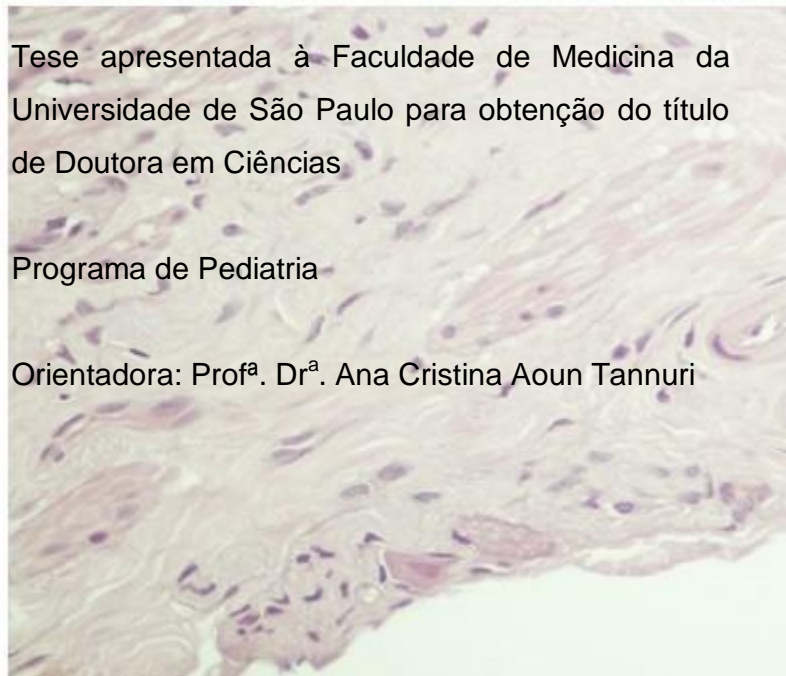
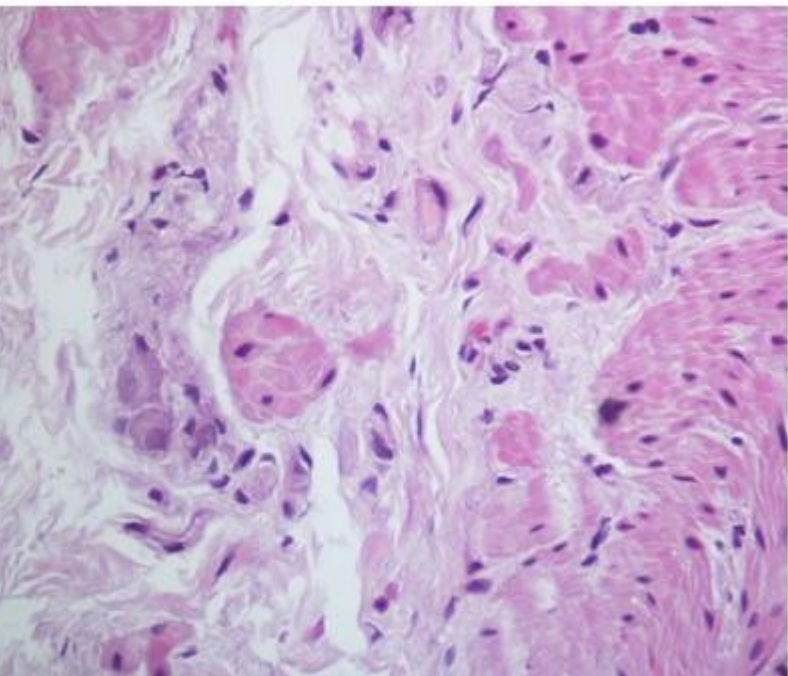


SUELLEN SERAFINI

Distribuição das células ganglionares em fragmentos de mucosa e submucosa retal para o diagnóstico da moléstia de Hirschsprung



Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências

Programa de Pediatria

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Ana Cristina Aoun Tannuri

**São Paulo
2022**

SUELLEN SERAFINI

Distribuição das células ganglionares em fragmentos de mucosa e submucosa retal para o diagnóstico da moléstia de Hirschsprung

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências

Programa de Pediatria

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Cristina Aoun Tannuri

São Paulo

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Serafini, Suellen

Distribuição das células ganglionares em fragmentos de mucosa e submucosa retal para o diagnóstico da moléstia de Hirschsprung / Suellen Serafini. -- São Paulo, 2022.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Pediatria.

Orientadora: Ana Cristina Aoun Tannuri.

Descritores: 1.Doença de Hirschsprung
2.Reto/biópsia 3.Submucosa 4.Hematoxilina-eosina
5.Plexo submucoso 6.Neurônios

USP/FM/DBD-260/22

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cirurgia Pediátrica da FMUSP (LIM 30) e no Serviço de Verificação de Óbito da cidade de São Paulo (SVOC-SP).

O projeto foi aprovado na Comissão de Ética e Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 23/01/2019, sob número 3.119.706.

Os recursos financeiros da presente linha de pesquisa foram obtidos da FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) por meio do projeto número 2019/10339-1.

Vivemos tempos sombrios onde assistimos à desvalorização da Ciência e dos pesquisadores científicos. Que não nos falte a esperança para seguirmos em frente.

Apesar de você

Amanhã há de ser

Outro dia

Chico Buarque

*Aos meus pais Luiz (in memoriam) e Ione, por me ensinarem sobre amor,
empatia e honestidade.*

Aos meus irmãos Kiko e Dani pela camaradagem.

Ao meu esposo Gabriel pelo apoio

E a minha pequena Olivia por trazer alegria para minha vida todos os dias.

Obrigada!

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Ana Cristina Aoun Tannuri, por sua orientação no meu mestrado e agora em meu doutorado, seus ensinamentos foram de grande importância para o meu crescimento acadêmico. E por sua dedicação tanto à cirurgia quanto à pesquisa, sua energia e comprometimento nos inspira.

À Dra. Maria Mercês Santos, por ser orientadora, professora, amiga e “mãe”. Tudo o que sei sobre o diagnóstico da Moléstia de Hirschsprung aprendi com ela e sou muito grata por isso.

Ao Prof. Dr. Uenis Tannuri, um ser humano de caráter admirável, um cirurgião brilhante e um chefe que sempre incentiva os seus funcionários a enriquecer seus conhecimentos. Agradeço por sua grande contribuição na minha formação profissional e acadêmica em todos esses anos.

À equipe do LIM 30 – HC FMUSP Patrícia e Josiane, por toda a ajuda nesse trabalho e pelo companheirismo. É muito bom ter amigas como vocês!

Ao Dr. Celso Di Loreto que durante a arguição do meu mestrado fez uma sugestão que acabou se tornando o tema da minha tese de doutorado.

Ao Prof. Dr. Carlos Augusto Pasqualucci, e a toda equipe do SVOC-SP por estarem sempre disponíveis para me auxiliar na coleta do material.

À equipe do departamento de cirurgia do ICr, Suzana, Juliana e Dra. Larissa pela ajuda com os prontuários.

Aos outros membros participantes da banca de Qualificação: Prof. Dr. Evandro Sobroza de Mello, Profa. Dra. Maria Claudia Nogueira Zerbini e Prof. Dr. Clovis Artur Almeida da Silva. Agradeço pelas sugestões e pela gentileza.

NORMATIZAÇÃO ADOTADA

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE GRÁFICOS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

RESUMO

ABSTRACT

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 2. OBJETIVOS..... | 11 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS | 12 |
| 3.1. Distribuição das células ganglionares em amostras com inervação normal..... | 12 |
| 3.1.1. Obtenção das amostras..... | 12 |
| 3.1.2. Preparo do material | 13 |
| 3.2. Análise estatística | 16 |
| 3.3. Aplicação dos modelos no diagnóstico | 18 |
| 3.3.1. Método de seleção dos casos | 18 |
| 3.3.2. Preparo das amostras | 19 |
| 3.4. Análise estatística | 22 |
| 4. RESULTADOS | 24 |
| 4.1. Estudo da distribuição dos plexos ganglionares nas amostras com inervação normal do reto. | 24 |
| 4.2. Análise por cortes equidistantes. | 27 |
| 4.2.1. Aplicação do método na leitura do HE..... | 29 |
| 4.3. Método de sistematização obtido pela técnica de Bootstrapping..... | 30 |
| 4.3.1. Aplicação do método na leitura do HE..... | 32 |
| 5. DISCUSSÃO..... | 35 |
| 6. CONCLUSÕES..... | 43 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 44 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1: Esquema da coleta do material..... | 13 |
| Figura 2: Disposição dos cortes em relação às lâminas | 14 |
| Figura 3: Reagentes e panela Pascal utilizados no preparo da técnica imunohistoquímica. | 16 |
| Figura 4: Visualização dos troncos e fibrilas em fragmento de biopsia retal preparado pela técnica da AChE. Aumento 200x..... | 20 |
| Figura 5: Plexo submucoso com duas células ganglionares em evidência pelas setas. Coloração HE. Aumento de 400x. | 22 |
| Figura 6: Neurônio marcado pela calretinina em um plexo submucoso. Aumento de 200x. | 26 |
| Figura 7: Imagens dos casos considerados falso-positivos pela comparação com o padrão ouro da AChE submetidos a técnica da calretinina. Ambos com marcação de células ganglionares. Figura a – caso 6, aumento de 200x. Figura b – caso 25, aumento de 400x. | 33 |
| Figura 8: Imagem de plexo submucoso encontrado no corte 4 do caso 8 que havia sido considerado como falso – positivo. Coloração HE. Aumento de 400x. | 34 |

LISTA DE GRÁFICOS

| | |
|---|----|
| Gráfico 1: Correlação de Spearman entre a idade e tempo de coleta dos doadores x quantidade de plexos visualizados. | 27 |
| Gráfico 2: Valores de acurácia por cortes equidistantes. | 28 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1: Características dos doadores do estudo da distribuição dos plexos ganglionares nas amostras com inervação normal do reto – Gênero, idade, tempo de coleta, quantidade de plexos, localização e quantidade de células ganglionares..... | 25 |
| Tabela 2: Valores da correlação de Spearman..... | 26 |
| Tabela 3: Tabela comparando os valores de acurácia de acordo com os cortes equidistantes. | 28 |
| Tabela 4: Comparação entre o diagnóstico realizado pela técnica do HE com os da AChE (padrão ouro). Negativo significa não doente e Positivo presença de MH para ambos os métodos – Método de leitura por cortes equidistantes..... | 29 |
| Tabela 5: Valores para validação da Hematoxilina & Eosina – Método de leitura por cortes equidistantes. | 30 |
| Tabela 6: Mostrando o ranqueamento dos cortes escolhidos na primeira coluna. A segunda coluna apresenta o corte selecionado, a terceira coluna representa a quantidade de vezes que esse corte estava presente no total de conjuntos gerados e quarta coluna apresenta esse número em porcentagem. | 31 |
| Tabela 7: Comparação entre o diagnóstico realizado pela técnica do HE com os da AChE (padrão ouro). Negativo significa não doente e Positivo presença de MH para ambos os métodos – Método de Bootstrapping. | 32 |
| Tabela 8: Valores para validação do método da Hematoxilina – Eosina – Método Bootstrapping. | 33 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|----------------|---|
| AChE | Acetilcolinesterase |
| DAB | Diaminobenzidina |
| DAP | Divisão de Anatomia Patológica |
| HCFMUSP | Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo |
| HE | Hematoxilina e Eosina |
| ICr | Instituto da Criança |
| LIM | Laboratório de Investigação Médica |
| MH | Moléstia de Hirschsprung |
| SNE | Sistema Nervoso Entérico |
| SVOC | Serviço de Verificação de Óbito da Capital |
| TBST | Tris- buffered saline |
| TCLE | Termo de Consentimento Livre e Esclarecido |

RESUMO

Serafini S. *Distribuição das células ganglionares em fragmentos de mucosa e submucosa retal para o diagnóstico da moléstia de Hirschsprung* [tese] São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2022.

