Mestrado Integrado em Medicina

Interpretação clínica da histopatologia nas Neuropatias Congénitas Intestinais

Ana Luísa Romualdo Matias

Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar

Universidade do Porto - Centro Hospitalar do Porto

Porto, Junho 2011

Tese de Dissertação - Mestrado Integrado em Medicina

Artigo de Revisão Bibliográfica

Interpretação clínica da histopatologia nas Neuropatias Congénitas Intestinais

Autor: Ana Luísa Romualdo Matias

Orientador: Dr. José Alfredo Carvalho Cidade Rodrigues

Afiliação: Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar - Universidade do Porto - Centro Hospitalar do Porto

Endereço: Largo Prof. Abel Salazar, 2, 4099-003 Porto

Contactos: alrmatias86@gmail.com / 936726695

Ano lectivo 2010/2011

ABSTRACT

Introduction: Intestinal dysganglionosis represent a heterogeneous group of enteric nervous system anomalies, a cause of serious problem in infant/children. This group is composed of different entities, including Hirschsprung's disease, neuronal intestinal dysplasia, hypoganglionosis, hyperganglionosis and retarded neuronal maturity.

Aim: The aim of this review will focus on congenital neuropathy of the enteric nervous system, in the study of correlation between histopathological findings and clinical presentation.

Development: The enteric nervous system is a large network of neurons and glial cells, which is located along the length of the gastrointestinal tract. Autonomously controls or regulates many gut functions, including motility, secretion, vascular tone and hormone release, although the central nervous system can modulate these behaviours. Motility patterns in the mature intestine require the coordinated interaction of enteric neurons, gastrointestinal smooth muscle cells and intersticial cells of Cajal. During embryogenesis, cells migrate from the neural crest to the gastrointestinal tract, in the craniocaudal direction, first in the myenteric plexus (Auerbach) and then in the submucous plexus (Meissner).

In congenital absence of the enteric nervous system, there is no spread of movements of the aganglionar (s) segment (s) colon (s) and the lack of internal anal sphincter relaxation (aganglionic) determines the typical clinical obstructive.

Conclusions: Although the various entities are different histologically, the clinical features are similar. The delayed passage of meconium may be the first symptom in the neonatal period, while in infants and older children have chronic constipation. An enhanced recognition and explanation of its etiohistopathological processes associated with the clinical expression, may lead to a substantial improvement in the quality of life of those children.

KEYWORDS: intestinal dysganglionosis, enteric nervous system development, enteric nervous system, Hirschsprung disease, Intestinal neuronal dysplasia, Hypoganglionosis, Hyperganglionosis, Neuronal immaturity.

RESUMO

Introdução: As disganglionoses intestinais representam um grupo heterogéneo de malformações do sistema nervoso entérico, como causa de perturbações da motilidade intestinal em lactentes/crianças. Este grupo de neuropatias compõe-se de diferentes entidades, nomeadamente a doença de Hirschsprung, a displasia neuronal intestinal, a hipoganglionose, a hiperganglionose e a imaturidade neuronal.

Objectivos: O objectivo deste artigo de revisão bibliográfica versará nas neuropatias congénitas do SNE, no estudo da correlação entre os dados histopatológicos e a forma de apresentação clínica.

Desenvolvimento: O sistema nervoso entérico é constituído por uma rede de neurónios e células gliais, que está localizado ao longo do tubo digestivo, e que controla/regula múltiplas funções digestivas, incluindo a motilidade, a secreção, o tónus vascular e a libertação de hormonas. O sistema nervoso central associadamente pode modular estes comportamentos. Os padrões da motilidade intestinal exigem a interacção coordenada dos neurónios entéricos, das células musculares lisas e das células intersticiais de Cajal.

Na embriogénese, as células neuroentéricas migram da crista neural para o tubo digestivo, na direcção craniocaudal, primeiro no plexo mioentérico (Auerbach) e de seguida no plexo submucoso (Meissner).

No caso de ausência congénita do SNE, não existe propagação dos movimentos peristálticos do tubo digestivo, nomeadamente do cólon pelo(s) segmento(s) aganglionar(es) e a ausência de relaxamento do esfíncter anal interno (aganglionar) determina o quadro clínico obstrutivo típico.

Conclusões: Embora as várias entidades sejam histologicamente diferentes, as características clínicas são semelhantes. A eliminação tardia de mecónio pode ser o primeiro sintoma no período neonatal, enquanto em lactentes e crianças mais velhas têm obstipação crónica. O diagnóstico precoce e a explicação dos processos etiohistopatológicos associados à expressão clínica, pode conduzir a uma melhoria substancial na qualidade de vida dessas crianças.

Palavras-chave: Disganglionoses intestinais, desenvolvimento sistema nervoso entérico, sistema nervoso entérico, doença de Hirschsprung, Displasia neuronal intestinal, Hipoganglionose, Hiperganglionose, Imaturidade neuronal.

ÍNDICE

ÍNDICE 2
I. INTRODUÇÃO 3
II. DESENVOLVIMENTO 6
1- EMBRIOLOGIA 6
1.1) Evolução temporal /Ontogenia do SNE 9
2- DISGANGLIONOSES INTESTINAIS 10
2.1) DOENÇA DE HIRSCHSPRUNG 10
2.2) DISPLASIA NEURONAL INTESTINAL 19
2.3) HIPOGANGLIONOSE 26
2.4) HIPERGANGLIONOSE ou GANGLIONEUROMATOSE INTESTINAL 30
2.5) IMATURIDADE NEURONAL 32
2.6) PÓS - OPERATÓRIO 34
2.7) RESUMO 35
III. CONCLUSÕES E FUTURAS PERSPECTIVAS 36
IV. REFERÊNCIAS 38
ANEXO 1
APARELHO DIGESTIVO 1
a) Estrutura geral 1
b) Função 2
c) Controlo da função 3
d) Tipos de movimentos 7
e) Embriologia 9

I. INTRODUÇÃO

As neuropatias entéricas constituem a base de múltiplas doenças do aparelho digestivo (Di Nardo et al., 2008; Furness, 2008) Podem ser congénitas ou adquiridas, e o defeito subjacente pode variar desde alterações mínimas na composição celular do gânglio até à ausência completa dos plexos entéricos em segmentos intestinais.

As Neuropatias Congénitas Intestinais são um grupo de malformações congénitas do sistema nervoso entérico (SNE), que inclui a Doença de Hirschsprung (a mais comum), a Displasia neuronal intestinal (DNI), a Hipoganglionose, a Hiperganglionose e a Imaturidade Neuronal (Knowles et al., 2009). A primeira classificação foi sistematizada por Schärli em 1995 (Tabela1).

Tabela 1. Sistematização das entidades que compõem as disganglionoses.

DISGANGLIONOSES INTESTINAIS	
1. Tipo agénico	- Doença de Hirschsprung (DH) clássica (rectosigmóide) - Aganglionose de segmento longo - Aganglionose total do cólon - Aganglionose total intestinal - Aganglionose de segmento ultra-curto
2. Tipo hipogénico	- Hipoganglionose (doença oligoneuronal) - Hipogénese das células nervosas dos plexos submucoso e mioentérico
3. Tipo disgénico	- Displasia neuronal intestinal tipo A (DNI A) - Displasia neuronal intestinal tipo B (DNI B)
4. Combinação de várias formas de disganglionoses	- DH + DNI B - Hipoganglionose + DNI B - Hipogénese das células nervosas no plexo submucoso + DNI B

Adaptado de Schärli, 1995.

Clinicamente no período neonatal apresentam atraso na eliminação de mecónio, superior a 48 horas (que resolve com estimulação anorrectal), obstipação subsequente e

obstrução intestinal neonatal (com vómitos biliares e distensão abdominal). O momento em que o recém-nascido expulsa o mecónio é um factor de prognóstico importante.

Em lactentes e crianças, apresentam atraso na eliminação de mecónio seguido de crises obstrutivas intestinais intermitentes (resolvidas com estimulação anorrectal e/ou enemas) e obstipação crónica com distensão abdominal. (Markiewicz-Kijewska et al., 2009)

Nos recém-nascidos, com atraso na eliminação de mecónio (superior a 48 horas), é importante considerar as várias causas de obstrução/obstipação intestinal, tais como as disganglionoses intestinais.

Apesar disso, a primeira eliminação de mecónio é tardia em crianças com peso muito baixo, que é atribuído à presença de neurónios imaturos, à composição anormal do mecónio ou a uma obstrução intestinal funcional. (Burns et al, 2009)

A obstipação crónica é um problema frequente em pediatria. É classificada em obstipação funcional e orgânica. Na funcional, não há evidência objectiva de uma condição patológica, sendo esta a mais frequente. A orgânica inclui as disganglionoses intestinais, (Montedonico et al., 2011) em que o diagnóstico histopatológico da causa subjacente é essencial. A interpretação da função das diferentes estruturas do intestino é a base para avaliar as anormalidades da motilidade. (Feichter et al, 2009)

A identificação e a avaliação (pré e intraoperatória) das alterações qualitativas e quantitativas dos neurónios é fundamental para o seu diagnóstico, para a determinação da extensão patológica, e na subsequente ressecção intestinal, evitar complicações pós-cirúrgicas. O principal método é a realização da biópsia rectal por vácuo ou transmural, com o apoio de técnicas histoquímicas (*gold standard*) tais como, a coloração pela hematoxilina & eosina (H&E) e pela acetilcolinesterase rápida (AChE) (Martucciello et al., 2001; Puri, 2003; Montedonico et al., 2011) As amostras de biópsia (duas a três) devem ser obtidas próximas na ampola rectal, 8 a 10 cm acima da linha pectínea (pelo menos 2 a 3 cm acima da linha pectínea para evitar, com segurança, a zona fisiológica hipoganglionar no recto distal).(Rabah, 2010) A amostra deve conter amostra suficiente de submucosa para possibilitar a análise das alterações histopatológicas presentes. (Rabah, 2010)

A coloração AChE é uma técnica histoquímica que cora a enzima acetilcolinesterase, cuja actividade se desenrola nas fibras nervosas parassimpáticas da *muscularis propria*. Esta técnica baseia-se na actividade desta enzima nas estruturas histológicas, nas neuropatias entéricas. O aumento da expressão da AChE está associado a hipertrofia das fibras nervosas extrínsecas do segmento aganglionar. A sua intensidade, aparentemente, aumenta com a idade. (Moore & Johnson, 2005; Gershon, 2010) Tem uma especificidade de 100% e uma sensibilidade de 91 a 96%, se comparada com a H&E. (Montedonico et al., 2011)

Outros marcadores histoquímicos disponíveis são a NADPH-diaforase (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato - diaforase), a LDH (desidrogenase láctica), a SDH (desidrogenase succínica), a NOS (sintetase do óxido nítrico), o GDNF (factor neurotrófico derivado da linhagem glial) e o bcl-2.

Os marcadores imunohistoquímicos empregues são a NCAM (molécula de adesão celular neuronal), o NGFR (receptor do factor de crescimento nervoso) (Ganström et al., 2011), o Pten (O`Donnell & Puri, 2011), o CD117 e o S100 (Nogueira et al., 2001).

II. DESENVOLVIMENTO

Para interpretar a fisiopatologia das neuropatias congénitas intestinais, é necessário empreender uma revisão anatomofisiológica (em ANEXO) e embriológica do sistema nervoso entérico, no tubo digestivo.

