UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Júlio de Mesquita Filho"
Faculdade de Medicina de Botucatu

Laura Cantisano de Deus Silva

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

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

Orientador: Prof. Ass. Pedro Luiz Toledo de Arruda Lourenção
Co-Orientadora: Profa. Dra. Giovana Tuccille Comes Brambilla

Botucatu
2024

Laura Cantisano de Deus Silva

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

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

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

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

Botucatu
2024

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

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

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina, Botucatu
Orientador: Pedro Luiz Toledo de Arruda Lourenção
Coorientador: Giovana Tuccille Comes Brambilla
Capes: 40102076

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

Palavras-chave: Biópsia retal; Disganglionoses intestinais; Doença de Hirschsprung; Experimental; Técnicas de biopsia.

REGISTRO DO IMPACTO ESPERADO NA SOCIEDADE

Discente: Laura Cantisano de Deus Silva

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

Co-Orientador: Profa. Dra Giovana Tuccille Comes Brambilla

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

RECORD OF THE EXPECTED IMPACT ON SOCIETY

Student: Laura Cantisano de Deus Silva

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

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

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

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Botucatu

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

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

Prof. Dr. PEDRO LUIZ TOLEDO DE ARRUDA LOURENÇÃO

Agradecimentos

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Resumo

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

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

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

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

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

Abstract

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

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

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

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

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

Lista de Abreviações

DH – Doença de Hirschsprung

UNESP – Universidade Estadual de São Paulo

FMB – Faculdade de Medicina de Botucatu

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

H&E – Método de hematoxilina e eosina

ANOVA – Análise de Variância

Seg – Segundos

Kg – Kilos

Cm – Centímetros

Lista de Quadros

Quadro 1. Classificação etiológica das disganglionoses intestinais. Adaptado de Scharli, 1995..... 14

Quadro 2: Tipos de técnicas de biópsias de reto utilizadas na investigação diagnóstica das disganglionoses intestinais..... 17

Quadro 3: Subdivisão dos animais para o estudo experimental..... 22

Quadro 4: Escala de deposição de colágeno..... 34

Quadro 5: Escala de intensidade de fibrose..... 34

Lista de Figuras

Figura 1: Sequência dos procedimentos executados com os animais de cada grupo + animal sham..... 23

Figura 2: Animais acondicionados em gaiolas individuais durante acompanhamento..... 24

Figura 3: A) Colocação dos afastadores; B) Exposição da mucosa e marcação do setor a ser biopsiado C) Aspecto pós biópsia cirúrgica..... 26

Figura 4: A) Coelho em decúbito dorsal B) Plástico adaptado para introdução da pinça C) Visão do ânus com o plástico posicionado..... 27

Figura 5: A) Coelho posicionado para o procedimento B) Gastroscópio Olympus CLV U20 C) Amostra obtida pela pinça Jumbo..... 28

Figura 6: A) Pinça de Noblett em mesa para utilização B) Coelho em decúbito lateral junto à pinça..... 29

Figura 7: A) Vista do ânus com a utilização de afastadores B) Vista do endoscópio inserido endoanal..... 30

Figura 8: Animal em período de observação pós-operatório..... 31

Figura 9: A) Procedimento de exérese do reto B) Vista da amostra obtida..... 32

Figura 10: Caso do grupo Punch constituído por fragmentos superficiais de mucosa e muscular da mucosa. Ausência de representação da submucosa e dos plexos nervosos submucosos (Hematoxilina e eosina, 40x)..... 37

Figura 11: Caso do grupo Cirúrgico mostrando plexo nervoso da submucosa e plexo nervoso mioentério (círculo) (Hematoxilina e eosina, 40x)..... 38

Figura 12: Caso do grupo Endoscopia com presença de plexos nervosos na submucosa (Hematoxilina e eosina, 200x)..... 38

Figura 13: Caso do grupo Sucção com presença de plexos nervosos na submucosa (Hematoxilina e eosina, 200x)..... 39

Figura 14: Caso do grupo Cirúrgico apresentando infiltrado inflamatório e tecido de granulação com neovascularização (Hematoxilina e eosina, 100x)..... 41

Figura 15: Caso do grupo Punch mostrando deposição de colágeno corado em azul destacando a fibrose na submucosa (Tricrômio de Masson, 40x)..... 41

Lista de Tabelas

Tabela 1: características de peso dos animais e tempo intraoperatório em relação aos grupos experimentais..... 35

Tabela 2: Análise histopatológica das amostras obtidas para cada grupo experimental..... 36

Tabela 3: Análise histológica descritiva das amostras obtidas para cada grupo experimental..... 37

Tabela 4: Características Macroscópicas para cada grupo experimental analisado..... 39

Tabela 5: Característica Histopatológica das peças cirúrgicas de reto para cada grupo experimental avaliado..... 40

Sumário

1.Introdução..... 14

2. Objetivos..... 20

3. Materiais e Metodologia..... 21

4. Resultados..... 35

5. Discussão..... 42

6. Conclusão..... 49

7. Referências Bibliográficas..... 50

8. Anexos..... 57

1. Introdução

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

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

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

A investigação diagnóstica é habitualmente composta por três métodos: manometria anorretal, enema opaco e biópsia do reto. Os dois primeiros são considerados como métodos de triagem e a biópsia retal é o padrão ouro para diagnóstico, comprovando a ausência de células ganglionares nos plexos nervosos do intestino distal (Qualman et al., 1999; De Lorink et al., 2006). Aspectos relacionados à etiopatogenia, fisiopatologia e diagnóstico da DH ainda são motivos de pesquisa e intensa discussão na literatura, objetivando melhorar o tratamento às crianças portadoras desta doença.

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

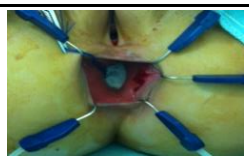
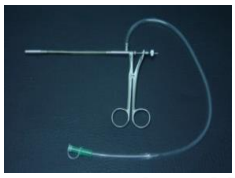
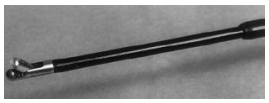
A análise histopatológica do sistema nervoso entérico a partir de amostras obtidas por meio de biópsias do reto distal é, portanto, a principal ferramenta diagnóstica na investigação etiológica das disganglionoses intestinais (Feichter et al., 2009; Montedonico et al., 2011). A análise histopatológica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

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

Os fragmentos de biópsias retais são considerados adequados quando apresentam pelo menos 3 mm de diâmetro, com, no mínimo, um terço da espessura correspondendo à submucosa, sendo preferível que a metade da amostra seja representada por submucosa (Qualmann et. al 1999; Muise & Cowles, 2016). Quando os fragmentos não envolvem a submucosa, a investigação diagnóstica fica bastante prejudicada (Ali et al., 2006; Kobayashi et al., 2002). Isto leva à necessidade da realização de novas biópsias, habitualmente sob anestesia geral, para a obtenção de fragmentos mais profundos da parede do reto (Hall et al., 2009; Gil-Vernet et al., 2006). Há, desta forma, além dos riscos inerentes deste novo procedimento, atraso no diagnóstico e no tratamento, maior ansiedade dos pais e considerável aumento de custos (Ali et al., 2006; Muise & Cowles, 2016).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2. Objetivos

Objetivo primário: Identificar qual é a melhor técnica de biópsia de reto para análise histopatológica dos plexos nervosos da submucosa.

Objetivos secundários:

- Identificar qual das técnicas de biópsias de reto permite avaliação histopatológica de um maior número de plexos nervosos e de células ganglionares na submucosa por seção histológica analisada;

- Identificar qual das técnicas de biópsias de reto apresenta menos inflamação e/ou fibrose quando avaliadas após 14 dias dos procedimentos;

- Identificar eventuais complicações ou óbitos.

- Identificar qual das técnicas exige menor tempo para sua realização.

3. Materiais e Metodologia

Este projeto de pesquisa foi elaborado de acordo com as diretrizes estabelecidas pelo ARRIVE *Guideline*, para estudos de experimentação animal (ARRIVE Guidelines, 2010) (Anexos 1 e 2).

3.1 Declaração ética

Este projeto foi submetido para apreciação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, sob protocolo SIPE-348/2019 (Anexo 3) e foi desenvolvido em acordo com as Diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA,2015). Não houve nenhum conflito de interesse na realização deste estudo.

3.2 Plano do estudo

O modelo animal proposto para este estudo utilizou coelhos fêmeas. Muitos estudos experimentais recentes vêm se utilizando de modelos em coelhos para a investigação das bases celulares da motilidade intestinal e modelos de doenças colorretais em crianças (Gunn et al., 1968; Cooke et al., 1986; Takegawa et al., 2005; Watanabe et al., 2014). A escolha por esses modelos é justificada pelo fato de que os humanos compartilham mecanismos de funcionamento intestinais equivalentes com outras espécies de mamíferos (Spencer et al., 2016).

Os animais foram, primeiramente, randomizados por sorteio, através de sua numeração sequencial com envelopes, e subdivididos para alocação em 4 grupos experimentais **(Biópsia cirúrgica, Punch, Endoscopia e Sucção** e em 1 grupo controle simulado **(Grupo Sham)** conforme Quadro 3:

Quadro 3: subdivisão dos animais para o estudo experimental.

Grupo	Número de Amostras	Técnica	Instrumento	Referência
Biópsia cirúrgica	6	Swenson	Afastador lone-star	(Swenson et.al, 1955);
Punch	6	Punch	Pinça tipo *Punch* laríngeo	(Hirose et.al, 1993);
Endoscopia	6	Biópsia endoscópica	Pinça tipo jumbo	(Hirsch et.al, 2011);
Sucção	6	Sucção da mucosa	Pinça de sucção tipo Noblett	(Noblett et.al, 1969);
Sham	4	Cada animal deste grupo submetido a simulação de uma das quatro técnicas experimentais		

Os fragmentos de biópsias obtidos através das técnicas experimentais foram processados e submetidos à análise histopatológica para avaliação da adequação do espécime e caracterização morfológica e morfométrica dos plexos nervosos da submucosa. A médica patologista responsável pela análise foi blindada das informações referentes ao tipo de técnica de biópsia utilizada em cada animal**.**

Após os procedimentos experimentais e simulados, os animais foram monitorados por 14 dias, investigando-se eventuais complicações (sinais de abdome agudo, sangramento profuso, sinais de infecção local, parada de eliminação de fezes) ou óbito. O membro da equipe de pesquisa, responsável por este monitoramento, foi blindado das informações referentes ao tipo de técnica utilizada em cada animal.

No 14º dia após os procedimentos, os animais foram eutanasiados e, posteriormente, submetidos à ressecção cirúrgica “em bloco” do reto. Estas peças cirúrgicas de reto foram processadas e submetidas à avaliação histopatológica para investigação da presença de reação inflamatória, tecido

de granulação e colagenogênese. Novamente, a médica patologista responsável pela análise foi blindada das informações referentes ao tipo de técnica utilizada em cada animal.

Durante todo o experimento, cada animal foi considerado como uma unidade experimental, sendo mantido isolado em uma gaiola e avaliado individualmente.

Nos três primeiros dias de pós-operatório, os coelhos eram avaliados em dois momentos além de receberem Tramadol e Meloxican, via intradérmica, com auxílio de agulha apropriada. Além da administração da medicação, os animais eram avaliados quanto à presença de sangramento, evacuação e diurese, que eram avaliados em conjunto com equipe de limpeza do local de observação dos animais, registrando intercorrências em tabela específica. Também era investigada a presença de sinais de infecção como hipoatividade, orelhas baixas, hiporexia e falta de reação ao estímulo. Após esse período, a avaliação ocorria apenas uma vez ao dia até o momento da eutanásia conforme Figura 1.

