

**Giovana Tuccille Comes**

**Qual é a melhor técnica de biópsia retal para  
o diagnóstico de disganglionoses  
intestinais em crianças? Uma  
revisão complementar através da análise de  
proporções de séries de casos.**

Tese apresentada à Faculdade de  
Medicina, Universidade Estadual Paulista  
“Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de  
Botucatu, para obtenção do título de  
Doutora em Bases Gerais da Cirurgia.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Luiz Toledo de Arruda Lourenção  
Coorientadora: Profa. Dra. Regina Paolucci El Dib

Botucatu  
2019

Giovana Tuccille Comes

**Qual é a melhor técnica de biópsia retal para o diagnóstico de disganglioneses intestinais em crianças? Uma revisão complementar através da análise de proporções de séries de casos.**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Bases Gerais da Cirurgia.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Luiz Toledo de Aruda Lourenção  
Coorientadora: Profa. Dra. Regina Paolucci El Dib

Botucatu  
2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Comes, Giovana Tuccille.

Qual é a melhor técnica de biópsia retal para o diagnóstico de disganglionoses intestinais em crianças? : uma revisão complementar através da análise de proporções de série de casos / Giovana Tuccille Comes. - Botucatu, 2019

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Pedro Luiz Toledo de Arruda Lourenção

Coorientador: Regina Paolucci El Dib

Capes: 40102076

1. Doença de Hirschsprung. 2. Reto - Biópsia. 3. Cólon (Anatomia) - Doenças. 4. Megacólon.

Palavras-chave: Aganglionose; Biópsia retal; Disganglionoses intestinais; Doença de Hirschsprung; Megacólon congênito.

***DEDICATÓRIA***

## **DEDICATÓRIA**

Aos pacientes da cirurgia pediátrica e suas famílias que tanto confiam no nosso cuidado e são a razão da nossa incansável busca pela excelência.

*AGRADECIMENTOS*

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, agradeço a Deus por me guiar pelos melhores caminhos e a Nossa Senhora Aparecida que sempre me amparou quando as forças faltaram;

À minha família, minha mãe Marly Tuccille, meu pai Alexandre Comes e minhas irmãs Flavia e Adriane que me ensinaram todos os valores da vida e que mesmo de longe me apoiaram e me reergueram sempre quando as forças estavam acabando;

Ao meu noivo, Eduardo Meneguzzi Brambilla, apaixonado pela pesquisa e pela carreira acadêmica, que sempre me incentivou e me amparou em momentos difíceis, com muito amor, carinho e compreensão;

Ao meu orientador e amigo, Prof. Dr. Pedro Luiz Toledo de Arruda Lourenção que me ensina o amor e a dedicação pela Cirurgia Pediátrica e, principalmente pela pesquisa, me incentivando sempre;

À Prof. Associada Erika Veruska Paiva Ortolan, querida amiga, que é meu grande exemplo e inspiração como cirurgiã pediátrica e gestora, por todo o apoio, incentivo e conselhos durante a elaboração desse trabalho;

À Profa Dra Regina Paloucci El Dib pela co-orientação do trabalho e por todos os ensinamentos em revisão sistemática;

Aos amigos Marcos Curcio Angelini e Wilson Elias de Oliveira Junior pelo auxílio na coleta de dados;

Aos residentes e amigos da equipe de cirurgia pediátrica do Hospital das Clínicas de Botucatu por todo apoio e incentivo;

Às amigas, principalmente Daniela Nemer, Janaina Pacheco, Vanessa Assis dos Santos, Debora Jozala, Pamela Cristina Bellaz e Thais Serafim que sempre entenderam os momentos de ausência e não mediram esforços para me incentivar e apoiar quando precisei;

À querida Marilisa de Oliveira Teixeira Inglez, grande amiga, por todo incentivo;

À Crystal pelo companheirismo, pela fidelidade e por todo amor.

Ao Sr. Douglas de Jesus J. Pinto pela diagramação e impressão desse trabalho.

***EPÍGRAFE***



## **EPÍGRAFE**

“Os que se encantam com a prática sem a ciência são como os timoneiros que entram no navio sem timão nem bússola, nunca tendo certeza do seu destino”  
(Leonardo da Vinci)



## Capítulo I – Revisão da Literatura

1. Introdução.....	13
2. Aspectos Históricos.....	16
3. Epidemiologia .....	19
4. Embriologia e Etiopatogenia .....	21
5. Aspectos Genéticos .....	24
6. Fisiopatologia.....	27
7. Classificação.....	30
8. Quadro Clínico.....	32
9. Diagnóstico.....	35
10. Diagnósticos Diferenciais.....	49
11. Tratamento.....	51
12. Enterocolite Associada à Doença de Hirschsprung.....	56
13. Complicações.....	60
14. Referências.....	66

## Capítulo II – Article

### **BEST RECTAL BIOPSY TECHNIQUE FOR DIAGNOSING INTESTINAL DYSGANGLIONOSIS IN CHILDREN: A systematic literature review and proportional meta-analysis**

Resumo.....	82
Abstract.....	84
Introduction.....	86
Methods.....	87
Results.....	90
Discussion.....	100
References.....	103
Appendices.....	107

*Capítulo I*  
*Revisão da Literatura*

## 1. Introdução

As disganglionoses intestinais compõem um grupo bastante heterogêneo de malformações do sistema nervoso entérico. As várias neurodisplasias congênitas, que podem levar a alterações e disfunções variadas do trato gastrointestinal, incluem a Doença de Hirschsprung (DH) e as suas variantes. Estas variantes são representadas por doenças que cursam com obstrução intestinal, sem causas mecânicas e que, diferentemente da Doença de Hirschsprung, apresentam células ganglionares na avaliação histopatológica.

As neuropatias entéricas podem ser congênitas ou adquiridas e estão relacionadas a um amplo espectro de alterações, que compreende desde alterações na composição celular até a potencial ausência completa do plexo em segmentos do intestino (Matias, 2011). Por esse motivo, há algumas propostas de classificações das disganglionoses, como a proposta por Schärli, 1995 (Quadro 1).

<b>Disglanglionoses por agenesia</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Doença de hirschsprung clássica</li> <li>- Aganglionose longa</li> <li>- Aganglionose colônica total</li> <li>- Aganglionose intestinal total</li> <li>- Aganglionose ultracurta</li> </ul>
<b>Disglanglionoses por hipogenesia</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Hipoganglionose</li> <li>- Hipogenesia de células ganglionares dos plexos mioentéricos e submucosos</li> </ul>
<b>Disglanglionoses por disgenesia</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Displasia Neuronal Intestinal tipos A e B</li> </ul>
<b>Condições adquiridas</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Doença de Chagas</li> </ul>
<b>Formas combinadas</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Doença de Hirschsprung + Displasia Neuronal Intestinal do tipo B</li> <li>- Hipoganglionose + Displasia Neuronal Intestinal do tipo B</li> <li>- Células nervosas hipogenéticas dos plexos submucosos + Displasia Neuronal Intestinal do tipo B</li> </ul>

**Quadro 1. Classificação etiológica das disglanglionoses intestinais. Adaptado de Scharli, 1995.**

Apesar da existência dessas outras entidades, na suspeita clínica de uma disglanglionose intestinal, a avaliação histopatológica das biópsias retais confirma o diagnóstico de DH em mais de 90% dos casos (Moore, 2017). Assim, tendo em vista a maior prevalência da Doença de Hirschsprung em comparação às demais disglanglionoses intestinais, nossa revisão se concentrará principalmente nesta doença.

A Doença de Hirschsprung ou Aganglionose Intestinal Congênita ocorre principalmente na faixa etária pediátrica. Essa condição é a principal causa de obstrução intestinal neonatal ou constipação intestinal grave no lactente e escolar, podendo também se manifestar com perfuração intestinal (Takawira et al., 2015; Duess et al., 2014; Masiakos & Ein, 2006; Dasgupta & Langer, 2004). É uma malformação congênita do sistema nervoso entérico, caracterizada pela ausência de células ganglionares nos plexos submucosos e mioentéricos do intestino distal. Isto resulta em um segmento aperistáltico, de extensão variável, responsável pelo quadro clínico de obstrução intestinal (Duess et al., 2014; Dasgupta & Langer, 2004). Por ser uma doença complexa e com manifestações clínicas

variáveis, seu cuidado envolve o trabalho conjunto de várias especialidades pediátricas, como a gastropediatria, cirurgia pediátrica e a patologia (Szyberg & Marszatek, 2014).

Aspectos relacionados à etiopatogenia, fisiopatologia e diagnóstico da DH ainda são motivos de pesquisa e intensa discussão na literatura, objetivando melhorar o tratamento às crianças portadoras desta entidade patológica.



## 2. Aspectos Históricos

Há relatos bastante antigos de descrições que se assemelham muito à DH. Sushruta's, durante a Índia pré-histórica, descreveu uma doença com “distensão abdominal por bloqueio funcional do canal anorretal” em que crianças ou adultos jovens apresentariam distensão gasosa de reto e cólon, “pedras” (fecalitos), “cabelos” (fibras não digeridas) e fezes. A distensão abdominal seria caracteristicamente observada entre coração e cicatriz umbilical e as evacuações seriam dificultosas e escassas em pacientes que poderiam apresentar, também, vômitos com conteúdo fecalóide (Apud Sergi, 2015).

Por um longo período, não houve novos relatos até a primeira descrição das características clínicas desta doença, datada de 1691, quando Frederick Ruysch, anatomista holandês, observou a dilatação do cólon de uma criança de 5 anos que havia falecido por obstrução intestinal (Apud Sergi, 2016). Em 1800, Domenico Battini, médico italiano, relatou outro caso de uma criança acompanhada por 10 anos com constipação severa, com os mesmos sinais e sintomas, cuja autópsia apresentou as mesmas características (Apud Sergi, 2016). Ainda foram descritos alguns outros relatos até que em 1886, o médico pediatra dinamarquês, Harald Hirschsprung, do Hospital Pediátrico de Copenhague “Queen Louise”, apresentou, na Conferência de Berlim da Sociedade Alemã de Pediatria, dois casos de disfunção intestinal desde o nascimento. O primeiro paciente apresentava constipação, sem trânsito intestinal espontâneo, necessitando de laxantes e enemas diariamente. O segundo paciente também se apresentava com distensão abdominal, oscilando entre períodos de diarreia e períodos de constipação grave. Há poucas informações sobre o seguimento clínico de ambos os pacientes, que foram a óbito. As autópsias revelaram reto estreito, com alças intestinais bastante dilatadas e hipertrofiadas, sem nenhuma obstrução mecânica aparente. Hirschsprung acreditou que esta “nova doença” seria uma alteração congênita, explicada pelas alterações macroscópicas observadas no cólon (Apud Sergi, 2016; Apud Masiakos & Ein, 2006). Seu trabalho foi

publicado um ano mais tarde, em 1887, na literatura alemã, e intitulado “Constipação no recém-nascido devido à dilatação e hipertrofia do cólon” (Hirschsprung, 1887). Entre 1825 e 1888, foram descritos, aproximadamente, 20 casos semelhantes (Apud Sergi, 2016), mas o termo “megacolon congênito” foi introduzido somente em 1894, por Mya.

Apesar de estes trabalhos terem definido uma entidade clínica, agora conhecida e estabelecida, a fisiopatologia da doença ainda era desconhecida, no início do século XX. Isto foi motivo de investigação científica intensa, revelada em alguns trabalhos publicados neste período. A ideia de que a causa da doença não estaria no cólon dilatado proximal, mas no segmento distal espástico e estreito, começou a ser descrita nos trabalhos de Fenwick (1900), Hawkins (1907) e Robertson & Kernohan (1938). A ausência de células ganglionares no cólon distal foi primeiramente descrita por Tittel (1901), no reto de uma criança de 15 meses, com constipação desde o nascimento. Até a década de 40, outros artigos foram publicados, revelando alterações microscópicas na inervação colônica, com destaque para Dalla Valle (1920), que descreveu a ausência de células ganglionares no retossigmóide de dois irmãos com sintomas típicos da doença e que apresentavam células ganglionares no segmento dilatado proximal do cólon. Em 1945, aproximadamente 60 anos após a descrição inicial de Hirschsprung, Theodor Ehrenpreis, elaborou profunda revisão da literatura e concluiu que a ausência de células ganglionares no retossigmóide teria um significado patológico e, a partir de estudos radiológicos contrastados (enemas opacos) de crianças normais e afetadas pela doença, observou que a dilatação do cólon seria um evento secundário na evolução da doença (Ehrenpreis, 1945, 1955). Em fevereiro de 1948, Zuelzer & Wilson (1948), a partir de estudo em 11 crianças falecidas com a doença, concluíram que a obstrução intestinal era funcional, e ocorria devido à alteração congênita na inervação do segmento espástico. Em julho do mesmo ano, Whitehouse & Kernohan (1948), também a partir de material de autópsias, observaram no reto espástico, ausência de células ganglionares nos plexos mioentéricos acompanhada da

presença de troncos nervosos hipertrofiados. Um ano mais tarde, Bodian et al. (1949) publicaram 73 casos de constipação intestinal em crianças, divididas em dois grupos (doença de Hirschsprung e constipação idiopática), e realizaram investigação radiológica (enema opaco) e patológica (peças cirúrgicas e autópsias). Os pacientes com DH apresentavam padrão radiológico peculiar, com zona espástica e dilatada, além da ausência de células ganglionares no segmento doente.

A consolidação destes conceitos sobre a fisiopatologia da doença, no meio de século passado, abriu novas perspectivas para o diagnóstico e tratamento das crianças acometidas. Estes aspectos serão discutidos mais adiante.

### 3. Epidemiologia

A incidência da DH é estimada em 1: 5.000 nascidos vivos (Dasgupta & Langer, 2004). Puri & Montedonico (2008) citam 12 estudos epidemiológicos, realizados entre 1962 e 2005, revelando variações desde 1:2.000 (Bodian & Carter, 1963), até 1:12.000 (Althoff, 1962). A casuística mais recente é a de Suita et al. (2005), realizada no Japão, que demonstra incidência de 1:5.343 nascidos vivos.

Com relação ao gênero, é bem definida a prevalência do sexo masculino, em proporção de 3:1 a 4:1 (Takawira et al., 2015). Esta razão varia na dependência da extensão da doença, apresentando taxas de 1:1 a 2:1 nas formas longas, e até mesmo, pode ser revertida para 0,8:1 na aganglionose colônica total. O motivo desta variação não é esclarecido (Puri & Montedonico, 2008).

Não há consenso sobre a prevalência da doença em alguma raça. Um completo programa de monitoramento de doenças congênitas na Califórnia, realizado entre 1983 e 1997, revelou diferenças raciais na distribuição da DH. As incidências encontradas foram 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 (Torfs, 1998). Os estudos de Kleinhaus et al. (1979) e de Sherman et al. (1989) demonstraram diferenças na incidência da doença entre brancos e negros norte-americanos, apenas em função das formas da doença, sendo a forma longa mais frequente nos brancos.

Mais recentemente, alguns estudos têm associado a ocorrência de dismotilidade intestinal em prematuros à imaturidade intrínseca do sistema nervoso entérico (Duess et al., 2014). Como raramente é estabelecida relação entre Doença de Hirschsprung e prematuridade, não se conhece uma prevalência exata, já que os dados não são bem documentados. Diante dessa dificuldade, Duess et al. (2014) realizaram uma revisão sistemática da literatura com 26 artigos publicados entre 1964 e 2013, relatando taxa de

prevalência de 6% dos recém-nascidos prematuros com diagnóstico de DH. Observou-se, também, que nos estudos mais recentes, entre 2000 e 2013, a prevalência atingiu 14%. O mesmo estudo relacionou a ocorrência de malformações congênitas associadas com maior frequência entre os prematuros, correspondendo a 46% dos casos, enquanto que entre os nascidos a termos, apenas 18% demonstravam tal associação.

As taxas de mortalidade apresentaram acentuada queda nas últimas décadas, variando de 7,1% em 1978 para 3% em 2002 (Green et al., 2016).

#### 4. Embriologia e Etiopatogenia

O trato gastrointestinal é derivado da endoderme e dividido em 3 segmentos de acordo com o suprimento venoso. O peristaltismo, o fluxo sanguíneo e as secreções no trato gastrointestinal são controlados pelo sistema nervoso entérico, que é o ramo mais complexo do sistema nervoso periférico, atuando de forma quase que independente do sistema nervoso central, sendo parte do sistema nervoso autônomo (Tjaden & Trainor, 2013; Laranjeira & Pachinis, 2009). Os mais de 500 milhões de neurônios, números maiores que os da medula espinhal, têm capacidade de realizar atividade reflexa na ausência do sistema nervoso central. Desempenham papel fundamental na absorção de água e nutrientes, secreção hormonal e na motilidade intestinal (Stamp, 2017; Tam, 2016; Puri & Rolle, 2008).

O entendimento de aspectos embriológicos é importante no estudo da etiopatogenia da DH (Takawira et al., 2015). Durante a 3ª semana de desenvolvimento embrionário, no processo chamado neurulação, ocorre a formação da crista neural a partir da ectoderme (Moore & Persaud, 2000). Suas células pluripotentes dão origem aos melanócitos, células da medular adrenal, dentina e aos neurônios do sistema nervoso autônomo, incluindo os do sistema entérico (Tjaden & Trainor, 2013; Puri & Rolle, 2008). A maioria das células do sistema nervoso entérico deriva da crista neural vagal. No entanto, há dois outros tipos celulares: provenientes da crista neural sacral que povoam o intestino grosso distal, mas não suprem a falta dos neurônios vagais, e os precursores das células de Schwann que atuam no final do desenvolvimento embrionário e no desenvolvimento pós-natal. A falta das diferentes linhagens pode causar diferentes tipos de dismotilidades intestinais (Stamp, 2017).

O desenvolvimento das células nervosas do tubo digestório, a partir da crista neural, ocorre através de um processo de migração, no sentido craniocaudal, a partir do esôfago até o canal anal, entre a 5ª e a 12ª semana do desenvolvimento (Duess et al., 2014;

Webster, 1973; Okamoto, 1967). Após migrarem, já entre a 12<sup>a</sup> e 16<sup>a</sup> semanas, os neuroblastos invadem a parede intestinal, originando primeiramente os plexos mioentéricos de Auerbach nas camadas mais externas, e posteriormente os plexos de Meissner na submucosa. Isto também segue uma sequência craniocaudal (Puri & Rolle, 2008). Os plexos mioentéricos situam-se entre as camadas musculares, sendo responsáveis apenas pela motilidade, enquanto que os plexos submucosos são responsáveis pela motilidade, pelo fluxo sanguíneo e pela troca de íons no epitélio intestinal (Tjaden & Trainor, 2013).

Desta forma, a ausência de células ganglionares tem sido atribuída à falha na migração das células da crista neural, durante a embriogênese (Szyberg & Marszatek, 2014; Tjaden & Trainor, 2013). De acordo com esta teoria, a altura da zona aganglionar é determinada pelo momento em que esta falha ocorreu (Duess et al., 2014). Bolande (1974) utilizou o termo “neurocristopatia” para descrever as anomalias derivadas de falhas no desenvolvimento da crista neural. Nesse contexto, a aganglionose é classificada como uma neurocristopatia simples, já que envolve um único processo patológico.

Outra teoria explica a patogenia de maneira diferente. A proposta é que as células da crista neural atingem seu destino de migração, povoando todo o tubo digestivo. Entretanto, determinadas células podem não se proliferar, nem se diferenciar, possivelmente por alterações no microambiente das regiões distais do cólon, dando origem aos segmentos aganglionares da DH (Szyberg & Marszatek, 2014). Sendo assim, a aganglionose seria relacionada a anormalidades celulares e moleculares durante o desenvolvimento do sistema nervoso mioentérico (Duess et al., 2014). O papel da fibronectina e da laminina, como glicoproteínas que facilitam a migração e o desenvolvimento das células da crista neural, é discutido por Dasgupta & Langer (2004). Estes autores citam alterações das moléculas de adesão das células neurais (NCAM) e ausência de fatores neurotróficos, como possibilidades etiológicas para a falta de proliferação local dos neuroblastos. Desta maneira, a alteração pode

ocorrer tanto na migração como na proliferação, diferenciação, sobrevivência e apoptose das células ganglionares (Tjaden & Trainor, 2013).



## 5. Aspectos Genéticos

O risco 200 vezes maior para ocorrência de DH entre irmãos de indivíduos afetados, a desproporção na sua distribuição entre os sexos e a associação com outras malformações e com síndromes cromossômicas constituíram as evidências iniciais para a pesquisa de fatores genéticos nesta entidade patológica, sendo descrita como esporádica ou familiar (Schäppi et al., 2013; Tjaden & Trainor, 2013; Kenny et al., 2010). Os fatores genéticos são heterogêneos e exibem interações complexas, não mendelianas, ligada ao sexo, que influenciam na penetrância e severidade da doença (Takawira et al., 2015; Tjaden & Trainor, 2013; Kapur, 2009). Devemos considerar a influência de genes modificadores e das condições ambientais, já que é observado que um mesmo fenótipo está associado a diferentes mutações (Tjaden & Trainor, 2013).

As alterações genéticas podem ser identificadas em 50% dos pacientes acometidos pela forma familiar e em 15-20% dos pacientes que apresentam a forma esporádica, que corresponde a 70% dos casos (Schäppi et al., 2013). Na aganglionose intestinal total, observa-se maior ocorrência familiar, podendo acontecer em 50% dos casos, enquanto que na forma colônica total pode acontecer em 15-21% dos pacientes e na forma clássica pode acometer até 7,6% dos casos (Henderson et al., 2017). Além disso, foram descritos casos entre irmãos que apresentaram aumento progressivo da extensão da doença, sugerindo que há maior penetrância do gene nas sucessivas gerações (Moore, 2015). Os diferentes fenótipos serão explicados mais adiante, na página 30, no item 7 sobre a classificação.

Foram descritos mais de 15 diferentes genes (RET, GDNF, GFR  $\alpha$  1, NRTN, EDNRB, ET3, ZFH1B, PHOX2b, SOX10, SHH, EDN3, PTCH1, WNT8A) que são responsáveis pela ocorrência de 50 % dos casos de DH (Bahrami et al., 2018; Sergi, 2016; Takawira et al., 2015; Tjaden & Trainor, 2013; Kapur & Kennedy, 2012). As alterações genéticas mais comuns incluem mutações no proto-oncogene RET, identificada em 7 a 35%

dos casos, no gene EDNRB em 7% e no gene END3 em menos que 5% (Kenny et al., 2010). Estudos recentes apontam também a pesquisa de microRNAs que estejam envolvidos na patogênese da DH. Os microRNAs são pequenas moléculas codificadoras que atuam na diferenciação, proliferação, migração e apoptose celulares (Sergi et al., 2016).

Anomalias congênitas e síndromes associadas como cardiológicas, alterações craniofaciais, malformações em trato gastrointestinal ou urinário, anomalias de sistema nervoso central e espinha bífida estão presentes em 5 a 32% dos casos (Tjaden & Trainor, 2013; Amiel et al., 2008). Devem ser destacadas algumas neurocristopatias que estão comumente associadas, como a Síndrome da Hipoventilação Central Congênita, a Síndrome de Waardenburg, Síndrome de Smith-Lemli-Optiz e a Síndrome de di Georgi (Bahrami et al., 2018; Schäppi et al., 2013; Kenny et al., 2010; Kapur, 2009). A aganglionose colônica também está associada à neoplasia endócrina múltipla tipo 2 em menos de 5% dos casos e a neurofibromatose (Schäppi et al., 2013; Amiel et al., 2008; Haricharan & Georgeson, 2008). Das anomalias cromossômicas, a mais frequentemente associada é a trissomia do 21, relatada em aproximadamente 2-15% das crianças com aganglionose congênita. Os pacientes com Síndrome de Down têm risco 100 vezes maior de apresentar a doença (Tjaden & Trainor, 2013; Kenny et al., 2010; Haricharan & Georgeson, 2008). São descritas, também, associações com surdez congênita, hidrocefalia, divertículo vesical, Divertículo de Meckel, agenesia renal, criptorquidia e neuroblastoma (Szyberg & Marszatek, 2014).

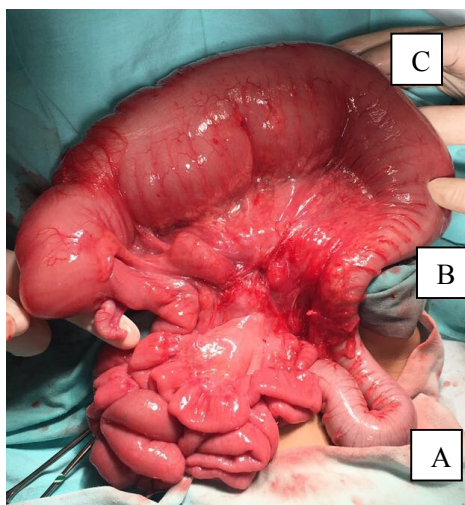
Estudos recentes têm investigado o papel dos comandos genéticos e moleculares na migração e desenvolvimento das células do sistema nervoso entérico (Amiel et al., 2008). O proto-oncogene RET e a proteína RET atuam na migração e proliferação dos neuroblastos. Aproximadamente 50% dos pacientes com DH familiar apresentam mutações no proto-oncogene RET, o que destaca a importância das alterações deste gene na patogênese da DH (Amiel et al., 2008). Mais de 20 diferentes mutações foram descritas neste proto-oncogene e

alguns de seus polimorfismos estão associados com fenótipos particulares, expressos pela extensão da zona aganglionar (Haricharan & Georgeson, 2008). Alterações genéticas também têm sido observadas nas células tronco da crista neural nos pacientes com aganglionose colônica (Iwashita et al., 2003).

## 6. Fisiopatologia

O conhecimento da patogenia da DH, fundamentado na ausência de células ganglionares nos plexos submucosos e mioentéricos do intestino distal, constitui a base para o entendimento de sua fisiopatologia. A região aganglionar é sabidamente aperistáltica, constituindo um obstáculo ao trânsito intestinal. Como os movimentos peristálticos não conseguem progredir através da área espástica, as regiões proximais ganglionares, conseqüentemente, dilatam-se, apresentando progressiva hipertrofia muscular e paredes espessadas, caracterizando o segmento conhecido como megacolon. O espessamento e a hipertrofia tendem a aumentar com o decorrer da idade, enquanto a doença não for tratada (Calkins, 2018; Sergi, 2016).

Entre a área espástica aganglionar e o segmento dilatado ganglionar há uma zona de transição, cônica e de extensão variável (Figura 1). Na maioria das vezes, esta zona de transição é identificada em nível de retossigmóide (Maksoud, 2003). As características mais comuns atribuídas à zona de transição são aganglionose circunferencial, hipoganglionose mioentérica, troncos nervosos hipertrofiados e a displasia neuronal intestinal do tipo B (Kapur & Kennedy, 2012).



**Figura 1 – Imagem do intra-operatório da zona de transição localizada em cólon descendente: A= segmento espástico aganglionar; B= zona de transição; C= megacólon normoganglionar.**

A principal responsável pela fisiopatologia da doença é, portanto, esta região aperistáltica distal, caracteristicamente espástica, que leva à obstrução intestinal funcional, conforme descrito por Swenson & Bill (1948). Entretanto, ainda não há, na literatura recente, explicação completa sobre os mecanismos que levam a esta espasticidade (Puri & Montedonico, 2008; Dasgupta & Langer, 2004).

Em revisão de 2008, Puri & Montedonico citam as possíveis explicações fisiopatológicas para a ocorrência desta espasticidade. Segundo estes autores, a motilidade do sistema gastrointestinal depende da interação de elementos nervosos e musculares. Uma das hipóteses propõe que a hiperinervação colinérgica seria responsável pela espasticidade da região distal. Para isso, haveria um aumento do número de fibras nervosas colinérgicas na zona aganglionar, representadas por troncos nervosos grossos e hipertrofiados na submucosa, muscular da mucosa e ao nível do plexo intermuscular. São fibras nervosas pré-ganglionares dos neurônios extrínsecos do sistema nervoso parassimpático que, não encontrando as células ganglionares para a sinapse, sofrem hipertrofia, dicotomizam-se e espalham-se pelas várias camadas da parede intestinal. Há liberação contínua de acetilcolina, neurotransmissor excitatório, que seria responsável pelo estímulo de contração. Entretanto, modelos experimentais demonstram a possibilidade de ocorrência da espasticidade na ausência de hiperatividade colinérgica (Imamura et al., 1975). Outra hipótese advoga o papel da inervação adrenérgica. Ocorreria um aumento do número e uma distribuição caótica de fibras adrenérgicas no segmento aganglionar. Entretanto, a sensibilidade desta região à epinefrina não está aumentada, apesar do aumento do número de fibras adrenérgicas. Além disso, estas fibras atuam no relaxamento da musculatura intestinal sendo, portanto, bastante improvável que sejam as responsáveis pelo aumento do tônus (Puri & Montedonico, 2008). Outro fator, de descoberta mais recente, é o papel do óxido nítrico. Trata-se de um dos neurotransmissores mais importantes no relaxamento da musculatura lisa da parede intestinal. Há indícios de que

a síntese deste neurotransmissor no segmento intestinal aganglionico está prejudicada e tal deficiência poderia impedir seu relaxamento (Rolle et al., 2002). Outros elementos também vêm sendo investigados. As células intersticiais de Cajal, as células enteroendócrinas, o músculo liso entérico, a matriz extracelular e alterações no segmento proximal ganglionar podem colaborar, de diferentes formas, para a formação do segmento espástico (Puri & Montedonico, 2008).

## 7. Classificação

A DH é classificada com base na extensão da zona aganglionar. Entretanto, há divergências sobre as divisões utilizadas.