INTRODUÇÃO: A Moléstia de Hirschsprung (MH), caracteriza-se pela suboclusão intestinal e ausência de células ganglionares entéricas. A análise de fragmento obtido por biópsia retal confirma o diagnóstico da MH. Em um trabalho recente, demonstramos que a análise de 60 cortes por fragmento de mucosa e submucosa retal, corados pelo HE, torna possível o diagnóstico com 90% de acurácia. Neste estudo, em 54% dos casos, os neurônios encontravam-se nos cortes finais (50-60). Isto nos motivou a estudar a distribuição destes na submucosa retal, para tornar o diagnóstico mais simples. **OBJETIVOS:** Criar um método que facilite o diagnóstico da MH, através do estudo da distribuição das células ganglionares no plexo submucoso. Aplicar este método em amostras de pacientes com suspeita de MH, para verificar a acurácia do mesmo. **MÉTODOS:** Estudamos a distribuição das células ganglionares em 60 cortes de submucosa retal, obtidos de 19 cadáveres encaminhados ao SVOC, através da técnica da calretinina. Após o estudo, os métodos de leitura criados foram utilizados para o diagnóstico em 47 casos de suspeita de MH, processados pela coloração HE. A verificação da acurácia dos métodos foi feita pela comparação entre os resultados obtidos pelo HE com os obtidos pela técnica da acetilcolinesterase, considerada padrão ouro em nosso laboratório. **RESULTADOS:** O estudo da distribuição das células ganglionares demonstrou que visualizando de 9 a 15 dos 60 cortes, já é possível realizar o diagnóstico da MH com 93% de acurácia. **CONCLUSÃO:** O estudo da distribuição das células ganglionares possibilitou a criação de dois métodos simplificados para leitura das lâminas. A aplicação dos métodos atingiu uma boa acurácia e pode ser utilizado com alternativa no diagnóstico da MH.

Descritores: Doença de Hirschsprung; Reto/biópsia; Submucosa; Hematoxilina-eosina; Plexo submucoso; Neurônios.

ABSTRACT

Serafini S. *Distribution of ganglion cells in rectal mucosa and submucosa fragments for the diagnosis of Hirschsprung's disease* [teshis] São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo", 2022.

Background: Hirschsprung's disease (HD) is characterized by intestinal sub-occlusion and absence of enteric ganglion cells. The analysis of a fragment obtained by rectal biopsy confirms the diagnosis of HD. In a recent study, we demonstrated that the analysis of 60 sections per fragment of rectal mucosa and submucosa stained by HE may ensure a 90% diagnostic accuracy. In this study, in 54% of the cases, neurons were found in the final sections (50-60). This encouraged us to study their distribution in the rectal submucosa, as a means to simplify the diagnosis. OBJECTIVES: To develop a method that facilitates the diagnosis of HD by studying the distribution of ganglion cells in the submucosal plexus. To apply this method to samples from patients with suspected HD, in order to verify its accuracy. METHODS: Using the calretinin technique, we studied the distribution of ganglion cells in 60 cuts of rectal submucosa from 19 cadavers received at our morgue (SVOC). After the study, the reading method created was used for diagnosis in 47 cases of suspected HD, using HE staining. The accuracy of the methods was verified by comparing the results obtained with HE to those obtained with the acetylcholinesterase technique, considered as the golden standard in our laboratory. RESULTS: The study of ganglion cell distribution showed that just by examining 9-15 of the 60 sections we could already diagnose HD with 93% accuracy. CONCLUSION: The study of ganglion cell distribution enabled the creation of two simplified methods for reading the slides. The application of the methods achieved good accuracy and it can be used as an alternative in the diagnosis of HD.

Descriptors: Hirschsprung's disease; Rectum/biopsy; Submucosa; Hematoxylin-eosin; Submucosal plexus; Neurons.

1. INTRODUÇÃO

A Moléstia de Hirschsprung (MH), também conhecida como megacolo congênito, caracteriza-se pela suboclusão intestinal, tendo como substrato anatomopatológico a ausência de neurônios do sistema nervoso entérico, podendo haver comprometimento de segmentos variáveis do intestino grosso¹.

A primeira descrição da Moléstia de Hirschsprung foi realizada por Harald Hirschsprung no ano de 1886. Através do estudo de necropsia de duas crianças que haviam apresentado sintomas graves de obstipação intestinal e distensão abdominal, ele observou que existia uma relação entre esses sintomas e a hipertrofia e dilatação dos colos^{2,3,4,5}.

Este trabalho de Hirschsprung foi o precursor para um melhor entendimento da MH, pois estabeleceu os padrões clínicos da doença. Porém, a fisiopatologia desta afecção se manteve desconhecida por muitos anos.

Em 1901, Tittel, em seus estudos descreveu que a hipertrofia e dilatação dos colos também estava acompanhada de uma diminuição dos plexos ganglionares intramurais. E por fim, no ano de 1948, Whitehouse e Kernohan descreveram a etiopatogenia definitiva da doença que consiste na ausência das células ganglionares entéricas e na hipertrofia dos troncos nervosos.^{1, 2, 6,7}.

A hipótese mais aceita para explicar a causa da ausência de células ganglionares na MH discorre da interrupção do deslocamento dos neuroblastos, células precursoras dos neurônios, durante o processo de formação do sistema nervoso entérico (SNE)^{8,9}.

O SNE apresenta uma rede de neurônios dispersos ou reunidos em pequenos gânglios nos plexos submucoso e mioentérico. Estes plexos contêm tipos neuronais variáveis e um grande número de neurotransmissores e receptores, responsáveis por controlar a motilidade intestinal e vascular.

A formação do SNE se dá no período embrionário, por volta da 5ª semana de gestação. Células provenientes dos segmentos vagal e sacral da crista neural, denominadas neuroblastos, iniciam um processo de deslocamento no sentido crânio caudal através do mesênquima, seguindo em direção a porção terminal do tubo digestivo^{10,11}. Segundo Kawai¹², aproximadamente 400 a 600 milhões de células ganglionares irão surgir a partir da crista neural durante o desenvolvimento embrionário.

Okamoto e Ueda¹³ realizaram um estudo em embriões e fetos humanos no ano de 1967, e demonstraram que esse processo de deslocamento dos neuroblastos ocorre de forma gradativa. Segundo eles, até a 8ª semana de gestação essas células ainda não alcançaram a parte distal do colo e do reto, este evento só irá ocorrer aproximadamente na 12ª semana de gestação^{6,14}.

Concomitante ao deslocamento craniocaudal, há, também, uma movimentação dos neuroblastos para o interior da parede intestinal em direção à mucosa. Após este deslocamento interno, essas células irão se diferenciar em neurônios para formar os plexos mioentérico de Auerbach e os plexos submucosos de Meissner (submucoso superficial) e Henley (submucoso profundo). A diferenciação dos neuroblastos em neurônios irá se iniciar por volta da 10ª a 18ª semana de gestação, neste período é possível encontrar neurônios maduros, diferenciados e neurônios imaturos na região do tubo digestivo. O

processo de maturação dessas células se estende do período embrionário e fetal, podendo chegar até 3 semanas após o nascimento^{7,11,15,16,17,18}.

Um outro aspecto interessante relacionado às células ganglionares entéricas, é que a quantidade de neurônios formados na idade gestacional permanece a mesma ao longo de toda a vida adulta. Em um estudo recente em ratos, Kulkarni (2017)¹⁹, demonstrou que o SNE do adulto, através de um equilíbrio dinâmico entre apoptose neuronal e neurogênese, tende a manter o número de neurônios entéricos constante.

Quanto à distribuição dos plexos nervosos, os neurônios do plexo mioentérico se encontram dispostos em gânglios concentrados entre as camadas musculares. Já os neurônios dos plexos submucosos se organizam em gânglios distribuídos de forma difusa ao longo da região da submucosa^{14,17}. As células ganglionares de ambos os plexos irão se interconectar através de feixes nervosos.

Fibras parassimpáticas pré-ganglionares provenientes dos nervos vago e pélvico realizam sinapses com os neurônios intramurais e emitem fibras responsáveis por inervar a parede intestinal. Enquanto as fibras simpáticas, pós-ganglionares, adentram o intestino sem inervar diretamente a musculatura intestinal^{20,21,22}.

As células neurais do SNE realizam sinapses colinérgicas que são mediadas pela acetilcolina, mediador químico parassimpático. A quebra da acetilcolina ocorre através da atividade enzimática das colinesterases^{23,24}.

Na Moléstia de Hirschsprung há uma interrupção no deslocamento dos neuroblastos durante o período embrionário, determinando a ausência de células

ganglionares no segmento de intestino acometido. Na região afetada, além da ausência de neurônios, irá ocorrer a hipertrofia de troncos nervosos e um aumento da quantidade das enzimas de colinesterase^{23,24,25}.

Esta doença apresenta incidência de 1:5000 nascidos vivos e é considerada a causa mais comum de obstrução intestinal baixa em recém-nascidos. Possui uma prevalência de 4:1 para o gênero masculino. Há, também, uma diferença na distribuição da MH entre raças, apresentando uma incidência de 1,5:10.000 em brancos, 2,1:10.000 em negros, 1:10.000 em hispânicos e 2,8:10.000 em asiáticos^{4,26,27}.

Muitos estudos na área da genética molecular têm sido feitos com o objetivo de elucidar qual o motivo da ausência das células ganglionares. Os fatores genéticos irão influenciar na penetrância e grau de severidade da doença. Já existem 25 genes descritos que estão relacionados à aganglionose, e estes interagem em uma rede complexa. Dentre eles o proto-oncogene RET e o gene GDNF apresentam as mutações mais comuns, sendo incidente em 7 a 35% dos casos^{28,29,30}.

A MH também apresenta padrões de herança familiar, há um maior risco entre irmão de indivíduos afetados. Este risco varia de acordo com o sexo e com o tamanho do segmento acometido pela doença. Sendo que o risco global entre irmãos é de aproximadamente 4%³⁰.

Existe também uma associação da doença com algumas anomalias congênitas. Um exemplo é a síndrome de Down. Pacientes com a trissomia do cromossomo 21 apresentam um risco 100 vezes maior de serem acometidos por MH²⁹.

Porém todas essas alterações genéticas enumeradas acima representam apenas 50 % dos casos da doença. Os outros 50 % ainda se encontram sem resolução^{30,31}.

Quanto aos aspectos clínicos, como consequência da ausência de células neuronais, ocorrerá a contração e hipertrofia das fibras musculares acima da região afetada. A falta de peristaltismo na zona aganglionar irá dificultar a passagem das fezes, levando à dilatação do segmento ganglionar que se encontra acima da zona doente. Esta alteração na motilidade intestinal é a responsável pelos sintomas clínicos de suboclusão identificados nos pacientes com MH^{3,32}.

Estes pacientes acometidos pela doença, tendem a apresentar, já no período logo após o nascimento, distensão abdominal, dificuldade na eliminação de mecônio e vômitos. Submetidas a um exame de toque retal, essas crianças podem apresentar uma eliminação explosiva de gases e fezes. Porém, em alguns casos os sintomas podem surgir tardiamente, e as manifestações de constipação intestinal se agravam de modo progressivo, conforme a dieta sólida é introduzida^{3,33}.

Já a natureza clínica da MH está relacionada com a extensão do segmento comprometido. Na forma clássica da doença que ocorre em aproximadamente 80% dos casos, apenas a região do reto e sigmoide apresentam comprometimento. Mas o tamanho do segmento afetado pode variar, chegando ao comprometimento total de todo o colo, denominada aganglionose cólica total^{3,32}.