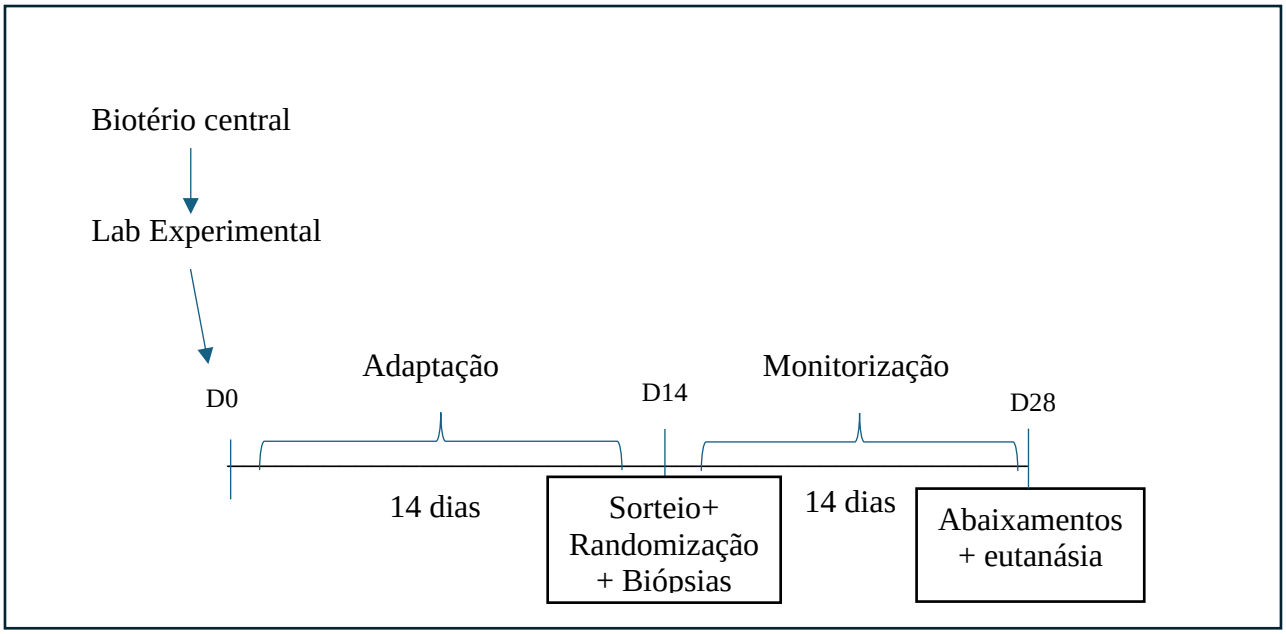


Figura 1: Sequência dos procedimentos executados com os animais de cada grupo + animal sham.

3.3 Animais

Foram utilizados coelhos, linhagem híbrida Norfolk, com padrão genético de Botucatu, fêmeas, com 90 a 100 dias de idade e peso entre 2,0 e 2,5 kg. Os animais foram provenientes do biotério central do campus de Botucatu da UNESP e foram transportados até o biotério de coelhos da Unidade de Pesquisa Experimental da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP (UNIPEX-FMB-UNESP), onde se aclimataram por aproximadamente 14 dias para se adaptarem às condições do novo biotério.

3.4 Instalações e condições veterinárias dos animais

Os animais foram mantidos no biotério de coelhos da UNIPEX-FMB-UNESP, onde permaneceram em gaiolas, com 50 cm altura x 50 cm largura x 50 cm profundidade, individualizados, recebendo água e ração comercial ad libitum (Figura 2). O biotério possui ciclo claro escuro 12h/12h, exaustão e controle de temperatura 16 a 21 °C.



Figura 2: Animais acondicionados em gaiolas individuais durante acompanhamento.

3.5 Número de amostra

O número amostral de 6 coelhos por grupo experimental foi estabelecido com base em poder de teste de 90%, nível de significância de 5%, desvio-padrão máximo esperado de 10%, com diferença esperada entre os grupos de 20%. Este valor de diferença esperada entre os grupos foi estimado a partir da revisão sistemática realizada por Comes et al. (2021), com análise de proporções de séries de casos,

na qual o maior valor entre os intervalos de confiança das taxas de resultados conclusivos obtidos com as diferentes técnicas de biópsias retais analisadas foi de próximo de 20%. Assim, a amostra planejada foi de 24 coelhos para os grupos experimentais (Grupo Cirúrgica, Grupo Punch, Grupo Endoscopia e Grupo Sucção) e mais 4 coelhos para o grupo simulado (Grupo Sham), seguindo orientações da normativa ética e da ARRIVE *Guideline* (Anexo 1 e 2) buscando a utilização de menor número possível de animais para o experimento, totalizando assim 28 coelhos.

3.6 Procedimentos técnicos

A) Anestesia e eutanásia

Após jejum de 12 horas, os animais foram anestesiados com cetamina 30mg/kg + xilazina 3mg/kg, por via intravenosa. Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados sob anestesia, supervisionada por anestesiologista veterinário. Durante o procedimento cirúrgico, foram realizados controles de tempo anestésico e de dose utilizada dos anestésicos em cada grupo. A eutanásia foi feita com injeção intravenosa de tiopental sódico na dose de 180 mg/kg de peso corporal.

B) Procedimentos Cirúrgicos

Foi realizada antibiótico profilaxia com enroloxacino 10mg/kg via subcutânea em dose única, que seria repetida, se houvesse sinais clínicos de infecção, após 7 dias do procedimento, por orientação veterinária. Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados sob condições estéreis. Os animais não foram submetidos a preparo intestinal. As técnicas de biópsias foram definidas de acordo com os grupos experimentais.

Grupo cirúrgica: sob anestesia, em decúbito dorsal, os animais foram submetidos à posicionamento de afastadores em garra, do tipo “Lone Star” (Yamataka et al., 2019). As garras foram posicionadas acima da transição anorretal (Figura 3). Em seguida, na parede posterior do reto, foram

passados 2 pontos de reparo, com fio categute simples 4.0, a 3 e a 4 cm acima da transição anorretal, seguindo o protocolo que utilizamos em humanos, em sentido longitudinal, para apresentação do segmento a ser incisado. Foi realizada incisão, com tesoura de Metzenbaum, com aproximadamente 1 cm de extensão (entre os pontos de reparo). Em seguida, foi realizada sutura com o mesmo fio categute simples 4.0, entre os dois pontos de reparo, no local em que foi realizada a biópsia de parede total. Este procedimento teve duração máxima de 5 minutos e foi retirado um fragmento de cada animal.

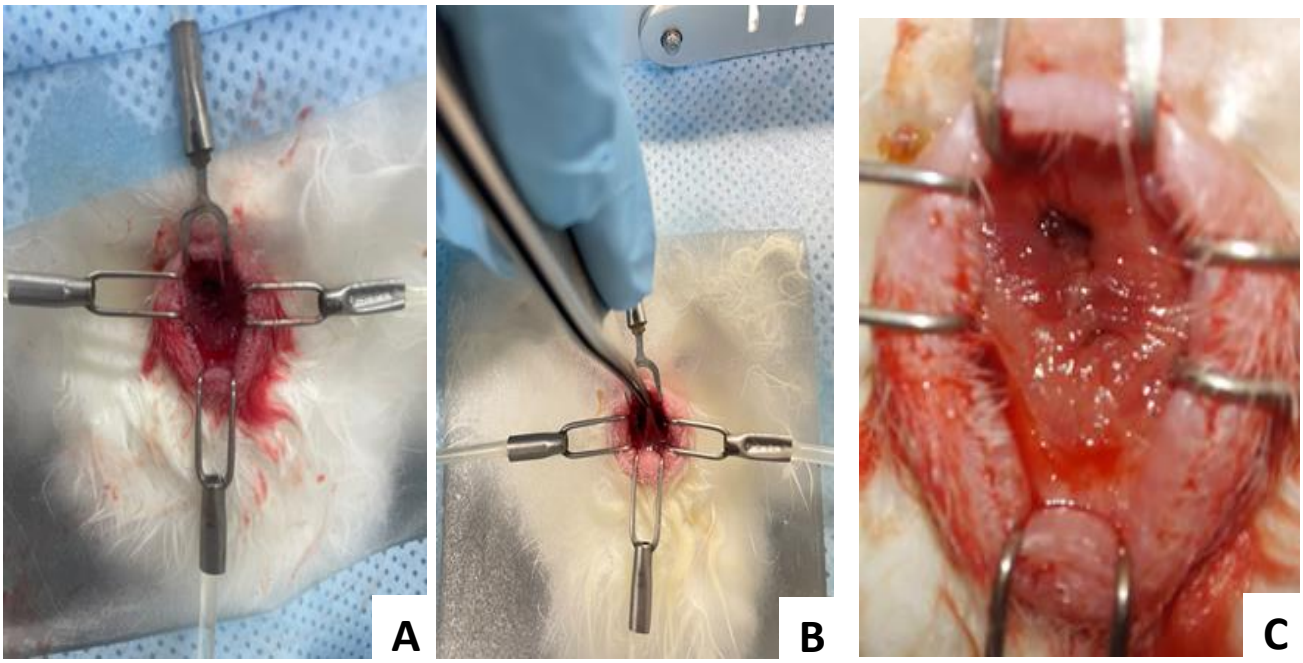


Figura 3: A) Colocação dos afastadores; B) Exposição da mucosa e marcação do setor a ser biopsiado C) Aspecto pós biópsia cirúrgica.

Grupo Punch: sob anestesia, em decúbito dorsal, foi introduzido no reto do animal, um tubo plástico adaptado, que possui um orifício de 6 mm perfurado em uma de suas paredes. Este orifício foi posicionado a aproximadamente 3 cm acima da borda anal, na parede posterior do reto (Figura 4). Em seguida, foi realizada pequena pressão do tubo contra a parede retal, fazendo com que a mucosa retal fosse projetada ao interior do tubo plástico. Logo após, foi realizada biópsia desta mucosa que se prolapsou para dentro do tubo plástico, utilizando-se pinça laríngea (do tipo Nishihata), com um

tamanho de copo de 3 mm (Hirose et al., 1993; Yoshimaru et al., 2017). Este procedimento teve duração máxima de 3 minutos. Caso a tentativa de biópsia não resultasse em obtenção de espécime, o procedimento era repetido, de acordo com os mesmos princípios técnicos, logo em seguida, até a obtenção de fragmento desejado, sendo feita a retirada de dois fragmentos por animal.

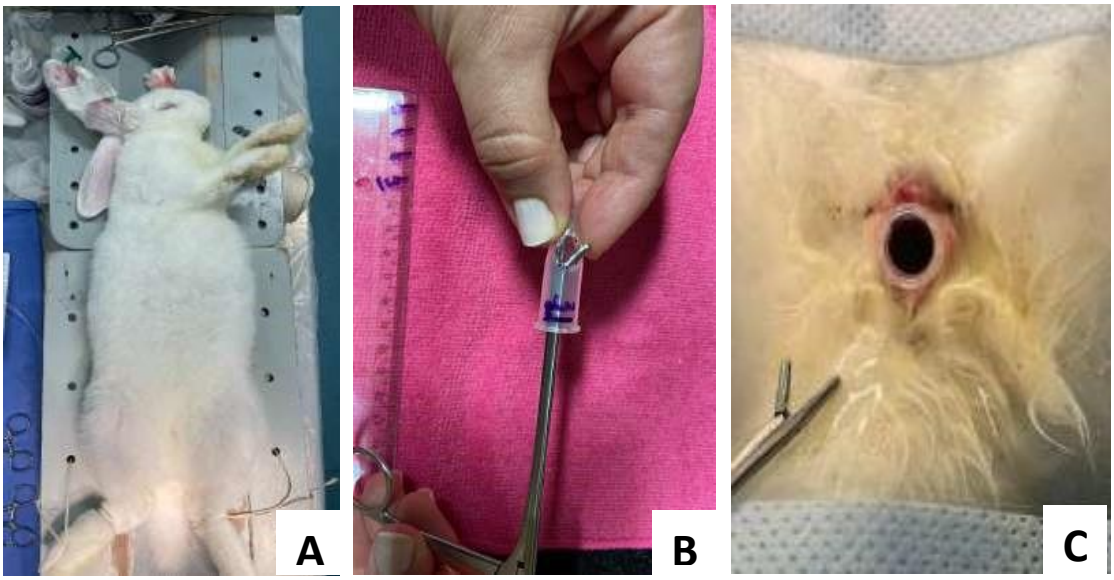


Figura 4: A) Coelho em decúbito dorsal; B) Plástico adaptado para introdução da pinça; C) Visão do ânus com o plástico posicionado.

