

## ACTUALIZACION

### Enfermedad de Hirschprung: Avances en el diagnóstico

Cathia Selman; Constanza Alzola  
Internas 7° año, Facultad de Medicina, Universidad de Chile

#### Definición

La enfermedad de Hirschprung, también conocida como megacolon aganglionar congénito, es una malformación del sistema nervioso entérico, caracterizada por falta de células ganglionares en plexo submucoso y mientérico en pared distal del colon.<sup>1</sup> La ausencia de estos plexos genera una espasticidad de la zona, lo que produce una obstrucción intestinal funcional en el neonato.<sup>2</sup> Los segmentos aganglionares pueden empezar desde el recto distal hasta un compromiso variable de las zonas proximales del colon.<sup>3</sup> Aproximadamente en un 80% de los afectados, la enfermedad se restringe a la zona rectosigmoidea, conocida también como enfermedad de segmento corto. En un 15-20%, la aganglionosis se extiende a zonas proximales del sigmoides (enfermedad de segmento largo). Sólo un 5% tiene compromiso de todo el intestino, conocido como aganglionosis colónica total.<sup>1,3</sup> En muy raras ocasiones se extiende a intestino delgado o incluso a zonas aún más proximales de sistema digestivo (aganglionosis intestinal total)<sup>4</sup>.

#### Etiología/Epidemiología

La enfermedad de Hirschprung es la alteración de la motilidad intestinal congénita más frecuente con una incidencia de 1 en 5000 /7500 recién nacidos vivos. Los hombres suelen presentar más frecuentemente la forma clásica de la enfermedad, mientras que las mujeres suelen presentar Hirschsprung de segmento largo. En el 20% de los casos se asocia a otra malformación congénita y en un 10% la enfermedad se presenta dentro de un síndrome, como por ejemplo, Mowat-Wilson, Smith-Lemli-Opitz y Neoplasia endocrina múltiple tipo 2b (Westhill et al). En el 70% es una alteración aislada.

Habitualmente se atribuye la enfermedad a una falla en la migración de las células ganglionares, durante el desarrollo del sistema nervioso

entérico. En el feto, los neuroblastos derivados de la cresta neural migran en un sentido craneo-caudal desde esófago a canal anal durante la 5ta – 12ª semana de gestación para inervar la zona intestinal. Mientras más precozmente se produzca la alteración en la migración, mayor será la zona aganglionar y mayor será el compromiso en el recién nacido.<sup>5</sup>

#### Clínica

El 90% de los casos se diagnostican en el periodo neonatal y debe ser sospechado en recién nacidos de término que tienen un retraso en la eliminación de meconio superior a 24 horas. Otros de los síntomas clásicos son la distensión abdominal, la presencia de vómitos biliosos e intolerancia a la alimentación. En los recién nacidos pretérminos es más recuente la dismotilidad intestinal, por lo que podrían tener retraso en la eliminación de meconio sin tener enfermedad de Hirschsprung. Además en los recién nacidos pretérminos, los signos clásicos de la enfermedad suelen no ser identificados por la complejidad de síntomas propios del prematuro y la frecuente asociación a otras malformaciones congénitas y complicaciones (falla respiratoria, requerimientos de nutrición parenteral, alteraciones del ritmo cardíaco etc.)<sup>5,6</sup>.

En los casos más severos, el cuadro puede llegar a enterocolitis necrotizante, causa más común de mortalidad en Hirschsprung. El cuadro se caracteriza en un comienzo por diarrea, deposiciones explosivas, distensión abdominal y evidencia radiológica de obstrucción intestinal y/o edema de la mucosa intestinal. Al avanzar el cuadro los neonatos presentarán sangramiento rectal, megacolon tóxico y shock, he ahí la importancia del diagnóstico precoz de la enfermedad<sup>6</sup>. Importante señalar que paciente con Síndrome de Down, historia familiar de enfermedad de Hirschsprung y/o MEN 2 A / 2B, síndrome de Mowat-Wilson, neurofibromatosis

o síndrome de Waardenburg existe un mayor riesgo de desarrollar enterocolitis necrotizante<sup>6</sup>.

### Diagnóstico

El diagnóstico de la EH no siempre es fácil de establecer. Si bien la sospecha clínica es importante, existen diferentes pruebas para su confirmación que varían tanto en sensibilidad como especificidad.