A extensão da região comprometida está diretamente ligada à interrupção no deslocamento dos neuroblastos. Quanto mais precoce esta interrupção, maior será o segmento doente, sendo que a porção terminal do intestino, a região retal, sempre apresentará a ausência de células ganglionares^{7,34}.

Após o paciente apresentar sintomas clínicos que sejam sugestivos de MH, existem alguns exames que podem ser realizados para a confirmação diagnóstica. O enema opaco, por exemplo, é um exame de imagem radiológica frequentemente utilizado. Em casos de moléstia de Hirschsprung, é possível visualizar a zona de transição entre a região de ganglionar, dilatada e a região de menor calibre, que corresponde à área sem células neuronais^{3,8}.

A manometria anorretal é um outro exame possível, onde será aferido o reflexo de abertura do esfíncter interno da criança. Se houver reflexo, afasta-se a suspeita de MH, porém se o reflexo for ausente pode ser sugestivo da doença^{3,8}.

Por fim, análise histopatológica de material obtido por exame de biópsia retal é o método que permite a realização do diagnóstico da MH, tendo em vista que em todas as possíveis variedades da doença, a região retal sempre estará comprometida. Este fragmento deve ser coletado a aproximadamente 1,5 – 2 cm da linha pectínea^{3,34,35, 36,37}.

O fragmento obtido através da biópsia poderá ser processado por congelação ou parafinização e em seguida tratado pela técnica de coloração disponível.

A parafinização seguida da coloração por Hematoxilina & Eosina (HE) em fragmentos de parede total do reto, é o método clássico para a realização do diagnóstico da doença, com acurácia próxima de 98%^{38,39,40}.

A coloração por HE é um método largamente utilizado nos laboratórios de anatomia patológica, tanto pela sua facilidade de preparo, quanto pelo baixo custo dos reagentes.

A hematoxilina é um corante de propriedade básica que irá se ligar aos componentes ácidos. Ela é convertida em hemateína, um composto de cor púrpura, através de uma reação de oxidação, sendo responsável pela coloração dos núcleos celulares. E a eosina tem o papel de contra corar a hematoxilina, conferindo um tom rosado ao citoplasma⁴¹.

Em um bom preparo histológico de fragmento de parede total do reto corado pelo HE, é possível a visualização das células ganglionares presentes no plexo mioentérico, afastando o diagnóstico da doença. Nos casos de MH, além da ausência das células ganglionares nos plexos, observa-se a hipertrofia de troncos nervosos^{3,33,38,42}.

Outro método utilizado no diagnóstico da doença é através da pesquisa da atividade de acetilcolinesterase (AChE)⁴³. No ano de 1972, Meier-Ruge demonstrou que havia um aumento da atividade da enzima acetilcolinesterase em fragmentos de intestino acometidos pela moléstia de Hirschsprung. Existem teorias de que as células neuronais entéricas funcionem como uma espécie de sensor de crescimento das fibras colinérgicas. Sendo assim, na falta destas células, as fibras, que são impregnadas de AChE, irão sofrer hipertrofia e hiperplasia, se espalhando em direção à mucosa. Isto explicaria porque os

pacientes doentes apresentam uma grande quantidade de fibras colinérgicas, na mucosa e submucosa do segmento intestinal acometido pela doença, em comparação com um intestino normal.^{7,44}.

O processo de coloração histoquímica para a pesquisa da enzima colinesterase é considerado um método eficiente no diagnóstico da MH, possuindo uma acurácia superior a 90%. Por esta razão ele é o método de escolha do nosso laboratório (LIM30-HCFMUSP), há mais de 30 anos, para o exame diagnóstico nos pacientes do Instituto da Criança (ICr)^{45,46,47}.

Para a realização da pesquisa de AChE é necessário apenas um pequeno fragmento de mucosa e submucosa obtido por biópsia retal. O material é congelado para o corte e em seguida é tratado pela técnica de Karnovsky e Roots. Esta técnica histoquímica consiste em um método de coloração direta que formará, através de diversas reações químicas, um precipitado acastanhado nos troncos e fibrilas onde houver a atividade da AChE, tornando essas estruturas fáceis de serem identificadas em microscópio óptico^{28,44}.

Também existe a possibilidade de fazer uso de técnicas imunohistoquímicas específicas para a identificação das estruturas do SNE. Dentre os marcadores que podem ser utilizados destaca-se a calretinina.

A calretinina é uma proteína de ligação de cálcio que é encontrada nas células ganglionares e nas fibrilas finas na região da *muscularis mucosae* e lâmina própria, em pacientes com inervação normal do intestino. Já em pacientes acometidos por MH, essa proteína é ausente³⁹.

Todos os métodos diagnósticos citados apresentam vantagens e desvantagens. O exame de pesquisa de atividade de AChE possui uma grande

sensibilidade no diagnóstico da MH. Além disso, com apenas um pequeno fragmento de mucosa e submucosa de aproximadamente 3 mm que pode ser obtido através de biópsia por sucção, já é suficiente para o diagnóstico. Por esta razão ela apresenta vantagem sobre a coloração HE, não só pela sua eficiência já comprovada, mas também pelo fato de não haver a necessidade de um fragmento de parede total do intestino. A biópsia feita para esse tipo de exame é bem menos invasiva para o paciente^{46,48,49}. Entretanto, a técnica não é tão acessível na prática clínica, pela dificuldade do processamento do material e pela utilização de reagentes e equipamentos que a tornam mais dispendiosa do que a coloração por HE^{46,50}.

Para a realização da técnica imunohistoquímica da calretinina, também é necessário apenas um pequeno fragmento de mucosa e submucosa, assim como o utilizado para a pesquisa de atividade de AChE, e o fragmento pode ser parafinado. Porém os métodos imunohistoquímicos também são mais dispendiosos e de execução mais elaborada quando comparados com a coloração por HE⁵¹.

Já a coloração HE é um método de execução simples, menos custoso e o mais amplamente utilizado pelos serviços. Porém, a grande desvantagem seria a necessidade da biópsia de parede total, um procedimento muito mais invasivo, se comparado com a biópsia de mucosa e submucosa, e nem sempre de fácil obtenção em crianças recém-nascidas. Muitos autores ainda discordam da possibilidade de se fazer um diagnóstico seguro da doença através da pesquisa de plexos nervosos apenas em fragmentos de mucosa e submucosa pelo HE, pois os neurônios se encontraram mais dispersos nessa região, o que poderia causar uma interpretação errônea de diagnóstico de falso-positivo^{8,46,52}.

Porém, em um trabalho recente do nosso laboratório, foi demonstrado que é possível realizar um diagnóstico seguro da MH apenas em fragmentos de mucosa e submucosa corados por HE, com tanto que sejam analisados no mínimo 60 cortes de cada fragmento. Neste mesmo trabalho, durante a leitura das lâminas, observamos que as células ganglionares foram localizadas mais facilmente entre os cortes finais dos fragmentos (corte 50-60), em 54% dos casos de pacientes com inervação normal do intestino⁵⁰.

Com a utilização deste método é possível realizar o diagnóstico da MH de uma forma segura, através de um método simples e menos invasivo. Mas, a necessidade de se analisar um grande número de cortes torna o processo de leitura das lâminas mais demorado. Segundo Qualman³⁵, a análise de um caso consumiria cerca de 30 a 60 minutos do tempo de um patologista.

Estes resultados fizeram com que surgisse o interesse de estudar melhor a distribuição das células ganglionares nos plexos da submucosa de pacientes normais, já que não há trabalhos pré-existentes que avaliem os neurônios entéricos na região da submucosa de pacientes hígidos. E a partir deste estudo, tentar elaborar um modelo que sistematize e facilite o processo de leitura das lâminas para o patologista, tornando-o mais eficiente.

É importante salientar que este estudo será de grande valia para os serviços de Cirurgia Pediátrica que não dispõem de métodos diagnósticos mais específicos para a MH, como a técnica da AChE e da calretinina.

2. OBJETIVOS

- 1- Estudar a distribuição das células ganglionares em fragmentos de mucosa e submucosa retal de pacientes com inervação normal do intestino para a elaboração de um método de sistematização para a leitura das lâminas.

- 2- Aplicação do método criado para diagnosticar a doença em pacientes com suspeita de MH.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

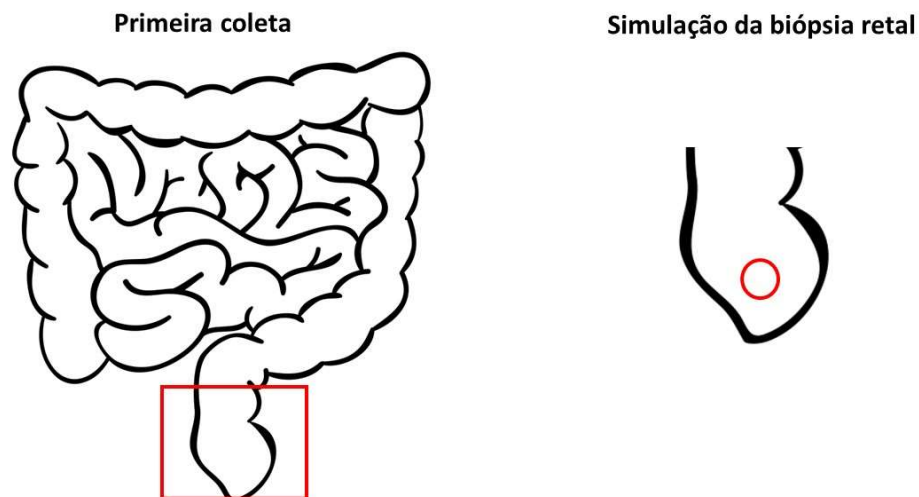
Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa sob o parecer nº 3.119.706. Obtivemos também uma carta de anuência do diretor do Serviço de Verificação de Óbitos da Capital (SVOC) – SP, e durante a entrevista com os familiares foi aplicado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

3.1. Distribuição das células ganglionares em amostras com inervação normal.

3.1.1. Obtenção das amostras

Foram obtidos, através de consentimento dos familiares, 19 fragmentos de reto provenientes de cadáveres encaminhados SVOC- SP entre julho de 2019 até março de 2020. Utilizamos como critério de exclusão neste trabalho os casos de mais de 12 horas post mortem, pois um tempo maior de doze horas para a coleta influenciava na qualidade do material; e os sujeitos que apresentavam doença de Chagas, já que esta pode ser responsável pela perda de células ganglionares nos plexos entéricos, levando ao Megacolo adquirido em adultos⁵³.

Os técnicos responsáveis pelo serviço de necropsia do SVOC-SP realizavam a coleta inicial, através da ressecção da porção terminal do intestino. Este material era acondicionado em solução de formol 10% e após a coleta o material era encaminhado ao nosso laboratório, onde era realizada a retirada um fragmento menor, simulando o procedimento de biópsia retal realizado em pacientes vivos.