Grupo Endoscopia: sob anestesia, em decúbito lateral esquerdo, foi realizada endoscopia utilizando-se gastroscópio Olympus CLV U20, com 10mm de diâmetro (Figura 5). Foi localizada, por visão endoscópica, a parede posterior do reto, na altura de 3 cm acima da borda anal, e realizada biópsia endoscópica com pinça tipo jumbo - Boston Scientific Radial Jaw 4 (Hirsch et al., 2011). Este procedimento teve duração máxima de 7 minutos. Caso a tentativa de biópsia não resultasse em obtenção de espécime, o procedimento era repetido, de acordo com os mesmos princípios técnicos, logo em seguida, até a obtenção de fragmento desejado, sendo feita a retirada de dois fragmentos por animal.

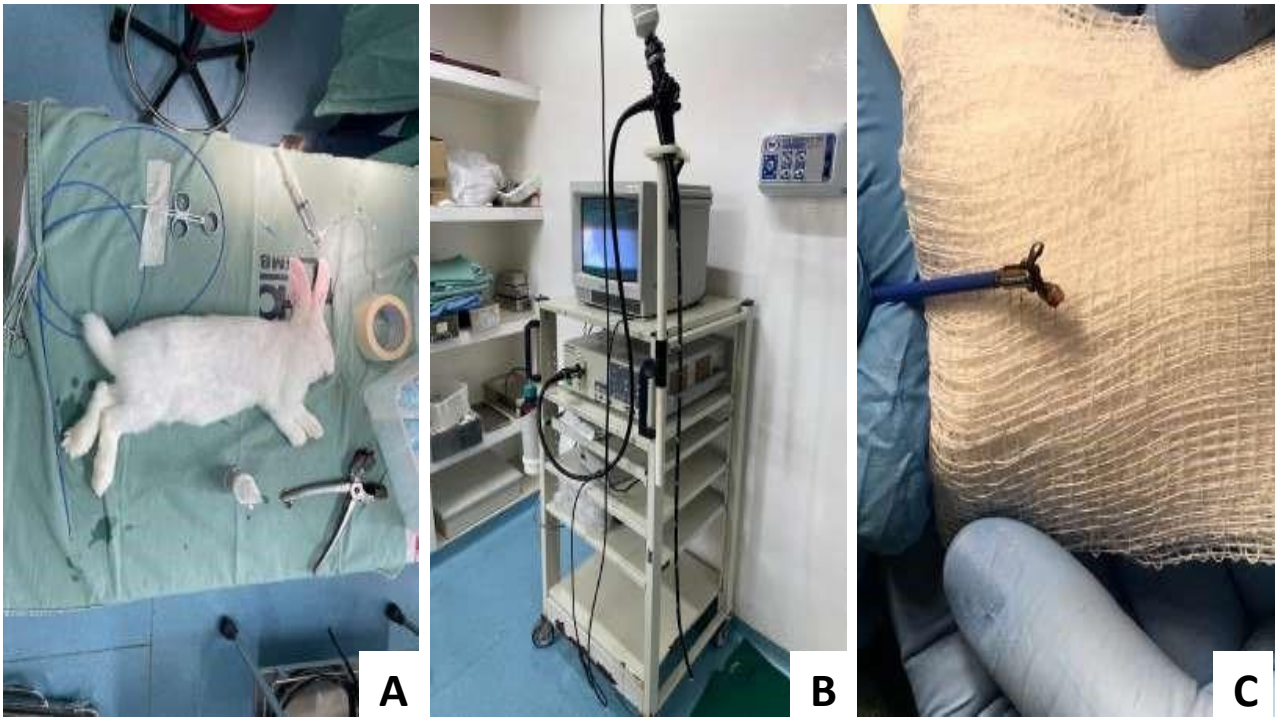


Figura 5: A) Coelho posicionado para o procedimento; B) Gastroscópio Olympus CLV U20; C) Amostra obtida pela pinça Jumbo.

Grupo Sucção: sob anestesia, em decúbito lateral, a pinça do tipo Noblett foi introduzida dentro do reto, até 3 cm acima da borda anal, na parede posterior do reto (Figura 6). Em seguida, foi realizada aspiração com pressão negativa, controlada por manômetro, com pressão negativa de 10ml de ar em seringa conectada (Friedmacher & Puri, 2016), e subsequente disparo do gatilho, com obtenção da biópsia por aspiração da parede do reto. Este procedimento teve duração máxima de 3 minutos e 10 segundos. Caso a tentativa de biópsia não resultasse em obtenção de espécime, o procedimento era repetido, de acordo com os mesmos princípios técnicos, logo em seguida, até a obtenção de fragmento desejado, sendo feita a retirada de dois fragmentos por animal.

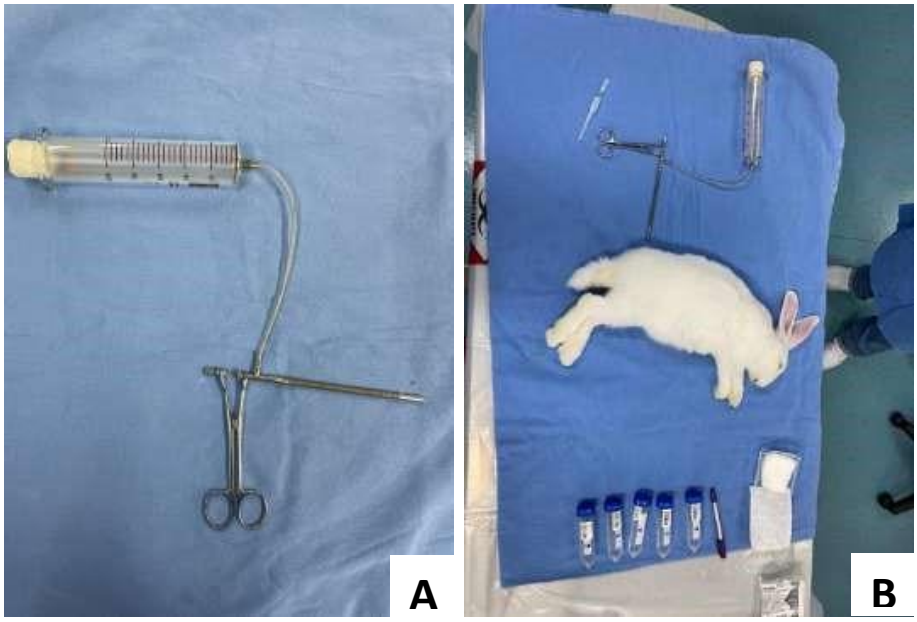


Figura 6: A) Pinça de Noblett em mesa para utilização; B) Coelho em decúbito lateral junto à pinça.

C) Procedimentos Simulados (Grupo Sham)

Cada um dos quatro animais do Grupo Sham foi submetido a uma das quatro técnicas de biopsias experimentais, em caráter simulado. Após anestesia, em decúbito dorsal, o primeiro animal do Grupo Sham (simulação da técnica experimental do Grupo Cirúrgica), foi submetido à colocação do afastador tipo "Lone Star", com suas garras locadas acima da transição anorretal e posterior passagem de pinças pela luz do reto, sem manipulação da parede do reto, por cerca de 3 minutos (Figura 7a). O segundo animal do Grupo Sham foi submetido à simulação da técnica experimental do Grupo Punch. Para isso, após anestesia e em decúbito dorsal, foi submetido à introdução via retal do mesmo tubo plástico adaptado, com seu orifício posicionado a aproximadamente 3 cm acima da borda anal, e com leve pressão na parede do reto, permitindo o prolapso da mucosa do reto para dentro do orifício do tubo. Em seguida, foi realizada a passagem da pinça laríngea (do tipo Nishihata), por dentro do tubo, sem manipulação da parede retal. Este procedimento teve duração aproximada de 1 minuto. O terceiro animal do Grupo Sham foi submetido à simulação da técnica experimental do Grupo

Endoscopia. Para isso, após anestesia e em decúbito lateral esquerdo, foi submetido à mesma técnica de retoscopia endoscópica, utilizando-se o mesmo gastroscópio. Foi localizada, por visão endoscópica, a parede posterior do reto, na altura de 3 cm acima da borda anal, e realizada passagem da pinça tipo jumbo, até sua exteriorização pelo canal de biópsia do gastroscópio, mas sem manipulação da mucosa retal (Figura 7b). Este procedimento teve duração aproximada de 5 minutos. O quarto animal do Grupo Sham foi submetido à simulação da técnica experimental do Grupo Sucção. Para isso, após anestesia e em decúbito dorsal, foi submetido à introdução via retal a pinça do tipo Noblett, até 3 cm acima da borda anal, sem manipulação da parede do reto, por cerca de 2 minutos.

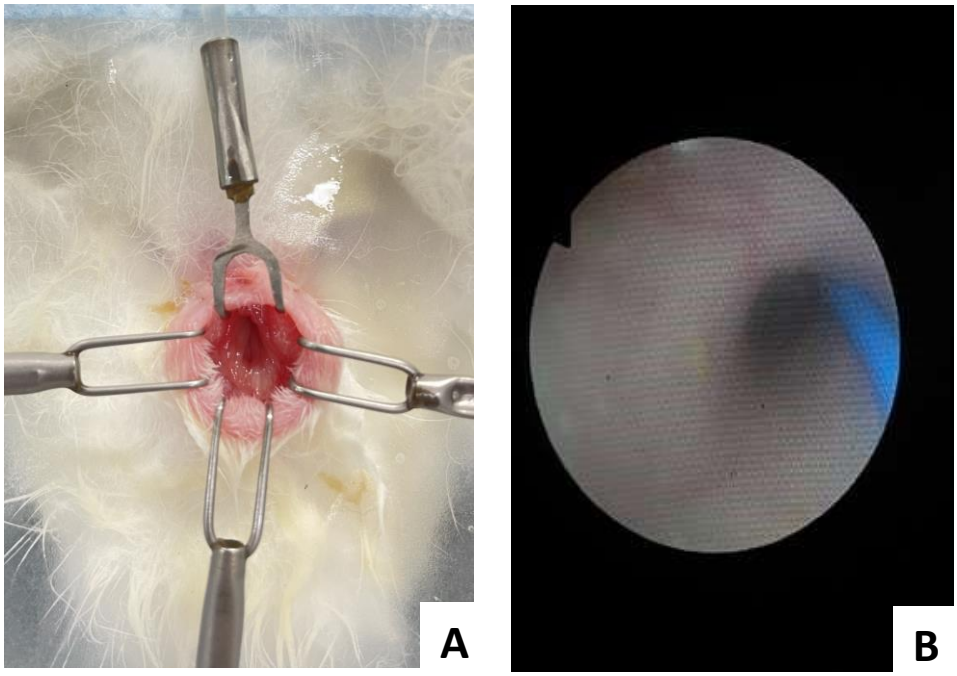


Figura 7: A) Vista do ânus com a utilização de afastadores; B) Vista do endoscópio inserido endoanal.