Puri & Montedonico (2008), consideram o esfíncter anal interno como o limite inferior da zona aganglionar e, a partir daí, classificam a doença nas formas clássica, quando o segmento espástico não se estende além do sigmóide; longa, quando a região agangliônica vai além do ângulo esplênico e aganglionose colônica total, quando se estende por todo o colon e pequena extensão do íleo terminal. Há também referência a uma forma rara, denominada aganglionose intestinal total, caracterizada pela ausência de células ganglionares do duodeno ao reto. A forma clássica é responsável pela grande maioria dos casos, com incidência variável de 72 a 88,8%, seguida pelas formas longa, em 3,9 a 23,7% dos casos e aganglionose colônica total em 2 a 13% dos pacientes.

A aganglionose colônica total, também conhecida como síndrome de Zuelzer e Wilson, pode ser dividida em 2 subtipos: aganglionose colônica total e a aganglionose colônica total com acometimento de delgado. No primeiro caso, a aganglionose acomete do ânus até a válvula íleo cecal e, no segundo, pode atingir, no máximo, 50cm de delgado (Moore, 2015; Meier-Ruge et al., 1972). Moore (2015) também considera que a aganglionose total pode ser considerada como uma outra doença, já que apresenta outros mecanismos na patogênese e que ainda podem se manter em evolução após o nascimento. No entanto, ainda faltam informações que possam justificar essa hipótese.

Maksoud (2003) considera, além destas formas de aganglionose, a existência da forma curta da doença, na qual a região agangliônica estende-se pouco além do esfíncter interno e que é responsável por cerca de 5% dos casos.

Por outro lado, pela classificação proposta por Kaiser & Bettex (1982), a forma clássica corresponde ao envolvimento do reto, sigmóide e colon descendente, até a flexura esplênica; a forma ultra-curta é caracterizada pela aganglionose restrita às porções mais distais do reto e a forma ultra-longa, é a que ocorre quando mais da metade do colon é representada pelo segmento agangliônico.

Holschneider & Kunst (2008) descrevem a forma ultra-curta com mais detalhes. Trata-se de forma rara da doença, cujos sintomas comumente iniciam-se a partir dos seis meses de idade. O segmento agangliônico estende-se de 3 a 4 cm a partir da linha pectínea podendo, entretanto, estar limitada ao canal anal (Meier-Ruge & Bruder, 2008). Esta forma da doença também é considerada como uma acalásia do esfíncter anal interno, mas há poucos dados sobre esta forma na literatura (Schäppi et al., 2013). O diagnóstico desta forma de aganglionose depende fundamentalmente de biopsias retais na altura da linha pectínea, que revelam aumento da atividade da acetilcolinesterase (Holschneider & Kunst, 2008; Meier-Ruge et al., 2004).

Em 2015, Takawira et al. consideraram 2 tipos de DH. A DH tipo 1 seria a de segmento curto, que corresponderia ao reto e ao cólon até ângulo esplênico, sendo o tipo mais comum, com frequência de 60 a 85% dos casos. Já a DH tipo 2, corresponderia à forma longa, envolvendo reto e maior extensão do cólon, sendo o tipo mais raro, com ocorrência de 15 a 25% (Takawira et al., 2015).



## 8. Quadro Clínico

A DH pode se apresentar sob diferentes formas e gravidades, na dependência da extensão e do grau de espasticidade do segmento agangliônico (Maksoud, 2003). Os sintomas podem aparecer já nos primeiros dias de vida com alterações de hábito intestinal, restrições alimentares, atraso no desenvolvimento pômbero-estatural, flatulência e vômitos (Szyllberg & Marszatek, 2014). Até 90% dos casos se apresentam no período neonatal, caracteristicamente como obstrução intestinal (Martucciello, 2008; Maksoud, 2003). Desta forma, a DH representa 20 a 25% dos casos de obstrução intestinal neste período (Loening-Baucke & Kimura, 1999).

O atraso na eliminação do mecônio nas primeiras 24 a 48 horas de vida é relatado em até 90% dos pacientes com a doença (Duess et al., 2014; Puri & Montedonico, 2008). Entretanto, outros estudos demonstram que até 40% dos pacientes podem eliminar mecônio dentro das primeiras horas de vida, revelando que este não é um sinal obrigatório para o diagnóstico (Singh et al., 2003). Habitualmente, trata-se de um recém-nascido a termo, com distensão abdominal progressiva (63 a 91% dos casos), intolerância às mamadas e vômitos biliosos (19 a 37% dos casos) (Duess et al., 2014; Haricharan & Georgeson, 2008; Puri & Montedonico, 2008). O toque retal pode demonstrar reto estreito, com ampola vazia, seguido ou não de eliminação explosiva de fezes (Green et al., 2016; Maksoud, 2003). Segundo descrição de Duess et al. (2014), a ocorrência de sintomas acontece de maneira semelhante entre os recém-nascidos a termo e os prematuros, mas a observação dos sintomas no paciente prematuro é ainda mais complicada, devido ao grande número de anormalidades envolvendo múltiplos sistemas que estão associadas à própria condição de imaturidade do paciente (Duess et al., 2014). Nesse grupo de pacientes considera-se como atraso significativo quando não há eliminação de mecônio em 7 a 8 dias de vida (Schäppi et al., 2013).

Entretanto, algumas crianças não apresentam obstrução intestinal neonatal.

Manifestam clinicamente constipação intestinal grave, em diferentes faixas etárias, que pode evoluir com distensão abdominal crônica, peristaltismo visível, déficit de crescimento e desnutrição (Szyllberg & Marszatek, 2014; Puri & Montedonico, 2008; Dasgupta & Langer, 2004). Há pouca resposta ao tratamento clínico, sendo comum a dependência de enemas (Dasgupta & Langer, 2004).

O diagnóstico de DH deve ser suspeitado em qualquer criança com história de constipação intestinal desde o período neonatal (Puri & Montedonico, 2008). A idade média de diagnóstico tem diminuído progressivamente nas últimas décadas, evidenciando maior conscientização sobre a doença (Puri & Montedonico, 2008; Dasgupta & Langer, 2004). Um levantamento de 1979, da seção cirúrgica da Associação Americana de Pediatria, demonstrou o diagnóstico no período neonatal em apenas 8% dos casos. Até os 3 meses de idade, este valor atingia 30% dos casos (Kleinhaus et al., 1979). Por outro lado, estudo australiano do fim da década de 90, demonstrou taxas de até 90% de diagnóstico no período neonatal (Singh et al., 2003). Levantamentos nacionais revelam taxas de 47,2% de diagnóstico neonatal (Villar et al., 2009) e mediana de 8,8 meses para a idade de diagnóstico (Bigélli et al., 2002).

O diagnóstico de agangliose colônica raramente é considerado em adultos. Porém, pode representar até 2% dos pacientes com constipação crônica refratária nesta faixa etária (Chatelain et al., 2006). Recentemente, dados demonstraram que menos de 1% dos casos de DH são diagnosticados na vida adulta (Schäppi et al., 2013). A forma adulta da DH é definida quando este diagnóstico é estabelecido a partir dos 10 anos de idade (Doodnath & Puri, 2010). Em revisão sistemática da literatura, que levantou dados dos últimos 50 anos, Doodnath & Puri (2010) encontraram relatos de 490 casos diagnosticados nesta faixa etária. A idade de diagnóstico variou dos 11 aos 74 anos, sendo mais comum na terceira década de vida. A maioria dos pacientes apresentava constipação intestinal desde a primeira infância, com pequena melhora após uso de laxativos ou enemas, mantendo este quadro clínico ao longo da

vida. Apenas alguns casos apresentaram início dos sintomas na idade adulta. A forma mais comumente encontrada foi a doença confinada ao reto, em 79,8% dos casos, compatível com quadro clínico menos exuberante.

## 9. Diagnóstico

Apesar do conhecimento de alterações nas diferentes fases embriológicas e do possível envolvimento de diversos genes, o diagnóstico intra-útero de DH ainda não é considerado como possível (Takawira et al., 2015).

Frente a um paciente com quadro clínico suspeito para DH, evidenciado a partir de anamnese, deve-se realizar um exame físico completo. Nesse momento a medida da circunferência abdominal apresenta-se, na maioria das vezes, aumentada, com palpação de massas fecais. Ao toque retal, nota-se hipertonia de esfíncter, com ampola retal vazia ou, possivelmente, com fezes bastante endurecidas, que podem ou não serem eliminadas de maneira explosiva após o toque (Sergi, 2016). A partir daí, inicia-se a investigação diagnóstica.

A radiografia simples do abdome pode revelar distensão gasosa de alças colônicas, com níveis hidroaéreos. O nível da obstrução pode ser inferido pela presença de ar no colon ou reto não-dilatados. Esta imagem pode ser observada na incidência em decúbito dorsal e facilitada pela incidência lateral, com o paciente em decúbito ventral e com as nádegas elevadas. Além disso, tem importante papel na investigação de perfuração intestinal, que constitui grave complicação da aganglionose colônica (Kelleher & Blake, 2008).

Swenson et al. (1949) publicaram técnica para realização de enema opaco, com bário, utilizada até os dias atuais, com sensibilidade de 76% e especificidade de 97%, que permite a identificação da zona de transição entre o segmento espástico agangliônico e o colon dilatado (Figura 2). Este exame ainda é considerado como método útil, principalmente na triagem diagnóstica diante da suspeita de DH, permitindo também estimar a extensão da zona aganglionar, auxiliando no planejamento cirúrgico (Lourenção et al., 2019; Takawira et al., 2015; Schäppi et al., 2013). Apesar de 75% dos neonatos com doença de Hirschsprung apresentarem o cone de transição, a ausência deste sinal não exclui a possibilidade de

aganglionose (Dasgupta & Langer, 2004). Em crianças mais velhas, a ausência da zona de transição ao enema opaco é menos comum, mas pode ocorrer devido a um segmento doente muito curto (Dasgupta & Langer, 2004). Além disso, até 75% das crianças com aganglionose colônica total apresentam colon de calibre normal, bem como crianças com a forma ultracurta da doença (Szyberg & Marszatek, 2014; Schäppi et al., 2013; De Lorink et al., 2006). Lavagens e toques retais prévios são fatores que também aumentam a taxa de falsos negativos no enema opaco (Takawira et al., 2015; De Lorink et al., 2006). Em neonatos, a presença de plugs de mecônio podem levar a resultados falso-positivos (Green et al., 2016). Radiografias de retardo, após 24 a 48 horas do exame radiológico inicial, podem colaborar para o diagnóstico. Permitem acesso ao bário residual e podem facilitar a identificação da zona de transição (Szyberg & Marszatek, 2014; Kelleher & Blake, 2008). O atraso de eliminação de bário maior que 24 horas, é fortemente sugestivo de DH (Moore, 2015). Deve-se considerar que, em vigência de enterocolite, a realização do enema opaco pode acarretar na perfuração intestinal durante administração do contraste (Szyberg & Marszatek, 2014).



**Figura 2 - Enema opaco pela técnica de Neuhauser, evidenciando zona de transição no reto-sigmóide**

Outro dado, descrito como sugestivo da doença, é o índice retossigmóide menor que 1,0 (Lourenção et al., 2019; Tjaden & Trainor, 2013; Garcia et al., 2007; Siegel et al., 1981). Este índice mede a razão entre o maior diâmetro do reto e o maior diâmetro do sigmóide. Fornece uma medida objetiva que deve ser utilizada em conjunto com a identificação da zona de transição na investigação radiológica da doença (Garcia et al., 2007).

A manometria anorretal vem sendo utilizada na investigação diagnóstica da doença de Hirschsprung, desde a metade do século passado. As descrições iniciais da ausência do reflexo inibitório retoanal nos pacientes portadores de aganglionose colônica (Callaghan & Nixon, 1964; Hiatt, 1951) permitiram a caracterização da manometria como método válido na investigação diagnóstica desta entidade patológica (Lawson & Nixon, 1967). A demonstração do relaxamento do esfíncter interno, após a insuflação de balão com ar no reto simula o reflexo evacuatório. Este processo fisiológico depende da presença de células ganglionares nos plexos nervosos do intestino distal (Takawira et al., 2015; Holschneider & Steinwegs, 2008). Desta forma, a evidência manométrica da existência deste reflexo exclui a possibilidade de DH. Entretanto, sua ausência não confirma este diagnóstico. A taxa de falsos positivos é muito alta para que este método possa ser utilizado isoladamente para o diagnóstico desta entidade patológica (Martuciello, 2008). Muitas vezes, o resultado é inconclusivo pela agitação e falta de colaboração do paciente para adequada realização do exame (Schäppi et al., 2013).

O reflexo inibitório reto-anal pode ser fisiologicamente rudimentar devido à imaturidade neuronal na criança com até 14 semanas de vida (Holschneider & Steinwegs, 2008). Entretanto, estudos recentes demonstraram que a sensibilidade e a especificidade da manometria anorretal são adequadas para a investigação diagnóstica no período neonatal (Zarabozo et al., 2010; Huang et al., 2009). Takawira et al demonstraram em revisão de 2015, que a especificidade da manometria anorretal é de 93% e a sensibilidade de 87% (Takawira et

al., 2015). Desta forma, a eletromanometria deve ser considerada como um método de triagem inicial na investigação da DH (Holschneider & Steinwegs, 2008; de Lorijn et al., 2006). Caso o resultado seja ausência do reflexo inibitório, essa criança deve ser submetida à biópsia retal para complementação diagnóstica. Já a presença do reflexo, pode excluir DH (Schäppi et al., 2013). Wu et al. descreveram que os resultados falso-negativos variam de 0 a 24% e os falso positivos de 0 a 62% (Takawira et al., 2015).

O diagnóstico definitivo da DH, entretanto, somente pode ser estabelecido pelo exame histopatológico, que permite analisar os plexos nervosos do sistema nervoso entérico, em amostras de tecido obtido por biópsias retais (Kapur, 2009; Dasgupta & Langer, 2004). A utilização de biópsias retais para o diagnóstico de DH foi originalmente proposta por Swenson et al. (1955), como um método preciso, superior ao enema opaco. Estes autores propuseram a realização de biópsias da parede posterior do reto, a 3 cm da linha pectínea, envolvendo a espessura total da parede intestinal. Este procedimento deveria ser conduzido sob anestesia geral e necessitaria de sutura da ferida operatória. A análise histopatológica, por sua vez, deveria compreender a busca por células ganglionares nos plexos intermusculares e a presença destas células excluiria o diagnóstico de DH (Swenson et al., 1955).

Bodian (1960), por outro lado, concluiu que amostras de tecido menores, envolvendo mucosa e submucosa, seriam suficientes para a pesquisa de células ganglionares na investigação diagnóstica de DH. As células ganglionares estariam invariavelmente ausentes na submucosa do reto distal nos pacientes portadores de aganglionose e as características da submucosa corresponderiam também à ausência de células ganglionares nos plexos mioentéricos. Este conhecimento foi fundamental para a evolução das técnicas de biópsias retais, com o surgimento de novos métodos, minimamente invasivos, sem a necessidade de anestesia geral e realizados em caráter ambulatorial (Dobbins & Bill, 1965; Shandling, 1961).

Merecem destaque os trabalhos de Helen Noblett, com a descrição de uma pinça de biópsia retal por sucção, que se tornou o instrumento mais utilizado para a investigação diagnóstica da DH (Campbell & Noblett, 1969; Noblett, 1969). Em sua descrição original, Noblett (1969) salientava a importância de alguns aspectos técnicos. Suas biópsias foram realizadas sob pressão negativa de 20 a 25 polegadas de mercúrio, sem lavagem intestinal prévia e com afiamento periódico da lâmina da pinça. As amostras eram consideradas adequadas quando apresentavam ao menos 3,5mm de diâmetro e contemplavam a submucosa. Todos os 116 espécimes analisados pela autora, foram considerados adequados.

Atualmente, as biópsias retais de sucção atingem taxas de sensibilidade de até 97% e especificidade de até 99% (Green et al., 2016). Quando a biópsia por sucção não é suficiente para o diagnóstico, pode-se optar pela realização de uma biópsia cirúrgica de parede total de reto. Schäppi et al. (2013) sugerem que biópsia retal por sucção é o método de preferência, desde que realizada a 2-3cm da linha pectínea e contenha fragmentos suficientes de submucosa para análise histopatológica (Schäppi et al., 2013). Assim, este é considerado um método simples, seguro, rápido e de baixo custo, o que favorece sua escolha como método de preferência em muitos serviços (Szyberg & Marszatek, 2014).

Na literatura, a acurácia da biópsia retal para o diagnóstico de DH gira em torno de 95% e, quando associada a análises imunohistoquímicas, esse valor pode se elevar até 99,7% (Szyberg & Marszatek, 2014). A sensibilidade pode alcançar 100% se o fragmento for retirado do local adequado, com representatividade suficiente e *expertise* adequada do médico patologista para analisar as amostras (Szyberg & Marszatek, 2014). Takawira et al. demonstraram, em revisão sistemática de 2015, especificidade de 99% e sensibilidade de 93%, confirmando a superioridade das biópsias retais para o diagnóstico de DH, quando comparada ao enema opaco e à manometria anorretal (Takawira et al., 2015).

Entretanto, este não pode ser considerado um método perfeito (Kobayashi et al.,

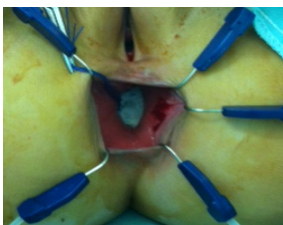
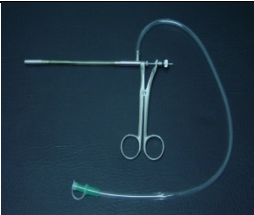
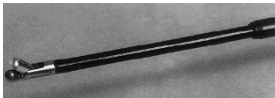



2002). Determinadas técnicas, como as biópsias por sucção ou por “*punch*” são realizadas “às cegas”, o que dificulta a determinação do local exato da biópsia e da espessura do fragmento obtido. Também são descritas possíveis complicações, como sangramento massivo (Pini-Prato et al., 2011), perfurações de reto, fibrose peri-retal, celulite em pelve e sepse (Lewis et al., 2003; Hirsch et al., 2011). Schäppi et al. (2013) relatam taxas de complicações em 1,3 a 2,9% dos procedimentos (Schäppi et al., 2013). Em revisão de 2016, Muise & Cowles concluem que as complicações são raras, mas muito graves, acometendo em torno de 2% dos pacientes, independentemente da técnica de biópsia utilizada. Os sangramentos habitualmente ocorrem imediatamente após o procedimento, mas há descrição de sangramento até 4 horas após a realização da biópsia.

Além disso, taxas de insucesso das biópsias retais para obtenção de espécimes adequados são relatadas na literatura, e variam de 13% a até 28% (Alizai et al., 1998; Kobayashi et al., 2002; Athow et al., 1990). Os fragmentos são considerados adequados quando apresentam, pelo menos 3 mm de diâmetro, com, no mínimo, um terço da espessura correspondendo a submucosa, mas idealmente, metade da amostra deveria ser representada por submucosa (Muise & Cowles, 2016). Quando os fragmentos não envolvem a submucosa, a exclusão da possibilidade diagnóstica de DH fica bastante prejudicada (Ali et al., 2006; Kobayashi et al., 2002). Isto leva à necessidade da realização de novas biópsias, habitualmente sob anestesia geral, para a obtenção de fragmentos mais profundos da parede do reto (Hall et al., 2009; Gil-Vernet et al., 2006). Há desta forma, além dos riscos inerentes deste novo procedimento, atraso no diagnóstico e no tratamento, maior ansiedade aos pais e considerável aumento de custos (Muise & Cowles, 2016; Ali et al., 2006).

Por tudo isso, há intensa pesquisa por novos métodos de biópsias. A adequação do espécime, contemplando a camada submucosa, constitui o ponto crítico para a análise histopatológica adequada (Alizai et al., 1998). Resultados satisfatórios são descritos com o

uso de fórceps (Kobayashi et al., 2002; Alizai et al., 1998.), com a realização de sucção por máquina de aspiração (Ali et al., 2006), com pinças modificadas para sucção (Hall et al., 2008) e com auxílio de visão endoscópica e biópsia por Jumbo (Hirsch et al., 2011). A Figura 3 apresenta os principais tipos de técnicas de biópsias retais utilizadas na investigação diagnóstica da DH. Até hoje não há estudos que comparem os diferentes métodos para obtenção dos fragmentos e nem consenso em relação ao melhor método para ser utilizado (Takawira et al., 2015).

Técnica de Biópsia retal	Descrição	Subtipos	Imagem
<b>Cirúrgica</b>	Incisão cirúrgica na parede do reto	- superficial - profunda	 Ex: Biópsia cirúrgica profunda
<b>Sucção</b>	Aspiração da mucosa do reto com pressão negativa, seguida de biópsia com lâmina	- Noblett - Rbi2 - SoloRBT - Multipurpose Quinton - SBT 100 - Outros	 Ex: pinça de Noblett
<b>“Punch”</b>	Biópsia incisional da mucosa do reto realizada através de diferentes pinças	- Cup biopsy - Nasal forceps - outros	 Ex: Storz cup biopsy forceps
<b>Endoscópica</b>	Sob visão endoscópica direta com pinças endoscópicas	- pinça jumbo - outras	 Ex: biópsia endoscópica com pinça jumbo

**Figura 3: Tipos de técnicas de biópsias de reto utilizadas na investigação diagnóstica da Doença de Hirschsprung.**

As biópsias retais de sucção geralmente fornecem amostras adequadas de submucosa, quando realizadas em neonatos e crianças mais jovens (Kapur 2009), com idade entre 6 meses e 3 anos (Alizai et al., 1998; Croffie et al., 2007). Para crianças mais velhas, há uma tendência deste método resultar em espécimes inadequados. Isto pode ser explicado pela própria evolução da constipação intestinal, que leva ao espessamento fibroso da submucosa devido ao megarreto, com edema de mucosa associado (Muisse & Cowles, 2016; Kapur, 2009; Croffie et al., 2007).

Não existe consenso quanto à padronização do número de fragmentos necessários e dos locais para realização das biópsias retais (Kapur, 2009). Sabe-se que 1 a 2 cm distais do reto são, fisiologicamente, hipogangliônicos (Takawira et al., 2015; Schäppi et al., 2013; Tjaden & Trainor, 2013; Aldridge & Campbell, 1968). Isto pode levar a falsos diagnósticos de aganglionose e exigem, na prática, análise de múltiplos cortes histológicos na busca por células ganglionares (Kapur, 2009). Desta forma, classicamente, propõe-se a realização de ao menos duas biópsias, que devem ser obtidas a 2 e 3 cm acima da linha pectínea (Takawira et al., 2015; Schäppi et al., 2013; Aldridge & Campbell, 1968). Os fragmentos devem ser retirados da parede posterior do reto (Muisse & Cowles, 2016).

Durante a realização da biópsia retal, a determinação exata do local de biópsia é difícil, principalmente nas técnicas realizadas “às cegas”, através da inserção de pinças. Assim, não é incomum, na análise histopatológica, a observação de fragmentos da junção escamo-colunar (Kapur et al., 2009). Presumivelmente, deve ocorrer também desvio no sentido proximal, o que pode dificultar o diagnóstico das formas curtas da doença. Por estas razões, alguns autores recomendam a realização de biópsias a 1, 2 e 3 cm da linha pectínea (Kapur, 2009). Meier-Ruge & Bruder (2008) preconizam a obtenção de quatro fragmentos: na linha pectínea (0cm), e a 1, 3 e 6cm acima.

O exame histopatológico das biópsias retais utilizando-se a coloração da

hematoxilina e eosina (H&E) constitui o método padrão, mais comumente utilizado, e permite excluir o diagnóstico de DH ao evidenciar ao menos uma célula ganglionar na submucosa do reto (Kapur, 2009). Os critérios para o diagnóstico histopatológico de DH pela H&E compreendem, além da ausência de células ganglionares, a identificação da hipertrofia de troncos nervosos na submucosa (Knowles et al., 2010). Estas estruturas são fibras nervosas do sistema nervoso extrínseco que estão presentes na submucosa e muscular própria do segmento aganglionar, aumentadas em número e com diâmetro superior a 40  $\mu\text{m}$ . No entanto, a hipertrofia das fibras nervosas pode não ser observada em alguns dos pacientes portadores DH sendo, portanto, considerada um marcador com sensibilidade incompleta (Kapur et al., 2009; Kapur, 2006). Histologicamente, a aganglionose nos plexos nervosos do sistema nervoso entérico é patognomônica de DH (Tjaden & Trainor, 2013).

Apesar da aparente simplicidade do quadro morfológico, a análise histopatológica pela H&E pode se tornar uma experiência bastante trabalhosa, principalmente para patologistas não especialistas (Kapur, 2006). Algumas situações são críticas nesta análise morfológica, tais como a realização de biópsias retais em regiões muito distais, com pobreza de células ganglionares ou a obtenção de fragmentos de biópsia superficiais, sem envolver a submucosa. Há também dificuldades na identificação precisa das células ganglionares, especialmente em neonatos que apresentam imaturidade do sistema nervoso entérico (Guinard-Samuel et al., 2009; Kapur et al., 2009). Em casos de aganglionose colônica total o diagnóstico histopatológico torna-se ainda mais difícil. Na análise por congelação, pode haver confusão, levando ao diagnóstico equivocado de zona de transição, já que pode ocorrer a presença de células com anormalidades. Como a população celular e a inervação são anormais, o padrão morfológico típico da DH pode não estar presente, com troncos nervosos completamente ausentes. Além disso, pode haver outras alterações, como a hipoplasia da inervação simpática e da presença de células de Cajal na parede intestinal (Moore, 2015).

Para garantir especificidade, os fragmentos de reto devem medir cerca de 3 mm de diâmetro, possuir ao menos um terço de submucosa e serem adequadamente orientados no processo de inclusão em parafina, para obtenção de cortes histológicos perpendiculares à mucosa. Devem ser feitos cortes seriados, cuja recomendação de número varia entre os diferentes serviços (Kapur, 2009). A habilidade e a experiência do examinador são fundamentais no diagnóstico histopatológico de DH pela H&E (Kapur, 2009). Considerando essas dificuldades, alguns centros têm como rotina a avaliação dos fragmentos por 2 especialistas e, em caso de divergências na interpretação, as amostras são enviadas para outra avaliação (Takawira et al., 2015).

Ao longo de décadas, pesquisadores buscam um método simples, factível e com boa acurácia para facilitar o diagnóstico histopatológico da DH por meio da análise de biópsias retais de sucção (Kapur, 2006).

A atividade da enzima acetilcolinesterase, identificada por método histoquímico, foi demonstrada como evidência indireta da presença de fibras nervosas colinérgicas no segmento agangliônico (Meier-Ruge, 1968). Para isto, fragmentos de biópsias retais a fresco são submetidos a cortes histológicos em criostato (-20°C) e passam por reações químicas para detectar a atividade desta enzima (Feichter et al., 2009; Hanker et al., 1964; Karnovsky & Roots, 1964). Modificações técnicas, objetivando diminuição do tempo para a coloração, foram descritas com resultados adequados (Martuciello et al., 2001; Kobayashi et al., 1994). O papel desta técnica histoquímica como adjuvante à análise histopatológica convencional foi determinado por Meier-Ruge et al. (1972). Desta forma, a atividade da acetilcolinesterase nos indivíduos normais está praticamente ausente ou é mínima. Por outro lado, as biópsias de pacientes portadores de DH demonstram aumento da atividade da enzima nas fibras nervosas parassimpáticas da lâmina própria da mucosa, da muscular da mucosa e na camada circular da muscular própria (Meier-Ruge & Bruder, 2008).

A grande vantagem do método da acetilcolinesterase é que biópsias mais superficiais podem ser adequadas para revelar a atividade da enzima na lâmina própria e na muscular da mucosa, confirmando o diagnóstico de DH (Kapur, 2009). Entretanto, a atividade da enzima na lâmina própria da mucosa é fraca em recém-nascidos e em pacientes portadores da forma ultracurta da doença, sendo, portanto, necessário que as biópsias contemplem ao menos a camada muscular da mucosa (Kapur, 2009; Meier-Ruge & Bruder, 2008). Alguns estudos revelam índices de acurácia diagnóstica de 99 a 100% para o diagnóstico de DH, tendo como critério o aumento de atividade da acetilcolinesterase nas fibras nervosas da lâmina própria e da muscular da mucosa (Moore & Johnson, 2005). Por outro lado, há relatos que apresentam resultados variáveis e problemas na interpretação deste método (Kapur, 2006). Resultados falsos positivos podem ser justificados pela presença de acetilcolinesterase na membrana celular de hemácias, em casos de espécimes com hemorragia (Moore & Johnson, 2005). Os resultados falsos negativos, no entanto, são os mais amplamente discutidos, atingindo taxas de até 40% (Kapur et al., 2009). A intensidade da atividade da enzima parece aumentar com a idade. Neste sentido, a ausência de reação positiva para acetilcolinesterase em recém-nascidos, com menos de 3 semanas de idade, não exclui o diagnóstico. Além disso, são descritos padrões de distribuição dos troncos nervosos, evidenciados pela distribuição da reação enzimática nas diferentes camadas da parede retal. Estes padrões apresentam variação direta com a idade. Crianças mais novas, com até 3 meses de idade, apresentam troncos nervosos espessos, que não alcançam a lâmina própria da mucosa, enquanto crianças mais velhas, acima de 1 ano de idade, comumente apresentam troncos nervosos mais finos na lâmina própria da mucosa (Takawira et al., 2015; Brito & Maksoud, 1987; Chow et al., 1977). Padrões incomuns podem também ser encontrados em biópsias obtidas próximo à flexura esplênica, onde a atividade da enzima é quase nula, ou em pacientes com aganglionose colônica total ou com de Displasia Neuronal Intestinal do tipo B

(Takawira et al., 2015; Schäppi et al., 2013; Moore & Johnson, 2005). Takawira et al. (2015), demonstraram taxas de 81% de sensibilidade e de 98% para especificidade em revisão sistemática da literatura.