1- EMBRIOLOGIA

Durante a fusão das pregas neurais, que formam o tubo neural, algumas células neuroectodérmicas, dispostas ao longo da crista de cada prega neural, perdem a afinidade epitelial e a ligação com as células vizinhas. Com a separação do tubo neural da ectoderme superficial, as células da crista neural migram dorsalmente de ambos os lados do tubo neural, formando a **crista neural**, situada entre o tubo neural e a ectoderme subjacente. Muitas células da crista neural migram em várias direcções, dispersam-se pelo mesênquima, e dão origem aos gânglios raquidianos e aos gânglios do sistema nervoso autónomo.(Sadler et al., 2010)

A formação do sistema nervoso entérico deriva das células da crista neural (NCC). Estas migram ao longo de caminhos pré-definidos, para colonizar o intestino primitivo a partir da 4ª até à 12ª semana de gestação, na direcção craniocaudal. (Paran et al, 2006) Podem ter três origens específicas: a) as células do segmento vagal da crista neural – células vagais NCC (adjacentes aos sómitos 1 – 7, migram na direcção oro – anal); b) as células do segmento do tronco anterior da crista neural (adjacentes aos sómitos 6 – 7, caudalmente às células vagais NCC mais distais, migram no mesmo sentido que estas); c) as células do segmento sagrado da crista neural – células sagradas NCC (caudal ao sómito 28, migram no sentido oposto). (Figura 1)

As células vagais NCC constituem no adulto a maioria dos neurónios, dos gânglios e das células gliais deste sistema. As células do tronco NCC originam parte dos neurónios do esófago e do estômago anterior. As células sagradas NCC formam os primeiros gânglios adjacentes à parede intestinal (plexo pélvico), e mais tarde migram para o intestino primitivo terminal, na zona pós-umbilical, e formam o plexo mioentérico, antes da chegada das células vagais NCC ao intestino terminal.(Figura 1) Foram encontradas diferenças intrínsecas neste tipo de células na capacidade de

colonização e de resposta à sinalização celular. (Gariepy, 2001; Anderson et al., 2006) Todavia, a interacção entre elas é fundamental para o desenvolvimento do SNE. (Gariepy, 2001; Anderson et al., 2006)

Quando as células vagais e sagradas NCC encontram-se no intestino primitivo médio, este grupos de células continua a migrar na sua direcção. Uma interpretação desse comportamento é que as duas populações de células seguem compartimentos de migração distintos na parede intestinal e entram em mínimo contacto in vivo.(Laranjeira & Pachnis, 2009) Acredita-se que a maioria do SNE seja proveniente da proliferação das células vagais NCC. (Anderson et al., 2006)

As NCCs colonizam a parede intestinal, em resposta a sinais proliferativos intensos, que estimulam um aumento numérico, e por conseguinte, iniciam a diferenciação neuronal e glial. (Figura 1) (Laranjeira & Pachnis, 2009)

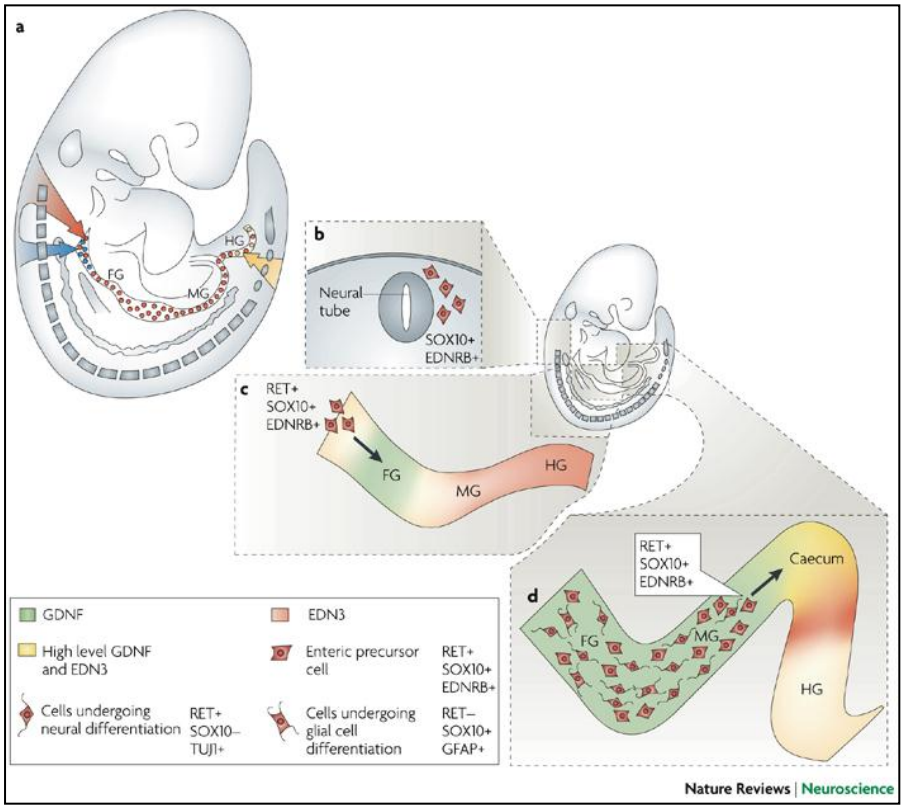


Figura 1. As origens, as rotas migratórias e a expressão genica das células da crista neural, contribuem para a formação do SNE. **a**) Durante a embriogénese, as células vagais NCC (seta vermelha), invadem o intestino primitivo anterior (FG), migram na direcção rostro caudal e colonizam todo o intestino primitivo; dão origem à maioria do sistema nervoso entérico (SNE, pontos vermelhos). As células vagais NCC mais distais, provenientes de uma região de sobreposição com as células do tronco anterior derivadas das células da crista neural (seta azul), fazem uma pequena contribuição na formação do SNE do esófago e do estómago anterior (pontos azuis). Finalmente, as células sagradas NCC (seta amarela) fazem uma pequena contribuição, migram na direção caudal a rostral

para colonizar o cólon (pontos amarelos). **b**) As células vagais NCC (vermelho) que emigram do tubo neural, expressam SOX10 e os receptores da endotelina B (EDNRB). **c**) Ao entrar no intestino primitivo anterior, as células entéricas derivadas da crista neural (ENCCs) começam a expressar o receptor RET. No mesênquima do intestino, o factor neurotrófico derivado da linhagem glial (GDNF) (o ligante do RET), é expresso em grande quantidade no intestino primitivo anterior (verde); a endotelina 3 - EDN 3 - é expressa no intestino primitivo médio e posterior (rosa). **d)** Como as ENCCs migram caudalmente, encontram-se altos níveis de expressão de GDNF e de EDN3 no cego (amarelo). As células que permanecem no mesênquima intestinal começam a diferenciar progressivamente em neurónios e células gliais. Adaptado de Heanue TA, Pachnis V (2007).

Mais tarde, com o crescimento do intestino em comprimento e em largura, as células nervosas ou neurónios agrupam-se em gânglios (aglomerados de corpos celulares de neurónios, localizados fora do SNC e associados a nervos), e no conjunto compõem os plexos (uma rede nervosa constituída por neurónios, gânglios e fibras nervosas). O primeiro plexo a formar-se é o mioentérico, externo à camada muscular circular; posteriormente forma-se a camada muscular longitudinal, ficando o plexo mioentérico entre estas duas subcamadas, durante a 12ª semana de gestação. De seguida, forma-se o plexo submucoso, pela migração centrípeta dos neuroblastos provenientes da camada muscular circular, para a submucosa. A formação destes plexos progride na direcção orocaudal, durante a 12ª e a 16ª semana.(Paran et al., 2006)

O sistema parassimpático tem origem na região craniossagrada, e constitui os gânglios justacervicais e intramurais, por migração extensa das células derivadas da crista neural. Por fim, as fibras pré-ganglionares emergem na região sagrada, pelos nervos sagrados.

O sistema simpático (ou ortossimpático) tem origem na região dorsolombar, com formação das cadeias ganglionares simpáticas ou laterovertebrais, dos gânglios pré-viscerais e dos plexos viscerais, por migração das células derivadas da crista neural, as células simpáticas ou simpatogónias. A disposição segmentar dos gânglios nas cadeias laterovertebrais contribui para que as células formem também os gânglios pré-aórticos (celíacos e mesentéricos).

Classicamente, a inervação adrenérgica e a colinérgica desenvolvem-se entre a 9ª e a 12ª semana. A inervação NANC (não colinérgica nem adrenérgica) desenvolve-se durante a 12ª semana. Os neurónios nitrérgicos distribuem-se ao acaso pela 14ª semana

de gestação e agregam-se em gânglios pela 19ª semana. A partir da 14ª semana já é evidente a inervação nitrérgica no plexo submucoso. (Paran et al., 2006)

(Continuação no ANEXO)

1.1) Evolução temporal /Ontogenia do SNE

Durante o desenvolvimento, os neurónios entéricos tendem a modificar a sua neurotransmissão química, o seu número e a sua densidade. (Paran et al., 2006)

Dados morfológicos de tecidos humanos sugerem que a população de neurónios entéricos do cólon começam a diminuir relativamente cedo na vida (nos plexos submucoso e mioentérico), com uma queda mais acentuada pelo quarto ano de vida. Esta neurodegeneração continua no plexo mientérico, com uma redução adicional de 37%, entre as idades dos 20 aos 35 anos e aos 65 anos. (Paran et al., 2006)

Estas perdas começam na infância, em ambos os plexos nervosos do intestino (mais específica nos neurónios colinérgicos) e nas células gliais. A extensão da perda varia ao longo de um gradiente oro-anal, sendo a área distal do intestino a mais afectada. (Phillips & Powley, 2007)

A rede do plexo mioentérico torna-se menos densa durante os primeiros anos de vida e a densidade das células ganglionares diminui significativamente durante os primeiros três a quatro anos de vida. Esta notável diminuição indica que o desenvolvimento do SNE é um processo em curso ainda no pós-natal. Aplicado à condição clínica, implica que a interpretação da patologia do sistema nervoso entérico é dependente da idade do doente. (Wester et al., 1999)

Na maioria dos casos, nas crianças em idades compreendidas entre o primeiro e o quarto ano de vida, decorre a maturação normal dos neurónios. (Feichter et al., 2009)

2- DISGANGLIONOSES INTESTINAIS

2.1) DOENÇA DE HIRSCHSPRUNG

Definição e epidemiologia

A doença de Hirschsprung (DH) é a doença congénita mais comum da motilidade intestinal, associada à ausência de células ganglionares no cólon distal. O comprimento dos segmentos é variável.

A incidência da DH é estimada em 1 em cada 5000 recém-nascidos. A doença é mais comum no sexo masculino, com uma proporção de 4:1 (masculino/feminino).