### Imagenología

El uso de herramientas no invasivas como lo es la radiografía de abdomen anteroposterior y lateral en posiciones de pie y en decúbito, tienen escasa utilidad ya que muestran signos radiológicos sugestivos de obstrucción intestinal: distribución anormal del aire intestinal, ausencia de aire en el recto, dilatación de asas intestinales y niveles hidroaéreos.<sup>7</sup>

La primera aproximación se realiza con el enema contrastado, el cual tiene un rol diagnóstico pero no es esencial para su confirmación. El uso de contraste líquido de baja osmolaridad versus bario es comparable.<sup>8</sup> Debe ser realizado cuidadosamente, sin preparación previa y sin haber realizado maniobras de desimpactación.<sup>7</sup> El enema puede delimitar una zona estrecha proximal al ano seguida por una transición en forma de embudo y más interiormente, una zona dilatada; lo que corresponde respectivamente a la zona agangliónica, la hipogangliónica y la ganglionar.<sup>9</sup> Diversos estudios han elaborado un sistema de puntuación en base a signos radiológicos donde la presencia de 2 o más se acerca estadísticamente a los casos confirmados con EH y cuya ausencia no descarta el diagnóstico<sup>10</sup>; zona de transición o índice rectosigmoidea invertido  $< 1$  (Este índice mide la relación entre la más grande diámetro del recto y el diámetro mayor del sigmoides), retraso en la evacuación del contraste después de 24 horas y distensión ausente del anorrecto. Debido a la inmadurez del sistema inmune estos hallazgos pueden no verse antes de los 15 días de vida.<sup>8-13</sup>

Se estima que el enema contrastado tiene sensibilidad del 86% y especificidad del 90% en el diagnóstico de la EH, presentando entre 20-28% falsos negativos<sup>8</sup>, por lo que si se

encuentra alterado es necesario complementar el estudio.

Ante la sospecha de enterocolitis no debe ser realizado por el riesgo de perforación.<sup>7</sup>

Se puede aumentar la precisión diagnóstica con un enema contrastado modificado, suplementado con inyecciones de medio de contraste frío en el recto para inducir el reflejo anorrectal inhibitorio, así se descartan aquellos niños sin la EH. De esta forma, se aumenta la sensibilidad del enema contrastado cerca del 100 % y la especificidad a 98%.<sup>13</sup>

### Manometría anorrectal

La manometría anorrectal es un método objetivo para estudiar la fisiología de la defecación, incluye el esfínter anal interno, responsable de la presión en reposo y el esfínter anal externo, responsable de la presión durante la contracción del canal anal.

Además, es posible medir la zona de mayor presión que corresponde al esfínter anal interno. El reflejo anorrectal inhibitorio se presenta en individuos normales, al distenderse la ampolla rectal, ocasiona una contracción transitoria del esfínter anal externo, seguida por una pronunciada relajación del esfínter anal interno. Este proceso fisiológico depende de la presencia de las células ganglionares en el plexo nervioso del intestino distal.<sup>9,10</sup>

Mediante la utilización de un catéter provisto de un balón que puede ser insuflado, es posible evaluar el reflejo anorrectal inhibitorio, así como la sensibilidad, la capacidad y la compliance. En la EH el reflejo anorrectal inhibitorio está ausente, la presión del esfínter anal interno no desciende e incluso puede aumentar.

Su sensibilidad es alta reportando hasta un 91% con especificidad del 94%. Hay que considerar la sedación en el estudio de la población pediátrica por lo que los resultados pueden ser menores.<sup>9</sup>

Si el estudio arroja un resultado anormal se debe confirmar el diagnóstico.

### Biopsia rectal

En el intestino existen tres plexos nerviosos: Auerbach o mientérico, que está localizado entre las dos capas de la muscular propia; Henle, localizado encima de la capa circular de la muscular propia y Meissner, el más superficial, localizado debajo de la muscular de la mucosa. Los plexos normales se componen de neuronas (células ganglionares) y células de soporte (glía).<sup>14</sup>

El método estándar para el diagnóstico de la EH y siendo de carácter obligatorio antes de la cirugía, es la biopsia por succión mediante la tinción con hematoxilina eosina (H&E) cuyo hallazgo histológico se caracteriza por la ausencia total de células ganglionares y un aumento en la densidad estructural de los plexos nerviosos, siendo las células gliales reemplazadas por células de Schwann que se hipertrofian, tomando un aspecto similar al de un nervio periférico.<sup>9-15</sup>

