



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA

Simone Terra Lourenção

**Análise imuno-histoquímica do
sistema nervoso entérico na
Displasia neuronal intestinal**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Ciências, Área: Patologia.

Orientadora: Profa. Titular Maria Aparecida Marchesan Rodrigues

Botucatu

2021

Simone Terra Lourenção

Análise imuno-histoquímica do
sistema nervoso entérico na
Displasia neuronal intestinal

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de
Doutora em Ciências, Área: Patologia.

Orientadora: Profa. Titular Maria Aparecida Marchesan Rodrigues

Botucatu

2021

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

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

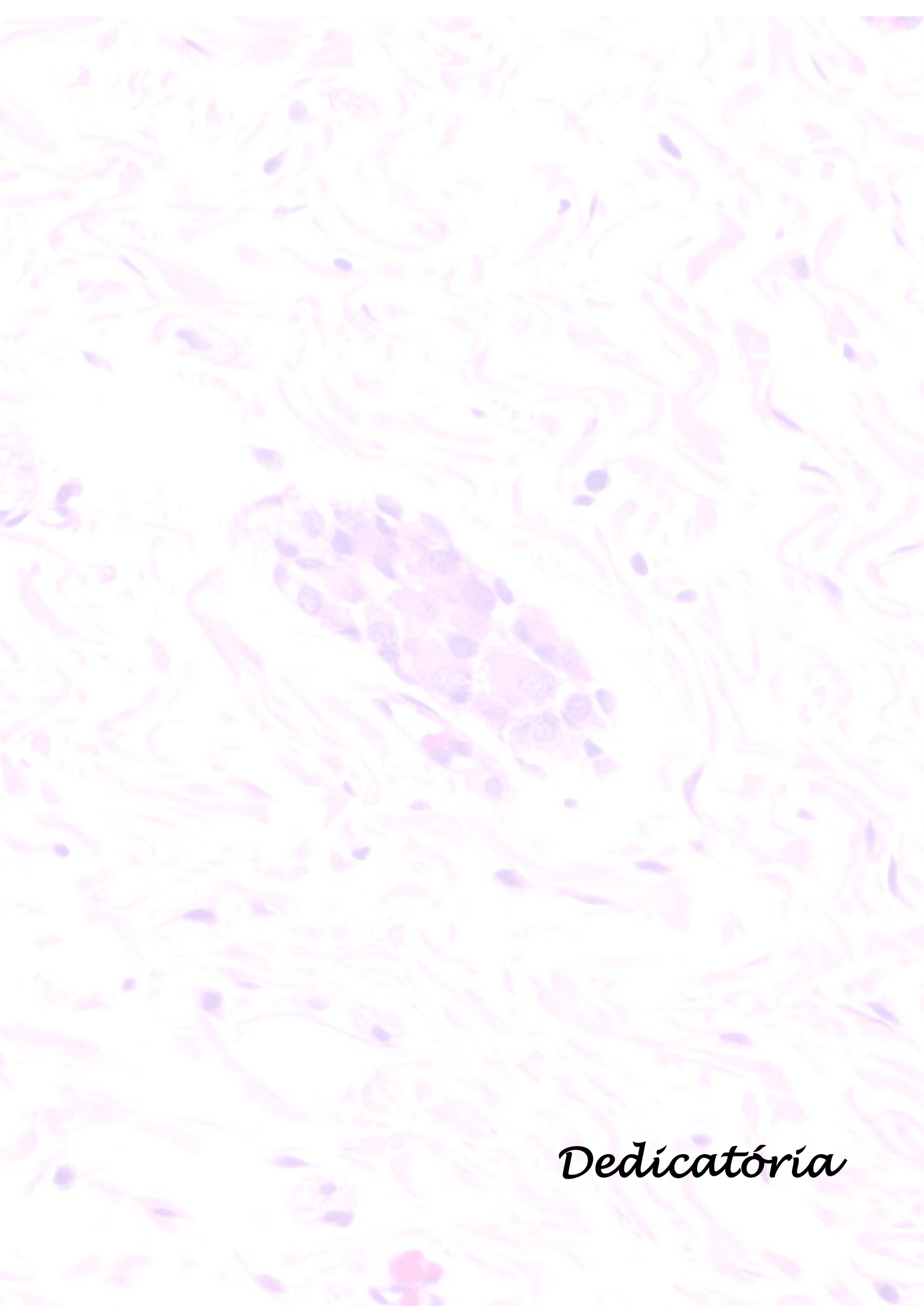
Lourenção, Simone Terra.

Análise imuno-histoquímica do sistema nervoso entérico na displasia neuronal intestinal / Simone Terra Lourenção. - Botucatu, 2021

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Maria Aparecida Marchesan Rodrigues
Capes: 40105008

1. Constipação intestinal. 2. Sistema nervoso entérico.
3. Doenças neuromusculares. 4. Imuno-histoquímica.
5. Diagnóstico.

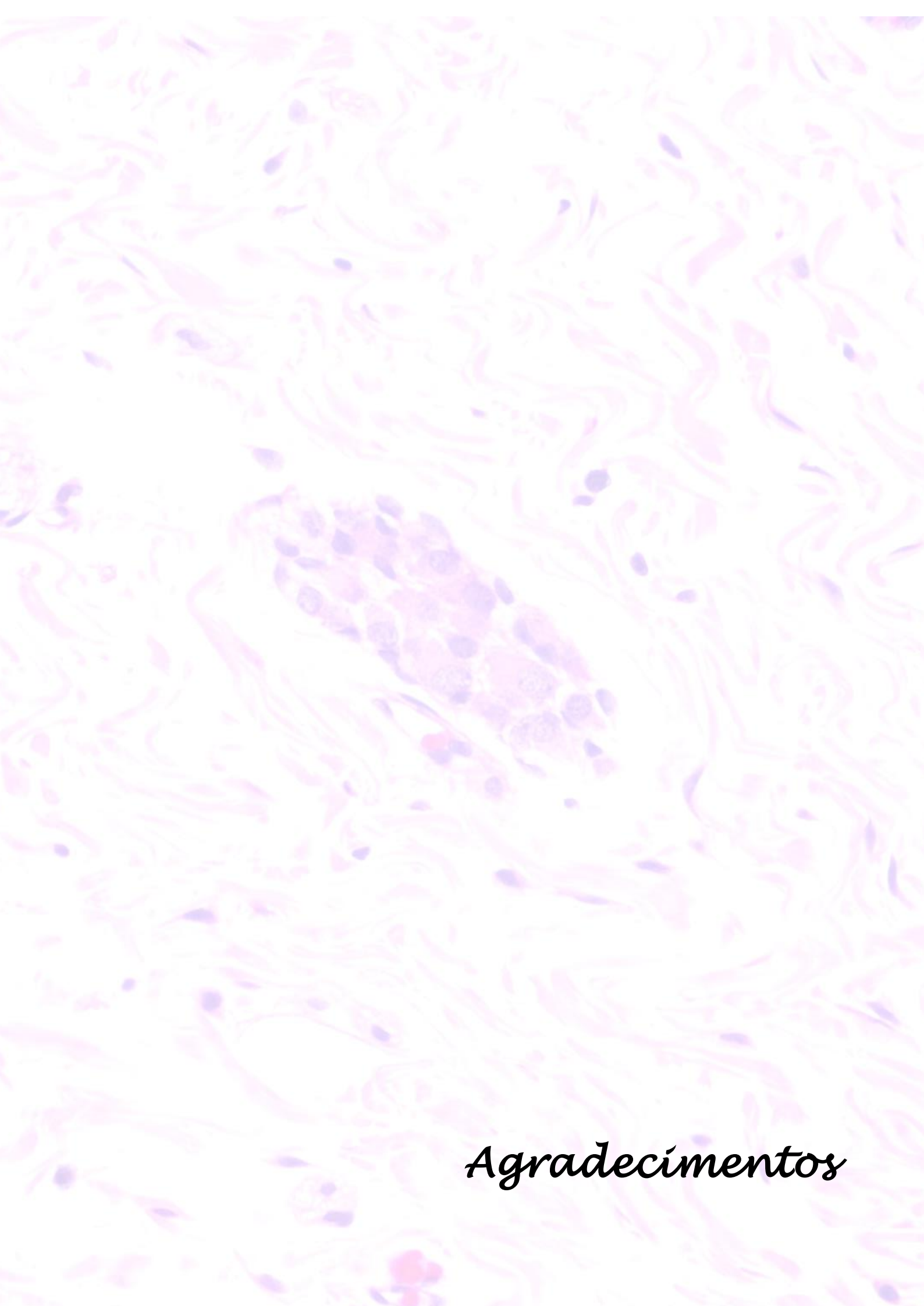
Palavras-chave: Constipação intestinal crônica;
Diagnósticos; Displasia neuronal intestinal; Hu C/D; PTEN.



Dedicatória

os meus pais, João Camilo (em
Amemória) e Maria Helena, e meus
irmãos, Luciane e Djalma, por
estarem presentes no meu caminho de
amadurecimento e por me apoiarem e
acreditarem nas minhas escolhas. Amo vocês.

mo meu marido, Pedro, que permitiu
Aconstituirmos uma grande família
com a nossa filha Alice.
Redescobrimos a beleza da vida todos os dias,
juntos.



Agradecimientos

À Professora Maria Aparecida Marchesan Rodrigues

Inteligência a frente do tempo. É um privilégio trabalhar e aprender em sua companhia.

Iluminou meu caminho profissional, agradeço a confiança.

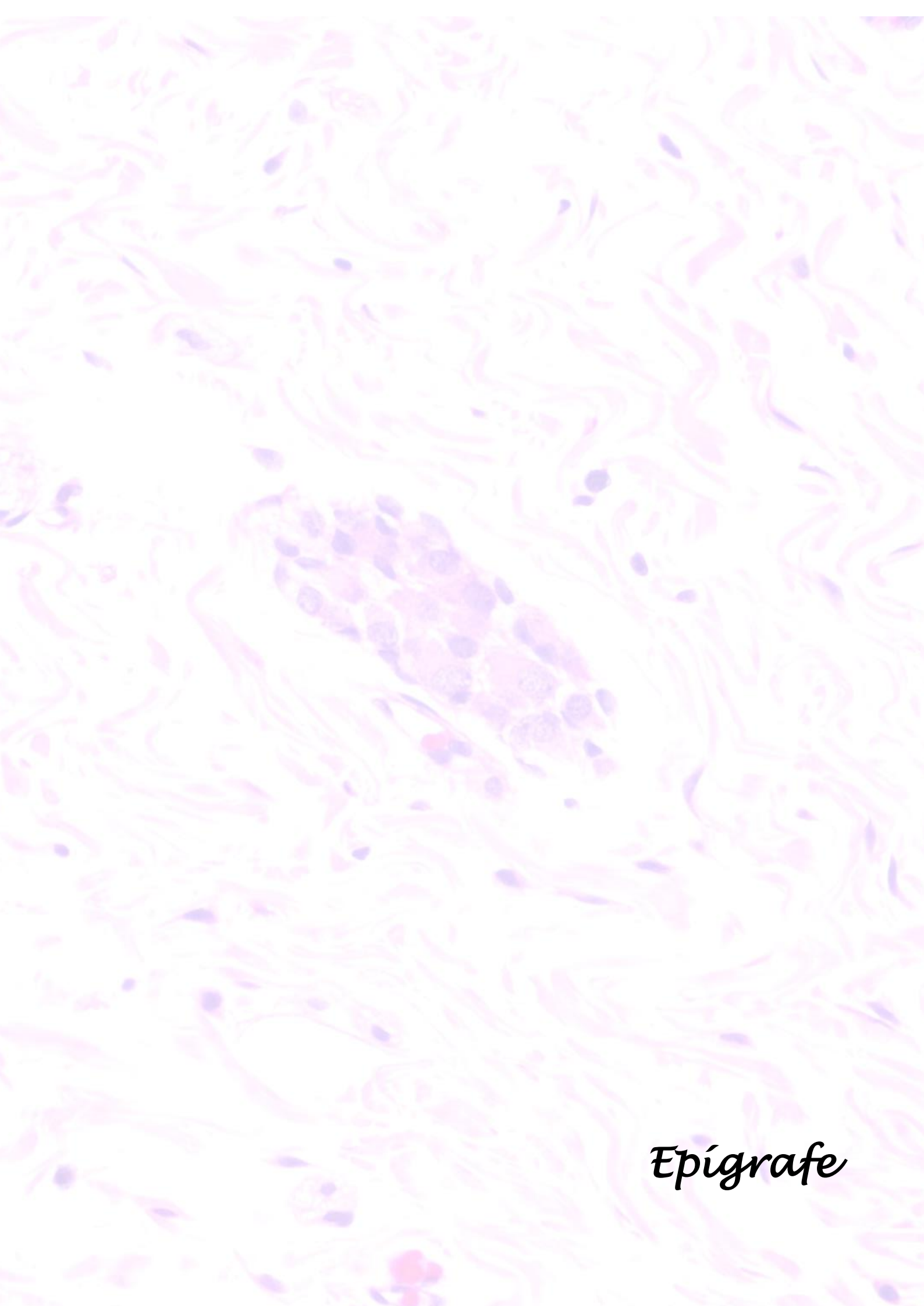
O Professor Pedro Luiz Toledo de Arruda Lourenção

Pela participação na revisão da literatura, levantamento dos casos, colaboração na análise estatística e discussão de ideias.

Aos funcionários do Departamento de Patologia José Carlos Pedroso de Lima, Luiz Fernando Franchi, Rita de Cássia de Moraes

Pela prontidão em colaborar com a pesquisa conforme necessidades apresentadas e pela habilidade e competência técnica.

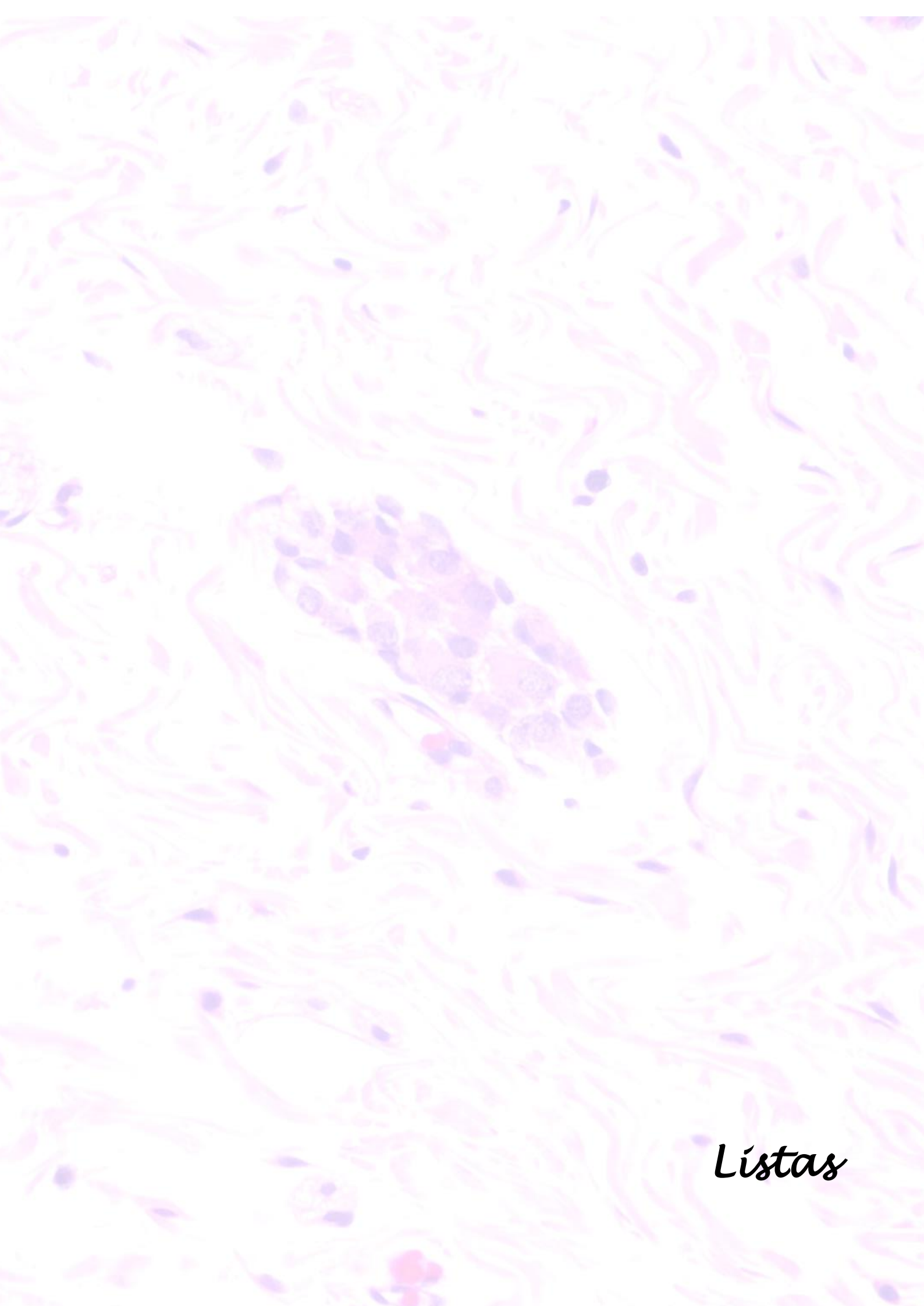
À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro à realização deste estudo (Processo 2017/26205-9).



Επίγραφε

“*ue minha alma floresça
Novamente apaixonada por toda
a existência.*”

Rudolf Steiner



Listas

LISTA DE FIGURAS

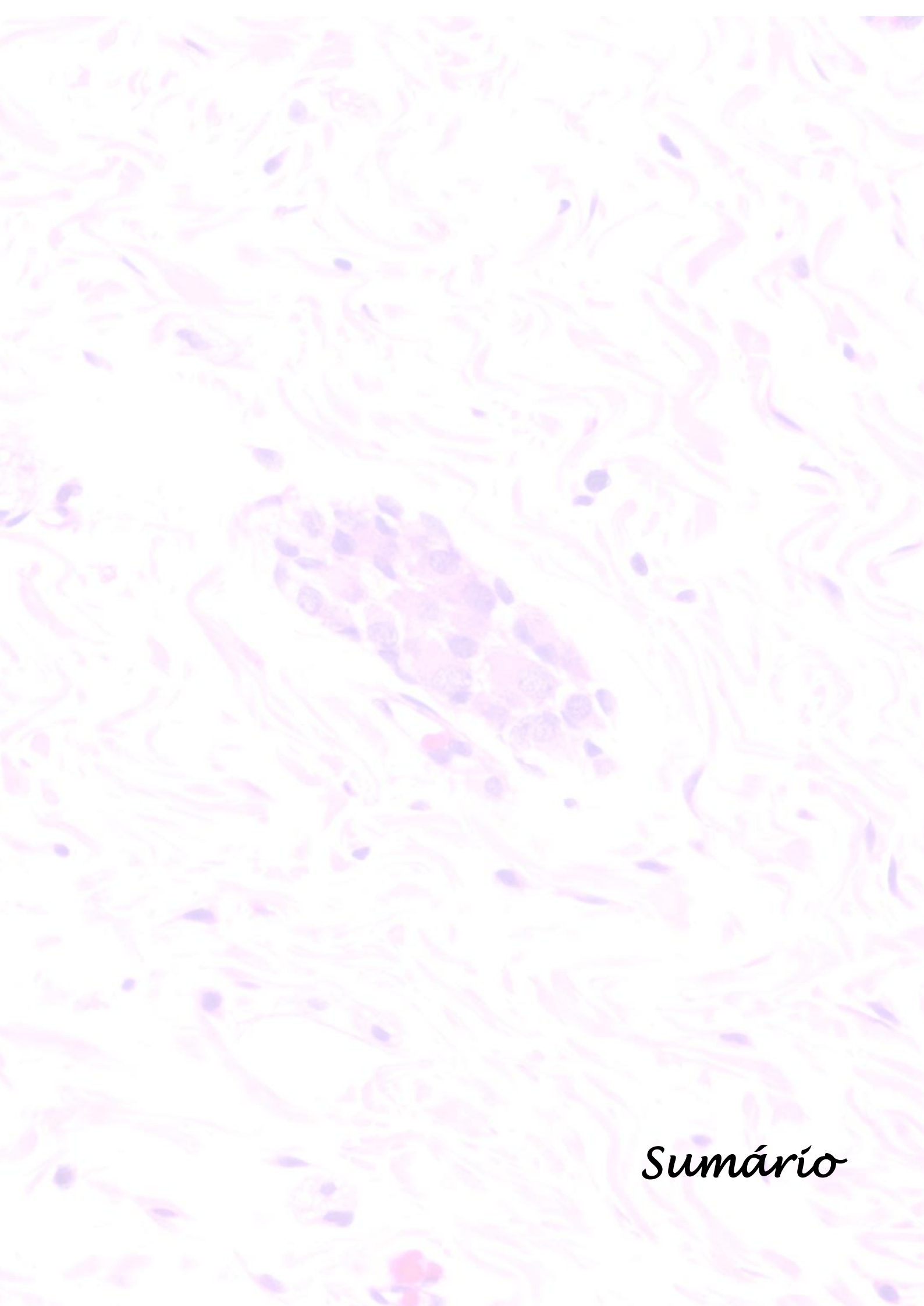
- Figura 1** – DNI-B (a e b): plexos nervosos submucosos com hiperganglionose (setas) (H&E, 400x). 90
- Figura 2** – DNI-B: plexos nervosos submucosos com hiperganglionose. (a) 8 neurônios (setas) (H&E, 400x); (b) 10 neurônios (setas) (Hu C/D, 400x). 91
- Figura 3** – DNI-B (a e b) Plexos nervosos submucosos com hiperganglionose. Hu C/D com imunoexpressão nuclear (400x). 92
- Figura 4** – Imunoexpressão do PTEN nos plexos nervosos submucosos: (a) controle: expressão positiva e (b) DNI-B: perda de expressão (seta) (400x). 93
- Figura 5** – Imunoexpressão do PTEN nos plexos nervosos mioentéricos: (a) controle: expressão positiva e (b) DNI-B: perda de expressão (seta) (400x). 94
- Figura 6** – Imunoexpressão do PTEN nas terminações nervosas da camada muscular: (a) controle: expressão positiva (seta) e (b) DNI-B: perda de expressão (400X). 95
- Figura 7** – Imunoexpressão positiva do PTEN na Doença de Hirschsprung: (a, c, e): segmento agangliônico; (b, d, f): segmento gangliônico; (a, b): plexos submucosos; (c, d): plexos mioentéricos e (e, f): muscular própria (400x). 96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características do grupo controle.....	62
Tabela 2 – Análise comparativa entre o grupo DNI-B e o grupo controle em relação à idade e ao sexo.....	62
Tabela 3 – Contagem de neurônios nos plexos nervosos submucosos: comparação entre Hu C/D e H&E (n=39).	63
Tabela 4 – Concordância intraexaminadora para o Hu C/D (n=39).....	64
Tabela 5 – Concordância entre diferentes formas de análise pelo Hu C/D.	65
Tabela 6 – Comparação entre grupo DNI-B e grupo controle para a análise quantitativa dos plexos nervosos de acordo com os métodos H&E e Hu C/D.	66
Tabela 7 – Expressão imuno-histoquímica do marcador PTEN.	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