Normalmente, ocorre em 70% dos casos como uma forma isolada. Em 25 a 35% dos doentes com DH têm associada Displasia neuronal intestinal. (Amiel et al., 2008; Kenny et al., 2010)

Etiologia

A sua etiologia é multifactorial e poligénica. (Ziad et al., 2006)

A incidência de casos familiares na DH, de localização no recto-sigmóide, varia de 3,6% a 7,8% dos casos. (Puri & Shinkai, 2004) O risco de recorrência para os irmãos é dependente do sexo da pessoa afectada e da extensão da aganglionose. (Puri & Shinkai, 2004)

A DH decorre provavelmente devido a uma falência na migração completa das células derivadas da crista neural pelo intestino primitivo. Postula-se, que quanto mais precoce é a suspensão da migração, maior é o segmento aganglionar. (Puri & Shinkai, 2004; O`Donnell & Puri, 2010) Como as células sagradas NCC dependem da interacção com as células vagais NCC, o que explica a incapacidade destas células para compensar a falta de gânglios no cólon distal. (Gariepy, 2001; O`Donnell & Puri, 2010)

i) Genes envolvidos

A DH é considerada uma doença genética, de penetrância incompleta e gravidade variável. (Moore, 2009)

A relação genótipo-fenótipo não é simples e a diversidade genética pode ser atribuída à cascata de eventos moleculares e celulares que ocorrem durante o desenvolvimento do SNE. (Newgreen & Young, 2002; Kenny et al., 2010) O fenótipo pode resultar de mutações em genes únicos ou múltiplos. A existência de indivíduos com mutações major, que não manifestam a doença, sublinha os mecanismos complexos multigénicos da formação do SNE e também o papel influente dos factores ambientais.(Kenny et al., 2010)

As mutações em múltiplos genes (RET, GDNF, NTN, EDNRB, EDN3, ECE1, PHOX2B, SOX10) têm sido associadas com a doença de Hirschsprung.(Tabela 2) Estes genes respondem por apenas 50% dos casos.

Tabela 2: Sumário dos genes envolvidos na doença de Hirschsprung e síndromes associados (Gershon, 2010; Kenny et al, 2010)

Gene	Frequência da mutação	Síndromes associados
RET ("REarranged during Transfection") - Receptor tirosina-cinase)	50% dos casos familiares; 15-35% dos casos esporádicos (pode modular a penetrância de outros genes)	Síndrome Neoplasia endócrina múltipla tipo 2B (NEM 2B), carcinoma medular tiróide
GDNF (Factor neurotrófico derivado da linhagem glial)	Raro (<5%); 6 casos descritos; cosegrega com o RET	
NTN (Nerturine)	1 caso familiar descrito	
EDNRB (Receptor B da endotelina)	~5%	Síndrome Shah – Waardenburg (WS4)
EDN3 (Endotelina 3)	< 5%; gene comum de susceptibilidade	
ECE – 1 (Enzima de conversão da	1 caso descrito	

endotelina)	
SOX 10(SRY-related HMG-box 10)	Syndrome Shah – Waardenburg (WS4)
Phox2b (Pairedlike homebox 2b)	Sem mutações descritas nos casos isolados

Uma característica dos genes implicados na patogénese da doença de Hirschsprung é serem imprescindíveis para o início do desenvolvimento do SNE. Em modelos animais (ratos), o *knockout* dos genes EDN3, EDNRB ou ECE1, resulta em aganglionose do cólon terminal, ao passo que, nos restantes genes, observa-se aganglionose de todo o intestino. Como resultado, a proliferação do pool de ENCCs é insuficiente para colonizar o intestino primitivo, ficando o segmento intestinal terminal aganglionar. (Gershon, 2004)

O Sox10 é importante para manter os precursores multipotentes a expressar PHOX2B e/ou Mash-1. O Sox10 também interage com o Pax3, de modo a regular a expressão do RET. (Gershon, 2004)

A DH resultante das mutações no RET e no GDNF é herdada de modo autossómico dominante, com penetrância incompleta. (Gariepy, 2001) As numerosas mutações no gene RET (codões de stop prematuros e delecções no domínio da cinase) inactivam a cinase. Na mesma mutação, numa família, o comprometimento funcional e a aganglionose resultante são variáveis, isto é, pode resultar em DH com segmento longo ou curto, e com apresentação diferente, desde intestino funcional a obstipação moderada. (Newgreen &Young, 2002)

As mutações no RET são as mais frequentes nesta doença, principalmente nos doentes com DH com segmento longo (apresentam maior percentagem de mutações no RET, particularmente no domínio da tirosina cinase). (Moore, 2009). Aproximadamente 50% dos doentes com DH familiar têm mutações no RET, indicando que este gene é um factor determinante na aganglionose do cólon (Amiel et al., 2008).

Formas de DH

A DH em termos de extensão limita-se ao recto-sigmóide em 75% dos casos; ao cólon transverso, ao ângulo esplénico do cólon ou ao cólon sigmóide em 17% dos casos; e ao cólon total, com um pequeno segmento de íleo terminal, em 8% dos doentes. A aganglionose total intestinal é uma forma rara, com ausência de células ganglionares desde o duodeno até ao recto. (Puri & Shinkai, 2004)

A DH baseada na extensão do envolvimento intestinal, é classificada em segmento ultra-curto (USSHD), segmento curto (SSHD), segmento longo (LHSD) ou aganglionose cólica total (TCA). Os critérios para o diagnóstico do USSHD continuam controversos. (Ziad et al., 2006; Moore, 2009)

1) A **aganglionose** numa **zona ou segmentar**, envolve uma zona de aganglionose, num intestino inervado normalmente. (O`Donnell & Puri, 2010) Pode ser único ou duplo ("skip segment"). O segmento único aparece preferencialmente no cólon sigmóide e no recto proximal.

O **SSHD** ("Skip segment" Hirschsprung disease) é um segmento inervado normalmente, que fica entre dois segmentos aganglionares, e localiza-se no cólon ascendente ou no transverso; o duplo segmento envolve o cólon ascendente e o íleo distal (o segmento proximal) e o recto-sigmóide e o cólon descendente (o segmento distal) (Berger et al., 2000) Não existe uma explicação embriológica clara para a sua etiologia. Ocorre predominantemente nos doentes com TCA (aganglionose total do cólon). A existência de uma área normalmente inervada no cólon, pode influenciar o tratamento cirúrgico, permitindo preservar e utilizar esta área do cólon de modo a melhorar o resultado funcional. (O`Donnell & Puri, 2010)

A teoria considerada a principal explicação, que esses segmentos "skip" são derivados de neuroblastos, que ao migrarem na direcção crânio-caudal, na passagem da fronteira mesentérica para a parte mais distal do intestino, acabam à frente da onda de migração das NCCs, ficando numa área dentro do segmento aganglionar. Assim, além da migração intramural do cólon pelas células vagais NCCs, existe uma migração extramural dos neuroblastos ao longo do mesentério e do cólon. (Ziad et al., 2006; O`Donnell & Puri, 2010)

O SSHD com 24 casos descritos na literatura científica, deve ser considerada uma entidade distinta, embora controversa. (O`Donnell & Puri, 2010)

2) **Aganglionose no recto-sigmóide (DH clássica)** (descrita nas páginas 16-19)

3) **Aganglionose total do cólon (TCA):** é uma forma rara, com características histológicas, genéticas e clínicas distintas. Representa 2 a 10% dos casos de DH. (Rolle et al., 2007)

Foi definida como a aganglionose que afecta todo o cólon, até à válvula ileocecal, mais um segmento de íleo variável, não superior a 50 cm. Pode ser dividido em aganglionose total do cólon e aganglionose total do cólon e do intestino delgado, que envolve um segmento muito longo de aganglionose. Ainda não está claro se a TCA representa apenas uma forma longa da DH ou uma expressão diferente da doença. (Moore, 2009)

É muito comum em 15-21% dos casos familiares, o que sugere uma provável ligação genética. (Puri & Shinkai, 2004; Moore, 2009) Há maior associação entre as malformações e as anomalias no gene RET. Embora a genética da TCA não esteja completamente esclarecida, o gene RET e o gene EDNRB continuam a ser os dois principais genes de susceptibilidade, sendo o gene RET o mais importante. (Moore, 2009)

As biópsias rectais revelam ausência da hipertrofia das fibras nervosas e da positividade da coloração pela acetilcolinesterase. (Rolle et al., 2007) Estes critérios auxiliam no diagnóstico. Em alguns casos, a biópsia é repetida para identificar a zona de transição, a área de passagem da zona ganglionar para a aganglionar. Está associada a uma zona de transição característica, com hipoganglionose longa e com a presença anormal de células imaturas, individuais e/ou em grupos. (Rabah, 2010) O estabelecimento do diagnóstico depende, principalmente, da falta de células ganglionares adequadas na submucosa. (Rabah, 2010) Um dos factores que potencialmente influenciam o diagnóstico é o comprimento do envolvimento do intestino delgado. (Moore, 2009)

Considerando o comprimento do segmento aganglionar, é sugerido que a fisiopatologia subjacente seja diferente da forma clássica da DH. (Moore, 2009; Moore et al., 2009)

Geralmente manifesta-se no período neonatal, com obstrução intestinal, mas ao contrário da DH recto-sigmóide clássica, a passagem de mecónio nas primeiras 24 horas de vida está presente, numa alta percentagem de recém-nascidos. Também foi descrito que os sintomas podem ter um desenvolvimento progressivo, com agravamento da obstrução sendo o diagnóstico é feito após o primeiro ano de vida, ou em casos raros, na adolescência ou na idade adulta. (Rolle et al., 2007)

4) **Aganglionose total intestinal (TIA):** a forma mais grave e rara. Ocorre em aproximadamente 1% dos doentes com DH. Até recentemente, era considerada uma forma fatal. (Ruttenstock & Puri, 2009)

A sua incidência familiar surge em 50% dos casos. (Puri & Shinkai, 2004; Ruttenstock & Puri, 2009)

A dificuldade do seu diagnóstico definitivo é um achado comum, em todos os casos de TIA.

Clinicamente, manifesta-se por vómitos biliares, distensão abdominal e ausência de eliminação de mecónio. Somente em 5,9% dos casos houve passagem do mecónio nos primeiros dois dias (com um intervalo de 1 a 2,5 dias). (Ruttenstock & Puri, 2009)

Os doentes com TIA com menos de 20 centímetros de intestino delgado ganglionar têm um prognóstico pior, devido às complicações fatais associados com a NPT (nutrição parentérica) a longo prazo, tais como a sépsis e a doença hepática. Nestes doentes, o transplante intestinal representa a única opção de tratamento. (Ruttenstock & Puri, 2009)

A enterocolite é a complicação mais grave da TIA, com diarreia, febre e distensão abdominal. (Ruttenstock & Puri, 2009)

Diagnóstico histológico

O diagnóstico baseia-se na ausência de células ganglionares nos plexos mioentérico e submucoso, associado ao aumento do número de fibras nervosas positivas à coloração pela acetilcolinesterase, na submucosa e na *muscularis mucosae*. Igualmente fibras nervosas hipertróficas evidenciam-se na submucosa. (O`Donnell & Puri, 2010; Rabah, 2010) (Imagem histológica nº 1 – a, b)

A ausência de células ganglionares é atribuída à falência na migração das células da crista neural. (Holschneider et al., 1994)

É provável que o aumento da expressão da AChE no cólon afectado seja a consequência da transcrição de alterações nas moléculas de sinalização que caracterizam a DH. (Rabah, 2010)

Guinard-Samuel et al., 2009 sugeriram que a imunohistoquímica pela calretinina pode ser útil na abordagem diagnóstica. A calretinina é expressa num subconjunto de células ganglionares (CGs) da submucosa e dos nervos, e também destaca as fibras nervosas na *muscularis mucosae* e na lâmina própria do cólon normal (Imagem histológica nº 1, c). Na DH, a coloração está completamente ausente (Imagem histológica nº 1, d) (Rabah, 2010)

