a su vez, por dos subdominios: en el extremo N-terminal (PAI) y en el extremo C-terminal (RED), los cuales se pliegan formando 3  $\alpha$ -hélices, 2 de ellas darán lugar a un motivo hélice-giro-hélice (HTH) (Epstein et al., 1994; Singh et al., 2000). Los 14 aminoácidos adicionales en la isoforma 5a, se insertan en la primera  $\alpha$ -hélice del motivo HTH del subdominio PAI, por lo que interfieren con la capacidad de unión al ADN del subdominio PAI, mientras que se favorece la unión a través del subdominio RED. En mamíferos, el ratio entre la isoforma canónica y la 5a depende del tejido, lo cual es un indicativo del desempeño de diferentes funciones en dichos tejidos (Pinson et al., 2005). Ambas isoformas se expresan en telencéfalo, diencéfalo y rombencéfalo, sin embargo, durante la neurogénesis temprana los niveles de expresión de la isoforma canónica son entre 6 y 10 veces mayores que los de la isoforma 5a. Los mecanismos reguladores de la expresión de estas dos isoformas

durante el desarrollo del SNC se desconocen. No obstante, se ha podido demostrar que dichos niveles de expresión están sometidos a una autorregulación tanto positiva como negativa *in vivo* (Georgala et al., 2011; Saham et al., 2012). El dominio PD que difiere en ambas isoformas es fundamental para un adecuado desarrollo cerebral, formando parte en la regulación de la neurogénesis, proliferación celular y segmentación (Singh et al., 2000; Garvie et al., 2001; Watkins et al., 2004). La sobreexpresión de la isoforma canónica afecta a los procesos de proliferación y diferenciación neuronal, mientras que la sobreexpresión de la isoforma 5a afectará únicamente a la proliferación (Osumi et al., 2001; Sansom et al., 2009).

Durante el desarrollo del SNE no existen datos previos sobre el ratio de expresión que existe entre ambas isoformas. Del estudio realizado para medir sus niveles de expresión en los precursores entéricos de pacientes HSCR versus controles, se obtuvo de nuevo la bajada de expresión obtenida previamente en sendos estudios utilizando TLDA. Sin embargo, no existían diferencias estadísticamente significativas en cuanto al ratio de expresión entre ambas isoformas. Se podría hipotetizar que dichos precursores entéricos se encuentran en un momento transitorio recibiendo diferentes señales del medio extracelular y no parece ser esencial la ratio PAX6/PAX5a para la decisión del precursor entérico (proliferación / diferenciación).

### **5.3.2 Diferente distribución alélica y genotípica del SRT (AC)<sub>m</sub>(AG)<sub>n</sub> localizado en el promotor P1 de PAX6, en pacientes HSCR versus controles.**

Con el objetivo de explorar los mecanismos subyacentes a la bajada de expresión de PAX6 observada en los precursores entéricos de pacientes HSCR, se realizó el estudio molecular completo del gen. En primer lugar, se realizó el rastreo mutacional de la secuencia codificante completa en la cohorte de pacientes, pero no se identificó ninguna mutación potencialmente patógena. Por otra parte, se analizó la distribución alélica y genotípica del elemento repetitivo (AC)<sub>m</sub>(AG)<sub>n</sub> localizado en el promotor P1 de PAX6. Se trata de una secuencia altamente polimórfica, que se manifiesta con diferencias en la longitud de los distintos alelos que surgen de la existencia de un número diferente de repeticiones dentro del motivo básico. Dentro de este motivo es polimórfico tanto el número de repeticiones AC como el número de repeticiones AG, aunque en este caso se estudió en bloque. Se ha demostrado que la

diferente longitud de este motivo repetitivo influye en la eficiencia transcripcional del promotor P1 y modula de forma diferencial la expresión de *PAX6* en corteza cerebelosa humana (Okladnova et al., 1998). Existen numerosos ejemplos de enfermedades humanas que son causadas por variaciones no codificantes en las regiones reguladoras de los genes respectivos, cuyo mecanismo consiste en la interrupción de una adecuada regulación de la expresión génica. Así, en la Ataxia de Friedreich (FRDA), la expansión de la repetición GAA en el primer intrón del gen FRDA resulta en niveles disminuidos de la proteína frataxina por inhibición de la elongación durante el proceso de transcripción, cuya deficiencia conduce a la aparición de lesiones progresivas en sistema nervioso central y periférico. Otro ejemplo es el Síndrome de X frágil, causado por el silenciamiento transcripcional del gen *FMR1* debido a una expansión progresiva del trinucleótido CGG en la región 5' no traducida del gen y la subsecuente hipermetilación de la Isla CpG, que tiene como consecuencia la ausencia del producto proteico.

Los resultados obtenidos tras el análisis de este polimorfismo, mostraron diferencias estadísticamente significativas entre pacientes y controles tanto en la distribución alélica como genotípica, observando una sobre-representación de aquellos alelos con más de 26 repeticiones en el grupo de pacientes HSCR. Se realizó el análisis *in silico* de la secuencia y se comprobó que al introducir alelos con un número igual o mayor a 29 repeticiones, se perdía la unión de la proteína EP300 la cual tiene su secuencia diana directamente en la región flanqueante a la secuencia (AC)<sub>m</sub>(AG)<sub>n</sub>, muy conservada entre especies. Este hallazgo se confirmó *in vitro* mediante inmunoprecipitación de cromatina a partir de ADN extraído de cultivos de precursores entéricos de paciente HSCR y control, y posteriormente amplificando un fragmento que incluía tanto la región polimórfica como la región conservada de unión a p300. El paciente que presentaba un número de 28 repeticiones mostró una intensidad de banda mucho menor, lo que sugiere una menor eficiencia de unión de la proteína p300 al promotor de *PAX6*.

La proteína p300 es un co-activador que posee actividad acetiltransferasa de histonas y además es capaz de reclutar a otras histona-acetiltransferasas. La acetilación de histonas es una marca epigenética que promueve la relajación local de la estructura de la cromatina liberando la represión transcripcional y facilitando la

actividad de la maquinaria de transcripción basal (Lee et al., 2001). Como ya se comentó, PAX6 es un factor esencial para el desarrollo de diferentes tejidos, incluyendo ojos, sistema nervioso central y páncreas. Además, está implicado en una serie de procesos biológicos fundamentales que incluyen la proliferación celular, la migración, la adhesión y señalización celular. Es por ello que los mecanismos por los que PAX6 regula sus dianas y a su vez su expresión es regulada, dependerá de interacciones con múltiples proteínas. Atendiendo a esos otros tejidos donde PAX6 también se expresa, la interacción de la proteína p300 con PAX6 ya había sido descrita, tanto en el desarrollo del ojo como del páncreas, y como se esperaba esta interacción regula positivamente la expresión de PAX6 (Kim et al., 2006, Cvekl et al. 2004). Por tanto, se podría sugerir que el aumento de repeticiones dentro de dicha región origina una pérdida de la unión de p300 y una regulación negativa a nivel de la transcripción de PAX6 también en precursores durante el desarrollo del SNE. Dado el papel otorgado a PAX6 durante la neurogénesis, cabe pensar que, problemas en la regulación de la neurogénesis del SNE podrían dar lugar a una diferenciación aberrante de estos precursores entéricos traducándose en un incorrecto desarrollo del SNE y posible aparición de HSCR. Este número de repeticiones elevado también se encontró en un 57,05% de los individuos control que eran heterocigotos para alelos con un número mayor de 26 repeticiones, frente al 73,47% de pacientes HSCR. Es por ello que deben existir eventos moleculares adicionales que contribuyan a la bajada de expresión tan acusada que se obtuvo en precursores entéricos de pacientes HSCR con respecto a controles.

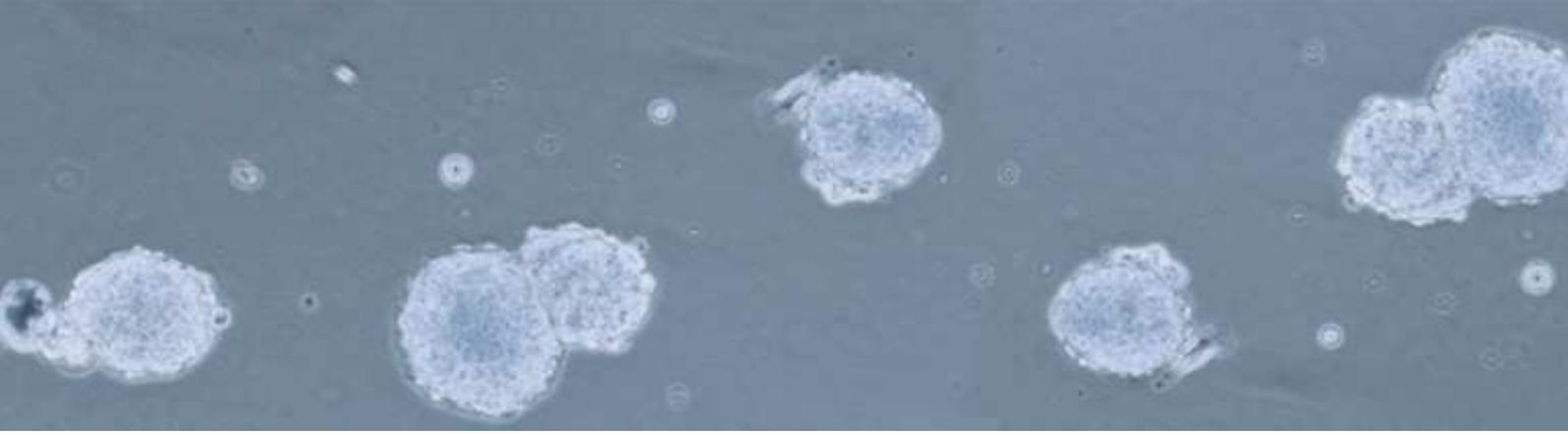
### **5.3.3 PAX6 es una diana de la metiltransferasa DNMT3B.**