D) Seguimento pós-operatório

Após os procedimentos cirúrgicos, os coelhos foram mantidos isolados em gaiolas, no biotério da Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPEX) da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP, por 14 dias (Figura 8). Receberam analgesia com tramadol a cada 12 horas por 3 dias e meloxican

1mg/kg a cada 24h por 3 dias por orientação veterinária e foram realimentados no primeiro dia de pós-operatório. Sinais sugestivos de sangramento, perfuração retal, presença de evacuação, distensão abdominal ou infecção foram monitorados diariamente por um dos membros da equipe de pesquisa.



Figura 8: Animal em período de observação pós-operatório.

E) Exérese cirúrgica "em bloco" do reto

Após o período de observação experimental de 14 dias, os coelhos dos 5 grupos de pesquisa (4 grupos experimentais + grupo controle sham) foram submetidos, no 14º dia, à eutanásia e exérese cirúrgica "em bloco" do reto (Figura 9). Para isso, foi realizada ressecção circunferencial do reto, permitindo a ressecção de todas as camadas de sua parede, por uma extensão de 4 a 5cm, desde a borda anal.

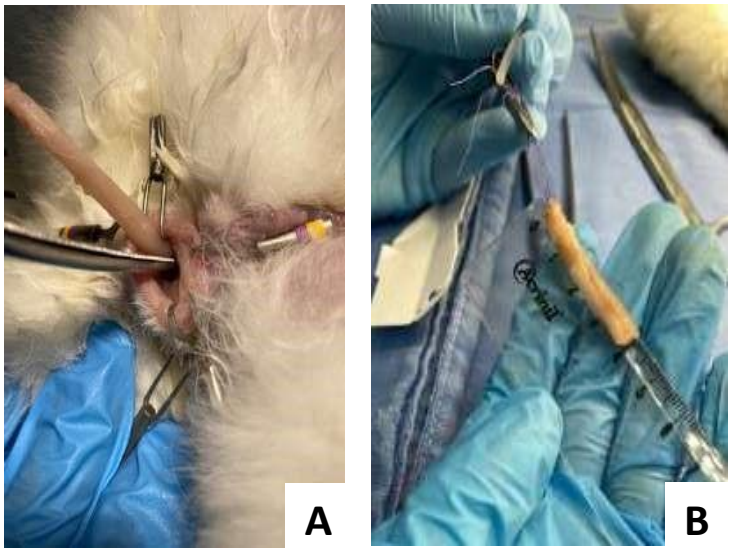


Figura 9: A) Procedimento de exérese do reto; B) Vista da amostra obtida

F) Processamento e análise histopatológica das biópsias retais

As amostras foram colocadas em formol e encaminhadas até o Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP. As amostras de biópsias retais foram mantidas para fixação em solução de formalina a 10% e, posteriormente, incluídas em parafina e submetidas aos cortes histológicos de 5 μm de espessura para coloração pelo método de hematoxilina e eosina (H&E).

A análise histopatológica foi realizada por uma médica patologista experiente no diagnóstico de disganglionoses intestinais e que não teve o conhecimento do grupo experimental de cada animal. Primeiramente, foram realizadas as medidas microscópicas dos cortes analisados, utilizando régua específica para microscópio. Em seguida, foi realizada a análise das camadas intestinais presentes nos fragmentos e calculada a porcentagem da razão entre a espessura da submucosa / espessura total do fragmento. Depois, realizadas a identificação e quantificação dos plexos nervosos da submucosa e a identificação e quantificação das células ganglionares presentes nestes plexos.

A análise histopatológica foi focada para avaliação da adequação das biópsias, incluindo: diâmetro total do fragmento, espessura total do fragmento, espessura da mucosa, espessura da submucosa e espessura da muscular própria, número de plexos submucosos identificados e número de células ganglionares nos plexos nervosos submucosos.

G) Processamento e análise histopatológica das peças cirúrgicas de reto

Inicialmente foram realizadas medidas do comprimento e do perímetro circunferencial das peças cirúrgicas do reto. Em seguida, estas peças foram abertas por uma de suas bordas, lavadas com água, colocadas sobre uma superfície rígida para manter sua forma, imersas em formalina 10% e encaminhadas ao Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP. Após 24 horas, uma faixa longitudinal foi cortada ao longo da amostra. Esta faixa foi cortada em pedaços pequenos, com cerca de 2 cm cada, e colocada em cassetes numerados, incluídos em parafina. Foram realizados cortes histológicos de 5-µm de espessura, para processamento pelas colorações de H&E e de tricrômio de Masson.

A análise histopatológica foi realizada pela mesma médica patologista, que não teve o conhecimento do grupo experimental de cada animal. Foram analisadas a presença de reação inflamatória (intensidade, localização e características do infiltrado inflamatório), a presença de tecido de granulação (características e intensidade da proliferação de pequenos vasos, fibroblastos e macrófagos) e a presença fibrose, incluindo avaliação da colagenogênese (intensidade e características da proliferação de fibras colágenas, se do tipo fibrilar frouxo ou denso, avaliadas pelo tricrômio de Masson). A análise histopatológica foi focada para avaliação das repercussões histopatológicas das biópsias após período de cicatrização, incluindo os seguintes aspectos: presença e extensão das áreas de infiltrado inflamatório e presença, intensidade e características da proliferação de fibras colágenas (Phillips et al.,1992; Li et al.,2019), de acordo com os quadros 4 e 5.

Quadros 4: escala de deposição de colágeno.

Deposição de colágeno	Escala Elrlich and Hunt
0	Sem evidência
1	Discreto e focal
2	Discreto e difuso
3	Intenso e focal
4	Intenso e difuso

Quadros 5: escala de intensidade de fibrose.

Fibrose (Masson)	
0	Sem evidência
1	Mínima fibrose submucosa ou subserosa
2	Fibrose submucosa
3	Através da muscular própria
4	Transmural e subserosa

3.7 Método estatístico

Análise estatística foi realizada permitindo a comparação entre os grupos experimentais quanto ao número de biópsias adequadas, características dos plexos nervosos submucosos, presença de complicações e sinais de inflamação ou fibrose retal após o período de seguimento. Os resultados foram expressos como média (± desvio padrão) ou mediana (mínimo e máximo), de acordo com o tipo de distribuição, verificado pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk. As diferenças entre os grupos, para variáveis numéricas contínuas foram avaliadas por Análise de Variância (ANOVA) ou pelo teste de Kruskal Wallis, de acordo com o padrão de normalidade. Variáveis nominais foram comparadas a partir dos testes de Fisher ou de Qui-quadrado e variáveis ordinais analisadas pelo teste de Kruskal Wallis. Foi estabelecido nível de significância de 5% e a análise realizada utilizando-se o software SPSS v 22.0.

4. Resultados

4.1 Procedimentos cirúrgicos

O tempo cirúrgico e o peso dos animais incluídos, estratificados pelos grupos de estudo, são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: características de peso dos animais e tempo intraoperatório em relação aos grupos experimentais

Característica/ Grupo	Cirúrgica	Punch	Endoscopia	Sucção	Sham	p
Tempo cirúrgico (seg)	240 (35) [ac]	120 (35) [b]	300 (90) [c]	170 (30) [ab]	145 (90) [abc]	<0,001
Peso dos animais (kg)	2.3 (0,45)	2.3 (0,4)	2.1 (0,35)	2.3 (0,35)	2.25 (0,35)	0.998

Dados expressos em mediana (intervalo interquartil)
* p valor associado ao teste de Kruskal-Wallis.
A diferença entre os grupos está representada pelas letras a,b e c onde grupos representados por pelo menos uma letra igual não possuem diferenças estatísticas entre eles e grupos com todas as letras diferentes apresentam um $p<0,05$ de acordo com o teste de Student-Newman-Keuls.

Houve diferenças estatisticamente significativas entre os tempos operatórios. O tempo de procedimento do grupo endoscopia foi significativamente maior que o dos grupos Punch e sucção. O tempo do grupo cirúrgica foi significativamente maior que o do grupo Punch. Não houve diferenças significativas entre os grupos biopsia cirúrgica e sucção e entre os grupos sucção e punch. Não houve diferenças significativas entre os grupos de intervenção e o grupo sham. Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os pesos dos animais entre os grupos.

4.2 Complicações ou evolução a óbito

Nenhum dos animais apresentou complicações (sinais de abdome agudo, sangramento profuso, sinais de infecção local, parada de eliminação de fezes) ou óbito durante o período de observação. Não foi necessário uso de antibioticoterapia, transfusão ou reabordagem em nenhum animal após os procedimentos.

4.3 Análise histopatológica das amostras obtidas nos procedimentos experimentais (biópsias)

As características da análise histológica morfométrica das biópsias, de acordo com os grupos experimentais, são apresentadas na Tabela 2. Não houve diferenças estatisticamente significativas identificadas entre os grupos.

Tabela 2: Análise morfométrica das amostras obtidas para cada grupo experimental

Análise morfométrica/ Grupo	Cirúrgica	Punch	Endoscopia	Sucção	p
Soma das áreas	8,84 ± 5,37	12,4 ± 2,18	11,9 ± 4,89	9,67 ± 3,93	0,407 *
Espessura da mucosa	0,30 (0,15)	0,30 (0,15)	0,30 (0,0)	0,30 (0,07)	0,748 #
Espessura da muscular da mucosa	0,30 (0,15)	0,30 (0,30)	0,35 (0,10)	0,30 (0,15)	0,938 #
Espessura da submucosa	0,20 (0,15)	0,20 (0,40)	0,25 (0,10)	0,10 (0,07)	0,256 #
Espessura total	0,90 ± 0,19	0,84 ± 0,05	0,91 ± 0,11	0,73 ± 0,17	0,268 *
% submucosa	0,28 (0,13)	0,25 (0,44)	0,27 (0,07)	0,16 (0,04)	0,481 #
Nº de plexos submucosos	2,0 (3,50)	1,0 (2,0)	1,5 (1,75)	2,5 (1,75)	0,586 #
Nº de neurônios plexos submucosa	1,50 (4,75)	2,0 (9,0)	4,5 (3,25)	3,0 (2,25)	0,920 #

* dados expressos em média ± desvio-padrão, p valor associado ao teste ANOVA
# dados expressos em mediana (intervalo interquartil), p valor associado ao teste de Kruskal-Wallis.

As características histológicas da análise morfológica descritiva das biópsias, de acordo com os grupos experimentais, são apresentadas na Tabela 3. O Grupo Punch apresentou número significativamente menor de amostras que contemplavam a presença de plexos nervosos na submucosa em comparação aos demais grupos de estudo (Figura 10). O Grupo cirúrgica apresentou número significativamente maior que o grupo Punch de biópsias que incluíram a presença de plexos mioentéricos nas amostras (Figura 11). O Grupo Endoscopia e o Grupo Sucção se equipararam ao Grupo Cirúrgica em relação a presença de plexos submucosos (Figura 12 e 13).

Tabela 3: Análise histológica descritiva das amostras obtidas para cada grupo experimental

Análise histológica descritiva/ Grupo	Cirúrgica	Punch	Endoscopia	Sucção	p	V de Cramer
Presença de > 1/3 de submucosa	33,3%	40,0%	33,3%	16,7%	0,931*	0,187
Presença de plexos submucosos	100% [a]	40,0% [b]	100% [a]	100% [a]	0,006*	0,735
Presença de plexos mioentéricos	83,3% [a]	0% [b]	50,0% [ab]	16,7% [ab]	0,023*	0,650
Presença de músculo estriado	16,7%	0%	0%	0%	1,00*	0,359

[*] dados expressos em percentual, p valor associado ao teste de Fisher
A diferença entre os grupos está representada pelas letras a e b, onde grupos representados por letras iguais não possuem diferenças estatísticas entre eles e grupos com letras diferentes apresentam resíduos ajustados < -1,96 ou > 1,96.