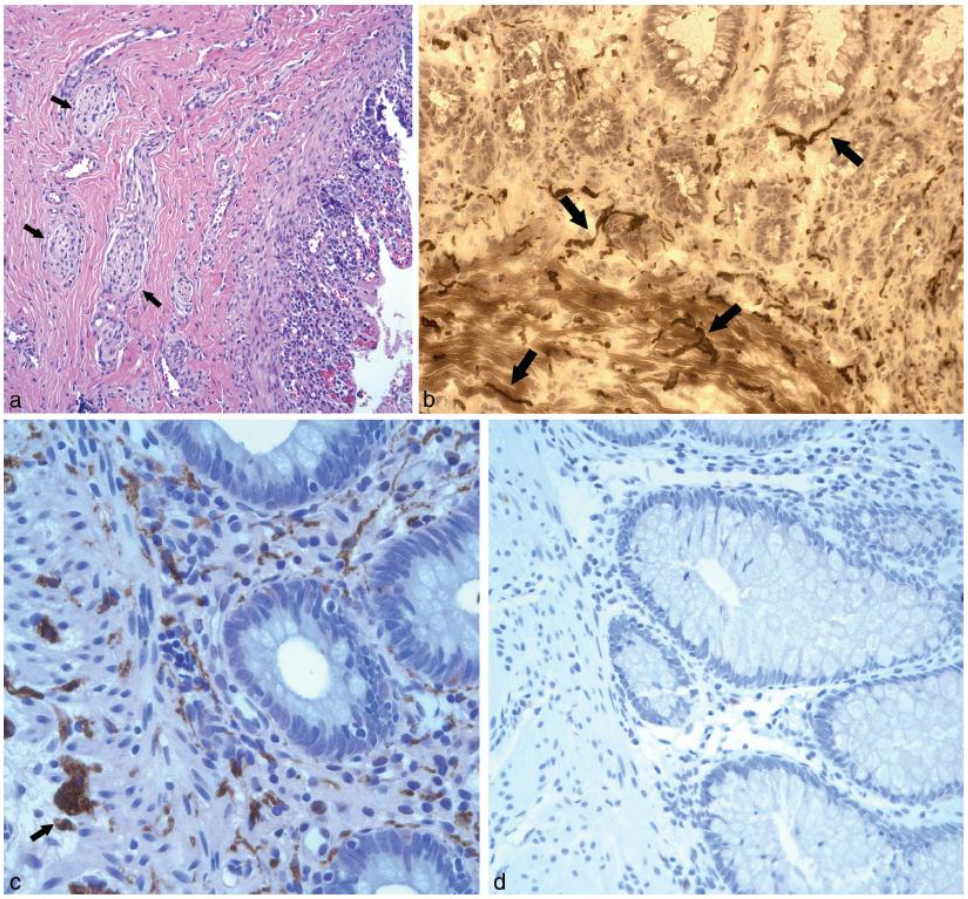


Imagem histológica nº 1. **a)** Vários nervos hipertróficos (setas) na submucosa (400x). **b)** Coloração pela acetilcolinesterase em fibras nervosas; presente na *muscularis mucosae* e na lâmina própria (setas), do segmento aganglionar (400x). **c)** Coloração com calretinina no segmento ganglionar; os nervos na lâmina própria e na *muscularis mucosae* estão evidenciados, e uma unidade neural na submucosa (seta) (400x). **d)** Coloração com calretinina na biópsia de doente com DH; verifica-se ausência de coloração na *muscularis mucosae* e na lâmina própria (40x) Adaptado de Rabah, 2010.

A presença de fibras nervosas hipertróficas na submucosa é útil no diagnóstico, mas não é suficiente para o determinar definitivamente. Estas podem não estar presentes na DH de segmentos ultracurtos ou longos. O grau de hipertrofia do nervo é variável e aumenta com a idade. (Rabah, 2010)

No período neonatal, as CGs da submucosa podem não ser facilmente reconhecidas porque são pequenas e imaturas, e outras células, assemelhando-se a outras células como os linfócitos, as células gliais e as células endoteliais.

As células ganglionares imaturas estão normalmente presentes em aglomerados chamados unidades neurais, que são facilmente reconhecidos sob a *muscularis mucosae*. Estas unidades são compostas de regiões centrais, pálidas e neurofibrilares,

rodeadas por uma mistura de células pequenas, incluindo CGs imaturas e células de Schwann imaturas. As CGs imaturas possuem núcleos menores e mais escuros, com uma proporção núcleo/citoplasma menor, quando comparadas às CGs maduras. Também contêm nucléolos impercetíveis e excêntricos, em forma de pêra, com citoplasma cinza-azulado, sem a aparente substância de Nissl pontilhada (presente nas CGs maduras). Nos recém-nascidos, os nucléolos muitas vezes não são bem reconhecidos. (Rabah, 2010)

Manifestações clínicas

A DH é uma causa de obstrução intestinal no recém-nascido. É suspeita em casos de obstipação crónica grave durante a infância e crises obstrutivas intermitentes.

O doente típico é um recém-nascido que apresenta atraso na eliminação de mecónio (> a 48h) e distensão abdominal (e/ou quadro de obstrução intestinal neonatal), ou uma criança com obstipação crónica grave. (Puri & Rolle, 2004) Também podem apresentar dor abdominal e vómitos biliares. (Kenny et al., 2010; O`Donnell & Puri, 2010) Apesar de muitos casos serem diagnosticados no período neonatal, alguns apresentam-se após o primeiro ano de vida ou na infância. (Ziad et al., 2006)

Apesar de a obstipação ser uma manifestação clínica, somente 12 a 17% dos casos de crianças obstipadas têm DH. (Ziad et al., 2006)

Como a migração craniocaudal não decorre nesta doença, as fibras parassimpáticas provenientes das raízes sagradas S2-S4, que normalmente crescem no cólon distal, não podem ser moduladas no cólon aganglionar distal, devido à ausência do plexo mientérico. Isto conduz a uma hiperactividade do intestino com a libertação de Acetilcolina contínua e permanentemente, causando a contracção do segmento intestinal afectado. (Feichter et al., 2009) Da mesma forma se explica a espasticidade do segmento rectal aganglionar. (Holschneider et al., 1994)

Assim, a obstrução intestinal observada é um exemplo da importante função do SNE. Os movimentos de segmentação no cólon não são capazes de propagar-se através do segmento aganglionar, que permanece num estado tónico. Além disso, a presença de fezes acumuladas no recto não provocam relaxamento do esfíncter anal aganglionar, o

que contribui para o quadro obstrutivo por ausência do reflexo inibidor recto-anal. (Kenny et al., 2010)

No entanto, alguns doentes continuam a ter disfunção intestinal persistente apesar da ressecção adequada do intestino aganglionar. Os problemas de motilidade pós-cirurgia correctiva têm sido atribuídos à displasia neuronal intestinal ou à distribuição alterada das ICCs. (Puri & Roll, 2004)

2.2) DISPLASIA NEURONAL INTESTINAL

Definição e epidemiologia

A displasia neuronal intestinal (DNI) tem sido um desafio desde as primeiras descrições, há mais de 30 anos. Esta entidade é considerada por vários autores a malformação do SNE mais subtil, uma vez que está limitada somente ao plexo **submucoso** do cólon. (Meier-Ruge et al., 2006) Porém, num terço dos doentes, a DNI acompanha a hipoganglionose no plexo mioentérico (Meier-Ruge et al., 2004). No entanto, algumas alterações hiperplásicas no plexo mioentérico podem ser também observadas. (Skabaa et al., 2006)

Existiu muita controvérsia na literatura médica em relação à definição desta entidade, mas com o decorrer do tempo os critérios patológicos de diagnóstico foram adaptados e aperfeiçoado. A aplicação rigorosa desses critérios é crucial para a obtenção de um diagnóstico fiável. (Meier-Ruge et al., 2006)

A DNI é a segunda entidade mais frequente das disganglionoses, a seguir à DH. (Nogueira et al., 2001) A incidência da forma isolada varia de 0,3% a 40% na literatura científica. Vinte e cinco a 35% dos doentes com DH têm associada DNI. (Puri, 2003)

Etiologia

A sua etiologia precisa permanece desconhecida e ainda não existem testes diagnósticos específicos, a não ser os testes morfológicos. (Meier-Ruge et al., 2006)

A DNI não está associada a alterações genéticas específicas, (Meier-Ruge et al., 2006) todavia, os aspectos moleculares do desenvolvimento da DNI baseiam-se em estudos sobre o papel do factor de transcrição Hox11L1 no sistema nervoso periférico, numa mutação homozigota do gene EDNRB e na ausência de moléculas de adesão celular neuronal, que podem estar envolvidos no tipo de inervação anormal desta doença. (Skabaa et al., 2006)

Nos estudos experimentais em animais (ratos), sobre a homozigotia do gene Ncx/Hox11L1, foi verificada hiperganglionose nos plexos entéricos. Este gene está envolvido na apoptose, permitindo que a caspase 3 seja altamente expressa no SNE. Dessa forma, no rato Ncx -/-, devido à persistência de células neuronais imaturas, o intestino encontra-se hiperganglionado. (Yamataka et al., 2001; Kato et al., 2009)

A deficiente sinalização dos genes EDN-3/EDNRB parece forçar a diferenciação prematura dos precursores neuronais e esgota o conjunto de células necessárias para colonizar o cólon. É fácil especular que o efeito concomitante seria o aumento do número de neurónios diferenciados no intestino proximal à zona aganglionar. Porém, ocorre a montante do intestino aganglionar. (Kapur, 2003)

Tipos de DNI

A DNI foi classificada em dois grupos com características clínicas e histológicas distintas. (Puri, 2003) (Tabela 3) Contudo, a linha divisória entre esses grupos nem sempre é clara e podem haver sobreposições. (Rajalakshmi et al., 2003)

O tipo **A,** o mais raro dos dois tipos, ocorre em menos de 5% dos casos. Caracteriza-se por aplasia ou hipoplasia congénita da inervação simpática. Apresenta-se de forma aguda no período neonatal, com episódios de obstrução intestinal, diarreia e fezes sanguinolentas, consequentes a uma enterocolite necrosante. (Puri, 2003; Rajalakshmi et al., 2003) Devido à sua apresentação incomum e à rápida evolução clínica, pode levantar dúvidas no seu diagnóstico. (Rajalakshmi et al., 2003) A nível

histológico, caracteriza-se por hiperplasia dos neurónios mioentéricos e aumento na actividade da acetilcolinesterase na lâmina própria e na *muscularis mucosae*. (Kapur, 2001)

O tipo **B** representa mais de 95% dos casos de DNI isolada. Na maioria dos casos, ocorre em associação com a DH (em 6% dos doentes). (Meier-Ruge et al., 2006) Os achados histológicos incluem hiperganglionose dos plexos submucoso e mioentérico, gânglios gigantes, neurónios ectópicos e aumento da actividade da AChE, na lâmina própria e na submucosa, em torno dos vasos sanguíneos. (Kapur, 2001; Puri, 2003) O quadro clínico assemelha-se à DH.

Tabela 3. Comparação entre os achados histopatológicos e clínicos nos tipos A e B, da DNI.

