

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta
tese será disponibilizado
somente a partir de 04/10/2026.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Medicina de Botucatu

Laura Cantisano de Deus Silva

**Qual a melhor técnica para diagnóstico
histopatológico de disganglioneoses intestinais:
evidências de estudo experimental controlado
em animais.**

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

Orientador: Prof. Ass. Pedro Luiz Toledo de Arruda Lourenção

Co-Orientadora: Profa. Dra. Giovana Tuccille Comes Brambilla

Botucatu
2024

Laura Cantisano de Deus Silva

**Qual a melhor técnica para diagnóstico
histopatológico de disganglionoses
intestinais: evidências de estudo
experimental controlado em animais.**

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

Orientador: Prof. Ass. Pedro Luiz Toledo de Arruda Lourenção

Co-Orientadora: Profa. Dra. Giovana Tuccille Comes Brambilla

Botucatu
2024

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

Silva, Laura Cantisano de Deus.

Qual a melhor técnica para diagnóstico histopatológico de disganglioneoses intestinais: evidências de estudo experimental controlado em animais / Laura Cantisano de Deus Silva. - Botucatu, 2024

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina, Botucatu

Orientador: Pedro Luiz Toledo de Arruda Lourenção

Coorientador: Giovana Tuccille Comes Brambilla

Capes: 40102076

1. Intestinos - Biópsia. 2. Hirschsprung, Doença de. 3. Ensaio clínico. 4. Técnicas operatórias.

Palavras-chave: Biópsia retal; Disganglioneoses intestinais; Doença de Hirschsprung; Experimental; Técnicas de biópsia.

REGISTRO DO IMPACTO ESPERADO NA SOCIEDADE

Discente: Laura Cantisano de Deus Silva

Orientador: Prof. Ass. Pedro Luiz Toledo de Arruda Lourenção

Co-Orientador: Profa. Dra Giovana Tuccille Comes Brambilla

A tese **Qual a melhor técnica para diagnóstico histopatológico de disganglionoses intestinais: evidências de estudo experimental controlado em animais**, visou identificar, por meio de modelo experimental, qual das técnicas de biópsias de reto é capaz de fornecer maior índice de amostras adequadas para análise histopatológica dos plexos nervosos da submucosa, com menor índice de complicações e que apresente menor inflamação e/ou fibrose quando avaliadas após 15 dias dos procedimentos. O modelo experimental, além de um desafio, é uma grande fortaleza do estudo, que pode ser definitivo para próximos estudos em modelo humano e mudar os paradigmas do diagnóstico da Doença de Hirshprung nas crianças. O modelo sucção demonstrou-se factível para o diagnóstico de disganglionoses intestinais visto que com menor tempo, apresentou biopsias com plexo presente e menores taxas de inflamação e fibrose. É uma técnica minimamente invasiva e eficiente. Assim, com o resultado deste trabalho, temos um impacto tanto científico quanto social para o diagnóstico de disganglionoses nas crianças, mudando os paradigmas no conhecimento e técnica na área de Cirurgia Pediátrica.

RECORD OF THE EXPECTED IMPACT ON SOCIETY

Student: Laura Cantisano de Deus Silva

Advisor: Prof. Ass. Pedro Luiz Toledo de Arruda Lourenção

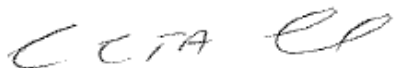
Co-Advisor: Prof. Dr. Giovana Tuccille Comes Brambilla

The thesis **What is the best technique for histopathological diagnosis of intestinal dysganglionoses: evidence from a controlled experimental study in animals**, aimed to identify, through an experimental model, which of the rectal biopsy techniques is capable of providing a higher rate of suitable samples for histopathological analysis of the submucosal nerve plexuses, with a lower rate of complications and that presents less inflammation and/or fibrosis when evaluated 15 days after the procedures. The experimental model, in addition to being a challenge, is a great strength of the study, which may be definitive for future studies in human models and change the paradigms of the diagnosis of Hirschprung's Disease in children. The suction model proved to be feasible for the diagnosis of intestinal dysganglionoses, since it produced biopsies with the plexus present and lower rates of inflammation and fibrosis in a shorter time. It is a minimally invasive and efficient technique. Thus, with the results of this work, we have both a scientific and social impact on the diagnosis of dysganglionoses in children, changing the paradigms in knowledge and technique in Pediatric Surgery.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE LAURA CANTISANO DE DEUS SILVA, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA E MEDICINA TRANSLACIONAL, DA FACULDADE DE MEDICINA - CÂMPUS DE BOTUCATU.