Las biopsias por succión se realizan bajo presión negativa de 20 a 25 mmHg, sin enemas previos. Las muestras se consideran adecuadas cuando se toman a 3 cm sobre la línea pectínea, si las biopsias se toman a una distancia más lejana, puede no diagnosticarse la EH de segmento ultracorto y si se toman a una distancia menor puede establecerse un falso diagnóstico, ya que normalmente existe una zona cercana al ano de 1 a 3 cm que carece de células ganglionares intramurales.<sup>9,10</sup> Debe tener un espesor de al menos 3 mm y un tercio de la muestra debe corresponder a la submucosa debidamente orientado para preparar el corte histológico perpendicular a mucosa. El número de muestras solicitadas varía, pero en general se extraen entre 2 a 3.<sup>10</sup> Es un procedimiento que se realiza "a ciegas", por lo que es difícil determinar el sitio exacto de la biopsia y el espesor del fragmento resultante. Las biopsias de espesor total incluyen la mucosa rectal, la submucosa y la capa muscular subyacente y deben tomarse de la pared posterior del recto. Este procedimiento debe llevarse a cabo bajo anestesia general y requiere sutura de la herida quirúrgica.<sup>9</sup> Complicaciones como la hemorragia, perforación intestinal, fibrosis peri-rectal, celulitis pélvica y sepsis.<sup>10</sup>

Actualmente a pesar que la biopsia por succión la técnica más amigable para el paciente, ha complicado el trabajo de los patólogos. Biopsias inadecuadas determinan nuevos procedimientos para la extracción de biopsias de espesor total añadiendo costos, trauma y riesgos al paciente.<sup>9</sup> Las biopsias por succión son más difíciles de interpretar que las biopsias de espesor total, ya que sólo muestran la parte superficial del plexo neural de la submucosa, y no contienen el plexo mientérico el cual es más abundante y fácilmente evaluado.<sup>16</sup> Las células ganglionares en el plexo submucoso son pocas y están muy dispersas, por lo que pudiendo estar presentes, ser difíciles de encontrar.<sup>17</sup> A esto se suma que cerca del 17 % de las muestras tomadas por succión fueron inadecuadas, incluyendo sólo la mucosa. Es por esto que se investigaron nuevas moléculas como marcadores y se observó una equivalencia de resultados entre las muestras que sólo incluyeron submucosa respecto a las de espesor total.<sup>15</sup> Se nombra la existencia de una variada cantidad de moléculas, marcadores específicos en la identificación de las células ganglionares; enolasa, anticuerpos contra S100, neurofilamentos, micro túbulos, MAP5, NSE, GLUT-1, proteína ácida glial fibrilar, sinaptofisina, CD 56 y Bcl 2. Se destacan por su empleo y discusión actual, la enzima acetilcolinesterasa (AChE) y la calretinina.<sup>16,18</sup>

En el intestino normal, la actividad de la AChE en individuos sanos es virtualmente ausente o mínima. Se aprecia de coloración moderada (café pálido) en el tejido muscular y en algunas fibras nerviosas de la submucosa. No se visualiza, sin embargo, en el tejido intersticial de la mucosa (lamina propia de la mucosa). El diagnóstico histoquímico se basa en la especificidad del aumento de la actividad AChE a nivel de la lámina propia de la mucosa. El aumento de actividad enzimática se hace más intenso en el recto más distal, dada su rica inervación extramural a este nivel, disminuyendo hacia el intestino proximal. No permite evaluar la longitud del segmento aganglionar antes de una intervención quirúrgica.<sup>19</sup> En los recién nacidos las células ganglionares son inmaduras siendo difíciles de identificar, por lo que el patrón de tinción AChE es especialmente útil en éstos casos.<sup>17</sup>

Por otro lado, la calretinina es una proteína de 29 kDa que se une a calcio, es vitamina D

dependiente y tiene un importante papel como modulador de iones calcio. Normalmente, está presente en los nervios intrínsecos de la muscular de la mucosa y la lámina propia. En la EH este patrón de tinción desaparece, la ausencia de esta proteína conduce a acumulación de iones en el citoplasma de las células nerviosas, promoción de la hiperexcitabilidad y consecuente neurodegeneración.<sup>15, 16</sup>