* <https://www.ultracoloringpages.com/>

Figura 1: Esquema da coleta do material

3.1.2. Preparo do material

Estes 19 fragmentos menores foram processados pela técnica de parafinização e a inclusão do material feita no sentido perpendicular ao bloco, de modo que todos os cortes realizados apresentassem a espessura total da parede intestinal. Foram feitos 60 cortes de 3 μm seriados de cada fragmento com o auxílio de um micrótomo eletrônico (Leica RM2255, German). Como era necessário saber exatamente qual a era o corte correspondente de cada fragmento, para cada caso foram confeccionadas 5 lâminas com 12 cortes, totalizando as 60 secções. Os cortes eram dispostos da esquerda para a direita e de cima para baixo, como mostra a imagem a seguir:



Figura 2: Disposição dos cortes em relação às lâminas

Após o corte do material, realizamos a técnica imunohistoquímica da calretinina, que marcou em quais cortes as células ganglionares apareceram. Segue abaixo os detalhes da técnica de parafinização e do método imunohistoquímico da calretinina:

Os fragmentos foram fixados em formalina tamponada (10%). Após a fixação o tecido foi desidratado e diafanizado conforme protocolo abaixo:

- Passagem por seis cubas de álcool absoluto, permanecendo 1 hora em cada cuba;
- Passagem por três cubas de xilol, permanecendo 1 hora em cada cuba;
- Passagem por duas cubas de parafina a 60° C, permanecendo 1 hora em cada cuba;

Posteriormente, os fragmentos foram incluídos em blocos de parafina e seccionados. As lâminas permaneceram 24 horas em estufa a 60° C para a desparafinização. Em seguida, foram realizadas as seguintes etapas da técnica imunohistoquímica:

- Recuperação antigênica – as lâminas foram mergulhadas em um tampão de citrato pH 6,0 e colocadas em panela pascal à temperatura de 125° C, e pressão a 18 psi, por 30 segundos;
- Lavagem em água deionizada;
- Bloqueio da peroxidase endógena por 20 minutos em temperatura ambiente;
- Lavagem em água deionizada e banho de 5 minutos em tampão de lavagem TBST;
- Bloqueio de proteína por 30 min.
- Aplicação do anticorpo Rabbit Anti-Human Calretinin Monoclonal Antibody – Clone SP13 (Spring, USA) com diluição de 1:200;
- Lavagem de 5 minutos em tampão de lavagem TBST;
- Aplicação do polímero de visualização N-Histofine (DBS, USA), manter por 30 minutos em câmara úmida;
- Lavagem de 5 minutos em tampão de lavagem TBST;
- Aplicação do substrato cromógeno Diaminobenzidina, DAB (DBS, USA), incubação por 10 minutos
- Lavagem em água corrente
- Contra – coloração com Hematoxilina de Harris.

Foi verificado a presença ou ausência de células ganglionares em todos os 60 cortes de cada caso.



Figura 3: Reagentes e panela Pascal utilizados no preparo da técnica imunohistoquímica.

3.2. Análise estatística

Estudamos a distribuição das células neuronais pela distância em micras entre os plexos submucosos. Para este fim, realizamos a pesquisa de células ganglionares nos cortes, levando em consideração o tamanho da amostra de tecido analisada. Cada amostra compreendia de 60 secções de 3 μm de espessura, totalizando 180 μm . Através de análise de cortes equidistantes, verificamos qual a quantidade de cortes necessários e a distância em micras para que obtivéssemos uma acurácia diagnóstica satisfatória. Iniciamos a análise do material pelas extremidades (corte 1 e corte 60) e fomos inserindo novos cortes, sempre no ponto médio entre os cortes anteriores.

A análise foi realizada da seguinte maneira:

- a. Acurácia analisando o primeiro e o último corte - distância de 180 micras.

- b. Acurácia analisando o primeiro, o corte 30 e o último corte – distância de 90 micras.
- c. Acurácia analisando o primeiro, o corte 15, 30, 45 e o último corte – distância de 45 micras.
- d. Acurácia analisando o primeiro, o corte 8, 15, 22, 30, 37, 45, 52 e o último corte – distância de 20 micras.

Realizamos também, uma segunda análise baseada na quantidade total de células ganglionares presentes nas amostras, através do uso de análise combinatória, onde foram geradas as combinações de leitura (conjuntos de cortes) possíveis para um diagnóstico acertivo.

Cada conjunto de corte foi testado através da técnica de *Bootstrapping* para avaliar a sua acurácia:

- a. Foram geradas randomicamente 1.000 amostras a partir da base inicial.
- b. Foi calculada a acurácia (quantidade de previsões corretas dividida pelo número de amostras).
- c. Os processos a e b foram repetidos 100 vezes.
- d. A acurácia do conjunto de cortes foi definida como a média entre as acurácias obtidas após as 100 repetições.

Foram selecionados para o método de leitura os 15 cortes que obtiveram maior incidência dentre todas as possibilidades geradas.

O software R versão 4.0.2 foi utilizado para a realização de todas as análises.

3.3. Aplicação dos modelos no diagnóstico

Rotineiramente são processadas no Laboratório de Investigação Médica em Cirurgia Pediátrica (LIM30 - HCFMUSP) biópsias retais, provenientes de crianças atendidas no Instituto da Criança para o diagnóstico da Moléstia de Hirschsprung. Tendo em vista este objetivo, no ICr, são colhidas de cada criança com suspeita de MH dois pequenos fragmentos de reto, compreendendo mucosa e submucosa, ambos medindo aproximadamente cinco milímetros. Um dos fragmentos é congelado para a realização do método AChE, e o outro fixado em solução de formol (10%) e emblocado em parafina. Este material emblocado em parafina permanece arquivado em nosso laboratório para eventual necessidade de complementação diagnóstica.

3.3.1. Método de seleção dos casos

Entre os anos de 2016 a 2019 foram realizadas em nosso serviço 90 biópsias destinadas ao diagnóstico de MH. Deste total, 26 biópsias foram excluídas deste estudo, por não atenderem aos critérios de seleção.

Casos excluídos:

- Blocos que haviam sido utilizados previamente em estudos complementares: 9 casos;
- Material inadequado: 7 casos de epitélio estratificado e 10 casos de biópsia de colostomia.

Restaram, portanto, 64 amostras adequadas para serem utilizadas neste estudo.

3.3.2. Preparo das amostras

As biópsias de mucosa e submucosa colhidas para o diagnóstico de MH foram obtidas pelo cirurgião, e encaminhadas rapidamente ao laboratório de cirurgia pediátrica LIM-30, sendo uma parte do material acondicionada em papel umedecido e a outra parte em solução de formol a 10%.

O fragmento destinado à pesquisa da AChE é processado por congelamento e posteriormente seccionado em criostato. A atividade de acetilcolinesterase foi demonstrada pelo método de Karnovsky e Roots⁴⁴ e contra corada pela hematoxilina de Carrazzi. Descrevemos a técnica abaixo:

O material a fresco, logo após a coleta, foi apoiado em um bloco de fígado de rato para facilitar o corte, com a mucosa voltada para o lado externo e a submucosa em contato com o fígado. Depois foi mergulhado em hexano e congelado em nitrogênio líquido em seguida.

Após a criogenização a peça foi fixada em um disco metálico com o auxílio de meio específico de inclusão para criostato (Killik – EasyPath, Brasil) e cortada em criostato (IEC CTF Microtome–Cryostat – Damon, USA) mantido a 12°C negativos. Obteve-se, em média, 18 cortes histológicos de 10 µ de espessura. Os cortes foram captados em lamínulas com a ajuda de um pincel e processados pelo método histoquímico de Karnovsky e Roots⁴⁴, com a modificação de Hanker et al⁵⁴.

Neste método, a acetilcolinesterase reduz o iodeto de acetilcolina em tiocolina livre que, por sua vez, reage com o ferricianeto de potássio transformando-o em ferrocianeto que se deposita em forma de sal de cobre

insolúvel. Hanker e cols⁵⁴ adicionaram tetra óxido de ósmio à reação, o que proporciona uma melhor visibilidade das fibras colinérgicas.

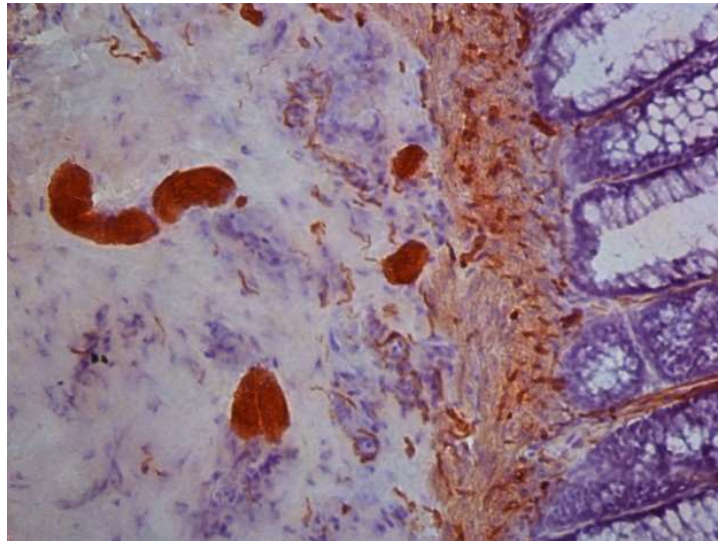


Figura 4: Visualização dos troncos e fibrilas em fragmento de biópsia retal preparado pela técnica da AChE. Aumento 200x.

O material foi incubado por 90 minutos em estufa à 37°C. O meio de incubação consiste em:

- 5 mg de iodeto de acetilcolina (Sigma Audrich – Germany)
- 6,5 ml de tampão acetato de sódio;
- 0,5 ml de citrato de sódio (0,1M);
- 1 ml de sulfato de cobre (30mM);
- 1 ml de água destilada;
- 0,2 ml de Iso-OMPA (4mM);
- 1 ml de ferricianeto de potássio (5mM);

Após essa etapa, as lâminas foram lavadas em água destilada, contra coradas pela Hematoxilina de Carrazzi por 5 minutos, processadas pela etapa de desidratação e clareamento: álcool 70%, álcool 80%, álcool 90%, álcool

absoluto e xilol e em seguidas montadas em resina sintética (Entellan – Merck, German).

Concomitantemente, o material fixado em formol é emblocado em parafina e permanece arquivado em nosso laboratório para alguma possível dúvida diagnóstica.

Utilizamos os 64 blocos de parafina que foram cortados com o auxílio de um micrótomo eletrônico (Leica RM2255, German). Foram seccionados 60 cortes seriados de 3 μ por caso, para serem processados pela hematoxilina-eosina. Durante a etapa dos cortes histológicos, alguns blocos não apresentaram os requisitos necessários para serem incluídos no estudo, 4 blocos de epitélio estratificado e 13 blocos onde não havia representação adequada da submucosa.

Esses 17 blocos também foram excluídos do trabalho. Restando assim 47 casos a serem analisados.

As lâminas contendo os 60 cortes seriados destinados ao HE foram desparafinizadas em estufa a 60°C por 30 minutos, com um banho de xilol quente e dois banhos de xilol à temperatura ambiente. A técnica de coloração Hematoxilina-eosina consiste em:

- 2 passagens em álcool absoluto;
- Lavagem em água corrente;
- 5 minutos imersas em Hematoxilina de Harris;
- Lavagem em água corrente;
- 3 minutos imersas em Eosina;
- 9 passagens em álcool absoluto;

- 3 passagens em xilol.

Após a coloração as lâminas foram montadas em resina sintética (Entellan – Merck, German).

Sem ter qualquer informação do diagnóstico prévio das lâminas processadas pela AChE, foi realizada a leitura das lâminas coradas pelo método de HE utilizando as fórmulas criadas, com o objetivo de identificar a presença ou ausência de células ganglionares nos plexos submucosos. Abaixo imagem de um plexo submucoso com duas células ganglionares em evidência. Aumento de 400x.

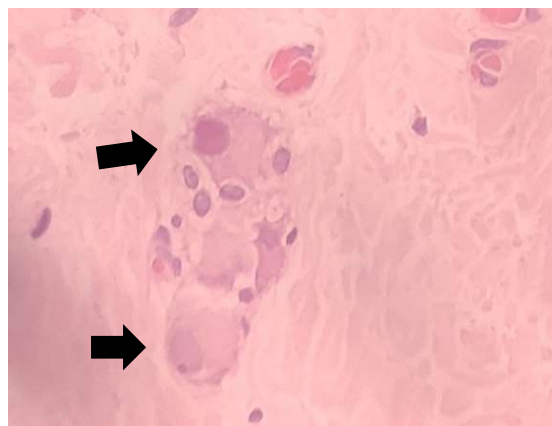


Figura 5: Plexo submucoso com duas células ganglionares em evidência pelas setas. Coloração HE. Aumento de 400x.