Aos 04 dias do mês de outubro do ano de 2024, às 14:00 horas, no(a) Sala da Congregação do Prédio da Administração - FM/Botucatu - Unesp, realizou-se a defesa de TESE DE DOUTORADO de LAURA CANTISANO DE DEUS SILVA, intitulada **Estudo experimental das diferentes técnicas de biópsia retal para diagnóstico de disganglionoses intestinais**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. PEDRO LUIZ TOLEDO DE ARRUDA LOURENÇÃO (Orientador(a) - Participação Presencial) do(a) Depto. de Cirurgia e Ortopedia / FM/Botucatu - Unesp, Prof. Dr. ANDERSON CESAR GONÇALVES (Participação Virtual) do(a) Centro Universitário de Votuporanga - UNIFEV, Prof. Dr. RODRIGO CORSATO SCOMPARIN (Participação Presencial) do(a) Paraná/PR. Após a exposição pela doutoranda e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, a discente recebeu o conceito final: APROVADA. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Prof. Dr. PEDRO LUIZ TOLEDO DE ARRUDA LOURENÇÃO



Agradecimentos

A Deus pela minha vida, após superar uma Trombose Venosa Profunda cerebral em meio a uma Pandemia Mundial, que, apesar das dificuldades, me permitiu aprender tantas coisas e concluir este trabalho.

À minha Família, que sempre compreendeu os momentos ausentes para concluir mais este sonho em minha vida. Ao amor incondicional e apoio sempre, sem vocês eu não conseguiria.

Ao meu Orientador, Prof. Ass. Pedro Luiz Toledo de Arruda Lourenção, que esteve comigo em todas as dificuldades encontradas pelo caminho, desde a residência médica, passando pelo mestrado, sempre trazendo uma inspiração gigantesca com seu amor à pesquisa científica. Se não fosse por seu exemplo de dedicação e empenho, e por acreditar tanto em mim, eu não teria conseguido concluir este trabalho. Obrigada pelo incentivo sempre, e por acreditar mais em mim do que eu mesma.

À Coorientadora Profa. Dra. Giovana Tuccille Comes Brambilla, antes, parceira de residência médica, agora contribuindo a conclusão deste trabalho com tanto empenho mesmo durante sua gestação e licença maternidade. Sempre uma inspiração quanto ao cuidado dos pacientes pediátricos e a sua constante busca pela excelência. Obrigada por abraçar este trabalho com tanto carinho e dedicação.

À Profa. Ass. Erika Veruska Paiva Ortolan, primeiramente pelo auxílio neste trabalho, desde a sua elaboração, e por contribuir com seu empenho para conseguirmos a pinça jumbo de biópsia, essencial para o processo experimental deste trabalho. E como inspiração como cirurgiã pediátrica e gestora que é.

Ao Dr. Diego Generoso, médico veterinário responsável por cuidar tão bem de todos os processos experimentais que compuseram este trabalho. Pelo empenho e parceria de trabalho inigualáveis, além de sua competência técnica e apoio nas dificuldades encontradas no processo.

Ao aluno de iniciação científica com bolsa FAPESP 2022/00553-9 Reinaldo Cesar Silveira Filho, que contribuiu com o trabalho, com seu entusiasmo e dedicação. E em toda etapa experimental, por seu empenho e participação.

À Dra. Simone Terra, patologista responsável pela análise histopatológica das peças.

À Enf. Tatiane Santa Rosa, pela contribuição na busca dos materiais de endoscopia.

Aos Funcionários do Departamento de Patologia pelo empenho e competência no processamento técnico das biópsias retais.

Aos Funcionários do Laboratório UNIPEX, pelo auxílio com toda a etapa experimental deste trabalho.

Ao Sr. Douglas de Jesus J. P. pela diagramação desse trabalho.

Aos professores que participaram das Bancas de Acompanhamento e Banca de Qualificação (Profa. Dra. Juliana Tedesco, Dr. Talles Bezerra, Profa. Ass. Erika Ortolan), que contribuíram com vários detalhes para a conclusão desta de Tese.

A todos os meus amigos, professores, pacientes e colegas de trabalho que estiveram comigo ao longo da minha caminhada em Barretos, Ribeirão Preto, Marília, Botucatu, Assis, e agora, Ji-paraná.

À Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, por toda estrutura e apoio à pesquisa.