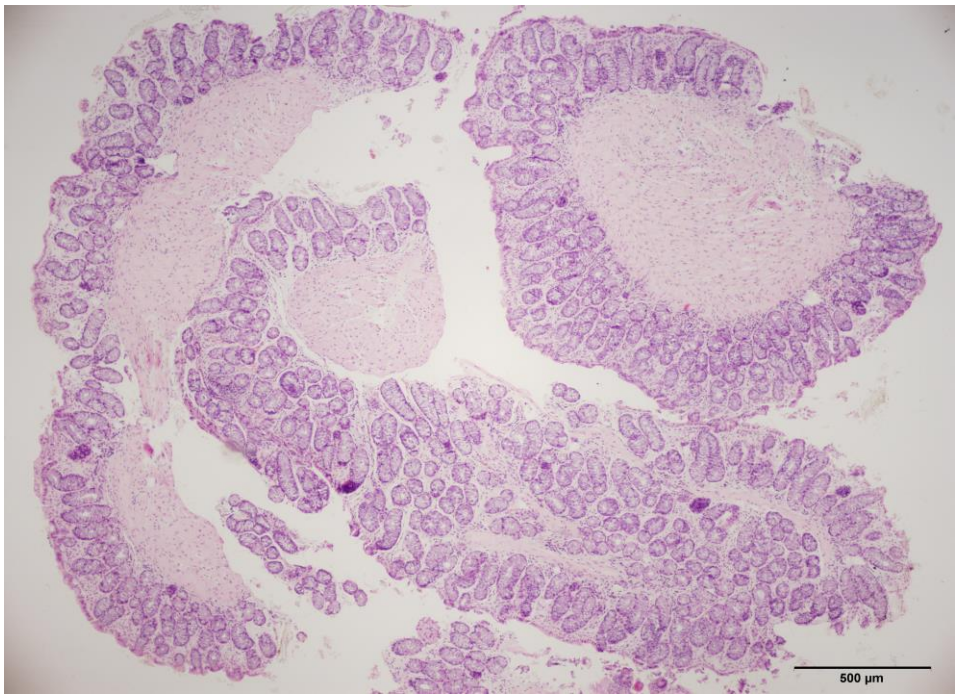


Figura 10: Caso do grupo Punch constituído por fragmentos superficiais de mucosa e muscular da mucosa. Ausência de representação da submucosa e dos plexos nervosos submucosos (Hematoxilina e eosina, 40x).

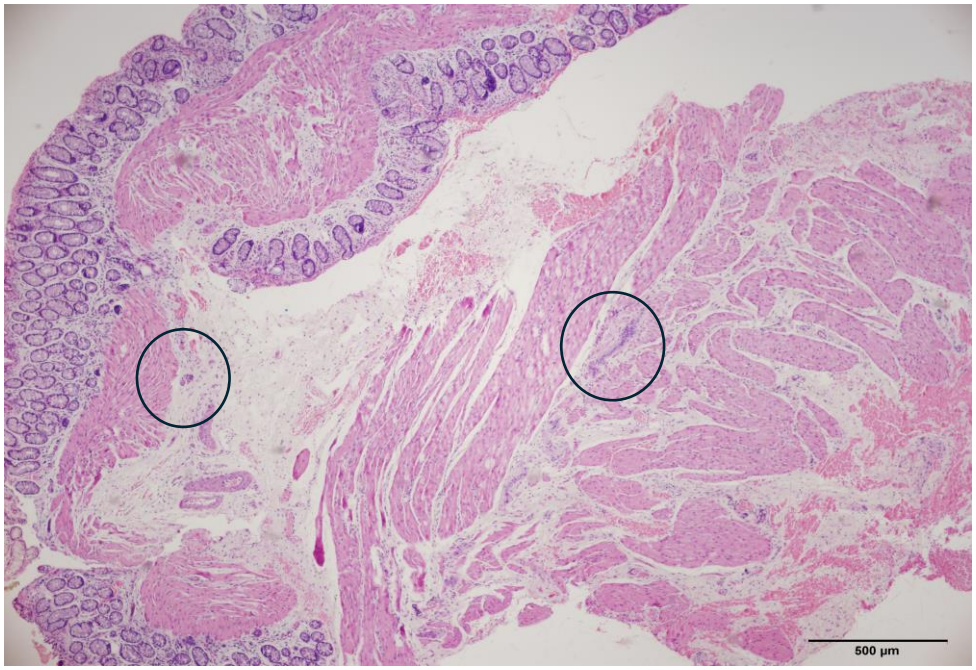


Figura 11: Caso do grupo Cirúrgico mostrando plexo nervoso da submucosa e plexo nervoso mioentério (círculo) (Hematoxilina e eosina, 40x).

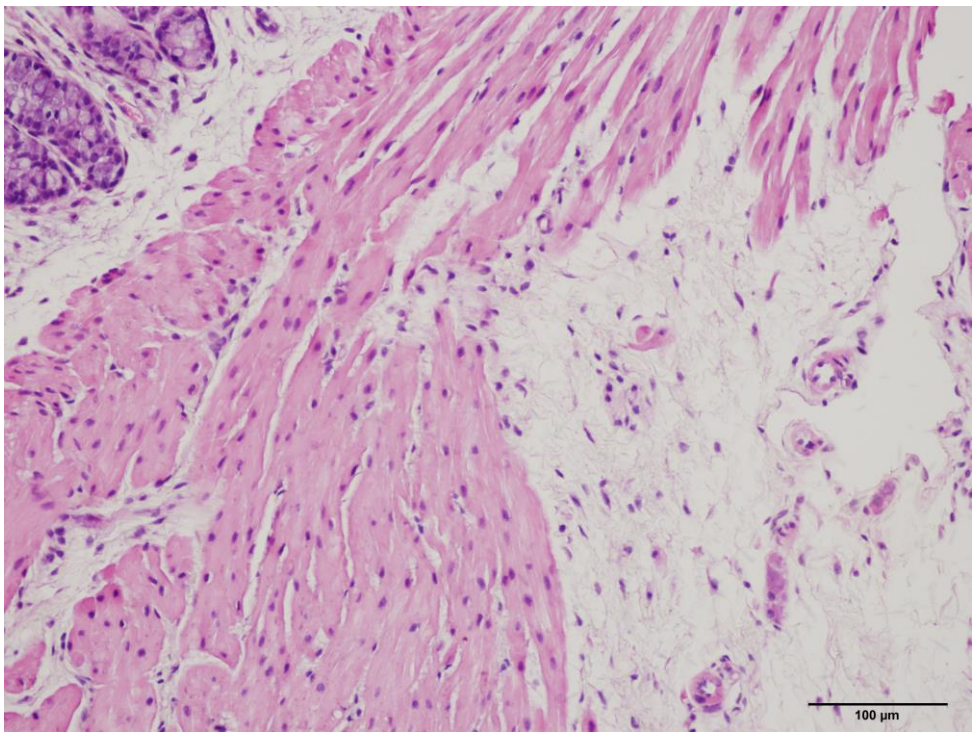


Figura 12: Caso do grupo Endoscopia com presença de plexos nervosos na submucosa (Hematoxilina e eosina, 200x).

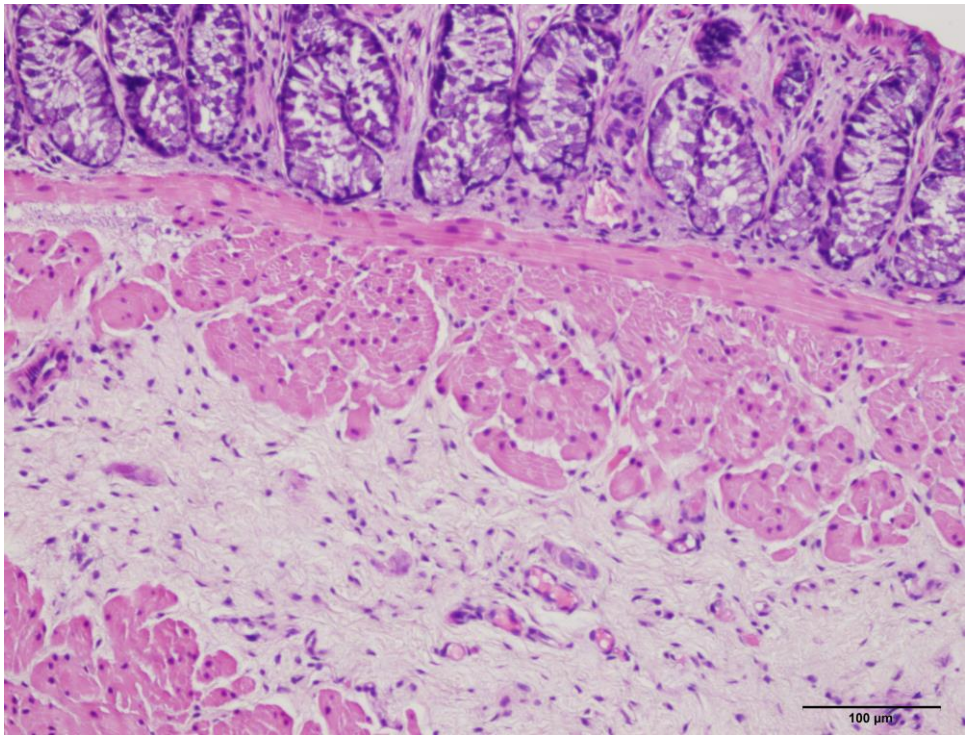


Figura 13: Caso do grupo Sucção com presença de plexos nervosos na submucosa (Hematoxilina e eosina, 200x).

4.4 Análise histopatológica das peças cirúrgicas de reto

As características macroscópicas das peças cirúrgicas obtidas após exérese em bloco do reto dos animais após a eutanásia são apresentadas na Tabela 4. Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos analisados.

Tabela 4: Características Macroscópicas para cada grupo experimental analisado

Característica/ Grupo	Cirúrgica	Punch	Endoscopia	Sucção	Sham	p*
Largura peça (cm)	2,0 (0)	2,0 (0)	2,0 (0)	1,85 (0,375)	2,0 (0)	0,055
Comprimento peça (cm)	3,0 (0,3)	3,0 (0)	3,0 (0)	3,0 (0)	3,15 (0,47)	0,830
Área peça(cm)	6,0 (0,45)	6,0 (0,67)	6,0 (0)	5,55 (1,13)	6,3 (0,87)	0,403

Dados expressos em mediana (intervalo interquartil) * p valor associado ao teste de Kruskal Wallis.

As características microscópicas identificadas na análise histológica destas amostras são apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5: Característica Histopatológica das peças cirúrgicas de reto para cada grupo experimental avaliado

Característica/ Grupo	Cirúrgica	Punch	Endoscopia	Sucção	Sham	p*
Inflamação	1,0 (0) [a]	0 (0) [b]	0 (0) [b]	0 (0) [b]	0 (0,25) [b]	0,002
Neovascularização	1,0 (0)	1,0 (0,75)	0 (0,75)	0 (0,75)	0 (0,25)	0,178
Presença de fibroblastos	1,0 (1,5)	3,0 (1,5)	1,0 (0,75)	0,5 (1,0)	1,0 (1,0)	0,100
Fibrose	2,0 (1,5) [a]	2,5 (1,0) [a]	0 (0) [b]	0 (0,75) [b]	0,5 (0,25) [b]	0,013

Dados expressos em mediana (intervalo interquartil)

* p valor associado ao teste de Kruskal Wallis.

A diferença entre os grupos está representada pelas letras a e b, onde grupos representados por letras iguais não possuem diferenças estatísticas entre eles e grupos com letras diferentes apresentam um $P<0,05$ de acordo com o teste de Student-Newman-Keuls para comparações múltiplas.