Como ya se ha mencionado, cambios en los patrones de metilación y, acetilación/desacetilación y fosforilación de las histonas, ocurren en combinaciones específicas que crearán patrones diferenciales de expresión génica. Dado que los precursores entéricos de pacientes HSCR presentaron unos niveles de expresión anormalmente disminuidos para la metiltransferasa *de novo* DNMT3B, se decidió estudiar si PAX6 era diana de DNMT3B y podría ser la metilación otro de los mecanismos implicados en la regulación de la expresión de este gen. Con este

objetivo se realizó un ensayo de inmunoprecipitación de cromatina a partir de ADN extraído de cultivos de precursores entéricos de ratón. De este ensayo se obtuvo que *Pax6* es una diana específica de Dnmt3b y concretamente las regiones reconocidas por la proteína eran secuencias que presentaban un alto porcentaje de homología con la secuencia nucleotídica en humanos y habían sido anotadas como Islas CpG dentro del promotor de *PAX6* humano. Debido a las limitaciones de muestra de humano, este ensayo se realizó en NLBs procedentes de intestino de ratón, es por ello que a continuación se decidió estudiar el estado de metilación de los fragmentos reconocidos por la proteína que correspondían a islas CpG presentes en el promotor de *PAX6* utilizando ADN, transformado con sales de bisulfito sódico, obtenido a partir de cultivo de precursores entéricos de pacientes HSCR y controles. El análisis de los perfiles de metilación de forma semicuantitativa de ambos fragmentos, resultó en perfiles de metilación diferentes en pacientes con respecto a los controles para el primer fragmento, existiendo un incremento de la metilación en el caso de los pacientes, mientras que para el segundo fragmento no se obtuvieron diferencias. Resultado que se confirmó de forma cuantitativa mediante pirosecuenciación.

La ausencia de metilación dentro de las denominadas islas CpG, se ha asociado a promotores génicos activos, estado que presentan la mayoría de células madre embrionarias, la cuales conforme van aumentando su grado de diferenciación y compromiso con el linaje celular específico, adquirirán unos niveles de metilación mayores. Los procesos epigenéticos, entre los que se encuentra la metilación, van a ir modelando el fenotipo celular confiriendo una identidad propia a cada uno de los tipos celulares presentes en el organismo, activando o desactivando la expresión selectiva de genes.

Por ello, unos patrones de metilación aberrantes del promotor de *PAX6* tendrán repercusión sobre la expresión de dicho gen y a su vez, sobre la expresión de los genes regulados directamente por el mismo, teniendo una posible repercusión sobre los procesos de diferenciación y proliferación de los precursores entéricos. Por tanto, este estudio supone un importante comienzo hacia el estudio de los patrones de metilación de los genes diana de la proteína DNMT3B y la importancia que puede tener este mecanismo en el desarrollo de HSCR, así como el hallazgo de la implicación de estos dos nuevos genes, en el desarrollo del SNE en el contexto de HSCR.



## **6. CONCLUSIONES**



- Los estudios de expresión génica realizados en precursores neurales aislados del SNE de pacientes HSCR y controles, constituyen una aproximación fiable, y altamente reproducible para la caracterización de dichos precursores y la identificación de nuevos genes implicados en el desarrollo del SNE en el contexto de la Enfermedad de Hirschsprung.

-A partir de los resultados obtenidos en el estudio de expresión diferencial en los citados precursores entéricos, se han identificado 10 genes (*DNMT3B*, *FN1*, *LAMC1*, *PAX6*, *NESTINA*, *PECAM*, *SEMA3A*, *CDYL*, *MEIS1* y *STAT3*) con un posible papel en la etiopatogenia de HSCR.

-La metiltransferasa *DNMT3B* mostró una bajada significativa en los niveles de expresión en precursores entéricos de pacientes HSCR en comparación con los controles, así como mutaciones potencialmente patogénicas dentro de su secuencia codificante. Estas evidencias, nos permiten proponer a *DNMT3B* como nuevo gen implicado en la aparición del fenotipo HSCR.

-La bajada de expresión de *DNMT3B* se tradujo en una hipometilación global en los precursores entéricos de pacientes HSCR en comparación con los precursores procedentes de los controles, evento que potencialmente puede inducir la aparición de patrones de expresión aberrantes, poniendo de manifiesto por primera vez la implicación de un mecanismo epigenético en relación con el desarrollo de la Enfermedad de Hirschsprung.

- La disminución de los niveles de expresión del factor de transcripción *PAX6* en precursores entéricos de pacientes HSCR en comparación con controles, nos permite proponer a *PAX6* como nuevo gen implicado en el desarrollo del SNE con un posible papel en la etiopatogenia de HSCR.

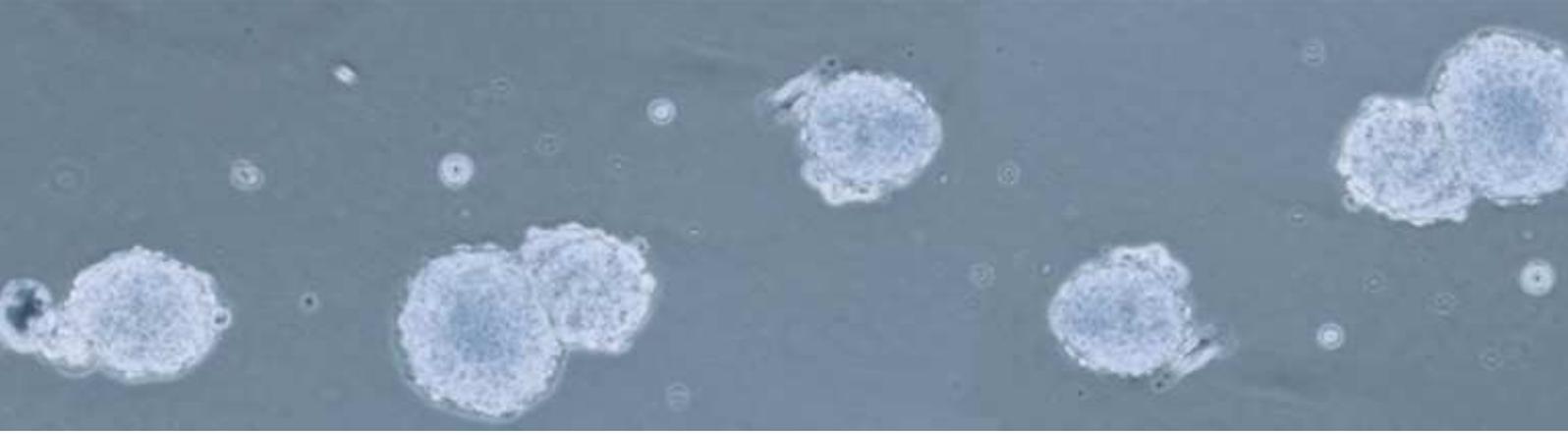
-El análisis de la distribución alélica y genotípica del elemento repetitivo (AC)<sub>m</sub>(AG)<sub>n</sub> localizado en el promotor P1 de *PAX6* mostró diferencias estadísticamente significativas entre pacientes HSCR y controles. La diferente longitud de este motivo

repetitivo influye en la eficiencia transcripcional del promotor y modula de forma diferencial la expresión de *PAX6*, por tanto, se presenta como uno de los mecanismos responsables de la disminución de los niveles de expresión observado en pacientes HSCR.

-La expansión del dinucleótido (AC)<sub>m</sub>(AG)<sub>n</sub> dentro del promotor de *PAX6* en pacientes HSCR da lugar a una menor eficiencia de unión de la proteína p300 a dicho promotor. Evento que se postula como posible mecanismo regulador de la expresión de *PAX6*, poniendo de manifiesto la implicación de p300 en el desarrollo del SNE y por tanto en la aparición de dicha patología.

-Se ha podido confirmar la implicación de la metilación en la etiopatogenia de HSCR y se ha identificado el gen *PAX6* como diana directa de la actividad de DNMT3B, el cual presenta unos patrones de metilación aberrantes en dos regiones dentro del promotor, evento que se propone como responsable de la disminución en los niveles de expresión transcripcional de dicho gen.

-En el presente trabajo se presentan dos nuevos mecanismos reguladores de la expresión génica, procesos de metilación y regiones altamente repetitivas o microsatélite, como procesos implicados en el desarrollo del SNE, fallos en los cuales podrían tener una clara consecuencia en la aparición de HSCR.



## **7. BIBLIOGRAFÍA**



- Aaronson DS, Horvath CM. A road map for those who don't know JAK-STAT. *Science*. 296(5573):1653-5, 2002.
- Airaksinen MS, Saarma M. The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. *Nat Rev Neurosci* 3(5):383-94, 2002
- Almond S, Lindley RM, Kenny SE, Connell MG, Edgar DH. Characterisation and transplantation of enteric nervous system progenitor cells. *Gut* 56: 489–496, 2007.
- 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*. 382(1):320-9, 2013.
- Amiel J, Attie T, Jan D, Pelet A, Edery P, Bidaud C, et al. Heterozygous endothelin receptor B (EDNRB) mutations in isolated Hirschsprung disease. *Hum Mol Genet* 5: 355-357, 1996.
- Amiel J, Lyonnet S. Hirschsprung disease, associated syndromes, and genetics: a review. *J Med Genet* 38: 729-739, 2001.
- Amiel J, Laudier B, Attie-Bitach T, Trang H, de Pontual L, Gener B, et al. Polyalanine expansion and frameshift mutations of the paired-like homeobox gene PHOX2B in congenital central hypoventilation syndrome. *Nat Genet* 33: 459- 461, 2003.
- Amiel J, Sproat-Emison E, Garcia-Barcelo M, Lantieri F, Burzynski G, Borrego S, et al. Hirschsprung disease, associated syndromes and genetics: a review. *J Med Genet* 45: 1-14, 2008.
- 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. *Developmental Biology* 305: 287-299, 2007.
- Angrist M, Bolk S, Thiel B, Puffenberger EG, Hofstra RM, Buys CH, et al. Mutation analysis of the RET receptor tyrosine kinase in Hirschsprung disease. *Hum Mol Genet* 4: 821-830, 1995.