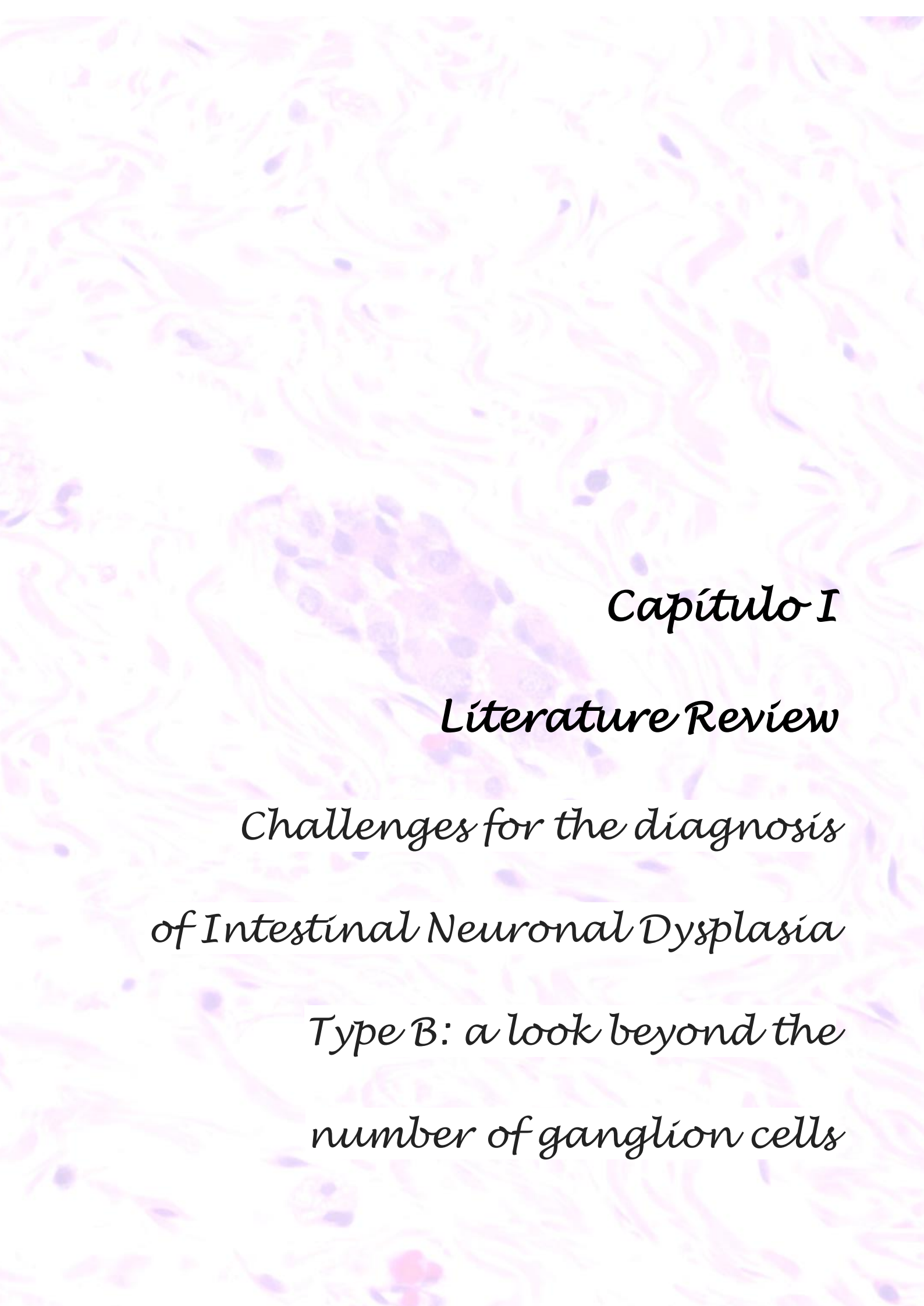
AChE	Acetilcolinesterase
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
CLMP	<i>Coxsackie and andenovirus receptor-like membrane protein</i>
DH	Doença de Hirschsprung
DNI	Displasia Neuronal Intestinal
DNI-B	Displasia Neuronal Intestinal Tipo B
GAP43	<i>Growth Associated Protein 43</i>
H&E	Hematoxilina e eosina
NCAM	<i>Neural Cell Adhesion Molecule</i> , Molécula de adesão celular neural
NGF	<i>Nerve Growth Factor</i>
NO sintase	<i>Nitrous Oxide sintase</i> , Óxido Nítrico sintase
NSE	<i>Neuron Specific Enolase</i> , Enolase neurônio específica
PGP9.5	<i>Protein Gene Product</i> , Produto do gene da proteína 9.5
PIP2	Fosfatidilinositol 3,4 bifosfato
PIP3	Fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome TEN</i> , Homólogo da fosfatase e tensina deletado no cromossomo dez
SMA	<i>Smooth Muscle Actin</i> , Actina de músculo liso



Sumário

SUMÁRIO

<i>CAPÍTULO I - LITERATURE REVIEW</i>	15
1. Introduction	16
2. Controversies regarding the existence of IND B	19
3. The lack of diagnostic criteria	21
4. Uncertainties and recent advances	25
5. Immunohistochemistry and looking beyond the number of ganglion cells.....	28
6. Conclusion	34
7. References.....	35
<i>CAPÍTULO II - ARTIGO</i>	46
Resumo	47
Abstract.....	49
1. Introdução	50
2. Objetivos	54
2.1. Objetivo principal.....	54
2.2. Objetivos intermediários	54
3. Pacientes e métodos.....	56
3.1. Casuística e cenário.....	56
3.2. Processamento das peças cirúrgicas e das amostras de autópsia.....	57
3.3. Histologia padrão pela hematoxilina e eosina (H&E)	57
3.4. Métodos imuno-histoquímicos Hu C/D e PTEN	58
3.5. Análise histopatológica.....	58
3.6. Análise dos resultados	60
3.7. Análise estatística	61
4. Resultados	62
4.1. Caracterização dos pacientes e grupos	62
4.2. Análise quantitativa dos plexos nervosos pelo método imuno-histoquímico Hu C/D	64
4.3. Análise da expressão imuno-histoquímica do PTEN	68
5. Discussão	70
6. Conclusão	78
7. Referências.....	79
Apêndice	98



Capítulo I

Literature Review

*Challenges for the diagnosis
of Intestinal Neuronal Dysplasia*

*Type B: a look beyond the
number of ganglion cells*

1. Introduction

The histopathological diagnosis of colon diseases presenting with chronic constipation in childhood has been a challenge in recent decades. Hirschsprung's disease (HD), considered a study model for other dysganglionoses, shows increased activity of the enzyme acetylcholinesterase (AChE) in the parasympathetic nerves of the lamina propria of the mucosa, the muscularis mucosa, and muscularis propria, due to aganglionosis of the submucosal and myenteric plexuses of the enteric nervous system (ENS). HD and allied disorders include diseases with abnormalities in intestinal ganglion cells or dysganglionosis: (i) immaturity of the enteric nervous system reveals small nerve cells that are difficult to differentiate from glial cells; (ii) hypoganglionosis characterized by 50% reduction in myenteric plexus area and the number of nerve cells; (iii) intestinal neuronal dysplasia type A (a rare form with hypoplasia or adrenergic aplasia) and type B (Muto et al., 2018).

Intestinal neuronal dysplasia type B (IND B) is a controversial entity among gastrointestinal neuromuscular diseases, characterized by complex changes in the ENS, mainly due to hyperplasia of the submucosa nerve plexuses (Meier-Ruge., 2006; Knowles et al., 2010; Friedmacher & Puri, 2013; Schäppi et al., 2013). It was first described in 1970, when Nezelof et al. reported on three cases of megacolon associated with hyperplasia of the myenteric nervous plexuses (Nezelof et al., 1970). A year later, Meier-Ruge defined it as a condition usually associated with low intestinal obstruction that could simulate HD, but which showed distinct histopathological characteristics, such as hyperplasia of the nerve plexuses and increased activity of the

enzyme AChE in the parasympathetic nerve fibers of the lamina propria of the mucosa (Meier-Ruge, 1971).

Almost fifty years have passed and, despite the intense scientific research conducted during this period, there are still countless uncertainties, including its etiopathogenesis, diagnostic criteria, and therapeutic possibilities. Thus, IND B is currently considered a controversial and little-known condition among the differential diagnoses for organic causes of intestinal constipation (Holschneider et al., 2008; Tabbers et al., 2014; Toledo de Arruda Lourenção et al., 2016; Kapur & Reyes-Mugica, 2019).

Most patients with IND B are children with a clinical picture of chronic constipation. Thus, the main symptoms are very similar to those presented by HD patients (Csury & Peña, 1995; Holschneider et al., 2008). Delay in the elimination of meconium, abdominal distention, vomiting and difficulty in eating can appear in the first days of life (Pini-Prato et al., 2007). A portion of these patients can show symptoms throughout their lives, evolving to severe constipation that is refractory to different types of clinical treatment (Schmittenebecher et al., 2000; Gillick et al., 2001; Mattioli et al., 2004). Severe symptoms, such as episodes of enterocolitis, acute intestinal obstruction, volvulus, and intussusception, although rare, are possible complications in different age groups (Sacher et al., 1991; Montedonico et al., 2002; Peng et al., 2011; Jáquez -Quintana et al., 2013). Recent publications have highlighted the growing number of cases in adults, some showing symptoms of constipation since childhood and others with late onset of symptoms (Voderholzer et al., 2000; Vijayaraghavan et al., 2006; López Sanclemente et al., 2014; Junquera Bañares et al., 2014; Vougas et al., 2014). The oldest patient reported in the literature with a diagnosis of IND B was

71 years old. This patient had shown symptoms since childhood, having presented severe constipation for more than 60 years, including several hospitalizations and surgeries during this period (Vougas et al., 2014).

Two therapeutic modalities have been used in patients with IND B: conservative clinical treatment and surgical treatment (Csury & Peña, 1995; Toledo de Arruda Lourenção et al., 2016). Conservative treatment is based on changes in diet, the use of laxatives, and intestinal lavages in cases of fecal retention (Schimpl et al., 2004; Holschneider et al., 2008). Surgical treatment can be performed through sphincterotomy, extensive surgical resection, or temporary colostomy (Briner et al., 1986; Rintala et al., 1989; Schärli, 1992; Tang et al., 2010). However, the outcomes obtained by the different treatment modalities show somewhat conflicting results (Csury & Peña, 1995; Schmittenbecher et al., 2000; Schimpl et al., 2004).

2. Controversies regarding the existence of IND B

One of the main controversies in the understanding of IND B is related to the existence of a cause-effect relationship between histopathological findings and clinical symptoms. In most cases, a diagnosis of IND B is made based on the histopathological analysis of rectal biopsies, in patients with constipation that is usually refractory to clinical treatment. A minority of cases are patients with acute intestinal obstruction or enterocolitis (Holschneider et al., 2008). On the other hand, histopathological alterations compatible with the diagnosis of IND B were observed in colon segments of 36 asymptomatic children (Coerdts et al., 2004). Other studies have failed to demonstrate a direct correlation between histopathological findings, clinical symptoms, and radiological and manometric changes (Koletzko et al., 1993; Ure et al., 1994). Given these controversies, some authors demonstrate skepticism concerning the definition of IND B as a true clinical entity, preferring to define it as a histopathological alteration of the ENS, which may not present symptoms (Berry, 1993; Martucciello et al., 2005; de la Torre Mondragón & Reyes-Múgica, 2006; Holschneider et al., 2008; Kapur & Reyes-Mugica, 2019).

In a recent review on the subject, Kapur & Reyes-Mugica (2019) concluded that IND B remains an undefined histopathological phenotype of uncertain clinical relevance and that it is imprudent to make clinical decisions based on this histopathological diagnosis, while also claiming that this type of histopathological finding may represent deviations from normality. Moreover, these authors criticize the most recent scientific publications that investigated patients with this diagnosis, arguing that they have perpetuated the debate on dubious and controversial concepts. However, in medical practice, we continue to find children with severe constipation or

intestinal obstructions who are submitted to diagnostic investigation for HD and, in the histopathological analysis of rect biopsies, present ganglion cells distributed in an abnormal pattern in the nervous plexuses of the submucosa, with signs of hyperplasia. Schmittenebecher et al. (2000) considered that these morphological changes are compatible with a diagnosis of IND B, which should be considered a distinct clinical entity, since the symptoms presented by the patients are evident and often remain for several years, directly influencing their quality of life. The authors argue that patients with IND B should be treated in a specific manner and highlight the need to develop specific treatment algorithms. The majority of experts who participated in the fourth International Symposium on Hirschsprung's disease and related neurocristopathies, in Genova, Italy, in 2004 (Martucciello et al., 2005), and the majority of the participants in a recent survey by the European Association of Pediatric Surgeons (Zani et al., 2016) consider IND B to be a clinicopathological entity, justifying the need for further studies on this disease.

3. The lack of diagnostic criteria

The lack of well-established criteria for the histopathological diagnosis of IND B can be considered the basis for many of the uncertainties described. To understand any disease, knowing how to diagnose it is mandatory. In the case of IND B, the morphological criteria for histopathological diagnosis have been modified over the years, making comparison between studies more difficult and increasing the controversies and doubts concerning its existence (Meier-Ruge, 1971; Schärli & Meier-Ruge, 1981; Borchard et al., 1991; Meier-Ruge et al., 2004; Holschneider et al., 2008; Mahesha et al., 2008). Hyperplasia of the nervous plexuses of the ENS is the morphological finding that defines IND B, but it is differently characterized by varying criteria (Meier-Ruge et al., 2006).

Based on the 1990 Frankfurt Consensus discussions, Borchard et al. (1991) established morphological criteria for the histopathological diagnosis of IND B using biopsies of the rectal wall. They proposed two mandatory criteria, submucosal plexus hyperplasia and increased activity of the AChE enzyme in nerve fibers around submucosal blood vessels, and two complementary criteria, the presence of neuronal heterotopy and increased AChE activity in the lamina mucosa (Borchard et al., 1991; Puri, 1997; Cord-Udy et al., 1997). Since then, these criteria have been widely used, both in clinical practice and in clinical follow-up studies and in investigations into the pathophysiology and etiopathogenesis of IND B (Schärli 1992; Koletzko et al., 1993; Sacher et al., 1993; Costa et al., 2000; Martucciello et al., 2002; Holschneider et al., 2008).

New diagnostic criteria were proposed in the 1990s, highlighting the need to identify giant ganglia in the submucosa, characterized by the presence of a minimum number of ganglion cells, ranging from six to more than ten per ganglion (Schofield & Yunis, 1991; Moore et al., 1994; Kobayashi et al., 1995; Meier-Ruge et al., 1995; Holschneider et al., 2008; Mahesha et al., 2008). In 2004, Meier-Ruge et al. proposed a quantitative criterion for the histopathological diagnosis of IND B, characterized by the presence of at least 20% of giant nerve ganglia in the submucosa, with more than eight ganglion cells present in each, analyzing a minimum of 25 submucosal nodes (Figure 1). Since the diagnosis depends on quantitative data, which can be compromised by technical variables, the entire laboratory process must be highly standardized. The biopsy must be adequate in order to obtain a sufficient quantity of submucosal tissue for analysis, and the freezing sections must be 15 µm thick and submitted to a specific histochemical panel composed of lactate dehydrogenase, succinyl dehydrogenase and nitric oxide (NO) synthase (Meier-Ruge et al., 2004; 2006).

However, although these criteria have been accepted by the scientific community, few case series reports have used them (Taguchi et al., 2014). The need for fresh material and specific histochemical stains, the availability of which is restricted to certain centers, are important limitations to diagnosis (Swaminathan et al., 2015; Toledo de Arruda Lourenção et al., 2016; Terra et al., 2017). It is also uncertain whether these criteria can be applied to 5 µm thick histological sections, from paraffin-embedded material, used for conventional histological analysis by hematoxylin and eosin (H&E) and for immunohistochemical methods (Schäppi et al., 2013; Terra et al., 2017). Taguchi et al. (2014) analyzed data from 161 Japanese gastroenterological and pediatric surgery institutions, from January 2000 to December 2009, and found 355

patients with HD and allied disorders. Of these, 13 patients had been diagnosed with IND B, based on the histopathological criteria commonly used, but only 4 patients met the quantitative criteria proposed by Meier-Ruge et al. (2004). Terra et al. (2017) analyzed surgical specimens from 29 patients diagnosed with IND B, previously established by the criteria of the Frankfurt Consensus (1990), in histological sections processed for conventional histology by H&E. Only one patient met the numerical diagnostic criteria proposed by Meier-Ruge et al. (2004). The authors concluded that the recommended quantitative criteria for 15 µm cuts, stained by specific histochemical panels, have limited applicability when transposed to conventional histological analysis.

Thus, the changes proposed in the last three decades have oriented the diagnostic criteria for quantifying the number of ganglion cells in the nervous plexuses of the ENS (Schofield & Yunis, 1991; Moore et al., 1994; Kobayashi et al., 1995; Meier-Ruge et al., 1995; Meier-Ruge et al., 2004; 2006). However, it is very complex to numerically distinguish that which is pathological from that which is normal, mainly due to the difficulty in determining a reliable control group composed of healthy children without intestinal symptoms (Koletzko et al., 1999; Meier-Ruge et al., 2006; Kapur & Reyes-Mugica; 2019; Angelini et al., 2019). Obtaining intestinal samples for use as controls has ethical limitations, because of the need for invasive procedures to obtain tissue samples. In some studies, the control group was composed of intestinal samples from patients with congenital intestinal malformations, such as anorectal abnormalities, which cannot be considered healthy controls (Kobayashi et al., 1995; Koletzko et al., 1999). In addition, the variation in the number of ganglion cells, related to age, especially during the first year of life, leads to the need for age-matched controls, making it difficult to develop an appropriate control group (Coerdts et al., 2004). The

thickness of the histological section, the staining techniques and the methods of histopathological analysis directly influence the number of ganglion cells identified in the count (Swaminathan et al., 2015; Terra et al., 2017). For all these reasons, the quantitative criteria seem to have contributed to more uncertainty rather than greater objectivity for a diagnosis of IND B. There are important divergences regarding the minimum number of ganglion cells and nerve ganglia, questions concerning the different methods of histopathological analysis, and the possibility of a minimum age for diagnosing this disease.

4. Uncertainties and recent advances

Pathophysiology and etiopathogenesis are poorly defined aspects in IND B (Martucciello et al., 2005; Holschneider et al., 2008). Some authors consider it as part of the normal development of the ENS (Friedmacher & Puri, 2013). As age advances, there is an increase in the size of ganglion cells and a decrease in their number per plexus (Schofield & Yunis, 1991; Meier-Ruge et al., 1995; Cord-Udy et al., 1997; Koletzko et al., 1999; Coerdts et al., 2004). These findings could be related to a physiological process of maturation, which involves apoptosis of components of the ENS (Meier-Ruge et al., 2004; 2006). Schimpl et al. (2004) retrospectively analyzed 105 patients with IND B: 60,95% were less than 6 months old, 30,47% were between 6 and 12 months old, and only 8,57% were more than a year old. This percentage distribution, decreasing with age, suggests a maturation process of the ENS or some abnormality in the development of the intestinal nervous system, with spontaneous normalization with the advance of age.

Other studies have raised the possibility that IND B represents an adaptive response of the ENS, secondary to obstructive or inflammatory bowel phenomena, occurring in the fetal, perinatal, or postnatal period. There are reports of morphological findings suggestive of IND B in areas of intestine immediately above intestinal atresia, rectal mucosa prolapse, imperforate anus, and necrotizing enterocolitis (Schofield & Yunis, 1991; Koletzko et al., 1993; Sacher et al., 1993; Holschneider et al., 1994; Lumb & Moore, 1998; Csury & Peña, 1995; Zorenkov et al., 2011). These secondary responses to obstructions or inflammations have been studied experimentally by several authors and their results are also conflicting (Pickard et al., 1981; Moore et al., 1993; Gálvez et al., 2004). Using a model of partial intestinal colon obstruction in rats,

Moore et al. (1993) showed a decrease in the number of ganglion cells compared with the control group, explained by an increase in colon diameter due to the distention of its wall. Using a model of chronic intestinal obstruction in adult rats, Gálvez et al. (2004) managed to identify histopathological changes compatible with IND B, with an increase in the number of ganglion cells.

Recent studies have shown that IND B can originate from genetic alterations, which directly influence the embryological development of tissues derived from the neural crest. Angelini et al. (2019) showed significantly unregulated expression of microRNAs in the submucosal and muscular layers of the colon and the peripheral blood of patients with IND B. The molecular pathways biologically regulated by these microRNAs (axon guidance, nerve growth factor signaling, NCAM signaling for neurite out-growth, neuronal system, and apoptosis) perform activities related to the ENS and, therefore, could be related to the pathogenesis of IND B. Liu et al. (2019) showed a decrease in methylation levels of locus 32 on the *Sox10* promoter gene in the peripheral blood of patients with IND B. There was a negative correlation between these levels and *Sox10* expression in the colon of these patients. These changes can contribute to the regulation of the number of intestinal glial cells and to the maturation of neurons in the ENS (Liu et al., 2019).

In addition, reports of familial occurrence of IND B and the association with other intestinal and extraintestinal diseases reinforce the theory that IND B has a primary, genetically determined origin (Kobayashi et al., 1996; Berger et al., 1998; Costa et al., 2000; Martucciello et al., 2002; Corduk et al., 2007; Fernández et al., 2009; Van der Welf et al., 2012; Friedmacher & Puri, 2013). Among these associations, we would

highlight HD, incomplete intestinal rotation, and multiple endocrine neoplasia type 2 (NEM 2) (Rintala et al., 1989; Martucciello et al., 1994, 2002; Ure et al., 1994).

Histopathological findings compatible with IND B in segments proximal to areas of aganglionosis are not uncommon and have been considered a possible cause of the persistence of obstructive symptoms in patients submitted to surgical treatment for HD. The first reports of this association date from the 1970s (Lassmann & Wurnig, 1973; Puri et al., 1977). Since then, the association between IND B and HD has been described with rates ranging from 6 to 75% of HD cases (Hanimann et al., 1992; Meier-Ruge 1992; Moore et al., 1994; Kobayashi et al., 1995; Banani et al., 1996; Meier-Ruge et al., 2006; Montedonico et al., 2011; Swaminathan et al. 2015). In these cases, the presence of colonic segments with IND B can be explained both by primary embryological alteration of the ENS, which gives rise to both neuropathies, and by secondary adaptation to distal intestinal obstruction, caused by the spastic aganglionic intestinal segment (Briner et al., 1986; Berry, 1993; Berger et al., 1998; Schmittenebecher et al., 1999; Kobayashi et al., 2004; Holschneider et al., 2008).

5. Immunohistochemistry and looking beyond the number of ganglion cells

Over the past two decades, a series of immunohistochemical markers have been proposed to assist in histopathological analysis of the ENS (Knowles et al., 2010; Schäppi et al., 2013; Wang et al., 2016; de Nanassy & Demellawy, 2017; Westfal & Goldstein, 2017; Galazka et al., 2020). The use of calretinin, well-established in HD, is the main example of how an immunohistochemical method can contribute substantially to the diagnosis of an enteric neuropathy. The absence of immunohistochemical expression of calretinin, in the investigation of ganglion cells and intrinsic nerve fibers, which occurs in colorectal segments with congenital aganglioneurosis, has been routinely used for HD diagnosis, and is part of the main guidelines for therapeutic management (Takawira et al., 2015; Veras et al., 2019). Several studies have assessed the role of immunohistochemical methods, both in investigating aspects related to etiopathogenesis and in improving the histopathological diagnosis of IND B. These studies are summarized in the table presented in Appendix 1.