Resumo

Introdução: já está bem estabelecido que o uso de biópsia retal para o diagnóstico das disganglioneoses intestinais em crianças, é o padrão ouro para definir o diagnóstico de doença de Hirshsprung. Contudo, até o momento, não há um consenso sobre qual a melhor técnica de obtenção dessas amostras. Vários métodos diferentes continuam sendo utilizados em todo o mundo com resultados heterogêneos. A escolha destes métodos parece depender muito mais da preferência e da experiência de cada serviço do que de evidências científicas. Em recente revisão sistemática, não foram encontrados ensaios clínicos randomizados que realizassem a comparação entre os resultados obtidos através das diferentes técnicas de biopsias retais e que permitissem uma análise com evidências robustas.

Objetivo: identificar qual é a melhor técnica de biópsia de reto para análise histopatológica dos plexos nervosos da submucosa, com maior taxa de biopsias adequadas, menor reação tecidual e complicações; e que apresente menor inflamação e/ou fibrose quando avaliadas após 14 dias dos procedimentos.

Metodologia: modelo experimental em 28 coelhos, fêmeas, envolvendo a realização de quatro tipos diferentes de procedimentos para realização de biópsia retal. Os animais foram, primeiramente, randomizados por sorteio, divididos em 4 grupos experimentais (Grupo Cirúrgica – biópsia cirúrgica aberta, Grupo Punch – biópsia por “punch”, Grupo Endoscopia - biópsia endoscópica e Grupo Sucção – biópsia de sucção) e 1 grupo controle simulado (Grupo Sham). As amostras da parede do reto foram colhidas e processadas pelo método da Hematoxilina & Eosina para avaliação da presença e característica dos plexos nervosos da submucosa. Após os procedimentos experimentais e simulados, os animais foram monitorados por 14 dias, investigando-se eventuais complicações. No 14º dia após os procedimentos, os animais foram eutanasiados e, posteriormente, submetidos à ressecção cirúrgica em bloco do reto. Estas peças cirúrgicas de reto foram processadas e submetidas à avaliação histopatológica para investigação da presença de reação inflamatória, tecido de granulação e colagenogênese.

Resultados: o tempo cirúrgico das biópsias do Grupo Endoscopia foi o mais longo, seguido do Grupo Cirúrgica. Para a obtenção do material, o Grupo Punch foi o que apresentou pior resultado (com relação a quantidade de material e número de células ganglionares), além de mais inflamação e fibrose subsequentes. O Grupo cirúrgica obteve material adequado, porém com mais inflamação e fibrose. O Grupo Sucção se mostrou factível, sendo rápido, simples, com menos inflamação e fibrose, fornecendo material adequado.

Palavras-chave: disganglioneoses intestinais, experimental, biópsia retal, técnicas de biopsia, doença de hirschsprung.

Abstract

Introduction: the use of rectal biopsy for diagnosing intestinal disganglionosis in children is well-established and is our standard practice for diagnosing Hirschsprung's disease. However, there remains no consensus on the optimal technique for obtaining these samples. Various methods are used globally with heterogeneous results. The choice of these methods appears to be more influenced by the preferences and experience of individual institutions than by scientific evidence. A recent systematic review did not identify any clinical trials that compared outcomes across different rectal biopsy techniques, thereby preventing a robust evidence-based analysis.

Objective: identify the most suitable rectal biopsy technique for histopathological analysis of the submucosal nerve plexuses, considering the highest rate of adequate biopsies, the lowest tissue reaction and complications, as well as reduced levels of inflammation and/or fibrosis when assessed 14 days after the procedures.

Methodology: the experimental model involved 28 rabbits, females, subjected to four distinct rectal biopsy procedures. The animals were randomly assigned to four experimental groups (Surgical Biopsy Group – open surgical biopsy, Punch Group – *punch* biopsy, Endoscopy Group – endoscopic biopsy, and Suction Group – suction biopsy) and one simulated control group (Sham Group). Rectal wall samples were collected and processed using Hematoxylin & Eosin staining to assess the presence and characteristics of the submucosal nerve plexuses. Following the experimental and simulated procedures, the animals were monitored for 14 days to identify potential complications. On the 14th day post-procedure, the animals were euthanized and underwent surgical resection of the rectal segment. These surgical specimens were processed and subjected to histopathological evaluation to investigate the presence of inflammation, granulation tissue, and collagenogenesis.

Results: the duration of surgical time for biopsies in the Endoscopy Group was the longest, followed by the Surgical Group. In terms of material acquisition, the Punch Group yielded the poorest results (in terms of both material quantity and number of ganglion cells), accompanied by higher levels of inflammation and fibrosis. The Surgical Group provided adequate material but with greater inflammation and fibrosis. The Suction Group demonstrated feasibility, being quick and simple, with reduced inflammation and fibrosis, and yielded adequate material.