En la literatura se discuten algunas diferencias en cuanto a la preferencia de uso de una técnica sobre otra. La AChE requiere el uso de tejido congelado, interrumpiendo el flujo de trabajo habitual de un laboratorio de patología quirúrgica. Además, la actividad de la AChE se desvanece después de la hora, lo que requiere la reposición continua. Por lo demás, la interpretación de los patrones de AChE requiere experiencia y se ha asociado con tasas relativamente altas de desacuerdo inter observador como así como los resultados falsos positivos.<sup>13-15, 21</sup> Al mismo tiempo, la mayoría de los laboratorios tienen calretinina disponible. La búsqueda de éste marcador se puede realizar en tejido incluido en parafina. Además, los estudios han demostrado que la calretinina se interpreta de manera más fiable y parece requerir menos experiencia por parte del observador sin falsos positivos.<sup>9</sup> Tiene un mejor rendimiento en la evaluación de biopsias inadecuadas, superficial o demasiado distal, permitiendo análisis más fácil y claros, incluyendo patólogos con menos experiencia en el campo.<sup>10</sup>

La biopsia de espesor total sigue siendo la prueba de mayor certeza diagnóstica en la EH con una sensibilidad y especificidad cercanas al 100%. La biopsia por aspiración tiene una sensibilidad de 93% y una especificidad de 98%. La tinción H&E utilizada mundialmente tiene sensibilidad del 57.57 % y cuenta con especificidad del 79.10 %. La sensibilidad de la AChE en el diagnóstico de la EH es de un 90.47 % y una especificidad del 96.36 %.<sup>11</sup> Los estudios basados en el uso de calretinina enseñan una sensibilidad del 100% y una especificidad del 83%.<sup>15</sup>

### Diagnóstico diferencial

Según su etiopatogenia, la constipación se divide en dos grandes grupos, las causas funcionales que engloban un 90-95% y las causas orgánicas 5-10%. Para su diagnóstico se requiere excluir la patología orgánica que es común en lactantes y niños pequeños quienes presentan un cuadro clínico de alarma muy sugestivo.<sup>22</sup>

Por un lado, orienta hacia una constipación orgánica: signos agudos caracterizados por distensión abdominal, vómitos y retraso en la eliminación del meconio mayor a 48 horas; signos crónicos tales como deposiciones en forma de cinta, incontinencia urinaria, bajo incremento ponderal, síntomas extra intestinales en especial el déficit neurológico y alteraciones al examen físico como es la presencia de fosita pilonidal sin fondo o cubierta de pelos, ano mal posicionado, masas fecales abdominales con ausencia de deposiciones en el recto, salida de aire mezclado con deposiciones al retirar el dedo del examinador, ausencia de reflejo anal, ausencia de reflejo cremasteriano, reflejos osteotendíneos alterados, disminución del tono y/o fuerza muscular, falta de la curvatura de la columna lumbo-sacra, agenesia del sacro, glúteos planos con distensión abdominal, sangre oculta en las deposiciones.<sup>23,24</sup>

Especial importancia tienen las patologías más frecuentes que se asocian a constipación debido a la urgencia que requiere su diagnóstico en el recién nacido: EH, anomalías rectales, atresias y estenosis intestinales, disrafia espinal y fibrosis quística.<sup>16, 18</sup>

La búsqueda de otros diagnósticos, causas de constipación de origen psicológico, neurológico, endocrinológico destacando al hipotiroidismo, intoxicación por metales, infecciosas como Botulismo o la enfermedad de Chagas y las malformaciones anatómicas anorrectales deben estudiarse según corresponda el caso.

### Tratamiento

Confirmado el diagnóstico de EH, el tratamiento es siempre quirúrgico. La evolución de las técnicas quirúrgicas mostró un gran avance en las últimas décadas, lo que permite la realización de un tratamiento en un tiempo quirúrgico, reduciendo costos. El procedimiento de elección es la resección del segmento

afectado transanal y sin movilización intra abdominal, llevando el intestino con células ganglionares hasta el ano preservando la continencia. Incluso, es posible de realizar en neonatos sin la necesidad de colostomía primaria. Sus ventajas: a largo plazo, tanto de funcionalidad como en tasa de complicaciones con una recuperación postoperatoria más rápida, con menor estadía hospitalaria y mejores resultados estéticos. Se debe preparar el colon, vaciarlo se heces mediante irrigaciones con solución salina y maniobras de dilatación anal, previniendo complicaciones y dejando un colon de calibre normal, previo a la cirugía.