Some of the hypotheses raised to explain aspects of IND B etiology came to light during the investigation of patterns of expression and the quantification of nerve cells by different immunohistochemical methods. Bosmann et al. (2001) identified an increase in the number of ganglion cells, with positive expression for NO synthase, in the intestine of patients with IND B compared with the control group. This enzyme is responsible for the synthesis of NO, a neurotransmitter capable of inducing smooth muscle relaxation that may be responsible for the clinical symptoms of intestinal pseudo-obstruction presented by patients.

Yamataka et al. (1997) showed a reduction in c-kit and 171B5 (synaptophysin) expression in the muscle layers, with the exception of the myenteric plexuses, in the intestine of patients with IND B compared with the control group. The c-kit protein is expressed in the interstitial cells of Cajal, considered to be regulators of gastrointestinal tract motor activity (Wester et al., 1999; Newman et al., 2003; Rolle et al., 2007). Synaptophysin is expressed in the protein membrane of synaptic vesicles, present in the neurotransmissions of the central and peripheral nervous system, including the ENS. The reduction in the expression of these two markers raises the hypothesis of the role of interstitial cells of Cajal in the pathophysiology of IND B (Yamataka et al., 1997).

Kobayashi et al. (1996) reported that the markers neural cell adhesion molecule (NCAM), growth-associated protein 43 (GAP43), and synaptophysin showed absence of expression or markedly decreased expression in the muscular layers of the intestine of patients with IND B compared with the control group. No change was observed in the expression of these markers in the nervous plexuses of the ENS. NCAM is a surface glycoprotein that is important for the interaction between neurons and muscle cells during synaptogenesis and is considered a marker of the neuromuscular junction (Kobayashi et al., 2003; Meyrat & Laurini, 2003; Dzienis-Kopronkiewicz et al., 2005). GAP43 is a marker associated with neuron development and regeneration during axonal growth and is found in high concentrations in presynaptic areas (Kobayashi et al., 1996). These changes in the expression patterns of these markers led the authors to propose the hypothesis that patients with IND B present defects in the innervation of neuromuscular junctions, which would explain the changes in colonic motility. However, Nogueira et al. (2011) were unable to reproduce this pattern of NCAM and synaptophysin expression, which weakens this hypothesis.

Kobayashi et al. (1999) showed an increase in the number of mast cells, identified by immunohistochemical method, in intestinal segments of patients with IND B and in aganglionic segments of HD patients, compared with the normoganglionic segments of HD patients and individuals in the control group. Mast cells were also identified by the marker nerve growth factor (NGF) close to the nerve ganglia in patients with IND B and close to the hypertrophied nerve trunks in aganglionic segments of HD. Based on these observations, the authors suggested the possible participation of mast cells in the pathogenesis of IND B and HD.

O'Donnell and Puri (2011) evaluated the immunohistochemical expression of the phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten (PTEN) in patients with IND B. PTEN is a protein involved in processes of cell proliferation, survival, and migration, presenting a potential modulatory role in neurogenesis and synaptic plasticity. PTEN promotes dephosphorylation of phosphatidylinositol 3,4,5 triphosphate (PIP3) in phosphatidylinositol 3,4 bisphosphate (PIP2), resulting in inhibition of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway related to cell proliferation. The authors showed significantly reduced expression for this marker in the myenteric and submucosal plexuses of the intestine of patients with IND B, absence of PTEN expression in the aganglionic segments of HD patients, and strongly positive expression in ganglionic intestinal segments of HD patients and individuals in the control group. Based on these results, the authors raised the possibility that the giant ganglia, with immature cells, present in IND B may be associated with a reduction in PTEN that could be responsible for a lack of control in neuronal growth and proliferation.

Other studies have investigated the possibility of using immunohistochemical markers for diagnosing IND B. Some markers have demonstrated the potential to assist in neuron counting, which is fundamental to proposals for quantitative diagnosis of IND B. Geramizadeh et al. (2013) evaluated the immunohistochemical expression of the protein gene product 9.5 (PGP9.5), a specific cytoplasmic marker for the nervous system, S100, a nerve cell nucleus and cytoplasm marker, c-kit, synaptophysin, and NCAM, to count nerve cells in the muscle layers and myenteric plexuses of the distal colon of patients with HD, IND B, and the control group. The authors showed a significantly higher number of nerve cells, stained by these immunohistochemical methods, in the muscle layers and/or the myenteric plexuses in patients with IND B compared with HD patients. However, this difference was not significant when patients with IND B were compared with the control group. Kim et al. (2010) showed no significant differences in the counts of interstitial cells of Cajal (c-kit immunopositive) in muscle layers and myenteric plexuses in patients with IND B, compared with patients who had other types of intestinal pseudo-obstructions.

Swaminathan et al. (2015) evaluated the use of the pan-neuronal immunohistochemical marker Hu C/D in the quantitative analysis of ganglion cells in colonic segments with IND-like submucosal ganglion cell hyperplasia at the proximal margins of HD resections. This marker detects neuronal cell bodies, facilitating the individual recognition of neurons, and has been used as a neuronal marker for central and peripheral nervous systems, including the ENS (Yoshimaru et al., 2017). By counting the nuclei of ganglion cells immunoexpressing Hu, the authors were able to quantify the number of ganglion cells per ganglion, the number of submucosal ganglia and the distance between ganglion cells. Based on this count, it was possible to develop and validate a quantitative histopathological criterion for the diagnosis of giant

ganglia, defined by the presence of at least seven ganglion cells, according to the significant differences observed between the number of cells in the segments with hyperplasia and in the colon of individuals in the control group (Swaminathan et al., 2015).

Wang et al. (2016) determined the number of ganglion cells and the area of myenteric nerve plexuses using immunohistochemical expression for the RET protein, which is encoded by the *RET* gene and is related to cell growth and differentiation, and for B-cell lymphoma 2 (Bcl-2), a protein encoded by the homonymous gene located on chromosome 18q21, which has a role related to the maintenance of cell survival. The authors identified a significantly higher number of ganglion cells and larger myenteric plexus area in the colon of patients with IND B compared with the control group.

Different immunohistochemical expression patterns for a series of markers have also been identified in the intestinal segments of patients with IND B, with the potential to assist in histopathological diagnosis. Among these, we would highlight a decrease in the expression of synaptophysin in the muscle layers (Kobayashi et al., 1996; 1997), a decrease in or loss of NCAM expression (Kobayashi et al., 1996; Kim et al., 2010) and GAP43 (Kobayashi et al., 1996) in the muscle layers, and the identification of ectopic myenteric plexuses by the RET protein (Wang et al., 2016). Wang et al. (2016) showed a differentiated expression pattern between calretinin, which is expressed in mature ganglion cells and nerve fibers, and Bcl-2, which is expressed in immature ganglion cells, and suggested an immunohistochemical panel composed of these markers, which could be useful in the differential diagnosis between HD and IND B. Terra et al. (2017) identified expression for calretinin in nerve plexus ganglion cells and in mucosal nerve fibers in 29 patients with IND B. Immunoexpression for this marker

was observed in ectopic neurons, present in the lamina propria and in the muscularis mucosa (Figure 2), not previously identified by standard histology (H&E).

Many of these immunohistochemical methods have stained and identified other ENS structures, in addition to the ganglion cells of the submucosa and muscular nerve plexuses. These structures could be related to the etiopathogenesis of IND B and may be potential candidates for biomarkers in the histopathological diagnosis of this disease.

6. Conclusion

Intestinal neuronal dysplasia type B remains a controversial clinicopathological entity, with a poorly understood etiopathogenesis and a series of difficulties related to its diagnosis. Despite these uncertainties, patients continue to present with severe constipation or intestinal obstruction, associated with histopathological alterations compatible with this morphological phenotype, which fully justifies all the effort directed towards new diagnostic perspectives. Only the correct diagnosis of these patients can lead to more effective treatments and better prognosis. In this regard, immunohistochemical techniques have been presented as potential adjuvants for histopathological diagnosis, expanding the horizon beyond counting the number of ganglion cells.

7. References

Angelini MC, Silva AM, Felix TF, Lapa RML, Terra SA, Rodrigues MAM, Ortolan EVP, Reis PP, Lourenção PLTA. Identification of potential molecular pathogenesis mechanisms modulated by microRNAs in patients with Intestinal Neuronal Dysplasia type B. *Scientific Reports*. 2019; 9:17673.

Banani SA, Forootan HR, Kumar PV. Intestinal Neuronal Dysplasia as a cause of surgical failure in Hirschsprung's Disease: a new modality for surgical management. *Journal of Pediatric Surgery*. 1996; 31(4):572-4.

Berger S, Ziebell P, Offsler M, Hofmann-von Kap-herr S. Congenital malformations and perinatal morbidity associated with intestinal neuronal dysplasia. *Pediatr Surg Int*. 1998; 13(7):474-9.

Berry CL. Intestinal neuronal dysplasia: does it exist or has it been invented? *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*. 1993; 422(3):183-4.

Borchard F, Meier-Ruge W, Wiebecke B, Briner J, Müntefering H, Födisch HF, Holschneider AM, Schmidt A, Enck P, Stolte M. Disorders of the innervation of the large intestine--classification and diagnosis. Results of a consensus conference of the Society of Gastroenteropathology 1 December 1990 in Frankfurt. *Pathologe*. 1991; 12(3):171-4.

Bosman C, Devito R, Fusilli S, Boldrini R. A New Hypothesis on the Pathogenesis of Intestinal Pseudo-obstruction by Intestinal Neuronal Dysplasia (IND). *Pathol. Res. Pract*. 2001; 197:789-96.

Briner J, Oswald HW, Hirsig J, Lehner M. Neuronal intestinal dysplasia--clinical and histochemical findings and its association with Hirschsprung's disease. *Z Kinderchir*. 1986; 41:282-6.

Coerdts W, Michel JS, Rippin G, Kletzki S, Gerein V, Müntefering H, Arnemann J. Quantitative morphometric analysis of the submucous plexus in age-related control groups. *Virchows Arch*. 2004; 444(3):239-46.

* Referências Bibliográficas elaboradas de acordo com o International Committee of Medical Journal Editors. *Ann Intern Med*. 1997; 26: 36-47.

Cord-Udy CL, Smith VV, Ahmed S, Risdon RA, Milla PJ. An evaluation of the role of suction rectal biopsy in the diagnosis of intestinal neuronal dysplasia. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1997; 24(1):1-6

Corduk N, Koltuksuz U, Bir F, Karabul M, Herek O, Sarioglu-Buke A. Association of rare intestinal malformations: colonic atresia and intestinal neuronal dysplasia. *Adv Ther.* 2007; 24(6):1254-9.

Costa M, Fava M, Seri M, Cusano R, Sancandi M, Forabosco P, Lerone M, Martucciello G, Romeo G, Ceccherini I. Evaluation of the HOX11L1 gene as a candidate for congenital disorders of intestinal innervation. *J Med Genet.* 2000; 37(7):E9.

Csury L, Peña A. Intestinal neuronal dysplasia. *Pediatr Surg Int.* 1995; 10:441-6.

de la Torre Mondragón L, Reyes-Múgica M (2006) R.I.P. for IND B. *Pediatr and Develop Pathol.* 2006; 9(6): 425-6.

de Nanassy J, Demellawy DL. Review of Current Applications of Immunohistochemistry in Pediatric Nonneoplastic Gastrointestinal, Hepatobiliary, and Pancreatic Lesions. *Analytical Chemistry Insights.* 2017; 12:1–11.

Dzienis-Koronkiewicz E, Debek W, Chyczewski L. Use of Synaptophysin Immunohistochemistry in Intestinal Motility Disorders. *Eur J Pediatr Surg.* 2005; 15(6):392-8.

Fernández RM, Sánchez-Mejías A, Ruiz-Ferrer MM, López-Alonso M, Antiñolo G, Borrego S. Is the RET proto-oncogene involved in the pathogenesis of intestinal neuronal dysplasia type B? *Mol Med Rep.* 2009; 2(2):265-70.

Friedmacher F, Puri P. Classification and diagnostic criteria of variants of Hirschsprung's disease. *Pediatr Surg Int.* 2013; 29(9):855-72.

Galazka P, Szyberg L, Bodnar M, Styczynski J, Marszalek A. In Vivo. Diagnostic Algorithm in Hirschsprung's Disease: Focus on Immunohistochemistry Markers. *In Vivo.* 2020; 34:1355-9.

Gálvez Y, Skába R, Vajtrová R, Frantlová A, Herget J. Evidence of secondary neuronal intestinal dysplasia in a rat model of chronic intestinal obstruction. *J Invest Surg.* 2004; 17(1):31-9.

Geramizadeh B, Akbarzadeh E, Izadi B, Foroutan HR, Heidari T. Immunohistochemical study of enteric nervous system in hirschsprung's disease and intestinal neuronal dysplasia. *Histol Histopathol.* 2013; 28(3):345-51.

Gillick J, Tazawa H, Puri P. Intestinal neuronal dysplasia: results of treatment in 33 patients. *J Pediatr Surg.* 2001; 36(5):777-9.

Hanimann B, Inderbitzin D, Briner J, Sacher P. Clinical Relevance of Hirschsprung-associated Neuronal Intestinal Dysplasia (HANID). *Eur J Pediatr Surg.* 1992; 2(3):147-9.

Holschneider AM, Pfrommer W, Gerresheim B. Results in the treatment of anorectal malformations with special regard to the histology of the rectal pouch. *Eur J Pediatr Surg.* 1994; 4(5):303-9.

Holschneider AM, Puri P, Homrighausen LH, Meier-Ruge W. Intestinal Neuronal Malformation (IND): Clinical Experience and Treatment. In: Holschneider AM, Puri P, editors. *Hirschsprung's disease and allied disorders*. 3rd ed. Berlin Heidelberg New York: Springer; 2008; 229-51.

Jáquez-Quintana JO, González-González JA, Arana-Guajardo AC, Larralde-Contreras L, Flores-Gutiérrez JP, Maldonado-Garza HJ. Sigmoid volvulus as a presentation of neuronal intestinal dysplasia type B in an adolescent. *Rev Esp Enferm Dig.* 2013; 105(3):178-9.

Junquera Bañares S, Oria Mundín E, Córdoba Iturriagagoitia A, Botella-Carretero JJ. Chronic intestinal pseudo-obstruction due to intestinal neuronal dysplasia type B (IND B), concerning one case. *An Sist Sanit Navar.* 2014; 37(1):157-64.

Kapur RP, Reyes-Mugica M. Intestinal neuronal dysplasia type B: an updated review of a problematic diagnosis. *Arch Pathol Lab Med.* 2019; 143:235-43.

Kim HK, Cheong H, Kang H, Bae JY, Song DE, Cho MS, Sung SW, Han WS, Koo H. Histopathological Evaluation of Pediatric Intestinal Pseudo-Obstruction: Quantitative Morphometric Analysis of Pathological Changes in the Enteric Nervous System. *The Korean Journal of Pathology* 2010;44(2): 162-172.

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.

Kobayashi H, Hirakawa H, Puri P. What are the diagnostic criteria for intestinal neuronal dysplasia? *Pediatr Surg Int*. 1995; 10:459–64.

Kobayashi H, Mahomed A, Puri P. Intestinal neuronal dysplasia in twins. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1996; 22(4):398-401.

Kobayashi H, Miyano T, Yamataka A, Lane GJ, Fujimoto T, Puri P. Use of synaptophysin polyclonal antibody for the rapid intraoperative immunohistochemical evaluation of functional bowel disorders. *J Pediatr Surg*. 1997 Jan;32(1):38-40.

Kobayashi H, Yamataka A, Fujimoto T, Lane GJ, Miyano T. Mast Cells and Gut Nerve Development: Implications for Hirschsprung's Disease and Intestinal Neuronal Dysplasia. *Journal of Pediatric Surgery*. 1999; 34(4):543-8.

Kobayashi H, Yamataka A, Lane GJ, Miyano T. 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; 39(2):152-6.

Koletzko S, Ballauff A, Hadziselimovic F, Enck P. Is histological diagnosis of neuronal intestinal dysplasia related to clinical and manometric findings in constipated children? Results of a pilot study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1993; 17(1):59-65.

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. Rectal biopsy for diagnosis of intestinal neuronal dysplasia in children: a prospective

multicentre study on interobserver variation and clinical outcome. *Gut*. 1999; 44(6):853-61.

Krammer HJ, Meier-Ruge W, Sigge W, Eggers R, Kühnel W. Histopathological features of neuronal intestinal dysplasia of the plexus submucosus in whole mounts revealed by immunohistochemistry for PGP 9.5. *Eur J Pediatr Surg*. 1994 Dec; 4(6):358-61.

Liu YR, Ba F, Cheng LJ, Li X, Zhang SW, Zhang SC. Efficacy of Sox10 Promoter Methylation in the Diagnosis of Intestinal Neuronal Dysplasia From the Peripheral Blood. *Clinical and Translational Gastroenterology*. 2019; 10:e00093.

López Sanclemente MC, Castellvi J, Ortiz de Zárate L, Barrios P. Intestinal neuronal dysplasia in a patient with chronic colonic pseudo-obstruction. *Cir Esp*. 2014; 92(10):e59.

Lumb PD, Moore L. Are giant ganglia a reliable marker of intestinal neuronal dysplasia type B (IND B)? *Virchows Arch*. 1998; 432(2):103-6.

Mahesha V, Saikia UN, Shubha AV, Rao KL. Intestinal neuronal dysplasia of the myenteric plexus--new entity in humans? *Eur J Pediatr Surg*. 2008; 18(1):59-60.

Martucciello G, Caffarena PE, Lerone M, Mattioli G, Barabino A, Bisio G, Jasonni V. Neuronal intestinal dysplasia: clinical experience in Italian patients. *Eur J Pediatr Surg*. 1994; 4(5):287-92.

Martucciello G, Torre M, Pini Prato A, Lerone M, Campus R, Leggio S, Jasonni V. Associated anomalies in intestinal neuronal dysplasia. *J Pediatr Surg*. 2002; 37(2):219-23.

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.

Mattioli G, Castagnetti M, Martucciello G, Jasonni V. Results of a mechanical Duhamel pull-through for the treatment of Hirschsprung's disease and intestinal neuronal dysplasia. *J Pediatr Surg*. 2004; 39(9):1349-55.

Meier-Ruge WA. Casuistic of colon disorder with symptoms of Hirschsprung's disease (author's transl). *Verh Dtsch Ges Pathol*. 1971; 55:506-10.

Meier-Ruge WA. Epidemiology of congenital innervations defects of the distal colon. *Virchows Archiv A Pathol Anat*. 1992; 420:171-7.

Meier-Ruge WA, Brönnimann PB, Gambazzi F, Schmid PC, Schmidt CP, Stoss F. Histopathological criteria for intestinal neuronal dysplasia of the submucosal plexus (type B). *Virchows Arch*. 1995; 426(6):549-56.

Meier-Ruge WA, Schmidt PC, Stoss FS. Intestinal neuronal dysplasia and its morphometric evidences. *Pediatr Surg Int*. 1995; 10:447-53.

Meier-Ruge WA, Ammann K, Bruder E, Holschneider AM, Schärli AF, Schmittenebecher PP, Stoss F. Updated results on intestinal neuronal dysplasia (IND B). *Eur J Pediatr Surg*. 2004; 14(6):384-91.

Meier-Ruge WA, Bruder E, Kapur RP. Intestinal neuronal dysplasia type B: one giant ganglion is not good enough. *Pediatr Dev Pathol*. 2006; 9(6):444-52.

Meyrat BJ, Laurini RN. Plasticity of the enteric nervous system in patients with intestinal neuronal dysplasia associated with Hirschsprung's disease: a report of three patients. *Pediatr Surg Int*. 2003; 19:715–20.

Montedonico S, Acevedo S, Fadda B. Clinical aspects of intestinal neuronal dysplasia. *J Pediatr Surg*. 2002; 37(12):1772-4.

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; 27:479–86.

Moore SW, Laing D, Melis J, Cywes S. Secondary effects of prolonged intestinal obstruction on the enteric nervous system in the rat. *J Pediatr Surg.* 1993; 28(9):1196-9.

Moore SW, Laing L, Kaschula ROC, Cywes S. A histological grading system for the evaluation of co-existing NID with Hirschsprung's disease. *Eur J Pediatr Surg.* 1994; 4:293-7.

Muto M, Matsufuji H, Taguchi T, Tomomasa T, Nio M, Tamai H, Tamura M, Sago H, Toki A, Nosaka S, Kuroda T, Yoshida M, Nakajima A, Kobayashi H, Sou H, Masumoto K, Watanabe Y, Kanamori Y, Hamada Y, Yamataka A, Shimojima N, Kubota A, Ushijima K, Haruma K, Fukudo S, Araki Y, Kudo T, Obata S, Sumita W, Watanabe T, Fukahori S, Fujii Y, Yamada Y, Jimbo K, Kawai F, Fukuoka T, Onuma S, Morizane T, Ieiri S, Esumi G, Jimbo T, Yamasaki T. Japanese clinical practice guidelines for allied disorders of Hirschsprung's disease, 2017. *Pediatr Int.* 2018 May; 60(5):400-10.

Newman CJ, Laurini RN, Lesbros Y, Reinberg O, Meyrat BJ. Interstitial cells of Cajal are normally distributed in both ganglionated and aganglionic bowel in Hirschsprung's disease. *Pediatr Surg Int.* 2003; 19:662-8.

Nezelof C, Guy-Grand D, Thomine E. Megacolon with hyperplasia of the myenteric plexus. An anatomo-clinical entity, apropos of 3 cases. *Presse Med.* 1970; 78(34):1501-6.

Nogueira A, Campos M, Soares-Oliveira M, Estevão-Costa J, Silva P, Carneiro F, Carvalho JL. Histochemical and immunohistochemical study of the intrinsic innervation in colonic dysganglionosis. *Pediatr Surg Int.* 2001; 17(2-3):144-51.

O'Donnell AM, Puri P. A role for PTEN in paediatric intestinal dysmotility disorders. *Pediatr Surg Int.* 2011; 27:491-3.

Peng SS, Lee WT, Hsui WM. An unusual cause of abdominal distension in a 4-year-old boy. Neuronal intestinal dysplasia. *Gastroenterology.* 2011; 141(4):e3-4.

Pickard LR, Santoro S, Wyllie RG, Haller JA Jr. Histochemical studies of experimental fetal intestinal obstruction. *J Pediatr Surg.* 1981; 16(3):256-60.

Pini-Prato A, Avanzini S, Gentilino V, Martucciello G, Mattioli G, Coccia C, Parodi S, Bisio GM, Jasonni V. Rectal suction biopsy in the workup of childhood chronic constipation: indications and diagnostic value. *Pediatr Surg Int.* 2007; 23(2):117-22.

Puri P. Intestinal neuronal dysplasia. *Semin Pediatr Surg.* 1997; 12:259-64.

Rintala R, Rapola J, Louhimo J. Neuronal intestinal dysplasia. *Prog Pediatr Surg.* 1989; 24:186-92.