Achados	DNI tipo A	DNI tipo B
Idade	Neonatal	Após os 6 meses de idade
Sintomas clínicos	Diarreia, fezes sanguinolentas, obstrução intestinal	Obstipação, megacólon, mimetiza a DH
Achados histológicos	1. Hiperplasia plexo mioentérico	1. Hiperplasia do plexo submucoso
	2. Inflamação da mucosa	2. Ausência de inflamação
	3. Ausência de gânglios	4. Gânglios ectópicos

Adaptado de Rajalakshmi et al., 2003.

A DNI B dependendo do comprimento do intestino anormal, a DNI B pode ter outras 2 formas: a localizada e a disseminada. E igualmente, pode ocorrer de forma isolada – "forma pura", ou em associação com a DH, proximal a um segmento aganglionar (em mais de 75% dos casos). Esta associação é frequente existir nas complicações pós-operatórias do tratamento cirúrgico definitivo da DH. (Nogueira et al., 2001). Em casos raros, a DNI pode estar associada a atrésia do cólon, de forma semelhante à aganglionose. (Skabaa et al., 2006)

Diagnóstico

O diagnóstico da DNI isolada baseia-se na história clínica e na análise histológica da biópsia rectal. (Montedonico et al., 2011) Se a biópsia rectal for

insuficiente, deve realizar-se uma biópsia transmural para diagnóstico definitivo. (Puri, 2003; Skabaa et al., 2006)

A idade média do diagnóstico é geralmente aos 12 meses (+6) em comparação com os 4 meses (+2), na DH. Isto pode ser justificado pela hipoplasia da inervação parassimpática extramural, decorrente das raízes sagradas S2-S4, do recto e pela imaturidade do SNE. A extensão da DNI aparentemente tem um efeito inibitório sobre o crescimento das fibras nervosas parassimpáticas extramurais no cólon distal. (Meier-Ruge et al., 1995)

i) Histológico

Actualmente, o diagnóstico fundamenta-se na presença de gânglios gigantes no plexo submucoso, simultaneamente com a hiperganglionose. (Imagem histológica nº 2 - B) (Puri, 2003; Rajalakshmi et al., 2003) O diagnóstico é quantitativo e baseia-se no aumento relativo da densidade dos gânglios gigantes submucosos esféricos (a definição de gigante inclui conter mais de 8 cortes seccionais de células nervosas num único gânglio). Mais de 20% dos gânglios submucosos do cólon devem ser gigantes, em crianças de idade superior a 1 ano. Para complementar os critérios, pelo menos 25 gânglios na submucosa devem ser avaliados ao acaso na visualização histológica da biópsia (com amostra suficiente de submucosa) e 20% desses, devem conter 9 ou mais cortes de corpos celulares de neurónios seccionados. (Meier-Ruge et al., 2004)

O aumento da actividade da AChE na lâmina própria da mucosa é um fenómeno dependente da idade, que indica moderada imaturidade do SNE, e por isso, desaparece com a maturação dos plexos submucosos. (Imagem histológica nº 3) (Meier-Ruge et al., 2004) Um aumento da actividade da acetilcolinesterase nas fibras nervosas, na lâmina própria da mucosa e na adventícia das artérias da submucosa é um critério obrigatório de diagnóstico de DNI. (Imagem histológica nº 2 - B) (Skabaa et al., 2006)

As colorações LDH e SDH são positivas no plexo submucoso. (Kim et al., 2010)

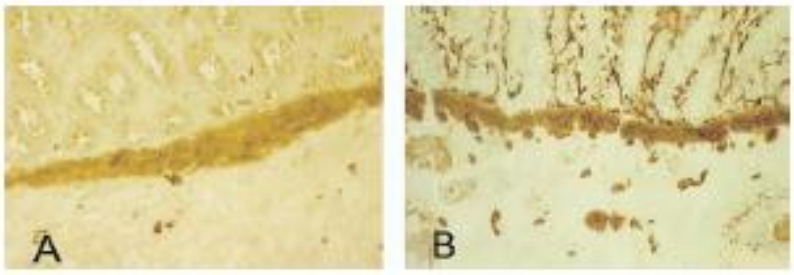


Imagem histológica nº 2. Coloração pela acetilcolinesterase (AChE). A) Biópsia rectal normal. B) Doente com DNI apresenta hiperganglionose, gânglios gigantes e aumento da actividade da AChE na lâmina própria. (125x) (Puri & Rolle, 2004)

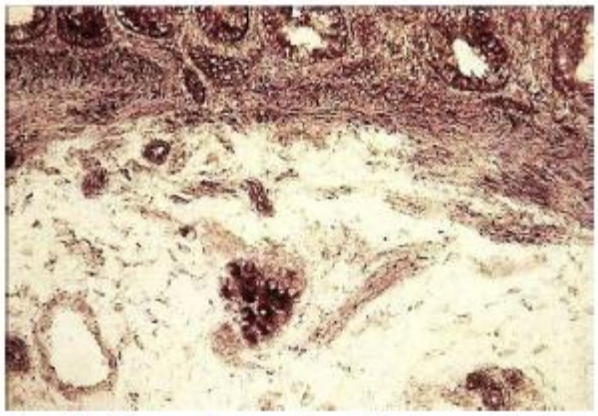


Imagem histológica nº 3. Plexo submucoso maturo com gânglios gigantes, pelo quarto ano de idade. (Coloração LDH, 180x) (Feichter et al., 2009)

A ausência ou diminuição da inervação nitrérgica no intestino afectado contribui para a incapacidade de relaxar do músculo liso, causando disfunção da motilidade. Pela histoquímica da NADPH-diaforase apresentam hiperganglionose e gânglios gigantes no plexo submucoso. (Imagem histológica nº 4) Há ausência ou acentuada redução da actividade da NADPH-diaforase na camada muscular circular, assim como nas fibras musculares longitudinais destes doentes. (Puri, 2003)

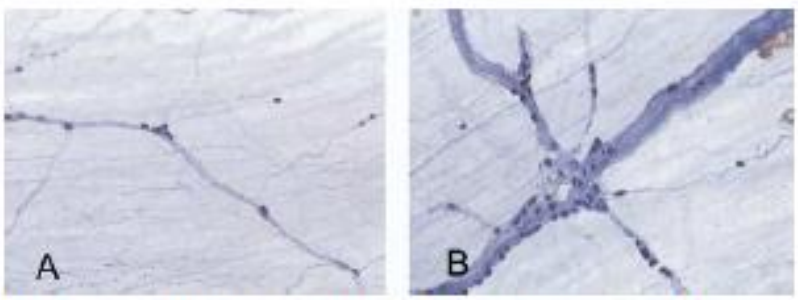


Imagem histológica nº 4. Coloração histoquímica NADPH-diaforase. A) Plexo submucoso normal. B) Plexo submucoso na DNI mostra gânglios gigantes (125x). (Puri & Rolle, 2004)

Montedonico e colaboradores (2002), evidenciaram uma correlação entre a gravidade histológica da DNI e os sintomas clínicos, o que a destaca como uma entidade isolada e distinta, nas disganglionoses intestinais.

Geralmente, um achado típico nesta patologia é a ausência do reflexo inibidor recto-anal. (Kobayashi et al., 1996; Meier-Ruge et al., 2006)

A razão do critério de diagnóstico ser somente feito a partir do primeiro ano de idade, é atribuído ao facto de que nessa idade, os neurónios e as células gliais presentes nos plexos ainda estão imaturos, com a presença de múltiplos gânglios gigantes, o que pode traduzir-se num diagnóstico sobrestimado ou incorrecto. (Meier-Ruge et al., 2004; Meier-Ruge et al., 2006) Deste modo, a interpretação da patologia do SNE deve estar relacionada com a idade do doente, implicando que a DNI não se limite à infância. (Gillick et al., 2001) Wester et al., (1998; 1999) evidenciaram que a densidade dos gânglios no plexo submucoso diminui durante os primeiros 3-4 anos de vida e o número de células por gânglio manteve-se constante.

É necessário esclarecer a aparência histológica do desenvolvimento do SNE pós-natal, e relacionar com os critérios diagnósticos da DNI. (Gillick et al., 2001)

Em crianças com idade superior a 4 anos com o diagnóstico de DNI é requerida uma biópsia adicional da *muscularis propria* para excluir hipoganglionose ou hipoplasia dos neurónios no plexo mioentérico ou, também, desmose da *muscularis propria.* (Meier-Ruge et al., 2004)

A ganglioneuromatose, com apresentação de hiperplasia notável do plexo submucoso e gânglios gigantes (com 20 ou mais neurónios por gânglio) deve ser claramente diferenciada da DNI. (Meier-Ruge et al., 2004)

A DNI foi observada em associação com outros processos patológicos que afectam o plexo mioentérico, incluindo a doença de Hirschsprung e a hipoganglionose. (Meier-Ruge et al., 2004) Tais perturbações são mais frequentes nas crianças mais velhas. (Meier-Ruge et al., 1995)

Apresentação clínica

A DNI identifica-se em 2,9% das crianças com idades superiores a 1 ano, com obstipação crónica. (Meier-Ruge et al., 2006)

As manifestações clínicas dependem da extensão da dismotilidade intestinal e da sua gravidade. (Meier-Ruge et al., 2004)

A pseudo-obstrução intestinal crónica pode ser uma forma clínica desta entidade. Os sintomas podem decorrer da pseudo-obstrução intestinal crónica e da obstipação intestinal, com vómitos, dor, distensão abdominal e diarreia. (Skabaa et al., 2006)

A pseudo-obstrução intestinal crónica e a obstipação resultam da imaturidade do SNE, ou seja, com a maturação dos gânglios (até aos 4 anos de idade) estes sintomas podem desaparecer. (Meier-Ruge et al., 1995; Meier-Ruge et al., 2006) A actividade propulsiva do cólon está reduzida ou ausente nos primeiros meses de vida e, por isso, a obstrução intestinal é tardia. (Meier-Ruge et al., 1995)

A maioria dos sintomas graves está relacionada com a imaturidade das células ganglionares e com os gânglios heterotópicos e gigantes no plexo mioentérico. As anormalidades mais graves são as que se encontram nos segmentos mais distais. (Nogueira et al., 2001)

Na forma disseminada da DNI B, há um quadro de obstrução intestinal do intestino delgado. (Skabaa et al., 2006)

A DNI presente após a correcção cirúrgica da doença de Hirschsprung pode ser a causa de obstipação crónica e/ou obstrução intestinal. (Gillick et al., 2001)

2.3) HIPOGANGLIONOSE

Definição e epidemiologia

A hipoganglionose tem sido classificada como um distúrbio da inervação intestinal do "tipo hipogénico", (Schärli, 1995), isto é, pela diminuição numérica das células ganglionares.