Por otro lado, según la presentación clínica y la extensión del segmento afectado, existen diferentes opciones:

- Casos complicados, tales como la enterocolitis y sepsis, necesitarán manejo de soporte: reposición de líquidos, sonda nasogástrica e irrigaciones rectales y estabilización antes de realizar la cirugía.
- Se deberá realizar colostomía de descarga como paso inicial en enterocolitis severa, perforación intestinal, desnutrición grave distensión importante del colon proximal. El tiempo hasta la corrección definitiva varía según el estado del paciente.
- Ante la EH de segmento ultracorto limitada al esfínter anal interno, existen varias opciones: dilataciones forzadas, esfínterotomía o infiltración de toxina botulínica.
- Para la afectación del recto sigmoides, durante años usaron técnicas clásicas (Swenson, Duhamel, Soave) requiriendo varias intervenciones. En los últimos años gracias a la laparoscopia, se describe la técnica De la Torre, similar a Soave pero vía transanal en un solo acto quirúrgico.
- En situaciones de aganglionismo completo de colon, se tiende a realizar anastomosis directa del íleon terminal sano con el ano. Ante situaciones raras de afectación extensa las medidas de soporte son vitales.

Por último, en la actualidad se encuentra en fases preliminares la investigación con células madre autólogas utilizadas para colonizar el colon agangliónico de niños con EH.<sup>7,10</sup>

### Bibliografía

1. Mohammad Hossein Anbardar, Bitá Geramizadeg, Hamid Reza Foroutan "Evaluation of Calretinin as a New Marker in the Diagnosis of Hirschsprung Disease" Iran J Pediatr. 2015 April; 25 (2):e367
2. Charlotte Wetherill, Jonathan Sutcliffe "Hirschsprung disease and anorectal malformtion, Best practice guidelines", Early Human Deelopment 90(2014) 927-932
3. Melissa A Parissi "Hirschsprung Disease Overviwe", GeneReviews
4. Badner Ja, Sieber WK, Garver KL, Chrakravarti A "A genetic study of hirschprung disease. AM J Hum Genet. 1990: 46:568-80
5. Johannes W. Duess, Alehandro D. Hofmann "Prevalence of Hirschsprung's disease in premature infants: a systematic review" , Pediatr Surg Int (2014) 30\_791-795
6. Deepika D'Cunha Burkardt, John M. Graham Jr, Scott S. Short, Philip K. Frykman " Advances in Hirschsprung Disease Genetics and Treatment Strategies, an Update for the prumary care pediatrician", Clinical Pediatrics 2014, Vol 53( 1), 71-81
7. J. Jiménez, L. Fernández. Enfermedad de Hirschsprung. Protocolos de la AEP, Ergon S. A. 2010. Disponible en: <http://www.aeped.es/sites/default/files/documentos/Hirschsprung.pdf>
8. A.N. O'Donovan, G. Habra, S. Somers, E. Malone, A. Rees, A.L. Winthrop. Diagnosis Hirschsprung Disease. American Roentgen Ray Society. Agosto 1996. Disponible en: [www.ajronline.org](http://www.ajronline.org) by 201.214.60.110 on 12/11/15 from IP address 201.214.60.110
9. U. Rodríguez, D. Olivares. Enfermedad de Hirschsprung: Sensibilidad y especificidad de las alternativas de diagnóstico. Revista Hospital Juárez de México. 2010, 77(2): 129-132. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/juarez/ju-2010/ju102j.pdf>
10. P.L Lourenção. Desafios diagnósticos na doença de Hirschsprung: aplicabilidade de novos métodos imunohistoquímicos e endoscópicos. 2012. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Faculdade de Medicina de Botucatu, 2012. Disponible en: <http://hdl.handle.net/11449/104573>