Keywords: intestinal disganglionosis, experimental, rectal biopsy, biopsy techniques, Hirschsprung disease.

Lista de Abreviações

DH – Doença de Hirschsprung

UNESP – Universidade Estadual de São Paulo

FMB – Faculdade de Medicina de Botucatu

UNIPEX – Unidade de Pesquisa Experimental da Faculdade de Medicina de Botucatu

H&E – Método de hematoxilina e eosina

ANOVA – Análise de Variância

Seg – Segundos

Kg – Kilos

Cm – Centímetros

Lista de Quadros

Quadro 1. Classificação etiológica das disganglionoses intestinais. Adaptado de Scharli, 1995.....	14
Quadro 2: Tipos de técnicas de biópsias de reto utilizadas na investigação diagnóstica das disganglionoses intestinais.....	17
Quadro 3: Subdivisão dos animais para o estudo experimental.....	22
Quadro 4: Escala de deposição de colágeno.....	34
Quadro 5: Escala de intensidade de fibrose.....	34

Lista de Figuras

Figura 1: Sequência dos procedimentos executados com os animais de cada grupo + animal sham.....	23
Figura 2: Animais acondicionados em gaiolas individuais durante acompanhamento.....	24
Figura 3: A) Colocação dos afastadores; B) Exposição da mucosa e marcação do setor a ser biopsiado C) Aspecto pós biópsia cirúrgica.....	26
Figura 4: A) Coelho em decúbito dorsal B) Plástico adaptado para introdução da pinça C) Visão do ânus com o plástico posicionado.....	27
Figura 5: A) Coelho posicionado para o procedimento B) Gastrosκόpio Olympus CLV U20 C) Amostra obtida pela pinça Jumbo.....	28
Figura 6: A) Pinça de Noblett em mesa para utilização B) Coelho em decúbito lateral junto à pinça.....	29
Figura 7: A) Vista do ânus com a utilização de afastadores B) Vista do endoscópio inserido endoanal.....	30
Figura 8: Animal em período de observação pós-operatório.....	31
Figura 9: A) Procedimento de exérese do reto B) Vista da amostra obtida.....	32
Figura 10: Caso do grupo Punch constituído por fragmentos superficiais de mucosa e muscular da mucosa. Ausência de representação da submucosa e dos plexos nervosos submucosos (Hematoxilina e eosina, 40x).....	37
Figura 11: Caso do grupo Cirúrgico mostrando plexo nervoso da submucosa e plexo nervoso mioentérico (círculo) (Hematoxilina e eosina, 40x).....	38
Figura 12: Caso do grupo Endoscopia com presença de plexos nervosos na submucosa (Hematoxilina e eosina, 200x).....	38
Figura 13: Caso do grupo Sucção com presença de plexos nervosos na submucosa (Hematoxilina e eosina, 200x).....	39
Figura 14: Caso do grupo Cirúrgico apresentando infiltrado inflamatório e tecido de granulação com neovascularização (Hematoxilina e eosina, 100x).....	41
Figura 15: Caso do grupo Punch mostrando deposição de colágeno corado em azul destacando a fibrose na submucosa (Tricrômio de Masson, 40x).....	41

Lista de Tabelas

Tabela 1: características de peso dos animais e tempo intraoperatório em relação aos grupos experimentais.....	35
Tabela 2: Análise histopatológica das amostras obtidas para cada grupo experimental.....	36
Tabela 3: Análise histológica descritiva das amostras obtidas para cada grupo experimental.....	37
Tabela 4: Características Macroscópicas para cada grupo experimental analisado.....	39
Tabela 5: Característica Histopatológica das peças cirúrgicas de reto para cada grupo experimental avaliado.....	40

Sumário

1.Introdução.....	14
2. Objetivos.....	20
3. Materiais e Metodologia.....	21
4. Resultados.....	35
5. Discussão.....	42
6. Conclusão.....	49
7. Referências Bibliográficas.....	50
8. Anexos.....	57

1. Introdução

As disganglionoses intestinais representam um grupo de entidades patológicas caracterizadas por alterações estruturais dos plexos nervosos que compõem o sistema nervoso entérico e que acometem tipicamente pacientes da faixa etária pediátrica. Este grupo de doenças pode ter origem congênita ou adquirida e está relacionado a um amplo espectro de alterações, que envolve desde a composição celular até a potencial ausência completa do plexo em segmentos do intestino (Kapur, 1999; Montedonico et al., 2011; Matias, 2011). Scharli (1995) propôs uma classificação que sumariza as principais patologias que compõem este grupo de doenças. Esta classificação apresentada no Quadro 1 é a mais utilizada até hoje na prática clínica e na investigação científica e baseia-se na gênese e distribuição das células ganglionares (Scharli, 1995).