Rolle U, Piaseczna-Piotrowska A, Puri P. Abnormal vasculature in intestinal neuronal dysplasia. *Pediatr Surg Int.* 2003; 19:345-8.

Rolle U, Piaseczna-Piotrowska A, Puri P. Interstitial cells of Cajal in the normal gut and in intestinal motility disorders of childhood. *Pediatr Surg Int.* 2007; 23(12):1139-52.

Sacher P, Briner J, Stauffer UG. Unusual cases of neuronal intestinal dysplasia. *Pediatr Surg Int.* 1991; 6:225-6.

Sacher P, Briner J, Hanimann B. Is neuronal intestinal dysplasia (NID) a primary disease or a secondary phenomenon? *Eur J Pediatr Surg.* 1993; 3(4):228-30.

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.

Schärli AF. Neuronal Intestinal dysplasia. *Pediatr Surg Int.* 1992; 7:2-7.

Schärli AF, Meier-Ruge W. Localized and disseminated forms of neuronal intestinal dysplasia mimicking Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg.* 1981; 16:164-70.

Schimpl G, Uray E, Ratschek M, Höllwarth ME. Constipation and intestinal neuronal dysplasia type B: a clinical follow-up study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2004; 38(3):308-11.

Schmittenebecher PP, Sacher P, Cholewa D, Haberlik A, Menardi G, Moczulski J, Rumlova E, Schuppert W, Ure B. Hirschsprung's disease and intestinal neuronal

dysplasia--a frequent association with implications for the postoperative course. *Pediatr Surg Int.* 1999; 15(8):553-8.

Schmittenebecher PP, Glück M, Wiebecke B, Meier-Ruge W. Clinical long-term follow-up results in intestinal neuronal dysplasia (IND). *Eur J Pediatr Surg.* 2000; 10(1):17-22.

Schofield DE, Yunis EJ. Intestinal neuronal dysplasia. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1991; 12:182–89.

Swaminathan M, Oron AP, Chatterjee S, Piper H, Cope-Yokoyama S, Chakravarti A, et al. Intestinal neuronal dysplasia-like submucosal ganglion cell hyperplasia at the proximal margins of Hirschsprung disease resections. *Pediatr Dev Pathol.* 2015; 18:466-76.

Tabbers MM, Di Lorenzo C, Berger MY, Faure C, Langendam MW, Nurko S, Staiano A, Vandenplas Y, Benninga MA; European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition; North American Society for Pediatric Gastroenterology. Evaluation and treatment of functional constipation in infants and children: evidence-based recommendations from ESPGHAN and NASPGHAN. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2014; 58(2):258-74

Taguchi T, Kobayashi H, Kanamori Y, Segawa O, Yamataka A, Sugiyama M, Iwanaka T, Shimojima N, Kuroda T, Nakazawa A, Oda Y, Miyoshi K, Ieiri S. Isolated intestinal neuronal dysplasia Type B (IND-B) in Japan: results from a nationwide survey. *Pediatr Surg Int.* 2014; 30(8):815-22.

Takawira C, D'Agostini S, Shenouda S, Persad R, Sergi C. Laboratory Procedures Update on Hirschsprung Disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2015; 60:598–605.

Tang ST, Yang Y, Wang GB, Tong QS, Mao YZ, Wang Y, Li SW, Ruan QL. Laparoscopic extensive colectomy with transanal Soave pull-through for intestinal neuronal dysplasia in 17 children. *World J Pediatr.* 2010; 6(1):50-4.

Terra SA, Lourenção PLTA, Silvia MG, Miot HA, Rodrigues MAM. A critical appraisal of the morphological criteria for diagnosing intestinal neuronal dysplasia type B. *Mod Pathol*. 2017; 30:978-85.

Toledo de Arruda Lourenção PL, Terra AS, Ortolan EVP, Rodrigues MAM. Intestinal neuronal dysplasia type B: A still little known diagnosis for organic causes of intestinal chronic constipation. *World J Gastrointest Pharmacol Ther*. 2016; 7:397-405.

Ure BM, Holschneider AM, Meier-Ruge W. Neuronal intestinal dysplasia malformations: a retro and prospective study in 203 patients. *Eur J Pediatr Surg*. 1994; 4:279-86.

Van Der Werf CS, Wabbersen TD, Hsiao NH, Paredes J, Etchevers HC, Kroisel PM, Tibboel D, Babarit C, Schreiber RA, Hoffenberg EJ, Vekemans M, Zeder SL, Ceccherini I, Lyonnet S, Ribeiro AS, Seruca R, Te Meerman GJ, van Ijzendoorn SC, Shepherd IT, Verheij JB, Hofstra RM. CLMP is required for intestinal development, and loss-of-function mutations cause congenital short-bowel syndrome. *Gastroenterology*. 2012; 142(3):453-462.e3.

Veras LV, Arnold M, Avansino JR, Bove K, Cowles RA, Durham MM, Goldstein AM, Krishnan C, Langer JC, Levitt M, Monforte-Munoz H, Rabah R, Reyes-Mugica M, Rollins MD, Kapur RP, Gosain A. Guidelines for synoptic reporting of surgery and pathology in Hirschsprung disease. *Journal of Pediatric Surgery*. 2019; 54:2017–23.

Vijayaraghavan R, Chandrashekar R, Melkote Jyotiprakash A, Kumar R, Rashmi MV, Shanmukhappa Belagavi C. Intestinal neuronal dysplasia (type B) causing fatal small bowel ischaemia in an adult: a case report. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2006; 18(7):773-6.

Voderholzer WA, Wiebecke B, Gerum M, Müller-Lissner SA. Dysplasia of the submucous nerve plexus in slow-transit constipation of adults. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2000; 12(7):755-9.

Vougas V, Vardas K, Christou C, Papadimitriou G, Florou E, Magkou C, Karamanolis D, Manganas D, Drakopoulos S. Intestinal neuronal dysplasia type B in adults: a controversial entity. *Case Rep Gastroenterol*. 2014; 9;8(1):7-12.

Wang SQ, Zhu J, Wang Y, Zhao ZB, Li XQ, Li SS, Jin XQ, Guo ZH. Utilization of RET, Bcl-2 and CR immunohistochemistry in the diagnosis of Hirschsprung disease and its allied disorders. *Int J Clin Exp Pathol*. 2016; 9(10):10390-7.

Wester T, Eriksson L, Olsson Y, Olsen L. Interstitial cells of Cajal in the human fetal small bowel as shown by c-kit immunohistochemistry. *Gut*. 1999; 44:65–71.

Westfal ML, Goldstein AM. Pediatric enteric neuropathies: diagnosis and current management. *Curr Opin Pediatr*. 2017; 29:0–0.

Yamataka A, Ohshiro K, Kobayashi H, Fujiwara T, Sunagawa M, Miyano T. Intestinal Pacemaker C-KIT+ Cells and Synapses in Allied Hirschsprung's Disorders. *Journal of Pediatric Surgery*. 1997; 32(7):1069-74.

Yoshimaru K, Taguchi T, Obata S, Takemoto J, Takahashi Y, Iwanaka T, Yanagi Y, Kuda M, Miyoshi K, Matsuura T, Kinoshita Y, Yoshioka T, Nakazawa A, Oda Y. Immunostaining for Hu C/D and CD56 is useful for a definitive histopathological diagnosis of congenital and acquired isolated hypoganglionosis. *Virchows Arch*. 2017.

Zani A, Eaton S, Morini F, Puri P, Rintala R, Heurn EV, et al. European Paediatric Surgeons' Association Survey on the management of Hirschsprung Disease. *Eur J Pediatr Surg*. 2017; 27:96-101.

Zorenkov D, Otto S, Böttner M, Hedderich J, Vollrath O, Ritz JP, Buhr H, Wedel T. Morphological alterations of the enteric nervous system in young male patients with rectal prolapse. *Int J Colorectal Dis*. 2011; 26(11):1483-91.



Capítulo II

Artigo

*Usefulness of Hu C/D and
PTEN Immunohistochemistry in
the Diagnosis of Intestinal
Neuronal Dysplasia type B.*

Resumo

Introdução: A Displasia neuronal intestinal do tipo B (DNI-B) é uma entidade complexa que compromete o sistema nervoso entérico e se manifesta clinicamente com constipação intestinal grave na infância. O diagnóstico é estabelecido por análise histopatológica de biópsias do reto. Contudo, os critérios para o diagnóstico morfológico têm sido modificados, dificultando a interpretação diagnóstica. **Objetivos:** Analisar a aplicabilidade dos marcadores neurais imuno-histoquímicos Hu C/D e PTEN na investigação diagnóstica de pacientes com DNI-B. **Pacientes e Métodos:** Foram analisadas retrospectivamente amostras de cólon distal de 29 crianças com diagnóstico prévio de DNI-B e de 10 crianças do grupo controle. As amostras foram submetidas à análise histológica convencional pela hematoxilina & eosina (H&E) e à análise imuno-histoquímica pelo Hu C/D e PTEN. A análise quantitativa dos neurônios nos plexos nervosos submucosos e mioentéricos foi feita pelos métodos H&E e Hu C/D. O padrão de expressão imuno-histoquímica do PTEN foi analisado nos plexos nervosos submucosos, mioentéricos e nos filetes nervosos da camada muscular própria. **Resultados:** O método Hu C/D promoveu aumento significativo da identificação do número de neurônios nos plexos nervosos, quando comparado ao método H&E. Entretanto a análise quantitativa dos neurônios pelo Hu C/D não discriminou o grupo DNI-B do grupo controle. O grupo DNI-B apresentou ausência ou perda da expressão do PTEN nos plexos nervosos submucosos e mioentéricos e nos filetes nervosos da camada muscular própria, enquanto a expressão do PTEN foi positiva nas mesmas estruturas neurais do grupo controle. **Conclusão:** O método imuno-histoquímico do Hu C/D e o PTEN podem ser aplicados na análise

histopatológica de amostras de intestino de pacientes em investigação diagnóstica para DNI-B.

Abstract

Introduction: Intestinal neuronal dysplasia type B (IND-B) is a complex entity involving the enteric nervous system, clinically manifested with chronic intestinal constipation in infancy. The diagnosis has been established by histopathologic analysis of rectal biopsies. However, the criteria for the diagnosis have been questioned and modified, hindering the diagnostic practice. **Aim:** To analyse the applicability of neural immunohistochemical markers Hu C/D and PTEN on the diagnosis of IND-B. **Patients and Methods:** Samples of the distal colon from 29 patients, aged 0-16 years old diagnosed with IND-B and from 10 age matched control patients were retrospectively analyzed for conventional histology (H&E) and Hu C/D and PTEN immunohistochemistry. Quantitative analysis of neurons in submucosal and mioenteric nerve plexi was performed by H&E and Hu C/D immunostaining. The pattern of PTEN immunohistochemical expression was analysed in the submucosal and mioenteric nerve plexi and nerve fibrils in muscularis propria. **Results:** Hu C/D immunostaining significantly increased neuron counting in the nerve plexi as compared to conventional histology by H&E. However quantitative analysis of neurons by Hu C/D was not able to distinguish IND-B from control cases. Loss or absence of reactivity for PTEN was observed in nerve fibrils from submucosal and mioenteric nerve plexi and in nerve fibrils of the muscularis propria in all cases of IND-B as compared with the same neural structures from the control group. **Conclusion:** Immunohistochemistry for Hu C/D and PTEN may be a useful tool in the diagnostic evaluation of IND-B.

1. Introdução

A Displasia Neuronal Intestinal tipo B (DNI-B) é uma condição patológica que afeta os plexos nervosos do sistema nervoso entérico, de forma isolada ou em associação com outras neuropatias congênicas, como a Doença de Hirschsprung (DH)^{1, 2}. Mais de 40 anos após sua descrição original³, a DNI-B permanece como entidade de patogenia pouco conhecida e, em consequência, com aspectos controversos relacionados ao seu diagnóstico e tratamento^{2, 4-7}.

A suspeita diagnóstica para esta doença surge em pacientes com constipação intestinal grave, incluindo recém-nascidos que podem evoluir com episódios de obstrução intestinal aguda, e crianças mais velhas, com pouca resposta ao tratamento convencional^{5, 6}. Estes pacientes devem ser investigados para possíveis causas orgânicas de constipação intestinal na infância, particularmente DH, a mais prevalente das doenças congênicas do sistema nervoso entérico^{1, 8}.

O ponto central nesta investigação é a realização de biópsias de reto, cuja análise histopatológica permite a definição diagnóstica das diferentes neuropatias intestinais^{1, 2, 8}. Entretanto, os critérios morfológicos para diagnóstico da DNI-B vêm sendo profundamente alterados ao longo dos anos, o que dificulta a prática diagnóstica e a comparação entre os estudos realizados e amplia as indefinições que cercam esta doença^{3, 6, 7, 9-15}. A hiperplasia dos plexos nervosos da submucosa é o achado morfológico que define a DNI-B, mas que é diferentemente caracterizada nos critérios propostos^{13, 15}.

A reunião de consenso ocorrida em Frankfurt, em 1990, estabeleceu critérios diagnósticos que vêm sendo utilizados tanto na prática clínica, como em estudos de seguimento clínico e em pesquisas sobre a fisiopatologia e a etiopatogenia da DNI-B^{6, 12, 15-20}. Estes critérios são embasados na análise qualitativa dos plexos nervosos, através da histologia padrão pela hematoxilina e eosina (H&E) e da pesquisa histoquímica da acetilcolinesterase (AChE)¹².

Novos critérios foram posteriormente propostos, com ênfase na quantificação do número de gânglios gigantes na submucosa para o diagnóstico de DNI-B^{8, 20}. Esses gânglios gigantes foram definidos pela presença de um número mínimo de células ganglionares, que variam de 6 a mais de 10 por gânglio, nos diferentes critérios^{6, 9, 10, 21-23}. A proposta quantitativa mais recente é a de Meier-Ruge et al. (2004)¹³ definida pela presença de ao menos 20% de gânglios nervosos gigantes na submucosa, com mais de oito células ganglionares presentes em cada um, em um mínimo de 25 gânglios submucosos^{13, 14}. Apesar de ter sido aceita pela comunidade científica, poucos são os relatos de séries de casos que os tenham utilizado^{15, 24}. A necessidade de material a fresco e de colorações histoquímicas específicas e a impossibilidade de serem transpostos à análise de cortes histológicos processados pela H&E ou por métodos imuno-histoquímicos, restringem sua utilização a poucos centros de pesquisa, distanciando-a da prática clínica^{7, 15, 24, 25}.

Uma série de marcadores imuno-histoquímicos vem sendo propostos para auxiliar na análise histopatológica do sistema nervoso entérico^{1, 2, 26-29}. O uso da calretinina, bem estabelecido na DH, é o principal exemplo de como um método imuno-histoquímico pode contribuir substancialmente para o diagnóstico de uma neuropatia entérica^{11, 30-37}. Alguns estudos avaliaram o potencial de métodos imuno-

histoquímicos para a determinação numérica de neurônios, buscando atender os critérios quantitativos para o diagnóstico de DNI-B^{15, 25, 38-41}. Outros estudos investigaram alterações na expressão imuno-histoquímica de uma série de marcadores, em estruturas neuromusculares da parede intestinal, com objetivo de auxiliar no diagnóstico morfológico de DNI-B^{15, 26, 42-48}.

O marcador imuno-histoquímico pan-neuronal Hu C/D demonstrou-se útil para análise quantitativa de células ganglionares²⁵. Por meio da contagem dos núcleos das células ganglionares imunoexpressando Hu, Swaminathan et al. (2015) quantificaram o número de células ganglionares por gânglio, o número de gânglios submucosos e a distância entre as células ganglionares. A partir das diferenças significativas encontradas entre segmentos colônicos com “Hiperplasia de célula ganglionar da submucosa tipo DNI nas margens proximais das ressecções de DH” (*Intestinal Neuronal Dysplasia-like submucosal ganglion cell hyperplasia at the proximal margins of Hirschsprung Disease resections*), e o cólon de indivíduos do grupo controle, os autores validaram um critério quantitativo para o diagnóstico de gânglios gigantes, definidos pela presença de ao menos 7 células ganglionares²⁵.

Outro método que demonstrou potencial para auxiliar no diagnóstico morfológico foi a imuno-histoquímica do homólogo da fosfatase e tensina deletado no cromossomo dez (*Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome TEN*, PTEN). O PTEN é um gene que codifica a proteína PTEN, composta por 403 aminoácidos da família das proteínas tirosino-fosfatases. Esta proteína promove a desfosforilação do fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato (PIP3) em fosfatidilinositol 3,4 bifosfato (PIP2), resultando em inibição da via de sinalização PI3K/AKT/mTOR, relacionada a proliferação celular. Desta maneira, a presença de PTEN reduz a

concentração de PIP3, regulando negativamente esta via. Por outro lado, a ausência de PTEN aumenta a concentração de PIP3, elevando a atividade de serina-treonina quinase AKT, que regula diversas proteínas relacionadas à proliferação celular^{45, 49, 50}. A avaliação da expressão imuno-histoquímica do PTEN tem sido amplamente utilizada em pesquisas oncológicas, uma vez que o PTEN é um dos genes supressores tumorais mais frequentemente alterados em pacientes com câncer⁶²⁻⁶⁴.

PTEN é uma proteína envolvida nos processos de proliferação, sobrevivência e migração celular, que apresenta papel modulador na neurogênese e plasticidade sináptica^{45, 49, 50}. O'Donnell & Puri (2011) evidenciaram expressão significativamente reduzida do PTEN nos plexos mioentéricos e submucosos do intestino de pacientes com DNI-B; ausência de expressão do PTEN em segmentos aganglionares de pacientes com DH e expressão fortemente positiva em segmentos intestinais ganglionares de pacientes com DH e em indivíduos do grupo controle⁴⁵.

Diante do potencial benefício da utilização destes dois métodos imuno-histoquímicos para investigação diagnóstica da DNI-B, e da escassez de estudos que investigaram sua utilização neste cenário, o presente estudo foi delineado para avaliar a capacidade diagnóstica dos métodos imuno-histoquímicos Hu C/D e PTEN em pacientes com DNI-B.

2. Objetivos

2.1. Objetivo principal

Avaliar a aplicabilidade dos métodos imuno-histoquímicos Hu C/D e PTEN na investigação diagnóstica de pacientes com Displasia neuronal intestinal do tipo B (DNI-B). O método Hu C/D foi escolhido para aprimorar a contagem de neurônios, tendo em vista os critérios quantitativos para o diagnóstico de DNI-B. A expressão do PTEN, visa investigar a possível participação desta proteína nas alterações do sistema nervoso entérico que ocorrem na DNI-B.

2.2. Objetivos intermediários

- Analisar quantitativamente os plexos nervosos submucosos de amostras de cólon de pacientes com ou sem diagnóstico de DNI-B pelo método histopatológico convencional da hematoxilina e eosina (H&E) e pelo método imuno-histoquímico Hu C/D.

- Comparar os resultados da análise quantitativa pelo método histopatológico convencional da H&E e pelo método imuno-histoquímico Hu C/D.

- Avaliar a confiabilidade da análise quantitativa realizada pelo método imuno-histoquímico Hu C/D através da determinação da concordância intraexaminador e da concordância entre duas formas de interpretação de sua expressão imuno-histoquímica.

- Avaliar o padrão de expressão do marcador imuno-histoquímico PTEN nos plexos nervosos submucosos, mioentéricos e nas camadas musculares do cólon de pacientes com ou sem diagnóstico de DNI-B.

3. Pacientes e métodos

3.1. Casuística e cenário

Foi realizado levantamento retrospectivo das peças cirúrgicas de pacientes com menos de 18 anos de idade, submetidos a abaixamento de cólon, entre 1992 e 2012, no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP. Foram incluídas amostras de cólon e reto de pacientes com diagnóstico histopatológico de DNI-B, estabelecido de acordo com os critérios propostos no Consenso de Frankfurt de 1990¹², sem outras disganglionoses intestinais associadas e sem evidências de miopatias associadas, de acordo com a identificação de expressão imuno-histoquímica para actina de músculo liso (*Smooth Muscle Actin*, SMA) nas células musculares lisas^{1, 39, 51}. O grupo controle incluiu amostras colorretais de pacientes com menos de 18 anos de idade, entre 2009 e 2019, no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP. As amostras foram obtidas de autópsias de indivíduos sem história clínica de doença gastrointestinal crônica e de peças cirúrgicas de pacientes submetidos a abaixamento de cólon por Doença de Hirschsprung, com utilização de amostras de segmentos intestinais agangliônicos e proximais à zona de transição, com distribuição normal de células ganglionares, sem DNI associada e sem alterações histológicas identificadas na análise dos plexos nervosos³⁷. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP (Número CAAE 63610617.9.0000.5411).

3.2. Processamento das peças cirúrgicas e das amostras de autópsia

As peças cirúrgicas dos pacientes submetidos ao abaixamento de cólon foram levadas a fresco, imediatamente após a cirurgia, ao Departamento de Patologia. Os segmentos de intestino distal foram dissecados em autópsias com menos que 12 horas de óbito. As peças cirúrgicas e os segmentos de intestino foram abertos pela borda antimesentérica, lavados com água e fixados em superfície rígida, para manter sua forma, imersos em solução de formalina a 10%. Após 24 horas, cortes longitudinais foram realizados ao longo das peças. Estes cortes foram seccionados em pedaços menores, com 2 cm cada, locados em cassetes numerados. Para este estudo, foram recuperados os fragmentos intestinais, e realizados novos cortes histológicos processados pela histologia padrão (H&E) e para os métodos imuno-histoquímicos Hu C/D e PTEN.

3.3. Histologia padrão pela hematoxilina e eosina (H&E)

Foram realizados cortes histológicos seriados, com 5 µm de espessura, corados pela H&E. A análise histopatológica destas seções histológicas foi direcionada para caracterização das estruturas dos plexos nervosos da submucosa.

3.4. Métodos imuno-histoquímicos Hu C/D e PTEN

A análise imuno-histoquímica foi realizada em cortes histológicos de 4 µm de espessura. O preparo das amostras iniciou-se com a recuperação antigênica em solução de pH alto por 20 minutos em temperatura de 95°C no PTLINK da Dako. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado através da incubação das lâminas em solução de peróxido de hidrogênio a 3%, por 5 minutos, em sistema automatizado (Autostainer Link 48, Dako, Glostrup, Denmark). Foram utilizados o anticorpo Hu C/D monoclonal 16A11 de camundongo (Molecular Probes, Eugene, OR), na diluição 1:200, por tempo de 20 minutos, e o anticorpo monoclonal de camundongo anti-humano PTEN, clone 6H2.1 (Dako), na diluição 1:100, em Sistema Autostainer da Dako. Após Incubação do anticorpo conjugado da Labelled Polymer Flex/HRP por 20 minutos, foi aplicado cromógeno 3,3-diaminobenzidine por 10 minutos, conforme recomendação do fabricante⁵². As lâminas foram contra coradas pela hematoxilina.

3.5. Análise histopatológica

A análise histopatológica foi realizada em conjunto por duas médicas patologistas, com experiência no diagnóstico de disganglionoses intestinais, sem conhecimento das informações clínicas dos pacientes e do grupo de inclusão no estudo. Primeiramente, foi realizada análise pelo método histológico padrão da H&E, para caracterizar a morfologia dos plexos nervosos da submucosa. A seguir, foi feita análise imuno-histoquímica para investigar a expressão dos

marcadores Hu C/D e PTEN. O marcador Hu C/D é específico para células nervosas que expressam coloração acastanhada nuclear e citoplasmática. O PTEN apresenta padrão de coloração celular citoplasmático e/ou nuclear em filetes e células nervosas.