Por tudo isso, o método histoquímico da acetilcolinesterase é considerado útil no diagnóstico da aganglionose colônica e pode superar as dificuldades relacionadas com amostras superficiais da mucosa retal (Knowles et al., 2010; Martucciello et al., 2005; Moore & Johnson, 2005). Por outro lado, este método exige a obtenção de fragmentos a fresco para os cortes em criostato e todo um aparato técnico histoquímico (Feichter et al., 2009). Além disso, a existência de diferentes padrões de atividade enzimática exige análise quantitativa e qualitativa, dificultando sua interpretação mesmo para patologistas experientes (Guinard-Samuel et al., 2009; Kapur et al., 2009). Estas razões acabam por limitar a disponibilidade e a utilização deste método na investigação diagnóstica de DH (Kapur et al., 2009). Knowles (2009) descreve a falta de estudos comparando a análise histopatológica pela H&E com o método histoquímico da acetilcolinestase para estabelecer uma recomendação precisa de qual seria o melhor método para o diagnóstico de DH.

Por tudo isso, a pesquisa de novos métodos complementares para análise destas biópsias retais teve continuidade (Kapur, 2006). O advento da imunohistoquímica, na segunda metade do século XX, abriu nova perspectiva para a busca de marcadores que poderiam facilitar o diagnóstico histopatológico de DH (Leong et al., 2010; Kapur, 2006). O marcador imunohistoquímico ideal deveria ser de fácil execução e interpretação, a partir de material de biópsias retais incluídas em parafina e apresentar alta sensibilidade e especificidade, evitando a análise de múltiplos cortes histológicos e a necessidade de biópsias repetidas (Kapur, 2006).

Neste contexto, vários tipos de marcadores vêm sendo propostos para auxiliar a identificação das células ganglionares ou delinear a natureza das fibras nervosas nas biópsias retais para investigação da doença de Hirschsprung (Holland et al., 2010). Podemos destacar o

uso da enolase neurônio-específica (NSE) e da periferina facilitando a identificação das células ganglionares. A proteína S-100 é um marcador que evidencia as fibras nervosas extrínsecas hipertrofiadas no segmento agangliônico (Holland et al., 2010; Kapur, 2006; Robey et al., 1998). Existem, também, estudos que investigaram a utilização de MAP5 (proteína 5 associada a microtúbulos), GLUT-1 (transportadora 1 de glicose), GFAP (proteína glial fibrilar ácida) e do método Diff Quick, buscando facilitar a identificação de células ganglionares (Szyberg & Marszatek, 2014).

Na última década, o método imunohistoquímico da calretinina ganhou destaque, firmando-se como método fundamental na investigação diagnóstica da DH (Lourenção et al., 2013, 2014; Holland et al., 2011; Guinard-Samuel et al., 2009; Kapur et al., 2009; Barshack et al., 2004). Uma subclasse de corpos celulares de neurônios, presentes nos plexos submucosos e mioentéricos do trato gastrointestinal humano, demonstra imunopositividade para calretinina (Wattchow et al., 1997; Walkers et al., 1993). Este marcador, por sua vez, é uma proteína de 29-kDA, que se liga ao cálcio, dependente de vitamina D, e que possui importante papel como sensor e modulador dos íons cálcio (Kapur et al., 2009; Barshack, 2004). Em indivíduos normais, há a expressão da calretinina nas células ganglionares e em pequenas fibras nervosas intrínsecas nos plexos submucosos e mioentéricos. Por outro lado, em indivíduos com DH, há perda total da expressão da calretinina em segmentos agangliônicos. Assim, este é um método muito preciso para afastar o diagnóstico de DH, quando há identificação da imunoexpressão deste marcador. Outra vantagem é o fato deste método utilizar o mesmo material da biópsia retal já incluída em parafina, não sendo necessários novos fragmentos à fresco para congelação (Lourenção et al., 2013, 2014). Takawira et al. (2015) relatam grande heterogeneidade nos estudos que reconhecem a utilidade da calretinina como importante ferramenta para auxiliar o diagnóstico de DH, mas destacam também seu potencial para o diagnóstico das formas ultra-curta e longa e a sua viabilidade, mesmo quando



a amostra não é adequada para avaliação por outros métodos imunohistoquímicos. Schäppi et al. (2013), por sua vez, sugerem que, em laboratórios experientes, a acurácia dos métodos imunoistoquímicos no diagnóstico histopatológico de pode atingir até 99%, com alta sensibilidade e especificidade (Schäppi et al., 2013).

## 10. Diagnósticos diferenciais

Recém-nascidos com sintomas obstrutivos intestinais e crianças mais velhas com constipação intestinal grave, refratária ao tratamento clínico, são os principais grupos de pacientes que devem ser submetidos à investigação diagnóstica para DH. Alguns sinais clínicos são considerados como “sinais de alarme” e exigem a investigação diagnóstica para causas orgânicas de constipação intestinal, incluindo as disganglionoses intestinais. Estes sinais clínicos incluem o início dos sintomas obstrutivos intestinais no primeiro mês de vida, atraso na eliminação de mecônio (>48 horas), história familiar de DH, déficit de crescimento, febre, vômitos biliosos, distensão abdominal, alterações no exame físico da região anal e eliminação explosiva de fezes após exame digital do reto (Tabbers et al. 2014).

Quando os sintomas clássicos de distensão abdominal, constipação e vômitos não estão presentes em uma história clínica detalhada, deve-se considerar desnecessária a exclusão diagnóstica de DH evitando, conseqüentemente, a realização de biópsias retais desnecessárias (Muisse & Cowles, 2016). Segundo Lewis et al. (2003), 36% das biópsias retais, realizadas por sucção, seriam desnecessárias.

Os principais diagnósticos diferenciais para DH, estratificados de acordo com a faixa etária, são apresentados no Quadro 2.

Faixa etária	Condições clínicas	Condições cirúrgicas
Neonatal	<p><b>Prematuridade</b> - íleo funcional (raio X com distensão gasosa sem nívei hidroaéreos, autolimitado);</p> <p><b>Botulismo:</b> muito raro, clostridium botulínico associado ao consumo de mel;</p>	<p><b>Doença de Hirschsprung:</b> atraso na eliminação de mecônio, distensão abdominal, vômitos, ausência de células ganglionares na biópsia retal, exige abaixamento;</p> <p><b>Íleo meconial:</b> associado a fibrose cística, enema contrastado pode ser diagnóstico e terapêutico, investigação de fibrose cística;</p> <p><b>Malformação anorretal:</b> diagnóstico possível pelo US antenatal, ausência de ânus ao exame físico, necessária correção cirúrgica</p>
Pré-escolar e escolar	<p><b>Constipação funcional:</b> excluir causas orgânicas, os sintomas para diagnóstico incluem incontínênica, retenção fecal, dores abdominais, fecalomas, fezes calibrosas;</p> <p><b>Alergia à proteína do leite de vaca:</b> investigação clínica e teste terapêutico baseado em alergia;</p> <p><b>Doença celíaca:</b> exames laboratoriais incluindo IgA e IgG e biópsias duodenais, tratamento com dieta restritiva em relação ao glúten;</p> <p><b>Intoxicação por chumbo:</b> pode estar associada a vômitos e dor abdominal;</p> <p><b>Hipotireoidismo:</b> congênito ou adquirido, diagnóstico realizado por dosagem sérica hormonal;</p> <p><b>Pseudo-obstrução intestinal:</b> doenças miopáticas ou neuropáticas intestinais, congênicas ou adquiridas, diagnosticadas por aumento no tempo de trânsito intestinal</p> <p><b>Muito baixo peso ao nascimento:</b> atraso no desenvolvimento neuropsicomotor;</p> <p><b>Distúrbios Neurológicos;</b></p> <p><b>Displasia neuronal intestinal tipo B</b></p>	<p><b>Doença de Hirschsprung:</b> considerar manometria anorretal e biópsia retal para diagnóstico, diagnóstico tardio mais comum em acometimento curto;</p> <p><b>Malformação anorretal:</b> constipação e alterações funcionais podem estar associadas e ainda são um desafio;</p> <p><b>Pseudo-obstrução intestinal:</b> pode-se considerar necessidade de estomia e necessidade de nutrição parenteral;</p> <p><b>Alterações neurológicas:</b> pode-se considerar necessidade de estomia e necessidade de nutrição parenteral;</p> <p><b>Displasia Neuronal Intestinal:</b> pode ser necessária alguma estomia</p> <p><b>Acalásia de esfíncter anal interno:</b> ausência de reflexo inibitório reto-anal na manometria e células ganglionares presentes</p>

**Quadro 2. Principais diagnósticos diferenciais da suspeita clínica de Doença de Hirschsprung (Adaptado de Muise & Cowles, 2016).**

## **11. Tratamento**

O tratamento da DH é cirúrgico. Entretanto, em algumas situações a estabilização clínica pré-operatória é fundamental, principalmente nos casos de complicações tais como enterocolite e sepse (Dasgupta & Langer, 2004). A taxa de incidência de enterocolite antes do procedimento cirúrgico chega a 50% (Green et al., 2016). Neste sentido, alguns pacientes necessitam de reposição hidroeletrólítica, sondagem nasogástrica e irrigações retais antes da realização do procedimento cirúrgico (Dasgupta & Langer, 2004; Maksoud, 2003). Após o estabelecimento diagnóstico de DH, recomenda-se a realização de irrigações retais com 10 a 20ml/kg/dia de solução fisiológica à 0,9% aquecido, para facilitar a passagem das fezes e manter o reto descomprimido (Green et al., 2016).

A evolução das técnicas para o tratamento cirúrgico da DH apresentou grande avanço nas últimas décadas, permitindo a realização de cirurgias em tempo único, mesmo em crianças mais novas (So et al., 1980), sem a necessidade da realização de colostomia primária. Isto diminuiu a morbidade relacionada à colostomia nas crianças, além de demonstrar redução dos custos (Dasgupta & Langer, 2004). Atualmente a realização de colostomia primária no tratamento destas crianças possui indicações restritas como enterocolite grave, perfuração intestinal, desnutrição grave ou grande dilatação do cólon proximal (Dasgupta & Langer, 2004). Todas as técnicas cirúrgicas descritas obedecem como princípios centrais: a remoção do segmento aganglionar e a reconstrução do trânsito intestinal, trazendo o segmento ganglionar até o ânus, com preservação da função esfinteriana (Tjaden & Trainor, 2013; Dasgupta & Langer, 2004). Para a adequada ressecção cirúrgica, envolvendo todo o segmento aganglionar e a zona de transição hipogangliônica, é mandatória a realização de biópsias de congelação seriadas no intra-operatório (Schäppi et al., 2013).

A primeira técnica cirúrgica descrita para o tratamento cirúrgico de DH é a proposta por Swenson & Bill (1948) e possui como particularidade a inversão e exteriorização

do reto, seguida do abaixamento do cólon através do reto invertido, realizando-se a ressecção do segmento aganglionar e anastomose colo-retal término-terminal. Esta técnica apresentou bons resultados e foi utilizada em muitos serviços, por vários anos (Sherman et al., 1989). Entretanto, dificuldades técnicas foram descritas, principalmente para a realização da dissecação pélvica, com potenciais danos à inervação urogenital (Maksoud, 2003).

Duhamel (1956) descreveu a técnica cirúrgica que levou seu nome e logo se tornou o procedimento mais realizado no tratamento da DH, em todo o mundo, com excelentes resultados. A técnica consiste no abaixamento do cólon através do espaço retro-retal, sem dissecação das paredes anterior e laterais do reto. O reto é aberto em sua parede posterior, sendo realizado abaixamento do cólon por este orifício com posterior anastomose término-lateral (Duhamel, 1956, 1963). Algumas modificações técnicas, como as propostas por Ikeda e Soper, que utilizam grampeadores mecânicos para confecção da anastomose, foram descritas, entretanto os princípios da cirurgia foram sempre mantidos (Seo et al., 2017; Vrsansky et al., 1998).

Outra técnica cirúrgica bastante utilizada para o tratamento da DH é a proposta por Soave (1964), e modificada por Boley (1964). Este procedimento objetiva evitar lesões a vasos e nervos da pelve, protegendo o esfíncter interno. Pela via abdominal realiza-se mucossectomia do reto, com preservação de seu manguito muscular, e o abaixamento do cólon é realizado por via endo-retal, com anastomose primária do segmento ganglionar logo acima da linha pectínea. A confecção de manguito com extensão de 2-3 cm objetiva evitar obstruções mecânicas como complicação pós-operatória (Pakarinen, 2018).

O abaixamento primário do cólon via endorectal, assistido por videolaparoscopia, desenvolvido por Georgeson et al. (1999), constituiu importante marco na evolução das técnicas cirúrgicas para o tratamento da doença de Hirschsprung. Este procedimento propõe a mobilização do cólon com o auxílio videolaparoscópico e seu abaixamento por dissecação

endoanal e com anastomose do segmento gangliônico realizada primariamente. Esta técnica demonstrou resultados adequados, com menor tempo de recuperação pós-operatória (Haricharan & Georgeson, 2008; Georgeson et al., 1999). Além disso, a videolaparoscopia permite a coleta de biópsias seromusculares seriadas para identificar o cólon normal, mobilização e dissecação do segmento aganglionar, com menor manipulação e distensão do canal anal (Tjaden & Trainor, 2013). Desta forma, esta técnica consolidou novos princípios para o tratamento cirúrgico da aganglionose colônica, como tratamento em tempo único para lactentes e recém-nascidos, através de procedimento cirúrgico minimamente invasivo (Dasgupta & Langer, 2004; Maksoud 2003).

A ressecção do segmento aganglionar exclusivamente pela via transanal, sem mobilização intra-abdominal foi inicialmente descrita por de La Torre & Ortega-Salgado (1998), e desde então, tornou-se o procedimento de eleição para o tratamento da doença de Hirschsprung. Apresenta inúmeras vantagens que incluem a recuperação pós-operatória mais rápida, com menores taxas de complicação e, conseqüentemente, menor tempo de internação hospitalar e melhores resultados estéticos. No entanto, as complicações relacionadas à mobilização transanal do reto e alongamento do esfíncter anal levam à desconfiança quanto às repercussões a longo prazo, como escapes fecais, incontinência e constipação (de La Torre & Langer, 2010; Tjaden & Trainor, 2013; Seo et al., 2017). Uma proposta mais recente é a da realização do abaixamento endorretal transanal baseado na técnica de Swenson, com dissecação da parede total do reto, desde 2 cm acima da linha pectínea, sem a manutenção de um *cuff* muscular. Em estudo recente publicado por Bing et al. (2017), esta técnica apresentou menor perda sanguínea, menor tempo cirúrgico e menor taxa de complicação em comparação ao abaixamento endorretal pela técnica proposta por de La Torre & Ortega-Salgado (1998). Ainda não há estudos suficientes que permitam concluir qual a melhor técnica cirúrgica a ser empregada no tratamento da Doença de Hirschsprung (Calkins, 2018).

Estes avanços no tratamento cirúrgico da DH, atualmente realizado em tempo único, exigiram precisão diagnóstica ainda mais crucial. O diagnóstico pré-operatório correto por meio da análise das biópsias retais, amplamente discutido, constitui a base para a indicação do tratamento cirúrgico (Barshack et al., 2004). Além disso, no intra-operatório, a identificação da presença de células ganglionares, pela análise histológica imediata de tecido, tornou-se passo fundamental no tratamento cirúrgico, determinando o local seguro para o término da ressecção e realização anastomose endoanal (De La Torre & Langer, 2010; Shayan et al., 2004).

Segundo a revisão de Kapur & Kennedy (2012), a zona de transição se estende, aproximadamente, entre 3 a 5cm entre a porção aperistáltica e a porção normal do cólon. Sendo assim, ressecções que compreendam essa extensão ou mais, apresentam maior taxa de sucesso em relação à ocorrência de sintomas obstrutivos (Kapur & Kennedy, 2012). Além disso, a peça cirúrgica deve ter sua margem proximal avaliada cuidadosamente em toda a circunferência, devido à distribuição irregular das células ganglionares na zona de transição (Schäppi et al., 2013).

Há grande controvérsia ainda em relação à abordagem cirúrgica da aganglionose total. Alguns autores defendem a realização do abaixamento de cólon assim que o diagnóstico for confirmado; outros preferem a confecção de ileostomia com abaixamento em um segundo momento (sem consenso sobre a idade em que deve ser realizado) e, ainda, há os que defendem o abaixamento de cólon no momento do diagnóstico, associado a confecção ileostomia protetora, postergando a reconstrução para o momento em que a criança já estiver com controle esfinteriano urinário, tolerando os enemas retais (Calkins, 2018). Para realização do abaixamento em caso de aganglionose total, pode-se utilizar as três principais técnicas citadas anteriormente ou ainda a técnica de Duhamel modificada por Martin, em que o delgado é anastomosado lateralmente ao cólon agangliônico, permitindo a maior absorção

de água e de eletrólitos. No entanto, não há, também, qualquer comprovação científica de que alguma técnica seria superior em relação à morbidade, mortalidade e à qualidade de vida. Assim, a técnica a ser escolhida deve ser a qual o cirurgião estiver mais familiarizado (Calkins, 2018).

Alguns artigos descrevem como promissora a terapia com células tronco. Apesar das dificuldades, já que as alterações da DH acontecem durante a embriogênese, há estudos demonstrando que as células-tronco migram corretamente no intestino, mesmo após o nascimento, quando os sinalizadores são adequadamente utilizados. Os testes ainda estão sendo realizados em modelos experimentais, mas os resultados são animadores para expandir a investigação para testes clínicos (Stamp, 2017).



## 12. Enterocolite associada à Doença de Hirschsprung

Diarréia, podendo ser explosiva e sanguinolenta, febre e distensão abdominal na criança com DH devem levantar a suspeita diagnóstica de enterocolite, a mais grave complicação clínica relacionada à doença, podendo evoluir com desidratação e sepse (Schäppi et al., 2013; Puri & Montedonico, 2008). Por apresentar-se com sinais e sintomas inespecíficos, há dificuldade no estabelecimento do seu diagnóstico podendo ser sub ou superdiagnosticada (Gosain et al., 2017). No entanto, o registro da literatura é de incidência que varia de 12 a 58% dos pacientes, e pode ocorrer antes ou após o tratamento cirúrgico, conforme as descrições clínicas iniciais de Bill & Chapman (1962). A descrição da literatura cita ocorrência de 6-50% em pacientes pré-operatórios e 2-35% em pacientes pós-operatórios (Nakamura et al., 2018).

A enterocolite é a complicação mais grave associada à DH, podendo levar a risco de morte. Sua recorrência chega a até 38%, em pacientes que apresentam enterocolite no período pré-operatório. Algumas teorias foram estabelecidas, sugerindo a patogênese dessa complicação. Dentre elas, é descrito o supercrescimento bacteriano associado à estase fecal e a quebra de barreira de defesa e de imunidade na mucosa intestinal, associada ao aumento de IgA. Além disso, acredita-se na associação com alteração da microbiota intestinal e a presença de germes anaeróbios e de *Clostridium difficile*. Há, também, um grande esforço na tentativa de se estabelecer a presença de genes específicos, relacionados à ocorrência de enterocolite (Gosain, 2016). Essas crianças apresentam infiltrado inflamatório no exame histopatológico da mucosa colônica. Isto pode levar a inflamação transmural e eventual perfuração intestinal (Teitelbaum et al., 1989).

O tratamento desta complicação consiste em irrigações retais, antibioticoterapia de amplo espectro, que cubram germes gram negativos e anaeróbios, descompressão com sonda nasogástrica e reposição hidroeletrólítica endovenosa (Gosain et al., 2017; Green et al.,

2016). Algumas condições, como Síndrome de Down, aganglionose de segmento longo, enterocolite prévia ou obstrução intestinal independentemente da causa, favorecem a ocorrência dessa grave complicação (Gosain et al., 2017). Essa complicação pode atingir taxas de mortalidade de 1 a 10%, sendo mais frequente em recém-nascidos, antes da cirurgia definitiva (Gosain, 2016).

Como o quadro clínico da doença de Hirschsprung é caracterizado por constipação intestinal, a presença de diarreia nos episódios de enterocolite pode levar a erros diagnósticos (Dasgupta & Langer, 2004). Diante da dificuldade diagnóstica da enterocolite devido à inespecificidade de seu quadro clínico, considera-se benéfico para a criança que seja tratada na suspeita dessa complicação, evitando que o paciente apresente formas mais graves da condição (Gosain et al., 2017). Neste contexto, Gosain et al. (2017) propõem um protocolo que classifica a enterocolite, de acordo com sua gravidade clínica e propõe o respectivo tratamento, conforme apresentado nos Quadros 3 e 4.

<b>Grau</b>	<b>Descrição</b>	<b>Quadro clínico</b>	<b>Exame físico</b>	<b>Radiografia</b>
I	Possível	Dairreia, anorexia	Distensão abdominal leve	Normal ou discretos sinais de obstrução com níveis
II	Definida	Episódio prévio de enterocolite, diarreia explosiva, febre, letargia	Febre, taquicardia, distensão e tensão abdominal, liberação explosiva de flatus ou fezes ao toque retal	Padrão obstrutivo, presença de níveis hidroaéreos, dilatação de alças, cut-off no reto
III	Grave	Obstipação, rebaixamento do nível de consciência	Diminuição da perfusão periférica, hipotensão, alteração do nível de consciência, distensão abdominal, peritonite	Pneumatose, pneumoperitônio

**Quadro 3. Classificação clínica da enterocolite associada à DH (Adaptado de Gosain et al. (2017)).**

<b>Grau</b>	<b>Internação</b>	<b>Dieta</b>	<b>Antibióticos</b>	<b>Irrigações</b>	<b>Cirurgia</b>
I	Não necessariamente	Hidratação oral	Metronidazol VO	Considerar	
II	Deve ser considerada	Dieta zero ou líquidos claros, hidratação endovenosa	Metronidazol VO ou EV, considerar necessidade de ampliação de espectro com ampicilina ou gentamicina ou piperacilina + tazobactam	Indicadas	
III	Considerar necessidade de UTI	Jejum e hidratação endovenosa	Metronidazol EV com ampicilina ou gentamicina ou piperacilina + tazobactam	Indicadas	Estomia proximal, exploração em caso de pneumoperitônio

**Quadro 4. Tratamento da enterocolite associada à DH, de acordo com sua classificação clínica (Adaptado de Gosain et al. (2017)).**

A prevenção da enterocolite no período pós-operatório consiste na realização de irrigações retais de rotina, administração de metronidazol via oral a longo prazo, e uso de probióticos, principalmente por 4 semanas (Gosain et al., 2017). Os probióticos são substâncias que trazem benefícios ao hospedeiro quando utilizados de maneira adequada, com efeito antimicrobiano por modificação da flora intestinal e secreção de substâncias antibacterianas. Dessa maneira há uma competição com a flora local por nutrientes, com efeito de antitoxina, além de dificultar a aderência desses microorganismos ao epitélio. No entanto, em revisão sistemática, Nakamura et al. (2018) demonstraram que não há redução

estatisticamente significativa na redução de risco para enterocolite associada ao Hirschsprung quando se utilizou probióticos, apesar de alguns artigos relatarem individualmente que o seu uso seria benéfico.

### 13. Complicações

As taxas de complicações relacionadas aos procedimentos cirúrgicos apresentam grande variação e compreendem, principalmente, complicações relacionadas à ferida operatória, deiscência de sutura, constipação, incontinência fecal, quadros obstrutivos, dermatites perianais e enterocolite (Pakarinen, 2018; Schäppi et al., 2013; Tjaden & Trainor, 2013). Green et al., em 2016, descreveram que 60% dos pacientes submetidos a correção cirúrgica de DH apresentam complicações. Aderências não ocorrem habitualmente, mas tem maior probabilidade de acontecer em pacientes submetidos a procedimentos com abordagem abdominal. As complicações relacionadas à ferida operatória são pouco frequentes, com taxas de incidência de 3-6%. Apesar de raras, também são descritas na literatura complicações genitourinárias com incidência de 1-2% após abaixamento transanal (Pakarinen, 2018).

A deiscência de anastomose tem uma frequência entre 0 e 8% e está principalmente associada à demora para realização de procedimento cirúrgico, piorando a distensão do cólon. A confecção de uma ileostomia temporária para desvio do trânsito é uma opção que não deixa sequelas funcionais tardias. As estenoses das anastomoses colorretais, por sua vez, respondem, em sua maioria, a dilatações anais seriadas. No entanto, quando há sintomas obstrutivos e resistência às dilatações, deve-se considerar a necessidade de reabordagem (Pakarinen, 2018).

Em revisão sistemática e metanálise realizada em 2017, Seo et al. compararam os resultados e complicações de abaixamentos realizados com a técnica de Duhamel e os abaixamentos transanais endoretais. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes, mas os abaixamentos transanais demonstram maior tendência à enterocolite e estenose da anastomose em relação à técnica de Duhamel. Por outro lado, apresentam menor tendência à constipação, incontinência ou perdas fecais e deiscência de anastomose. Alguns riscos foram associados a essas complicações. É possível observar que o hábito intestinal

melhora conforme a criança cresce, independentemente da técnica de abaixamento utilizada. A desnutrição, a estenose de anastomose e o atraso para o diagnóstico, em crianças menores, foram associados a maior risco de enterocolite no pós-operatório. Já a estenose retal está associada à isquemia na região de anastomose, deiscência ou isquemia do manguito muscular. Rouzrokh et al. (2010) preconizam a dilatação profilática com velas de Hegar para evitar a estenose da anastomose (Seo et al., 2017).

Em 2016, outra revisão sistemática, com 6 estudos incluídos e um total de 316 crianças submetidas a abaixamento endorretal transanal, em seguimento médio de 4,3 anos, descreve que 14,2% dos pacientes apresentaram distúrbios intestinais (constipação, incontinência e enterocolite). Essas alterações podem melhorar com o decorrer da infância, conforme a criança adquire maior consciência comportamental. No entanto, observa-se que a constipação é uma condição mais prolongada (Zimmer et al., 2016).

A dismotilidade intestinal pode persistir por alteração na distribuição e na função das células intersticiais de Cajal, muitas vezes associada à DH (Schäppi et al., 2013). Os sintomas obstrutivos podem estar relacionados a alterações funcionais ou mecânicas e têm taxas de incidência descritas entre 8 e 30%, sendo que a variabilidade se deve à falta de padronização no reconhecimento dos sintomas (Langer et al., 2017). As principais razões para a persistência dos sintomas obstrutivos são: obstrução mecânica, aganglionose adquirida ou residual, distúrbios de motilidade, disfunção do esfíncter anal interno e megacolon funcional por alterações comportamentais (Calkins, 2018). Quando há sintomas obstrutivos mais brandos, alterações dietéticas, laxantes, enemas ou injeção de toxina botulínica a cada 3 a 4 meses podem levar a controle satisfatório. Para pacientes com acalasia do esfíncter anal interno, que respondem bem à toxina botulínica, mas tem alguma restrição a administrações repetidas, a miomectomia torna-se uma opção (Tjaden & Trainor, 2013). Em caso de constipação intestinal grave, o procedimento de Malone para enemas anterógrados deve ser

considerado, para permitir a irrigação desde a transição íleo-cecal corrigindo os sintomas obstrutivos (Green et al., 2016).

Por outro lado, quando há aganglionose residual ou adquirida, abaixamento da zona de transição, estenoses, aderências pós-operatórias, twist do cólon abaixado ou cólon proximal dilatado disfuncional deve-se considerar a reabordagem com novo abaixamento de cólon, sem se esquecer das dificuldades prováveis por aderências do procedimento prévio (Pakarinen, 2018; Tjaden & Trainor, 2013). Algumas especulações são feitas sobre as causas de aganglionose adquirida. Nesses casos, as margens do cólon abaixado apresentam-se inicialmente com células ganglionares. Deve-se considerar a possibilidade de identificação errônea pelo patologista, mas existem teorias que defendem uma variante da DH, enquanto outras acreditam que há uma morte de células ganglionares por isquemia em consequência do abaixamento. Outros relatam ainda que o crescimento da criança levaria ao aumento da tensão no cólon abaixado, gerando um segmento agangliônico e ainda há os que sugerem que a constipação crônica pode levar ao alongamento desse segmento (Ralls et al., 2017). O abaixamento inadvertido da zona de transição aumenta o risco de complicações no pós-operatório (Kapur & Kennedy, 2012). Entretanto, a necessidade de novas reabordagens cirúrgicas, com um novo abaixamento, é pouco relatada na literatura. Ralls et al. (2017) descreveram, recentemente, a necessidade de novo abaixamento em menos de 3% dos pacientes. Os pacientes submetidos a um novo abaixamento apresentam piores marcadores relacionados a hábitos intestinais a longo prazo quando comparados a pacientes submetidos a um único procedimento, sem ter relação com o tipo de procedimento escolhido (Ralls et al., 2017).

Em sua revisão de 2016, Zimmer et al. descreveram que em 3,2% dos casos foi necessária uma segunda abordagem cirúrgica, mas sem especificar as complicações que levaram a isso (Zimmer et al., 2016).