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

Disganglionoses agenéticas	- Doença de Hirschsprung clássica - Aganglionose longa - Aganglionose colônica total - Aganglionose intestinal total - Aganglionose ultracurta
Disganglionoses hipogenéticas	- Hipoganglionose - Hipogenesia de células ganglionares dos plexos mioentéricos e submucosos
Disganglionoses disgenéticas	- Displasia Neuronal Intestinal tipos A e B
Condições adquiridas	- Doença de Chagas
Formas combinadas	- Doença de Hirschsprung + Displasia Neuronal Intestinal do tipo B - Hipoganglionose + Displasia Neuronal Intestinal do tipo B - Células nervosas hipogenéticas dos plexos submucosos + Displasia Neuronal Intestinal do tipo B

A investigação diagnóstica é habitualmente composta por três métodos: manometria anorretal, enema opaco e biópsia do reto. Os dois primeiros são considerados como métodos de triagem e a biópsia retal é o padrão ouro para diagnóstico, comprovando a ausência de células ganglionares nos plexos nervosos do intestino distal (Qualman et al., 1999; De Lorink et al., 2006). 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 doença.

O tratamento da DH é cirúrgico. As técnicas utilizadas têm como princípios a remoção do segmento aganglionar e a reconstrução do trânsito intestinal, trazendo o segmento ganglionar até o ânus, com preservação da função esfinteriana (Dasgupta & Langer, 2004). Atualmente, as técnicas mais recomendadas envolvem a ressecção do segmento agangliônico por via transanal, sem mobilização intra-abdominal do cólon, dependendo da idade da criança (de La Torre & Ortega-Salgado, 1998; de La Torre & Langer, 2010).

A análise histopatológica do sistema nervoso entérico a partir de amostras obtidas por meio de biópsias do reto distal é, portanto, a principal ferramenta diagnóstica na investigação etiológica das disganglionoses intestinais (Feichter et al., 2009; Montedonico et al., 2011). A análise histopatológica deve idealmente compreender a identificação e caracterização das células ganglionares nos plexos nervosos da submucosa e da muscular própria (Swenson et al., 1955). Bodian (1960) demonstrou que amostras de tecido menores, envolvendo mucosa e submucosa, são suficientes, uma vez que as características dos plexos nervosos da submucosa correspondem às características morfológicas dos plexos mioentéricos. Assim, biópsias mais superficiais, envolvendo apenas o plexo submucoso podem ser suficientes para o diagnóstico de DH e de outras disganglionoses intestinais (Shandling, 1961; Dobbins & Bill, 1965; Knowles et al., 2010).

A adequação do espécime, contemplando a camada submucosa, constitui o ponto crítico para a análise histopatológica adequada no diagnóstico das disganglionoses intestinais (Alizai et al., 1998).

Os fragmentos de biópsias retais são considerados adequados quando apresentam pelo menos 3 mm de diâmetro, com, no mínimo, um terço da espessura correspondendo à submucosa, sendo preferível que a metade da amostra seja representada por submucosa (Qualmann et. al 1999; Muise & Cowles, 2016). Quando os fragmentos não envolvem a submucosa, a investigação diagnóstica 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 dos pais e considerável aumento de custos (Ali et al., 2006; Muise & Cowles, 2016).

Em vista disso, diferentes métodos de biópsias vêm sendo desenvolvidos e adaptados para realização de biópsia retal na investigação diagnóstica das disganglionoses intestinais. O Quadro 2 apresenta as quatro principais técnicas de biópsias retais utilizadas na investigação diagnóstica das disganglionoses intestinais.