3.5.1. Análise quantitativa dos plexos nervosos

Foi realizada análise quantitativa dos plexos nervosos da submucosa pelos métodos H&E e Hu C/D. Esta análise incluiu o número total de neurônios identificados nos plexos nervosos, o número total de plexos nervosos encontrados, a razão entre o número total de neurônios identificados e o número de plexos nervosos examinados, o número máximo de neurônios identificado em um plexo nervoso e a porcentagem de plexos nervosos com 7 ou mais neurônios.

A análise quantitativa pelo método Hu C/D foi realizada duas vezes, após intervalo de 2 meses, em conjunto, pelas mesmas examinadoras. Na primeira análise quantitativa por este método, foram aplicadas duas metodologias de análise: a interpretação padrão pelo Hu C/D, com contagem somente dos núcleos celulares e outra interpretação ampliada com contagem do citoplasma e dos núcleos celulares, considerando que, por vezes, pode ocorrer contagem equivocada do citoplasma (ao invés do núcleo) das células.

3.5.2. Expressão imuno-histoquímica do marcador PTEN

A análise da expressão imuno-histoquímica do PTEN foi feita em amostras da parede intestinal nas seguintes localizações: plexos nervosos submucosos, mioentéricos e nas camadas da muscular própria. Nos casos do grupo controle com diagnóstico de Doença de Hirschsprung foi realizada análise da expressão do PTEN no segmento com presença de células ganglionares e adicionalmente também nos segmentos aganglionares.

3.6. Análise dos resultados

Os resultados da análise quantitativa dos plexos nervosos pelos métodos H&E e Hu C/D permitiram a comparação entre as contagens obtidas por estes métodos. Além disso, foi possível avaliar a capacidade de diferenciação destes dois métodos para os pacientes dos dois grupos (grupo DNI-B e grupo controle) em relação aos parâmetros quantitativos analisados. A confiabilidade da análise quantitativa realizada pelo método Hu C/D foi estimada. Para isso, foram avaliadas a concordância entre as duas abordagens de análise (expressão nuclear versus expressão nuclear e citoplasmática) e a concordância entre as aferições realizadas em momentos diferentes. A capacidade de diferenciação do PTEN entre os pacientes dos dois grupos foi avaliada de acordo com o padrão de expressão imuno-histoquímica nos plexos nervosos e camadas musculares.

3.7. Análise estatística

Dados numéricos contínuos foram expressos em média $\pm$ desvio padrão e mediana (mínimo/máximo) de acordo com o tipo de distribuição dos dados, determinada pelos testes de normalidade de Shapiro-Wilk. Proporções foram apresentadas em percentuais e seus respectivos intervalos de confiança. A comparação entre grupos foi realizada utilizando-se diferentes critérios. As variáveis categóricas nominais foram analisadas através do Teste Exato de Fisher e a comparação entre proporções foi realizada através do Teste Binomial. As variáveis numéricas contínuas, de distribuição não paramétrica, foram avaliadas através do Teste de Mann-Whitney (para comparação entre amostras independentes) ou de Wilcoxon (para avaliação de amostras relacionadas). As variáveis numéricas contínuas, de distribuição paramétrica, foram analisadas por teste T. Análises de concordância foram realizadas pela determinação de coeficiente de correlação intraclasse^{53, 54}. O nível de significância considerado foi de 5% e a análise foi realizada no software SPSS 22.0 for Windows.

4. Resultados

4.1. Caracterização dos pacientes e grupos

Cento e treze pacientes, com menos de 18 anos de idade, foram submetidos ao abaixamento de cólon por disganglionoses intestinais entre 1992 e 2012. Neste grupo, 29 pacientes receberam diagnóstico de DNI-B, de acordo com os critérios morfológicos propostos pelo Consenso de Frankfurt (1990)¹², sem outras disganglionoses ou miopatias associadas (Figura 1). A mediana de idade dos pacientes, no momento da cirurgia, foi de 26 meses (1-199 meses). Dez (34,4%) pacientes tinham idade menor que 1 ano e dezenove (65,6%) idade maior que 1 ano. Dezenove pacientes (65,6%) eram do sexo masculino e dez (34,4%) do sexo feminino.

O grupo controle (n=10) foi composto por amostras de cólon e reto obtidas de autópsias (n=4) ou peças cirúrgicas (n=6) (Tabela 1). Os casos de autópsia foram de pacientes falecidos por causas diversas, sem história clínica de doença gastrointestinal crônica. Duas causas de óbito foram decorrentes de complicações de doença gastrointestinal aguda: diarreia aguda e desidratação e enterocolite necrosante. Nos casos das peças cirúrgicas, os pacientes possuíam diagnóstico de DH e foram utilizadas amostras de segmentos intestinais agangliônicos e proximais à zona de transição, com distribuição normal de células ganglionares, sem DNI associada. A mediana de idade dos pacientes do grupo controle foi de 7 meses (1-145 meses). Seis (60%) pacientes tinham idade menor que 1 ano e quatro (40%) idade maior que 1 ano. Oito pacientes (80%) eram do sexo masculino e dois (20%) do sexo feminino. Não houve diferença para a mediana de idade e para distribuição de sexo entre os pacientes dos dois grupos (Tabela 2).

Tabela 1 – Características do grupo controle.

Idade	Sexo	Material	Causa da morte ou Doença de base
1 mês	Masculino	Autópsia	Diarréia aguda e desidratação
1 mês	Masculino	Autópsia	Enterocolite necrosante
3 meses	Feminino	Autópsia	Cardiopatia congênita
3 meses	Masculino	Peça cirúrgica	Doença de Hirschsprung
7 meses	Masculino	Autópsia	Ectopia ureteral
7 meses	Masculino	Peça cirúrgica	Doença de Hirschsprung
3 anos 1 mês	Masculino	Peça cirúrgica	Doença de Hirschsprung
9 anos 9 meses	Masculino	Peça cirúrgica	Doença de Hirschsprung
9 anos 11 meses	Masculino	Peça cirúrgica	Doença de Hirschsprung
12 anos 1 mês	Feminino	Peça cirúrgica	Doença de Hirschsprung

Tabela 2 – Análise comparativa entre o grupo DNI-B e o grupo controle em relação à idade e ao sexo.

		Grupo DNI-B	Grupo controle	p
	Idade (dias)*	790 (22/5805)	221 (8/4380)	0,859 ^a
Sexo#	masculino	65,5 (47,3-80,1) %	80 (49,0-94,3) %	0,126 ^b
	feminino	34,5 (19,9-52,7) %	20 (5,7-51,0) %	

* dados expressos em mediana (mínimo/máximo)

dados expressos em distribuição percentual (IC95%)

a p valor associado ao teste de Mann-Whitney

b p valor associado ao teste Binominal.

4.2. Análise quantitativa dos plexos nervosos pelo método imuno-histoquímico Hu C/D

4.2.1. Contagem de neurônios nos plexos nervosos submucosos e comparação com H&E

Esta análise incluiu os 39 pacientes do estudo (29 grupo DNI-B e 10 grupo controle). O método imuno-histoquímico Hu C/D permitiu identificar números significativamente maiores de neurônios do que os identificados pelo método H&E (Figura 2) (Tabela 3).

Tabela 3 – Contagem de neurônios nos plexos nervosos submucosos: comparação entre Hu C/D e H&E (n=39).

Variável	Hu C/D	H&E	p
Nº total de neurônios	173,71 ± 132,22	120,89 ± 91,79	0,001 ^a
Nº de neurônios / nº de plexos examinados	2,34 ± 0,41	1,47 ± 0,69	< 0,0001 ^a
Nº máximo de neurônios por plexo	8,41 ± 2,57	8,41 ± 3,95	1,000 ^a
% de plexos com ≥ 7 neurônios	3,80 (0/11,3)	1,50 (0/13,3)	0,014 ^b

^a p valor associado ao teste T pareado, ^b p valor associado ao teste de Wilcoxon.

4.2.2. Avaliação da concordância intraexaminadora

Houve indicadores de concordância considerados adequados para as análises quantitativas pelo Hu C/D, realizadas por uma mesma examinadora, em momentos

diferentes (Tabela 4), nos 39 pacientes incluídos no estudo, sem estratificação entre os grupos.

Tabela 4 – Concordância intraexaminadora para o Hu C/D (n=39).

Variável	CCI medidas únicas	Estimativa de magnitude de concordância*	CCI medidas médias	Estimativa de magnitude de concordância*
Número total de neurônios	0,887	Quase completa	0,940	Quase completa
Média neurônios/plexo	0,447	Moderada	0,618	Substancial
Número máximo de neurônios	0,728	Substancial	0,843	Quase completa
% plexos ≥ 7 neurônios	0,605	Moderada	0,754	Substancial

CCI: coeficiente de correlação intraclass;

* estimativa de magnitude de concordância de acordo com Landis & Koch (1977)⁵⁴.

4.2.3. Concordância entre os critérios de interpretação do método imuno-histoquímico Hu C/D

Esta análise incluiu os 39 pacientes do estudo. Para a maioria das variáveis quantitativas analisadas, houve concordância considerada adequada entre a interpretação padrão do método imuno-histoquímico Hu C/D, com contagem da marcação dos núcleos celulares e a interpretação ampliada que considerou a contagem da marcação dos núcleos e do citoplasma das células nervosas (Figura 3) (Tabela 5).

Tabela 5 – Concordância entre diferentes formas de análise pelo Hu C/D.

Métodos de análise Hu C/D	Variável	CCI medidas únicas	Magnitude de concordância*	CCI medidas médias	Magnitude de concordância*
Contagem de núcleos x Contagem de núcleos e citoplasma	Número total de neurônios	0,813	Quase completa	0,897	Quase completa
	Média neurônios/plexo	0,335	Fraca	0,502	Moderada
	Número máximo de neurônios	0,575	Moderada	0,730	Substancial
	% plexos ≥ 7 neurônios	0,392	Fraca	0,564	Moderada

CCI: coeficiente de correlação intraclasse;

* estimativa de magnitude de concordância de acordo com Landis & Koch (1977)⁵⁴.

4.2.4. Discriminação entre os grupos DNI-B e controle na análise histopatológica pelos métodos Hu C/D e H&E

Esta análise inclui os 39 pacientes do estudo: 29 grupo DNI-B e 10 grupo controle. A comparação entre os resultados da análise quantitativa dos plexos nervosos dos dois grupos, de acordo com os métodos Hu C/D e H&E da análise histopatológica, está apresentada na Tabela 6. Não houve diferenças significativas entre o grupo DNI-B e o grupo controle para todas as variáveis analisadas pelo método imuno-histoquímico Hu C/D (Tabela 6). As diferenças foram significativas entre o grupo DNI-B e o grupo controle para todas as variáveis analisadas pelo método histológico convencional H&E (Tabela 6).

Tabela 6 – Comparação entre grupo DNI-B e grupo controle para a análise quantitativa dos plexos nervosos de acordo com os métodos H&E e Hu C/D.

	Variável	Grupo DNI-B (n=29) *	Grupo controle (n=10) *	p ^a
H&E	Número total de neurônios	133 (6/474)	48 (21/178)	0,013
	Número de neurônios / número de plexos avaliados	1,53 (0,375/3,12)	1,11 (0,26/1,95)	0,033
	Número máximo de neurônios em um plexo	9 (4/20)	5,5 (4/11)	0,004
	Porcentagem de plexos com mais que 7 neurônios	2,4 (0/13,3)	0 (0/1,4)	0,001
Hu C/D	Número total de neurônios	170 (20/454)	91,5 (22/428)	0,176
	Número de neurônios / número de plexos avaliados	2,16 (0,59/2,73)	2,22 (1,25/3,15)	0,723
	Número máximo de neurônios em um plexo	8 (5/17)	8 (3/21)	0,675
	Porcentagem de plexos com mais que 7 neurônios	2 (0/7,1)	1,35 (0/9,5)	0,629

* dados expressos em mediana (mínimo/máximo)

^a p valor associado ao teste de Mann-Whitney.

4.3. Análise da expressão imuno-histoquímica do PTEN

Foram analisados 39 pacientes: 29 do grupo DNI-B e 10 do grupo controle.

A imunoexpressão do marcador PTEN foi identificada nas células de Schwann, que constituem o arcabouço dos plexos nervosos submucosos e mioentéricos e nas terminações neurais finas que permeiam a camada muscular própria (Figuras 4, 5, 6).

Verificou-se perda da expressão do PTEN nos plexos nervosos submucosos e mioentéricos em 25/29 (86%) casos do grupo DNI-B (Figuras 4 e 5). No grupo controle 9/10 (90%) casos apresentaram expressão positiva do PTEN nas células de Schwann dos plexos submucosos e mioentéricos (Figuras 4 e 5) (Tabela 7).

Verificou-se ausência de expressão do PTEN na camada muscular própria em 21/29 (72%) casos do grupo DNI-B. Todos os casos do grupo controle (n=10) apresentaram imunoexpressão positiva do PTEN na camada muscular (Figura 6) (Tabela 7).

No grupo controle, todos os casos de Doença de Hirschsprung apresentaram expressão positiva do PTEN, tanto nos segmentos intestinais com aganglionose, como nos segmentos proximais com distribuição normal de células ganglionares (Figura 7).

Tabela 7 – Expressão imuno-histoquímica do PTEN.

	Expressão PTEN	Grupo DNI-B (n=29)	Grupo controle (n=10)	p ^a
Muscular própria	Negativa	21	0	0,0001
	Perda de expressão	7	0	0,158
	Positiva	1	10	<0,0001
Plexo submucoso	Negativa	4	0	0,555
	Perda de expressão	25	1	<0,0001
	Positiva	0	9	<0,0001
Plexo mioentérico	Negativa	3	0	0,555
	Perda de expressão	25	1	<0,0001
	Positiva	1	9	<0,0001

a p valor associado ao teste exato de Fisher.

5. Discussão

Quase 50 anos após sua descrição original³, a DNI-B ainda é considerada uma entidade patológica controversa, com etiopatogenia pouco conhecida e com uma série de dificuldades relacionadas ao seu diagnóstico^{2, 4, 6, 7}. Apesar de todas estas incertezas, pacientes continuam apresentando quadros graves de constipação ou obstrução intestinal, associados a alterações histopatológicas compatíveis com este fenótipo morfológico, o que faz com que todo o esforço direcionado para novas perspectivas diagnósticas seja justificado⁷. Somente o diagnóstico correto destes pacientes poderá direcionar tratamentos mais eficazes e melhores prognósticos.

Neste sentido, técnicas imuno-histoquímicas vêm se apresentando como potenciais adjuvantes para o diagnóstico histopatológico de DNI-B^{15, 25, 38-48}. Além de serem amplamente disponíveis e aplicáveis aos cortes histológicos de amostras embocadas em parafina, estes métodos permitem a identificação de outras estruturas neuromusculares da parede intestinal, proporcionando um olhar para além das células ganglionares dos plexos nervosos do sistema nervoso entérico.

Marcadores imuno-histoquímicos de neurônios como a proteína Hu C/D, o produto do gene da proteína 9.5 (*Protein Gene Product 9.5*, PGP9.5) e a enolase neurônio específica (*Neuron Specific Enolase*, NSE), podem ser úteis na investigação diagnóstica para DNI-B^{25, 38, 39, 44}. O marcador pan-neuronal Hu C/D detecta corpos celulares e apresenta a vantagem de não marcar fibras nervosas, o que facilita o reconhecimento individual de neurônios^{39, 55-57}. Estas características tornam o Hu C/D um método bastante atrativo para a investigação diagnóstica da DNI-B, particularmente para a contagem de neurônios nos plexos nervosos submucosos,

atendendo as diretrizes para preenchimento de critérios diagnósticos quantitativos²⁵. No estudo realizado por Swaminathan et al. (2015)²⁵, este marcador facilitou a identificação de células ganglionares e permitiu sua quantificação com boa reprodutibilidade por um mesmo examinador. Por meio da contagem de neurônios com imunopositividade para Hu C/D, os autores validaram um critério para o diagnóstico de gânglios gigantes, definido pela presença de ao menos 7 células ganglionares. Apesar da utilização de um grupo controle bem definido, este estudo não utilizou segmentos de cólon de pacientes com diagnóstico de DNI-B isolada, mas amostras colônicas de pacientes com DNI associada a DH denominada como “Hiperplasia de células ganglionares da submucosa tipo DNI” (*Intestinal Neuronal Dysplasia-like submucosal ganglion cell hyperplasia*).

Em nosso estudo, o Hu C/D demonstrou-se um método útil e de aplicação simples para identificação e contagem de neurônios em pacientes com diagnóstico prévio de DNI-B. A contagem de neurônios por este método mostrou-se confiável⁵⁸, ao fornecer resultados concordantes para contagens realizadas em momentos diferentes e de acordo com métodos distintos de interpretação. Entretanto, a avaliação quantitativa neuronal pelo Hu C/D, não se mostrou adequada para diferenciação entre os pacientes do grupo DNI-B e do grupo controle, inclusive na comparação entre números de gânglios gigantes, de acordo com a proposta de Swaminathan et al. (2015)²⁵.

O método HuC/D facilita a identificação de neurônios degenerados e imaturos, dificilmente reconhecidos pela H&E^{56, 57}, o que pode ter contribuído para a identificação de um número significativamente maior de neurônios por este método imuno-histoquímico em comparação à contagem realizada pela análise histológica

convencional. Por outro lado, a avaliação quantitativa neuronal realizada pelo H&E foi capaz de discriminar os grupos DNI-B e controle. Estes resultados evidenciam as limitações do diagnóstico de DNI-B centrado na quantificação neuronal. Seja qual for o método utilizado, a contagem neuronal é dependente de uma série de fatores, que incluem a capacidade de identificação de neurônios do método, as diferenças entre o tamanho das amostras analisadas e a concordância entre contagens realizadas por diferentes examinadores, que tende a ser bastante limitada^{15, 17, 25}.

A análise da expressão imuno-histoquímica do PTEN mostrou-se aplicável, com interpretação simples e adequada para discriminar os casos do grupo DNI-B e do grupo controle, com diferenças estatisticamente significativas identificadas em sua expressão nos plexos nervosos e na camada muscular própria. A maior parte dos casos com DNI-B apresentou perda ou expressão negativa do PTEN, em contraste com o grupo controle, em que a expressão foi positiva para este marcador.

O papel regulatório do PTEN na proliferação celular tem estimulado investigações relacionadas ao seu envolvimento na etiopatologia de doenças neuromusculares gastrointestinais. Becker et al. (2013)⁴⁹, utilizando um sistema de cultura de tecido *ex vivo*, demonstraram que a neurogênese nos gânglios entéricos é dependente de PTEN. Um modelo experimental em ratos demonstrou que a deleção embrionária seletiva no locus PTEN em células nervosas entéricas foi capaz de induzir sua hiperplasia e hipertrofia em fases posteriores da embriogênese⁵⁰. Por outro lado, um modelo experimental em ratos deficientes na proteína de ligação de retinol sérico (Rbp4^{-/-}), demonstrou que a deficiência de ácido retinóico está associada ao acúmulo de PTEN nas células migratórias precursoras do sistema nervoso entérico. Nesta situação, estas células passam a ter migração lentificada, gerando segmentos com

aganglionose intestinal^{65, 66}. Em humanos, foi evidenciada redução da expressão imuno-histoquímica do PTEN em pacientes com ganglioneuromatose (doença com gânglios gigantes maiores que na DNI-B e intensa hiperplasia dos plexos submucosos)⁵⁰ e foram identificados níveis aumentados de RNA mensageiro e da proteína PTEN no cólon de pacientes com DH, possivelmente relacionados à expressão diminuída dos microRNAs 200a e 141⁶⁷. Estudo prévio do nosso grupo analisou a expressão de microRNAs em segmentos de intestino dos mesmos 29 pacientes com DNI-B incluídos no presente estudo. Houve expressão alterada de uma série de microRNAs relacionados a genes e vias moleculares que incluíam o gene PTEN⁶⁸. O miRNA 451, que apresentou expressão significativamente diminuída no cólon e no sangue dos pacientes com DNI-B é um dos miRNAs descritos como reguladores da expressão do PTEN^{69, 70}. Este achado reforça o potencial papel do gene PTEN como regulador do desenvolvimento do sistema nervoso entérico, relacionado ao desenvolvimento das neuropatias congênitas.

Diferentemente do descrito por O'Donnell & Puri (2011)⁴⁵, observamos que todos os pacientes com Doença de Hirschsprung apresentaram expressão positiva do PTEN, tanto nos segmentos aganglionares, quanto nos segmentos normoganglionares, proximais à zona de aganglionose. Este resultado é corroborado pelas evidências de que o aumento de expressão do PTEN deve estar relacionado à diminuição da proliferação celular, interrompendo o desenvolvimento normal do sistema nervoso entérico^{49, 50, 65-67}.

Outro ponto relevante na interpretação do PTEN é a sua expressão em outras estruturas, além dos plexos nervosos da submucosa e da muscular própria. Em nosso estudo, a maioria dos pacientes com DNI-B apresentou perda da expressão do PTEN

na camada muscular própria, diferentemente do que ocorreu nos pacientes do grupo controle, que apresentavam expressão positiva em fibras nervosas localizadas nesta camada da parede intestinal. Estes achados sugerem o comprometimento de estruturas neuromusculares nos casos de DNI-B, ampliando o olhar da etiopatogenia e dos critérios diagnósticos para além do debatido e controverso número de células ganglionares dos plexos nervosos da submucosa.

O número excessivo de células ganglionares nos plexos nervosos da submucosa, “gânglios gigantes”, constitui a alteração morfológica de maior destaque para o diagnóstico da DNI-B^{9-10, 12-13}. Esta alteração estrutural pode ser atribuída ao comprometimento da função do gene PTEN, levando à migração inadequada das células ganglionares para os plexos nervosos da submucosa e à perda da conexão destes neurônios motores com as terminações nervosas finas que permeiam a camada muscular própria, responsáveis pela integridade da junção neuromuscular.

Estudos experimentais demonstraram que a inativação do PTEN pode comprometer o desenvolvimento da junção neuromuscular e a maturação da musculatura, com potencial prejuízo funcional^{71, 72}. A junção neuromuscular é composta por três elementos: neurônios motores pré-sinápticos, fibras musculares pós-sinápticas e células de Schwann perissinápticas⁷¹. No intestino, esta estrutura é responsável pela conexão entre o sistema nervoso entérico e a musculatura lisa, responsável pela motilidade. Os neurônios dos plexos mioentéricos são a principal fonte de inervação da camada muscular longitudinal e da lamela externa da camada muscular circular. Os neurônios dos plexos submucosos inervam a lamela interna do músculo circular⁷³. Alterações da expressão de outros marcadores imuno-histoquímicos já haviam sugerido o potencial comprometimento das junções

neuromusculares em pacientes com DNI-B. Kobayashi et al. (1996)⁴² evidenciaram que os marcadores *Neural Cell Adhesion Molecule* (NCAM), *Growth Associated Protein 43* (GAP43) e sinaptofisina apresentavam ausência de expressão ou expressão marcadamente diminuída nas camadas musculares do intestino de pacientes com DNI-B, comparados a um grupo controle. Não havia alteração da expressão destes marcadores nos plexos nervosos do sistema nervoso entérico. Kim et al. (2010)³⁹ também evidenciaram redução da imunoexpressão de NCAM nas fibras nervosas da muscular externa em pacientes com DNI-B. A NCAM é uma glicoproteína de superfície, importante para a interação entre neurônios e células musculares durante a sinaptogênese e considerada como um marcador de junção neuromuscular⁴².