Observamos também, que alguns pacientes desenvolvem “soiling” no pós-operatório. Essa condição está relacionada à perda da função de continência do esfíncter anal, menor sensibilidade no canal anal ou pseudoincontinência por encoprese ou hiperperistalse intestinal (Calkins, 2018). Os abaixamentos endoanais podem acarretar mais comumente incontinência fecal por manipulação do esfíncter e anastomose coloanal realizada inadvertidamente na linha pectínea ou após ela. Além disso, deve-se considerar que o reservatório natural (o reto) foi removido (Calkins, 2018). Quando o abaixamento é realizado no período neonatal, também há maior risco de lesão esfíncteriana (Pakarinen, 2018). Alguns autores defendem que as dilatações forçadas podem levar a lesão do esfíncter anal interno, causando incontinência ou perdas fecais (Zimmer et al., 2016). As perdas fecais, apesar de não corresponderem a complicações graves, geram importante impacto psicossocial por desconforto e isolamento social. Observa-se que em mais de 50% dos pacientes, essa condição melhora significativamente com o passar do tempo, durante a infância. Os pais devem ser orientados sobre a condição e necessidade de acolhimento do paciente, compreendendo que não é um desvio de comportamento (Green et al., 2016). Nesses casos, o paciente se beneficia, além de orientações comportamentais, incluindo o treinamento para evacuação (evacuações programadas), do uso de loperamida quando se necessita da diminuição da frequência e da amplitude das ondas peristálticas (Calkins, 2018).

Quando há suspeita de alguma dessas complicações, é importante que, após história e exame físico detalhados, o paciente seja submetido a uma radiografia contrastada que permita a avaliação da anatomia do cólon abaixado. Na sequência, esse paciente deve ser avaliado, sob anestesia, para verificar integridade do canal anal, o status e posição da anastomose e, quando houver, avaliar o cuff muscular. Por fim, deve-se realizar uma biópsia de parede total logo acima da anastomose para verificar a presença de células ganglionares (Calkins, 2018). Quando se identifica apenas alterações de motilidade, em muitas vezes, um



adequado manejo de cólon permite uma boa evolução do quadro (Calkins, 2018). Para a condução e controle dessas complicações, é fundamental a participação de uma equipe multidisciplinar que envolva gastroenterologistas pediátricos, cirurgiões pediátricos, nutricionistas e psicólogos (Green et al., 2016).

A Figura 4 apresenta uma proposta de fluxograma para o acompanhamento clínico e tratamento de pacientes com DH que apresentem complicações pós-operatórias.

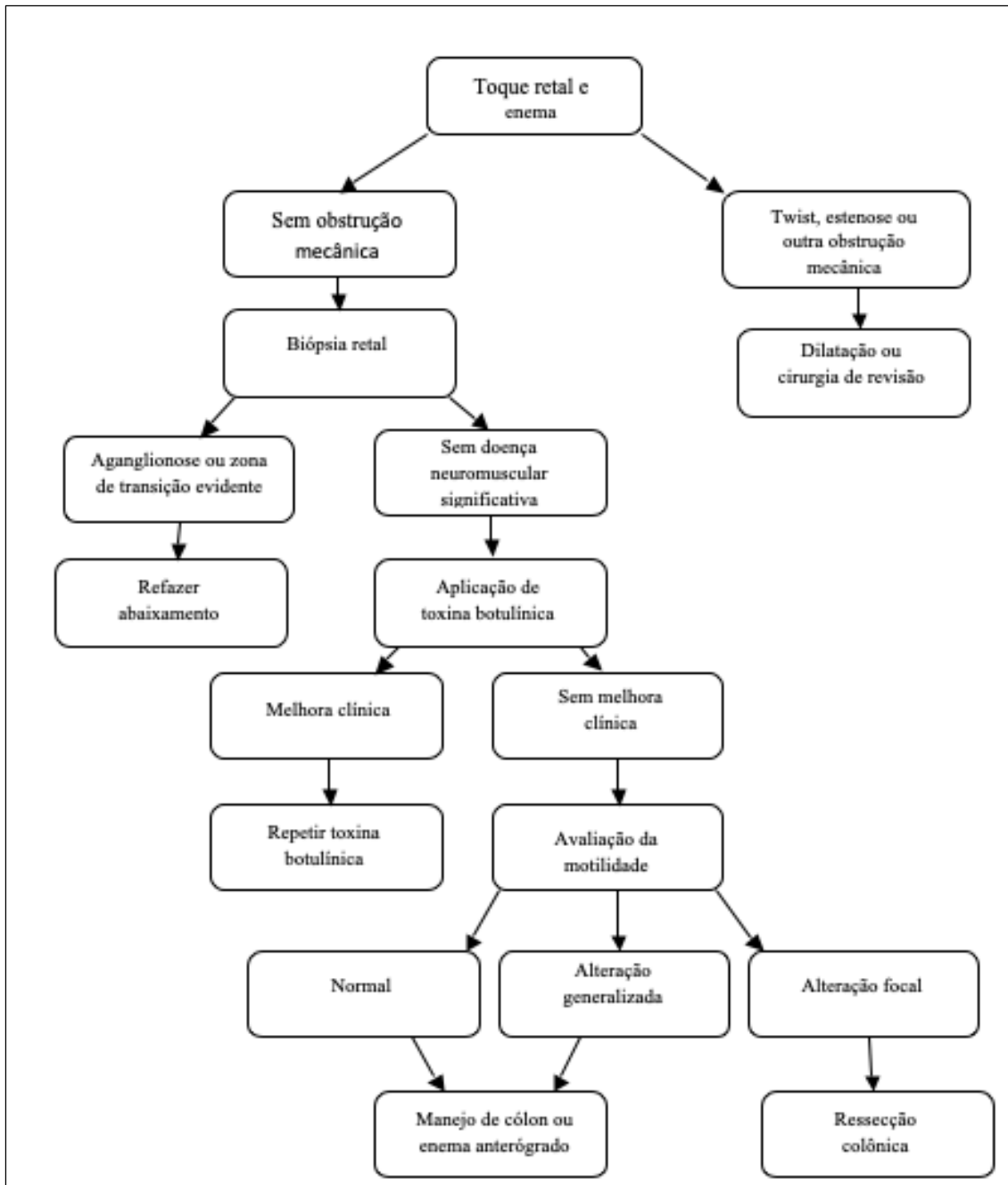


Figura 4: Fluxograma de tratamento de complicações pós-operatórias em pacientes submetidos ao tratamento cirúrgico para DH.

## 14. Referências

Aldridge RT, Campbell PE. Ganglion cell distribution in the normal rectum and anal canal: a basis for the diagnosis of Hirschsprung's disease by anorectal biopsy. *J Pediatr Surg.* 1968; 3(4): 475-90.

Ali AE, Morecroft JA, Bowen JC, Bruce J, Morabito A. Wall or machine suction rectal biopsy for Hirschsprung's disease: a simple modified technique can improve the adequacy of biopsy. *Pediatr Surg Int.* 2006; 22(8):681-2.

Alizai NH, Batcup G, Dixon MF, Stringer MD. Rectal biopsy for Hirschsprung's disease: what is the optimum method? *Pediatr Surg Int.* 1998; 13(2-3):121-4

Althoff W. On the genetics of Hirschsprung's disease. *Z Mensch Vererb Konstitutionsl.* 1962; 36:314-40.

Amiel J, Sproat-Emison E, Garcia-Barcelo M, Lantieri F, Burzynski G, Borrego S, Pelet A, Arnold S, Miao X, Griseri P, Brooks AS, Antinolo G, de Pontual L, Clement-Ziza M, Munnich A, Kashuk C, West K, Wong KK, Lyonnet S, Chakravarti A, Tam PK, Ceccherini I, Hofstra RM, Fernandez R; Hirschsprung Disease Consortium. Hirschsprung disease, associated syndromes and genetics: a review. *J Med Genet.* 2008; 45(1):1-14.

Athow AC, Filipe MI, Drake DP. Problems and advantages of acetylcholinesterase histochemistry of rectal suction biopsies in the diagnosis of Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg.* 1990; 25(5):520-6.

Bahrami A, Joodi M, Moetamani-Ahmadi M, Maftouh M, Hassanian SM, Ferns GA, Avan A. Genetic background of Hirschsprung disease: a bridge between basic science and clinical application. *J Cell Biochem.* 2018; 119(1):28-33.

Barshack I, Fridman E, Goldberg I, Chowers Y, Kopolovic J. The loss of calretinin expression indicates aganglionosis in Hirschsprung's disease. *J Clin Pathol.* 2004; 57(7):712-6.

Bigélli RHM, Fernandes MIM; Galvao LG, Sawamura R. Estudo retrospectivo de 53 crianças com doença de Hirschsprung: achados clínicos e laboratoriais. *Medicina Ribeirão Preto.* 2002;

35: 78-84.

Bill AH, Chapman N. The enterocolitis of Hirschsprung's disease. *Am J Surg.* 1962; 103:70-4.

Bing X, Sun C, Wang Z, Su Y, Sun H, Wang L, Yu X. Transanal pullthrough Soave and Swenson techniques for pediatric patients with Hirschsprung disease. *Medicine (Baltimore).* 2017. 96(10):e6209. doi: 10.1097/MD.00000000000006209.

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.

Bodian M, Carter C. A family study of Hirschsprung's disease. *Ann Hum Genet.* 1963; 26: 261-77.

Bodian M, Stephens FD, Ward BLH. Hirschsprung's disease and idiopathic megacolon *Lancet.* 1949; 1(6540):6-11.

Bolande, RP. The neurocristopathies: a unifying concept of disease arising in neural crest maldevelopment. *Hum Pathol.* 1974; 5 (4): 409-29.

Boley SJ. New modification of the surgical treatment of Hirschsprung's disease. *Surgery.* 1964; 56:1015-7.

Brito IA, Maksoud JG. Evolution with age of the acetylcholinesterase activity in rectal suction biopsy in Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg.* 1987; 22(5):425-30.

Calkins CM. Hirschsprung Disease beyond infancy. *Clin Colon Rectal Surg.* 2018; 31:51-60.

Callaghan RP, Nixon NH. Megarectum: Physiological observations. *Arch Dis Child.* 1964; 39:153-7.

Campbell PE, Noblett HR. Experience with rectal suction biopsy in the diagnosis of Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg.* 1969; 4(4):410-5.

Cathro HP, Stoler MH. The utility of calretinin, inhibin, and WT1 immunohistochemical staining in the differential diagnosis of ovarian tumors. *Hum Pathol.* 2005; 36(2):195-201.

Chatelain D, Manaouil C, Marc B, Ricard J, Brevet M, Montpellier D, Defouilloy C, Jardé O. Adult Hirschsprung's disease diagnosed during forensic autopsy. *J Forensic Sci.* 2006; 51(5):1160-3.

Chow CW, Chan WC, Yue PC. Histochemical criteria for the diagnosis of Hirschsprung's disease in rectal suction biopsies by acetylcholinesterase activity. *J Pediatr Surg.* 1977; 12(5):675-80.

Croffie JM, Davis MM, Faught PR, Corkins MR, Gupta SK, Pfefferkorn MD, Molleston JP, Fitzgerald JF. At what age is a suction rectal biopsy less likely to provide adequate tissue for identification of ganglion cells? *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2007; 44(2):198-202.

Dalla Valle A. Ricerche istologiche su di un caso di megacolon congenito. *Pediatria.* 1920; 28:740-52.

Dasgupta R, Langer JC. Hirschsprung disease. *Curr Probl Surg.* 2004; 41(12):942-88.

De La Torre L, Langer JC. Transanal endorectal pull-through for Hirschsprung disease: technique, controversies, pearls, pitfalls, and an organized approach to the management of postoperative obstructive symptoms. *Semin Pediatr Surg.* 2010;19(2):96-106.

De La Torre-Mondragon L, Ortega-Salgado JA. Transanal endorectal pull-through for Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg.* 1998; 33(8):1283-6.

De Lorink F, Kremer LCM, Reitsma JB, Benninga MA. Diagnostic tests in Hirschsprung disease: a systematic review. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2006; 42(5):496-505.

Dobbins WO, Bill AH Jr. Diagnosis of Hirschsprung's disease excluded by rectal suction biopsy. *N Engl J Med.* 1965; 272:990-3.

Dogliani C, Dei Tos AP, Laurino L, Iuzzolino P, Chiarelli C, Celio MR, Viale G. Calretinin: a novel immunocytochemical marker for mesothelioma. *Am J Surg Pathol.* 1996; 20(9):1037-

46.

Doodnath R, Puri P. A systematic review and meta-analysis of Hirschsprung's disease presenting after childhood. *Pediatr Surg Int.* 2010; 26(11):1107-10.

Duess JW, Hoffmann AD, Puri P. Prevalence of Hirschsprung's disease in premature infants : a systematic review. *Pediatr Surg Int.* 2014; 30:791-795.

Duhamel, B. Une nouvelle opération pour le megacôlon congénital: L'abaissement rétro-rectale et trans-anale du côlon, et son application possible au traitement de quelques autres malformats. *Presse Med.* 1956; 64: 2249-50.

Duhamel B. Technique et indications de l'abaissement retro-rectal et trans-anal en chirurgie colique. *Gaz med Fr.* 1963; 70:599- 608.

Ehrenpreis T. Megacolon in the newborn; a clinical and röntgenological study with special regard to the pathogenesis; a preliminary report. *Acta Paediatr.* 1945; 32(3-4):358-70.

Ehrenpreis T. Hirschsprung's disease in the neonatal period . *Arch Dis Child.* 1955; 30(149):8-12.

Enríquez Zarabozo E, Núñez Núñez R, Ayuso Velasco R, Vargas Muñoz I, Fernández de Mera JJ, Blesa Sánchez E. Anorectal manometry in the neonatal diagnosis of Hirschsprung's disease. *Cir Pediatr.* 2010; 23(1):40-5.

Feichter S, Meier-Ruge W, Bruder E. The histopathology of gastrointestinal motility disorders in children. *Semin Pediatr Surg.* 2009; 18(4):206-11.

Fenwick WS. Hypertrophy and dilatation of the colon in infancy. *Br Med J.* 1900; 2: 564-7.

Fine SW, McClain SA, Li M. Immunohistochemical staining for calretinin is useful for differentiating schwannomas from neurofibromas. *Am J Clin Pathol.* 2004; 122(4):552-9.

Fiori MG. Domenico Battini and his description of congenital megacolon: a detailed case report one century before Hirschsprung. *J Peripher Nerv Syst.* 1998;3(3):197-206.

Garcia R, Arcement C, Hormaza L, Haymon ML, Ward K, Velasco C, Correa H, Congeni JD, Brown R, Tyson P, Udall J, Schmidt-Sommerfeld E. Use of the recto-sigmoid index to diagnose Hirschsprung's disease. *Clin Pediatr (Phila)*. 2007; 46(1):59-63.

Georgeson KE, Cohen RD, Hebra A, Jona JZ, Powell DM, Rothenberg SS, Tagge EP. Primary laparoscopic-assisted endorectal colon pull-through for Hirschsprung's disease: a new gold standard. *Ann Surg*. 1999; 229(5):678-83.

Gil-Vernet JM, Broto J, Guillén G. [Hirschsprung-neurointestinal dysplasia: differential diagnosis and reliability of diagnostic procedures]. *Cir Pediatr*. 2006; 19(2):91-4.

Gosain A. Established and emerging concepts in Hirschsprung's-associated enterocolitis. *Pediatr Surg Int*. 2016; 32:313-20.

Gosain A, Frykman PK, Cowles RA, Horton J, Levitt M, Rothstein DH, Langer JC, Goldstein AM. *Pediatr Surg Int*. 2017; 33:517-21.

Gotzos V, Vogt P, Celio MR. The calcium binding protein calretinin is a selective marker for malignant pleural mesotheliomas of the epithelial type. *Pathol Res Pract*. 1996; 192(2):137-47.

Green HL, Rizzolo D, Austin M. Surgical Management for Hirschsprung disease: A review for primary care providers. *JAAPA*. 2016; 29(4):24-9.

Guinard-Samuel V, Bonnard A, De Lagausie P, Philippe-Chomette P, Albertini C, El Ghoneimi A, Peuchmaur M, Berrebi-Binczak D. Calretinin immunohistochemistry: a simple and efficient tool to diagnose Hirschsprung disease. *Mod Pathol*. 2009; 22(10):1379-84.

Hall NJ, Kufeji D, Keshtgar A. Out with the old and in with the new: a comparison of rectal suction biopsies with traditional and modern biopsy forceps. *J Pediatr Surg*. 2009; 44(2):395-8.

Hanker JS, Seaman AR, Weiss LP, Ueno H, Bergman RA, Seligman AM. Osmiophilic reagents: new cytochemical principle for light and electron microscopy. *Science*. 1964; 146:1039-43.

Haricharan RN, Georgeson KE. Hirschsprung disease. *Semin Pediatr Surg.* 2008; 17(4):266-75.

Hawkins HP. Remarks on idiopathic dilatation of the colon. *Br Med J.* 1907; 1(2409):477-83.

Hiatt RB. The pathologic physiology of congenital megacolon. *Ann Surg.* 1951; 133(3):313-20.

Hirsch BZ, Angelides AG, Goode SP, Garb JL. Rectal biopsies obtained with jumbo biopsy forceps in the evaluation of Hirschsprung disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2011; 52(4):429-32.

Hirschsprung H. Stuhltragheit neugeborner in folge von dilatation and hypertrophie des colons. *Jaharb Kinderch* 1887; 27: 1.

Holland SK, Hessler RB, Reid-Nicholson MD, Ramalingam P, Lee JR. Utilization of peripherin and S-100 immunohistochemistry in the diagnosis of Hirschsprung disease. *Mod Pathol.* 2010; 23(9):1173-9.

Holland SK, Ramalingam P, Podolsky RH, Reid-Nicholson MD, Lee JR. Calretinin immunostaining as an adjunct in the diagnosis of Hirschsprung disease. *Ann Diagn Pathol.* 2011; 15(5):323-8.

Holschneider AM, Kunst M. Anal Sphincter Achalasia and Ultrashort Hirschsprung's Disease. In: Holschneider AM, Puri P, editors. *Hirschsprung's disease and allied disorders.* 3<sup>rd</sup> ed. Berlin Heidelberg New York : Springer; 2008; p.297-322.

Holschneider AM, Steinwegs I. Functional diagnosis. In: Holschneider AM, Puri P, editors. *Hirschsprung's disease and allied disorders.* 3<sup>rd</sup> ed. Berlin Heidelberg New York : Springer; 2008; p.153-84.

Huang Y, Zheng S, Xiao X. Preliminary evaluation of anorectal manometry in diagnosing Hirschsprung's disease in neonates. *Pediatr Surg Int.* 2009; 25(1):41-5.

Imamura K, Yamamoto M, Sato A, Kashiki Y, Kunieda T. Pathophysiology of aganglionic



colon segment: an experimental study on aganglionosis produced by a new method in the rat. *J Pediatr Surg.* 1975; 10(6):865-73.

Iwashita T, Kruger GM, Pardal R, Kiel MJ, Morrison SJ. Hirschsprung disease is linked to defects in neural crest stem cell function. *Science.* 2003; 301(5635):972-6.

Langer JC, Rollins MD, Levitt M, Gosain A, de la Torre L, Kapur RP, Cowles RA, Horton J, Rohstein DH, Goldstein AM. *Pediatr Surg Int.* 2017; 33:523-26.

Kaiser G, Bettex M. Terminology and classification. In: Holschneider A, editor. *Hirschsprung's Disease.* 1st ed. Stuttgart: Thieme Stratton; 1982. p. 42–47.

Kapur, RP. Can we stop looking? Immunohistochemistry and the diagnosis of Hirschsprung's disease. *Am J Clin Pathol.* 2006; 126(1):9-12.

Kapur RP. Practical pathology and genetic of Hirschsprung's disease. *Semin Pediatr Surg.* 2009; 18(4):212-23.

Kapur, RP, Reed RC, Finn LS, Patterson K, Johanson J, Rutledge JC. Calretinin Immunohistochemistry versus Acetylcholinesterase Histochemistry in the evaluation of suction rectal biopsies for Hirschsprung disease. *Pediatr Dev Pathol.* 2009; 12(1):6-15.

Kapur RP, Kennedy AJ. Transitional zone pull through: surgical pathology considerations. *Semin Pediatr Surg* 2012; 21(4):291-301.

Karnovsky MJ, Roots L. A "direct-coloring" thiocholine method for cholinesterases. *J Histochem Cytochem.* 1964; 12:219-21.

Kelleher J, Blake N. Diagnosis of Hirschsprung's disease and allied disorders. In: Holschneider AM, Puri P, editors. *Hirschsprung's disease and allied disorders.* 3<sup>rd</sup> ed. Berlin Heidelberg New York : Springer; 2008; p. 145-152.

Kenny SE, Tam PKH, Garcia-Barcelo M. Hirschsprung's disease. *Semin Pediatr Surg.* 2010; 19(3):194-200.

Kleinhaus S, Boley SJ, Sheran M, Sieber WK. Hirschsprung's disease – a survey of the members of the Surgical Section of the American Academy of Pediatrics. *J Pediatr Surg.* 1979; 14(5):588-97.

Kobayashi H, Li Z, Yamataka A, Lane GJ, Miyano T. Rectal biopsy: what is the optimal procedure? *Pediatr Surg Int.* 2002; 18(8):753-6.

Kobayashi H, O'Briain DS, Hirakawa H, Wang Y, Puri P. A rapid technique of acetylcholinesterase staining. *Arch Pathol Lab Med.* 1994; 118(11):1127-9.

Knowles CH, De Giorgio R, Kapur RP, Bruder E, Farrugia G, Geboes K, Lindberg G, Martin JE, Meier-Ruge WA, Milla PJ, Smith VV, Vandervinden JM, Veress B, Wedel T. The London Classification of gastrointestinal neuromuscular pathology: report on behalf of the Gastro 2009 International Working Group. *Gut.* 2010; 59(7):882-7.

Laranjeira C, Pachnis V. Enteric nervous system development: Recent progress and future challenges. *Auton Neurosci.* 2009; 151(1):61-9.

Lawson JON, Nixon HH. Anal canal pressures in the diagnosis of Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg.* 1967; 2(6):544-52.

Leenders E, Sieber WK. Congenital megacolon observation by Frederick Ruysch--1691. *J Pediatr Surg.* 1970; 5(1):1-3.

Leong TY, Cooper K, Leong AS. Immunohistology--past, present, and future. *Adv Anat Pathol.* 2010; 17(6):404-18.

Lewis NA, Levitt MA, Zallen GS, Zafar MS, Iacono KL, Rossman JE, Caty MG, Glick PL. Diagnosing Hirschsprung's disease: increasing the odds of a positive rectal biopsy result. *J Pediatr Surg.* 2003; 38(3):412-6.

Loening-Baucke V, Kimura K. Failure to pass meconium: diagnosing neonatal intestinal obstruction. *Am Fam Physician.* 1999; 60(7):2043-50.

Lourenção PLTA, Takegawa BK, Ortolan EV, Terra SA, Rodrigues MA. A useful panel for

the diagnosis of Hirschsprung disease in rectal biopsies: calretinin immunostaining and acetylcholinesterase histochemistry. *Ann Diagn Pathol.* 2013; 17(4):352-6.

Lourenção PLTA, Takegawa BK, Ortolan EV, Terra SA, Rodrigues MA. Does calretinin immunohistochemistry reduce inconclusive diagnosis in rectal biopsies for Hirschsprung disease? *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2014; 58(5):603-7.

Lourenção PLTA, Valerini FG, Cataneo AJM, Ortolan EVP, Silveira GLD, Piva MFL, Cucco LDM, Rodrigues MAM. Barium enema revisited in the workup for the diagnosis of Hirschsprung's disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2019; Jan 4. doi:10.1097/MPG.0000000000002242.

Maksoud JG. Moléstia de Hirhsprung. In Maksoud JG. *Cirurgia Pediátrica 2ª edição.* Rio de Janeiro: Revinter; 2003. p. 806-825.

Martucciello G, Favre A, Torre M, Pini Prato A, Jasonni V. A new rapid acetylcholinesterase histochemical method for the intraoperative diagnosis of Hirschsprung's disease and intestinal neuronal dysplasia. *Eur J Pediatr Surg.* 2001; 11(5):300-4.

Martucciello G, Pini Prato A, Puri P, Holschneider AM, Meier-Ruge W, Jasonni V, Tovar JA, Grosfeld JL. Controversies concerning diagnostic guidelines for anomalies of the enteric nervous system: a report from the Fourth International Symposium on Hirschsprung's disease and related neurocristopathies. *J Pediatr Surg.* 2005; 40(10):1527-31.

Martucciello G. Hirschsprung's disease, one of the most difficult diagnoses in pediatric surgery: a review of the problems from clinical practice to the bench. *Eur J Pediatr Surg.* 2008; 18(3):140-9.

Masiakos PT, Ein SH. The History of Hirschsprung's disease: Then and now. *Semin Colon Rectal Surg.* 2006; 17: 10-9.

Matias ALR. *Interpretação clínica da histopatologia nas neuropatias congénitas intestinais (dissertation).* Porto: Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto; 2011.

Meier-Ruge, W. Das megacolon, seine diagnose und pathophysiologie. *Virchows Arch A Pathol Pathol Anat.* 1968; 344(1):67-85.

Meier-Ruge W, Bruder E. Histopathological diagnosis and differential diagnosis of Hirschsprung's disease. In: Holschneider AM, Puri P, editors. *Hirschsprung's disease and allied disorders.* 3<sup>rd</sup> ed. Berlin Heidelberg New York: Springer; 2008; p.185-198.

Meier-Ruge WA, Bruder E, Holschneider AM, Lochbühler H, Picket G, Posselt HG, Tewes G. Diagnosis and therapy of ultrashort Hirschsprung's disease. *Eur J Pediatr Surg.* 2004; 14(6):392-7.

Meier-Ruge W, Lutterbeck PM, Herzog B, Morger R, Moser R, Schärli A. Acetylcholinesterase activity in suction biopsies of the rectum in the diagnosis of Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg.* 1972; 7(1):11-7.

Meier-Ruge W, Hunziker O, Tobler HJ, Walliser C. The pathophysiology of aganglionosis of the entire colon (Zuelzer-Wilson syndrome). Morphometric investigations of the extent of sacral parasympathetic innervation of the circular muscles of the aganglionic colon. *Beitr Pathol.* 1972;147(3):228-36.

Moore KL, Persaud TVN. Formação das camadas germinativas e início da diferenciação dos tecidos e órgãos: terceira semana. In: Moore KL, Persaud TVN. *Embriologia Clínica.* 6<sup>a</sup> edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. p. 59-77.

Moore SW, Johnson S. Acetylcholinesterase in Hirschsprung's disease. *Pediatr Surg Int.* 2005; 21(4):255-63.

Moore SW. Total colonic aganglionosis and Hirschsprung's disease: a review. *Pediatr Surg Int.* 2015; 31:1-9.

Moore SW. Advances in understanding functional variations in the Hirschsprung disease spectrum (variant Hirschsprung disease). *Pediatr Surg Int.* 2017; 33:285-98.

Muise ED, Cowles RA. Rectal biopsy for Hirschsprung's disease: a review of techniques, pathology, and complications. *World J Pediatr.* 2016; 12(2):135-41.

Mya G. Due osservazioni di dilatazione ed ipertrofia congenita del colon. *Sperimentale.* 1894; 48: 215-31.

Nakamura H, Lim T, Puri P. Probiotics for the prevention of Hirschsprung-associated enterocolitis: a systematic review and meta-analysis. *Pediatr Surg Int.* 2018; 34:189-93.

Noblett HR. A rectal suction biopsy tube for use in the diagnosis of Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg.* 1969; 4(4):406-9.

Okamoto E, Ueda T. Embryogenesis of intramural ganglia of the gut and its relation to Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg* 1967; 2: 437-43.

Pakarinen M. Perioperative complications of transanal pull-through surgery for Hirschsprung's Disease. *Eur J Pediatr Surg* 2018. 28(2):152-5.

Papka RE, Collins J, Copelin T, Wilson K. Calretinin-immunoreactive nerves in the uterus, pelvic autonomic ganglia, lumbosacral dorsal root ganglia and lumbosacral spinal cord. *Cell Tissue Res.* 1999; 298(1):63-74.

Pini-Prato A, Carlini C, Pesce F, Jasonni V, Seymandi P. Massive bleeding after rectal suction biopsy: uncommon and unexpected delayed onset. *World J Pediatr.* 2011; 7(1):83-5.

Portugal R; Oliva E. Calretinin: diagnostic utility in the female genital tract. *Adv Anat Pathol.* 2009; 16(2):118-24.

Puri P, Montedonico S. Hirschsprung's disease: clinical features. In: Holschneider AM, Puri P, editors. *Hirschsprung's disease and allied disorders.* 3<sup>rd</sup> ed. Berlin Heidelberg New York: Springer; 2008; p107-13.

Puri P, Montedonico S. Hirschsprung's disease: Pathophysiology of Hirschsprung's disease. In: Holschneider AM, Puri P, editors. *Hirschsprung's disease and allied disorders.* 3<sup>rd</sup> ed. Berlin Heidelberg New York: Springer; 2008; p. 95-106.

Puri P, Rolle U. Development of the enteric nervous system. In: Holschneider AM, Puri P, editors. Hirschsprung's disease and allied disorders. 3<sup>rd</sup> ed. Berlin Heidelberg New York: Springer; 2008; p. 13-20.

Ralls MW, Coran AG, Tietelbaum DH. Redo pullthrough for Hirschsprung disease. *Pediatr Surg Int.* 2017; 33:455-60.

Robertson HE, Kernohan VW. The myenteric plexus in congenital megacolon. *Proc. Staff Meet Mayo Clinic* 1938; 13:123-5.

Robey SS, Kuhajda FP, Yardley JH. Immunoperoxidase stains of ganglion cells and abnormal mucosal nerve proliferations in Hirschsprung's disease. *Hum Pathol.* 1988; 19(4):432-7.