Quadro 2: Tipos de técnicas de biópsias de reto utilizadas na investigação diagnóstica das disglanglionoses intestinais (adaptado de Comes et al, 2019)

Técnica de Biópsia retal	Descrição	Subtipos	Imagem
Cirúrgica	Incisão cirúrgica na parede do reto	- superficial - profunda	 Ex: Biópsia cirúrgica profunda
Sucção	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
“Punch”	Biópsia incisional da mucosa do reto realizada através de diferentes pinças	- Cupbiopsy - Nasal forceps - outros	 Ex: Storz cup biopsy forceps
Endoscópica	Sob visão endoscópica direta com pinças endoscópicas	- pinça jumbo - outras	 Ex: biópsia endoscópica com pinça jumbo

Diante desse cenário, há intensa pesquisa por novos métodos de biópsias. Resultados satisfatórios foram descritos com o uso de pinças adaptadas tipo “punch” (Alizai et al., 1998; Kobayashi et al., 2002), com outros modelos de pinças de sucção (Ali et al., 2006; Hall et al., 2008) e com auxílio de visão endoscópica e biópsia por fórceps jumbo (Hirsch et al., 2011). Entretanto, os resultados destas inovações são extremamente variáveis e o risco de complicações aumenta diretamente com o tamanho da amostra da biópsia (Ali et al., 2006; Muise & Cowles, 2016).

Paralelamente, uma série de marcadores histoquímicos e imunohistoquímicos vêm sendo propostos para auxiliar a análise histopatológica das biópsias retais (Kapur, 2006; Holland et al., 2010).

Alguns destes, como a pesquisa histoquímica de atividade da enzima acetilcolinesterase (Ache) e o método imunohistoquímico da calretinina, vêm permitindo que fragmentos mais superficiais de mucosa do reto possam ser suficientes para a conclusão diagnóstica, exercendo, desta forma, influência nas taxas de sucesso das diferentes técnicas de biópsias de reto (Barshack et al., 2004; Kapur, 2006; Kapur et al., 2009; Guinard-Samuel et al., 2009; Holland et al., 2011; de Arruda Lourenção et al., 2014).

Até o momento, não há consenso sobre qual a melhor técnica para obtenção de biópsias de reto em crianças em investigação diagnóstica para disganglionoses intestinais (Takawira et al., 2015). Diferentes métodos continuam sendo utilizados em todo o mundo, com resultados bastante heterogêneos. Amostras de biópsia inadequadas, envolvendo espécimes muito pequenos e superficiais, ou biópsias distais, muito próximas da linha pectínea, são associadas a resultados inconclusivos (Qualman et al., 1999; Guinard-Samuel et al., 2009). Outros fatores como o modelo da pinça de biópsia, idade do paciente no momento da biópsia e as técnicas de processamento e análise histopatológica podem exercer influência nas taxas de falhas de diagnóstico (Alizai et al., 1998; Croffie et al., 2007). Diante disso, a escolha da técnica de biópsia retal parece depender muito mais da preferência e da experiência de cada serviço do que de evidências científicas.

Em revisão sistemática da literatura, Friedmacher & Puri (2015) analisaram os resultados de 58 estudos sobre a utilização de biópsias de sucção do reto para o diagnóstico de DH. Estes autores concluíram que há evidências suficientes para sustentar a utilização de biópsias retais de sucção, analisadas pelo método histoquímico da acetilcolinesterase, para a investigação diagnóstica de DH. Entretanto, esta revisão limitou-se à análise de apenas uma técnica de biópsia retal e incluiu somente pacientes em investigação diagnóstica para DH. Recentemente, outra revisão sistemática (Comes et al., 2021) na qual não foram encontrados ensaios clínicos randomizados que comparassem os resultados obtidos através de diferentes técnicas de biópsias retais, sob as mesmas condições de análise

histopatológica, em um grupo homogêneo de pacientes em investigação diagnóstica para disganglionoses intestinais. A partir de uma análise de proporções de série de casos, foi possível demonstrar que as técnicas de sucção, “*punch*” e cirúrgica convencional apresentaram taxas equivalentes de resultados conclusivos. Considerando que as técnicas de “*punch*” e de sucção são procedimentos minimamente invasivos, que não requerem anestesia geral ou hospitalização, conclui-se que estas técnicas podem ser adequadas para serem utilizadas na investigação diagnóstica de disganglionoses intestinais em crianças. Entretanto, a técnica de “*punch*” apresentou taxas significativamente maiores de complicações comparadas ao método de sucção, desencorajando a recomendação para sua utilização na prática clínica.

Entretanto, estas duas revisões sistemáticas apresentam como principal fraqueza o fato de serem compostas por séries de casos, o que limita sobremaneira a qualidade da evidência. A natureza invasiva das biópsias retais dificulta a condução de estudos randomizados controlados, prejudicando a qualidade da evidência e impedindo a realização de metanálises convencionais.