- Angrist M, Bolk S, Halushka M, Lapchak PA, Chakravarti A. Germline mutations in glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) and RET in a Hirschsprung disease patient. *Nat Genet* 14: 341-344, 1996.
- Aoki Y, Saint-Germain N, Gyda M, Magner-Fink E, Lee YH, Credidio C, et al. Sox10 regulates the development of neural crest-derived melanocytes in *Xenopus*. *Dev Biol* 259: 19-33, 2003.
- 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* 30: 771-775, 2009.
- Attie T, Pelet A, Edery P, Eng C, Mulligan LM, Amiel J, et al. Diversity of RET protooncogene mutations in familial and sporadic Hirschsprung disease. *Hum Mol Genet* 4: 1381-1386, 1995.
- Auricchio A, Casari G, Staiano A, Ballabio A. Endothelin-B receptor mutations in patients with isolated Hirschsprung disease from a non-inbred population. *Hum Mol Genet* 5: 351-354, 1996.
- Avantiaggiato V, Dathan NA, Grieco M, Fabien N, Lazzaro D, Fusco A, et al. Developmental expression of the RET protooncogene. *Cell Growth Differ* 5: 305-311, 1994.
- Baloh RH, Tansey MG, Lampe PA, Fahrner TJ, Enomoto H, Simburger KS, et al. Artemin, a novel member of the GDNF ligand family, supports peripheral and central neurons and signals through the GFRalpha3-RET receptor complex. *Neuron* 21: 1291-1302, 1998.
- Baloh RH, Enomoto H, Johnson EM Jr, Milbrandt J. The GDNF family ligands and receptors - implications for neural development. *Curr Opin Neurobiol* 10: 103-110, 2000
- 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* 40: 905-916, 2003.
- Basel-Vanagaite L, Straussberg R, Friez MJ, Inbar D, Korenreich L, Shohat M, et al. Expanding the phenotypic spectrum of L1CAM-associated disease. *Clin Genet*. 69(5):414-9, 2006.

- 
- 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* 79: 1277- 1285, 1994.
  - Bel-Vialar S, François Medevielle, Fabienne Pituello. The on/off of Pax6 controls the tempo of neuronal differentiation in the developing spinal cord. *Developmental Biology* 305 659–673, 2007.
  - Bergner AJ, Stamp LA, Gonsalvez DG, Allison MB, Olson DP, Myers MG Jr, et al. Birthdating of myenteric neuron subtypes in the small intestine of the mouse. *J Comp Neurol*. 522(3):514-27, 2014.
  - Bidaud C, Salomon R, Van Camp G, Pelet A, Attie T, Eng C, et al. Endothelin-3 gene mutations in isolated and syndromic Hirschsprung disease. *Eur J Hum Genet* 5: 247-251, 1997.
  - Bilozur ME, Hay ED. Neural crest migration in 3D extracellular matrix utilizes laminin, fibronectin, or collagen. *Dev Biol* 125: 19-33, 1988.
  - Binder BJ, Landman KA, Simpson MJ, Mariani M, Newgreen DF. Modeling proliferative tissue growth: a general approach and an avian case study. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* 78: 031912, 2008.
  - Bolk S, Angrist M, Xie J, Yanagisawa M, Silvestri JM, Weese-Mayer DE, et al. Endothelin-3 frameshift mutation in congenital central hypoventilation syndrome. *Nat Genet* 13: 395-396, 1996.
  - Bondurand N, Kobetz A, Pingault V, Lemort N, Encha-Razavi F, Couly G, et al. Expression of the SOX10 gene during human development. *FEBS Lett* 432: 168-172, 1998.
  - Bondurand N, Natarajan D, Thapar N, Atkins, C, Pachnis V. Neuron and glia generating progenitors of the mammalian enteric nervous system isolated from foetal and postnatal gut cultures. *Development* 130: 6387–6400, 2003
  - 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* 81: 1169-1185, 2007.
  - Bondurand N, Sham MH. The role of SOX10 during enteric nervous system development. *Dev Biol*. 382(1):330-43, 2013.

- Borghini S, Bocciardi R, Bonardi G, Matera I, Santamaria G, Ravazzolo R, et al. Hirschsprung associated GDNF mutations do not prevent RET activation. *Eur J Hum Genet* 10: 183-187, 2002.
- 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* 36: 771-774, 1999.
- 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* 37: 572-578, 2000.
- 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* 72: 88- 100, 2003a.
- 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* 40: e18, 2003b.
- Borrego S, Ruiz-Ferrer M, Fernández RM, Antiñolo G. Hirschsprung's disease as a model of complex genetic etiology. *Histol Histopathol.* 28(9):1117-36, 2013.
- Bowles J, Schepers G, Koopman P. Phylogeny of the SOX family of developmental transcription factors based on sequence and structural indicators. *Dev Biol* 227: 239–255, 2000.
- Brand M, Le Moullec JM, Corvol P, Gasc JM. Ontogeny of endothelins-1 and -3, their receptors, and endothelin converting enzyme-1 in the early human embryo. *J Clin Invest* 101: 549–559, 1998.
- Breau MA, Dahmani A, Broders-Bondon F, Thiery JP, Dufour S. Beta1 integrins are required for the invasion of the caecum and proximal hindgut by enteric neural crest cells. *Development.* 136(16):2791-801, 2009.
- Bronner-Fraser M. An antibody to a receptor for fibronectin and laminin perturbs cranial neural crest development in vivo. *Dev Biol* 117: 528-536, 1986.

- 
- 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.* 77(1):120-6, 2005.
  - Buchon N, Broderick NA, Chakrabarti S, Lemaitre B. Invasive and indigenous microbiota impact intestinal stem cell activity through multiple pathways in *Drosophila*. *Genes Dev.* 23(19):2333-44, 2009.
  - Burns AJ, Thapar N. Neural stem cell therapies for enteric nervous system disorders. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 11(5):317-28, 2014.
  - Burzynski G, Shepherd IT, Enomoto H. Genetic model system studies of the development of the enteric nervous system, gut motility and Hirschsprung's disease. *Neurogastroenterol Motil* 21: 113–127, 2009
  - Cedar H, Bergman Y. Epigenetic silencing during early lineage commitment. *StemBook*. Cambridge (MA): Harvard Stem Cell Institute, 2008.
  - Chakravarti A. Endothelin receptor-mediated signaling in Hirschsprung disease. *Hum Mol Genet* 5: 303-307, 1996.
  - Chakravarti A, Lyonnet S. Hirschsprung disease. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited disease*. Capítulo 251. Eds McGraw-Hill Companies, 2002.
  - Chaoui A, Watanabe Y, Touraine R, Baral V, Goossens M, Pingault V, Bondurand N. Identification and functional analysis of SOX10 missense mutations in different subtypes of Waardenburg syndrome. *Hum Mutat.* 32(12):1436-49, 2011.
  - Chauhan BK, Reed NA, Zhang W, Duncan MK, Kilimann MW, Cvekl A. Identification of genes downstream of Pax6 in the mouse lens using cDNA microarrays. *J Biol Chem.* 277(13):11539-48, 2002.
  - Chen T, Dent SY. Chromatin modifiers and remodellers: regulators of cellular differentiation. *Nat Rev Genet.* 15(2):93-106, 2014.
  - Cheng X, Blumenthal RM. Mammalian DNA methyltransferases: a structural perspective. *Structure* 16, 341–350, 2008.
  - Cheng Y, Cheung M, Abu-Elmagd MM, Orme A, Scotting PJ. Chick *sox10*, a transcription factor expressed in both early neural crest cells and central nervous system. *Brain Res Dev Brain Res.* 121(2):233-41, 2000.

- Coelho-Aguiar J de M, Bon-Frauches AC, Gomes AL, Veríssimo CP, Aguiar DP, Matias D, Thomasi BB, et al. The enteric glia: identity and functions. *Glia*. 63(6):921-35, 2015.
- Cramer H, Schmenger K, Heinrich K, Horstmeyer A, Böning H, Breit A, et al. Coupling of endothelin receptors to the ERK/MAP kinase pathway. Roles of palmitoylation and G(alpha)q. *Eur J Biochem*. 268(20):5449-59, 2001.
- Cui L, Wong EH, Cheng G, Firmato de Almeida M, So MT, Sham PC, et al. Genetic Analyses of a Three Generation Family Segregating Hirschsprung Disease and Iris Heterochromia. *PLoS One*. 26;8(6):e66631, 2013.
- Currie ABM, Haddad M, Honeyman M. Associated developmental abnormalities of the anterior end of the neural crest: Hirschsprung's disease-Waardenburg's syndrome. *J Pediatr Surg* 21:248-250, 1986.
- Cvekl A, Yang Y, Chauhan BK, Cveklova K. Regulation of gene expression by Pax6 in ocular cells: a case of tissue-preferred expression of crystallins in lens. *Int J Dev Biol*. 48(8-9):829-44, 2004.
- D'Autreaux F, Cserjesi P, Rothman TP, Gershon MD. Expression of the basic helix-loop-helix (b-HLH) transcription factor, Hand2 is essential for enteric neuronal development. *Gastroenterology* 126(suppl 2): 119, 2004.
- de Castro E, Sigrist CJ, Gattiker A, Bulliard V, Langendijk-Genevaux PS, Gasteiger E, et al. ScanProsite: detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins. 34 (Web Server issue):W362-5, 2006.
- de Graaff E, Srinivas S, Kilkenny C, D'Agati V, Mankoo BS, Costantini F, et al. Differential activities of the RET tyrosine kinase receptor isoforms during mammalian embryogenesis. *Genes Dev* 15:2433-2444, 2001.
- Dodge JE, Okano M, Dick F, Tsujimoto N, Chen T, Wang S, et al. Inactivation of Dnmt3b in mouse embryonic fibroblasts results in DNA hypomethylation, chromosomal instability, and spontaneous immortalization. *J Biol Chem*. 280(18):17986-91, 2005.
- Doray B, Salomon R, Amiel J, Pelet A, Touraine R, Billaud M, et al. Mutation of the RET ligand, neurturin, supports multigenic inheritance in Hirschsprung disease. *Hum Mol Genet* 7: 1449-1452, 1998.