O Grupo cirúrgica apresentou significativamente mais características inflamatórias locais do que os demais grupos de estudo (Figura 14). Os grupos biópsia cirúrgica e Punch apresentaram significativamente mais fibrose do que os grupos endoscopia, sucção e Sham (Figura 15).

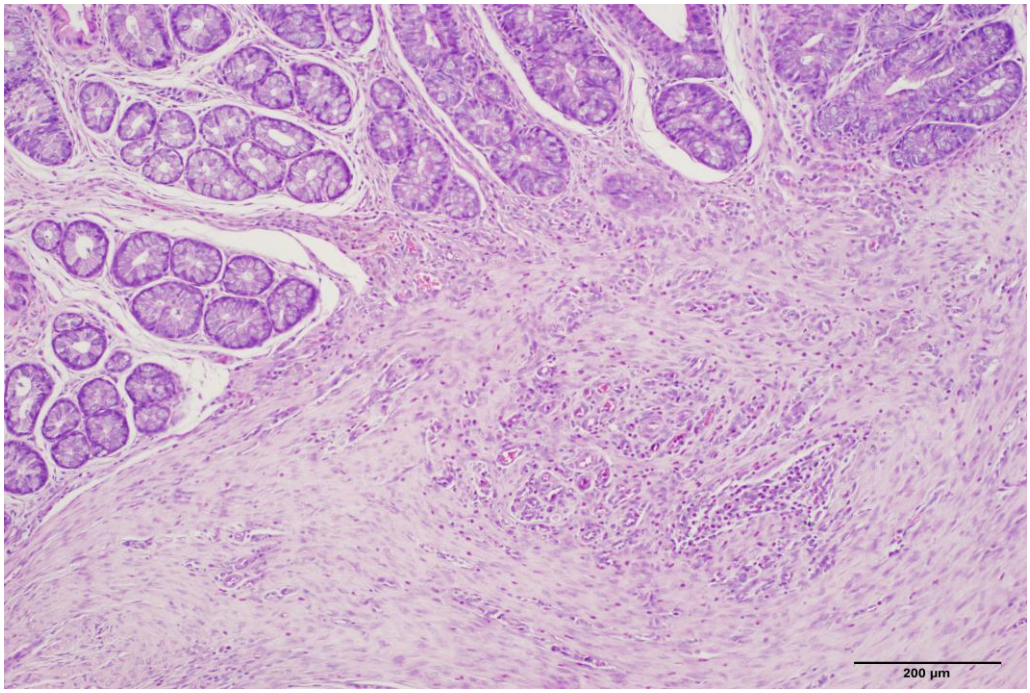


Figura 14: Caso do grupo Cirúrgico apresentando infiltrado inflamatório e tecido de granulação com neovascularização (Hematoxilina e eosina, 100x).

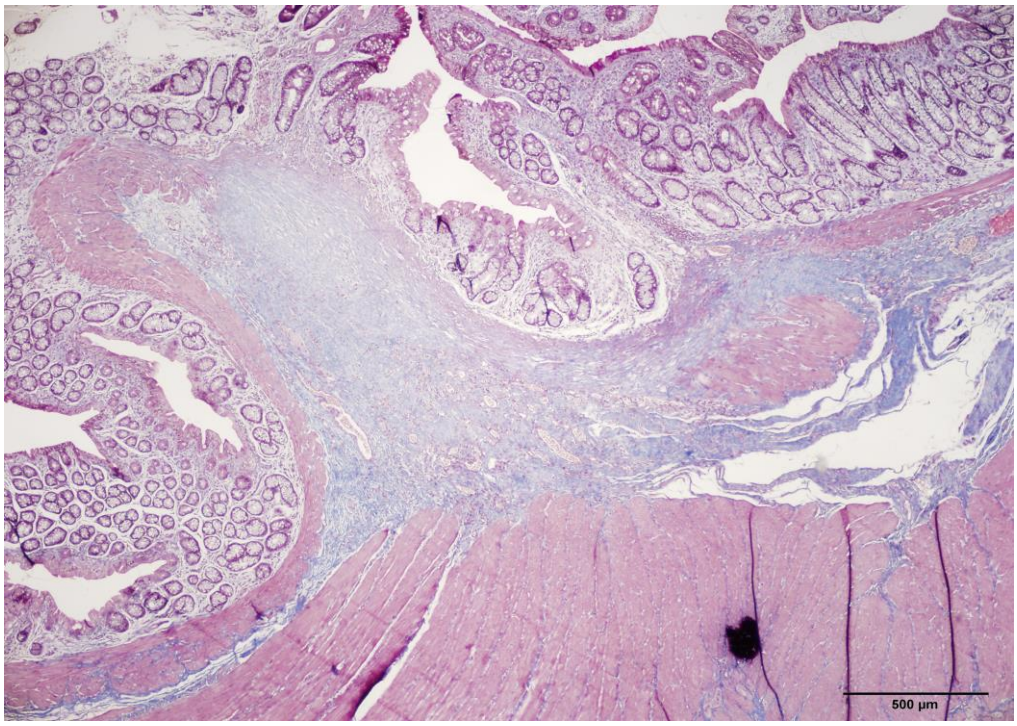


Figura 15: Caso do grupo Punch mostrando deposição de colágeno corado em azul destacando a fibrose na submucosa (Tricrômio de Masson, 40x).

5. Discussão

O diagnóstico definitivo das disganglionoses intestinais deve ser estabelecido pelo exame histopatológico a partir dos plexos nervosos do sistema nervoso entérico por meio de amostras de tecido obtido por biópsias retais (Dasgupta & Langer, 2004; Kapur, 2009). Atualmente dispomos de diversas técnicas associadas a diversos métodos de análise histopatológica para definição de diagnósticos relativos às disganglionoses intestinais. No entanto, observamos uma falta de consenso em todos os aspectos: técnica e instrumento a serem utilizados, distância da linha pectínea, número de fragmentos e método de análise. Nesse cenário, temos altas taxas de falsos positivos e negativos, com atraso no diagnóstico, influenciando no prognóstico dos doentes, risco de complicações, tratamentos ineficientes e inadequados, além de gerar maior ansiedade à família. Diante da complexidade das disganglionoses intestinais com grande impacto na qualidade de vida dos pacientes e sua família e da diversidade de tratamentos que podem variar desde uso de medicamentos, lavagens intestinais até abordagens cirúrgicas complexas com necessidade de ressecções e anastomoses, torna-se ainda mais importante o diagnóstico breve e preciso. Como há muitas controvérsias e riscos associados aos procedimentos para realização das biópsias retais, tentamos definir o melhor método, considerando as particularidades de cada técnica e suas complicações.

A primeira técnica foi descrita por Swenson et al. (1955). Estes autores propuseram a realização de biópsias cirúrgicas, da parede posterior do reto, a 3 cm da linha pectínea, envolvendo a espessura total da parede intestinal. Este procedimento deve ser conduzido sob anestesia e exige sutura da ferida operatória. Técnicas minimamente invasivas, que buscam fragmentos de espessura parcial da parede retal, através de amostras que contemplem os plexos nervosos da submucosa, também vêm sendo propostas e amplamente utilizadas. Merecem destaque os trabalhos de Helen Noblett, que descreveram uma pinça de biópsia por sucção da mucosa retal, que logo se tornou o instrumento mais utilizado na investigação diagnóstica da DH (Noblett, 1969; Schäppi et al., 2013). Em sua descrição original, Noblett (1969) salienta a importância de alguns aspectos técnicos. Suas biópsias foram realizadas com

pressão negativa de 20 a 25 polegadas de mercúrio, sem lavagem intestinal prévia e com afiamento periódico da lâmina da pinça. Todos os 116 espécimes analisados pela autora foram considerados adequados. Entretanto, este não pode ser considerado um método perfeito, já que é realizado "às cegas", o que dificulta a determinação do sítio exato da biópsia e da espessura do fragmento obtido (Kobayashi et al.,2002). São descritas possíveis complicações como sangramento massivo (Pini-Prato et al., 2011), perfurações de reto, fibrose peri-retal, celulite em pelve e sepse (Lewis et al., 2003; Hirsch et al., 2011). Além disso, taxas de insucesso na obtenção de espécimes adequados com este método são relatadas na literatura, e podem atingir até cerca de 30% dos casos (Athow et al., 1990; Alizai et al., 1998; Kobayashi et al., 2002; Ali et al., 2006).

Por existirem barreiras éticas para que esse estudo seja realizado em humanos, optamos pela realização em modelo experimental animal. Tendo em vista que o coelho permite a reprodução dos procedimentos e mantem semelhança anatômica e fisiológica com humanos, o estudo proposto se mostrou exequível, sem complicações relevantes intra e pós-operatórias. Não tivemos nenhuma complicação grave ou óbito durante o período de observação.

Em estudo realizado junto a cirurgiões pediátricos brasileiros (Penaloza, 2022) com contato frequente com pacientes com Doença de Hirschsprung, observou-se que a maioria utiliza mais comumente a técnica cirúrgica aberta para biópsia retal. Notou-se que cerca de 10% utilizam a técnica de coleta por pinça de sucção (Olivos et al., 2021), quadro semelhante ao restante da América Latina (14% dos 149 respondentes do estudo utilizam pinça de sucção). O panorama se altera se tomadas Europa e Oceania como referencial de estudo (Nataraja et al., 2019; Zani et al., 2017), onde as biópsias por pinça de sucção minimamente invasiva e sem necessidade de anestesia geral e, geralmente com menores taxas de complicação, são as mais utilizadas (Takawira et al., 2015). Acreditamos que a limitação do uso desta técnica no Brasil muito se deve à falta de registro na Agência Nacional de Vigilância Sanitária não apenas da pinça de sucção, como a de Noblett, utilizada neste projeto.

Em relação às características histológicas da análise morfológica descritiva das biópsias, o grupo Punch apresentou um número significativamente menor de amostras que contemplavam a presença de plexos nervosos na submucosa em comparação aos demais grupos de estudo, reforçando as recomendações de estudos atuais que desencorajam seu uso por ser um procedimento às cegas, e com maior risco de complicações (Comes et al., 2019; Nataraja et al., 2019). Já o grupo cirúrgica apresentou número significativamente maior que o grupo Punch de biópsias que incluíram a presença de plexos mioentéricos nas amostras. A presença de plexos mioentéricos nos grupos Endoscopia e Sucção também foi inferior ao grupo cirúrgica, porém superior ao grupo Punch. Com esses dados reforçamos, por outro lado, que o grupo cirúrgica apresentou significativamente mais características inflamatórias locais do que os demais grupos de estudo.

Estudos recentes demonstram que a técnica de sucção é adequada para obtenção de espécimes para a análise dos plexos submucosos e células ganglionares. Porém, o estudo retrospectivo de Green et al 2022, mostrou um maior número de amostras inadequadas provenientes de biópsia de sucção em pacientes com idade superior a 6 meses de vida. Contudo, Comes et al (2019) em sua revisão sistemática não encontrou diferenças significativas nas taxas de resultados conclusivos acima dos 3 anos e abaixo dos 3 anos de idade. A literatura existente também apoia a utilização de biópsias retais por sucção em diversas faixas etárias, demonstrando que esta técnica oferece resultados conclusivos confiáveis, mesmo em crianças mais velhas (Zani et al., 2017; Muise & Cowles, 2016). No entanto não conseguimos estabelecer esse parâmetro tendo em vista a utilização dos animais, não sendo possível fazer um paralelo adequado com a idade das crianças.

Embora raras, biópsias retais apresentem um risco real de complicações graves, incluindo perfuração e sangramento - entre 1,3 a 2,9% dos procedimentos (Schäppi et al., 2013; Knowles et al, 2009). Em revisão de 2016, Muise & Cowles verificaram que as complicações são raras, mas muito graves, acometendo em torno de 2% dos pacientes, independentemente da técnica de biópsia utilizada.