Diante desse cenário, nós decidimos realizar um estudo experimental, randomizado, controlado, em modelo animal, para investigar qual das técnicas de biópsias de reto é capaz de fornecer maior índice de amostras adequadas com menor número de complicações. Optamos por tal delineamento, já que seria muito difícil a realização de estudos em humanos, em vista das limitações éticas relacionadas às características invasivas e riscos do procedimento. Portanto, a realização de estudo experimental em modelo animal permitirá ampliar o conhecimento sobre este importante método diagnóstico, através da comparação entre as diferentes técnicas, indicando qual a técnica mais adequada a ser utilizada.

7. Referências Bibliográficas

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

Alizai N.K., Batcup G., Dixon M.F., Stringer M.D. Rectal biopsy for Hirschsprung's disease: what is the optimum method? *Pediatric Surgery International.* 1998; 13 (2-3): 121- 124.

Athow A.C., Filipe M.I., Drake D.P. Problems and advantages of acetylcholinesterase histochemistry of rectal suction biopsies in the diagnosis of Hirshsprung's disease. *J Pediatr Surg.* 1990; 25(5):520-6.

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.

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.

Brady AC, Saito JM, Lukas K, Guthrie T, Utterson EC, White FV, Dillon PA. Suction rectal biopsy yields adequate tissue in children. *J Pediatr Surg.* 2016 Jun;51(6):966-9. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2016.02.064. Epub 2016 Mar 4. PMID: 27032614.

Comes GT, Ortolan EVP, de Medeiros Moreira MM, de Oliveira Junior WE, Angelini MC, El Dib R, de Arruda Lourenção PLT. Rectal Biopsy Technique for the Diagnosis of Hirschsprung Disease in Children: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2021 Apr 1;72(4):494-500.

Cooke H.J., Neurobiology of the Intestinal Mucosa. *Gastroenterology* 1986;90:1057-81.

Croffie J.M., Davis M.M., Faught P.R., Corkins M.R., Gupta S.K., Pfefferkorn M.D., Molleston J.P., Fitzgerald J.F. 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.

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

de Arruda Lourenção PL, 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 May;58(5):603-7.

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

De Lorink F., Kremer L.C.M., Reitsma J.B., Benninga M.A. Diagnostic tests in Hirschsprung disease: a systematic review. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2006; 42(5):496-505.

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

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.

Friedmacher F., Puri P. Current practice patterns of rectal suction biopsy in the diagnostic work-up of Hirschsprung's disease: results from an international survey. *Pediatr Surg Int* (2016) 32:717–722.

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

- Gil-Vernet J.M., Broto J., Guillén G. [Hirschsprung-neurointestinal dysplasia: differential diagnosis and reliability of diagnostic procedures]. *Cir Pediatr.* 2006; 19(2):91-4.
- Gunn M. Histological and histochemical observations on the myenteric and submucous plexuses of mammals. *J. Anat.* (1968), 102, 2, pp. 223-239.
- 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.
- Green, N., Smith, C.A., Bradford, M.C. et al. Rectal suction biopsy versus incisional rectal biopsy in the diagnosis of Hirschsprung disease. *Pediatr Surg Int* **38**, 1989–1996 (2022).
- Hall N.J., 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.
- Hayes C, Kawatu D, Mangray S, et al. Rectal suction biopsy to exclude the diagnosis of Hirschsprung disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2012; 55:268–71.
- Hirose R., Hirata Y., Yamada T., Kawana T., Taguchi T., Fukuoka S. S. The Simple Technique of Rectal Mucosal Biopsy for the Diagnosis of Hirschsprung's Disease. *Journal of Pediatric Surgery*, Vol28, No 7 (July), 1993: pp 942-944.
- Hirsch B. Z., Angelides A.G., Goode S.P., Garb J.L. Rectal biopsies obtained with jumbo biopsy forceps in the evaluation of Hirschsprung disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2011; 52(4):429-32.
- Holland S.K., Hessler R.B., Reid-Nicholson M.D., Ramalingam P., Lee J.R. 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 Hirshsprung disease. *Ann Diagn Pathol*. 2011; 15(5):323-8.
- Kapur R.P. et al., Hirschsprung disease and other enteric dysganglionoses. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 1999 Jun;36(3):225-73.
- Kapur, R.P. 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 genetics of Hirschsprung's disease. *Semin Pediatr Surg*. 2009 Nov;18(4):212-23.
- Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol*. 2010 Jun 29;8(6):e1000412.
- Knowles CH, De Giorgio R, Kapur RP, et al. Gastrointestinal neuro- muscular pathology: guidelines for histological techniques and report- ing on behalf of the Gastro 2009 International Working Group. *Acta Neuropathol* 2009; 118:271–301.
- Kobayashi H., Li Z., Yamataka A., Lane G.J., Miyano T. Rectal biopsy: what is the optimal procedure? *Pediatr Surg Int*. 2002; 18(8):753-6.
- Kobayashi H., Yamataka A., Lane G.J., Miyano T. Pathophysiology of hypoganglionosis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 34:231–235. 2002.
- Knowles CH, De Giorgio R, Kapur RP, Bruder E, Farrugia G, Geboes K, et al. The London Classification of gastrointestinal neuromuscular pathology: report on behalf of the Gastro 2009 International Working Group. *Gut*. 2010; 59:882-7.