- 
- Draper BW, Morcos PA, Kimmel CB. Inhibition of zebrafish fgf8 pre-mRNA splicing with morpholino oligos: a quantifiable method for gene knockdown. *Genesis*. 30(3):154-6, 2001.
  - Dutton KA1, Pauliny A, Lopes SS, Elworthy S, Carney TJ, Rauch J, et al. Zebrafish colourless encodes sox10 and specifies non-ectomesenchymal neural crest fates. *Development*. 128(21):4113-25, 2001.
  - 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* 367: 378–380, 1994.
  - Edery P, Attie T, Amiel J, Pelet A, Eng C, Hofstra RM, et al. Mutation of the endothelin-3 gene in the Waardenburg–Hirschsprung disease (Shah- Waardenburg syndrome). *Nat Genet* 12: 442–444, 1996.
  - Ehrlich M, Sanchez C, Shao C, Nishiyama R, Kehrl J, Kuick R, et al. ICF, an immunodeficiency syndrome: DNA methyltransferase 3B involvement, chromosome anomalies, and gene dysregulation. *Autoimmunity* 41, 253–271, 2008.
  - Eketjall S, Fainzilber M, Murray-Rust J, Ibanez CF. Distinct structural elements in GDNF mediates binding to GFRalpha1 and activation of the GFRalpha1-c-Ret receptor complex. *EMBO J* 18: 5901-5910, 1999.
  - Elworthy S, Pinto JP, Pettifer A, Cancela ML, Kelsh RN. Phox2b function in the enteric nervous system is conserved in zebrafish and is sox10-dependent. *Mech Dev*. (5):659-69, 2005.
  - 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* 434: 857-863, 2005.
  - Emison ES, Garcia-Barcelo M, Grice EA, Lantieri F, Amiel J, Burzynski G, et al. Differential contributions of rare and common, coding and noncoding Ret mutations to multifactorial Hirschsprung disease liability. *Am J Hum Genet* 87(1):60-74, 2010.
  - Enomoto H, Araki T, Jackman A, Heuckeroth RO, Snider WD, Johnson EM Jr, et al. GFR alpha1-deficient mice have deficits in the enteric nervous system and kidneys. *Neuron* 21: 317-324, 1998.

- Epstein JA, Glaser T, Cai J, Jepeal L, Walton DS, Maas RL. Two independent and interactive DNA-binding subdomains of the Pax6 paired domain are regulated by alternative splicing. *Genes Dev.* 8(17):2022-34, 2004.
- Fernández RM, Boru G, Peciña A, Jones K, López-Alonso M, Antiñolo G, et al. Ancestral RET haplotype associated with Hirschsprung's disease shows linkage disequilibrium breakpoint at -1249. *J Med Genet* 42: 322-327, 2005.
- Fernandez RM, Sanchez-Mejias A, Mena MD, Ruiz-Ferrer M, Lopez-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* 73: 19-25, 2009.
- 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.* 22;11:137, 2010.
- 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.* 158A(4):816-20, 2012.
- 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.* 8(1):e54043, 2013.
- Flentjar N, Chu PY, Ng AY, Johnstone CN, Heath JK, Ernst M, et al. TGF-betaRII rescues development of small intestinal epithelial cells in Elf3-deficient mice. *Gastroenterology.* 132(4):1410-9, 2007.
- 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* 31: 89-93, 2002.
- Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol.* 31(7):397-405, 2013.
- Garcia-Barcelo M, Sham MH, Lee WS, Lui VC, Chen BL, Wong KK, et al. Highly recurrent RET mutations and novel mutations in genes of the receptor tyrosine kinase and endothelin receptor B pathways in Chinese patients with sporadic Hirschsprung disease. *Clin Chem* 50: 93-100, 2004.

- 
- 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* 106: 2694-2699, 2009.
  - Gardiner-Garden M, Frommer M. CpG islands invertebrate genomes. *J. Mol. Biol.* 196,261–282, 1987.
  - Garvie CW, Hagman J, Wolberger C. Structural studies of Ets-1/Pax5 complex formation on DNA. *Mol Cell.* 8(6):1267-76, 2001.
  - Georgala PA, Carr CB, Price DJ. The role of Pax6 in forebrain development. *Dev Neurobiol.* 71(8):690-709, 2011.
  - Gershon MD, Ratcliffe EM. Development of the Enteric Nervous System. *Physiology of the Gastrointestinal Tract, Fourth Edition. Capítulo 18.* Ed. Leonard R. Johnson. Academic Press, Pages 499-521, 2006.
  - Grice EA, Rochelle ES, Green ED, Chakravarti A, McCallion AS. Evaluation of the RET regulatory landscape reveals the biological relevance of a HSCR implicated enhancer. *Hum Mol Genet* 14: 3837-3845, 2005.
  - Heanue TA, Pachnis V. Enteric nervous system development and Hirschsprung's disease: advances in genetic and stem cell studies. *Nat Rev Neurosci* 8: 466–479, 2007.
  - Henion PD, Weston JA. Timing and pattern of cell fate restrictions in the neural crest lineage. *Development* 124: 4351-4359, 1997.
  - Herbarth B, Pingault V, Bondurand N, Kuhlbrodt K, Hermans-Borgmeyer I, Puliti A, et al. Mutation of the Sry-related Sox10 gene in Dominant megacolon, a mouse model for human Hirschsprung disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 5161-5165, 1998.
  - Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(18):9821-6, 1996.
  - 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* 22: 253-263, 1999.
  - Hilleren P, Parker R. Mechanisms of mRNA surveillance in eukaryotes. *Annu Rev Genet* 33: 229-260, 1999.

- 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* 12: 445–447, 1996.
- 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* 64: 304-308, 1999.
- Hofstra R, Wu Y, Stulp RP, Elfferich P, Osinga J, Maas SM, et al. RET and GDNF gene scanning in Hirschsprung patients using two dual denaturing gel systems. *Hum Mutat* 15: 418-429, 2000.
- Holmberg A, Olsson C, Hennig GW. TTX-sensitive and TTX-insensitive control of spontaneous gut motility in the developing zebrafish (*Danio rerio*) larvae. *J Exp Biol.* 210(Pt 6):1084-91, 2007.
- Höpker V, Shewan D, Tessier-Lavigne M, Poo M, Holt C. Growthcone attraction to netrin-1 is converted to repulsion by laminin-1. *Nature* 401: 69-73, 1999.
- 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* 79: 1267–1276, 1994.
- Hotta R, Stamp LA, Foong JP, McConnell SN, Bergner AJ, Anderson RB, et al. Transplanted progenitors generate functional enteric neurons in the postnatal colon. *J Clin Invest.* 123(3):1182-91, 2013.
- Hu N, Strobl-Mazzulla PH, Bronner ME. Epigenetic regulation in neural crest development. *Dev Biol.* 15;396(2):159-68, 2014.
- Hwang WY, Fu Y, Reyon D, Maeder ML, Tsai SQ, Sander JD, et al. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol.* 31(3):227-9, 2013.
- Innis MA, Gelfand DH. Optimization of PCRs. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (ed.) *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego, CA: Harcourt Brace Jovanovich, publishers (1990).

- Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyauchi T, Goto K, et al. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 2863-2867, 1989
- Inoue K, Khajavi M, Ohyama T, Hirabayashi S, Wilson J, Reggin JD, et al. Molecular mechanism for distinct neurological phenotypes conveyed by allelic truncating mutations. *Nat Genet* 36: 361-369, 2004.
- Ivanchuk SM, Myers SM, Eng C, Mulligan LM. De novo mutation of GDNF, ligand for the RET/GDNFR-alpha receptor complex, in Hirschsprung disease. *Hum Mol Genet* 5: 2023-2026, 1996.
- Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat.Genet.* 33, 245–254, 2003.
- Jin B, Tao Q, Peng J, Soo HM, Wu W, Ying J, et al. DNA methyltransferase 3B (DNMT3B) mutations in ICF syndrome lead to altered epigenetic modifications and aberrant expression of genes regulating development, neurogenesis and immune function. *Hum. Mol. Genet.* 17, 690–709, 2008.
- Jing S, Wen D, Yu Y, Holst PL, Luo Y, Fang M, et al. GDNF-induced activation of the ret protein tyrosine kinase is mediated by GDNFR-alpha, a novel receptor for GDNF. *Cell* 85: 1113-1124, 1996.
- Jurkowska RZ, Rajavelu A, Anspach N, Urbanke C, Jankevicius G, Ragozin S, et al. Oligomerization and binding of the Dnmt3a DNA methyltransferase to parallel DNA molecules: heterochromatic localization and role of Dnmt3L. *J. Biol. Chem.* 286, 24200–24207, 2011.
- Kabouridis PS, Pachnis V. Emerging roles of gut microbiota and the immune system in the development of the enteric nervous system. *J Clin Invest.* 125(3):956-64, 2015.
- Kamachi Y, Uchikawa M, Tanouchi A, Sekido R, Kondoh H. Pax6 and SOX2 form a co-DNA-binding partner complex that regulates initiation of lens development. *Genes Dev.* 15(10):1272-86, 2001.
- Kapur RP. Colonization of the murine hindgut by sacral crest-derived neural precursors: experimental support for an evolutionarily conserved model. *Dev Biol* 227: 146-155, 2000