Rogers, JH. Calretinin: a gene for a novel calcium-binding protein expressed principally in neurons. *J Cell Biolol.* 1987; 105: 1343-53.

Rolle U, Nemeth L, Puri P. Nitrergic innervation of the normal gut and in motility disorders of childhood. *J Pediatr Surg.* 2002; 37(4):551-67.

Rouzkoh M, Khaleghnejad AT, Mohejerzadeh L, Heydari A, Molaei H. What is the most common complication after one-stage transanal pull-through in infants with Hirschsprung's disease? *Pediatr Surg Int.* 2010; 26(10):967-70.

Schäppi MG, Staiano A, Milla PJ, Smith VV, Dias JA, Heuschkel R, Husby S, Mearin ML, Papadopoulou A, Ruemmele FM, Vandenplas Y, Koletzko S. A practical guide for the diagnosis of primary enteric nervous system disorders. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2013; 57(5):677-86.

Seo S, Miyake H, Hock A, Koike Y, Yong C, Lee C, Li B, Pierro A. Duhamel and transanal endorectal pull-throughs for Hirschsprung' Disease: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Pediatr Surg.* 2018; 28:81-8.

Sergi C. Hirschsprung's disease: Historical notes and pathological diagnosis on the occasion of 100<sup>th</sup> anniversary of Dr. Harald Hirschsprung's death. *World J Clin Pediatr.* 2015; 4(4):120-5.

Sergi C, Caluseriu O, McColl H, Eisenstat DD. Hirschsprung's disease: clinical dysmorphology, genes, micro-RNA, and future perspectives. *Pediatr Res*. 2017. 81(1-2):177-191.

Shandling B: A new technique in the diagnosis of Hirschsprung's disease. *Can J Surg*. 1961; 4:298-305.

Shayan K, Smith C, Langer JC. Reliability of intraoperative frozen sections in the management of Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg*. 2004; 39(9):1345-8.

Sherman JO, Snyder ME, Weitzman JJ, Jona JZ, Gillis DA, O'Donnell B, Carcassonne M, Swenson O. A 40-year multinational retrospective study of 880 Swenson procedures. *J Pediatr Surg*. 1989; 24(8):833-8.

Siegel MJ, Shackelford GD, McAlister WH. The rectosigmoid Index. *Radiology*. 1981; 139(2):497-9.

Singh SJ, Croaker GD, Manglick P, Wong CL, Athanasakos H, Elliott E, Cass D. Hirschsprung's disease: the Australian Paediatric Surveillance Unit's experience. *Pediatr Surg Int*. 2003; 19(4):247-50.

So HB, Schwartz DL, Becker JM, Daum F, Schneider KM. Endorectal "pull-through" without preliminary colostomy in neonates with Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg*. 1980; 15(4):470-1.

Soave, F. A new surgical technique for treatment of Hirschsprung's disease. *Surgery*. 1964; 56:1007-14.

Stamp L. Cell therapy for gi motility disorders: comparison of cell sources and proposed steps for treating Hirschsprung disease. *Am J physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2017; 312:348-54.

Suita S, Taguchi T, Satoshi I, Nakatsuji T. Hirschsprung's disease in Japan: analysis of 3852 patients based on a nationwide survey in 30 years. *J Pediatr Surg*. 2005; 40(1):197-202.

Swenson O, Bill AH. Resection of rectum and rectosigmoid with preservation of sphincter for

benign spastic lesions producing megacolon. *Surgery*. 1948; 24(2):212-20.

Swenson O, Fisher JH, MacMahon H. Rectal biopsy as an aid in the diagnosis of Hirschsprung's disease. *N Engl J Med*. 1955; 253(15):632-5.

Swenson O, Neuhauser EBD, Pickett LK. New concepts of etiology, diagnosis and treatment of congenital megacolon (Hirschsprung's disease). *Pediatrics*. 1949; 4(2):201-9.

Szylberg T, Marszatek A. Diagnosis of Hirschsprung's Disease with particular emphasis on histopathology. A systematic review of current literature. *Prz Gastroenterol*. 2014; 9(5):264-9.

Takawira C, D'Agostini S, Shenouda S, Persad R, Sergi C. Laboratory Procedures update on Hirschsprung disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2015; 60(5):598-605.

Tam P. Hirschsprung's disease: a bridge for science and surgery. *J Pediatr Surg*. 2016; 51:18-22.

Teitelbaum DH, Caniano DA, Qualman SJ. The pathophysiology of Hirschsprung's-associated enterocolitis: importance of histologic correlates. *J Pediatr Surg*. 1989; 24(12):1271-7.

Tittel K. Über eine angeborene missbildung des dickdarmes. *Wein Klin Wochenschr*. 1901; 14: 903-6.

Tjaden NEB, Trainor PA. The developmental etiology and pathogenesis of Hirschsprung disease. *Transl Res*. 2013; 162(1):1-15.

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.

Tabbers MM, Di Lorenzo C, Berger MY, Faure C, Langendam MW, Nurko S, et al. Evaluation and treatment of functional constipation in infants and children: evidence-based recommendations from ESPGHAN and NASPGHAN. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2014;58:258-74.



Villar MAM, Jung MP, Cardoso LCA; Cardoso MHCA, Lierena Junior JC. Doença de Hirschsprung: experiência com uma série de 55 casos. *Rev Bras Saúde Matern Infant.* 2009; 9(3): 285-91.

Vrsansky P, Bourdelat D, Pagés R. Principal modifications of the Duhamel procedure in the treatment of Hirschsprung's disease. Analysis based on results of an international retrospective study of 2,430 patients. *Pediatr Surg Int.* 1998; 13(2-3):125-32.

Walters JR, Bishop AE, Facer P, Lawson EM, Rogers JH, Polak JM. Calretinin and calbindin-D28k immunoreactivity in the human gastrointestinal tract. *Gastroenterology.* 1993; 104(5):1381-9.

Wattchow DA, Porter AJ, Brookes SJ, Costa M. The polarity of neurochemically defined myenteric neurons in the human colon. *Gastroenterology.* 1997; 113(2):497-506.

Webster, W. Embryogenesis of enteric ganglia in normal mice and in mice that develop congenital aganglionic megacolon. *J Embryol Exp Morphol.* 1973; 30(3):573-85.

Whitehouse FR, Kernohan JW. Myenteric plexus in congenital mega-colon. *Arch Intern Med (Chic).* 1948; 82(1):75-111.

Zhang PJ, Genega EM, Tomaszewski JE, Pasha TL, LiVolsi VA. The role of calretinin, inhibin, melan-A, BCL-2, and C-kit in differentiating adrenal cortical and medullary tumors: an immunohistochemical study. *Mod Pathol.* 2003; 16(6):591-7.

Zimmer J, Tomuscat C, Puri P. Long-term results of transanal pull-through for Hirschsprung's disease: a meta-analysis. *Pediatr Surg Int.* 2016; 32:743-9.

Zuelzer WW, Wilson JL. Functional intestinal obstruction on congenital neurogenic basis in infancy. *Am J Dis Child.* 1948; 75(1):40-6.

*Capítulo II*  
*Article*

**BEST RECTAL BIOPSY TECHNIQUE FOR DIAGNOSING INTESTINAL  
DYSGANGLIONOSIS IN CHILDREN: A systematic literature review and proportional  
meta-analysis**

**Resumo:**

COMES, G. T. **QUAL A MELHOR TÉCNICA DE BIÓPSIA RETAL PARA O DIAGNÓSTICO DE DISGANGLIONOSES INTESTINAIS EM CRIANÇAS: Revisão sistemática e metanálise de proporções** 2019. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2019.

**Introdução:** A constipação intestinal é uma condição debilitante que afeta mais de 27% da população, representando um problema de saúde pública, além de corresponder a 3% de todas as consultas pediátricas. Existem várias causas congênitas e adquiridas. A Doença de Hirschsprung (DH) é a principal causa congênita de constipação e envolve 90% dos casos congênitos. O diagnóstico de disganglioneses intestinais depende da análise histopatológica de biópsias retais. Nessa revisão sistemática, levantamos todas as series de casos disponíveis na literatura e desenvolvemos uma metanálise de proporções para definir a taxa de resultados conclusivos e as complicações relacionadas aos diferentes tipos de biópsia retal no diagnóstico de disganglioneses intestinais.

**Métodos:** A partir de ampla busca na literatura em múltiplas bases de dados, foi realizada uma revisão sistemática e metanálise de proporção das séries de casos que envolviam biópsias retais em pesquisa de disganglioneses intestinais em crianças. Foram incluídas series de casos que envolvessem mais de 5 biópsias em pacientes menores de 18 anos de idade com suspeita de disganglione intestinal, que descrevesse ao menos um tipo de biópsia retal. Os estudos deviam especificar a taxa de resultados conclusivos e a taxa de complicações das técnicas de biópsias. A análise de proporção de série de casos foi realizada e os resultados apresentados em gráficos do tipo forest plot.

**Resultados:** Foram selecionados 151 estudos pelos critérios de elegibilidade e 63 foram submetidos a metanálise de proporções, totalizando 16,769 pacientes e 23,667 biópsias retais. A proporção da taxa de resultados conclusivos foi de 95% (95% CI, 0.87–0.99) em biópsias cirúrgicas; 95% (95% CI, 0.90–0.98) em punch e 88% (95% CI, 0.85–0.92) para sucção. Para a biópsia de sucção, em pacientes menores de 36 meses de idade, a taxa de resultados conclusivos foi de 84% (95% CI, 0.77–0.90) enquanto que em maiores de 36 meses foi de 78% (95% CI, 0.69–0.85). A proporção para resultados conclusivos de acordo com a análise histopatológica foi de 89% (95% CI, 0.83–0.93) para HE; 95% (95% CI, 0.90–0.99) para AChE; 89% (95% CI, 0.81–0.95) em HE + AChE e o grupo HE + calretinina com ou sem AChE apresentou 94% (95% CI, 0.89–0.98). A proporção de taxa de resultados conclusivos para pacientes submetidos a biópsia cirúrgica foi de 100% (95% CI, 0.98–1.00) no grupo para análise com AChE; 94% (95% CI, 0.88–0.98) na análise com HE e 97% (95% CI, 0.87–1.00) em HE + AChE. Nos pacientes submetidos a biópsia por

sucção, a análise da proporção da taxa de resultados conclusivos foi de 91% (95% CI, 0.85–0.95) no grupo com análise por AChE; 85% (95% CI, 0.74–0.93) no grupo HE; 86% (95% CI, 0.77–0.94) no grupo HE + AChE analysis group; e 92% (95% CI, 0.87–0.96) em HE + calretinina com ou sem AChE. A proporção das taxas de complicações foi de 1% (95% CI, 0.00019–0.03) para biópsias cirúrgicas, 0.03% (95% CI, 0.00019–0.00051) para sucção e 2% (95% CI, 0.00075–0.04) em biópsias por punch.

**Conclusão:** Essa é a primeira revisão sistemática com metanálise de proporção que compara a taxa de resultados conclusivos dos diferentes tipos de biópsias retais e que considera a taxa de complicações de cada uma. As taxas de resultados conclusivos não tiveram diferença estatisticamente significativa entre as biópsias retais por punch, sucção e cirúrgicas. No entanto, as biópsias por punch apresentaram taxas superiores com significância estatísticas para complicações quando comparadas ao grupo submetido a biópsias por sucção. As biópsias por sucção apresentaram taxas de resultados conclusivos semelhantes entre os dois grupos estabelecidos por faixa etária, mantendo sua indicação mesmo para crianças maiores. Nossos resultados reforçam a importância da associação de diferentes métodos de análises histopatológicas, principalmente em biópsias por sucção.

**Palavras chaves:** constipação, disganglionoses intestinais, Doença de Hirschsprung, biópsias retais.

**Abstract:**

COMES, G. T. **BEST RECTAL BIOPSY TECHNIQUE FOR DIAGNOSING INTESTINAL DYSGANGLIONOSIS IN CHILDREN: A systematic literature review and proportional meta-analysis.** 2019. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2019.

**Introduction:** Intestinal constipation is a debilitating condition that affects up to 27% of the population, representing an important public health problem and corresponding to 3% of all pediatric consultations. There are many different congenital and acquired conditions, but Hirschsprung's disease (HD) is the main representative entity of congenital disease and is involved in 90% of all cases. The diagnosis of intestinal dysganglionosis depends on the histopathological analysis of rectal biopsies. Here we conducted an updated systematic review of all case series studies available in the literature and performed a pooled analysis of proportions to assess the rate of conclusive results and possible complications of different rectal biopsy techniques in the diagnosis of intestinal dysganglionosis.

**Methods:** A broad literature search using multiple online databases. A systematic literature review and proportional meta-analysis of the available case series studies of rectal biopsies in the diagnosis of intestinal dysganglionosis in children were performed. We included case series with more than 5 rectal biopsies in children under 18 years of age suspected of intestinal dysganglionosis, that described at least one type of rectal biopsy. The studies should have specified the rate of conclusive results and the rate of complications of the biopsy procedures. Proportional meta-analysis of case series studies was performed and forest plot charts were created to summarize the data.

**Results:** There were 151 included studies according to eligibility criteria and 63 were included in proportional meta-analysis, ranging 16,769 patients and 23,667 rectal biopsies. The pooled proportion of conclusive results was 95% (95% CI, 0.87–0.99) in open biopsies; 95% (95% CI, 0.90–0.98) in punch and 88% (95% CI, 0.85–0.92) in suction. The pooled proportion of conclusive results in the group of patients undergoing suction biopsies was 84% (95% CI, 0.77–0.90) of patients younger than 36 months old and 78% (95% CI, 0.69–0.85) of patients older than 36 months old. The pooled proportion of conclusive results was 89% (95% CI, 0.83–0.93) in the HE analysis; 95% (95% CI, 0.90–0.99) in the AChE analysis; 89% (95% CI, 0.81–0.95) in HE with AChE analysis and in HE with calretinin with or without AChE group, there was 94% (95% CI, 0.89–0.98). The pooled proportion of conclusive effects in patients undergoing open biopsies regarding to the histopathological analysis was 100% (95% CI, 0.98–1.00) in the AChE analysis group; 94% (95% CI, 0.88–0.98) in the HE analysis group and 97% (95% CI, 0.87–1.00) in the HE + AChE analysis

group. In the suction group, the pooled proportion of conclusive effects was 91% (95% CI, 0.85–0.95) in the AChE analysis group; 85% (95% CI, 0.74–0.93) in the HE analysis group; 86% (95% CI, 0.77–0.94) in the HE + AChE analysis group; and 92% (95% CI, 0.87–0.96) in the HE + calretinin with or without AChE analysis group. The pooled proportion of complication rates was 1% (95% CI, 0.00019–0.03) in open biopsies. There was a 0.03% rate (95% CI, 0.00019–0.00051) in suction biopsies, and the pooled complication rate was 2% (95% CI, 0.00075–0.04) in punch biopsies.

**Conclusion:** This is the first systematic review and meta-analysis to compare the rate of conclusive results obtained by the different types of rectal biopsies techniques, also considering their rate of complications. The conclusive result rates of open, suction, and punch biopsies did not differ significantly. However, punch biopsies demonstrate significantly higher complication rates than suction biopsies. Suction rectal biopsies also demonstrated similar conclusive rates across different mean age groups, supporting their indication even for older children. Our results reinforce the value of the association between different adjuvant methods in the histopathological analysis, mainly in rectal suction biopsies.

**Key words:** constipation, intestinal dysganglionosis, Hirschsprung Disease, rectal biopsies.

# **BEST RECTAL BIOPSY TECHNIQUE FOR DIAGNOSING INTESTINAL DYSGANGLIONOSIS IN CHILDREN: A systematic literature review and proportional meta-analysis**

## **INTRODUCTION**

Intestinal constipation is a debilitating condition that affects up to 27% of the population, representing an important public health problem<sup>1-2</sup> and corresponding to 3% of all pediatric consultations<sup>3-4</sup>. In most cases, the cause is functional, mainly related to defecation and nutritional habits<sup>4</sup>. However, organic causes like intestinal dysganglionosis are responsible for the most severe cases of constipation<sup>3-5</sup>. There are many different congenital and acquired conditions, but Hirschsprung's disease (HD) is the main entity considering the congenital diseases representing 90% of all cases<sup>6</sup>.

The diagnosis of intestinal dysganglionosis depends on the histopathological analysis of rectal biopsies<sup>5</sup>. However, in clinical practice, many difficulties occur during this histopathological evaluation<sup>7</sup>. Inadequate biopsy samples involving insufficient and superficial specimens or distal biopsies taken too close to the pectinate line are associated with inconclusive results<sup>8-10</sup>. Thus, several modifications of rectal biopsy techniques have been proposed to obtain deeper and larger specimens with highly variable results<sup>11-23</sup>. The most commonly used biopsy techniques can be divided into four groups: open surgical, punch, suction, and endoscopic.

In a previous systematic review, Friedmacher & Puri (2015) summarized the results from 58 cohort studies evaluating suction biopsy for the diagnosis of HD. The authors concluded that there was evidence to support that rectal suction biopsy combined with acetylcholinesterase (AChE) staining is an accurate diagnostic method<sup>24</sup>. However, this review was limited as it analyzed just a single type of rectal biopsy and one histopathological analysis method and included only patients with the diagnosis of HD.

The aim of this study is an updated systematic review of all case series studies available in the literature as an overview complementary to the Friedmacher & Puri (2015) study through a pooled analysis of proportions to assess the rate of conclusive results and possible complications (bleeding, perforation, sepsis, death) of different rectal biopsy techniques (suction, open, punch, endoscopic) in the diagnosis of intestinal dysganglionosis.

## METHODS

Our study followed the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses statement<sup>25</sup>.

A systematic literature review and proportional meta-analysis of the available case series studies of rectal biopsies in the diagnosis of intestinal dysganglionosis in children are performed in this study. The method used has been previously described in detail elsewhere<sup>26-27</sup>. The design of this study was based on the PICO acronym (P = population; I = Intervention; C = comparison; O = Outcome) as shown in Table 1.

**Table 1.** PICO acronym description.

Population	Patients under 18 years old suspected of intestinal dysganglionosis
Intervention	Rectal biopsies
Comparison	Conclusive results: open × suction × punch × endoscopic Conclusive results × histopathological analysis Conclusive results × mean age Complication rates: open × suction × punch × endoscopic
Outcome	Rate of conclusive results Complication

### *Eligibility criteria*

The participants were children (patients under 18 years of age) who had a suspected diagnosis of intestinal dysganglionosis. We included all case series studies with the number of reported patients and number of rectal biopsies greater than five and that analysed at least one of the following rectal biopsy techniques: suction, punch, endoscopic, and/or open rectal biopsy. We also considered different histopathological analysis methods (e.g., hematoxylin and eosin [HE] staining and any histochemical or immunohistochemical method). The studies should have specified the rate of conclusive results and the rate of complications of the biopsy procedures. Case series with incomplete data were excluded from the final analysis.

### *Data sources and searches*

There were no restrictions in year or publication status for the study selection process. Only articles in English, Spanish, and Portuguese were included. Studies were obtained from MEDLINE, EMBASE, and LILACS (Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde). The electronic databases were last accessed on 20 August 2018. All duplicate publications were deleted.

To maximize sensitivity, the only Medical Subject Heading (MESH) terms used were rectal biopsy OR intestinal dysganglionosis. The detailed search strategy is included in Appendix 1.



We also searched the reference lists and contacted expert authors in the field or of the included studies to ensure that we retrieved all relevant papers and clarified information when necessary.

### ***Study selection and data extraction***

All publications were independently reviewed by title, keywords, and abstract by two authors (PL and GC). Any disagreement was resolved by the third (EO) and fourth (RED) reviewers. All selected articles were subjected to full-text review.

The following information was extracted independently by two reviewers (PL and GC): authors, year of publication, country, type (suction, open, endoscopic, punch) and subtype (i.e. Solo-RBT, Noblett, Jumbo) of rectal biopsy technique, number of participants, mean patient age, number of biopsies per study, number of biopsies per patient, type of histopathological analysis, distance from anal verge, and interest outcomes (i.e., rates of conclusive results and complications).

If there was more than one published report on the same group of patients, the articles were analyzed to verify whether they reported different outcomes. If two studies presented the same outcomes, we extracted data from the most complete report or from that with the latest follow-up. The mean age was calculated on the basis of the mean age of the included studies.

### ***Statistical analysis***

Proportional meta-analysis of case series studies was performed using StatsDirect software version 2.8.0 (StatsDirect Ltd, Altrincham, Cheshire, UK). The outcomes of interest were treated as dichotomous variables with their respective 95% confidence intervals (CIs). Because of clear differences among the included studies and several uncontrollable variables, a random-effects model (DerSimonian-Laird) was used to perform the pooled analysis of proportions.

Forest plot charts were created to summarize the data. Combined proportionality and 95% CIs are presented. Overlap of the CIs from the interventions suggests a similar effect on the outcome. On the other hand, non-overlapping CIs suggest different effects from the interventions studied. Therefore, a statistically significant difference among the study groups was achieved if their combined 95% CIs did not overlap<sup>28</sup>.

### ***Statistical heterogeneity and subgroup analysis***

We performed subgroup analyses by histopathological analysis (HE vs. AChE vs. HE with AChE vs. HE with calretinin with or without AChE) and by age group, according to the stratification previously proposed by Croffie et al (2007) (mean age < 36 months vs. mean age ≥ 36 months)<sup>20</sup>. We also planned to perform subgroup analyses according to the characteristics of the rectal biopsy subtypes (e.g. Noblett vs Solo-RBT; full thickness × superficial open biopsies); however, we were unable to conduct this analysis because it did not meet our minimal criteria (at least three studies in each subgroup).

We used the  $I^2$  statistic to test for heterogeneity, and significance was assumed when  $I^2$  was  $>50\%$ , with a value of  $P < 0.1$ . We also assessed publication bias by visually inspecting the funnel plots for each outcome, in which we identified 10 or more eligible studies.

## **RESULTS**

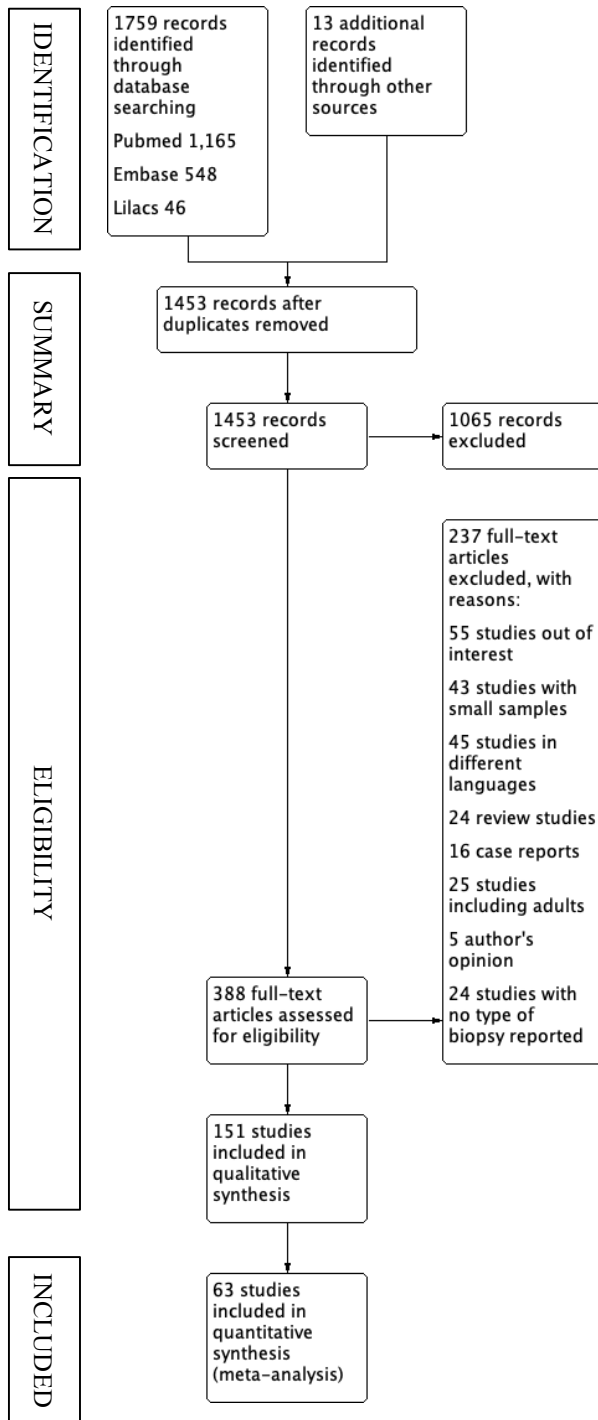
### ***Study selection***

Figure 1 presents the process that we used to identify eligible studies, including publications in the last systematic review published<sup>24</sup>, citations identified through searches of electronic databases, and studies identified through contact with experts in the field. No studies compared the different rectal biopsies techniques.

In the title and abstract screening process, we assessed 388 articles. Of them, after the full-text screening process, we included 151 studies (Appendix 2) recruiting 16,769 participants. Two studies evaluated endoscopic rectal biopsies (Appendix 3), 45 open biopsies (Appendix 4), 17 punch biopsies (Appendix 5), and 120 suction biopsies (Appendix 6). However, of these 151 studies, only 63 cases series studies reported our outcomes of interest and were included in the quantitative analysis. The full list of references of the included studies is shown in Appendix 2.

Table 2 describes the characteristics of the patients undergoing rectal biopsies according to technique. The number of patients ranged from 125 in the endoscopic group (Appendix 3) to 12,657 in the suction group (Appendix 6). The mean age also ranged from 27.84 months old in the suction biopsy group (Appendix 6) to 50.40 months old for patients in the punch biopsy group (Appendix 5). Eighty-one studies were conducted in Europe, 44 in North America, 34 in Asia, 15 in Central and South America, nine in Australia and New Zealand, and just one in Africa (Appendices 3–6). The studies described that patients underwent one to six rectal biopsies and samples were taken from the anal verge to more than a10cm distant for a total of 23,667 samples (Appendices 3, 4, 5, and 6). A total of 19,209 biopsies were taken using the suction technique (Appendix 6), 2,661 using the open technique (Appendix 4), 1,507 using the punch technique (Appendix 5), and 290 using the endoscopic technique (Appendix 3). The samples were analyzed histopathologically with HE, AChE, calretinin, and a combination thereof.