11. M.M. Mahmoud, H.A. Ayman, M.Y. Tamer, E.F. Ahmed, E. Hisham, S. Hadeel, E. Montasser, M.E. Mohamed. Reducing the frequency of unnecessary rectal biopsies by combined interpretation of clinical and radiological findings in Egyptian children with suspected Hirschsprung's disease. *Egyptian Pediatric Association Gazette*, Volume 63, Issues 3–4, September–December 2015, Pages 80–85. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1110663815000403>
12. M. Alehossein, A. Roohi, M. Pourgholami, M. Mollaeian, P. Salamat. Diagnostic Accuracy of Radiologic Scoring System for Evaluation of Suspicious Hirschsprung Disease in Children. *Iran J Radiol*. 2015 Apr; 12(2): e12451. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4389175/>
13. K. Vult von Steyern, P. Wingren, M. Wiklund, P. Stenström, E. Arnbjörnsson. Visualisation of the rectoanal inhibitory reflex with a modified contrast enema in children with suspected Hirschsprung Disease. *Pediatr Radiol* (2013) 43:950–957. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/235797209\\_Visualisation\\_of\\_the\\_rectoanal\\_inhibitory\\_reflex\\_with\\_a\\_modified\\_contrast\\_enema\\_in\\_children\\_with\\_suspected\\_Hirschsprung\\_disease](https://www.researchgate.net/publication/235797209_Visualisation_of_the_rectoanal_inhibitory_reflex_with_a_modified_contrast_enema_in_children_with_suspected_Hirschsprung_disease)
14. L.E. Jaramillo. Diagnóstico de enfermedad de Hirschsprung en biopsias de mucosa-submucosa del recto; una propuesta de trabajo. *Rev Col Gastroenterol* vol.26 no.4 Bogotá Oct./Dec. 2011. Disponible en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-99572011000400007](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-99572011000400007)
15. D. Hernandez, T. Plesec. Hirschsprung Disease and Use of Calretinin in Inadequate Rectal Suction Biopsies. *Arch Pathol Lab Med—Vol 137*, August 2013. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23899067>
16. I. Barshack, E. Fridman, I. Goldberg, Y. Chowers, J. Kopolovic. The loss of calretinin expression indicates aganglionosis in Hirschsprung's Disease. *J Clin Pathol* 2004; 57:712–716. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15220363>
17. R.K. Agrawal, Nandita Kakkar, R.K. Vasishta, Vandana Kumari, R. Samujh, K.L.N. Rao. Acetylcholinesterase histochemistry (AChE)- A helpful technique in the diagnosis and in aiding the operative procedures of Hirschsprung Disease. *Diagnostic Pathology* (2015) 10:208. Disponible en: <http://www.diagnosticpathology.org/content/10/1/208>
18. L. Yadav, U. Kini, K. Das, S. Mohanty, D. Puttegowda. Calretinin immunohistochemistry versus improvised rapid Acetylcholinesterase histochemistry in the evaluation of colorectal biopsies for Hirschsprung disease. *Indian J Pathol Microbiol* 2014; 57:369-75. Disponible en: <http://www.ijpmonline.org/text.asp?2014/57/3/369/138717>
19. B. Fadda. Fundamentos del diagnóstico histoquímico de la Enfermedad de Hirschsprung. *Rev. Chilena de Pediatría*, Vol. 47, N° 2, 1976. Disponible en: <http://www.scielo.cl/pdf/rcpv/v47n2/art09.pdf>
20. M.H. Anbardar, B. Geramizadeh, H.R. Foroutan. Evaluation of Calretinin as a New Marker in the Diagnosis of Hirschsprung Disease. *Iran J Pediatr*. 2015 April; 25(2):e367. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4506005/>
21. R.P. Kapur, R.C. Reed, L.S. Finn, K. Petterson, J. Johanson, J.C. Rutledge. Calretinin Immunohistochemistry versus Acetylcholinesterase Histochemistry in the Evaluation of Suction Rectal Biopsies for Hirschsprung Disease. *Pediatric and Developmental Pathology* 12, 6- 15, 2009. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18442301>
22. E. Ortega, D. Barroso. Estreñimiento. *Rev Pediatr Aten Primaria* vol.15 supl.23 Madrid jun. 2013. Disponible en: [http://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=S1139-76322013000300007&script=sci\\_arttext](http://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=S1139-76322013000300007&script=sci_arttext)
23. J. Espinoza. Constipación en pediatría. *Rev Chil Nutr* Vol. 29, N°3, Diciembre 2002. Disponible en: [http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0717-75182002000300001&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0717-75182002000300001&script=sci_arttext)
24. M.R. Sood. Constipation in infants and children: Evaluation. Up to Date. Literature review current through: Nov 2015. | This topic last updated: Apr 01, 2015.