3.4. Análise estatística

Para analisar a concordância entre a coloração HE e a técnica padrão ouro da AChE, utilizamos o modelo estatístico de Kappa e Qui-quadrado para os

valores de acurácia, sensibilidade e especificidade a partir da construção de tabelas de contingência.

O software R versão 4.0.2 foi utilizado para a realização de todas as análises.

4. RESULTADOS

4.1. Estudo da distribuição dos plexos ganglionares nas amostras com inervação normal do reto.

Dentre os 19 doadores participantes do estudo da distribuição das células neuronais, 12 eram do sexo masculino e 7 do feminino. As idades variaram entre 26 a 92 anos e a quantidade de neurônios e plexos também apresentou variações, como demonstrado na tabela a seguir:

Tabela 1: Características dos doadores do estudo da distribuição dos plexos ganglionares nas amostras com inervação normal do reto – Gênero, idade, tempo de coleta, quantidade de plexos, localização e quantidade de células ganglionares.

| DOADOR | GENÊRO | IDADE | POST MORTEM | PLEXOS em 180µm | LOCALIZAÇÃO APROXIMADA DOS PLEXOS | CÉLULAS GANGLIONARES em 180µm |
|--------|--------|-------|-------------|-----------------|---|-------------------------------|
| 1 | masc | 87 | 12h | 7 | 6µm - 27µm - 60µm - 81µm - 138µm - 165µm - 180µm | 11 |
| 2 | fem | 55 | 10h | 10 | 6µm - 18µm - 24µm - 63µm - 78µm - 102µm - 114µm - 120µm - 138µm - 174µm | 13 |
| 3 | masc | 43 | 10h | 15 | 6µm - 21µm - 33µm - 42µm - 51µm - 60µm - 75µm - 84µm - 93µm - 102µm - 129µm - 147µm - 156µm - 162µm - 180µm | 32 |
| 4 | masc | 55 | 12h | 12 | 12µm - 18µm - 45µm - 54µm - 87µm - 114µm - 120µm - 135µm - 141µm - 153µm - 171µm - 177µm | 15 |
| 5 | masc | 26 | 10h | 11 | 21µm - 42µm - 69µm - 78µm - 93µm - 102µm - 111µm - 123µm - 138µm - 162µm - 177µm | 18 |
| 6 | fem | 60 | 9h | 8 | 30µm - 57µm - 69µm - 78µm - 93µm - 111µm - 135µm - 165µm | 12 |
| 7 | masc | 71 | 10h | 12 | 9µm - 27µm - 48µm - 60µm - 90µm - 99µm - 108µm - 114µm - 132µm - 144µm - 153µm - 177µm | 18 |
| 8 | fem | 86 | 9h | 9 | 12µm - 27µm - 51µm - 78µm - 141µm - 153µm - 165µm - 174µm - 180µm | 12 |
| 9 | fem | 92 | 10h | 8 | 12µm - 42µm - 60µm - 81µm - 96µm - 129µm - 150µm - 177µm | 10 |
| 10 | masc | 65 | 10h | 14 | 9µm - 24µm - 30µm - 48µm - 69µm - 84µm - 96µm - 105µm - 114µm - 129µm - 141µm - 160µm - 169µm - 180µm | 28 |
| 11 | masc | 65 | 7h | 6 | 18µm - 45µm - 51µm - 60µm - 168µm - 180µm | 21 |
| 12 | masc | 54 | 11h | 10 | 12µm - 27µm - 36µm - 54µm - 87µm - 105µm - 120µm - 141µm - 150µm - 180µm | 19 |
| 13 | masc | 47 | 11h | 12 | 12µm - 27µm - 39µm - 57µm - 75µm - 93µm - 114µm - 126µm - 141µm - 153µm - 168µm - 180µm | 21 |
| 14 | masc | 58 | 7h | 12 | 3µm - 24µm - 36µm - 57µm - 69µm - 87µm - 99µm - 114µm - 132µm - 153µm - 165µm - 180µm | 22 |
| 15 | fem | 83 | 12h | 10 | 6µm - 24µm - 45µm - 57µm - 72µm - 87µm - 108µm - 129µm - 144µm - 165µm | 24 |
| 16 | masc | 76 | 12h | 10 | 3µm - 21µm - 45µm - 69µm - 90µm - 81µm - 111µm - 129µm - 144µm - 162µm | 22 |
| 17 | fem | 89 | 8h | 9 | 21µm - 57µm - 75µm - 99µm - 120µm - 147µm - 156µm - 168µm - 180µm | 18 |
| 18 | fem | 84 | 7h | 11 | 12µm - 21µm - 39µm - 66µm - 84µm - 99µm - 114µm - 126µm - 144µm - 162µm - 177µm | 22 |
| 19 | masc | 52 | 11h | 11 | 12µm - 24µm - 42µm - 63µm - 78µm - 102µm - 114µm - 141µm - 153µm - 165µm - 177µm | 20 |

Foram analisados todos os 60 cortes de cada fragmento. Em uma tabela era anotado em quais cortes de cada amostra as células ganglionares estavam presentes.

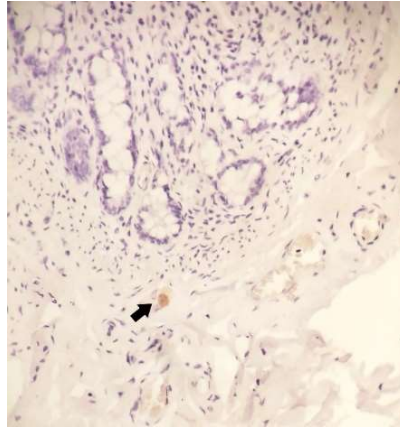


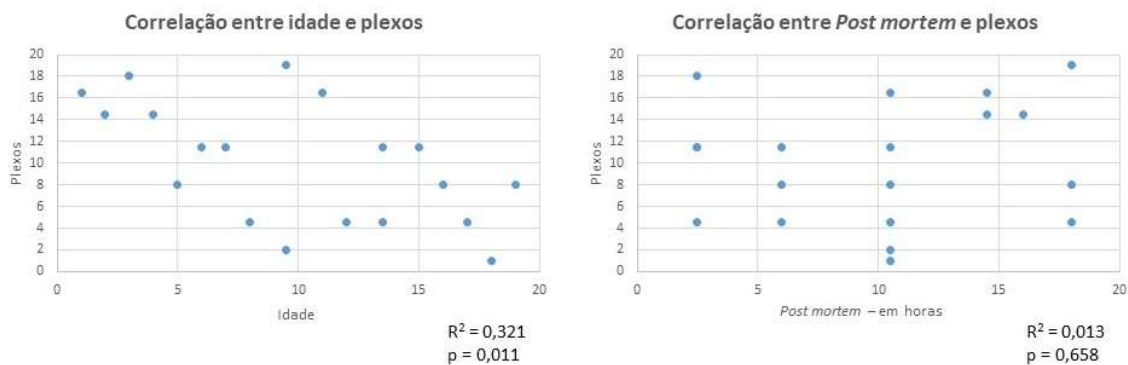
Figura 6: Neurônio marcado pela calretinina em um plexo submucoso. Aumento de 200x.

Através do teste estatístico de Spearman verificamos se a idade do doador ou o tempo entre o óbito e a coleta do material estavam correlacionados com o número de neurônios visualizados nas amostras e obtivemos os seguintes valores:

Tabela 2: Valores da correlação de Spearman.

| Idade x plexos | | <i>Post mortem</i> x plexos | |
|--------------------------------|-------|------------------------------------|------|
| Rho (ρ) | -0,56 | Rho (ρ) | 0,10 |
| R² | 0,32 | R² | 0,01 |
| p | 0,01 | p | 0,65 |

Gráfico 1: Correlação de Spearman entre a idade e tempo de coleta dos doadores x quantidade de plexos visualizados.



4.2. Análise por cortes equidistantes

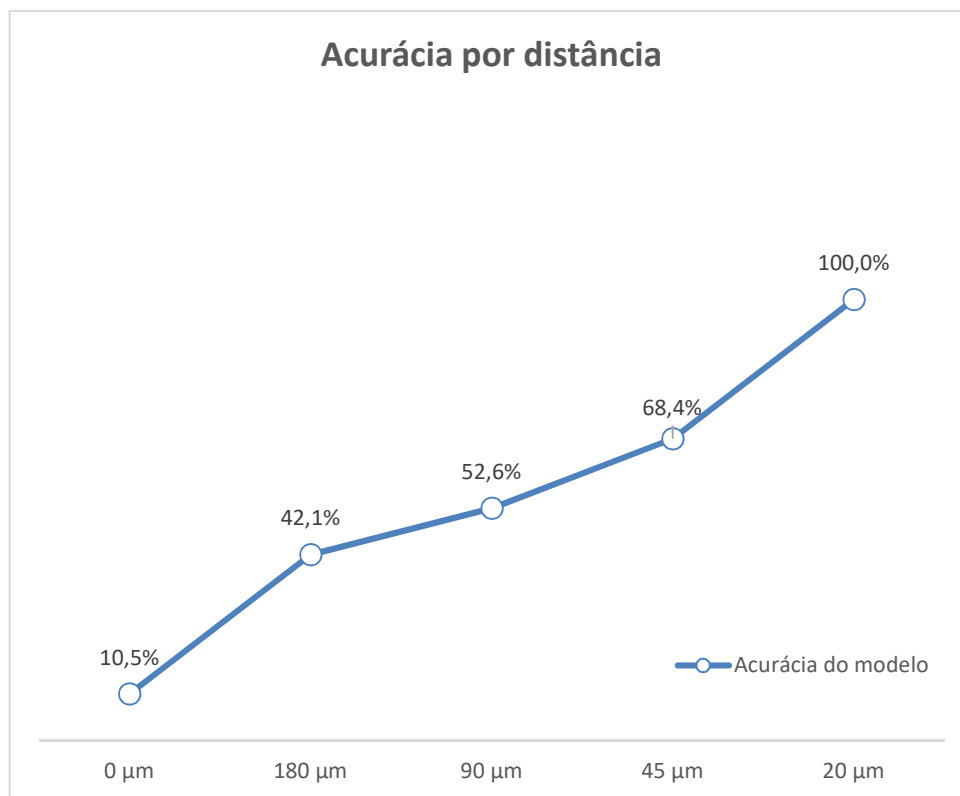
A análise da acurácia por cortes equidistantes foi feita a partir das extremidades da amostra. Cada novo corte era introduzido no ponto médio entre os pontos anteriores, para manter as distâncias entre os cortes iguais. Fomos introduzindo novos cortes até atingirmos uma acurácia que fosse superior a 90%.

Com essa abordagem, segundo os dados obtidos no estudo da distribuição das células ganglionares, seria possível alcançar uma acurácia de 100%, através da visualização de 9 cortes com uma distância de 20 micras entre eles.

Tabela 3: Tabela comparando os valores de acurácia de acordo com os cortes equidistantes.

| Distância entre os cortes | Qtd de cortes | Cortes | Acurácia do modelo |
|---------------------------|---------------|----------------------------------|--------------------|
| 0 μm | 1 | 1 | 10,5% |
| 180 μm | 2 | 1, 60 | 42,1% |
| 90 μm | 3 | 1, 30, 60 | 52,6% |
| 45 μm | 5 | 1, 15, 30, 45, 60 | 68,4% |
| 20 μm | 9 | 1, 8, 15, 22, 30, 37, 45, 52, 60 | 100,0% |

Gráfico 2: Valores de acurácia por cortes equidistantes.