É uma entidade rara, que representa apenas 5% das malformações neuronais intestinais. (Dingemann & Puri, 2010)

Formas

Pode apresentar-se na forma isolada ou na forma associada à DH (proximal a um segmento de aganglionose, como a zona de transição). (Kobayashi et al., 2002; Zhang et al., 2008). Em doentes com DH de segmento curto, pode estar associado a um segmento longo de hipoganglionose. (Zhang et al., 2008)

Na forma isolada, o número de gânglios é normal no plexo submucoso, enquanto que no plexo mioentérico se observa-se uma redução numérica. (Kobayashi et al., 2002)

Na forma associada à DH verifica-se um decréscimo absoluto do número de gânglios nos plexos mioentérico e submucoso, entre o segmento aganglionar e o segmento normal. (Kobayashi et al., 2002)

Taguchi e colaboradores (2006) expuseram a possível divisão da hipoganglionose em 2 tipos distintos: a congénita e a adquirida, cujas descrições histológicas e clínicas são divergentes. Na congénita: o número e o tamanho dos gânglios são muito reduzidos; ainda que o tamanho do núcleo nos neurónios aumente, o seu número não se altera; decorre no período neonatal, com manifestação de obstrução intestinal, e por isso, realizam ileostomia. (Taguchi et al., 2006; Zhang et al., 2008)

Diagnóstico histológico

A hipoganglionose caracteriza-se pela ausência ou baixa actividade da acetilcolinesterase na lâmina própria por uma redução significativa do número de gânglios nos plexos mioentérico e submucoso, com hipertrofia da *muscularis mucosae* e da camada muscular circular. (Imagem histológica nº 5) (Kobayashi et al., 2002; Rolle et al., 2007; Zhang et al., 2008; Dingemann & Puri, 2010) O achado histológico patognomónico desta entidade é o défice de gânglios nos plexos nervosos. (Kobayashi et al., 2002) O número de células nervosas por cada centrímetro longitudinal de intestino diminui (na área dos plexos) e a distância interganglionar (isto é, a distância entre os gânglios) duplica. (Kobayashi et al., 2002; Dingemann & Puri, 2010) O número de células nervosas perdidas é superior a 40% do normal (Imagem histológica nº 6), e a área média dos gânglios é três vezes menor do que o normal. (Zhang et al., 2008) O tamanho dos gânglios tende a aumentar com o tempo, mas o seu número não aumenta. (Taguchi et al., 2006)

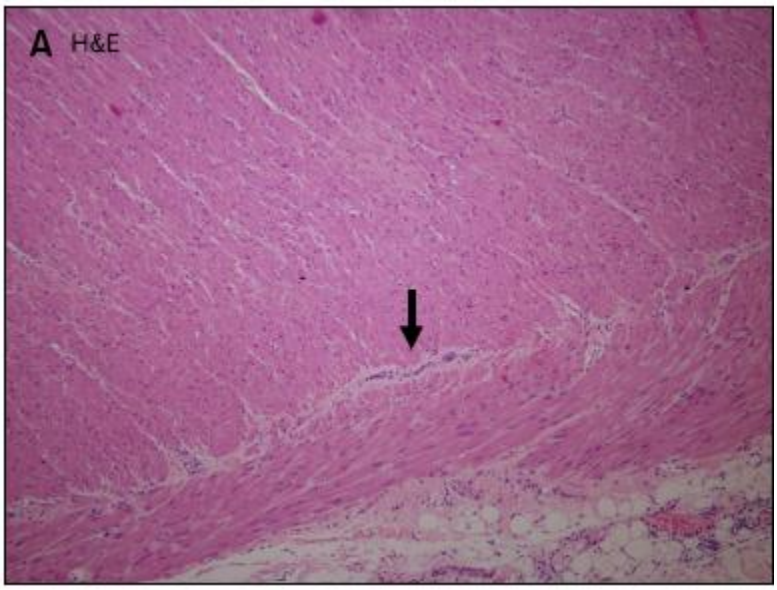


Imagem histológica nº 5. Achados patológicos da hipoganglionose. Redução marcada do número de células ganglionares mioentéricas maturas e imaturas e diminuição do tamanho dos gânglios mioentéricos (seta) do segmento afectado. (H&E, 100x) (Lee et al., 2010)

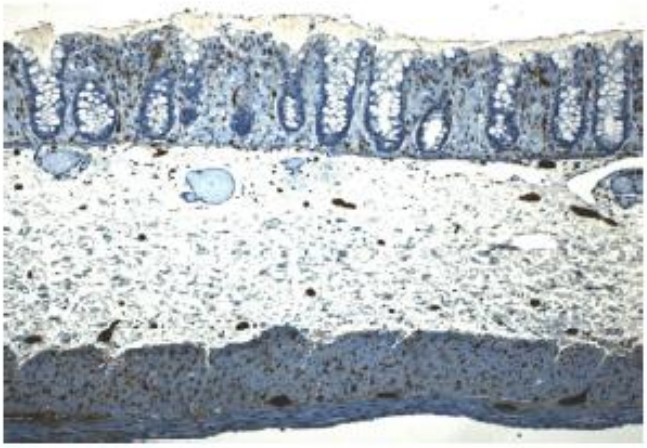


Imagem histológica nº 6. Na hipoganglionose evidencia-se uma perda numérica de células ganglionares na parede intestinal superiores a 60% do normal (reacção da AChE com H&E; 16x) (Feichter et al., 2009)

As alterações na densidade neuronal são fáceis de reconhecer (pela coloração NADPH-diaforase - Imagem histológica nº 7) porém, as mudanças numéricas são difíceis de estabelecer com os convencionais estudos histopatológicos, porque a densidade e o tamanho dos gânglios entéricos não são uniformes, são influenciados pela distensão dos tecidos e pelas alterações da idade, e não podem ser estimados com precisão a partir da coloração H&E. O número de núcleos varia de uma área para outra devido, em parte, à distribuição irregular dos gânglios e ao facto, do espaço interganglionar ser menor do que a espessura da maioria das biópsias. (Kapur, 2001)

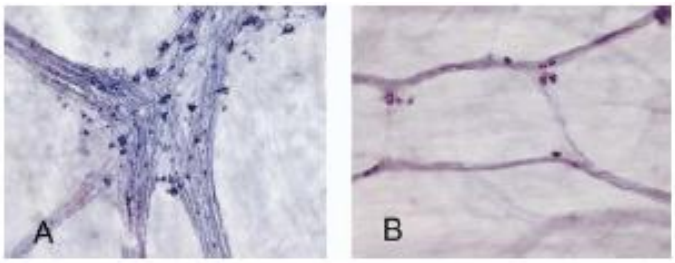


Imagem histológica nº 7. Coloração histoquímica pela NADPH-diaforase. A) Plexo mioentérico normal. B) Hipoganglionose no plexo mioentérico evidenciando redução marcada no número de células ganglionares. (125x) (Puri & Rolle, 2004)

Normalmente o seu diagnóstico é tardio, o que reflecte não só as dificuldades no diagnóstico através da biópsia, mas também a sua raridade. (Dingemann & Puri, 2010)

As diferentes características dos neurónios, tais como, o seu número real, a sua distribuição nos plexos e o grau de maturação, são importantes no seu diagnóstico,

(Kobayashi et al., 2002) permanecendo uma entidade clínica discutível, devido à falta de critérios diagnósticos definitivos. (Do et al., 2011)

A dificuldade nos estudos experimentais sobre esta patologia assenta na falta de dados descritivos, sobre a localização e a extensão precisa do envolvimento do cólon. Geralmente, localiza-se no recto e no cólon transverso ou descendente, sendo o segmento anormal pequeno. Por isso, é vital conhecer o local preciso da hipoganglionose para evitar erros de diagnóstico. Quando o segmento é curto, deve-se fazer biópsia da zona de transição. (Kobayashi et al., 2002)

Manifestações Clínicas

Clinicamente é semelhante à doença de Hirschsprung, pois manifesta-se por obstipação ou sub-oclusão intestinal. Metade dos doentes apresentam obstipação crónica.

O atraso na eliminação de mecónio pode ser o primeiro sintoma no período neonatal, enquanto os lactentes e as crianças mais velhas apresentam obstipação crónica. (Rolle et al., 2002)

A forma isolada manifesta obstipação grave ou, até, pseudo-obstrução intestinal crónica.

Kobayashi e colaboradores (2002) categorizaram-na em **moderada** ou **grave**, de acordo com a gravidade dos sintomas da hipoganglionose isolada.

A condição **moderada** (ou tipo A): envolve uma área de cólon pequena, na criança mais velha; tem bom prognóstico, mesmo após tratamento conservador ou ressecção cirúrgica. A condição **grave** (ou tipo B): está presente desde o nascimento, afecta o intestino delgado e apresenta pior prognóstico, mesmo após correcção cirúrgica. (Kobayashi et al., 2002; Zhang et al., 2008)

As complicações descritas foram obstipação crónica grave, íleo paralítico e enterocolite, a complicação mais séria. (Dingemann & Puri, 2010)

2.4) HIPERGANGLIONOSE ou GANGLIONEUROMATOSE INTESTINAL

Definição

A hiperganglionose ou ganglioneuromatose intestinal é uma forma extremamente rara, mas grave, das disganglionoses intestinais. Esta proliferação neuronal é típica das ganglioneuromatoses difusas, que estão associadas ao síndrome NEM 2B (neoplasias endócrinas múltiplas do tipo 2B), uma doença hereditária ligada a tumores neuroendócrinos. (Wallace et al., 2009; Montedonico et al., 2011)

Etiologia

A inibição da apoptose nos precursores neuronais resulta num número acrescido de neurónios precursores do SNE ao longo da migração intestinal, e consequentemente num excesso de células nervosas. (Wallace et al., 2009) Isto está de acordo com a opinião de Barlow et al. (2008) de que o controlo do número crítico de células precursoras SNE durante a migração das células da crista neural é necessário para a formação completa e normal do SNE. Se esse número não é atingido, só a parte superior do intestino primitivo é colonizada. (Barlow et al., 2008)

Assim, a hiperganglionose pode resultar: a) da inibição da apoptose, que ocorre no SNE após o nascimento; b) do excesso de proliferação das células precursoras do SNE; c) pela compensação das células nervosas do SNE a uma alteração funcional do tubo digestivo. Wallace et al. (2009) comprovaram experimentalmente a primeira hipótese.

As mutações do gene RET são responsáveis por mais de 97% dos casos de NEM 2B. (Montedonico et al., 2011) Se a mutação deste gene é confirmada, como a ganglioneuromatose pode fazer parte do NEM 2B, deve-se incitar a avaliação endocrinológica e oncológica. (Feichter et al, 2009)

Diagnóstico histológico

O diagnóstico baseia-se no exame histológico onde a proliferação maciça do tecido neural é visível. (Montedonico et al., 2011)

Caracteriza-se pela presença de gânglios gigantes (2 a 3 vezes superiores ao normal, com a frequência de 15 a 40 células nervosas num único gânglio), pela hiperplasia do plexo submucoso, pela hipertrofia dos plexos submucoso e mioentérico, assim como pelo aumento moderado da coloração da AChE na lâmina própria da mucosa. (Imagem histologica nº 8)(Athow et al., 1991; Feichter et al., 2009; Wallace et al., 2009)

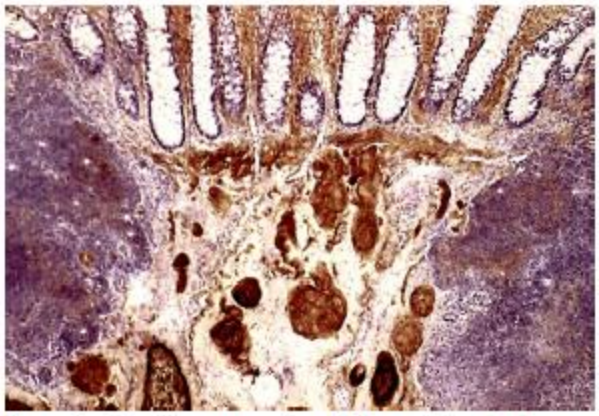


Imagem histológica nº 8. Ganglioneuromatose com hiperplasia do plexo submucoso e gânglios gigantes. (coloração AChE, 74x) (Feichter et al., 2009)

Manifestações clínicas

As crianças afectadas com esta doença apresentam sintomas de obstrução intestinal (distensão abdominal) e/ou obstipação crónica. A obstipação pode alternar com períodos de diarreia. (Feichter et al., 2009; Wallace et al., 2009)

2.5) IMATURIDADE NEURONAL

É a entidade menos frequente das disganglionses intestinais. Descreve-se pela presença aumentada de neurónios imaturos durante o primeiro ano de vida. (Markiewicz-Kijewska et al., 2009)

Diagnóstico histológico

O seu diagnóstico é estabelecido desde o primeiro dia de vida até aos 12 meses dias de idade, com base na avaliação histopatológica das biópsias. Os neurónios imaturos são menores, têm núcleos menores e mais escuros, (têm uma faixa estreita de citoplasma basófilo), com menos nucléolos e citoplasma vacuolizado, excêntrico, em forma de pêra. Os neurónios podem ser tão pequenos que chegam a ser confundidos com linfócitos. (Kapur, 1999; Markiewicz-Kijewska et al., 2009; Rabah, 2010)

Caracteriza-se pelo número normal a ligeiramente aumentado de neurónios imaturos. O tamanho do núcleo está diminuído. Cronologicamente, esta entidade melhora progressivamente antes de o lactente chegar ao primeiro ano de idade, devido ao aumento no tamanho do núcleo dos neurónios, que corresponde ao fenómeno de maturação. (Taguchi et al., 2006) A maturação das células nervosas persiste até ao quarto ano de vida.