- Kapur RP, Gershon MD, Milla PJ, Pachnis V. The influence of Hox genes and three intercellular signalling pathways on enteric neuromuscular development. *Neurogastroenterol Motil* 16: 8-13, 2004.
- Kapur RP. Practical pathology and genetics of Hirschsprung's disease. *Semin Pediatr Surg* 18: 212-223, 2009.
- Karpf AR, Matsui S. Genetic disruption of cytosine DNA methyltransferase enzymes induces chromosomal instability in human cancer cells. *Cancer Res.* 65(19):8635-9, 2005.
- 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* 102: 8949- 8954, 2005.
- Kawamoto Y, Takeda K, Okuno Y, Yamakawa Y, Ito Y, Taguchi R, et al. Identification of RET autophosphorylation sites by mass spectrometry. *J Biol Chem* 279: 14213-14224, 2004.
- Kim EA, Noh YT, Ryu MJ, Kim HT, Lee SE, Kim CH. Phosphorylation and transactivation of Pax6 by homeodomain-interacting protein kinase 2. *J Biol Chem.* 281(11):7489-97, 2006.
- Kim GD, Ni J, Kelesoglu N, Roberts RJ, Pradhan S. Co-operation and communication between the human maintenance and de novo DNA (cytosine-5) methyltransferases. *EMBO J.* 21(15):4183-95, 2002.
- Kim J, Lo L, Dormand E, Anderson DJ. SOX10 maintains multipotency and inhibits neuronal differentiation of neural crest stem cells. *Neuron* 38: 17-31, 2003.
- Kloog Y, Sokolovsky M. Similarities in mode and sites of action of sarafotoxins and endothelins. *Trends Pharmacol Sci* 10: 212-214, 1989.
- Kok FO, Shin M, Ni CW, Gupta A, Grosse AS, van Impel A, et al. Reverse genetic screening reveals poor correlation between morpholino-induced and mutant phenotypes in zebrafish. *Dev Cell.*32(1):97-108, 2015.
- Kuhlbrodt K, Herbarth B, Sock E, Hermans-Borgmeyer I, Wegner M. Sox10, a novel transcriptional modulator in glial cells. *J Neurosci.* 18(1):237-50, 1998.
- Kusafuka T, Wang Y, Puri P. Novel mutations of the endothelin-B receptor gene in isolated patients with Hirschsprung's disease. *Hum Mol Genet* 5: 347-349, 1996.

- 
- Lake JJ, Heuckeroth RO. Enteric nervous system development: migration, differentiation, and disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 305(1):G1-24, 2013.
  - Lallier T, Deutzmann R, Perris R, Bronner-Fraser M. Neural crest cell interactions with laminin: structural requirements and localization of the binding site for  $\alpha 1 \beta 1$  integrin. *Dev Biol* 162: 451-464, 1994.
  - Lang D, Chen F, Milewski R, Li J, Lu MM, Epstein JA. Pax3 is required for enteric ganglia formation and functions with Sox10 to modulate expression of c-ret. *J Clin Invest* 106: 963-971, 2000.
  - Lang D, Epstein JA. Sox10 and Pax3 physically interact to mediate activation of a conserved c-RET enhancer. *Hum Mol Genet* 12: 937-945, 2003.
  - Langer JC. Persistent obstructive symptoms after surgery for Hirschsprung's disease: Development of a diagnostic and therapeutic algorithm. *J Pediatr Surg* 39: 1458-1462, 2004.
  - Laranjeira C, Sandgren K, Kessar N, Richardson W, Potocnik A, Vanden Berghe P, et al. Glial cells in the mouse enteric nervous system can undergo neurogenesis in response to injury. *J Clin Invest.* 121(9):3412-24, 2011.
  - Law JA, Jacobsen SE. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat Rev Genet.* 11(3):204-20, 2010.
  - Le Douarin NM, Cameron-Curry P, Dulac C. Cellular interactions during the ontogeny of neural crest derivatives. *C R Acad Sci III* 314: 55-58, 1992.
  - Le Douarin NM, Kalcheim C. *The Neural Crest.* Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1999.
  - Read AP, Newton VE. Waardenburg syndrome. *J Med Genet.* 34(8):656-65, 1997.
  - Lee JW, Lee YC, Na SY, Jung DJ, Lee SK. Transcriptional coregulators of the nuclear receptor superfamily: coactivators and corepressors. *Cell Mol Life Sci.* 58(2):289-97, 2001.
  - Leibl MA, Ota T, Woodward MN, Kenny SE, Lloyd DA, Vaillant CR, et al. Expression of endothelin 3 by mesenchymal cells of embryonic mouse caecum. *Gut* 44: 246-252, 1999.

- Lin LF, Doherty DH, Lile JD, Bektesh S, Collins F. GDNF: a glial cell line–derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science* 260: 1130– 1132, 1993.
- Lindahl M, Timmusk T, Rossi J, Saarma M, Airaksinen MS. Expression and alternative splicing of mouse Gfra4 suggest roles in endocrine cell development. *Mol Cell Neurosci* 15: 522-533, 2000.
- Lindahl M, Poteryaev D, Yu L, Arumae U, Timmusk T, Bongarzone I, et al. Human glial cell line-derived neurotrophic factor receptor alpha 4 is the receptor for persephin and is predominantly expressed in normal and malignant thyroid medullary cells. *J Biol Chem* 276: 9344-9351, 2001.
- Linhart HG, Lin H, Yamada Y, Moran E, Steine EJ, Gokhale S, Lo G, Cantu E, Ehrich M, He T, Meissner A, Jaenisch R. Dnmt3b promotes tumorigenesis in vivo by gene specific de novo methylation and transcriptional silencing. *Genes Dev.* 21, 3110–3122, 2007.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real - time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method. *Methods.* 25(4):402-8, 2001.
- Liu B, Wu D. The first inner loop of endothelin receptor type B is necessary for specific coupling to Galpha 13. *J Biol Chem* 278: 2384-2387, 2003.
- Liu, Y, Xiao A. Epigenetic regulation in neural crest development .*Birth Defects Res. Part A Clin. Mol.Teratol.* 91(8):788-96, 2011.
- Lurie IW, Supovitz KR, Rosenblum-Vos LS, Wulfsberg EA. Phenotypic variability of del(2) (q22-q23): report of a case with a review of the literature. *Genet Couns.* 5(1):11-4, 1994.
- 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.* 7(5):e36524, 2012.
- 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.* 8(1):e54800, 2013.

- 
- Martins-Taylor K, Schroeder DI, Lasalle JM, Lalande M, Xu RH. Role of DNMT3B in the regulation of early neural and neural crest specifiers. *Epigenetics* 7,71–81, 2012.
  - Martucciello G, Ceccherini I, Lerone M, Jasonni V. Pathogenesis of Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg* 35: 1017-1025, 2000.
  - Masure S, Cik M, Hoefnagel E, Nosrat CA, Van der Linden I, Scott R, et al. Mammalian GFRalpha -4, a divergent member of the GFRalpha family of coreceptors for glial cell line-derived neurotrophic factor family ligands, is a receptor for the neurotrophic factor persephin. *J Biol Chem* 275: 39427- 39434, 2000.
  - Mayer W, Niveleau A, Walter J, Fundele R, Haaf T. Demethylation of the Zygotic paternal genome. *Nature* 403, 501–502, 2000.
  - McLin VA, Henning SJ, Jamrich M. The role of the visceral mesoderm in the development of the gastrointestinal tract. *Gastroenterology*. 136(7):2074-91, 2009.
  - Metzger M, Caldwell C, Barlow AJ, Burns AJ, Thapar N. Enteric nervous system stem cells derived from human gut mucosa for the treatment of aganglionic gut disorders. *Gastroenterology*. 136(7):2214-25.e1-3, 2013.
  - Moore MW, Klein RD, Farinas I, Sauer H, Armanini M, Phillips H, et al. Renal and neuronal abnormalities in mice lacking GDNF. *Nature* 382: 76–79, 1996.
  - Mostafavi S1, Ray D, Warde-Farley D, Grouios C, Morris Q. GeneMANIA: a real-time multiple association network integration algorithm for predicting gene function. *Genome Biol*. 9 Suppl 1:S4, 2008.
  - Mowat DR, Croaker GD, Cass DT, Kerr BA, Chaitow J, Adès 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*. 35(8):617-23, 1998.
  - Muller PA, Koscsó B, Rajani GM, Stevanovic K, Berres ML, Hashimoto D, et al. Crosstalk between muscularis macrophages and enteric neurons regulates gastrointestinal motility. *Cell*. 17;158(2):300-13, 2014.
  - Muncan V, Faro A, Haramis AP, Hurlstone AF, Wienholds E, van Es J, Korving J, Begthel H, Zivkovic D, Clevers H. T-cell factor 4 (Tcf7l2) maintains proliferative compartments in zebrafish intestine. *EMBO*. 8(10):966-73, 2007.

- Myers SM, Eng C, Ponder BA, Mulligan LM. Characterization of RET proto-oncogene 3' splicing variants and polyadenylation sites: a novel C-terminus for RET. *Oncogene* 11: 2039-2045, 1995.
- Ng PC, Henikoff S. SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res.* 31(13):3812-4, 2003.
- Nakakimura S, Sasaki F, Okada T, Arisue A, Cho K, Yoshino M, et al. Hirschsprung's disease, acrocallosal syndrome, and congenital hydrocephalus: report of 2 patients and literature review. *J Pediatr Surg.* 43(5):E13-7, 2008.
- Nakazawa N, Miyahara K, Okawada M, Yamataka A, Suzuki R, Akazawa C, et al. Laminin-1 promotes enteric nervous system development in mouse embryo. *Pediatr Surg Int.* 29(11):1205-8, 2013.
- Namihira M, Nakashima K, Taga T. Developmental stage dependent regulation of DNA methylation and chromatin modification in an immature astrocyte specific gene promoter. *FEBS Lett.* 572(1-3):184-8, 2004.
- Nataf V, Lecoin L, Eichmann A, Le Douarin NM. Endothelin-B receptor is expressed by neural crest cells in the avian embryo. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 9645-9450, 1996.
- Nataf V, Amemiya A, Yanagisawa M, Le Douarin NM. The expression pattern of endothelin 3 in the avian embryo. *Mech Dev* 73: 217-220, 1998.
- Newgreen D, Young HM. Enteric nervous system: development and developmental disturbances--part 1. *Pediatr Dev Pathol* 5: 224-247, 2002a
- Newgreen D, Young HM. Enteric nervous system: development and developmental disturbances--part 2. *Pediatr Dev Pathol* 5: 329-349, 2002b.
- Ng AN, de Jong-Curtain TA, Mawdsley DJ, White SJ, Shin J, Appel B, Dong PD, Stainier DY, Heath JK. Formation of the digestive system in zebrafish: III. Intestinal epithelium morphogenesis. *Dev Biol.* 286(1):114-35, 2005.
- Nitta KR, Takahashi S, Haramoto Y, Fukuda M, Tanegashima K, Onuma Y, Asashima M. The N-terminus zinc finger domain of *Xenopus* SIP1 is important for neural induction, but not for suppression of *Xbra* expression. *Int J Dev Biol* 51: 321-325, 2007.