**Figure 1.** Flowchart of the article review process.



**Table 2.** Demographic characteristics of patients undergoing rectal biopsies by method.

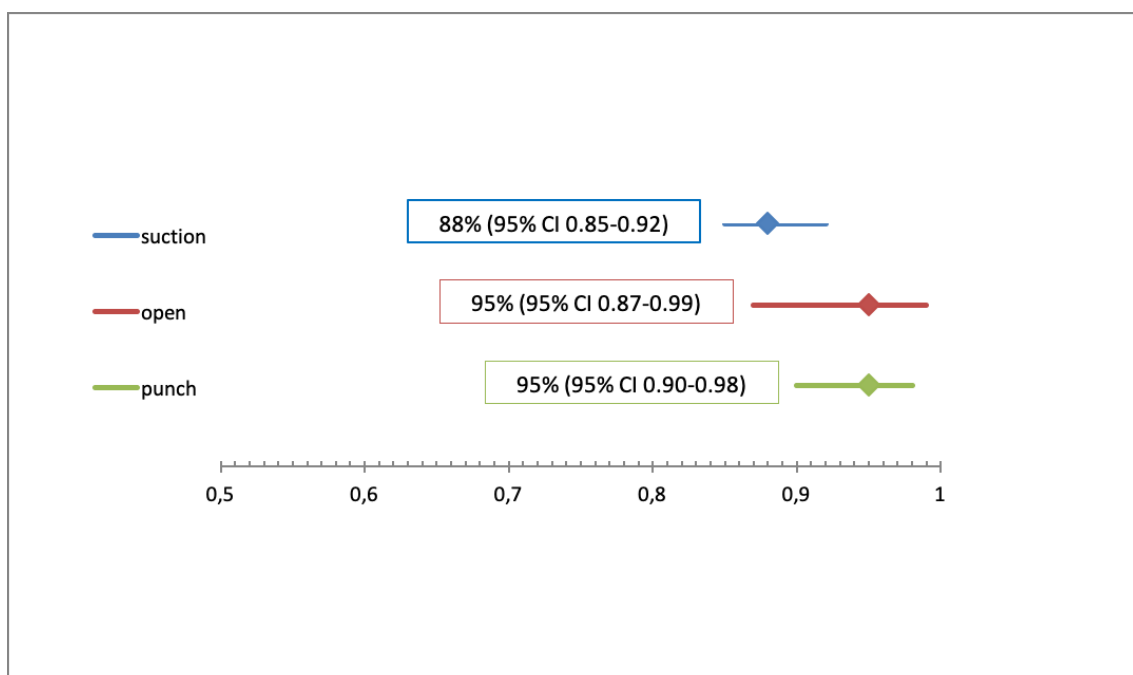
		<u>Endoscopic<sup>£</sup></u>	<u>Open<sup>£</sup></u>	<u>Punch<sup>£</sup></u>	<u>Suction<sup>£</sup></u>
<b>Total case series</b>		2	45	17	120
<b>Number of patients</b>		125	2,520	1,467	12,657
<b>Mean age (month)</b>		--	38.25	50.4	27.84
<b>World region</b>	North America	--	7	4	33
	Central and South America	--	7	--	8
	Europe	2	19	8	52
	Asian/Japan	--	11	5	18
	Australia and New Zeland	--	1	--	8
	Africa	--	--	--	1
<b>Number of rectal biopsies</b>		290	2,661	1,507	19,209
<b>Number of rectal biopsies per patient</b>	1-3	2	25	7	44
	4-6	--	--	--	2
	7-10	--	--	--	--
	>10	--	--	--	--
<b>Subtype of rectal biopsy</b>			<u>Full Thickness</u> 40	<u>Cup biopsy</u> 4	<u>Noblett Rbi2</u> 29
					<u>SoloRBT</u> 2
					<u>Multipurpose</u> 3
					<u>Quinton</u> 8
			<u>Superficial</u> 1	<u>Other</u> 10	<u>SBT 100</u> 3
					<u>Others</u> 7
<b>Distance from anal verge</b>	0-3cm	1	18	13	41
	4-6cm	2	4	5	20
	7-10cm	1	2	2	4
	>10cm	--	1	2	1
<b>Type of histopathological analysis</b>	HE	--	7	4	15
	Ache	2	5	4	15
	HE + Ache	--	9	5	38
	HE + Ache + Calretinin	--	2	--	8
	HE + Calretinin	--	1	--	5
	Others	--	11	3	25

(Please refer to references in the appendices)

(-- not reported)

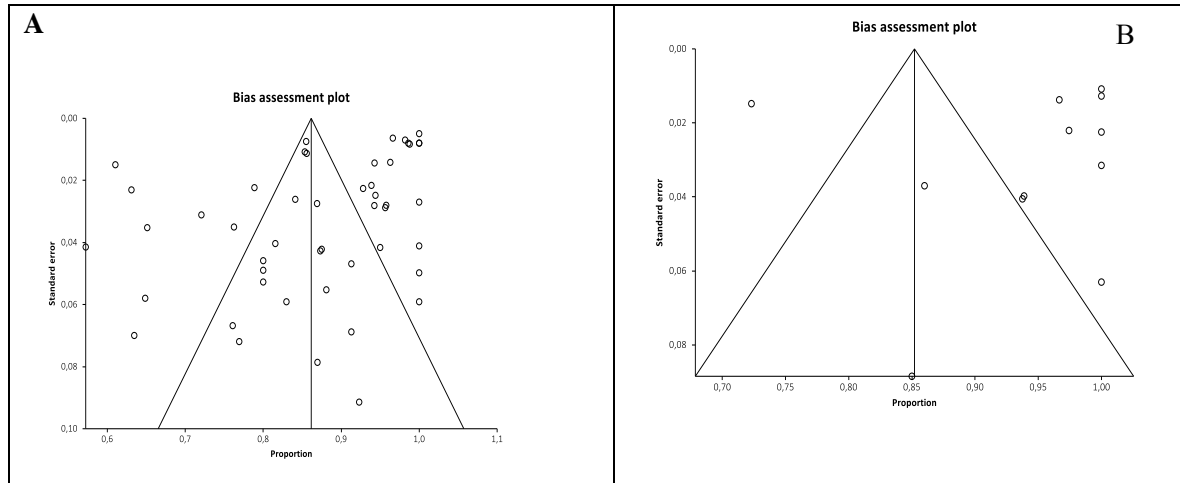
**Rate of conclusive results**Overall

The pooled proportion of conclusive results was 95% (95% CI, 0.87–0.99) in open biopsies from 12 studies with a total of 1,689 samples (Appendix 4). Similarly, there was 95% (95% CI, 0.90–0.98) in punch biopsies from six studies with a total of 883 samples (Appendix 5). On the other hand, suction biopsies showed 88% (95% CI, 0.85–0.92) of conclusive rates from 48 studies with a total of 11,184 biopsies (Appendix 6). Therefore, there was no significant difference between the rate of conclusive results of all biopsies methods since their CIs overlapped (Figure 2).



**Figure 2.** Pooled analysis of proportions from case series related to stratified rectal biopsy methods regarding conclusive effects.

Significant heterogeneity was noted in all plotted results: open  $I^2 = 95.7\%$ , punch  $I^2 = 85.0\%$ , and suction  $I^2 = 96.7\%$ , showing the inconsistency of the methodological aspects between the studies included in the meta-analysis ( $P < 0.0001$ ). Figure 3 represents an asymmetric funnel plot of the outcome rates of conclusive results of the suction (Panel A) and open (Panel B) biopsies case series by the Egger test, which indicates a relationship between the outcome effect and the study size. This suggests the possibility of publication bias.

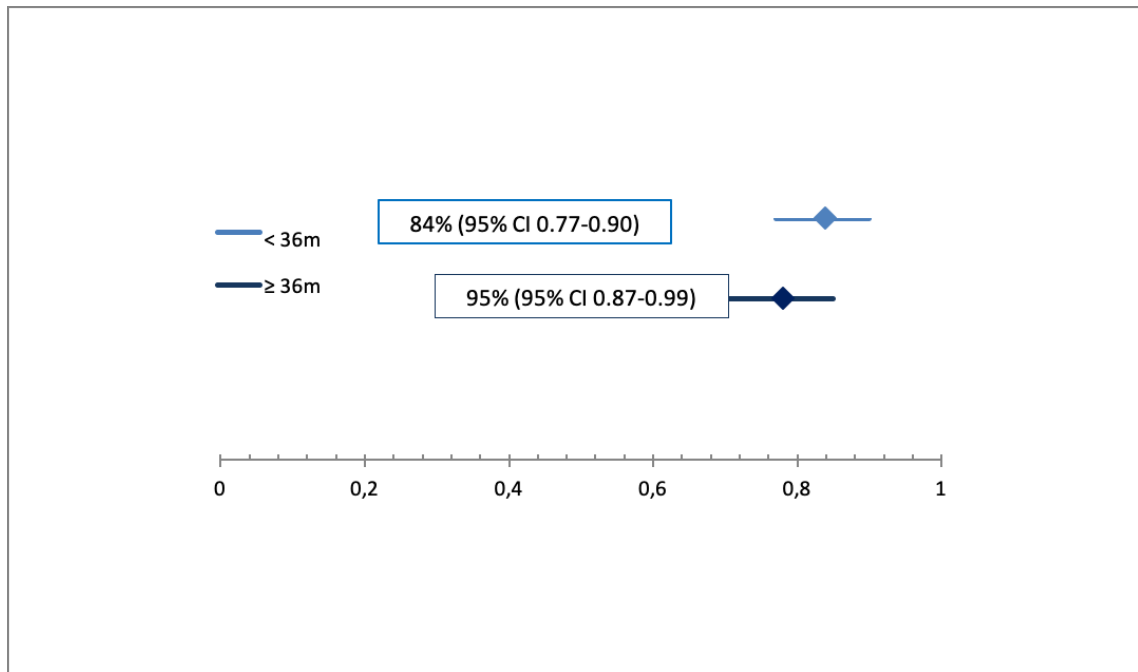


**Figure 3.** Funnel plot of case series studies regarding rates of conclusive results by the Egger test. Panel A: Suction biopsies. Panel B: Open biopsies.

Stratification by age

The pooled proportion of conclusive results in the group of patients undergoing suction biopsies was 84% (95% CI, 0.77–0.90) from eight studies of patients younger than 36 months old and 78% (95% CI, 0.69–0.85) from four studies of patients older than 36 months old. There was no significant difference among those two age groups since their CIs overlapped (Figure 4). On the other hand, there was a lack of data in the age group stratification by in the other rectal biopsy techniques. Therefore, it was impossible to compare the rate of conclusive results according to patient age subgroups in the open, punch, and endoscopic groups.

There was significant heterogeneity in the results of children in the suction groups, both in the younger than 36 months  $I^2 = 86.5\%$  ( $P < 0.0001$ ) group and the older than 36 months of age  $I^2 = 95.2\%$  ( $P < 0.0001$ ) group.



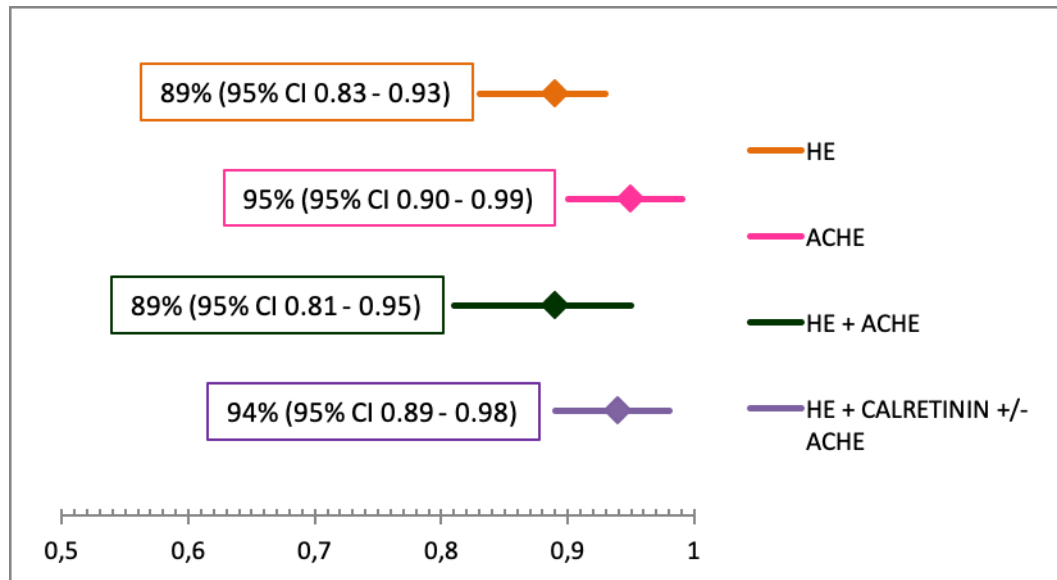
**Figure 4.** The pooled analysis of proportions from case series related to suction biopsy stratified by mean age group for the conclusive results rate (m, months).

Stratification according to histopathological analysis regardless of rectal biopsy type

The pooled proportion of conclusive results was 89% (95% CI, 0.83–0.93) in the HE analysis of 18 studies with a total of 2,989 samples. Similarly, there was 95% (95% CI, 0.90–0.99) in the AChE analysis of seven studies with a total of 696 samples. In addition, there was 89% (95% CI, 0.81–0.95) in HE with AChE analysis from 17 studies with a total of 3,958 samples, and in HE with calretinin with or without AChE group, there was 94% (95% CI, 0.89–0.98) from five studies with a total of 197 samples. According to these results, there was no significant difference among those four studied groups since their CIs overlapped (Figure 5).

There was significance regarding heterogeneity in following plotted results: HE,  $I^2 = 94.4\%$ ; AChE,  $I^2 = 85.8\%$ ; and HE + AChE,  $I^2 = 97.8\%$ , showing the inconsistency of clinical and methodological aspects between the studies included in the meta-analysis ( $P < 0.0001$ ). However, there was no significance in heterogeneity in the plotted results of HE + calretinin with or without AChE ( $I^2 = 41.4\%$ ;  $P = 0.1456$ ).

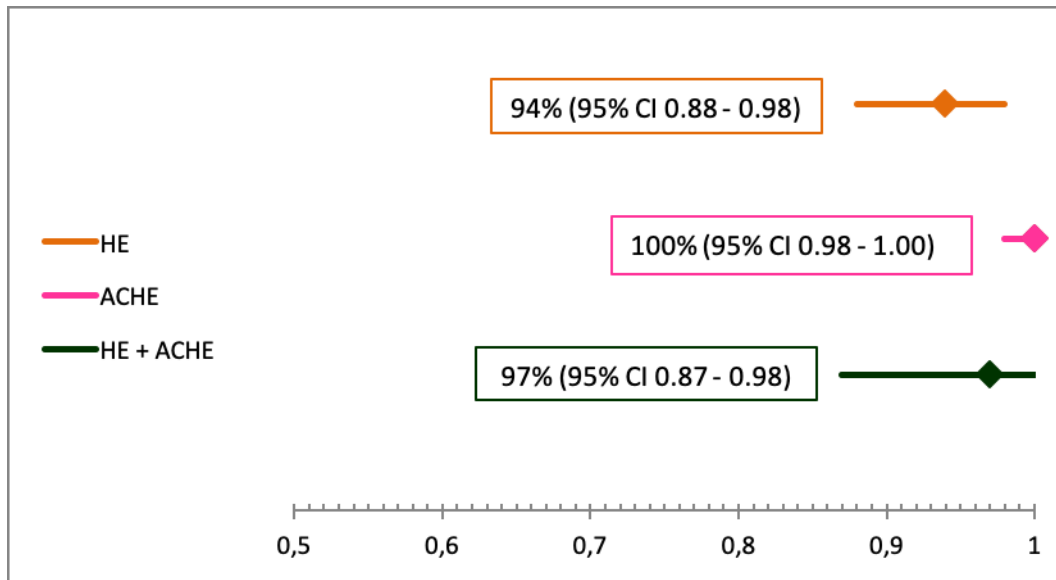




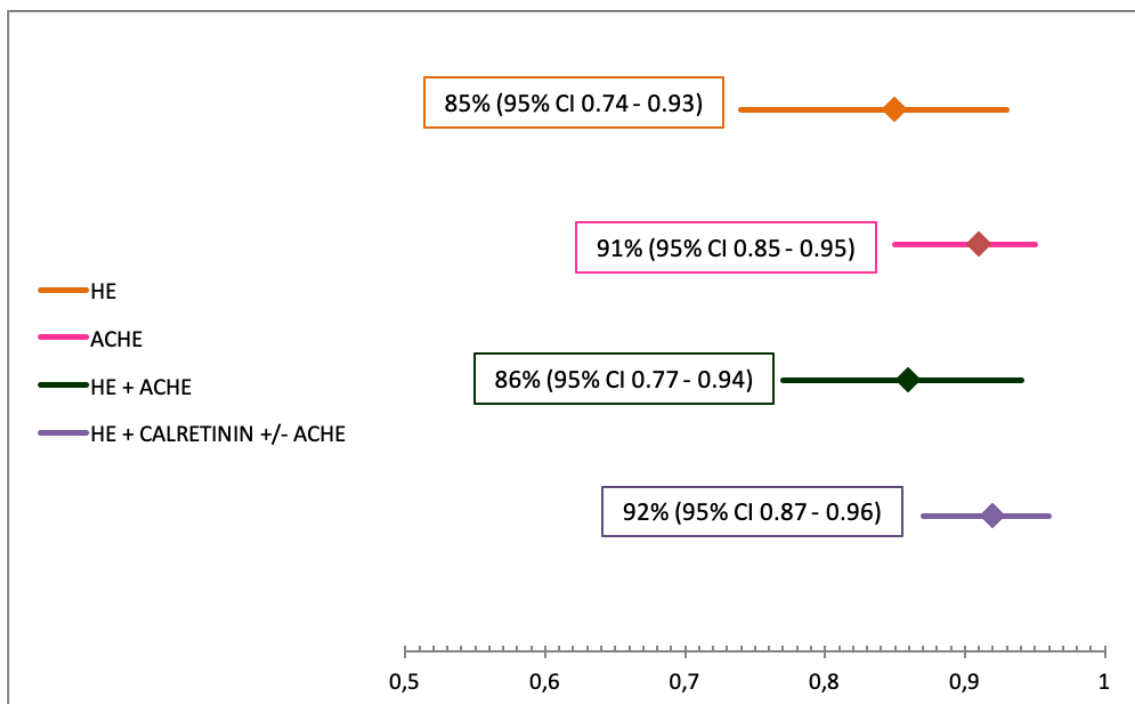
**Figure 5.** Pooled analysis of proportions from case series related to stratified rectal biopsy methods regarding true positive effects according histopathological analysis regardless of rectal biopsy type.

Stratification according to histopathological analysis according to rectal biopsy technique

The pooled proportion of conclusive results in patients undergoing open biopsies regarding to the histopathological analysis was 100% (95% CI, 0.98–1.00) in the AChE analysis group from two studies with a total of 125 samples; 94% (95% CI, 0.88–0.98) in the HE analysis group from four studies with a total of 436 samples; and 97% (95% CI, 0.87–1.00) in the HE + AChE analysis group from two studies with a total of 121 samples (Figure 6). Thereafter, in the suction group, the pooled proportion of conclusive effects was 91% (95% CI, 0.85–0.95) in the AChE analysis group from five studies with a total of 571 samples; 85% (95% CI, 0.74–0.93) in the HE analysis group from 11 studies with a total of 1,780 samples; 86% (95% CI, 0.77–0.94) in the HE + AChE analysis group from 13 studies with a total of 3,759 samples; and 92% (95% CI, 0.87–0.96) in the HE + calretinin with or without AChE analysis group from four studies with a total of 169 samples (Figure 7). There was no significant difference in the histopathological analysis, even upon comparisons of isolated groups of rectal biopsy technique (open and suction) since their CIs overlapped.



**Figure 6.** Pooled analysis of proportions from case series related to stratified conclusive effects by open rectal biopsies regarding histopathological analysis. HE, hematoxylin and eosin; AChE, acetylcholinesterase.



**Figure 7.** Pooled analysis of proportions from case series related to stratified conclusive effects by suction rectal biopsies regarding histopathological analysis. HE, hematoxylin and eosin; AChE, acetylcholinesterase.

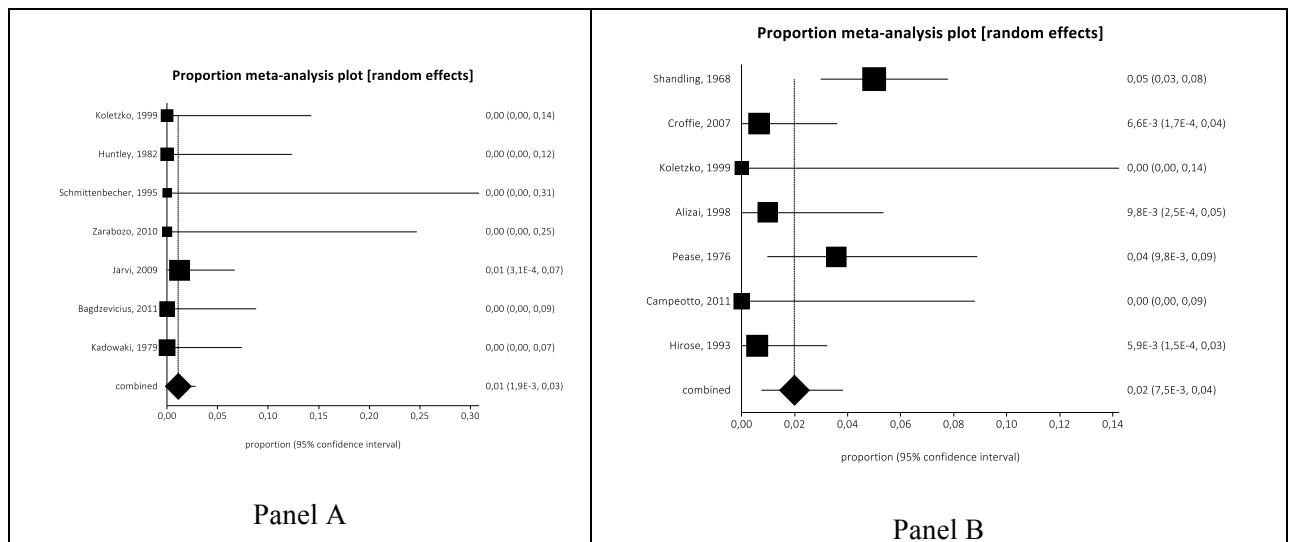
There was no significance in the heterogeneity of the plotted results for the open group (HE + AChE,  $I^2 = 80.4\%$  [ $0P = 0.0237$ ], HE  $I^2 = 75.8\%$  [ $P = 0.0062$ ]) or in the AChE open group ( $I^2 = 0$ ). There was significant heterogeneity in the plotted results of the 2 suction groups: HE + AChE,  $I^2 = 98.2\%$ ; and HE,  $I^2 = 96.2\%$  showing the inconsistency of clinical and methodological aspects

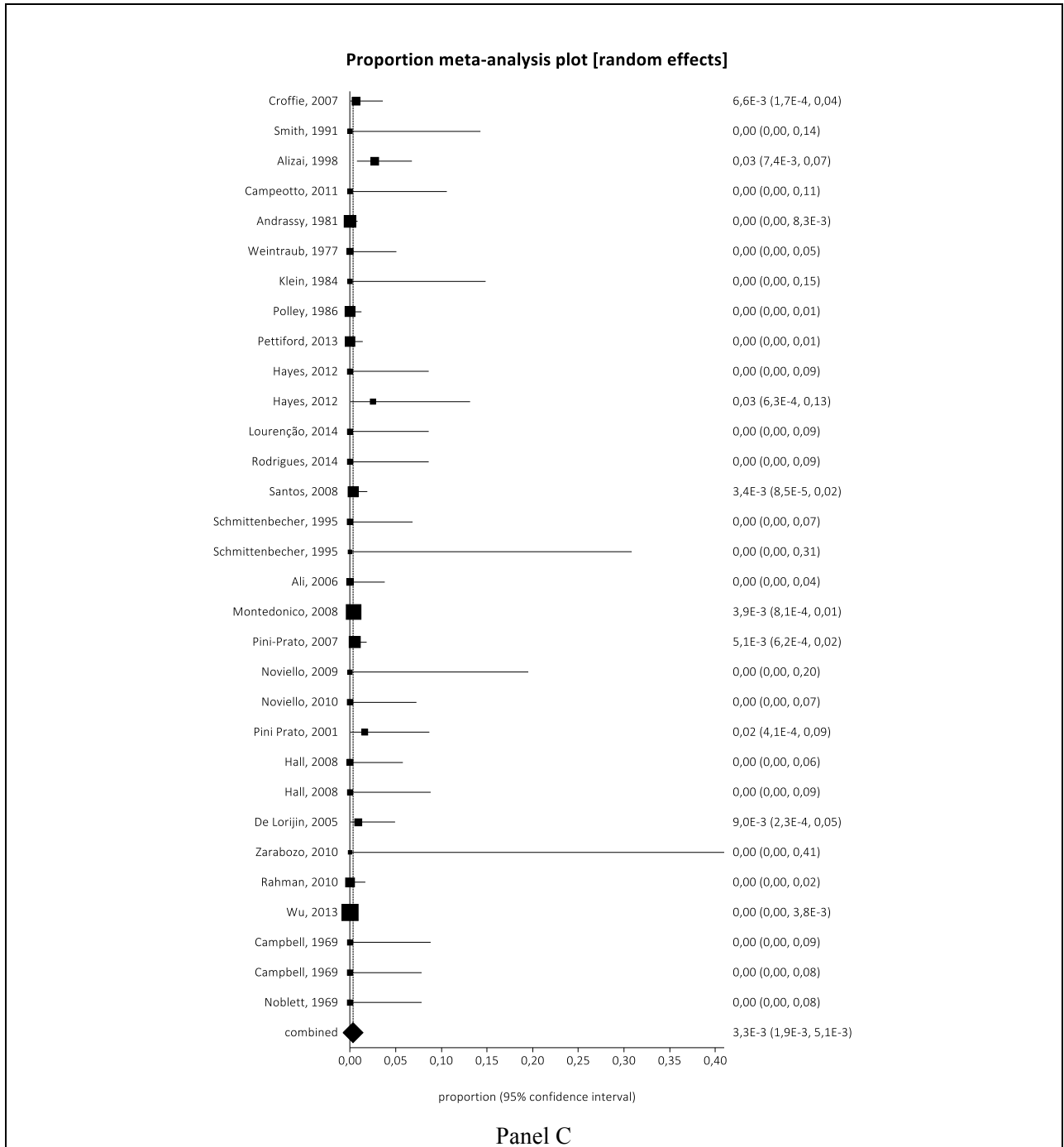
between the studies included in the meta-analysis ( $P < 0.0001$ ). On the other hand, there was no significance in heterogeneity of the plotted results in suction AChE  $I^2 = 72.7\%$  ( $P = 0.0055$ ) or HE + calretinin with or without AChE,  $I^2 = 14.9\%$  ( $P = 0.3177$ ).

**Rate of complications**

The pooled proportion of complication rates was 1% (95% CI, 0.00019–0.03) in open biopsies from seven studies for a total of 244 patients. There was a 0.03% rate (95% CI, 0.00019–0.00051) in suction biopsies from 31 studies with a total of 4,890 patients, and the pooled complication rate was 2% (95% CI, 0.00075–0.04) in punch biopsies from seven studies with a total of 960 patients. Therefore, there was no significant difference among the open, punch, and suction group since their CIs overlapped, whereas there was a significant difference between the complication rates of the punch and suction groups since their CIs did not overlap (Figure 8).

There was no significance in heterogeneity of the plotted results of the punch group  $I^2 = 60.1\%$  ( $P = 0.0199$ ). However, no heterogeneity was noted in the open and suction groups,  $I^2 = 0$ .





**Figure 8.** Pooled analysis of proportions from case series related to stratified rectal biopsy technique regarding complications. Panel A: Open care series; Panel B: Punch case series; Panel C: Suction case series. An effect difference was seen because of the non-overlap of the 95% confidence intervals.

## DISCUSSION

The definitive diagnosis of intestinal dysganglionosis depends on the histopathological evaluation of rectal biopsies<sup>29-32</sup>. However, this analysis can generate a great diagnostic challenge<sup>7</sup>. A variety of different forceps models, technical modifications, and new biopsy methods have been proposed to provide deeper and larger rectal specimens to improve the conclusive biopsy rates<sup>11-21, 23</sup>. However, the risk of complications increases directly with the size of the biopsy specimen<sup>11, 12, 33</sup>.

To the best of our knowledge, this is the first systematic review and meta-analysis to compare the rate of conclusive results obtained by the different types of rectal biopsies techniques, also considering their rate of complications.

### *Main findings*

The conclusive result rates of open, suction, and punch biopsies did not differ significantly. However, punch biopsies demonstrate significantly higher complication rates than suction biopsies. On the other hand, the rates of complication in open biopsy group were not significantly different compared to the suction or open group. Although suction and punch biopsies are both performed blindly, the punch instruments provide larger fragments<sup>12</sup>. Therefore, the complication risks are higher.

Regarding age, there were no significant differences among conclusive results between the age subgroups in suction biopsy group. Although some studies described that suction biopsies are better indicated for children under 36 months of age because of the lack of cooperation and the presence of a thickened megarectum, which is common in older children, our review did not reveal the same conclusion<sup>16, 20, 23, 34, 35</sup>.

Despite the lack of significant differences among the histopathological analysis types, the complete panel including calretinin + HE with or without AChE staining demonstrated a higher rate of conclusive results. In addition, the absence of statistical significance and the closer results demonstrated that the histopathological analysis may not be considered a bias in the rates of conclusive results among the different rectal biopsy techniques. Moreover, the association between HE + calretinin with or without AChE increased the diagnostic capacity<sup>36</sup>, particularly for suction biopsies, leading to an increase in proportion of conclusive results from 88% to 94%, bringing them closer to the rates of conclusive results of open and punch biopsies. This finding reinforces the value of the association between different adjuvant methods in the histopathological analysis, mainly in rectal suction biopsies.

***Strengths and limitations***

This meta-analysis included a broad search with independent data abstraction. Our study surpassed the diagnosis of HD to include several other diseases of the enteric nervous system, usually present in the investigation set for organic causes of intestinal constipation in children. This is the first systematic review to analyze different rectal biopsy techniques and their complications. In addition, the subgroup analysis of age or histopathological analysis method allowed us to identify the potential bias of the conclusive result rates. Compared with the most recent published meta-analysis on this issue<sup>24</sup>, our study included all rectal biopsy techniques; greater numbers of case series, patients, and samples; and a more detailed analysis.

The primary limitation of our study is related to the invasive nature of rectal biopsies, which makes it difficult to conduct randomized controlled studies, impairs the quality of the evidence, and rules out a conventional meta-analysis. Considering the Grading of Recommendations Assessment, Development and Evaluation criteria<sup>37</sup>, it is impossible to determine the quality of evidence and strength of recommendations. However, the quality of evidence is considered low because the data available for this subject are represented only for case series. In addition, this characteristic does not allow us to perform a conventional meta-analysis.

Another limitation is that we could not perform a proportional meta-analysis of the endoscopic biopsies on all outcomes since there were only two included studies. The meta-analysis according to rectal biopsy technique subtype and different complications was impossible because few studies describe the subtype. Furthermore, we cannot rule out the possibility of bias in the analysis stratified by age since we used the mean age data provided by the included studies to dichotomize the < 36 months and  $\geq$  36 months groups. Because of a lack of data, we could not perform the analysis in all biopsy groups.

As described by Higgins & Thompson (2002), most of the heterogeneity associated with our data was highly significant<sup>38</sup>. However, this can be justified because the case series presents a wide variation in the number of patients, biopsy techniques, histopathological analysis types, instruments, number of samples, and distance from the anal verge, which could lead to methodological and clinical bias. In addition, publication bias must be considered since this study consisted of only case series, the great majority of which focused only on suction techniques.

**Implications**

Our findings demonstrated that suction, punch, and open techniques have comparable rates of conclusive results. Considering that punch and suction techniques are minimally invasive procedures that do not require anesthesia or hospitalization, these techniques could be considered as a good choice for diagnostic intestinal dysganglionosis in children. The rates of conclusive results of rectal suction biopsies can increase if different methods of histopathological analysis are combined such as AChE histochemistry and calretinin immunohistochemistry. Suction rectal biopsies also demonstrated similar conclusive rates across different mean age groups, supporting their indication even for older children. Moreover, punch rectal biopsy is associated with significantly higher complication rates than suction technique. Therefore, rectal suction biopsies are useful, safe, and effective for diagnosing intestinal dysganglionosis in children.

**Funding and conflicts of interest:** The authors have no conflicts of interest.

The authors report no commercial or financial relationships in regard to this article. El Dib R received a Brazilian Research Council (CNPq) scholarship (CNPq 310953/2015-4).

**AUTHORS' CONTRIBUTIONS**

All authors contributed to all aspects of this study, including conducting the literature search, study design, data collection, data analysis, data interpretation, and writing of the paper.