As colorações histoquímicas que permitem observar os neurónios maturos são a SDH e a LDH. (Imagem histológica nº 9) É mandatório realizar nova biópsia após 12 a 18 meses das biópsias iniciais de controlo, com identificação da maturação do citoplasma (através do aumento da actividade da LDH e da SDH). (Feichter et al., 2009)

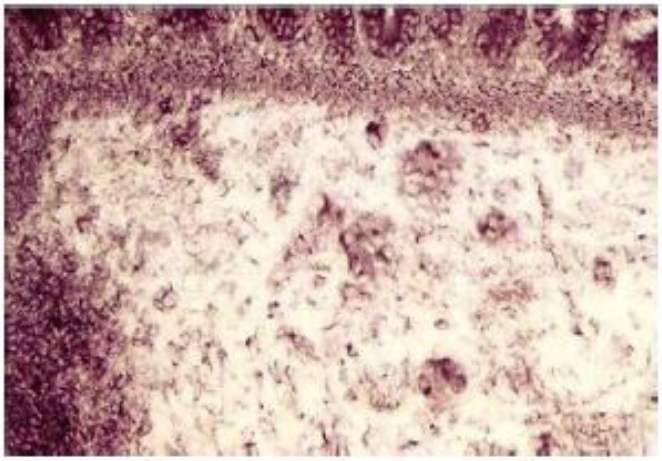


Imagem histológica nº 9. Imaturidade neuronal no plexo submucoso, no primeiro mês de idade de um recém-nascido. Coloração LDH moderadamente positiva nas células nervosas deste plexo. (180x) (Feichter et al., 2009)

O estudo histoquímico pela coloração com AChE evidencia neurónios e gânglios pequenos.

A coloração com NADPH-diaforase e a imunohistoquímica pela NCAM conseguem diferenciar claramente os neurónios pequenos das células gliais (células de suporte), que são do mesmo tamanho. (Puri, 1997; Puri & Rolle, 2004; Markiewicz-Kijewska et al., 2009)

Manifestações clínicas

A maturação tardia dos plexos submucoso e mioentérico é a causa mais comum de obstipação intestinal durante o primeiro ano de vida. Este achado clínico normaliza com a maturação do sistema nervoso entérico. (Feichter et al., 2009)

A imaturidade neuronal grave do plexo submucoso conduz a alterações graves na motilidade intestinal. (Holschneider et al., 1994)

2.6) PÓS - OPERATÓRIO

Relativamente às complicações pós-operatórias neste grupo de doenças, existem duas entidades clínicas predominantes, a enterocolite e a obstrução intestinal.

Apesar de várias pesquisas na literatura científica, a etiologia da enterocolite permanece desconhecida. A dilatação física do intestino proximal, as variações nos componentes e na produção da mucina, as alterações na imunidade da mucosa e a motilidade descoordenada são as principais teorias da sua génese. (Rouzrokh et al., 2010) Recentemente, Estevão-Costa et al., (2006) apontaram que a ocorrência da enterocolite pós-operatória pode estar correlacionada com a presença de segmentos residuais de displasia neuronal intestinal.

A obstrução intestinal poderá surgir da permanência de segmentos aganglionares ou zonas de transição residuais, tal como pode acontecer na Doença de Hirschsprung, que apresenta segmentos residuais com displasia neuronal intestinal. (Lawal et al., 2011)

2.7) RESUMO CLÍNICO

Tabela 4: Quadro resumo das descrições clínicas nas várias entidades das disganglionoses intestinais, nos períodos neonatal , lactente e criança.

Disganglionoses intestinais		Período neonatal	Período pós-neonatal
Doença de Hirschsprung (clássica)		Atraso na eliminação de mecónio /Obstrução intestinal	Obstipação crónica
a)	**TCA**	Obstrução intestinal	
b)	**TIA**	Obstrução intestinal	
Displasia Neuronal Intestinal		Obstipação	Obstipação crónica/ Pseudo-obstrução intestinal crónica
a)	**DNI tipo A**	Diarreia, fezes sanguinolentas, obstrução intestinal	
b)	**DNI tipo B**		Obstipação, megacólon, mimetiza DH
Hipoganglionose		Atraso na eliminação de mecónio	Obstipação crónica
Hiperganglionose		Obstrução e/ou obstipação intestinal	
Imaturidade neuronal		Obstipação intestinal	

NOTA: Na Displasia neuronal intestinal e na Imaturidade neuronal os sintomas enumerados podem regredir aquando da maturação do SNE.

III. CONCLUSÕES E FUTURAS PERSPECTIVAS

Como referido anteriormente, as neuropatias congénitas intestinais representam uma importante fonte de morbilidade e mortalidade para os recém-nascidos/crianças que delas padecem, pelo que uma melhor explicação dos seus processos fisiopatológicos em correlação com a expressão clínica, poderá traduzir-se numa melhoria substancial da sua qualidade de vida.

A avaliação histológica da biópsia rectal é muito importante no diagnóstico e no estudo morfológico do segmento do cólon e/ou intestino afectado (quando insuficiente realizam-se múltiplas biópsias transmurais), de modo que o tratamento cirúrgico seja efectivo na sua ressecção. Por conseguinte, o restante cólon/intestino inervado normalmente restaura a motilidade intestinal normal.

A identificação e o conhecimento da função dos vários genes, quer no seu papel fisiológico, quer no seu papel patológico, como possível base etiológica, melhorou a compreensão sobre esta forma particular de malformações. O comprimento do intestino sob a alteração resultante reflecte o grau em que a função do gene alterado está comprometida. Os modelos animais podem constituir ferramentas importantes para o estudo da etiopatogenia e para avaliar a eficácia de novas técnicas diagnósticas.

É necessário continuar a questionar a ontogénese do SNE e os factores que determinam a diferenciação dos vários subtipos de neurónios durante a embriogénese.

Embora as várias entidades das disganglionoses intestinais sejam histologicamente diferentes, as características clínicas são muito semelhantes. O atraso na eliminação de mecónio e a obstrução intestinal neonatal podem ser os primeiros sintomas no período neonatal, enquanto que lactentes e crianças mais velhas apresentam obstipação e crises obstrutivas intestinais.

Há ainda uma compreensão incompleta da relação causa-efeito da ausência de gânglios entéricos com o desenvolvimento de sintomas intestinais. Muitos aspectos fisiopatológicos destas doenças permanecem pouco estudados. Apesar disso, a DH e a DNI são as patologias mais bem caracterizadas a nível histológico e clínico, tal como a sua correlação (embora sob a avaliação de inúmeros estudos de investigação).

Todavia, demonstrou-se que as características patológicas não são facilmente associadas às características clínicas, o que torna difícil a classificação do doente numa destas entidades. É claro que para qualquer doente, a apresentação clínica vai determinar a sua investigação.

Porém, a combinação de estudos clínicos e histopatológicos pode facilitar a tradução da ciência básica para o contexto clínico dos doentes com neuropatias congénitas entéricas.

Assim, a génese destes distúrbios deve ser mais bem elucidada, pois permitirá: perceber o modo como os genes actuam e se correlacionam no processo de desenvolvimento do SNE; uma melhor compreensão das correlações genótipo-fenótipo, que se pode traduzir numa identificação e abordagem clínica mais correcta; identificar novos alvos genéticos com base no conhecimento dos defeitos moleculares subjacentes.

IV. REFERÊNCIAS

Amiel J, Sproat-Emison E, Garcia-Barcelo M, Lantieri F, Burzynski G, Borrego S, Pelet A, Arnold S, Miao X, Griseri P, et al. (2008) Hirschsprung disease, associated syndromes and genetics: a review. J Med Genet 45: 1–14.

Anderson RB, Newgreen DF, Young HM. (2006) Neural crest and the development of the enteric nervous system. Adv Exp Med Biol 589: 181 – 196.

Athow AC, Filipe MI, Drake DP. (1991) Hyperganglionosis mimicking Hirschsprung's disease. Archives of Disease in Childhood 66: 1300-1303.

Barlow AJ, Wallace AS, Thapar N, Burns AJ. (2008) Critical numbers of neural crest cells are required in the pathways from the neural tube to the foregut to ensure complete enteric nervous system formation. Development 135: 1681–1691.

Berger S, Heymanns M, Boor R, et al. (2000) Complex Long-Segment Intestinal Dysganglionosis. J Pediatr Surg 35: 1123-1126.

Bondurand N, Natarajan D, Barlow A, Thapar N, Pachnis V. (2006) Maintenance of mammalian enteric nervous system progenitors by SOX10 and endothelin 3 signalling. Development 133: 2075–2086.

Burns AJ, Roberts RR, Bornstein JC, Young HM. (2009) Development of the enteric nervous system and its role in intestinal motility during fetal and early postnatal stages. Seminars in Pediatric Surgery 18 (4): 196 – 205.

Burzynski G, Shepherd IT, Enomoto H. (2009) Genetic model system studies of the development of the enteric nervous system, gut motility and Hirschsprung's disease. Neurogastroenterol Motil 21: 113–127.

Costa M, Brookes SJH, Hennig GW. (2000) Anatomy and physiology of the enteric nervous system. Gut 47: iv15 – iv19.

Delalande JM, Barlow AJ, Thomas AJ, Wallace AS, Thapar N, Erickson CA, Burns AJ. (2008) The receptor tyrosine kinase RET regulates hindgut colonization by sacral neural crest cells. Dev Biol 313: 279–292.

Di Nardo G, Blandizzi C, Volta U, Colucci R, Stanghellini V, Barbara G, Del Tacca M, Tonini M, Corinaldesi R, De Giorgio R. (2008) Review article: molecular, pathological and therapeutic features of human enteric neuropathies. Aliment Pharmacol Ther 28: 25–42.