- 
- Núñez-Torres R, Fernández RM, Acosta MJ, Enguix-Riego Mdel 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.* 12:138, 2011.
  - Okamoto E, Ueda T. Embryogenesis of intramural ganglia of the gut and its relation to Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg* 2: 437-443, 1967.
  - Okamoto N, Wada Y, Goto M. Hydrocephalus and Hirschsprung's disease in a patient with a mutation of L1CAM. *J Med Genet.* 34(8):670-1, 1997.
  - 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* 49: 334–337, 2004.
  - Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 99, 247–257, 1999.
  - Okladnova O, Syagailo YV, Tranitz M, Stöber G, Riederer P, Mössner R, Lesch KP. A promoter-associated polymorphic repeat modulates PAX-6 expression in human brain. *Biochem Biophys Res Commun.* 248(2):402-5, 1998.
  - Ooi SK, O'Donnell AH, Bestor TH. Mammalian cytosine methylation at a glance. *J. Cell Sci.* 122, 2787–2791, 2009.
  - Osumi N. The role of Pax6 in brain patterning. *Tohoku J Exp Med.* 193(3):163-74, 2001.
  - Osumi N, Shinohara H, Numayama-Tsuruta K, Maekawa M. Concise Review: Pax6 Transcription Factor Contributes to both Embryonic and Adult Neurogenesis as a Multifunctional Regulator. *Stem Cells* 26:1663–1672, 2008.
  - Pachnis V, Mankoo B, Costantini F. Expression of the c-ret proto-oncogene during mouse embryogenesis. *Development* 119: 1005-1017, 1993.
  - Paratore C, Goerich DE, Suter U, Wegner M, Sommer L. Survival and glial fate acquisition of neural crest cells are regulated by an interplay between the transcription factor Sox10 and extrinsic combinatorial signaling. *Development* 128: 3949-3961, 2001.

- Paratore C, Eichenberger C, Suter U, Sommer L. Sox10 haploinsufficiency affects maintenance of progenitor cells in a mouse model of Hirschsprung disease. *Hum Mol Genet* 11: 3075-3085, 2002.
- 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* 108: 51–56, 2002.
- 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* 399: 366–370, 1999.
- Pichel JG, Shen L, Sheng HZ, Granholm AC, Drago J, Grinberg A, et al. Defects in enteric innervation and kidney development in mice lacking GDNF. *Nature* 382: 73–76, 1996.
- Pingault V, Bondurand N, Kuhlbrodt K, Goerich DE, Préhu MO, Puliti A, et al. SOX10 mutations in patients with Waardenburg-Hirschsprung disease. *Nat Genet* 18: 171-173, 1998.
- Pingault V, Bondurand N, Lemort N, Sancandi M, Ceccherini I, Hugot JP, et al. A heterozygous endothelin 3 mutation in Waardenburg-Hirschsprung disease: is there a dosage effect of EDN3/EDNRB gene mutations on neurocristopathy phenotypes? *J Med Genet* 38: 205-209, 2001.
- Pingault V, Girard M, Bondurand N, Dorkins H, Van Maldergem L, Mowat D et al. SOX10 mutations in chronic intestinal pseudo-obstruction suggest a complex physiopathological mechanism. *Hum Genet.* 111(2):198-206, 2002.
- Pingault V, Ente D, Dastot-Le Moal F, Goossens M, Marlin S, Bondurand N. Review and update of mutations causing Waardenburg syndrome. *Hum Mutat* 31:391–406, 2010.
- Pingault V, Bodereau V, Baral V, Marcos S, Watanabe Y, Chaoui A, et al. Loss-of-function mutations in SOX10 cause Kallmann syndrome with deafness. *Am J Hum Genet.* 92(5):707-24, 2013.
- Pinson J, John O Mason, T Ian Simpson and David J Price. Regulation of the Pax6: Pax6(5a) mRNA ratio in the developing mammalian brain. *Developmental Biology* 5:13, 2005.

- 
- Pontier DB, Gribnau J. Xist regulation and function explored. *Hum Genet.* 130(2):223-36, 2011.
  - Prato AP, Gentilino V, Giunta C, Avanzini S, Mattioli G, Parodi S, et al. Hirschsprung disease: do risk factors of poor surgical outcome exist? *J Pediatr Surg* 43: 612-619, 2008.
  - Puffenberger EG, Hosoda K, Washington SS, Nakao K, deWit D, Yanagisawa M, et al. A missense mutation of the endothelin-B receptor gene in multigenic Hirschsprung's disease. *Cell* 79: 1257–1266, 1994.
  - Rauch U, Hansgen A, Hagl C, Holland-Cunz S, Schafer KH. Isolation and cultivation of neuronal precursor cells from the developing human enteric nervous system as a tool for cell therapy in dysganglionosis. *Int J Colorectal Dis* 21: 554–559, 2006.
  - Ramensky V, Bork P, Sunyaev S. Human non-synonymous SNPs: server and survey. *Nucleic Acids Res.* 30: 3894-3900, 2002.
  - Robu ME, Larson JD, Nasevicius A, Beiraghi S, Brenner C, Farber SA, Ekker SC. p53 activation by knockdown technologies. *PLoS Genet.* 3(5):e78, 2007.
  - Romeo G, Ronchetto P, Luo Y, Barone V, Seri M, Ceccherini I, et al. Point mutations affecting the tyrosine kinase domain of the RET protooncogene in Hirschsprung's disease. *Nature* 367: 377–378, 1994.
  - Rossi J, Luukko K, Poteryaev D, Laurikainen A, Sun YF, Laakso T, et al. Retarded growth and deficits in the enteric and parasympathetic nervous system in mice lacking GFR alpha2, a functional neurturin receptor. *Neuron* 22: 243- 252, 1999.
  - 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* 43: 1308-1311, 2008.
  - Ruiz-Ferrer M, Torroglosa A, Luzón-Toro B, Fernández RM, Antiñolo G, Mulligan LM, Borrego S. Novel mutations at RET ligand genes preventing receptor activation are associated to Hirschsprung's disease. *J Mol Med (Berl).* 89(5):471-80, 2011.
  - Runeberg-Roos P, Saarma M. Neurotrophic factor receptor RET: structure, cell biology, and inherited diseases. *Ann Med.* 39(8):572-80, 2007.

- Sakurai T, Yanagisawa M, Masaki T. Molecular characterization of endothelin receptors. *Trends Pharmacol Sci* 13: 103-108, 1992.
- Salomon R, Attie T, Pelet A, Bidaud C, Eng C, Amiel J, et al. Germline mutations of the RET ligand GDNF are not sufficient to cause Hirschsprung disease. *Nat Genet* 14: 345-347, 1996.
- Sancandi M, Ceccherini I, Costa M, Fava M, Chen B, Wu Y, et al. Incidence of RET mutations in patients with Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg* 35: 139- 142, 2000.
- Sánchez MP, Silos-Santiago I, Frisen J, He B, Lira SA, Barbacid M. Renal agenesis and the absence of enteric neurons in mice lacking GDNF. *Nature* 382: 70– 73, 1996.
- 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* 46: 862-864, 2009
- 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* 12: 39-43, 2010.
- Sánchez-Mejías A, Watanabe Y, Fernández RM, 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 (Berl)*. 88(5):507-14, 2010.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74, 5463-7, 1977.
- Sansom SN, Dean S, Griffiths, Andrea Faedo, Dirk-Jan Kleinjan, Youlin Ruan, et al. The Level of the Transcription Factor Pax6 Is Essential for Controlling the Balance between Neural Stem Cell Self-Renewal and Neurogenesis. *PLoS Genet*. 5(6): e1000511, 2009.
- Sasselli V, Pachnis V, Burns AJ. The enteric nervous system. *Dev Biol*. 366(1):64-73, 2012.
- Sauka-Spengler T, Bronner-Fraser M. Insights from a sea lamprey into the evolution of neural crest gene regulatory network. *Biol Bull*. 214(3):303-14, 2008.

- 
- Scardigli R, Nicole Bäumer, Peter Gruss, François Guillemot and Isabelle Le Roux. Direct and concentration-dependent regulation of the proneural gene Neurogenin2 by Pax6. *Development* 130, 3269-3281, 2003.
  - Schafer KH, Hagl CI, Rauch U. Differentiation of neurospheres from the enteric nervous system. *Pediatr Surg Int* 19: 340–344, 2003.
  - S. Schreiner, F. Cossais, K. Fischer, S. Scholz, M.R. Bösl, B. Holtmann, et al. Hypomorphic Sox10 alleles reveal novel protein functions and unravel developmental differences in glial lineages. *Development*. 134(18):3271-81, 2007.
  - 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* 367: 380–383, 1994.
  - Shaham O, Menuchin Y, Farhy C, Ashery-Padan R. Pax6: a multi-level regulator of ocular development. *Prog Retin Eye Res*. 31(5):351-76, 2012
  - Sham MH, Lui VC, Chen BL, Fu M, Tam PK. Novel mutations of SOX10 suggest a dominant negative role in Waardenburg-Shah syndrome. *J Med Genet* 38: E30, 2001.
  - Shi Y, Sawada J, Sui G, Affar el B, Whetstine JR, Lan F, et al. Coordinated histone modifications mediated by a CtBP co-repressor complex. *Nature*. 422(6933):735-8, 2003.
  - Shin SC, Kim SH, You H, Kim B, Kim AC, Lee KA, et al. Drosophila microbiome modulates host developmental and metabolic homeostasis via insulin signaling. *Science*. 334(6056):670-4, 2011.
  - Siddique AN, Nunna S, Rajavelu A, Zhang Y, Jurkowska RZ, Reinhardt R, et al. Targeted methylation and gene silencing of VEGF-A in human cells by using a designed Dnmt3a- Dnmt3L single-chain fusion protein with increased DNA methylation activity. *J Mol Biol*. 425(3):479-91, 2012.
  - Sidorova YA, Mätlik K, Paveliev M, Lindahl M, Piranen E, Milbrandt J. Persephin signaling through GFRalpha1: the potential for the treatment of Parkinson's disease. *Mol Cell Neurosci* 44:223–232, 2010.
  - Singh S, Stellrecht CM, Tang HK, Saunders GF. Modulation of PAX6 homeodomain function by the paired domain. *J Biol Chem*. 275(23):17306-13, 2000.