**REFERENCES**

1. Sanchez MI, Bercik P. Epidemiology and burden of chronic constipation. *Can J Gastroenterol.* 2011; 25 Suppl B:11B-15B.
2. Andrews CN, Storr M. The pathophysiology of chronic constipation. *Can J Gastroenterol.* 2011; 25 Suppl B:16B-21B.
3. NASPGHAN. Constipation Guideline Committee of the North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. Evaluation and treatment of constipation in infants and children: recommendations of the North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2006; 43(3):e1-13.
4. Rajindrajith S, Devanarayana NM. Constipation in children: novel insight into epidemiology, pathophysiology and management. *J Neurogastroenterol Motil.* 2011; 17(1):35-47.
5. Knowles CH, De Giorgio R, Kapur RP, Bruder E, Farrugia G, Geboes K, Lindberg G, Martin JE, Meier-Ruge WA, Milla PJ, Smith VV, Vandervinden JM, Veress B, Wedel T. The London Classification of gastrointestinal neuromuscular pathology: report on behalf of the Gastro 2009 International Working Group. *Gut.* 2010; 59(7):882-7.
6. Moore SW. Advances in understanding functional variations in the Hirschsprung Disease spectrum (variant Hirschsprung disease). *Pediatr Surg Int* (2017); 33:285-98.
7. Kapur, RP, Reed RC, Finn LS, Patterson K, Johanson J, Rutledge JC. Calretinin Immunohistochemistry versus Acetylcholinesterase Histochemistry in the evaluation of suction rectal biopsies for Hirschsprung disease. *Pediatr Dev Pathol.* 2009; 12(1):6-15.
8. Ghosh A, Griffiths DM. Rectal biopsy in the investigation of constipation. *Arch Dis Child.* 1998;79(3):266-8.
9. Qualman SJ, Jaffe R, Bove KE, Monforte-Muñoz H. Diagnosis of Hirschsprung disease using the rectal biopsy: multi-institutional survey. *Pediatr Dev Pathol.* 1999; 2(6):588-96.
10. Guinard-Samuel V, Bonnard A, De Lagausie P, Philippe-Chomette P, Albertini C, El Ghoneimi A, Peuchmaur M, Berrebi-Binczak D. Calretinin immunohistochemistry: a simple and efficient tool to diagnose Hirschsprung's disease. *Mod Pathol.* 2009; 22(10):1379-84.



11. Shandling B, Auldish AW. Punch biopsy of the rectum for the diagnosis of Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg.* 1972 Oct-Nov;7(5):546-52.
12. Pease PW, Corkery JJ, Cameron AH. Diagnosis of Hirschsprung's disease by punch biopsy of rectum. *Arch Dis Child.* 1976; 51(7):541-3.
13. Weintraub WH, Heidelberger KP, Coran AG. A simplified approach to diagnostic rectal biopsy in infants and children. *Am J Surg.* 1977; 134(2):307-10.
14. Hirose R, Hirata Y, Yamada T, Kawana T, Taguchi T, Suita S. The simple technique of rectal mucosal biopsy for the diagnosis of Hirschsprung's Disease. *J Pediatr Surg.* 1993; 28(7):942-944.
15. Schmittbecher PP, Schmidt A, Meier-Ruge W, Wiebecke B. Rectal suction biopsy: can it be sufficient to diagnosis neuronal intestinal dysplasia? *Eur J Pediatr Surg.* 1995 Oct; 5(5): 277-9.
16. Alizai NK, Batcup G, Dixon MF, Stringer MD. Rectal biopsy for Hirschsprung's disease: what is the optimum method? *Pediatric Surgery International.* 1998; 13 (2-3): 121-124.
17. Kobayashi H, Li Z, Yamataka A, Lane GJ, Miyano T. Rectal biopsy: what is the optimal procedure? *Pediatr Surg Int.* 2002 Dec;18(8):753-6.
18. Ali AE, Morecroft JA, Bowen JC, Bruce J, Morabito A. Wall or machine suction rectal biopsy for Hirschsprung's disease: a simple modified technique can improve the adequacy of biopsy. *Pediatr Surg Int.* 2006 Aug; 22(8):681-2.
19. Pini-Prato A, Martucciello G, Jasonni V. Rectal suction biopsy in the diagnosis of intestinal dysganglionoses: 5-year experience with Solo-RBT in 389 patients. *J Pediatr Surg.* 2006; 41(6):1043-8.
20. Croffie JM, Davis MM, Faught PR, Corkins MR, Gupta SK, Pfefferkorn MD, Molleston JP, Fitzgerald JF. At what age is a suction rectal biopsy less likely to provide adequate tissue for identification of ganglion cells? *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2007 Feb; 44(2):198-202.
21. Hall NJ, Kufeji D, Keshtgar A. Out with the old and in with the new: a comparison of rectal suction biopsies with traditional and modern biopsy forceps. *J Pediatr Surg.* 2009 Feb;44(2):395-8.

22. Campeotto F, Barbet PJ, Kalach N, Arhan P, Devroede G, Beaudoin S, Dupont C. Deeper rectal biopsies and better yield of neuronal structures with Scheye vs Noblett forceps--preliminary results. *J Pediatr Surg.* 2011; 46(3):478-81.
23. Hirsh BZ, Angelides AG, Goode SP, Garb JL. Rectal biopsies obtained with jumbo biopsy forceps in the evaluation of Hirschsprung disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2011 Apr; 52(4):429-32.
24. Friedmacher F, Puri P. Rectal suction biopsy for the diagnosis of Hirschsprung's disease: a systematic review of diagnostic accuracy and complications. *Pediatr Surg Int.* 2015 Sep;31(9):821-30.
25. Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG, The PRISMA Group 2009. Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement. *PLoS Med* 6(7): e1000097. doi:10.1371/journal.pmed1000097
26. El Dib R, Touma NJ, Kapoor A. Cryoablation versus Radiofrequency Ablation for the Treatment of Renal Cell Carcinoma: a meta-analysis of case series studies. *BJU Int.* 2012; 110(4):510-6. doi: 10.1111/j.1464-410X.2011.10885.x.
27. El Dib R, Nascimento Jr P, Kapoor A. An alternative approach to deal with the absence of clinical trials. A proportional meta-analysis of case series studies. *Acta Cir Bras* 2013;28(12):870-6.
28. Barretti P, Doles JV, Pinotti DG, El Dib R: Efficacy of antibiotic therapy for peritoneal dialysis-associated peritonitis: A proportional meta-analysis. *BMC Infect Dis* 14: 445, 2014
29. Swenson O, Fisher JH, MacMahon H. Rectal biopsy as an aid in the diagnosis of Hirschsprung's disease. *N Engl J Med.* 1955; 253(15):632-5.
30. 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.
31. Dobbins WO, Bill AH Jr. Diagnosis of Hirschsprung's disease excluded by rectal suction biopsy. *N Engl J Med.* 1965; 272:990-3.
32. Campbell PE, Noblett HR. Experience with rectal suction biopsy in the diagnosis of Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg.* 1969; 4(4):410-5.

33. Melendez E, Goldstein AM, Sagar P, Badizadegan K. Case 3-2012: A newborn boy with vomiting, diarrhea, and abdominal distension. *N Engl J Med* 2012; 366:361-72.
34. Muise ED, Gandotra N, Tackett JJ, Bamdad MC, Cowles RA. Localization of muscarinic acetylcholine receptor 2 to the intestinal crypt stem cell compartment. *Data in Brief* 2017; 10:482-6.
35. Takawira C, D' Agostini S, Shenouda S, et al. Laboratory procedures update on Hirschsprung disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2015;60:598–605
36. de Arruda Lourenção PL, Takegawa BK, Ortolan EVP, Terra SA, Rodrigues MAM. Does calretinin immunohistochemistry reduce inconclusive diagnosis in rectal biopsies for Hirschsprung Disease?. *J Pediatr Gastroenterol Nut* 2014; 58(5):603-7
37. Guyatt GH, Oxman AD, Vist GE, Kunz R, Falck-Ytter Y, Alonso-Coello P. GRADE: an emerging consensus on rating quality of evidence and strength of recommendations. *BMJ* 2008; 336:924-6
38. Higgins JPT, Thompson SG. Quantifying heterogeneity in a metanalysis. *Stat Med.* 2002, 21:1539-58.

**Appendix 1.** Detailed search strategy.

(Hirschsprung Disease OR Hirschsprung's Disease OR Hirschsprungs Disease OR Aganglionic Megacolon OR Congenital Megacolon OR Rectosigmoid Colon Aganglionosis OR Rectosigmoid Aganglionosis OR Congenital Intestinal Aganglionosis OR Colonic Aganglionosis OR Total Colonic Aganglionosis OR constipation OR Dyschezia OR Colonic Inertia OR intestinal dysganglionosis OR intestinal Pseudo Obstruction OR Intestinal Pseudo-Obstructions OR Intestinal Pseudo-Obstruction OR Chronic Idiopathic Intestinal Pseudo-Obstruction OR Congenital Short Bowel Syndrome OR Idiopathic Intestinal Pseudo-Obstruction OR Idiopathic Intestinal Pseudo-Obstructions OR Idiopathic Intestinal Pseudo Obstruction OR Idiopathic Intestinal Pseudo-Obstructions OR Idiopathic Intestinal Pseudo-Obstruction OR Idiopathic Intestinal Pseudo-Obstructions OR Pseudointestinal Obstruction Syndrome OR Pseudoobstructive Syndrome OR Intestinal Pseudoobstruction OR Intestinal Pseudoobstructions OR Enteric Neuropathy OR Paralytic Ileus OR Visceral Myopathy OR Visceral Myopathies OR intestinal neuronal dysplasia OR Neuronal intestinal pseudoobstruction OR Autosomal Recessive Familial Visceral Neuropathy OR type A Neuronal intestinal dysplasia OR neuronal type chronic idiopathic intestinal Pseudoobstruction OR deficiency of Argyrophil myenteric plexus OR Intestinal pseudoobstruction due to neuronal disease OR type B Neuronal Intestinal Dysplasia OR hypoganglionosis) AND (Rectal biopsy OR Rectal biopsies OR rectal suction biopsy OR rectal suction biopsies OR rectal punch biopsy OR rectal punch biopsies OR two-point rectal mucosal biopsy OR two-point rectal mucosal biopsies OR Suction Biopsies of the rectum OR Suction Biopsy of the rectum OR Suction Biopsy of rectum OR Suction Biopsies of rectum OR Punch Biopsy of rectum OR Punch Biopsies of rectum OR Punch Biopsy of the rectum OR Punch Biopsies of the rectum OR rectal mucosal biopsy OR rectal mucosal biopsies OR suction biopsy OR suction biopsies OR suction rectal biopsy OR suction rectal biopsies OR Noblett OR biopsy forceps OR biopsies forceps OR traditional biopsy forceps OR traditional biopsies forceps OR modern biopsy forceps OR modern biopsies forceps OR rectal biopsy forceps OR rectal biopsies forceps OR deeper rectal biopsy OR deeper rectal biopsies OR Scheye OR Jumbo biopsy forceps OR jumbo biopsies forceps OR multipurpose biopsy tube OR multipurpose biopsy tubes OR multipurpose biopsies tube OR multipurpose biopsies tubes OR Swenson rectal biopsy OR Swenson rectal biopsies OR open rectal biopsy OR open rectal biopsies OR cup rectal biopsy OR cup rectal biopsies OR surgical rectal biopsy OR surgical rectal biopsies)

**Appendix 2.** References of all included studies

Reference number	Article	Journal	Author
1.	Acetylcholinesterase and manometry in the diagnosis of the constipated child	Arch Surg. 1986	Ikawa H, Kim SH, Hendren WH, Donahoe PK.
2.	Punch biopsy of the rectum for the diagnosis of Hirschsprung's disease	Arch Surg. 1968	Shandling B, Auldist AW.
3.	At what age is a suction rectal biopsy less likely to provide adequate tissue for identification of ganglion cells?	J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2007	Croffie JM, Davis MM, Faught PR, Corkins MR, Gupta SK, Pfefferkorn MD, Molleston JP, Fitzgerald JF.
4.	Diagnostic value of rectal mucosal acetylcholinesterase levels in Hirschsprung's disease.	Lancet. 1979	Dale G, Bonham JR, Lowdon P, Wagget J, Rangescroft L, Scott DJ.
5.	Rectal biopsy for diagnosis of intestinal neuronal dysplasia in children: a prospective multicentre study on interobserver variation and clinical outcome	Gut. 1999	Koletzko S, Jesch I, Faus-Kebetaler T, Briner J, Meier-Ruge W, Müntefering H, Coerdts W, Wessel L, Keller KM, Nützenadel W, Schmittenbecher P, Holschneider A, Sacher P.
6.	Infantile Hirschsprung's disease – is barium enema useful?	Pediatr Surg Int (1991) 6: 318-321	Smith GH, Cass D
7.	Rectal biopsy for Hirschsprung's disease: what is the optimum method?	Pediatr Surg Int. 1998	Alizai NK, Batcup G, Dixon MF, Stringer MD.
8.	Diagnosis of Hirschsprung's disease by punch biopsy of rectum	Arch Dis Child. 1976	Pease PW, Corkery JJ, Cameron AH.
9.	Diagnosis of Hirschsprung's disease by quantitative biochemical assay of acetylcholinesterase in rectal tissue	Lancet. 1975	Boston VE, Dale G, Riley KW.
10.	Idiopathic megarectum in children.	European Journal of Pediatric Surgery. 2001	Godbole P.P., Pinfield A., Stringer M.D.
11.	Deeper rectal biopsies and better yield of neuronal structures with Scheye vs Noblett forceps--preliminary results.	J Pediatr Surg. 2011	Campeotto F, Barbet PJ, Kalach N, Arhan wP, Devroede G, Beaudoin S, Dupont C.
12.	Clinical evaluation of diagnostic methods for Hirschsprung's disease.	Pediatric Surgery International. 1986 Nov;1(4): 218–222.	• She Yaxiong, Shi Chengren
13.	Is it worthwhile looking for hirschsprung's disease in children older than 1 year of age	Journal of Pediatric Gastroenterology	Hauser B., Hoorens A., Devreker T., Veereman-

	with chronic constipation?	and Nutrition. 2011	Wauters G., De Greef E., Vandenplas Y Y
14.	Hirschsprung's disease: is there a relationship between mast cells and nerve fibers?	World J Gastroenterol. 2009	Yadav AK, Mishra K, Mohta A, Agarwal S.
15.	Manometry and histochemistry in the diagnosis of Hirschsprung's disease	Pediatrics. 1979	Morikawa Y, Donahoe PK, Hendren WH.
16.	Deformation of cholinergic (cholinesterase-positive) nerves of rectal mucous membrane in Hirschsprung's disease--a histochemical diagnosis using mucosal biopsies	Chin Med J. 1979	No authors listed
17.	The simple technique of rectal mucosal biopsy for the diagnosis of Hirschsprung's disease	J Pediatr Surg. 1993	Hirose R, Hirata Y, Yamada T, Kawana T, Taguchi T, Suita S.
18.	Two-point rectal mucosal biopsy for selection of surgical treatment of Hirschsprung's disease	J Pediatr Surg. 1990	Ohi RJ, Tseng SW, Kamiyama T, Chiba T.
19.	Fourteen-year experience of acetylcholinesterase staining for rectal mucosal biopsy in neonatal Hirschsprung's disease	J Pediatr Surg. 2001	Nakao M, Suita S, Taguchi T, Hirose R, Shima Y.
20.	Histochemical diagnosis of Hirschsprung disease	Pediatrics. 1982	Huntley CC, Shaffner LD, Challa VR, Lysterly AD.
21.	Acetylthiocholinesterase staining activity of rectal mucosa. Its use in the diagnosis of Hirschsprung's disease	Arch Pathol Lab Med. 1982	Hamoudi AB, Reiner CB, Boles ET Jr, McClung HJ, Kerzner B.
22.	Immunohistochemistry as an aid in the diagnosis of Hirschsprung's disease	Am J Clin Pathol. 1985	Hall CL, Lampert PW.
23.	Rectal biopsy in children with Down syndrome and chronic constipation: Hirschsprung disease vs non-hirschsprung disease	Pediatr Dev Pathol. 2012	Yin H, Boyd T, Pacheco MC, Schonfeld D, Bove KE.
24.	Cathepsin D in intestinal ganglion cells. A potential aid to diagnosis in suspected Hirschsprung's disease.	Am J Surg Pathol. 1997	Abu-Alfa AK, Kuan SF, West AB, Reyes-Múgica M.
25.	Hirschsprung's disease: an appraisal of histochemically demonstrated acetylcholinesterase activity in suction rectal biopsy specimens as an aid to diagnosis	Arch Pathol Lab Med. 1978	Lake BD, Puri P, Nixon HH, Claireaux AE.
26.	Histologic diagnosis of Hirschsprung's disease. The value of concurrent hematoxylin and eosin and cholinesterase staining of rectal biopsies.	Am J Clin Pathol. 1987	Challa VR, Moran JR, Turner CS, Lysterly AD.
27.	Variability of acetylcholinesterase hyperinnervation patterns in distal rectal suction biopsy specimens in Hirschsprung	Pediatr Dev Pathol. 2008	Pacheco MC, Bove KE.

	disease		
28.	Acetylcholinesterase-stained suction rectal biopsies in the diagnosis of Hirschsprung's disease	J Pediatr Gastroenterol Nutr. 1990	Schofield DE, Devine W, Yunis EJ.
29.	Calretinin immunohistochemistry versus acetylcholinesterase histochemistry in the evaluation of suction rectal biopsies for Hirschsprung Disease	Pediatr Dev Pathol. 2009	Kapur RP, Reed RC, Finn LS, Patterson K, Johanson J, Rutledge JC.
30.	Intestinal neuronal dysplasia	J Pediatr Gastroenterol Nutr. 1991	Schofield DE, Yunis EJ.
31.	Hirschsprung disease and use of calretinin in inadequate rectal suction biopsies	Arch Pathol Lab Med. 2013	Gonzalo DH, Plesec T.
32.	Utility of microtubule associated protein-2 (MAP-2) immunohistochemistry for identification of ganglion cells in paraffin-embedded rectal suction biopsies	Am J Surg Pathol. 2009	Burtelow MA, Longacre TA.
33.	The loss of calretinin expression indicates aganglionosis in Hirschsprung's disease.	J Clin Pathol. 2004 Jul;57(7):712-6.	Barshack I, Fridman E, Goldberg I, Chowers Y, Kopolovic J.
34.	Rectal suction biopsy for the diagnosis of Hirschsprung's disease	Ann Surg. 1981	Andrassy RJ, Isaacs H, Weitzman JJ.
35.	Chronic idiopathic intestinal pseudo-obstruction syndrome in children - clinical characteristics and prognosis	J Pediatr. 1977	Byrne WJ, Cipel L, Euler AR, Halpin TC, Ament ME.
36.	Increased submucosal nerve trunk caliber in aganglionosis: A 'positive' and objective finding in suction biopsies and segmental resections in Hirschsprung's disease.	Arch Pathol Lab Med. 1998	Monforte-Muñoz H, Gonzalez-Gomez I, Rowland JM, Landing BH.
37.	Role of calretinin immunohistochemical stain in evaluation of Hirschsprung disease: an institutional experience	Int J Clin Exp Pathol. 2013	Alexandrescu S, Rosenberg H, Tatevian N.
38.	Hirschsprung's disease and calretinin in inadequate biopsies	Laboratory Investigation. 2012	Hernandez Gonzalo D., Plesec T.
39.	The accuracy of acetylcholinesterase reaction in rectal suction biopsy in the diagnosis of Hirschsprung's disease	J Bras Patol Med Lab. 2005. 41(6); 431-6.	Elizabeth S. Gugelmin; Luiz Fernando B. Torres
40.	A simplified approach to diagnostic rectal biopsy in infants and children	Am J Surg. 1977	Weintraub WH, Heidelberger KP, Coran AG.
41.	Hirschsprung's disease in the newborn	Journal of Pediatric Surgery. 1984	Klein MD, Coran AG, Wesley JR, Drongowski RA, Arbor A.
42.	Rectal biopsy findings in down syndrome patients with chronic constipation: Hirschsprung disease vs. non-hirschsprung disease.	Pediatric and Developmental Pathology. 2009	Yin H., Pacheco M.C., Boyd T., Bove K.E.
43.	Suction rectal biopsy in the diagnosis of Hirschsprung's disease and chronic constipation	Pediatric Surgery International. 1986	Polley Jr. T.Z., Coran A.G., Heidelberger K.P., Wesley J.R.
44.	Don't get misled by calretinin-immunoreactive mucosal nerves in suction rectal biopsies from patients with very short-segment Hirschsprung disease	Pediatric and Developmental Pathology. 2013	Kapur R.P

45.	The prevalence of hirschsprung's disease in premature infants and the role of suction rectal biopsy	Journal of Surgical Research. 2013	Pettiford J.P., Shah S.R., Thomas P., Sharp N., Juang D., St. Peter S.D., Ostlie D.J.
46.	Calretinin immunohistochemistry-A useful method in the evaluation of suboptimal rectal biopsies performed for hirschsprung's disease: An institutional experience	Pediatric and Developmental Pathology. 2011	Alexandrescu S., Al-Ibraheemi A., Rosenberg H., Tatevian N.
47.	Rectal suction biopsy in the diagnosis of Hirschsprung disease in infants	Arch Pathol Lab Med. 1976	Yunis EJ, Dibbins AW, Sherman FE.
48.	The determination of total cholinesterase in rectal biopsy tissue from patients with Hirschsprung's disease	S Afr Med J. 1980	de Wet PM, Boston VE, Rode H, Davies MR, Cywes S.
49.	Rectal myectomy in the management of short segment Hirschsprung's disease	Bol Asoc Med P R. 1988	Ortiz VN, Cebollero J.
50.	The contrast enema for Hirschsprung disease: predictors of a false-positive result	J Pediatr Surg. 2007	Diamond IR, Casadiego G, Traubici J, Langer JC, Wales PW.
51.	Does pre-biopsy contrast enema delay the diagnosis of long segment hirschsprung's disease?	European Journal of Pediatric Surgery. 2010	Chen J.Z., Jamieson D.H., Skarsgard E.D.
52.	Experience of acetylcholinesterase histochemistry application in the diagnosis of chronic constipation in children	Medicina (Kaunas). 2007	Bagdzevicius R, Vaicekaskas V, Bagdzeviciute S.
53.	Rectal suction biopsy to exclude the diagnosis of Hirschsprung disease	J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2012	Hayes CE, Kawatu D, Mangray S, LeLeiko NS.
54.	Intractable constipation with a decrease in substance P-immunoreactive fibres: Is it a variant of intestinal neuronal dysplasia?	Journal of Pediatric Surgery. 1996	Hutson J.M., Chow C.W., Borg J.
55.	Does calretinin immunohistochemistry reduce inconclusive diagnosis in rectal biopsies for hirschsprung disease?	J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2014	de Arruda Lourenção PL, Takegawa BK, Ortolan EV, Terra SA, Rodrigues MA.
56.	Is calretinin immunohistochemistry able to decrease the rate of inconclusive results of rectal suction biopsies in hirschsprung's disease?	Gastroenterology. 2013.	Lourencao P.L., Ortolan E.P., Takegawa B.K., Marques R.G., Terra S.A., Rodrigues M.A.M.
57.	Calretinin immunohistochemistry can reduce the rate of inconclusive diagnoses in rectal biopsies for hirschsprung's disease.	Laboratory Investigation. 2014.	Rodrigues M.A.M., Lourencao P.L.T.A., Terra S.A., Ortolan E.V.P., Takegawa B.K.
58.	Determination of acetylcholinesterase activity by aspiration rectal biopsy	Rev Chil Pediatr. 1982	Venegas G, Rudloff T, Reinecke K.
59.	Study of acetylcholinesterase activity in rectal suction biopsy for diagnosis of intestinal dysganglioneses: 17-year experience of a single center	Pediatr Surg Int. 2008	Santos MM, Tannuri U, Coelho MC.
60.	A useful panel for the diagnosis of Hirschsprung disease in rectal biopsies: calretinin immunostaining and acetylcholinesterase histochemistry	Ann Diagn Pathol. 2013	Lourenção PLA, Takegawa BK, Ortolan EV, Terra SA, Rodrigues MA.



61.	Evolution with age of the acetylcholinesterase activity in rectal suction biopsy in Hirschsprung's Disease	J Pediatr Surg. 1987	de Brito IA, Maksoud JG.
62.	Histochemical and immunohistochemical study of the intrinsic innervation in colonic dysganglionosis	Pediatr Surg Int. 2001	Nogueira A, Campos M, Soares-Oliveira M, Estevão-Costa J, Silva P, Carneiro F, Carvalho JL
63.	A 7-year study of the diagnostic value of rectal mucosal acetylcholinesterase measurement in Hirschsprung's disease	J Pediatr Surg. 1987	BonhamS JR, Dale G, Scott DJ, Wagget J.
64.	Rectal suction biopsy: can it be sufficient to diagnosis neuronal intestinal dysplasia?	Eur J Pediatr Surg. 1995	Schmittenebecher PP, Schmidt A, Meier-Ruge W, Wiebecke B.
65.	Wall or machine suction rectal biopsy for Hirschsprung's disease: a simple modified technique can improve the adequacy of biopsy	Pediatr Surg Int. 2006	Ali AE, Morecroft JA, Bowen JC, Bruce J, Morabito A.
66.	Muscularis mucosae of the rectum in children with Hirschsprung's disease and functional constipation.	Gastroenterology. 2009	Bekkali N.L., Tabbers M., Wilde J.C., Oomen M.W., Benninga M.A., Ten Kate F.J.
67.	Chronic idiopathic intestinal pseudoobstruction and Berdon syndrome: still a diagnostic and therapeutic challenge for the pediatric surgeon	Cir Pediatr. 2010	Andrés AM, Miguel M, De la Torre C, Barrena S, Ramírez M, Hernández F, Martínez L, Leal N, Ramos E, Prieto G, López Santamaría M, Tovar JA.
68.	Intestinal neuronal dysplasia: results of treatment in 33 patients	J Pediatr Surg. 2001	Gillick J, Tazawa H, Puri P.
69.	Histochemical staining of rectal suction biopsies as the first investigation in patients with chronic constipation	Pediatr Surg Int. 2008	Montedonico S, Piotrowska AP, Rolle U, Puri P.
70.	Rectal suction biopsy in the workup of childhood chronic constipation: indications and diagnostic value	Pediatr Surg Int. 2007	Pini-Prato A, Avanzini S, Gentilino V, Martucciello G, Mattioli G, Coccia C, Parodi S, Bisio GM, Jasonni V.
71.	Rectal suction biopsy in the diagnosis of intestinal dysganglionoses: 5-year experience with Solo-RBT in 389 patients	J Pediatr Surg. 2006	Pini-Prato A, Martucciello G, Jasonni V.
72.	Hirschsprung-neurointestinal dysplasia: differential diagnosis and reliability of diagnostic procedures	Cir Pediatr. 2006	Gil-Vernet JM, Broto J, Guillén G.
73.	The innervation of human bowel mucosa and its alterations in Hirschsprung's disease using a whole-mount preparation technique	Pediatr Surg Int. 2000	Nemeth L, Puri P.
74.	Role of fecal calprotectin in differentiating between Hirschsprung's disease and functional constipation	Korean J Gastroenterol. 2013	Mahjoub FE, Zahedi N, Ashjai B, Ashtiani MT, Farahmand F, Monajemzadeh M, Kashi L, Iranikhah H.
75.	Calretinin immunohistochemistry: a simple and efficient tool to diagnose Hirschsprung	Mod Pathol. 2009	Guinard-Samuel V1, Bonnard A, De Lagausie

	disease		P, Philippe-Chomette P, Alberti C, El Ghoneimi A, Peuchmaur M, Berrebi-Binczak D.
76.	Nerve growth factor receptor immunohistochemistry has a limited additional value to diagnose Hirschsprung's disease.	Pediatr Surg Int. 2011	Granström ALI, Orrego A, Svensson PJ, Almström M, Skikuniene J, Wester T.
77.	Neonatal functional intestinal obstruction and the presence of severely immature ganglion cells on rectal biopsy: 6 year experience	Pediatr Surg Int. 2011	Burki T, Kiho L, Scheimberg I, Phelps S, Misra D, Ward H, Colmenero I.
78.	Selective demonstration of mural nerves in ganglionic and aganglionic colon by immunohistochemistry for glucose transporter-1: Prominent extrinsic nerve pattern staining in Hirschsprung disease.	Archives of Pathology and Laboratory Medicine. 2000	Kakita Y., Oshiro K., O'Briain D.S., Puri P.
79.	Role of anorectal manometry in children with severe constipation.	Colorectal Disease. 2009	Noviello C., Cobellis G., Papparella A., Amici G., Martino A.
80.	An evaluation of the role of suction rectal biopsy in the diagnosis of intestinal neuronal dysplasia.	Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition. 1997	Cord-Udy C.L., Smith V.V., Ahmed S., Risdon R.A., Milla P.J.
81.	Nerve growth factor receptor staining of suction biopsies in the diagnosis of Hirschsprung's Disease	J Pediatr Surg. 1994	Kobayashi H, Hirakawa H, O'Briain DS, Puri P.
82.	What are the diagnostic criteria for intestinal neuronal dysplasia?	Pediatric Surgery International. 1995.	Kobayashi H., Hirakawa H., Puri P.
83.	Acetylcholinesterase activity in rectal biopsies: an assessment of its diagnostic value in Hirschsprung's disease	J Pediatr Gastroenterol Nutr. 1986	Wells FE, Addison GM.
84.	Clinical evaluation of the histochemical diagnosis of Hirschsprung's disease	Gut. 1985	Barr LC, Booth J, Filipe MI, Lawson JO.
85.	Histochemical criteria for the diagnosis of Hirschsprung's disease in rectal suction biopsies by acetylcholinesterase activity	J Pediatr Surg. 1978	Almoyna CM, Claver M, Monereo J, Contreras F.
86.	Intestinal neuronal dysplasia is a possible cause of persistent bowel symptoms after pull-through operation for Hirschsprung's disease	J Pediatr Surg. 1995	Kobayashi H, Hirakawa H, Surana R, O'Briain DS, Puri P.
87.	Experience with a cholinesterase histochemical technique for rectal suction biopsies in the diagnosis of Hirschsprung's disease	J Clin Pathol. 1974	Trigg PH, Belin R, Haberkorn S, Long WJ, Nixon HH, Plaschkes J, Spitz L, Willital GH.
88.	Acetylcholinesterase activity in suction biopsies of the rectum in the diagnosis of Hirschsprung's disease	J Pediatr Surg. 1972	Meier-Ruge W, Lutterbeck PM, Herzog B, Morger R, Moser R, Schärli A.
89.	Use of calretinin in the diagnosis of Hirschsprung's diseases in rectal suction biopsies. The experience of two centres	Pediatric and Developmental Pathology. 2012	Colmenero I., Kiho L., Casco F., Scheimberg I.
90.	Diagnosis of Hirschsprung's Disease: an	Colorectal Dis.	Noviello C., Cobellis G.,