4.2.1. Aplicação do método na leitura do HE

Dos 47 casos de biopsia provenientes do ICr estudados neste trabalho, 31 eram de crianças portadoras de MH e os outros 16 de crianças que não apresentavam a doença, de acordo com o diagnóstico realizado pelo padrão-ouro da AChE.

O modelo foi aplicado na leitura do HE das biopsias dos 47 pacientes e a acurácia medida nessa base de validação atingiu 93,5%.

Na comparação entre o método de leitura aplicado no HE com o diagnóstico da AChE, obtivemos os seguintes resultados. O método de coloração HE apresentou concordância com o método AChE em 93,5% dos casos, com um índice Kappa de 0,850 (p-valor < 0,00001). Os 3 casos discordantes foram falsos-positivos.

Tabela 4: Comparação entre o diagnóstico realizado pela técnica do HE com os da AChE (padrão ouro). Negativo significa não doente e Positivo presença de MH para ambos os métodos – Método de leitura por cortes equidistantes.

| | | Comparação AChE x HE | | |
|------|----------|----------------------|----------|-------|
| | | HE | | |
| | | Positivo | Negativo | Total |
| AChE | Positivo | 31 | 0 | 31 |
| | Negativo | 3 | 13 | 16 |
| | Total | 34 | 13 | 47 |

Tabela 5: Valores para validação da Hematoxilina & Eosina – Método de leitura por cortes equidistantes.

| | |
|-----------------------|-------|
| Acurácia | 0,935 |
| Sensibilidade | 0,911 |
| Especificidade | 1,000 |
| VPN | 0,812 |
| VPP | 1,000 |

Realizamos uma releitura dos 3 casos considerados falsos-positivos e não detectamos células ganglionares em nenhum dos nove cortes selecionados para o diagnóstico.

4.3. Método de sistematização obtido pela técnica de Bootstrapping

Utilizando as informações obtidas pela leitura das lâminas, através de análise combinatória seguida da técnica de Bootstrapping, foram geradas todas as combinações possíveis para realizar a leitura das lâminas com uma acurácia satisfatória.

Fazendo o uso de um total de 5 cortes por conjunto, foram gerados 80.035 conjuntos onde seria possível realizar o diagnóstico da MH com acurácia superior a 80%.

Como foram criadas mais de 80 mil possibilidades para leitura das lâminas com acurácia satisfatória e não seria possível testar todas essas possibilidades,

escolhemos para a fórmula os quinze cortes que mais se repetiram em todos os conjuntos (cortes selecionados: 4, 9, 10, 20, 23, 26, 27, 32, 46, 47, 48, 51, 55, 56 e 59).

Tabela 6: Mostrando o ranqueamento dos cortes escolhidos na primeira coluna. A segunda coluna apresenta o corte selecionado, a terceira coluna representa a quantidade de vezes que esse corte estava presente no total de conjuntos gerados e quarta coluna apresenta esse número em porcentagem.

| Ranking | Corte | Qtde | % |
|---------|-------|--------|-----|
| 1 | 59 | 295925 | 28% |
| 2 | 23 | 277442 | 26% |
| 3 | 4 | 227613 | 22% |
| 4 | 26 | 208033 | 20% |
| 5 | 27 | 203252 | 19% |
| 6 | 9 | 191833 | 18% |
| 7 | 20 | 188683 | 18% |
| 8 | 55 | 186250 | 18% |
| 9 | 51 | 183404 | 17% |
| 10 | 10 | 180496 | 17% |
| 11 | 32 | 177554 | 17% |
| 12 | 47 | 176396 | 17% |
| 13 | 56 | 171363 | 16% |
| 14 | 46 | 168304 | 16% |
| 15 | 48 | 149700 | 14% |

4.3.1. Aplicação do método na leitura do HE

As amostras de biopsia coradas pelo HE foram analisadas de acordo com a fórmula criada através do Bootstrapping, e apenas os quinze cortes selecionados (4, 9, 10, 20, 23, 26, 27, 32, 46, 47, 48, 51, 55, 56 e 59) foram utilizados para o diagnóstico.

Após a leitura, realizamos a comparação dos resultados do HE com o nosso padrão ouro da pesquisa de colinesterase. O método de coloração HE apresentou concordância com o método AChE em 93,6% dos casos, com um índice Kappa de 0,850 (p-valor < 0,00001). Dos 3 casos discordantes 1 foi um falso-positivo e dois falsos-negativos.

Tabela 7: Comparação entre o diagnóstico realizado pela técnica do HE com os da AChE (padrão ouro). Negativo significa não doente e Positivo presença de MH para ambos os métodos – Método de Bootstrapping.

| | | Comparação AChE x HE | | |
|------|----------|----------------------|----------|-------|
| | | HE | | |
| | | Positivo | Negativo | Total |
| AChE | Positivo | 31 | 2 | 33 |
| | Negativo | 1 | 13 | 14 |
| | Total | 2 | 15 | 47 |

Também foram alcançados valores significativos de acurácia, sensibilidade e especificidade.

Tabela 8: Valores para validação do método da Hematoxilina – Eosina – Método Bootstrapping.

| | |
|-----------------------|-------|
| Acurácia | 0,936 |
| Sensibilidade | 0,929 |
| Especificidade | 0,939 |
| VPN | 0,867 |
| VPP | 0,969 |

Submetemos os dois casos que foram considerados como falso-negativos (caso 6 e 25) à técnica imunohistoquímica da calretinina para verificar se as estruturas visualizadas eram mesmo células ganglionares, e em ambos os casos a marcação da calretinina foi positiva, demonstrando que a leitura realizada pelo método HE estava correta.

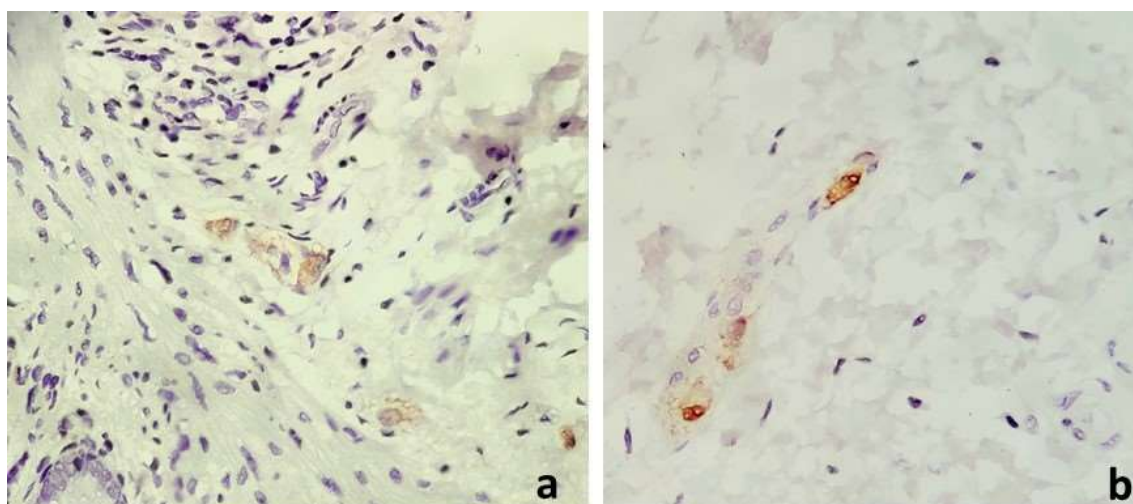


Figura 7: Imagens dos casos considerados falso-positivos pela comparação com o padrão ouro da AChE submetidos a técnica da calretinina. Ambos com marcação de células ganglionares. Figura **a** – caso 6, aumento de 200x. Figura **b** – caso 25, aumento de 400x.

Já o caso considerado como falso-positivo foi reavaliado e na nova leitura das lâminas, foi encontrado um plexo com células ganglionares no corte 4. Neste caso então, o erro foi do observador.

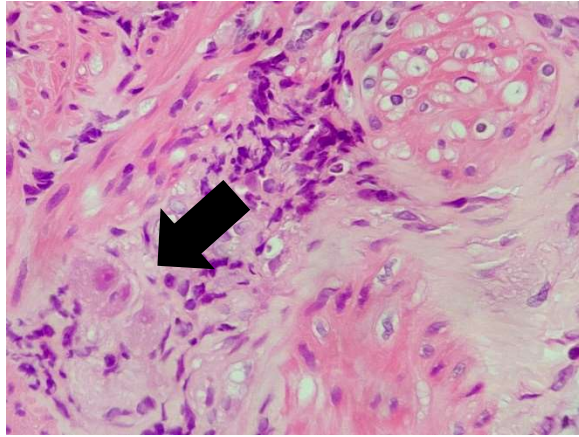


Figura 8: Imagem de plexo submucoso encontrado no corte 4 do caso 8 que havia sido considerado como falso – positivo. Coloração HE. Aumento de 400x.

5. DISCUSSÃO

Embora a primeira descrição da MH tenha sido feita em 1886 por Harald Hirschsprung, a doença ainda se apresenta como um desafio, tanto na esfera de sua etiopatogenia quanto nos seus aspectos genéticos.^{2,30,55}

Após a caracterização fisiopatológica da MH realizada em 1948 por Whitehouse e Kernohan, a biópsia retal tornou-se o método de certeza para a confirmação do diagnóstico. Mas, ainda existem muitas discussões relacionadas com a melhor técnica de preparo do material obtido através da biópsia^{1,2,56}.

Em 1955, foi demonstrado por Swenson⁴⁰, a possibilidade de se realizar um diagnóstico com acurácia aproximada de 98% em fragmentos de parede total do reto, obtidos por biópsia e tratados pela coloração HE. A partir deste estudo, esse se tornou o método clássico para diagnosticar a MH. Porém para a coleta de um fragmento de parede total, faz-se necessário o uso de anestesia geral, o que torna o procedimento mais invasivo e com uma maior dificuldade de realização, sobretudo em crianças recém-nascidas^{36,50,57}.

Em 1960, Bodian⁵⁶ indicou que o procedimento poderia ser realizado em pequenos fragmentos que contivessem apenas mucosa e submucosa, pensando em reverter essa questão da necessidade de anestesia geral para a coleta do material. Este método, na época, não foi bem aceito pela comunidade científica, devido à localização dispersa dos neurônios na região da submucosa, o que dificultaria o diagnóstico.

Então, quando Meier – Ruge⁴³ descreveu a técnica histoquímica de pesquisa de atividade de AChE, no ano de 1972, este se transformou no método

de escolha em muitos serviços para a realização do diagnóstico. Já que era uma técnica específica, e que necessitava de um fragmento de mucosa e submucosa apenas. Aqui no nosso serviço, LIM30-HCFMUSP foi eleita como padrão-ouro para o diagnóstico da MH. Em um estudo publicado em 2008, Santos, M.M demonstrou que a pesquisa de AChE obteve uma acurácia de 93,5%, através da análise de material de 297 crianças que foram submetidas ao exame de biopsia retal para confirmação da MH aqui no ICr – HCFMUSP⁴⁶. Ainda que seja uma técnica específica e de boa acurácia, ela não é muito utilizada aqui no Brasil, isso se deve ao fato do uso de reagentes específicos, criostato, e o material pode sofrer autólise com muita facilidade, necessitando também de mão-de-obra treinada para sua execução.

Com o avanço das técnicas imunohistoquímicas, criou-se a possibilidade de diagnosticar a MH através do marcador para a calretinina. Para este método, um fragmento de mucosa e submucosa também é o suficiente.

Atualmente, a pesquisa de atividade de AChE e a marcação imunohistoquímica da calretinina, são as técnicas mais utilizadas para o diagnóstico da MH em fragmentos de mucosa e submucosa retal^{39,46,51,59}. Porém, novos trabalhos têm surgido com o objetivo de simplificar o diagnóstico revisitando o uso da coloração HE nestes fragmentos de mucosa e submucosa retal^{8,35,48,50,60}.