Algumas limitações deste estudo devem ser consideradas, como o desenho retrospectivo, utilizando amostras emblocadas em parafina, com intervalos diferentes de tempo de armazenamento. O levantamento dos casos de DNI-B correspondeu ao período de 1992 a 2012 pois, a partir desta data, houve mudança na conduta da equipe médica que passou a realizar o tratamento conservador ao invés do tratamento cirúrgico com abaixamento de cólon. Outra limitação está relacionada à DNI-B e às inúmeras polêmicas que cercam essa entidade patológica. Kapur & Reyes-Mugica (2019)⁷⁴, em recente revisão sobre o assunto, concluem que a DNI-B continua sendo um fenótipo histopatológico indefinido, com relevância clínica incerta, mas que pode representar desvios da normalidade. Schmittenebecher et al. (2000)⁷⁵ consideram que a DNI-B deve ser definida como uma entidade clínica, uma vez que os sintomas apresentados por esses pacientes são evidentes e influenciam diretamente a qualidade de vida. A maioria dos especialistas presentes no 4º Simpósio Internacional

de Doença de Hirschsprung e Neurocristopatias Associadas, que ocorreu em Genova, Itália, em 2004⁷⁶, e a maioria dos participantes de um levantamento recente da Associação Europeia de Cirurgiões Pediátricos⁷⁷ afirmam acreditar na existência da DNI-B. Por tudo isso, investigações sobre aspectos diagnósticos são fundamentais para maior conhecimento sobre esta doença ainda tão cheia de incertezas.

Por outro lado, alguns pontos fortes do estudo merecem ser destacados. Os pacientes com DNI-B foram diagnosticados de acordo com critérios estabelecidos pelo Consenso de Frankfurt¹², que eram as diretrizes disponíveis à época, utilizadas por grande parte dos estudos sobre esta doença^{6, 12, 15-20}. Além disso, as amostras foram submetidas à análise de expressão imuno-histoquímica para SMA, permitindo afastar miopatias associadas^{1, 39, 51}. Outro ponto relevante foi a inclusão de um grupo controle. A determinação de um grupo controle que seja confiável, composto por crianças saudáveis e sem sintomas intestinais é um dos maiores desafios para as investigações científicas relacionadas à DNI-B. A obtenção de amostras de intestino para uso como controle apresenta limitações éticas, pela necessidade de procedimentos invasivos para sua obtenção^{14, 68, 74, 78}. No presente estudo, utilizamos amostras de intestino de autópsias de pacientes que não apresentavam história clínica de doença gastrointestinal crônica. Também foram incluídas amostras de peças cirúrgicas de pacientes submetidos a abaixamento de cólon por DH, obtidas dos segmentos intestinais proximais à zona de transição, em áreas que apresentavam distribuição normal de células ganglionares, sem DNI associada e sem alterações morfológicas dos plexos nervosos³⁷. Avaliamos também a expressão do PTEN na zona agangliônica já que as biópsias de reto da rotina diagnóstica são direcionadas para o diagnóstico da disganglionose mais frequente, a DH. Cabe destacar que o

grupo controle não apresentou diferenças significativas em relação à idade e sexo, quando comparado ao grupo de pacientes com DNI-B. Isto é particularmente relevante em relação à idade, uma vez que a variação do número de células ganglionares relacionada à idade, principalmente durante o primeiro ano de vida, poderia influenciar os resultados comparativos entre os grupos⁷⁹.

6. Conclusão

Em síntese, concluímos que os métodos imuno-histoquímicos Hu C/D e PTEN são úteis na investigação diagnóstica de amostras de intestino de pacientes com hipótese de Displasia neuronal intestinal tipo B (DNI-B).

A análise quantitativa neuronal dos plexos nervosos da submucosa pelo método Hu C/D facilitou a identificação e contagem das células ganglionares, apesar de não discriminar o grupo DNI-B do controle sendo, portanto, útil na investigação dos critérios numéricos para o diagnóstico de DNI-B.

A análise da expressão imuno-histoquímica do PTEN permitiu a discriminar o grupo DNI-B do controle, mostrando-se capaz de diagnosticar DNI-B através da perda ou ausência de expressão do PTEN nas células de Schwann dos plexos nervosos submucosos, mioentéricos e na camada muscular própria.

A identificação de alterações da expressão imuno-histoquímica do PTEN no sistema nervoso entérico nos casos de DNI-B sugere que a patogênese da alteração da motilidade intestinal deve estar relacionada ao comprometimento da junção neuromuscular, conforme demonstrado pela ausência de expressão do PTEN nos componentes neurais da camada muscular própria.

7. Referências

1. 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.
2. 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.
3. Meier-Ruge WA. Casuistic of colon disorder with symptoms of Hirschsprung's disease (author's transl). *Verh Dtsch Ges Pathol*. 1971; 55:506-10.
4. Friedmacher F, Puri P. Classification and diagnostic criteria of variants of Hirschsprung's disease. *Pediatr Surg Int*. 2013; 29(9):855-72.
5. Csury L, Peña A. Intestinal neuronal dysplasia. *Pediatr Surg Int*. 1995; 10:441-6.
6. Holschneider AM, Puri P, Homrighausen LH, Meier-Ruge W. Intestinal Neuronal Malformation (IND): Clinical Experience and Treatment. Hirschsprung's disease and allied disorders. 3rd ed. New York: Springer, 2008.
7. Toledo de Arruda Lourenção PL, Terra SA, Ortolan EV, Rodrigues MAM. Intestinal neuronal dysplasia type B: A still little known diagnosis for organic causes of intestinal chronic constipation. *World J Gastrointest Pharmacol Ther*. 2016; 7(3):397-405.
8. Tabbers MM, Di Lorenzo C, Berger MY, Faure C, Langendam MW, Nurko S, Staiano A, Vandenplas Y, Benninga MA; European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition; North American Society for Pediatric Gastroenterology. Evaluation and treatment of functional constipation in infants and children: evidence-based recommendations from ESPGHAN and NASPGHAN. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2014; 58(2):258-74.

9. Meier-Ruge WA, Brönnimann PB, Gambazzi F, Schmid PC, Schmidt CP, Stoss F. Histopathological criteria for intestinal neuronal dysplasia of the submucosal plexus (type B). *Virchows Arch.* 1995; 426(6):549-56.
10. Kobayashi H, Hirakawa H, Puri P. What are the diagnostic criteria for intestinal neuronal dysplasia? *Pediatr Surg Int.* 1995; 10:459–64.
11. Schärli AF, Meier-Ruge W. Localised and disseminated forms of neuronal intestinal dysplasia mimicking Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg Int.* 1981; 16:164–70.
12. Borchard F, Meier-Ruge W, Wiebecke B, Briner J, Müntefering H, Födisch HF, Holschneider AM, Schmidt A, Enck P, Stolte M. Disorders of the innervation of the large intestine--classification and diagnosis. Results of a consensus conference of the Society of Gastroenteropathology 1 December 1990 in Frankfurt. *Pathologe.* 1991; 12(3):171-4.
13. Meier-Ruge WA, Ammann K, Bruder E, Holschneider AM, Schärli AF, Schmittenbecher PP, Stoss F. Updated results on intestinal neuronal dysplasia (IND B). *Eur J Pediatr Surg.* 2004; 14(6):384-91.
14. Meier-Ruge WA, Bruder E, Kapur RP. Intestinal neuronal dysplasia type B: one giant ganglion is not good enough. *Pediatr Dev Pathol.* 2006; 9(6):444-52.
15. Terra SA, Lourenção PLTA, Silva MG, Miot HA, Rodrigues MAM. A critical appraisal of the morphological criteria for diagnosing intestinal neuronal dysplasia type B. *Mod Pathol.* 2017; 30:978-85.
16. Schärli AF. Neuronal Intestinal dysplasia. *Pediatr Surg Int.* 1992; 7:2-7.
17. Koletzko S, Ballauff A, Hadziselimovic F, Enck P. Is histological diagnosis of neuronal intestinal dysplasia related to clinical and manometric findings in constipated children? Results of a pilot study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1993; 17(1):59-65.
18. Sacher P, Briner J, Hanimann B. Is neuronal intestinal dysplasia (NID) a primary disease or a secondary phenomenon? *Eur J Pediatr Surg.* 1993; 3(4):228-30.

19. Costa M, Fava M, Seri M, Cusano R, Sancandi M, Forabosco P, Lerone M, Martucciello G, Romeo G, Ceccherini I. Evaluation of the HOX11L1 gene as a candidate for congenital disorders of intestinal innervation. *J Med Genet.* 2000; 37(7):E9.
20. Martucciello G, Torre M, Pini Prato A, Lerone M, Campus R, Leggio S, Jasonni V. Associated anomalies in intestinal neuronal dysplasia. *J Pediatr Surg.* 2002; 37(2):219-23.
21. Schofield DE, Yunis EJ. Intestinal neuronal dysplasia. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1991; 12:182–9.
22. Moore SW, Laing L, Kaschula ROC, Cywes S. A histological grading system for the evaluation of co-existing NID with Hirschsprung's disease. *Eur J Pediatr Surg.* 1994; 4:293–7.
23. Mahesha V, Saikia UN, Shubha AV, Rao KL. Intestinal neuronal dysplasia of the myenteric plexus--new entity in humans? *Eur J Pediatr Surg.* 2008; 18(1):59-60.
24. Taguchi T, Kobayashi H, Kanamori Y, Segawa O, Yamataka A, Sugiyama M, Iwanaka T, Shimojima N, Kuroda T, Nakazawa A, Oda Y, Miyoshi K, Ieiri S. Isolated intestinal neuronal dysplasia Type B (IND-B) in Japan: results from a nationwide survey. *Pediatr Surg Int.* 2014; 30(8):815-22.
25. Swaminathan M, Oron AP, Chatterjee S, Piper H, Cope-Yokoyama S, Chakravarti A, et al. Intestinal neuronal dysplasia-like submucosal ganglion cell hyperplasia at the proximal margins of Hirschsprung disease resections. *Pediatr Dev Pathol.* 2015; 18:466-76.
26. Wang SQ, Zhu J, Wang Y, Zhao ZB, Li XQ, Li SS, Jin XQ, Guo ZH. Utilization of RET, Bcl-2 and CR immunohistochemistry in the diagnosis of Hirschsprung disease and its allied disorders. *Int J Clin Exp Pathol.* 2016; 9(10):10390-7.

27. de Nanassy J, Demellawy DL. Review of Current Applications of Immunohistochemistry in Pediatric Nonneoplastic Gastrointestinal, Hepatobiliary, and Pancreatic Lesions. *Analytical Chemistry Insights*. 2017; 12:1–11.
28. Westfal ML, Goldstein AM. Pediatric enteric neuropathies: diagnosis and current management. *Curr Opin Pediatr*. 2017; 29:0–0.
29. Galazka P, Szyberg L, Bodnar M, Styczynski J, Marszalek A. In Vivo. Diagnostic Algorithm in Hirschsprung's Disease: Focus on Immunohistochemistry Markers. *In Vivo*. 2020; 34:1355-9.
30. 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.
31. 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 Hirshsprung disease. *Pediatr Dev Pathol*. 2009; 12(1):6-15.
32. 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.
33. 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.
34. de Arruda Lourenção PL, 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.

35. 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; 58(5):603-7.
36. Takawira C, D'Agostini S, Shenouda S, Persad R, Sergi C. Laboratory Procedures Update on Hirschsprung Disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2015; 60:598–605.
37. Veras LV, Arnold M, Avansino JR, Bove K, Cowles RA, Durham MM, Goldstein AM, Krishnan C, Langer JC, Levitt M, Monforte-Munoz H, Rabah R, Reyes-Mugica M, Rollins MD, Kapur RP, Gosain A. Guidelines for synoptic reporting of surgery and pathology in Hirschsprung disease. *Journal of Pediatric Surgery.* 2019; 54:2017–23.
38. Geramizadeh B, Akbarzadeh E, Izadi B, Foroutan HR, Heidari T. Immunohistochemical study of enteric nervous system in hirschsprung's disease and intestinal neuronal dysplasia. *Histol Histopathol.* 2013; 28(3):345-51.
39. Kim HK, Cheong H, Kang H, Bae JY, Song DE, Cho MS, Sung SW, Han WS, Koo H. Histopathological Evaluation of Pediatric Intestinal Pseudo-Obstruction: Quantitative Morphometric Analysis of Pathological Changes in the Enteric Nervous System. *The Korean Journal of Pathology.* 2010; 44(2):162-172.
40. Kobayashi H, Yamataka A, Fujimoto T, Lane GJ, Miyano T. Mast Cells and Gut Nerve Development: Implications for Hirschsprung's Disease and Intestinal Neuronal Dysplasia. *Journal of Pediatric Surgery.* 1999; 34(4):543-8.
41. Bosman C, Devito R, Fusilli S, Boldrini R. A New Hypothesis on the Pathogenesis of Intestinal Pseudo-obstruction by Intestinal Neuronal Dysplasia (IND). *Pathol. Res. Pract.* 2001; 197:789–96.
42. Kobayashi H, Mahomed A, Puri P. Intestinal neuronal dysplasia in twins. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1996; 22(4):398-401.
43. Nogueira A, Campos M, Soares-Oliveira M, Estevão-Costa J, Silva P, Carneiro F, Carvalho JL. Histochemical and immunohistochemical study of the intrinsic innervation in colonic dysganglionosis. *Pediatr Surg Int.* 2001; 17(2-3):144-51.

44. Krammer HJ, Meier-Ruge W, Sigge W, Eggers R, Kühnel W. Histopathological features of neuronal intestinal dysplasia of the plexus submucosus in whole mounts revealed by immunohistochemistry for PGP 9.5. *Eur J Pediatr Surg.* 1994; 4(6):358-61.
45. O'Donnell AM, Puri P. A role for PTEN in paediatric intestinal dysmotility disorders. *Pediatr Surg Int.* 2011; 27:491–3.
46. Kobayashi H, Miyano T, Yamataka A, Lane GJ, Fujimoto T, Puri P. Use of synaptophysin polyclonal antibody for the rapid intraoperative immunohistochemical evaluation of functional bowel disorders. *J Pediatr Surg.* 1997; 32(1):38-40.
47. Rolle U, Piaseczna-Piotrowska A, Puri P. Abnormal vasculature in intestinal neuronal dysplasia. *Pediatr Surg Int.* 2003; 19:345-8.
48. Yamataka A, Ohshiro K, Kobayashi H, Fujiwara T, Sunagawa M, Miyano T. Intestinal Pacemaker C-KIT+ Cells and Synapses in Allied Hirschsprung's Disorders. *Journal of Pediatric Surgery.* 1997; 32(7):1069-74.
49. Becker L, Peterson J, Kulkarni S, Pasricha PJ. Ex vivo neurogenesis within enteric ganglia occurs in a PTEN dependent manner. *PLoS One.* 2013; 8(3):e59452.
50. Puig I, Champeval D, De Santa Barbara P, Jaubert F, Lyonnet S, Larue L. Deletion of PTEN in the mouse enteric nervous system induces ganglioneuromatosis and mimics intestinal pseudoobstruction. *J Clin Invest.* 2009; 119(12):3586-96.
51. Park SH, Min H, Chi JG, Park KW, Yang HR, Seo JK. Immunohistochemical studies of pediatric intestinal pseudo-obstruction: bcl2, a valuable biomarker to detect immature enteric ganglion cells. *Am J Surg Pathol.* 2005; 29(8):1017-24.
52. Manual Dako Autostainer para imuno-histoquímica. Disponível em https://cmrf.research.uiowa.edu/sites/cmrf.research.uiowa.edu/files/0003106_rev_e_man_user_guide_autostainer_english.pdf.
53. Miot HA. Agreement analysis in clinical and experimental trials. *J Vasc Bras.* 2016; 15(2):89-92.

54. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 1977; 33(1):159-74.
55. Lin Z, Gao N, Hu HZ, Liu S, Gao C, Kim G, Ren J, Xia Y, Peck OC, Wood JD. Immunoreactivity of Hu proteins facilitates identification of myenteric neurones in guinea-pig small intestine. *Neurogastroenterol Motil*. 2002 Apr;14(2):197-204.
56. Muto M, Matsufuji H, Taguchi T, Tomomasa T, Nio M, Tamai H, Tamura M, Sago H, Toki A, Nosaka S, Kuroda T, Yoshida M, Nakajima A, Kobayashi H, Sou H, Masumoto K, Watanabe Y, Kanamori Y, Hamada Y, Yamataka A, Shimojima N, Kubota A, Ushijima K, Haruma K, Fukudo S, Araki Y, Kudo T, Obata S, Sumita W, Watanabe T, Fukahori S, Fujii Y, Yamada Y, Jimbo K, Kawai F, Fukuoka T, Onuma S, Morizane T, Ieiri S, Esumi G, Jimbo T, Yamasaki T. Japanese clinical practice guidelines for allied disorders of Hirschsprung's disease, 2017. *Pediatr Int*. 2018 May; 60(5):400-10.
57. Yoshimaru K, Taguchi T, Obata S, Takemoto J, Takahashi Y, Iwanaka T, Yanagi Y, Kuda M, Miyoshi K, Matsuura T, Kinoshita Y, Yoshioka T, Nakazawa A, Oda Y. Immunostaining for Hu C/D and CD56 is useful for a definitive histopathological diagnosis of congenital and acquired isolated hypoganglionosis. *Virchows Arch*. 2017 Jun; 470(6):679-85.
58. Davis DW. Validity and reliability: part I. *Neonatal Netw*. 2004; 23:54-6.
59. Phillips RJ, Hargrave SL, Rhodes BS, Zopf DA, Powley TL. Quantification of neurons in the myenteric plexus: an evaluation of putative pan-neuronal markers. *J Neurosci Methods*. 2004 Feb 15; 133(1-2):99-107.

60. Wakamatsu Y, Weston JA. Sequential expression and role of Hu RNA-binding proteins during neurogenesis. *Development*. 1997 Sep; 124(17):3449-60.
61. Phillips RJ, Kieffer EJ, Powley TL. Loss of glia and neurons in the myenteric plexus of the aged Fischer 344 rat. *Anat Embryol (Berl)*. 2004 Nov; 209(1):19-30.
62. Molinari F, Frattini M. Functions and Regulation of the PTEN Gene in Colorectal Cancer. *Front Oncol*. 2014 Jan 16; 3:326.
63. Ágoston EI, Micsik T, Ács B, Fekete K, Hahn O, Baranyai Z, Dede K, Bodoky G, Bursics A, Kulka J, Krenács T, Györffy B, Harsányi L, Szász AM. In depth evaluation of the prognostic and predictive utility of PTEN immunohistochemistry in colorectal carcinomas: performance of three antibodies with emphasis on intracellular and intratumoral heterogeneity. *Diagn Pathol*. 2016 Jul 8; 11(1):61.
64. Anselmi Júnior RA, Souza CM, Azevedo MLV, Montemor Netto MR, Baldin RKS, Sebastião APMartins et al. The role of Phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K) and Cyclooxygenase-2 (COX2) in carcinogenesis of colorectal polyps. *J. Coloproctol. (Rio J.)* [Internet]. 2018 Mar [cited 2020 Sep 11]; 38(1):1-8.
65. Fu M, Sato Y, Lyons-Warren A, Zhang B, Kane MA, Napoli JL, Heuckeroth RO. Vitamin A facilitates enteric nervous system precursor migration by reducing PTEN accumulation. *Development*. 2010 Feb; 137(4):631-40.
66. Butler Tjaden NE, Trainor PA. The developmental etiology and pathogenesis of Hirschsprung disease. *Transl Res*. 2013; 162(1):1-15.

67. Li H, Tang J, Lei H, Cai P, Zhu H, Li B, Xu X, Xia Y, Tang W. Decreased MiR-200a/141 suppress cell migration and proliferation by targeting PTEN in Hirschsprung's disease. *Cell Physiol Biochem*. 2014; 34(2):543-53.

68. Angelini MC, Silva AM, Felix TF, Lapa RML, Terra SA, Rodrigues MAM, Ortolan EVP, Reis PP, Lourenção PLTA. Identification of potential molecular pathogenesis mechanisms modulated by microRNAs in patients with Intestinal Neuronal Dysplasia type B. *Scientific Reports*. 2019; 9:17673.

69. Bai H, Wu S. miR-451: A Novel Biomarker and Potential Therapeutic Target for Cancer. *Onco Targets Ther*. 2019 Dec 16; 12:11069-82.

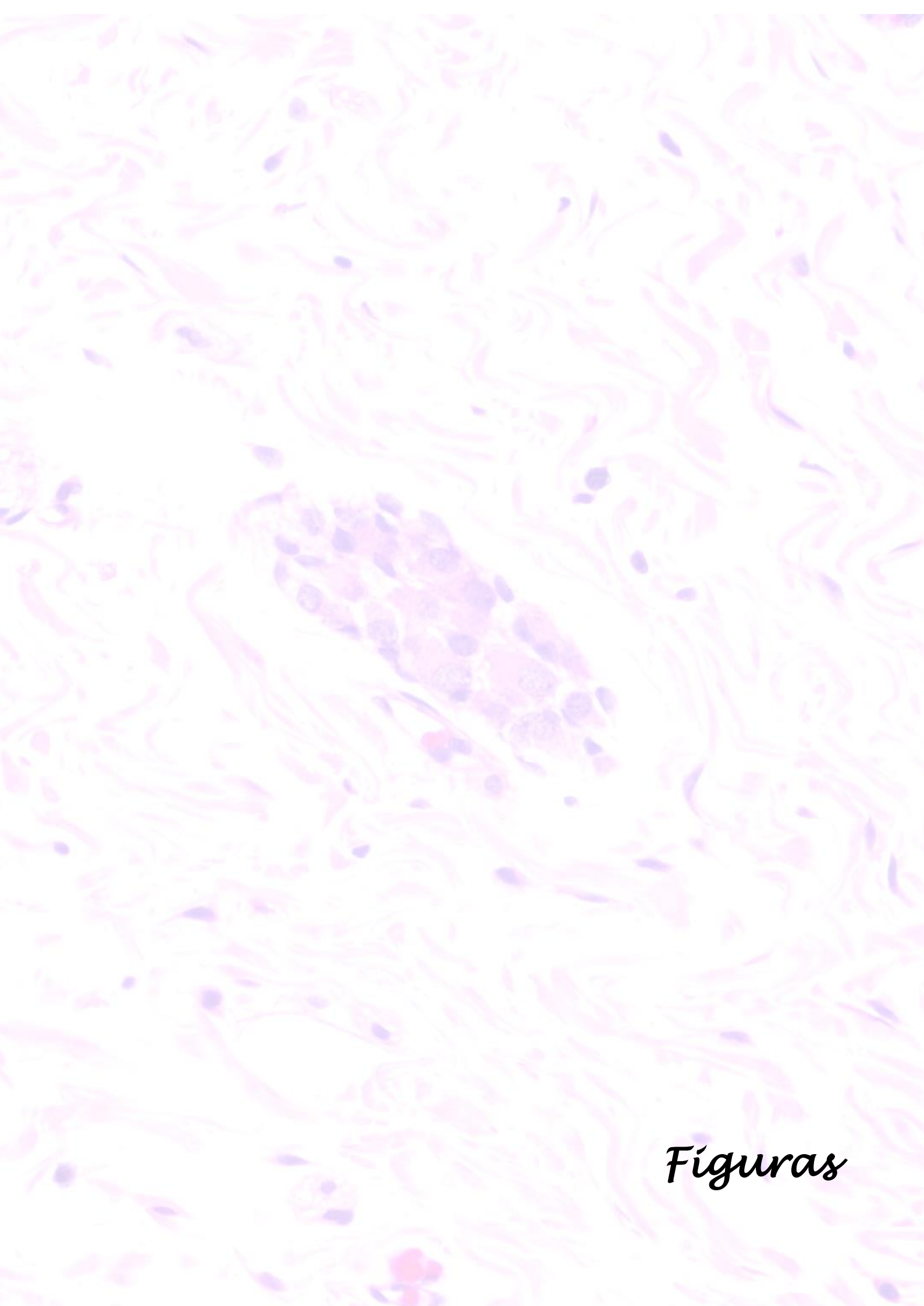
70. Li W, Zhang T, Guo L, Huang L. Regulation of PTEN expression by noncoding RNAs. *J Exp Clin Cancer Res*. 2018; 37(1):223.