Outras complicações citadas como sangramento massivo (Pini- Prato et al., 2011), perfurações de reto, fibrose perirretal, celulite em pelve e sepse são descritas (Lewis et al., 2003; Hirsch et al., 2011), mas a maioria ocorre imediatamente após o procedimento (Vervloet et al, 2023). Na nossa amostra, não tivemos a ocorrência de qualquer intercorrência ou complicação grave. Apenas um animal do grupo Sucção apresentou quadro de sangramento autolimitado, no primeiro dia, sem necessidade de nova abordagem, transfusão, ou qualquer outro tratamento durante a nossa observação de 14 dias de pós-operatório (que associamos a um sangramento residual do procedimento). Os dados de literatura, no entanto, diferem dos nossos achados, uma vez que em recente revisão sistemática (Comes et al, 2019) foram comparadas as técnicas para obtenção de biópsia retal e os métodos de análise histopatológica para definição do diagnóstico de DH, foi descrito que as taxas de complicações da biópsia cirúrgica aberta não foram significativamente diferentes em comparação com as biópsias por sucção. Já as biópsias realizadas por punch, possivelmente porque os instrumentos punch fornecem fragmentos maiores, apresentam taxa de complicação significativamente superior quando comparadas à sucção.

Em relação ao tempo para realização do procedimento, o mais demorado foi o grupo Endoscopia. Este procedimento demanda a montagem do material, teste do endoscópio e posicionamento do aparelho com determinação da altura da biópsia além da prática do cirurgião. Além disso, o aparelho fica no reto, não sendo possível grandes insuflações para localizar a parede posterior, o que pode ser mais desafiador em alguns casos. A técnica endoscópica foi descrita em um único estudo em que se utilizou o colonoscópio para realização de biópsias retais em humanos (Hirsch, 2011). Este estudo concluiu que a visualização da mucosa a ser biopsiada parece sempre ser a melhor opção quando comparada a uma “biópsia cega”, quando a endoscopia estiver disponível. (Hirsch, 2011). Contudo não existem dados sobre o uso da pinça de biópsia jumbo em crianças, sendo os dados limitados em adultos. Todas as biópsias realizadas no estudo foram realizadas abaixo da reflexão peritoneal, eliminando a possibilidade de perfuração no peritônio. A natureza relativamente superficial de nossas biópsias sugere que seria segura, eficaz e já familiar aos gastroenterologistas.

A análise histológica das amostras de exérese em bloco do reto após 14 dias revelou que o Grupo Cirúrgica apresentou mais características inflamatórias e fibrose comparado aos demais grupos, evidenciando o impacto adverso da técnica cirúrgica na integridade tecidual. Isso está em concordância com os achados de estudos anteriores que destacam a maior invasividade e complicações associadas à biópsia cirúrgica (Pini-Prato et al., 2011; Schäppi et al., 2013). A biópsia cirúrgica, embora forneça um maior número de biópsias adequadas com parede total, é mais invasiva e está associada a um aumento na inflamação e fibrose devido à necessidade de sutura da ferida operatória (Hirsch et al., 2011; Lewis et al., 2003). A fibrose e a inflamação observadas nas peças cirúrgicas podem refletir a resposta tecidual ao trauma cirúrgico, e é importante considerar esses fatores ao avaliar a eficácia e a segurança das técnicas de biópsia. Os grupos Endoscopia e Sucção apresentaram menos inflamação e fibrose, o que pode indicar menor trauma tecidual e menor resposta inflamatória, reforçando a vantagem dessas técnicas menos invasivas para procedimentos diagnósticos.

A revisão sistemática e metanálise conduzida por Comes et al. (2019) destacou que a técnica de sucção é preferível devido ao menor risco de complicações e à sua eficácia na obtenção de amostras diagnósticas adequadas (Comes et al., 2019). Este resultado é corroborado por outros estudos que evidenciam a superioridade da técnica de sucção sobre o Punch e a biópsia cirúrgica, especialmente em termos de menor taxa de inflamação e fibrose (Takawira et al., 2015; Olivos et al, 2021). No nosso estudo, a técnica de sucção apresentou taxas significativamente maiores de biopsias adequadas contendo submucosas que a técnica de punch, com menor inflamação e fibrose que a cirúrgica e menor tempo de realização que a biopsia endoscópica.

O modelo experimental utilizado foi um dos pontos fortes do estudo, permitindo uma avaliação detalhada das técnicas de biópsia em um ambiente controlado. A replicação dos procedimentos cirúrgicos em um modelo animal possibilitou uma análise aprofundada das complicações e riscos associados, fornecendo uma base sólida para a avaliação da qualidade das amostras obtidas (Lewis et

al., 2003; Hirsch et al., 2011). Todos os métodos de obtenção de biópsias estudados se mostraram seguros, sem nenhuma complicação (sinais de abdome agudo, sangramento profuso, sinais de infecção local, parada de eliminação de fezes) ou óbito.

Nossos resultados têm o potencial de estimular novos estudos em modelo humano e promover mudanças na prática clínica que estão presentes nas doenças do sistema nervoso entérico. Em suma, o modelo experimental utilizado nesta tese demonstrou ser eficaz para a comparação das técnicas de biópsia, oferecendo dados valiosos sobre a adequação e segurança de cada abordagem. A biópsia por sucção emergiu como a melhor técnica devido à sua menor invasibilidade, menor tempo de procedimento e bons índices de biopsias adequadas e pouca reação inflamatória e fibrose cicatricial local. Esses resultados são importantes para a prática clínica, especialmente em contextos pediátricos onde a minimização de riscos e a eficiência são cruciais. A continuidade da pesquisa, incluindo estudos clínicos adicionais e a incorporação de novas tecnologias diagnósticas, é essencial para aprimorar ainda mais o diagnóstico e o manejo das disganglionoses intestinais.

O método endoscópico está se destacando no cenário atual, demonstrando a possibilidade de realização de diversos procedimentos sob visão, sendo um método seguro, mas que necessita de mais estudos em crianças. Neste estudo, as biopsias realizadas por esta técnica apresentaram um ótimo resultado pela análise macroscópica e microscópica, porém com um tempo de realização muito elevado. Acreditamos que isso se deve a dificuldade de posicionar o aparelho de endoscopia nos animais, que possuem um coxim gorduroso e muscular pélvico menor que nos humanos, trazendo esta limitação aos procedimentos, por ser um estudo experimental em animais. Além disso, o método endoscópico possui uma limitação relacionada ao tempo maior de montagem do aparelho, disponibilidade de pinças e expertise para sua realização. A técnica endoscópica tem uma vantagem de segurança, pois é um exame realizado sob visão, porém com necessidade de anestesia. Isso pode ser um fator de inferioridade em comparação com a biópsia de sucção. A grande dificuldade para a

realização da biópsia de sucção se deve a questão de disponibilidade de sua pinça, que é muito específica e depende de um funcionamento adequado e cuidado na esterilização para um procedimento eficaz. Ao mesmo tempo que a sua superioridade consiste em ser um procedimento que não depende de anestesia e pode ser realizado ambulatorialmente, além do menor tempo de realização, demonstrado em nosso estudo.

A transformação no diagnóstico dessas doenças, através da adoção de técnicas menos invasivas, impacta tanto promovendo maiores brevidade e precisão no diagnóstico, como proporcionando alívio significativo para as famílias afetadas, promovendo um futuro mais esperançoso e menos angustiante para as crianças com disganglionoses intestinais.

Recomendamos a realização de estudos adicionais em modelos humanos para confirmar os achados obtidos em nosso estudo animal e para validar a técnica de biópsia por sucção como o padrão ouro para o diagnóstico das disganglionoses intestinais. A continuidade da pesquisa nesse campo é essencial para otimizar o diagnóstico e tratamento desse grupo de patologias, garantindo melhores resultados para os pacientes e suas famílias.

6. Conclusão

Concluímos que a técnica de sucção é a melhor técnica de biópsia de reto para análise histopatológica dos plexos nervosos da submucosa, com maior taxa de biopsias adequadas, menor reação tecidual e sem nenhuma complicação.

7. Referências Bibliográficas

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

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

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

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

Bodian M. Pathological aids in the diagnosis and management of Hirschsprung's disease. In: Dyke, SC, editor. Recent Advances in Clinical Pathology. Series 3. London: Churchill; 1960. p. 384.

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

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

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

Croffie J.M., Davis M.M., Faught P.R., Corkins M.R., Gupta S.K., Pfefferkorn M.D., Molleston J.P., Fitzgerald J.F. At what age is a suction rectal biopsy less likely to provide adequate tissue for identification of ganglion cells? J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2007 Feb; 44(2):198-202.

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

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

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

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

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

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

Friedmacher F., Puri P. Rectal suction biopsy for the diagnosis of Hirschsprung's Disease: a systematic review of diagnostic accuracy and complications. Pediatr Surg Int. 2015 Sep;31(9):821-30.

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

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

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

Gunn M. Histological and histochemical observations on the myenteric and submucous plexuses of mammals. J. Anat. (1968), 102, 2, pp. 223-239.

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

Green, N., Smith, C.A., Bradford, M.C. et al. Rectal suction biopsy versus incisional rectal biopsy in the diagnosis of Hirschsprung disease. *Pediatr Surg Int* **38**, 1989–1996 (2022).

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

Hayes C, Kawatu D, Mangray S, et al. Rectal suction biopsy to exclude the diagnosis of Hirschsprung disease. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2012; 55:268–71.

Hirose R., Hirata Y., Yamada T., Kawana T., Taguchi T., Fukuoka S. S. The Simple Technique of Rectal Mucosal Biopsy for the Diagnosis of Hirschsprung's Disease. Journal of Pediatric Surgery, Vol28, No 7 (July), 1993: pp 942-944.

Hirsch B. Z., Angelides A.G., Goode S.P., Garb J.L. Rectal biopsies obtained with jumbo biopsy forceps in the evaluation of Hirschsprung disease. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2011; 52(4):429-32.

Holland S.K., Hessler R.B., Reid-Nicholson M.D., Ramalingam P., Lee J.R. Utilization of peripherin and S-100 immunohistochemistry in the diagnosis of Hirshsprung disease. Mod Pathol. 2010; 23(9):1173-9.

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

Kapur R.P. et al., Hirschsprung disease and other enteric dysganglionoses. Crit Rev Clin Lab Sci. 1999 Jun;36(3):225-73.

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

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

Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. PLoS Biol. 2010 Jun 29;8(6):e1000412.

Knowles CH, De Giorgio R, Kapur RP, et al. Gastrointestinal neuro- muscular pathology: guidelines for histological techniques and report- ing on behalf of the Gastro 2009 International Working Group. Acta Neuropathol 2009; 118:271–301.

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

Kobayashi H., Yamataka A., Lane G.J., Miyano T. Pathophysiology of hypoganglionosis. J Pediatr Gastroenterol Nutr 34:231–235. 2002.

Knowles CH, De Giorgio R, Kapur RP, Bruder E, Farrugia G, Geboes K, et al. The London Classification of gastrointestinal neuromuscular pathology: report on behalf of the Gastro 2009 International Working Group. Gut. 2010; 59:882-7.

Lewis N.A., Levitt M.A., Zallen G.S., Zafar M.S., Iacono K.L., Rossman J.E., Caty M.G., Glick P.L. Diagnosing Hirschsprung's disease: increasing the odds of a positive rectal biopsy result. J Pediatr Surg. 2003; 38:412-6.

Li et al. A novel collagen area fraction index to quantitatively assess bowel fibrosis in patients with Crohn's disease. BMC Gastroenterology. 2019.

Matias A.L.R. Interpretação clínica da histoptologia nas neuropatías congénitas intestinais (dissertation). Porto: Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto;2011.