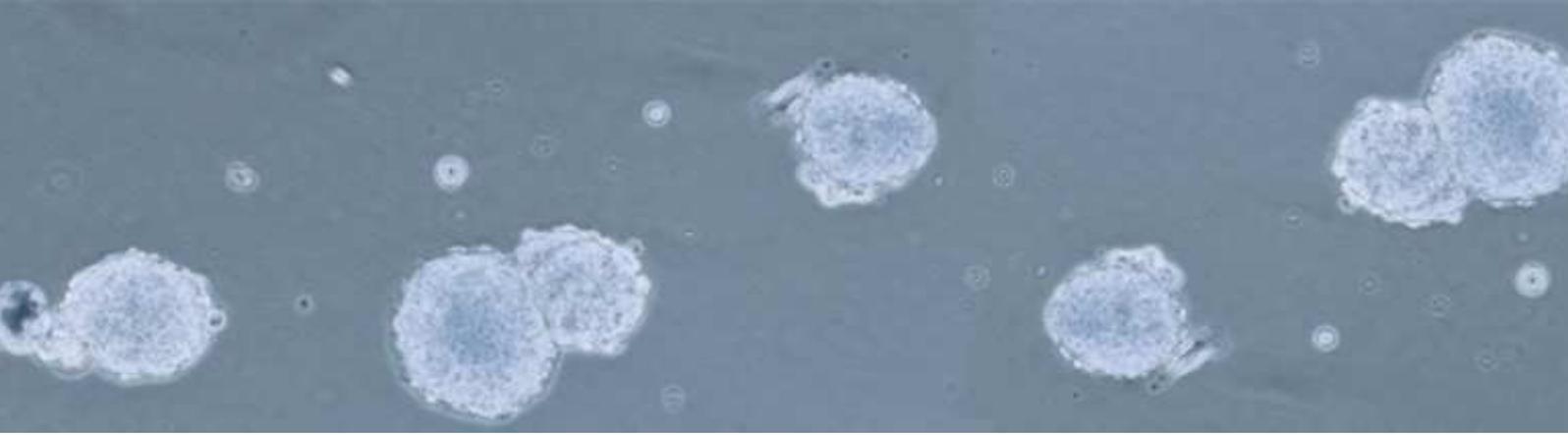
- Singh, R.P., Shiue, K., Schomberg, D., Zhou, F.C. Cellular epigenetic modifications of neural stem cell differentiation. *Cell Transplant.* 18:1197-1211, 2009.
- Smith TH, Collins TM, McGowan RA. Expression of the dnmt3 genes in zebrafish development: similarity to Dnmt3a and Dnmt3b. *Dev Genes Evol.* 220(11-12):347-53, 2011.
- Southard-Smith EM, Kos L, Pavan WJ. Sox10 mutation disrupts neural crest development in Dom Hirschsprung mouse model. *Nat Genet* 18: 60–64, 1998.
- Southard-Smith EM, Angrist M, Ellison JS, Agarwala R, Baxevanis AD, Chakravarti A, et al. The Sox10(Dom) mouse: modeling the genetic variation of Waardenburg-Shah (WS4) syndrome. *Genome Res* 9: 215-225, 1999.
- Sribudiani Y, Metzger M, Osinga J, Rey A, Burns AJ, Thapar N, et al. Variants in RET associated with Hirschsprung's disease affect binding of transcription factors and gene expression. *Gastroenterology.* 140(2):572-582.e2, 2011.
- Stanchina L, Van de Putte T, Goossens M, Huylebroeck D, Bondurand N. Genetic interaction between Sox10 and Zfhx1b during enteric nervous system development. *Dev Biol.* 15;341(2):416-28, 2010.
- Sundberg M, Andersson PH, Åkesson E, Odeberg J, Holmberg L, Inzunza J, et al. Markers of pluripotency and differentiation in human neural precursor cells derived from embryonic stem cells and CNS tissue. *Cell Transplant.* 20(2):177-91, 2011.
- Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y, Agarwal S, et al. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* 324,930–935, 2009.
- Takahashi M, Buma Y, Iwamoto T, Inaguma Y, Ikeda H, Hiai H. Cloning and expression of the ret proto-oncogene encoding a tyrosine kinase with two potential transmembrane domains. *Oncogene* 3: 571-578, 1988.
- Takahashi M. The GDNF/RET signalling pathway and human diseases. *Cytokine Growth Factor Rev* 12: 361-373, 2001.
- Takayama K, Shimoda N, Takanaga S, Hozumi S, Kikuchi Y. Expression patterns of dnmt3aa, dnmt3ab, and dnmt4 during development and fin regeneration in zebrafish. *Gene Expr Patterns.* 14(2):105-10, 2014.

- 
- Takigawa M, Sakurai T, Kasuya Y, Abe Y, Masaki T, Goto K. Molecular identification of guanine-nucleotide-binding regulatory proteins which couple to endothelin receptors. *Eur J Biochem* 228: 102–108, 1995.
  - Tam PK, Garcia-Barceló M. Genetic basis of Hirschsprung's disease. *Pediatr Surg Int* 25: 543-558, 2009.
  - 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.* 131(1):67-76, 2012.
  - 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.* 8(5):e1002687, 2012.
  - Thapar N. New frontiers in the treatment of Hirschsprung disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 48: S92–94, 2009.
  - Tost J, Gut IG. DNA methylation analysis by pyrosequencing. *Nature Protocols* 2(9):2265-75, 2007.
  - 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* 66: 1496-1503, 2000.
  - Treanor JJ, Goodman L, de Sauvage F, Stone DM, Poulsen KT, Beck CD, et al. Characterization of a multicomponent receptor for GDNF. *Nature* 382: 80- 83, 1996.
  - 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* 74: 761–764, 2004.
  - Tsuzuki T, Takahashi M, Asai N, Iwashita T, Matsuyama M, Asai J. Spatial and temporal expression of the ret proto-oncogene product in embryonic, infant and adult rat tissues. *Oncogene* 10: 191-198, 1995.
  - Turek-Plewa J, Jagodzinski PP. The role of mammalian DNA methyltransferases in the regulation of gene expression. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 10, 631–647, 2005.
  - Van de Putte T, Maruhashi M, Francis A, Nelles L, Kondoh H, Huylebroeck D, et al. Mice lacking ZFH1B, the gene that codes for Smad-interacting protein-1, reveal a role for multiple neural crest cell defects in the etiology of Hirschsprung disease-mental retardation syndrome. *Am J Hum Genet.* 72(2):465-70, 2003.

- Van de Putte T, Francis A, Nelles L, van Grunsven LA, Huylebroeck D. Neural crest-specific removal of *Zfhx1b* in mouse leads to a wide range of neurocristopathies reminiscent of Mowat–Wilson syndrome. *Hum Mol Genet* 16: 1423–1436, 2007.
- Verheij JB, Kunze J, Osinga J, van Essen AJ, Hofstra RM. ABCD syndrome is caused by a homozygous mutation in the *EDNRB* gene. *Am J Med Genet* 108: 223–225, 2002.
- Verheij JB, Sival DA, van der Hoeven JH, Vos YJ, Meiners LC, Brouwer OF, et al. Shah-Waardenburg syndrome and PCWH associated with *SOX10* mutations: a case report and review of the literature. *Eur J Paediatr Neurol* 10: 11-17, 2006.
- Viñuela A, Morín M, Villamar M, Morera C, Lavilla MJ, Cavallé L, et al. Genetic and phenotypic heterogeneity in two novel cases of Waardenburg syndrome type IV. *Am J Med Genet A*. 149A(10):2296-302, 2009.
- 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* 3: 195–253, 1951.
- Waddington C.H. *The strategy of the genes*. George Allen & Unwin, London, 1953.
- Wahlbuhl M, Reiprich S, Vogl MR, Bösl MR, Wegner M. Transcription factor *Sox10* orchestrates activity of a neural crest-specific enhancer in the vicinity of its gene. *Nucleic Acids Res*. 40(1):88-101, 2012.
- 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* 27: 369-370, 2001.
- Wallace KN, Akhter S, Smith EM, Lorent K, Pack M. Intestinal growth and differentiation in zebrafish. *Mech Dev*. 122(2):157-73, 2005.
- Wan L, Hu XJ, Yan SX, Chen F, Cai B, Zhang XM, et al. Generation and neuronal differentiation of induced pluripotent stem cells in *Cdyl*<sup>-/-</sup> mice. *Neuroreport*. 24(3):114-9, 2013.
- 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*. 91(9):842-7, 2011.