- Lewis N.A., Levitt M.A., Zallen G.S., Zafar M.S., Iacono K.L., Rossman J.E., Caty M.G., Glick P.L. Diagnosing Hirschsprung's disease: increasing the odds of a positive rectal biopsy result. *J Pediatr Surg.* 2003; 38:412-6.
- Li et al. A novel collagen area fraction index to quantitatively assess bowel fibrosis in patients with Crohn's disease. *BMC Gastroenterology.* 2019.
- Matias A.L.R. Interpretação clínica da histopatologia nas neuropatias congênitas intestinais (dissertation). Porto: Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto;2011.
- Minossi, J G; Leite C V. S; Naresse, L E; Rodrigues M A; Curi, P R; Kobayasi, S. Ação do diclofenaco de sódio em anastomoses realizadas no intestino delgado de ratos. *Acta Cirúrgica Brasileira. Sociedade Brasileira para o Desenvolvimento da Pesquisa em Cirurgia*, v. 13, n. 1, p. -, 1998.
- Montedonico S., Cáceres P., Muñoz N., Yáñez H., Ramírez R., Fadda B. Histochemical staining for intestinal dysganglionosis: over 30 years' experience with more than 1,500 biopsies. *Pediatr Surg Int.* 2011 May;27(5):479-86.
- Muise E.D., Cowles RA. Rectal biopsy for Hirschsprung's disease: a review of techniques, pathology, and complications. *World J Pediatr.* 2016; 12(2):135-41.
- Noblett H. R. A Rectal Suction Biopsy Tube for Use in the Diagnosis of Hirschsprung's Disease. *JOURNAL OF PEDIATRIC SURGERY*, VOL. 4, No. 4 (AUGUST), 1969.
- Normativas do CONCEA para produção, manutenção ou utilização de animais em ensino ou pesquisa científica. Brasília, 2015.
- Olivos, M., Correa, C. & De la Torre, L. Current practice of rectal biopsies for the diagnosis of Hirschsprung's disease in Latin America: an international online survey. *Pediatr Surg Int* 37, 479–483 (2021).

- Penaloza, C S Q et al., Manejo diagnóstico e terapêutico da Doença de Hirschsprung: um levantamento com cirurgias pediátricas do Brasil; Dissertação mestrado, Universidade Estadual Paulista (Unesp).
- Phillips et al. Effects of chronic corticosteroids and vitamin A on the healing of intestinal anastomoses. *The American Journal of Surgery*. 1992.
- 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.
- Puri P., Montedonico S. Hirschsprung's disease: clinical features. In: Holschneider AM, Puri P, editors. *Hirschsprung's disease and allied disorders*. 3rd ed. Berlin Heidelberg New York: Springer; 2008; p107-13.
- Qualmann S.J., Jaffe R., Bove K.E., Monforte-Muñoz H. Diagnosis of Hirschsprung disease using the rectal biopsy: multi-institutional survey. *Pediatr Dev Pathol*. 1999 NovDec;2(6):588-96.
- Shandling B. A new technique in the diagnosis of Hirschsprung's disease. *Can J Surg*. 1961; 4:298-305.
- Schäppi M.G., Staiano A., Milla P.J., Smith V.V., Dias J.A., Heuschkel R., Husby S., Mearin M.L., Papadopoulou A., Ruemmele F.M., 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.
- Schärli AF (1992) Surgery for Hirschsprung's disease and intestinal neuronal dysplasia. In: Hadziselimovic F, Herzog B (eds) *Pediatric Gastroenterology: Inflammatory Bowel Disease and Morbus Hirschsprung*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 287–296.
- Spencer N.J., Dinning P.G., Brookes S.J., Costa M. Insights into the mechanisms underlying colonic motor patterns. *J Physiol* 594.15 (2016) pp 4099–4116.