Minossi, J G; Leite C V. S; Naresse, L E; Rodrigues M A; Curi, P R; Kobayasi, S. Ação do diclofenaco de sódio em anastomoses realizadas no intestino delgado de ratos. Acta Cirúrgica Brasileira. Sociedade Brasileira para o Desenvolvimento da Pesquisa em Cirurgia, v. 13, n. 1, p. -, 1998.

Montedonico S., Cáceres P., Muñoz N., Yáñez H., Ramírez R., Fadda B. Histochemical staining for intestinal dysganglionosis: over 30 years' experience with more than 1,500 biopsies. Pediatr Surg Int. 2011 May;27(5):479-86.

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

Noblett H. R. A Rectal Suction Biopsy Tube for Use in the Diagnosis of Hirschsprung's Disease. JOURNAL OF PEDIATRIC SURGERY, VOL. 4, No. 4 (AUGUST), 1969.

Normativas do CONCEA para produção, manutenção ou utilização de animais em ensino ou pesquisa científica. Brasília, 2015.

Olivos, M., Correa, C. & De la Torre, L. Current practice of rectal biopsies for the diagnosis of Hirschsprung's disease in Latin America: an international online survey. *Pediatr Surg Int* **37**, 479–483 (2021).

Penaloza, C S Q et al., Manejo diagnóstico e terapêutico da Doença de Hirschsprung: um levantamento com cirurgiões pediátricos do Brasil; Dissertacao mestrado, Universidade Estadual Paulista (Unesp).

Phillips et al. Effects of chronic corticosteroids and vitamin a on the healing of intestinal anastomoses. The american journal of surgery. 1992.

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

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

Qualmann S.J., Jaffe R., Bove K.E., Monforte-Muñoz H. Diagnosis of hirschsprung disease using the rectal biopsy: multi-institutional survey. Pediatr Dev Pathol. 1999 NovDec;2(6):588-96.

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

Schäppi M.G., Staiano A., Milla P.J., Smith V.V., Dias J.A., Heuschkel R., Husby S., Mearin M.L., Papadopoulou A., Ruemmele F.M., Vandenplas Y., Koletzko S.. A practical guide for the diagnosis of primary enteric nervous system disorders. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2013; 57(5):677-86.

Schärli AF (1992) Surgery for Hirschsprung's disease and intestinal neuronal dysplasia. In: Hadziselimovic F, Herzog B (eds) Pediatric Gastroenterology: Inflammatory Bowel Disease and Morbus Hirschsprung. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 287–296.

Spencer N.J., Dinning P.G., Brookes S.J., Costa M. Insights into the mechanisms underlying colonic motor patterns. J Physiol 594.15 (2016) pp 4099–4116.

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

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

Takegawa B., Ortolan E. P., Rodrigues A. M., et al. Experimental model for transanal endorectal pull-through surgery. Technique of De la Torre and Ortega. Journal of Pediatric Surgery (2005) 40, 1539 – 1541.

Vervloet, G.; De Backer, A.; Heyman, S.; Leyman, P.; Van Cauwenberge, S.; Vanderlinden, K.; Vercauteren, C.; Vervloessem, D.; Miserez, M. Rectal Biopsy for Hirschsprung's Disease: A Multicentre Study Involving Biopsy Technique, Pathology and Complications. *Children* **2023**, *10*, 1488.

Watanabe M., Fonseca C.D., Vattimo M.F.F. Aspectos instrumentais e éticos da pesquisa experimental com modelos animais. 2014.

Yamataka A., Yazaki Y., Koga H., Lane G.J., Ochi T. How best to expose the entire surgical anal canal in the operative field during transanal pull-through for Hirschsprung's disease: a crucial step that determines success. Pediatr Surg Int. 2019 Feb;35(2):199-202.

Yoshimaru et al., The evaluation of rectal mucosal punch biopsy in the diagnosis of Hirschsprung's disease: a 30-year experience of 954 patients. Pediatr Surg Int (2017) 33:173– 179.

8. Anexos

Anexo 1

Os 10 itens essenciais

Estes itens são o mínimo a ser incluído em um manuscrito. Sem estas informações, leitores e revisores não serão capazes de avaliar a confiabilidade dos resultados.

Desenho do Estudo	1	Para cada experimento, descreva detalhes resumidos do desenho do estudo: a. Os grupos comparados, incluindo o(s) grupo(s) controle. Se um grupo controle não foi usado, isto deve ser justificado. b. A unidade experimental (ex: um único animal, uma ninhada, ou uma gaiola de animais).
Tamanho da amostra	2	a. Especifique o número exato de unidades experimentais alocadas em cada grupo, e o número total em cada experimento. Indique também o número total de animais utilizados. b. Explique como o tamanho da amostra foi definido. Descreva os detalhes do cálculo amostral, caso ele tenha sido realizado.
Critérios de inclusão e exclusão	3	a. Descreva quaisquer critérios utilizados para inclusão e exclusão de animais (ou unidades experimentais) durante o experimento, e de dados durante a análise. Especifique se estes critérios foram definidos a priori. Se nenhum critério foi definido, declare explicitamente. b. Para cada grupo experimental, relate quaisquer animais, unidades experimentais ou dados não incluídos na análise e explique por que foram excluídos. Caso não haja exclusões, declare explicitamente. c. Para cada análise, relate o valor exato do n em cada grupo experimental.
Randomização	4	a. Declare se foi utilizada randomização para alocar as unidades experimentais nos grupos controle e tratado. Caso tenha sido, descreva o método utilizado para gerar a sequência de randomização. b. Descreva a estratégia utilizada para minimizar potenciais variáveis de confusão, como a ordem dos tratamentos e medidas ou a localização dos animais/gaiolas no biotério. Se variáveis de confusão não foram controladas, declare explicitamente.
Cegamento	5	Descreva quem estava ciente da alocação das unidades experimentais nos grupos nos diferentes momentos do experimento (durante a alocação, condução do experimento, avaliação dos desfechos e análise de dados).
Desfechos	6	a. Defina claramente todos os desfechos avaliados (ex: morte celular, marcadores moleculares ou mudanças comportamentais). b. Para estudos que testam hipóteses, especifique o desfecho primário, ou seja, o desfecho utilizado para determinar o tamanho da amostra.
Métodos estatísticos	7	a. Descreva em detalhes os métodos estatísticos usados em cada análise, incluindo o software utilizado. b. Descreva quaisquer métodos usados para avaliar se os dados atendem às premissas da abordagem estatística, e o que foi feito caso elas não tenham sido atendidas.
Animais experimentais	8	a. Descreva detalhes apropriados à espécie sobre os animais utilizados, incluindo espécie, linhagem e sublinhagem, sexo, idade ou estágio de desenvolvimento e, caso seja relevante, peso. b. Descreva informações adicionais relevantes sobre a procedência dos animais, estado de saúde/imunidade, modificações genéticas, genotipagem, e quaisquer procedimentos prévios.
Procedimentos experimentais	9	Para cada grupo experimental, incluindo controles, descreva os procedimentos com detalhes suficientes para permitir que outros os repitam, incluindo: a. O que foi feito, como foi feito e o que foi utilizado. b. Quando e com que frequência. c. Onde (incluindo detalhes de quaisquer períodos de aclimatação). d. Por quê (justifique os procedimentos).
Resultados	10	Para cada experimento conduzido, incluindo replicações independentes, relate: a. Estatísticas resumidas/descritivas para cada grupo experimental, com uma medida de variabilidade quando aplicável (ex: média e desvio-padrão, ou mediana e amplitude). b. Se aplicável, o tamanho de efeito com um intervalo de confiança.

Anexo 2

Os itens recomendáveis

Estes itens complementam os 10 essenciais e adicionam contexto relevante ao estudo. Relatar os itens nos dois conjuntos representa a prática ideal.

Resumo	11	Inclua um resumo preciso dos objetivos da pesquisa, espécie animal utilizada, linhagem/raça e sexo, métodos e resultados principais e conclusões do estudo.
Embasamento científico	12	a. Inclua embasamento científico suficiente para compreender a justificativa e o contexto do estudo, e explique a abordagem experimental. b. Explique como a espécie e modelo animal utilizados atendem aos objetivos científicos e, quando aplicável, sua relevância para a biologia humana.
Objetivos	13	Descreva claramente a pergunta e objetivos da pesquisa e, quando apropriado, a(s) hipótese(s) específica(s) sendo testada(s).
Declaração ética	14	Inclua o nome do Comitê de Ética para Uso de Animais ou equivalente que aprovou o uso de animais neste estudo, e quaisquer números de licença ou protocolo (caso aplicável). Caso a aprovação ética não tenha sido solicitada ou concedida, justifique.
Alojamento e manejo	15	Descreva detalhes das condições de alojamento e criação, incluindo qualquer enriquecimento ambiental.
Cuidados com animais e monitoramento	16	a. Descreva quaisquer intervenções ou cuidados tomados nos protocolos experimentais para minimizar dor, sofrimento e angústia. b. Relate qualquer evento adverso esperado ou inesperado. c. Descreva os critérios de ponto final humanitário estabelecidos para o estudo, os sinais monitorados e a frequência de monitoramento. Caso não tenha havido critérios de ponto final humanitário, declare explicitamente.
Interpretação / Implicações científicas	17	a. Interprete os resultados, levando em conta os objetivos e hipóteses do estudo, teorias atuais e outros estudos relevantes na literatura. b. Comente as limitações do estudo, incluindo fontes potenciais de viés, limitações do modelo animal e imprecisões associadas aos resultados.
Aplicabilidade / tradução	18	Comente sobre a probabilidade dos achados deste estudo serem generalizáveis para outras espécies ou condições experimentais, incluindo qualquer relevância para a biologia humana (quando apropriado).
Registro do Protocolo	19	Faça uma declaração indicando se um protocolo (incluindo a pergunta do estudo, principais pontos do desenho experimental e plano de análise) foi preparado antes do estudo e, caso tenha sido, onde foi registrado.
Acesso aos dados	20	Apresente uma declaração descrevendo se e onde os dados do estudo estão disponíveis.
Declaração de interesses	21	a. Declare quaisquer potenciais conflitos de interesse, sejam eles financeiros ou não. Caso não exista nenhum, isso deve ser declarado. b. Liste todas as fontes de financiamento (incluindo o identificador da verba) e o papel do(s) financiador(es) no desenho, análise e relato do estudo.

Diretrizes ARRIVE 2.0: diretrizes atualizadas para relato de pesquisas com animais. Originalmente publicado na *PLOS Biology*, Julho de 2020.

ARRIVE

Anexo 3

Aprovação pela CEUA – FMB- UNESP

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE BOTUCATU
FACULDADE DE MEDICINA

unesp

FMB

Comissão de Ética no Uso de Animais
Criada através da Portaria DFM nº 611 de 13/12/2012

CERTIFICADO Nº 1323/2019 – CEUA

Certificamos que o projeto intitulado: "**Comparação de diferentes técnicas de biópsia retal para diagnóstico de disganglionoses intestinais: modelo experimental em coelhos**", conduzido pela pesquisadora: **Laura Cantisano de Deus Silva** – Orientador: Prof. Dr. Pedro Luiz Toledo de Arruda Lourenção, registrada com o **nº 1323/2019**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n. 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto n. 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADA pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Botucatu, em reunião ordinária de 30 de outubro de 2019.

Finalidade	( ) Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	28 de janeiro de 2022
Espécie/Linhagem/Raça	Coelhos
Nº de animais	28
Idade/Peso	90 a 100 dias – 2,0 a 2,5 kg
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério Central

Sara Rosa Stanley Sampaio
Secretária da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP

Profa. Associada Bertha Furlan Polegato
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP

Distrito Rubião Junior, s/nº – Botucatu – SP, CEP: 18618-970 Fone: (14) 3880-1880 – E-mail Secretaria: ceua@fmb.unesp.br