	age-related approach in children below or above one year.	2010	Romano M., Amici G., Martino A.
91.	Hirschsprung's disease: an appraisal of histochemically demonstrated acetylcholinesterase activity in suction rectal biopsy specimens as an aid to diagnosis	Arch Pathol Lab Med. 1978	Lake BD, Puri P, Nixon HH, Claireaux AE.
92.	Results of a mechanical Duhamel pull-through for the treatment of Hirschsprung's disease and intestinal neuronal dysplasia	J Pediatr Surg. 2004	Mattioli G, Castagnetti M, Martucciello G, Jasonni V.
93.	Histochemical demonstration of acetylcholinesterase activity applied to the study of human biopsies. I. Rectal suction biopsy in the diagnosis of congenital megacolon	An Esp Pediatr. 1978	Segura DI, Montero C.
94.	Reliability of the acetylcholinesterase (ACE) reaction in rectal mucosal biopsies for the diagnosis of Hirschsprung's disease	Z Kinderchir. 1981	van der Staak FH.
95.	Solo-RBT: A new instrument for rectal suction biopsies in the diagnosis of Hirschsprung's disease	J Pediatr Surg. 2001	Pini Prato A, Martucciello G, Jasonni V.
96.	NADPH-diaphorase histochemical staining of suction rectal biopsies in the diagnosis of Hirschsprung's disease and allied disorders	Pediatr Surg Int. 1998	Miyazaki E, Ohshiro K, Puri P.
97.	Out with the old and in with the new: a comparison of rectal suction biopsies with traditional and modern biopsy forceps	J Pediatr Surg. 2008	Hall NJ, Kufeji D, Keshtgar A.
98.	Calretinin immunohistochemistry in Hirschsprung's disease: An adjunct to formalin-based diagnosis	Turk J Gastroenterol. 2012	Kaçar A, Arikök AT, Azili MN, Ekberli Ağırbaş G, Tiryaki T.
99.	Rectal biopsy for Hirschsprung's disease--are we performing too many?	Eur J Pediatr Surg. 2010	Rahman N, Chouhan J, Gould S, Joseph V, Grant H, Hitchcock R, Johnson P, Lakhoo K.
100.	Associated anomalies in intestinal neuronal dysplasia	Journal of Pediatric Surgery. 2002	Martucciello G., Torre M., Prato A.P., Lerone M., Campus R., Leggio S., Jasonni V.
101.	Diagnosis of Hirschsprung's disease: A prospective, comparative accuracy study of common tests.	Journal of Pediatrics. 2005	De Lorijn F., Reitsma J.B., Voskuil W.P., Aronson D.C., Ten Kate F.J., Smets A.M.J.B., Taminiu J.A.J.M., Benninga M.A.
102.	Anorectal manometry in the neonatal diagnosis of Hirschsprung's disease.	Cirugia pediátrica : organo oficial de la Sociedad Espanola de Cirugia Pediátrica. 2010	Enriquez Zarabozo E., Nunez Nunez R., Ayuso Velasco R., Vargas Munoz I., Fernandez de Mera J.J., Blesa Sanchez E.
103.	Suction biopsy in Hirschsprung's disease.	Archives of Disease in Childhood. 1986	Kurer M.H.J., Lawson J.O.N., Pambakian H.

104.	Diagnosis of allied functional bowel disorders using monoclonal antibodies and electronmicroscopy.	Journal of Pediatric Surgery. 1988	Puri P., Fujimoto T.
105.	Rectal biopsy in the investigation of constipation	Arch Dis Child. 1998	Ghosh A, Griffiths DM.
106.	Visceral neuropathies responsible for chronic intestinal pseudo-obstruction syndrome in pediatric practice: analysis of 26 cases.	J Pediatr Gastroenterol Nutr. 1990	Navarro J, Sonsino E, Boige N, Nabarra B, Ferkadji L, Mashako LM, Cezard JP.
107.	Problems and advantages of acetylcholinesterase histochemistry of rectal suction biopsies in the diagnosis of Hirschsprung's disease	J Pediatr Surg. 1990	Athow AC, Filipe MI, Drake DP.
108.	Audity of adequacy of rectal suction biopsies using a new rectal biopsy gun.	The online journal of clinical audits. 2011; Vol 3(2).	Skerrit C, Rees C, Lakhoo K
109.	A new rapid acetylcholinesterase staining kit for diagnosing Hirschsprung's disease	Pediatr Surg Int. 2007	Kobayashi H, Miyahara K, Kusafuka J, Yamataka A, Lane GJ, Sueyoshi N, Miyano T, Puri P.
110.	Diagnosis and surgical treatment of isolated hypoganglionosis	World J Pediatr. 2008	Zhang HY, Feng JX, Huang L, Wang G, Wei MF, Weng YZ.
111.	Preliminary evaluation of anorectal manometry in diagnosing Hirschsprung's disease in neonates	Pediatr Surg Int. 2009	Huang Y, Zheng S, Xiao X.
112.	Anorectal manometry in children with evacuation disturbances.	GED - Gastreterologia Endoscopia Digestiva. 2004	Bigelli R.H.M., Fernandes M.I.M., Dantas R.O., Vicente Y.A.M.V.A., Galvao L.C
113.	Hirschsprung's disease: Role of rectal suction biopsy - data on 216 specimens	J Indian Assoc Pediatr Surg. 2010	Rahman Z, Hannan J, Islam S.
114.	A new diagnostic scoring system to differentiate Hirschsprung's disease from Hirschsprung's disease-allied disorders in patients with suspected intestinal dysganglionosis	Int J Colorectal Dis. 2013	Wu XJ, Zhang HY, Li N, Yan MS, Wei J, Yu DH, Feng JX.
115.	Laparoscopy-assisted transanal pull-through at the time of suction rectal biopsy: a new approach to treating selected cases of Hirschsprung disease.	Journal of Pediatric Surgery. 2006	Yamataka A., Kobayashi H., Hirai S., Koga H., Miyano G., Lane G.J., Okazaki T.
116.	Is acetylcholinesterase activity in neorectum after laparoscopic endorectal pull-through method for Hirschsprung's disease a primary or a secondary condition?	Journal of Medical Investigation. 2006	Takehara H., Ishibashi H., Yoshikawa K., Shimada M.
117.	Acetylcholinesterase histochemistry of rectal suction biopsies in the diagnosis of Hirschsprung's disease	J Korean Med Sci. 1992	Park WH, Choi SO, Kwon KY, Chang ES.
118.	Role of erythrocyte acetylcholinesterase in the diagnosis of Hirschsprung's disease.	Journal of Pakistan Medical Students. 2013.	Chalkoo M.A., Rashid A., Kakroo S.M., Razvi S.A., Wani A.A., Wani M.Y.

119.	Histologic studies of rectocolic aganglionosis and allied diseases	J Pediatr Surg. 1978	Munakata K, Okabe I, Morita K.
120.	Clinical characteristics and management of benign transient non-organic ileus of neonates: a single-center experience	Yonsei Med J. 2014	Chang HK, Koh H, Hong YJ, Chang EY, Han SJ, Oh JT.
121.	Histochemical confirmation of the acetylcholinesterase-activity in rectal suction biopsy from neonates with Hirschsprung's disease	Z Kinderchir. 1984	Goto S, Ikeda K, Toyohara T.
122.	Anorectal electromanometrical patterns in children with isolated neuronal intestinal dysplasia	Eur J Pediatr Surg. 2008	Guo X, Feng J, Wang G.
123.	Calretinin and microtubule-associated protein-2 (MAP-2) immunohistochemistry in the diagnosis of Hirschsprung's disease	J Pediatr Surg. 2013	Yang WI, Oh JT.
124.	Inflammatory changes secondary to postoperative complications of Hirschsprung's disease as a cause of histopathologic changes typical of intestinal neuronal dysplasia	J Pediatr Surg. 2004	Kobayashi H, Yamataka A, Lane GJ, Miyano T.
125.	Laparoscopic extensive colectomy with transanal Soave pull-through for intestinal neuronal dysplasia in 17 children	World J Pediatr. 2010	Tang ST, Yang Y, Wang GB, Tong QS, Mao YZ, Wang Y, Li SW, Ruan QL.
126.	The constipated child: how likely is Hirschsprung's disease?	Pediatr Surg Int. 2003	Khan AR, Vujanic GM, Huddart S.
127.	A new instrument for rectal suction biopsy in the diagnosis of Hirschsprung's disease	Pediatr Surg Int. 1997	Freeman JK.
128.	Experience with rectal suction biopsy in the diagnosis of Hirschsprung's disease	J Pediatr Surg. 1969	Campbell PE, Noblett HR.
129.	Short segment Hirschsprung's disease as a cause of discrepancy between histologic, histochemical, and clinical features.	J Pediatr Surg. 1983	Chow CW, Campbell PE.
130.	Histochemical criteria for the diagnosis of Hirschsprung's disease in rectal suction biopsies by acetylcholinesterase activity	J Pediatr Surg. 1977	Chow CW, Chan WC, Yue PC.
131.	A rectal suction biopsy tube for use in the diagnosis of Hirschsprung's disease	J Pediatr Surg. 1969	Noblett HR.
132.	Histochemical diagnosis of Hirschsprung's disease	Lancet. 1969	Gannon BJ, Burnstock G, Noblett HR, Campbell PE.
133.	Long-term clinical, manometric, and histological evaluation of obstructive symptoms in the postoperative Hirschsprung's patient	J Pediatr Surg. 1994	Moore SW, Millar AJ, Cywes S.
134.	Is neuronal intestinal dysplasia (NID) a primary disease or a secondary phenomenon?	Eur J Pediatr Surg. 1993	Sacher P, Briner J, Hanimann B.
135.	Aganglionosis and related disorders	Hum Pathol. 1994	Qualman SJ, Murray R.
136.	Congenital aganglionic megacolon (Hirschsprung's disease). Diagnosis, management, and complications	Arch Surg. 1968	Soper RT, Miller FE.
137.	Total colonic aganglionosis. Analysis of 16	Am J Surg. 1982	Careskey JM, Weber

	cases		TR, Grosfeld JL.
138.	Role of anorectal manometry in the differential diagnosis of chronic constipation in children	J Pediatr (Rio J). 2000	Bustorff-Silva JM, Costa-Pinto EA, Fukushima E.
139.	Clinical aspects of intestinal neuronal dysplasia	J Pediatr Surg. 2002	Montedonico S, Acevedo S, Fadda B
140.	Histochemical staining for intestinal dysganglionosis: over 30 years experience with more than 1,500 biopsies	Pediatr Surg Int. 2011	Montedonico S, Cáceres P, Muñoz N, Yáñez H, Ramírez R, Fadda B.
141.	Retrospective study of 53 children with Hirschsprung's disease: Clinical and laboratorial findings.	Medicina. 2002	Bigelli R.H.M., Fernandes M.I.M., Galvao L.C., Sawamura R
142.	Hirschsprung disease in the older child: diagnostic strategies	Clin Pediatr (Phila). 2012	Maerzheuser S, Bassir C, Rothe K
143.	Histology of the myenteric plexus in relation to rectal biopsy in congenital megacolon.	J Pediatr Surg. 1967	Hofmann S, Orestano F.
144.	Anorectal manometry with reference to operative rectal biopsy for the diagnosis/exclusion of Hirschsprung's disease in children under 1 year of age.	International Journal of Colorectal Disease. 2009	Jarvi K., Koivusalo A., Rintala R.J., Pakarinen M.P.
145.	Application of acetylcholinesterase histochemistry for the diagnosis of Hirschsprung's disease in neonates and infants: a twenty-year experience	Medicina (Kaunas). 2011	Bagdzevičius R, Gelman S, Gukauskienė L, Vaičekauskas V.
146.	Role of rectal biopsy in predicting response to intrasphincteric botulinum toxin injection for obstructive symptoms after a pullthrough operation	Indian J Gastroenterol. 2008	Hosseini SM, Foroutan HR, Bahador A, Khosravi MB, Geramizadeh B, Sabet B, Zeraatian S, Razmi T, Banani SJ.
147.	Diagnostic scoring system of Hirschsprung's disease in the neonatal period	Asian J Surg. 2006	Guo W, Zhang Q, Chen Y, Hou D
148.	Application of a plain abdominal radiograph transition zone (PARTZ) in Hirschsprung's disease	BMC Pediatr. 2007	Pratap A, Gupta DK, Tiwari A, Sinha AK, Bhatta N, Singh SN, Agrawal CS, Kumar A, Adhikary S.
149.	Can We Rely on Frozen Sections of a Rectal Biopsy for One-stage Trans-anal Pull-through Operation in Hirschsprung's Disease?	Iran J Pediatr. 2011	Rouzrokh M, Jadali F, Gharib A, Khaleghnejad-Tabari A, Tavassoli A, Mohajezadeh L.
150.	Necrotizing enterocolitis in full-term neonates: Is it aganglionosis?	European Journal of Pediatric Surgery. 2009	Raboeuf E.H.
151.	Full-thickness rectal punch biopsy for the diagnosis of Hirschsprung's disease	J Pediatr Surg. 1979	Kadowaki H, Kitano F, Takeuchi S, Tamate S.

**Appendix 3.** Characteristics of endoscopic biopsies of the included studies.

	References	Absolut number per respective included study	Total number of included studies	
<b>Total case series</b>	52, 145	Not applied	2	
<b>Number of patients per included study</b>	52, 145	40, 85	2	
<b>Mean Age</b>	--	--	--	
<b>World Region</b>	North America	Not applied	0	
	Central and South America	Not applied	0	
	Europe	52, 145	Not applied	2
	Asian/Japan	--	Not applied	0
	Australia and New Zealand	--	Not applied	0
	Africa	--	Not applied	0
<b>Number of rectal biopsies per included study</b>	52, 145	120, 170	2	
<b>Number of rectal biopsies per patient</b>	1-3	52, 145	Not applied	0
	4-6	--	Not applied	0
	7-10	--	Not applied	0
	>10	--	Not applied	0
<b>Subtype of rectal biopsy</b>	Jumbo	--	Not applied	0
	Other	52, 145	Not applied	2
<b>Distance from anal verge</b>	0-3cm	145	Not applied	1
	4-6cm	52, 145	Not applied	2
	7-10cm	52	Not applied	1
	>10cm	--	Not applied	0
<b>Type of Histopathologica I analysis</b>	HE	--	Not applied	0
	Ache	52, 145	Not applied	2
	HE + Ache	--	Not applied	0
	HE + Ache + Calretinin	--	Not applied	0
	HE + Calretinin	--	Not applied	0
	Others	--	Not applied	0

-- not reported

**Appendix 4.** Characteristics of open biopsies of the included studies.

		References	Absolut number per respective included study	Total number of included studies
<b>Total case series</b>		4, 5, 7, 15, 20, 21, 33, 50, 52, 54, 56, 60, 62, 64, 74, 98-107, 112, 118, 126, 135-151	Not applied	45
<b>Number of patients per included study</b>		4, 5, 7, 20, 21, 50, 52, 54, 56, 60, 62, 64, 74, 98-104, 106, 107, 112, 118, 126, 135-139, 141-151	68, 24, 8, 28, 29, 19, 85, 15, 6, 6, 17, 10, 76, 23, 397, 41, 32, 13, 72, 19, 26, 49, 30, 78, 30, 30, 22, 11, 13, 651, 53, 10, 25, 81, 40, 16, 74, 27, 210, 8, 48	41
<b>Mean Age (months)</b>		7, 56, 98, 107, 118, 126, 135, 140, 146, 149	43.2, 35, 29, 29.16, 42.12, 34.8, 40.8, 60, 64.8, 3.6	10
<b>World Region</b>	North America	15, 20, 21, 50, 135-137	Not Applied	7
	Central and South America	56, 60, 112, 138-141	Not Applied	7
	Europe	4, 5, 7, 52, 62, 64, 99-107, 142-145	Not Applied	19
	Asian/Japan	33, 74, 98, 118, 126, 146-151	Not Applied	11
	Australia and New Zeland	54	Not Applied	1
	Africa	--	--	0
<b>Number of rectal biopsies per included study</b>		4, 7, 15, 21, 33, 52, 56, 60, 62, 64, 98, 99, 101-105, 107, 126, 118, 138, 140, 142, 145-151	136, 8, 30, 29, 54, 85, 6, 12, 51, 20, 28, 397, 32, 13, 72, 19, 100, 49, 78, 30, 13, 946, 30, 40, 16, 74, 27, 210, 8, 48	30
<b>Number of rectal biopsies per patient</b>	1-3	4, 7, 21, 52, 56, 60, 62, 64, 99, 101-104, 107, 118, 126, 138, 142, 145-151	Not Applied	25
	4-6	--	Not Applied	0
	7-10	--	Not Applied	0
	>10	--	Not Applied	0
<b>Subtype of rectal biopsy</b>	Full Thickness	4, 7, 15, 20, 21, 33, 50, 52, 54, 56, 60, 62, 64, 74, 98, 100-107, 112, 118, 126, 135-138, 140-144, 146-148, 150-151	Not Applied	40
	Superficial	145	Not Applied	1
<b>Distance from anal verge</b>	0-3cm	5, 52, 60, 62, 64, 74, 101, 105, 118, 138-140, 142, 144, 145, 148, 149, 151, 151	Not Applied	18
	4-6cm	5, 62, 64, 142	Not Applied	4



	7-10cm	5, 62	Not Applied	2
	>10cm	5	Not Applied	1
<b>Type of Histopathologic al analysis</b>	HE	101, 105, 118, 126, 138, 149, 151, 151	Not Applied	7
	Ache	4, 52, 142, 145, 146	Not Applied	5
	HE + Ache	7, 15, 20, 21, 99, 103, 107, 148, 150	Not Applied	9
	HE + Ache + Calretinin	56, 60	Not Applied	2
	HE + Calretinin	98	Not Applied	1
	Others	5, 33, 54, 62, 64, 74, 100, 104, 106, 135, 139, 140, 147	Not Applied	11
<b>Conclusive results</b>		52, 64, 98, 102, 103, 105, 107, 126, 140, 141, 144, 145, 149, 151	100%, 85%, 100%, 100%, 100%, 86%, 94%, 97%, 72.3%, 100%, 100%, 100%, 96.7%, 93.75%	14
<b>Complication</b>		5, 20, 64, 102, 105, 140, 144, 145, 151	0, 0, 0, 0, 0, 0.1%, 1.23%, 0, 0	9

--not reported

**Appendix 5.** Characteristics of punch biopsies of the included studies.

	References	Absolut number per respective included study	Total number of included studies
<b>Total case series</b>	1-5, 7-11, 13-19	Not applied	17
<b>Number of patients per included study</b>	1- 5, 7-11, 13, 14, 16-19	124, 360, 152, 68, 24, 102, 112, 19, 27, 40, 101, 32, 17, 170, 28, 91	16
<b>Mean Age (months)</b>	3, 7, 11, 13	79.2, 62.3, 8.5, 51.6	4
<b>World Region</b>	North America	1-3, 15	Not applied
	Central and South America	--	Not applied
	Europe	4, 5, 7-11, 13	Not applied
	Asian/Japan	14, 16-19	Not applied
	Australia and New Zeland	--	Not applied
	Africa	--	Not applied
<b>Number of rectal biopsies per included study</b>	1-4, 8, 9, 11, 13, 14, 15, 18, 19	217, 387, 152, 136, 234, 38, 40, 101, 32, 43, 56, 71	12
<b>Number of rectal biopsies per patient</b>	1-3	3, 4, 9, 11, 13, 14, 18	Not applied
	4-6	--	Not applied
	7-10	--	Not applied
	>10	--	Not applied
<b>Subtype of rectal biopsy</b>	Cup biopsy	4, 7, 10, 15	Not applied
	Nasal fórceps	--	Not applied
	Other	1-3, 5, 8, 9, 11, 13, 16-18	Not applied
<b>Distance from anal verge</b>	0-3cm	1-5, 7-9, 13, 15, 16, 18, 19	Not applied
	4-6cm	4, 5, 7, 16, 18	Not applied
	7-10cm	5, 16	Not applied
	>10cm	5, 16	Not applied
<b>Type of Histopathological analysis</b>	HE	2, 3, 8, 13	Not applied
	Ache	4, 16, 18, 19	Not applied
	HE + Ache	1, 7, 9, 11, 15	Not applied
	HE + Ache + Calretinin	--	Not applied
	HE + Calretinin	--	Not applied
	Others	5, 14, 17	Not applied
<b>Conclusive</b>	2, 3, 7-9, 11, 14, 17	97.42%, 95.39%, 96%, 89.32%, 79%, 100%, 100%, 88.9%	8
<b>Complication</b>	2, 3, 5, 7, 8, 11, 17	5%, 0.66%, 0, 0.98%, 3.57%, 0, 0.59%	7

-- not reported

	References	Absolut number per respective included study	Total number of included studies	
<b>Total case series</b>	3-7, 11, 12, 19-32, 34-51, 53, 53, 55-61, 63, 64, 64-73, 75-97, 97, 99, 100, 100-111, 113-117, 119-128, 128-134	Not applied	120	
<b>Number of patients per included study</b>	3-7, 11, 12, 19-21, 23-32, 34-45, 47-51, 53, 53, 55-61, 63, 64, 64, 65, 67-73, 75-87, 89-97, 97, 99, 100, 100-104, 106-111, 113-117, 119-126, 128, 128-134	152, 68, 60, 24, 148, 33, 69, 17, 30, 43, 32, 10, 168, 96, 102, 455, 31, 456, 17, 151, 444, 6, 70, 23, 15, 68, 71, 23, 27, 293, 18, 269, 40, 52, 11, 110, 29, 41, 40, 41, 41, 41, 34, 297, 37, 230, 211, 52, 10, 95, 16, 418, 766, 429, 389, 52, 8, 131, 39, 46, 20, 17, 548, 60, 9, 392, 101, 237, 24, 101, 84, 49, 168, 56, 41, 117, 62, 80, 62, 40, 253, 95, 95, 111, 7, 72, 19, 15, 108, 38, 20, 34, 52, 216, 967, 7, 11, 37, 30, 14, 23, 214, 22, 7, 17, 104, 40, 45, 328, 96, 45, 26, 16, 10	114	
<b>Mean Age (months)</b>	3, 5, 7, 11, 24, 42, 43, 53, 53, 60, 69, 71, 75, 76, 97, 97, 107, 123, 125, 126	79.2, 25.2, 20.8, 13, 27.5, 16.8, 14.4, 40, 40, 35, 42.6, 48, 15.6, 0.7, 0.5, 0.7, 29.2, 2.9, 70, 34.8	20	
<b>World Region</b>	North America	3, 20-24, 26-32, 34-38, 40-51, 53, 53, 108	Not applied	33
	Central and South America	39, 55-61	Not applied	8
	Europe	4, 5, 7, 11, 25, 63, 64, 64-73, 75-97, 97, 99, 100, 100-107, 134	Not applied	52
	Asian/Japan	12, 19, 109-111, 113-117, 119-126	Not applied	18
	Australia and New Zeland	6, 127, 128, 128-132	Not applied	8
	Africa	133	Not applied	1

		3, 4, 6, 7, 11, 12, 19, 20- 22, 25, 27, 28, 30-32, 34, 35, 37, 40, 43, 46-48, 51, 53, 55, 57-61, 63, 64, 64-66, 68-71, 75-77, 79-81, 85, 87, 88, 90, 91, 93-97, 97, 99-111, 113, 114, 117, 119-121, 123, 126-128, 128, 131, 132	152, 136, 72, 168, 33, 69, 17, 71, 43, 19, 458, 107, 497, 496, 17, 247, 888, 18, 23, 71, 293, 28, 47, 104, 29, 46, 42, 87, 68, 297, 74, 311, 211, 195, 13, 103, 75, 1254, 2298, 1118, 1012, 131, 39, 46, 51, 1096, 180, 532, 160, 214, 147, 458, 41, 144, 189, 240, 153, 85, 253, 190, 444, 21, 288, 19, 74, 15, 222, 40, 20, 68, 52, 216, 967, 76, 60, 14, 23, 65, 355, 180, 52, 116, 116, 50	84
<b>Number of rectal biopsies per included study</b>	1-3	3, 4, 6, 11, 12, 19, 21, 31, 34, 35, 37, 40, 43, 48, 51, 58-60, 63, 68, 69, 75-77, 79-81, 90, 93, 96, 99, 100, 102-104, 106, 109-111, 113, 114, 119-121	Not applied	44
	4-6	101, 108	Not applied	2
	7-10	--	Not applied	--
	>10	--	Not applied	--
<b>Subtype of rectal biopsy</b>	Noblett	7, 11, 25, 39, 48, 55, 56, 59-61, 63, 64, 65, 79, 83, 87, 91, 94, 97, 99, 102, 105-107, 126, 128, 129, 131, 132	Not applied	29
	Rbi2	97, 108	Not applied	2
	SoloRBT	70, 71, 95	Not applied	3
	Multipurpose Quinton	20, 34, 40, 43, 53, 103, 117, 128	Not applied	8
	SBT 100	3, 45, 53	Not applied	3
	Others	6, 35, 58, 88, 93, 121, 127	Not applied	7
<b>Distance from anal verge</b>	0-3cm	3-5, 7, 19, 20, 25, 34, 35, 39, 40, 43-45, 53, 53, 55, 59-61, 65, 68, 79, 81, 87, 90, 91, 96, 101-103, 105, 107, 110, 111, 119, 121, 124, 126, 130, 133	Not applied	41
	4-6cm	4, 5, 7, 25, 35, 39, 53, 53, 58, 68, 81, 91, 96, 101-103, 110, 126, 130, 133	Not applied	20
	7-10cm	5, 6, 68, 96	Not applied	4
	>10cm	5	Not applied	1
<b>Type of Histopathologic al analysis</b>	HE	3, 6, 34, 35, 40, 43, 47, 53, 53, 77, 105, 111, 113, 128, 128	Not applied	15
	Ache	4, 12, 19, 27, 59, 61, 63, 66, 84, 109, 110, 114, 116, 121, 122	Not applied	15

HE + Ache	7, 11, 20, 21, 25, 26, 28, 30, 39, 48, 58, 65, 68, 72, 79, 80, 82, 83, 86-88, 90, 91, 93, 99-101, 103, 107, 115, 117, 119, 124-126, 129, 130, 133	Not applied	38
HE + Ache + Calretinin	23, 29, 42, 55-57, 60, 89	Not applied	8
HE + Calretinin	31, 37, 38, 44, 46	Not applied	5
Others	5, 22, 24, 32, 36, 64, 64, 69-71, 73, 75, 76, 78, 81, 85, 92, 94-96, 100, 104, 106, 123, 132	Not applied	25
<b>Conclusive</b>	3, 6, 7, 11, 12, 20, 23, 26, 27, 31, 32, 34, 37, 39, 40, 47, 53, 53, 55, 56, 57, 59, 64, 64-66, 69, 70, 71, 72, 76, 77, 80, 86-88, 90, 91, 95, 97, 97, 101-103, 105, 107, 108, 113, 115, 120, 121, 123, 124, 126, 128, 128, 131	57.24%, 87.5%, 87%, 100%, 95%, 95.72%, 93.75%, 81%, 94.12%, 100%, 98.79%, 96.62%, 89.3%, 97.1%, 87.33%, 83%, 76%, 76%, 88.1%, 88.1%, 94.25%, 94.28%, 65.1%, 92.3%, 81.02%, 80%, 85.5%, 85.3%, 85.35%, 69.3%, 77%, 91.3%, 61%, 100%, 76.25%, 84.2%, 93.9%, 63%, 100%, 93%, 80%, 98.2%, 100%, 98.62%, 65%, 72%, 95%, 96.3%, 100%, 100%, 86.96%, 80%, 100%, 79%, 63.5%, 100%, 100%	57
<b>Complication</b>	3, 6, 7, 11, 34, 40, 41, 43, 45, 53, 53, 55, 57, 59, 64, 64, 65, 69, 71, 79, 90, 95, 97, 97, 101, 102, 105, 113, 114, 127, 128, 128, 131	0.66%, 0, 2.7%, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 2.5%, 0, 0, 0.33%, 0, 0, 0, 0.4%, 0.5%, 0, 0, 1.61%, 0, 0, 0.9%, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0	33

-- not reported

**Appenadix 6.** Characteristics of suction biopsies of the included studies