A utilização da coloração HE para a detecção das células ganglionares nos plexos submucosos para o diagnóstico da MH, apesar de ser um método simples e rápido, ainda gera muitas controvérsias. Diversos autores citam a

dificuldade para identificar os neurônios nesses plexos, já que eles se distribuem de forma difusa ao longo da submucosa intestinal^{35,40,47}.

Demonstramos em um trabalho anterior⁵⁰ a possibilidade de contornar o problema da dispersão dos neurônios, desde que fossem realizados 60 cortes de um mesmo fragmento para a avaliação das células ganglionares. Durante esta pesquisa notou-se que as células ganglionares estavam presentes com uma maior frequência nos cortes finais do fragmento.

Esse achado nos levou a estudar a distribuição dos neurônios em intestinos com inervação normal, pensando em criar uma sistematização para leitura das lâminas que tornasse o diagnóstico mais simples, minimizando o trabalho do patologista, pois não seria necessário analisar um número tão grande de cortes para um diagnóstico com uma boa acurácia. Esta sistematização poderia agilizar o processo de observação das lâminas, já que para avaliar 60 cortes, um patologista leva em média de 30 a 60 minutos^{35,61}.

A criação de um método de sistematização traz benefícios tanto para o paciente, pois é possível realizar o diagnóstico com um exame menos invasivo, quanto para o patologista, que consegue fazer a análise histopatológica mais facilmente, utilizando uma técnica simples e barata, disponível em todos os laboratórios de anatomia patológica.

O estudo dos fragmentos de intestinos normais foi realizado em material *post mortem* coletado de doadores adultos. Optamos por adultos, e não crianças, pela facilidade de obtenção das amostras, já que a diferença entre a inervação intestinal em adultos e crianças está apenas relacionada com a maturação das células ganglionares. Sabe-se que em alguns casos, esta pode ocorrer somente

3 semanas após o nascimento, o que não iria interferir no nosso estudo, pois para esta parte do trabalho era do nosso interesse saber apenas se os neurônios estavam presentes ou não.^{12,18,19}

Também não há diferenças a serem consideradas quanto a quantidade de células neuronais entre adultos e crianças. Já foi demonstrado que o SNE mantém o número de neurônios constante ao longo da vida através de um balanço entre apoptose e neurogênese¹⁹.

Os únicos fatores de exclusão considerados para este trabalho estavam relacionados ao tempo entre o óbito e a coleta, pois verificamos que um período maior que doze horas poderia comprometer a integridade do material, levando à autólise do tecido. E também como fator de exclusão, não utilizamos neste trabalho nenhuma amostra de doadores que haviam sido acometidos por Doença de Chagas, já que esta doença, em alguns casos, leva ao Megacolo Adquirido, que consiste na perda das células ganglionares entéricas⁵³.

Optamos pelo uso do marcador imunohistoquímico da calretinina e não da coloração HE nessa primeira parte do estudo, porque era importante contarmos todas as células neuronais presentes nas amostras. Desta forma optamos por um marcador específico para que nenhuma célula ganglionar passasse despercebida pelo observador durante a leitura dos cortes^{51,59}.

Os doadores apresentavam sexo e idade variados, sendo doze homens e sete mulheres, com idade entre 26 e 92 anos. O número de células neuronais e plexos observados também obtiveram variações. Entre 10 e 32 células por amostra, com média de 18 neurônios e desvio padrão de 5,72.

Não encontramos correlação entre a quantidade de plexos observados na amostra e a idade do doador, demonstrando que não existe diferença entre o número de neurônios relacionado com a idade, ao contrário do que se pensava anteriormente de que com o envelhecimento, os plexos intestinais poderiam perder suas células^{19,62}. Também não houve correlação do tempo entre o óbito e a coleta do material com a quantidade de células observadas nas amostras.

Na análise da localização dos plexos neuronais por cortes equidistantes, priorizamos demonstrar qual era a distância aproximada entre os plexos ganglionares. Para este feito, iniciamos a análise do material pelas extremidades (corte 1 e corte 60) e fomos inserindo novos cortes, sempre no ponto médio entre os cortes anteriores, até atingirmos uma acurácia satisfatória. Chegamos a um total de 9 cortes com uma distância de 20 μm entre eles. Aplicamos este método de leitura nos casos suspeitos de MH e obtivemos acurácia de 93,5%, demonstrando assim que o modelo criado alcança uma acurácia similar aos métodos específicos, sendo valido para o diagnóstico da doença^{39,46,50,59}.

Na comparação entre o método de leitura por cortes equidistantes e o diagnóstico da AChE, houve apenas três casos divergentes, considerados falsos positivos, isto é, dentre os nove cortes sugeridos para a leitura, nenhuma célula ganglionar estava presente, mas o paciente apresentava inervação normal do intestino. Reavaliamos esses cortes, e de fato, não havia a presença de neurônios no material analisado.

Portanto, através desse estudo é possível afirmar que analisando um material de biópsia retal a cada 20 μm existe uma grande chance de visualizar um plexo submucoso nos pacientes com inervação normal do intestino.

Já através da análise da distribuição dos neurônios nos fragmentos com inervação normal pelo método estatístico de Bootstrapping, conseguimos, dentre os 60 cortes, escolher apenas 15 cortes. Verificamos que estes 15 cortes selecionados possuíam uma maior incidência de células ganglionares se comparados com os demais cortes, apresentando assim uma boa representação do material.

Durante a aplicação deste modelo de sistematização nos 47 casos de suspeita de MH com a coloração HE, realizamos a leitura das lâminas observando apenas esses 15 cortes e obtivemos uma acurácia satisfatória de 93%.

Na comparação dos resultados do HE com o nosso padrão ouro para o diagnóstico (AChE) houve apenas um caso de falso-positivo, e durante a reavaliação das lâminas verificamos que foi um erro de observador, pois havia uma célula ganglionar no corte 4, que foi um dos cortes selecionados para o modelo^{56,60}.

Também houve dois casos em que foram visualizados neurônios na coloração HE, mas o diagnóstico pela técnica da AChE demonstrava atividade da acetilcolinesterase. Estes dois casos foram revistos pela calretinina e foi confirmada a presença dos neurônios.

Ao analisarmos o prontuário destes dois pacientes, verificamos que o paciente 4 possuía um laudo anatomopatológico da biopsia retal, realizado pela Divisão de Anatomia Patológica (DAP) do laboratório central do HCFMUSP, onde também não foram visualizadas células ganglionares. O paciente foi

submetido à cirurgia de abaixamento e de retirada de coto, ambos os produtos de ressecção cirúrgica possuíam células ganglionares.

Já o paciente 25, não possuía um laudo anatomopatológico do fragmento de biópsia retal do DAP, apenas o da biópsia de colostomia que era positivo para células ganglionares. Também foram realizados os procedimentos de abaixamento e ressecção de coto com anatomopatológico positivo para células ganglionares.

Acreditamos que, em ambos os casos, a biópsia retal tenha sido realizada na zona de transição da MH, região que pode apresentar tanto neurônios quanto atividade aumentada da colinesterase em fibrilas e troncos nervosos³⁷. Sabe-se que a doença atinge porções variadas do intestino, e em sua versão curta, a região afetada pode estar bem próxima da linha pectínea, o que poderia levar ao resultado anatomopatológico conflitante entre as técnicas de AChE e HE. Por esta razão reiteramos a importância de correlacionar o resultado do exame anatomopatológico com o histórico clínico do paciente⁵.

Ambos os métodos de leitura formulados neste trabalho apresentaram acurácia próxima à alcançada pelos métodos específicos. Na literatura podemos encontrar trabalhos onde a acurácia da AChE chega a 93,5% e a da calretinina a 97,6%. A acurácia do modelo por cortes equidistantes foi de 93,5% e do modelo de Bootstrapping de 93,6%^{46,63,64}.

Embora os dois modelos tenham atingido uma acurácia satisfatória, acreditamos que apenas o modelo por cortes equidistantes pode ser reproduzido na prática por demonstrar aproximadamente qual seria a distância entre os plexos submucosos. Já o modelo de Bootstrapping, por ter sido criado somente

com base em modelos matemáticos, não possui uma aplicabilidade real, mas serviu para reforçar a hipótese proposta por esta pesquisa de que em uma amostra contendo sessenta secções de um fragmento de biópsia, não existe a necessidade de visualizar todos estes cortes para um diagnóstico acurado.

Apesar de ainda considerarmos os métodos específicos como a melhor opção para o diagnóstico da MH, acreditamos que o resultado deste estudo pode ser uma ótima alternativa para os serviços que não dispõem destes métodos, já que é possível diagnosticar a doença de uma forma menos invasiva, mais prática e mais barata, trazendo benefícios para o paciente e o patologista.

6. CONCLUSÕES

1. O estudo da distribuição das células ganglionares em fragmentos de reto com inervação normal possibilitou a criação de dois métodos simplificados de leitura de lâminas para o diagnóstico da MH através da coloração HE.

2. Durante a aplicação dos métodos de leitura, a concordância entre o padrão-ouro da AChE e a técnica de coloração HE foi satisfatória, tornando possível a utilização destes como alternativa no diagnóstico da doença.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. WHITEHOUSE, F.R.; KERNOHAN, J.W. – Myenteric plexus in congenital megacolon – Study of eleven cases. **Arch Intern Med** **82**: 75-111, 1948.
2. SERGI, C; Hirschsprung's disease: Historical notes and pathological diagnosis on the occasion of the 100th anniversary of Dr. Harald Hirschsprung's death. **World J Clin Pediatr.** 4(4):120-5, 2015
3. SANTOS, M.M. – **Megacolo congênito**. In: TANNURI, U. **Doenças cirúrgicas da criança e do adolescente**. SP: Manole, 2010. – Coleção Pediatria. Instituto da Criança HC-FMUSP. v13. p.219-229.
4. CONSOLATO, S. Hirschsprung's disease: Historical notes and pathological diagnosis on the occasion of the 100th anniversary of Dr. Harald Hirschsprung's death. **World J Clin Pediatr.**4(4):120-5, 2015.
5. SANTOS JR, JCM., Megacólon – Parte I: Doença de Hirschsprung. *Rev Bras Coloproct.* 3:196-209, 2002.
6. WHITEHOUSE, FR.; KERNOHAN, JW. – Myenteric plexus in congenital megacolon – Study of eleven cases. **Arch Intern Med.** 82: 75-111, 1948.
7. BRITO, IA. **Atividade de acetilcolinesterase na moléstia de Hirschsprung: características etárias e estudo evolutivo**. São Paulo, Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 1985.

8. SZYLBER, T.; MARSZATEK, A. Diagnosis of Hirschsprung's disease with particular emphasis on histopathology. A systematic review of current literature. **Prz Gastroenterol.** 9(5):264-9, 2014.
9. MORRIS, MI.; SOGLIO, DB.; OUIMET, A.; ASPIROT, A.; PATEY, N. A study of calretinin in Hirschsprung pathology, particularly in total colonic aganglionosis. **J Pediatr Surg**, 48:1037-43, 2013.
10. TSAI, HY.; MURAKAMY, N.; GARIEPY, CE. Postnatal intestinal engraftment of prospectively selected neural crest stem cells in a rat model of Hirschsprung disease. **Neurogastroenterol Motil.** 23:362-9; 2011.
11. LAKE, JI.; HEUCKEROTH, RO. Enteric nervous system development: migration, differentiation, and disease. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.** 305:G1-G24, 2013.
12. KAWAI, H.; SATOMI, K.; MORISHITA, Y.; *et al.* Developmental markers of ganglion cells in the enteric nervous system and their application for evaluation of Hirschsprung disease. **Pathology International.** 64:432-42, 2014.
13. OKAMOTO, E; UEDA, T. Embryogenesis of intramural ganglia of the gut and its relation to Hirschsprung's disease. **J Pediatr Surg.** 2:437-43, 1967.
14. GOLDENSTEIN, A.; HOFSTRA, R.; BURNS, AJ. Building a brain in the gut: development of the enteric nervous system. **Clin Genet.** 83:307-16, 2013.
15. GOYAL, RK.; HIRANO, I. The enteric nervous system. **N. Engl J Med.** 334:1106-15, 1996.