71. Li XX, Zhang SJ, Chiu AP, Lo LH, To JC, Cui HN, Rowlands DK, Keng VW. Conditional Inactivation of Nf1 and PTEN in Schwann Cells Results in Abnormal Neuromuscular Junction Maturation. *G3/ Genes, Genomic, Genetics (Bethesda)*. 2019; 9(1):297-303.

72. Zhang SJ, Li XX, Yu Y, Chiu AP, Lo LH, To JC, Rowlands DK, Keng VW. Schwann cell-specific PTEN and EGFR dysfunctions affect neuromuscular junction development by impairing Agrin signaling and autophagy. *Biochem Biophys Res Commun*. 2019; 515(1):50-56.

73. Makhoul GM. Neuromuscular function of the small intestine. In: Johnson LR, ed. *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. New York: Raven Press, 1994.

74. Kapur RP, Reyes-Mugica M. Intestinal neuronal dysplasia type B: an updated review of a problematic diagnosis. *Arch Pathol Lab Med.* 2019; 143:235-43.
75. Schmittenebecher PP, Glück M, Wiebecke B, Meier-Ruge W. Clinical long-term follow-up results in intestinal neuronal dysplasia (IND). *Eur J Pediatr Surg.* 2000; 10(1):17-22.
76. 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.
77. Zani A, Eaton S, Morini F, Puri P, Rintala R, Heurn EV, et al. European Paediatric Surgeons' Association Survey on the management of Hirschsprung Disease. *Eur J Pediatr Surg.* 2017; 27:96-101.
78. Koletzko S, Jesch I, Faus-Kebetaler T, Briner J, Meier-Ruge W, Müntefering H, Coerdts W, Wessel L, Keller KM, Nützenadel W, Schmittenebecher P, Holschneider A, Sacher P. Rectal biopsy for diagnosis of intestinal neuronal dysplasia in children: a prospective multicentre study on interobserver variation and clinical outcome. *Gut.* 1999; 44(6):853-61.
79. Coerdts W, Michel JS, Rippin G, Kletzki S, Gerein V, Müntefering H, Arnemann J. Quantitative morphometric analysis of the submucous plexus in age-related control groups. *Virchows Arch.* 2004; 444(3):239-46.



Figuras

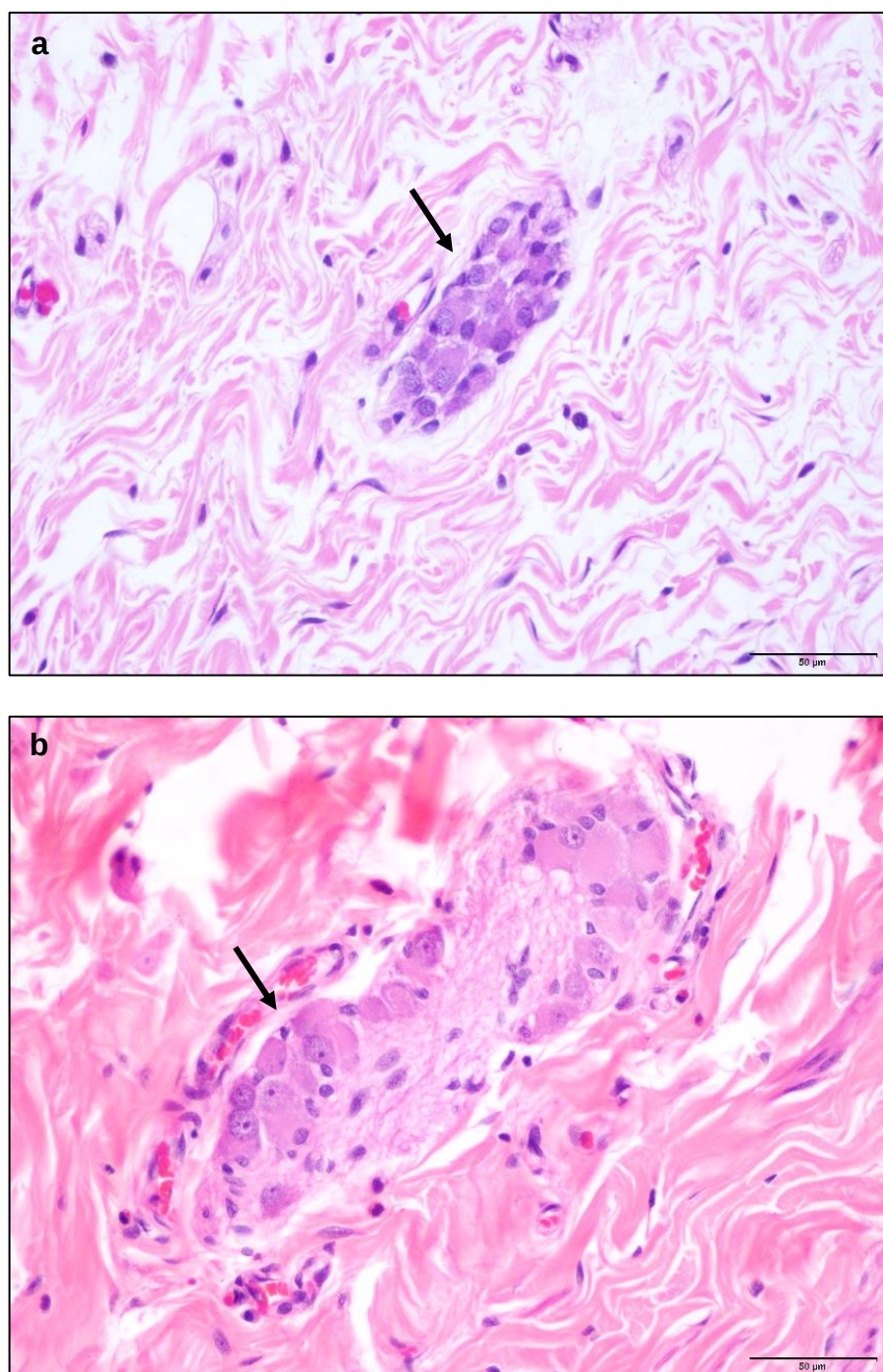


Figura 1 – DNI-B (a e b): plexos nervosos submucosos com hiperganglionose (setas) (H&E, 400x).

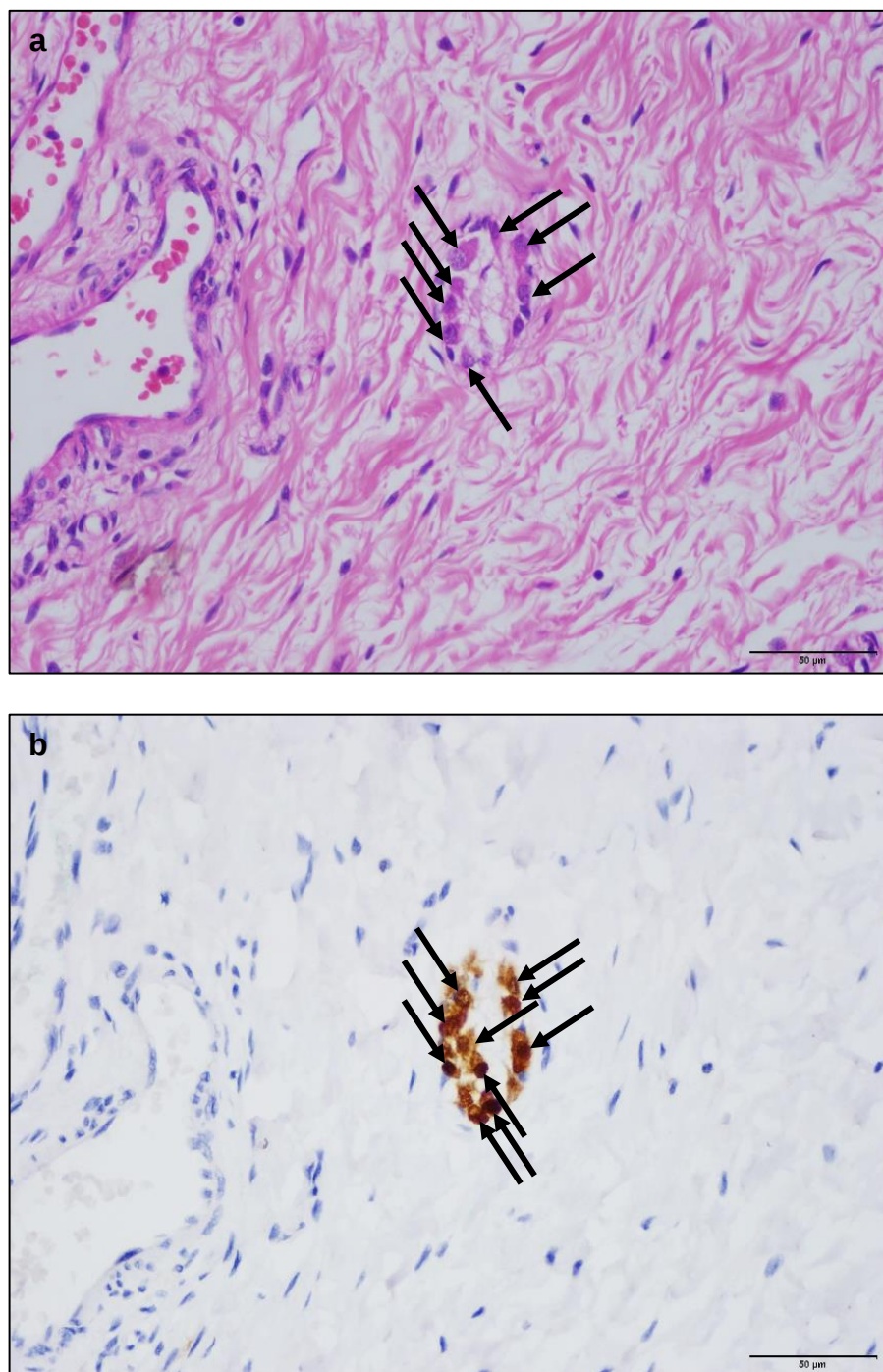


Figura 2 – DNI-B: plexos nervosos submucosos com hiperganglionose. (a) 8 neurônios (setas) (H&E, 400x); (b) 10 neurônios (setas) (Hu C/D, 400x).

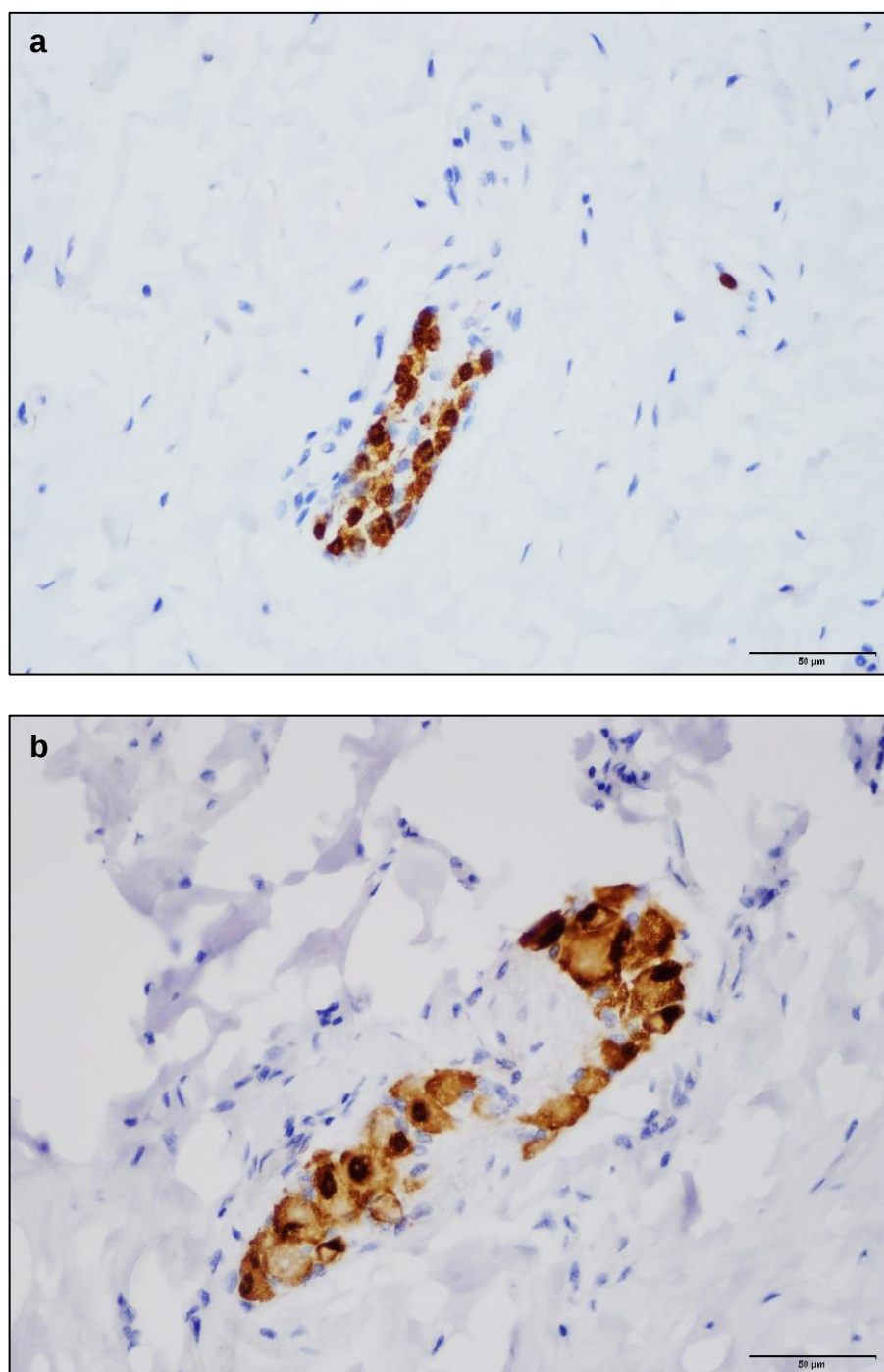


Figura 3 – DNI-B (a e b) Plexos nervosos submucosos com hiperganglionose. Hu C/D com imunoexpressão nuclear (400x).

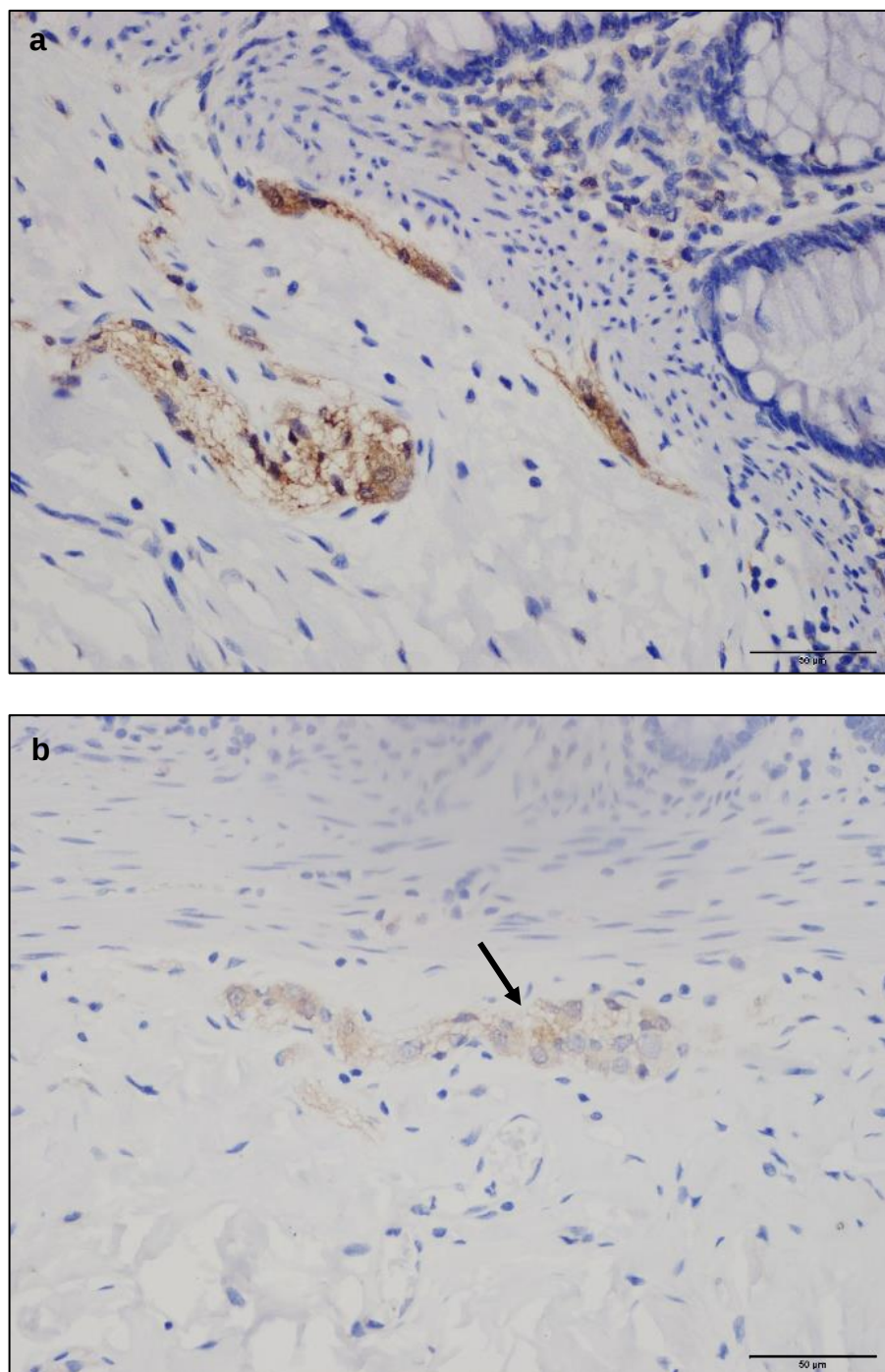


Figura 4 – Imunoexpressão do PTEN nos plexos nervosos submucosos: (a) controle: expressão positiva e (b) DNI-B: perda de expressão (seta) (400x).

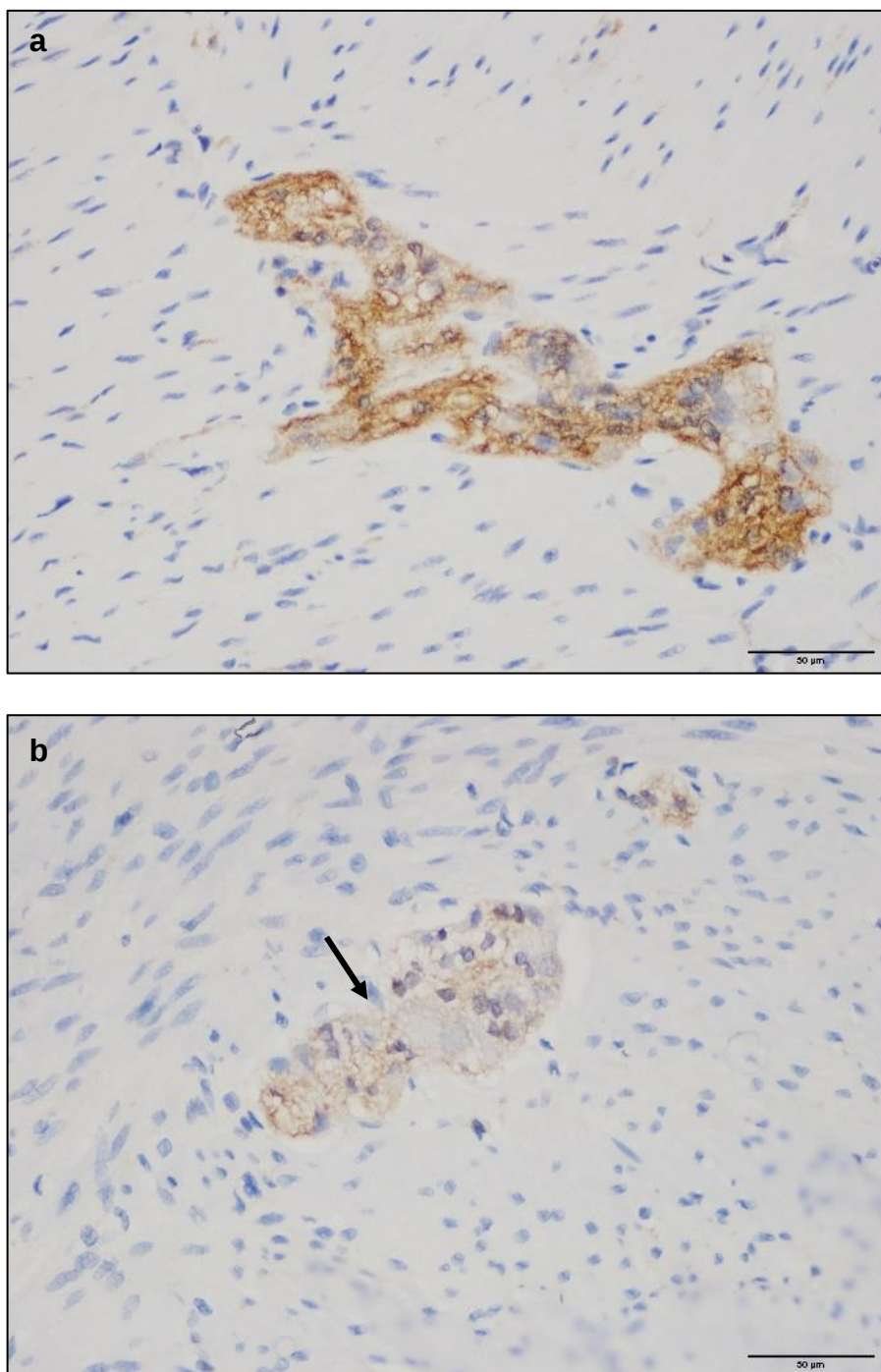


Figura 5 – Imunoexpressão do PTEN nos plexos nervosos mioentéricos: (a) controle: expressão positiva e (b) DNI-B: perda de expressão (seta) (400x).