- Wang S, Dangerfield JP, Young RE, Nourshargh S. PECAM-1, alpha6 integrins and neutrophil elastase cooperate in mediating neutrophil transmigration. *J Cell Sci.* 118(Pt 9):2067-76, 2005.
- Watanabe D, Uchiyama K, Hanaoka K. Transition of mouse de novo methyltransferases expression from DNMT3B to DNMT3A during neural progenitor cell development. *Neuroscience.* 142:727-737, 2006.
- Watkins S, van Pouderoyen G, Sixma TK. Structural analysis of the bipartite DNA-binding domain of Tc3 transposase bound to transposon DNA. *Nucleic Acids Res.* 32(14):4306-12, 2004.
- Wienholz BL, Kareta MS, Moarefi AH, Gordon CA, Ginno PA, Chedin F. DNMT3L modulates significant and distinct flanking sequence preference for DNA methylation by DNMT3A and DNMT3B in vivo. *PLoS Genet.* 9;6(9):e1001106, 2010.
- Wilson AS, Power BE, Molloy PL. DNA hypomethylation and human diseases. *Biochim Biophys Acta.* 1775(1):138-62, 2007.
- Wolf LV, Yang Y, Wang J, Xie Q, Braunger B, Tamm ER, et al. Identification of pax6-dependent gene regulatory networks in the mouse lens. *PLoS One.* 4(1):e4159, 2009.
- Woodward MN, Kenny SE, Vaillant C, Lloyd DA, Edgar DH. Time-dependent effects of endothelin-3 on enteric nervous system development in an organ culture model of Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg* 35: 25–29, 2000.
- Xu PX, Zhang X, Heaney S, Yoon A, Michelson AM, Maas RL. Regulation of Pax6 expression is conserved between mice and flies. *Development.* 126(2):383-95, 1999.
- Yamada T, Urano-Tashiro Y, Tanaka S, Akiyama H, Tashiro F. Involvement of crosstalk between Oct4 and Meis1a in neural cell fate decision. *PLoS One.* 8(2):e56997, 2013.
- Yan XJ, Xu J, Gu ZH, Pan CM, Lu G, Shen Y et al. Exome sequencing identifies somatic mutations of DNA methyltransferase gene DNMT3A in acute monocytic leukemia. *Nat Genet.* 43(4):309-15, 2011.
- Yntema CL, Hammond WS. The origin of intrinsic ganglia of trunk viscera from vagal neural crest in the chick embryo. *J Comp Neurol* 101: 515-541, 1954.

- Young HM, Anderson RB, Anderson CR. Guidance cues involved in the development of the peripheral autonomic nervous system. *Auton Neurosci* 112: 1-14, 2004.
- Young HM, Bergner AJ, Muller T. Acquisition of neuronal and glial markers by neural crest-derived cells in the mouse intestine. *J Comp Neurol* 456: 1-11, 2003.
- Young HM, Turner KN, Bergner AJ. The location and phenotype of proliferating neural-crest-derived cells in the developing mouse gut. *Cell Tissue Res* 320: 1–9, 2005.
- Zhang X, Huang CT, Chen J, Pankratz MT, Xi J, Li J, et al. Pax6 is a human neuroectoderm cell fate determinant. *Cell Stem Cell*. 7(1):90-100, 2010.
- Zhang Y, Yang X, Gui B, Xie G, Zhang D, Shang Y, et al. Corepressor protein CDYL functions as a molecular bridge between polycomb repressor complex 2 and repressive chromatin mark trimethylated histone lysine 27. *J Biol Chem*. 286(49):42414-25, 2011.
- Zheng H, Pritchard DM, Yang X, Bennett E, Liu G, Liu C, Ai W. KLF4 gene expression is inhibited by the notch signaling pathway that controls goblet cell differentiation in mouse gastrointestinal tract. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 296(3):G490-8, 2009.
- Zhou L, Too HP. GDNF family ligand dependent STAT3 activation is mediated by specific alternatively spliced isoforms of GFR $\alpha$ 2 and RET. *Biochim Biophys Acta*. 1833(12):2789-802, 2013.
- Zhu L, Lee HO, Jordan CS, Cantrell VA, Southard-Smith EM, Shin MK. Spatiotemporal regulation of endothelin receptor-B by SOX 10 in neural crest-derived enteric neuron precursors. *Nat Genet* 36: 732-737, 2004.



## **8. ANEXO**



**Tabla 1: Variantes de secuencia detectadas en el rastreo mutacional del gen *DNMT3B***

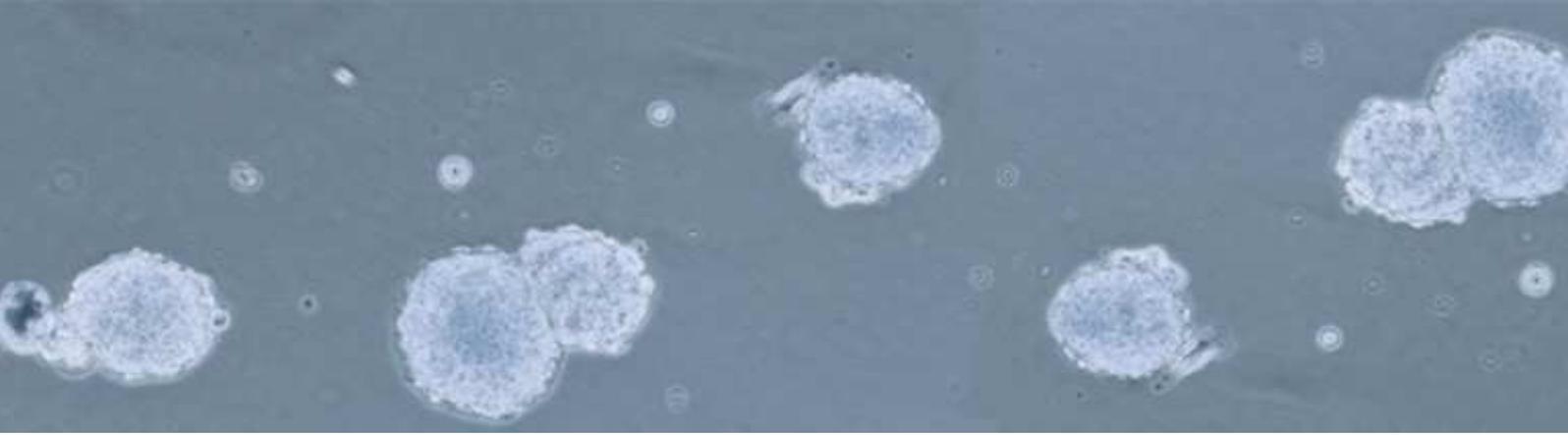
Cambio nucleotídico	Cambio aminoacídico	Referencia
c.-6-176C>T		rs6058885
c.142+117G>A		-
c.142+79G>A		rs181671547
c.142+36C>A		-
c.432+75G>A		-
c.432+76T>A		-
c.654+54A>G		rs4911108
c.654+30T>C		rs73258152
c.654+111G>A		rs79368590
c.654+129A>G		rs6057645
c.922-123G>A		rs1474738
c.922-55C>A		-
c.922-57G>T		-
c.922-8C>T		rs200508870
c.1066-113G>A		-
c.1066-135G>T		-
c.1066+653G>A		rs993419
c.1066-55G>T		-
c.1252+13T>G		rs910085
c.1252-70G>T		-
c.1252-59G>C		-
c.1297+30C>T		rs875041
c.1377+126C>T		rs6058890
c.1377+60C>T		rs192769774
c.1378-113C>A		rs6057648
c.1572T>C	Cys524Cys	rs6058891
c.1759-5C>G		rs1997797
c.1759+122C>A		-
c.1872C>T	Tyr624Tyr	-
c.1881C>T	Asp627Asp	rs17123657

**Tabla 2: Genes contenidos en la Placa TLDA: *TaqMan® Array Human Transcriptional Regulatory Network in Embryonic Stem Cell*.**

GAPDH	CDYL	GATA6	HESX1	MEIS1	ONECUT1	RIF1	SOX2
HPRT1	EOMES	GBX2	HNF4A	MYF5	OTX1	SALL1	STAT3
GUSB	ESX1	GJD2	HOXB1	MYST3	PAX6	SET	TCF7L1
CALB1	FOXC1	GRIN1	ISL1	NANOG	POU5F1	SIX3	TRIM24
CDX2	FOXD3	GSX2	JARID2	NEUROD1	REST	SKIL	ZFHX3
18S	GATA4	HAND1	LHX5	NEUROG1	RFX4	SMARCAD1	ZIC3

**Tabla 3: Variantes de secuencia detectadas en el rastreo mutacional del gen *PAX6***

Cambio nucleotídico	Cambio aminoacídico	Referencia
c.-476C>T	-	rs1806181
c.-129+9G>A	-	rs56139994/CS072275
c.-118 T>C	-	-
c.11-40T>A	-	-
c.11-41T>C	-	rs73477673
c.11-96C>A	-	-
c.183-4G>A	-	-
c.399+61C>A	-	rs369596046
c.400-18delT	-	-
c.873G>A	Gln291Gln	rs149053004
c.958+33T>A	-	rs73477665
c.960T>C	Val320Val	-
c.1183+43T>G	-	rs3026393



## **9. PUBLICACIONES**



**-PAX6 down-regulation as a potential event contributing to the onset of Hirschsprung disease**

**Enguix-Riego MV\***, Torroglosa A\*, Fernández RM, Moya-Jiménez MJ, de Agustín JC, Antiñolo G, Borrego S.

\*Co-Author

Submitted to Journal of Medical Genetics

**-Involvement of DNMT3B in the pathogenesis of Hirschsprung disease and its possible role as a regulator of neurogenesis in the human enteric nervous system.**

Torroglosa A\*, **Enguix-Riego MV\***, Fernández RM, Román-Rodríguez FJ, Moya-Jiménez MJ, de Agustín JC, Antiñolo G, Borrego S.

\*Co-Author

Genet Med. 16(9):703-10, 2014

**-Waardenburg syndrome type 4: report of two new cases caused by SOX10 mutations in Spain.**

Fernández RM, Núñez-Ramos R, **Enguix-Riego MV**, Román-Rodríguez FJ, Galán-Gómez E, Blesa-Sánchez E, Antiñolo G, Núñez-Núñez R, Borrego S.

Am J Med Genet A. 164 A(2):542-7, 2014.