16. COSTA, M.; BROOKES, S.J.; HENNIG, G. Anatomy and physiology of the enteric nervous system. **Gut**. 47:15-26, 2010.
17. FURLAN, MMDP. Ontogenia e filogenia do sistema nervosa entérico. **Arq Ciênc Saúde Unipar**. 4: 149-57, 2000.
18. PAWOLSKY, V.; SCHMIDT, M.H.H. Neuron-glia interaction in the developing and adult enteric nervous system. **Cells**. 10:47, 2021.
19. KULKARNI, S.; MICCI, M.; LESER, J.; *et al.* Adult enteric nervous system in health is maintained by a dynamic balance between neuronal apoptosis and neurogenesis. **PNAS**. E3709-18, 2017
20. SILVEIRA, AB.; LEMOS, EM.; ADAD, SJ.; CORREA-OLIVEIRA, R.; FURNES, JB.; D'AVILLA, DR. Megacolon in Chagas disease: a study of inflammatory cells, enteric nerves, and glial cells. **Hum Pathol**. 38:1256-64, 2007.
21. POWLEY, TL. Vagal input to the enteric nervous system. **Gut**. 47:30-6, 2000.
22. RAO, M.; GERSHON, M.D. Enteric nervous system development: what could possibly go wrong? **Nat Rev Neurosci**. 19(9): 552-65,2019.
23. OVALLE, WK.; NAHIRNEY, PC. **Netter – Bases da Histologia**. Ed Elsevier - RJ, 2008. p. 128-9 e 471.
24. LI, Z.; CARON, MG.; BLAKELY, RD.; MARGOLIS, KG.; GERSHON, MD. Dependence of serotonergic and other noradrenergic enteric neurons on norepinephrine transporter expression. **J Neurosci**. 31:8998-9009, 2011.

25. DRUCKENBROD, NR.; EPSTEIN, ML. Behavior of enteric neural crest-derived cells varies with respect to the migratory wave front. **Dev Dyn.** 236:84-92, 2007.
26. AMIEL, J.; LYONNET, S. Hirschsprung disease, associated syndromes, and genetics: a review. **J Med Genet.** 38:729-39, 2001.
27. TORFS, C. An epidemiological study of Hirschsprung's disease in a multiracial California population. **Proceedings of the Third International Meeting: Hirschsprung's Disease and Related Neurocristopathies.** Evian, France; 1998.
28. COELHO MC, TANNURI U.; BENDITT, I.; SANTOS, MM. Studies of RET gene expression and acetylcholinesterase activity in a series of sporadic Hirschsprung's disease. **Pediatr Surg Int.** 24:1017-21, 2008.
29. KENNY SE, TAM PKH, GARCIA-BARCELO M. Hirschsprung's disease. **Semin Pediatr Surg.** 2010;19(3):194-200.
30. KLEIN, M.; VARGA, I. Hirschsprung's Disease – recent understanding of embryonic aspects, etiopathogenesis and future treatment avenues. **Medicina.** 56:611, 2020
31. JIANG, Q.; HO, Y.; HAO, L.; BERRIOS, C.N.; CHAKRAVARTI, A. Copy number variants in candidate genes are genetic modifiers of Hirschsprung disease. **Plos one.** 6(6): 1-6, 2011.
32. SCHAPPI, MG.; STAIANO, A.; MILLA, PJ.; SMITH VV.; DIAS, JA.; HEUSCHKEL, R. *et al.* A practical Guide for the Diagnosis of primary enteric

- nervous system disorders. **J Pediatr Gastroenterol Nutr.** 57(5): 677-84, 2013.
33. TJADEN, N. E., TRAINOR, P. A. The developmental Etiology and pathogenesis of Hirschsprung disease. **Transl Res.** 162(1): 1-15, 2013.
 34. SWAMINATHAN, M.; KAPUR, RP. Counting myenteric ganglions cells in histologic sections: an empirical approach. **Hum Pathol.** 41: 1097-108.
 35. QUALMAN, SJ.; JAFFE, R.; BOVE, KE.; MONFORTE-MUÑOZ, H. Diagnosis of Hirschsprung Disease using the rectal biopsy: Multi-institucional Survey. **Pediatr Dev Pathol.** 2:588-96, 1999.
 36. KOBAYASHI, H.; LI, Z.; YAMATAKA, A.; LANE, GJ.; MIYANO, T. Rectal biopsy: what is the optimal procedure? **Pediatr Surg Int.** 18:753-6, 2002.
 37. KAPUR, RP.; KENNEDY, AJ. Transitional zone pull through: surgical pathology considerations. **Semin Pediatr Surg.** 21:291-301, 2012.
 38. KNOWLES, CH.; MARTIN, JE. Enteric Neuromuscular Pathology Update. **Gastroenterol Clin North Am.**40:695-713, 2011.
 39. GONZALO, DH.; PLESES, T. Hirschsprung Disease and Use of Calretinin in Inadequate Rectal Suction Biopsies. **Arch Pathol Lab Med.** 137:1099-102, 2013.
 40. SWENSON, O.; SHERMAN, J.O.; FISCHER, J.H. Diagnosis of congenital megacolon: an analysis of 501 patients. **J Pediatr Sur.** 8:587-93, 1973.

41. TOLOSA, EMC.; RODRIGUES, CJ.;BEHMER, OA.; FREITAS NETO, A.
Manual de técnicas para histología normal e patológica. Ed. Manole – São Paulo, 2003. p. 80.
42. MONFORTE-MUÑOZ, H.; GONZALES-GOMEZ, I.; ROWLAND, JM.; LANDING, BH. Increased submucosal nerve trunk in aganglionosis, a “positive” and objective finding in suction biopsies and segmental resections in Hirschsprung’s disease. **Arch Pathol Lab Med.** 122:721-5, 1998.
43. MEIER-RUGE, W.; LUTTERBECK, P.M.; HERZOG, B. et al - Acetylcholinesterase activity in suction biopsies of the rectum in the diagnosis of Hirschsprung’s disease. **J Pediatr Surg** 7: 11-17, 1972.
44. KARNOVSKY, M.J.; ROOTS, L. – A “direct-coloring” thiocholine method for cholinesterases. **J Histochem Cytochem** 12: 219-221, 1964.
45. MEIER-RUGE, WA.; BRUDER, E. Current concepts of enzyme histochemistry in modern pathology. **Pathobiol.** 75(4):233-43, 2008.
46. SANTOS, M.M.; TANNURI, U.; COELHO, M.C. – Study of acetylcholinesterase activity in rectal suction biopsy for diagnosis of intestinal dysganglionoses: 17-year experience of a single center. **Pediatric Surg Int** 24: 715-719, 2008.
47. AGRAWAL, R.K.; KAKKAR, N.; VASISHTA, R.K.; KUMARI, V. SAMUJH, R.; RAO, K.L.N. Acetylcholinesterase histochemistry (AChE) – A helpful technique in the diagnosis and in aiding the operative procedures of Hirschsprung disease. **Diagnostic Pathology.** 10: 1-8, 2015.

48. ANDRASSY, R.J.; ISAACS, H.; WEITZMAN, J.J. – Rectal suction biopsy for the diagnosis of Hirschsprung's disease. **Ann Surg** **193(4)**: 419-424, 1981.
49. GUGELMIN, E.S.; TORRES, L.F.B. – The accuracy of acetylcholinesterase reaction in rectal suction biopsy in the diagnosis of Hirschsprung's disease. **J Bras Patol Med Lab** **41**: 431-436, 2005.
50. SERAFINI, S.; SANTOS, M. M.; TANNURI, A. C. A.; ZERBINI, M. C. N.; COELHO, M. C. M.; GONÇALVES, J. O.; TANNURI, U. Is hematoxylin-eosin staining in rectal mucosal e submucosal biopsies still useful for the diagnosis of Hirschsprung disease? **Diagnostic Pathology** **12**:84, 2017
51. TRAN, V. Q.; LAM, K. T.; TRUONG, D. Q.; DANG, M. H.; DOAN, T. T. P.; SEGERS, V. *et al.* Diagnostic value of rectal suction biopsies using calretinin immunohistochemical staining in Hirschsprung disease. **J Pediatr Surgery**. **51**:2005-9, 2016
52. SETIADI, J. A.; DWIHANTORO, A.; ISKANDAR, K.; HERIYANTO, D. S.; GUNADI. The utility of the hematoxylin and eosin staining in patients with suspected Hirschsprung disease. **BMC Surgery**, **17**:71, 2017.
53. JABARI, S.; OLIVEIRA, E. C.; BREHMER, A.; SILVEIRA, A. B. M. Chagasic megacolon: enteric neurons and related structures. **Histochem Cell Biol**.**142**: 235-244, 2014.
54. HANKER, J. S.; THOMBURG, L. P.; YATES, P. E.; MOORE, H. G. The demonstration oh cholinesterases by the formation of osmium blacks at the sites of Hatchett's brown. **Histochemie**. **37**:223-42, 1973.

55. TAN, P.K.H. Hirschsprung's disease: A bridge for science and surgery. **JPedSurg**. 51:18-22, 2016.
56. MUISE, E.D.; COWLES, R.A. Rectal biopsy for Hirschsprung's disease: a review of techniques, pathology, and complications. *World J Pediatr*.12(2) 135-141, 2016.
57. BRADY, A.; SAITO J.; LUKAS, K.; GUTHRIE, T.; UTTERSON, EC.; WHITE, FV.; DILLON, PA. Suction rectal biopsy yields adequate tissue in children. **J Pediatr Surg**. 51:966-9, 2016.
58. BODIAN M. Pathological aids in the diagnosis and management of Hirschsprung's disease. In:Dyke, SC, editor. **Recent Advances in Clinical Pathology**. Series 3. London: Churchill; 1960.p. 384.
59. PARK, W.H.; CHOI, S.O.; KWON, K.Y.; CHANG, E.S. Acetylcholinesterase histochemistry of rectal suction biopsies in the diagnosis of Hirschsprung's disease. *Journal of Korean Medical Science*. 7:353-9, 1992.
60. GREENBERG, A.; AIZIC, A.; ZUBROV, A.; BORSEKOFISKY, HEGEGE, R.R.; HERSHKOVITZ, D. Automatic ganglion cell detection for improving the efficiency and accuracy of Hirschsprung's disease diagnosis. **Nature**. 11:3306, 2021.
61. KAPUR, R.P. Practical pathology and genetics of Hirschsprung's disease. *Semin In Pediatr Surg*. 18: 212-223, 2009.
62. SANTER, R.M.; BAKER, D.M. Enteric neuron numbers and sizes in Auerbach's plexus in the small and large intestine of adults and aged rats. *J of Autonomic Nervous System*. 25:59-67, 1988.

63. LOURENÇÃO, PL.; TAKEGAWA, BK.; ORTOLAN, EV.; TERRA, SA.; RODRIGUES, MA. A useful panel for diagnosis of Hirschsprung disease in rectal biopsies: calretinin immunostaining and acetylcholinesterase histochemistry. **An Diag Pathol.** 17:352-6,2013.
64. JEONG, H.; JUNG, RA.; HWANG, I.; KWON, SY *et al.* Diagnostic accuracy of combined acetylcholinesterase histochemistry and calretinin immunohistochemistry of rectal biopsy specimens in Hirschsprung's disease. **Int J Surg Pathol.** 26(6):507-13, 2018.