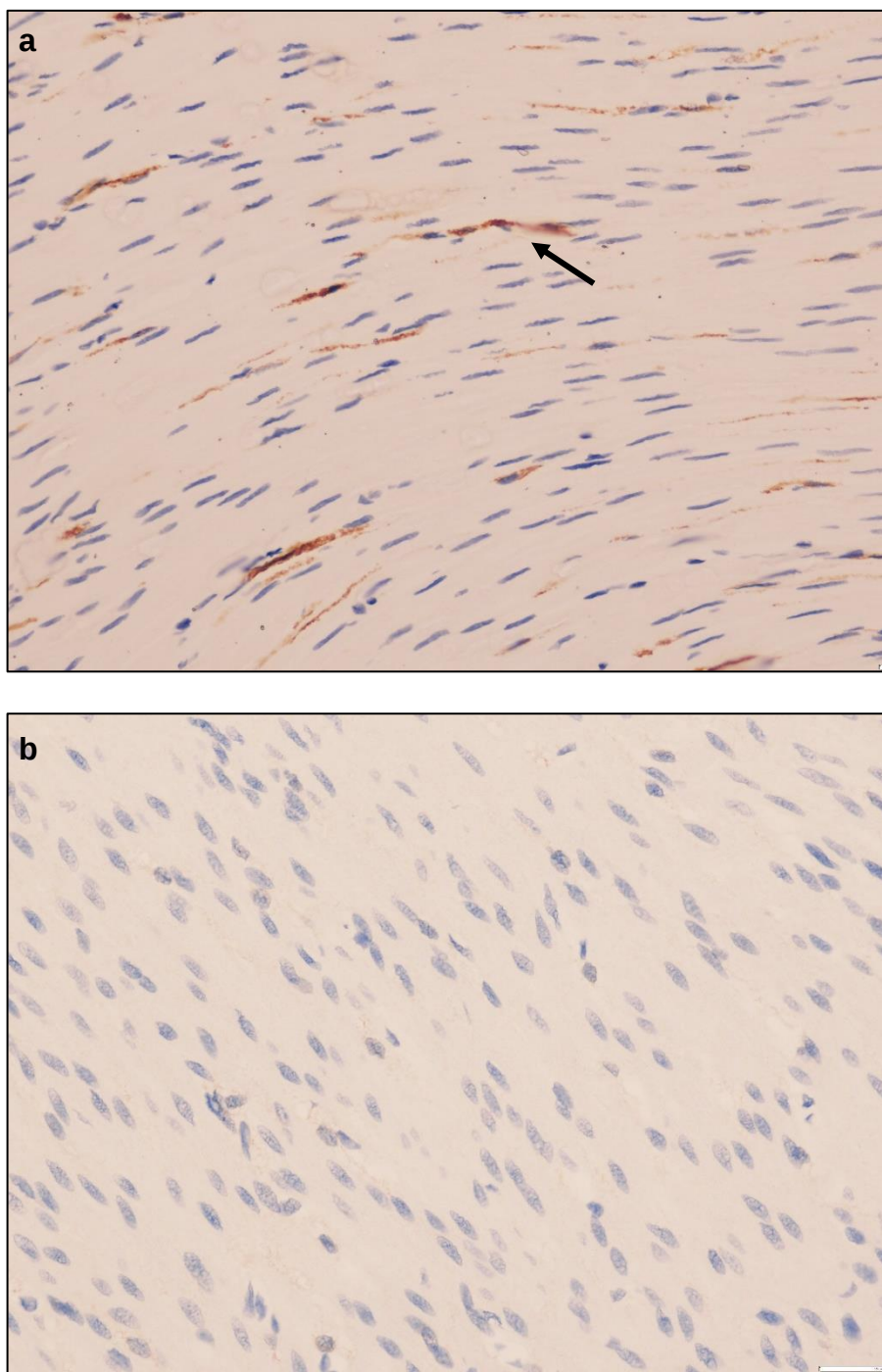


Figura 6 – Imunoexpressão do PTEN nas terminações nervosas da camada muscular: (a) controle: expressão positiva (seta) e (b) DNI-B: perda de expressão (400X).

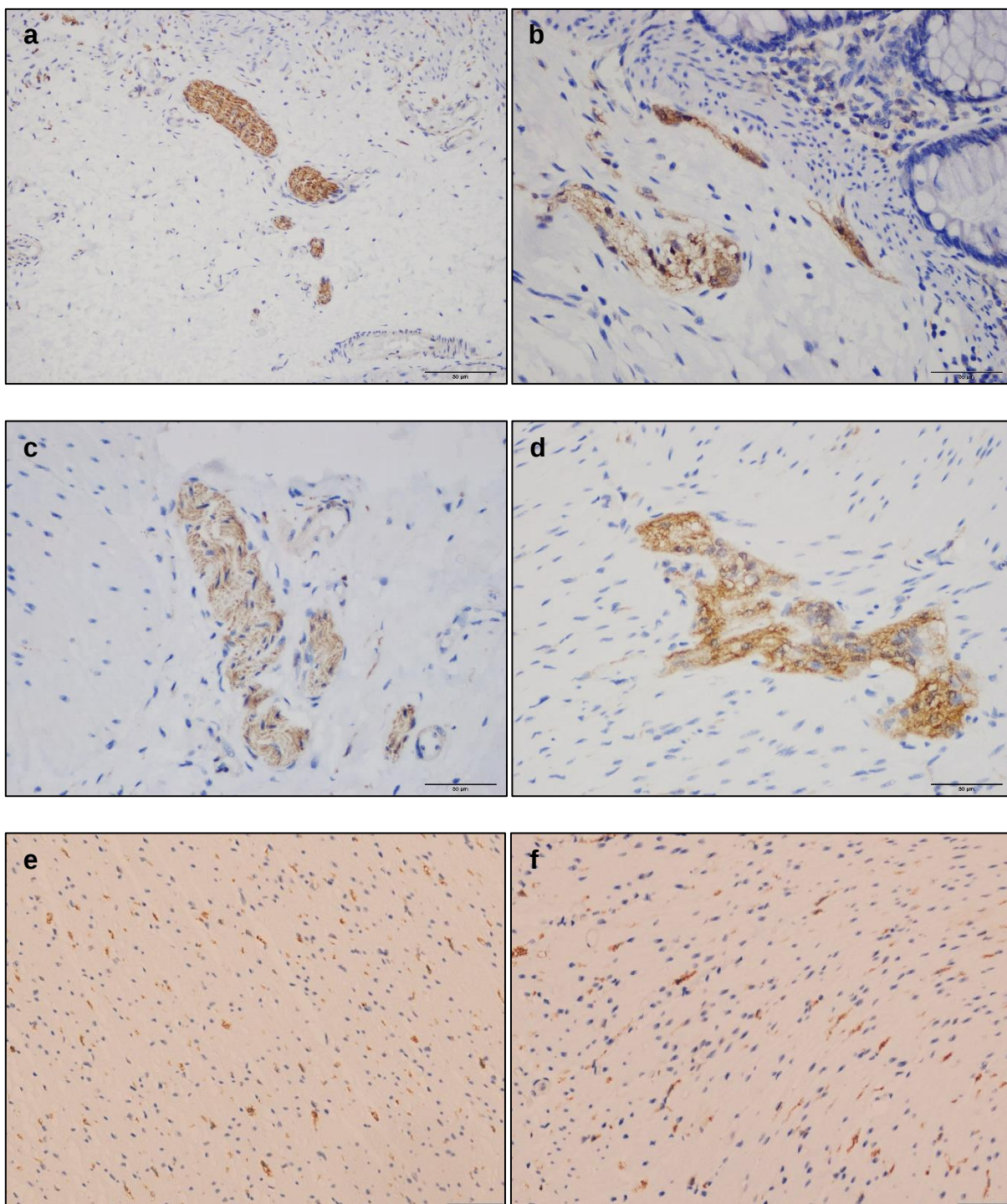
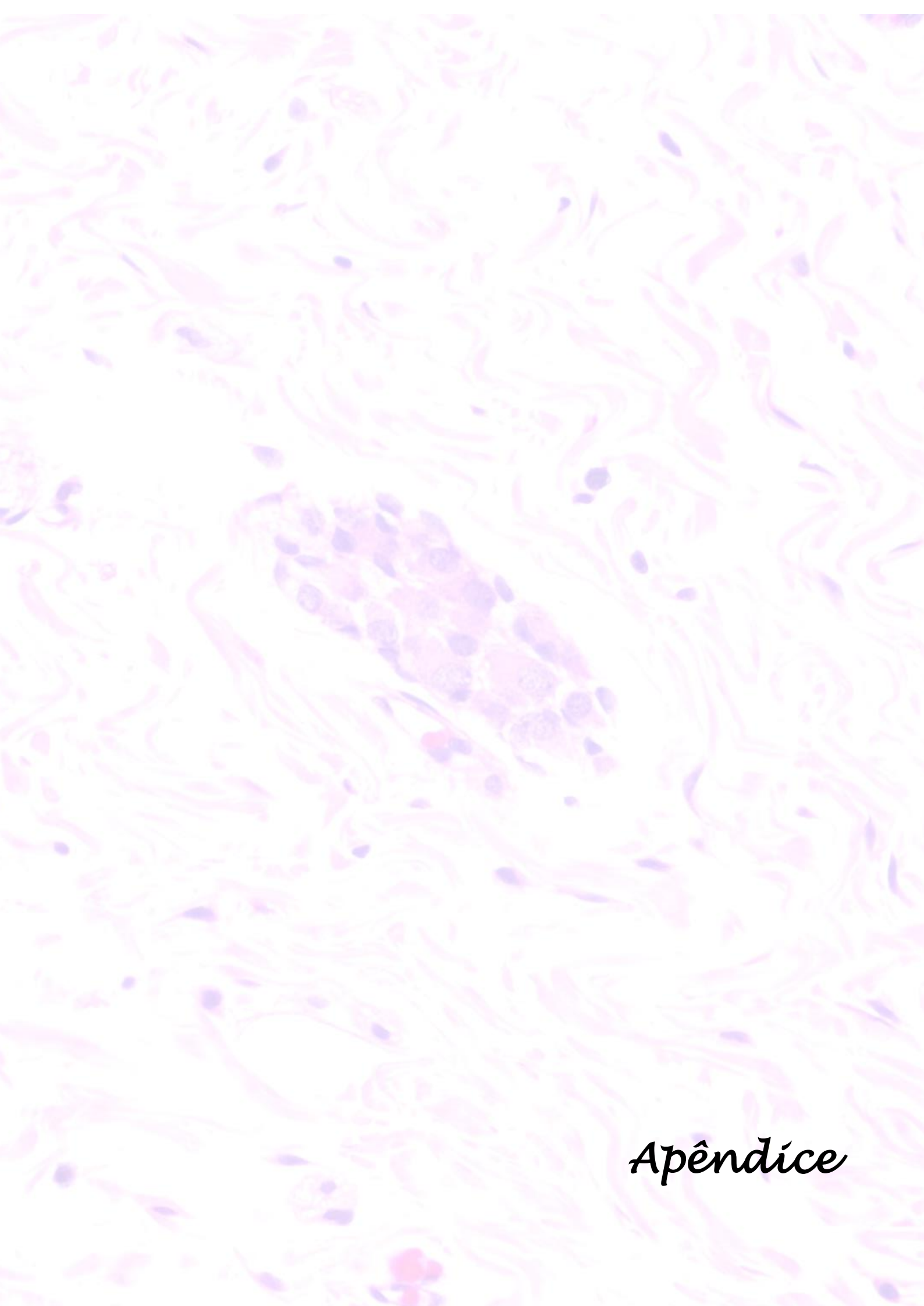


Figura 7 – Imunoexpressão positiva do PTEN na Doença de Hirschsprung: (a, c, e): segmento agangliônico; (b, d, f): segmento gangliônico; (a, b): plexos submucosos; (c, d): plexos mioentéricos e (e, f): muscular própria (400x).

A microscopic image of tissue, likely a histological section, showing a central cluster of cells with prominent nuclei, surrounded by a dense network of pink-stained fibers and scattered individual cells.

Apêndice

Appendix

Studies using immunohistochemical (IHC) methods for diagnosis of Intestinal neuronal dysplasia type B (IND B).

IHQ marker	Authors	Number of patients with IND B	Method for IHC analysis	Histopathological findings of immunoexpression in patients with IND B	Main conclusions
Bcl-2	Wang et al. (2016)	37	Expression in ganglion cells, comparing number of cells and areas of nerve plexuses in IND B, HD and controls.	- Positive expression in immature ganglion cells. - Area of myenteric plexuses significantly larger in IND B than in control group. - Ganglion cell number significantly higher in IND B than in control group. - Ganglion cell size smaller in IND B.	The method can be used with calretinin and RET as a valuable tool in the differential diagnosis between IND B and HD.
Calretinin	Wang et al. (2016)	37	Expression in nerve plexuses and muscle layers.	Positive expression in mature ganglion cells and nerve fibers in myenteric plexuses in IND B and absence of expression in aganglionic segment in HD.	The method can be used with RET e Bcl-2 as a valuable tool in the differential diagnosis between IND B and HD.
	Terra et al. (2017)	29	Expression in ganglion cells and nerve fibers and number of neurons.	Positive expression in neurons of the submucosa nerve plexuses, intrinsic nerve fibers, and ectopic neurons in the mucosa. Identification of fewer neurons than H&E in quantitative analysis.	It can help in the diagnosis of IND B, but it is not as useful as for the diagnosis of HD.
c-kit	Geramizadeh et al. (2013)	29	Number of Cajal interstitial cells in muscle layers and myenteric plexuses in HD and controls.	Positive expression in Cajal cells in muscle layers with significantly higher numbers in IND B compared to HD, but without significant difference with control group.	It can assist in differentiating between IND B and HD.
	Kim et al. (2010)	13	Number of Cajal interstitial cells in muscle layers and myenteric plexuses in IND B and other causes of intestinal pseudo-obstruction.	Positive expression in Cajal cells in muscle layers and myenteric nerve plexuses, with no significant differences between the number of Cajal cells in IND B and other causes of intestinal pseudo-obstruction.	No difference between IND B and other causes of intestinal pseudo-obstruction.
	Yamataka et al. (1997)	3	Expression in myenteric plexuses and muscle layers in IND B and controls.	Reduction of expression in muscle layers, but not in myenteric plexuses in IND B.	Abnormal synapse in muscle layers in IND B.
GAP43	Kobayashi et al. (1996)	14 (4 isolated IND B and 10 IND B associated with HD)	Expression in nerve and nerve plexuses in IND B and controls.	- Absence of expression in muscularis mucosae and/or in the circular muscular and/or longitudinal muscular. - Positive expression in nerve plexuses.	Changes in neuromuscular junctions in IND B.
Hu C/D	Swaminathan et al. (2015)	64 IND B associated with HD	Number of ganglion cell nuclei in submucosal plexuses.	Significant differences in the number of ganglion cells per ganglion between colonic segments with hyperplasia compared to the control group.	Validation of a quantitative histopathological criterion for the diagnosis of giant ganglia, defined by the presence of at least 7 ganglion cells.

Mast cells	Kobayashi et al. (1999)	5 IND B associated with HD	Number of mast cells in IND B, aganglionic and ganglionic segments (HD) and controls.	A higher number of mast cells in IND B and aganglionic segments, compared to ganglionic segments and control group.	Mast cells may be involved in the pathogenesis of HD and IND B.
NCAM (CD56)	Geramizadeh et al. (2013)	29	Number of neurons in muscle layers in IND B, HD and controls.	Positive expression in neurons of the muscular layers, higher number of neurons in IND B, compared to HD, but without significant differences with control group.	It can assist in differentiating between IND B and HD.
	Kim et al. (2010)	13	Expression and distribution of nerve fibers in muscle layers, lamina propria, and muscularis mucosa in IND B and other causes of intestinal pseudo-obstruction.	Positive expression in nerve fibers in muscle layers and mucosa, reduced expression in nerve fibers in external longitudinal muscle layer in IND B, compared to other causes of intestinal pseudo-obstruction.	Abnormalities in neuromuscular junctions in IND B.
	Kobayashi et al. (1996)	14 (4 isolated IND B and 10 IND B associated with HD)	Expression in nerve fibers and nerve plexuses in IND B and controls.	- Absence of expression in muscularis mucosae and/or in circular muscular and/or in longitudinal muscular. - Positive expression in nerve plexuses.	Changes in neuromuscular junctions in IND B.
	Nogueira et al. (2011)	11 (2 isolated IND B, 8 IND B associated with HD and 1 IND B associated with hypoganglionosis)	Expression in nerve trunks in IND B, HD and controls.	Increased expression in nerve trunks in IND B.	IND B cannot be attributed to changes the neuromuscular junction.
NGF	Kobayashi et al. (1999)	5 IND B associated with HD	Expression of mast cells in IND B, aganglionic and ganglionic segments (HD) and controls.	Expression of mast cells close to ganglia in IND B and close to hypertrophied nerve trunks in HD.	Mast cells may be involved in the pathogenesis of HD and IND B.
NO synthase	Bosmann et al. (2001)	17	Expression in ganglion cells in IND B and controls.	Increase in the number of NO synthase positive ganglion cells, compared to the control group.	Increase in local NO production in IND B.
NSE	Kim et al. (2010)	13	Expression and distribution of nerve fibers in muscle layers, lamina propria, and muscularis mucosa in IND B and other causes of intestinal pseudo-obstruction.	Positive expression in nerve fibers in the muscle layers and mucosa, without significant differences compared other causes of intestinal pseudo-obstruction.	Difference in NSE expression between IND B and other causes of intestinal pseudo-obstruction.
Peripherin	Bosmann et al. (2001)	17	Number of ganglion cells.	Increase in number of NO synthase positive ganglion cells compared to control group.	Increase in local NO production in IND B.
	Szabolcs et al. (1996)	3 IND B associated with HD	Density of ganglion cells in submucosal and myenteric nerve plexuses.	Markedly high ganglion cell density in IND B associated with HD compared to HD and control group.	The identification of ganglion cells and can be useful in the diagnosis of different forms of malformations of the enteric nervous system.

PGP9.5	Geramizadeh et al. (2013)	29	Number of neurons in inner and outer muscle layers in IND B, HD and controls.	Positive expression in neurons of the inner intestinal muscle layer, with a significantly higher number of neurons in patients with IND B, compared to HD, but without significant differences when compared to the control group.	It can assist in differentiating between IND B and HD.
	Kramer et al. (1994)	1	Specific marker of nervous system.	Positive expression in enlarged nerve trunks, hyperplastic nerve ganglia, and heterotopic nerve cells.	IND B can be diagnosed using this immunohistochemical method.
PTEN	O'Donnell & Puri (2011)	10	Expression in myenteric and submucosal plexuses in IND B, HD and controls.	Significantly reduced expression in submucosal and myenteric nerve plexuses.	IND B may be related to lower PTEN expression.
RET	Bosmann et al. (2001)	17	Number of ganglion cells.	RET-IHQ showed only a few ganglion cells.	Not useful in the diagnosis of IND B.
	Wang et al. (2016)	37	Expression in ganglion cells, number of cells and areas of nerve plexuses in IND-B, HD, and controls.	- Expression present in mature and immature ganglion cells. - Area of myenteric plexuses significantly larger in IND B than in control group. - Ganglion cell number in the myenteric plexus significantly higher in IND B than in control group. - Identification of ectopic myenteric plexuses in IND B.	Can be used together with calretinin and Bcl-2 in the differential diagnosis between IND B and HD.
S100	Bosmann et al. (2001)	17	Number of ganglion cells	S100 IHQ showed only a few ganglion cells.	Not useful in the diagnosis of IND B.
	Geramizadeh et al. (2013)	29	Number of neurons in muscle layers and myenteric plexuses, in IND-B, HD and controls	Expression in neurons of the muscle layers and myenteric nerve plexuses, with a significantly higher number of neurons in IND B, compared to HD, but without significant differences with control group	It can assist in the differential diagnosis between IND B and HD.
	Kim et al. (2010)	13	Expression and distribution of nerve fibers in muscle layers, lamina propria and muscularis mucosa in IND B and other causes of intestinal pseudo-obstruction.	Expression in nerve fibers in the muscular layers and mucosa, without significant differences between IND B and other causes of intestinal pseudo-obstruction.	Not useful in the differential diagnosis between IND B and other causes of intestinal pseudo-obstruction.
Sinaptofisina	Bosmann et al. (2001)	17	Number of ganglion cells	Synaptophysin showed only a few ganglion cells.	Not useful in the diagnosis of IND B.
	Geramizadeh et al. (2013)	29	Number of neurons in muscle layers and myenteric plexuses, in IND B, HD and controls	Expression in neurons of the muscle layers and myenteric nerve plexuses, with a significantly higher number of neurons in IND B, compared to HD, but without significant differences with control group.	It can assist in the differential between IND B and HD.

	Kobayashi et al. (1996)	14 (4 isolated IND and 10 IND B associated with HD)	Expression in synaptic vesicles in the plexuses and nerve fibers in IND B and controls	- Absence of expression in the muscularis mucosa and/or muscularis propria - Positive expression in nerve plexuses.	Change in neuromuscular junctions in IND B
	Kobayashi et al. (1997)	5 (3 isolated IND B and 2 IND B associated with HD)	Expression in synaptic vesicles in plexuses and nerve fibers in IND B and HD	Strong expression in myenteric ganglion and reduction in muscle layers.	The method is applicable in intraoperative evaluation to assess the distribution of synapses in myenteric plexuses and intestinal muscle layers.
	Nogueira et al. (2011)	11 (2 isolated IND B, 8 IND B associated with HD and 1 IND B associated with hypoganglionosis)	Expression in nerve trunks in IND B, HD and controls	Increased expression in nerve trunks in IND B, irregularly distributed in the mucosa, muscularis mucosa, and muscularis propria.	IND B cannot be attributed to changes in the neuromuscular junction
	Yamataka et al. (1997)	3	Expression in myenteric plexuses and muscle layers.	Reduced expression in the muscle layers, but not in the myenteric plexuses in IND B	In association with decreased expression of c-kit, it can demonstrate the role of Cajal cells in the pathophysiology of IND B.
SMA (1a4)	Kim et al. (2010)	13	Expression and distribution in muscularis mucosa and muscle layers in IND B and other causes of intestinal pseudo-obstruction.	Expression in muscle fibers from muscular layers and muscularis mucosa, without differences between IND B and other causes of intestinal pseudo-obstruction.	No differences between IND B and other causes of intestinal pseudo-obstruction.
	Rolle et al. (2003)	16 isolated IND B and 11 IND B associated with HD	Expression in submucosa vasculature of IND B and controls.	Increased filaments around the submucosa vessels compared to control group.	Abnormal vasculature may aid in the diagnosis of IND B.
Sox10	Liu et al. (2019)	32	Number of Sox10 + glial cells and nerve cells of plexuses in IND B, HD and controls.	High proliferation of glial cells and nerve cells in nerve plexuses in IND B.	A negative correlation between Sox10 IHC expression and blood Sox10 methylation, which may be related to IND B etiopathogenesis.