Dingemann J, Puri P. (2010) Isolated hypoganglionosis: systematic review of a rare intestinal innervation defect. Pediatr Surg Int. 26:1111-15

Do MY, Myung SJ, Park HJ, Chung JW et al. (2011) Novel classification and pathogenetic analysis of Hypoganglionosis and Adult-Onset Hirschsprung´s disease. Digestive Disease Sciences.

Enomoto H. (2009) Death comes early: apoptosis observed in ENS precursors. Neurogastroenterol Motil 21: 684–687.

Estevão-Costa J, Fragoso AC, Campos M etal. (2006) An approach to minimize postoperative enterocolitis in Hirschsprung`s disease. J Pediatr Surg 41: 1704 – 1707.

Faure C, Chalazonitis A, Rheaume C, Bouchard G, Sampathkumar SG, Yarema KJ, Gershon MD. (2007) Gangliogenesis in the enteric nervous system: roles of the polysialylation of the neural cell adhesion molecule and its regulation by bone morphogenetic protein-4. Dev Dyn 236: 44–59.

Feichter S, Meier-Ruge WA, Bruder E. (2009) Histopathology of gastrointestinal motility disorders in children. Seminars in Pediatric Surgery 18: 206 – 211.

Fu M, Sato Y, Lyons-Warren A et al. (2010) Vitamin A facilitates enteric nervous system precursor migration by reducing Pten accumulation. Development 137: 631 – 640.

Furness JB. (2000) Types of neurons in the enteric nervous system. J Auton Nerv Syst 81: 87–96.

Furness, JB. (2008) The enteric nervous system: normal functions and enteric neuropathies. Neurogastroenterol Motil 20 (Suppl 1): 32–38.

Ganong WF Fisiologia médica - Lange. (2006) 22ªedição. Capítulo 26, págs 429-431, 453. Rio de Janeiro: McGraw-Hill.

Ganström AL, Orrego A, Svensson PJ et al. (2011) Nerve growth factor receptor immunohistochemistry has a limited additional value to diagnose Hirschsprung`s disease. Pediatr Surg Int 27: 431 – 435.

Gariepy CE. (2001) Intestinal Motility disorders and development of the Enteric Nervous System. Pediatric Research 49 (5): 605 – 613.

Gershon MD, Ratcliffe EM. (2004) Developmental biology of the enteric nervous system:Pathogenesis of Hirschsprung's disease and other congenital dysmotilities. Semin Pediatr Surg 13(4): 224–235.

Gershon MD. (2010) Developmental determinants of the independence and complexity of the enteric nervous system. Trends in Neurosciences 33 (10): 446 – 456.

Gillick J, Tazawa H, Puri P. (2001) Intestinal Neuronal Dysplasia: results of treatment in 33 patients. J Pediatr Surg 36 (5):777-79.

Goyal RK, Hirano I. (1996) The enteric nervous system. New England Journal of Medicine 334: 1106–1115.

Guinard–Samuel V, Bonnard A, De Lagausie P, et al. (2009) Calretinin immunohistochemistry: a simple and efficient tool to diagnose Hirschsprung disease. Mod Pathol 22(10): 1379 – 1384.

Guyton AC & Hall JE. (2006) Textbook of medical physiology. 11nd edition. Chapters 62, 63, pages 774 – 777, 786 - 788. Elsevier Saunders.

Heanue TA, Pachnis V. (2007) Enteric nervous system development and Hirschsprung's disease: advances in genetic and stem cell studies. Nature Reviews Neuroscience 8:466-479.

Hendershot TJ, Liu H, Sarkar AA, Giovannucci DR, Clouthier DE, Abe M, Howard MJ. (2007) Expression of Hand2 is sufficient for neurogenesis and cell type-specific gene expression in the enteric nervous system. Dev Dyn 236: 93–105.

Holschneider AM, Meier-Ruge WA, Ure BM. (1994) Hirschsprung`s disease and Allied disorders - a review. Eur J Pediatr Surg 4: 260- 266.

Kapur RP. (1999) Hirschsprung disease and other enteric dysganglionnosis. Crit Ver Clin Lab Sci 36: 225 – 273.

Kapur RP. (2001) Neuropathology of paediatric chronic intestinal pseudo-obstruction and related animal models. Journal of Pathol; 194: 277–288

Kapur RP. (2003) Neuronal Dysplasia: a controversial pathological correlate of intestinal pseudo-obstruction. American Journal of Medical Genetics 122A: 287-293.

Kato Y, Miyahara K, Hatano M, Hasegawa Y et al. (2009) Immature enteric neurons in Ncx/Hox11L.1 deficient intestinal neuronal dysplasia model mice. Pediatr Surg Int 25: 961-965.

Kenny SE, Tam PKH, Garcia-Barcelo M, Phil M. (2010) Hirschsprung`s disease. Seminars in Pediatric Surgery 19: 194 – 200.

Kim HK, Cheong H, Kang H, Bae JY et al. (2010) Histopathological evaluation of Pediatric Intestinal Pesudo-Obstruction: Quantitative morphometric analysis of pathological changes in the enteric nervous system. The Korean Journal of Pathology 44: 162 – 172.

Knowles CH, De Giorgio R, Kapur RP, Bruder E, et al. (2009) Gastrointestinal neuromuscular pathology: guidelines for histological techniques and reporting on behalf of the Gastro 2009 International Working Group. Acta Neuropathol 118: 271 – 301.

Kobayashi H, Hirakawa H, Puri P. (1996) Abnormal internal anal sphincter innervation in patients with Hirschsprung's disease and allied disorders. J Pediatr Surg 31:794-799.

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

Kubota A, Yamauchi K, Yonekura T, Kosumi T, Oyanagi H, Mushiake S, Nakayama M, Imura K, Okada A. (2001) Clinicopathologic relationship of hypoganglionosis. J Pediatr Surg 36:898–900

Landman KA, Simpson MJ, Newgreen DF. (2007) Mathematical and experimental insights into the development of the enteric nervous system and Hirschsprung's disease. Dev Growth Differ 49: 277–286.

Laranjeira C, Pachnis V. (2009) Enteric nervous system development: recent progress and future challenges. Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical 151: 61-69.

Lawal TA, Chatoorgoon K, Collins MH et al. (2011) Redo pull-through in Hirschsprung`s disease for obstructive symptoms due to residual aganglionosis and transition zone bowel. Journal of Pediatric Surgery 46: 342 – 347.

Lee BH, Kim N, Kang SB, Lee KH et al. (2010) Two cases of chronic idiopathic intestinal pseudo-obstruction with different clinical features. J Neurogastroenterol Motil 16: 83 – 89.

Lomax AE, Sharkey KA, Furness JB. (2010) The participation of the sympathetic innervation of the gastrointestinal tract in disease states. Neurogastroenterol Motil 22: 7 – 18.

Markiewicz-Kijewska M, Kowalski A, Bacewicz L, Drewniak T et al. (2009) Immaturity of ganglion cells – a study of our own material. Przeglad Chirurciczny 81 (2): 95-102.

Martucciello G, Favre A, Torre M, Prato AP, Jasonni V. (2001) A new rapid acetylcholinesterase histochemical method for the intraoperative diagnosis of Hirschsprung`s disease and Intestinal Neuronal Dysplasia. Eur J Pediatr Surg 11: 300 – 304.

Meier-Ruge W, Bruder E, Kapur RP. (2006) Intestinal Neuronal Dysplasia Type B: one giant ganglion is not good enough. Pediatric and Developmental Pathology 9:444-52.

Meier-Ruge WA, Ammann K, Bruder E, Holschneider AM, Schärli AF, et al. (2004) Updated results on intestinal neuronal dysplasia (IND B). Eur J Pediatric Surg 14:384-391.
Meier-Ruge WA, Brönnimann PB, Gambazzi F, et al. (1995) Histopathological criteria for intestinal neuronal dysplasia of the submucosal plexus (type B). Virchows Arch 426: 549 – 556.

Montedonico S, Acevedo S, Fadda B. (2002) Clinical aspects of intestinal neuronal dysplasia. J Pediatr Surg 37:1772-1774.
Montedonico S, Cáceres P, Muñoz N et al. (2011) Histochemical staining for intestinal dysganglionosis: over 30 years experience with more than 1500 biopsies. Pediatr Surg Int 27: 479 – 486.

Moore SW, Johnson G. (2005) Acetylcolinesterase in Hirschsprung`s disease. Pediatr Surg Int 21: 255 – 263.

Moore SW, Zaahl M. (2009) Clinical and genetic differences in total colonic aganglionosis in Hirschsprung`s disease. Journal of Pediatric Surgery 44: 1899- 1903.

Moore SW. (2009) Total colonic aganglionosis and Hirschsprung's disease: shades of the same or different? Pediatr Surg Int 25:659–666.
Newgreen D, Young HM. (2002) Enteric Nervous System: Development and Developmental Disturbances – part 1. Pediatric and Developmental Pathology 5: 224 - 247.

Nogueira A, Campos M, Soares-Oliveira M, Estevão-Costa et al. (2001) Histochemical and immunohistochemical study of the intrinsic innervations in colonic dysganglionosis. Pediatr Surg Int 17: 144 – 151.

O´Donnell AM, Puri P. (2009) Hypoganglionic colorectum in the chick embryo: a model of human hypoganglionosis. Pediatr Surg Int 25:885-888.

O`Donnell AM, Puri P. (2010) Skip segment Hirschsprung`s disease: a systematic review. Pediatr Surg Int 26: 1065 – 1069.

O´Donnell AM, Puri P. (2011) A role for Pten in paediatric intestinal dysmotility disorders. Pediatr Surg Int 27: 491 – 493.

Paran TS, Rolle U, Puri P. (2006) Enteric nervous system and developmental abnormalities in childhood. Pediatr Surg Int 22: 945 – 959.

Phillips RJ, Powley TL. (2007) Innervation of the gastrointestinal tract: patterns of aging. Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical 136: 1-19.

Porth CM, Matfin G. (2009) Pathophysiology – concepts of altered health states. 8th edition. chapter 36, pages 897 – 903; Lipincott Williams & Wilkins.

Puri P. (1997) Variant Hirscgsprung´s disease. J Pediatr Surg 32: 149-157.

Puri P. (2003) Intestinal Neuronal Dysplasia. Seminars in Pediatric Surgery 12(4):259-264.

Puri P, Rolle U. (2004) Variant Hirschsprung`s disease. Seminars in Pediatric Surgery 13: 293- 299.

Rabah R. (2010) Total colonic aganglionosis: case report, practical diagnostic approach and pitfalls. Arch Pathol Lab Med 134: 1467 – 1473.

Rajalakshmi T, Makhija P, Babu MK and Kini U. (2003) Intestinal Neuronal Dysplasia type A. Indian J Pediatr 70 (10): 839-41.

Rolle U, Yoneda A, Solari V, Nemeth L, Puri P. (2002) Abnormalities of C-Kit-positive cellular network in isolated hypoganglionosis. J Pediatr Surg 37(5):709–714

Rolle U, Piaseczna-Piotrowska A, Puri P. (2007) Intersticial cells of Cajal in the normal gut and in intestinal motility disorders of childhood. Pediatr Surg Int 23: 1139 – 1152.

Rouzrokh M, Khaleghnejad AT, Mohejerzadeh L et al. (2010) What is the most common complication after one-stage transanal pull-through in infants with Hirschsprung`s disease. Pediatr Surg Int 26: 967 – 970.

Ruttenstock E, Puri P. (2009) A meta-analysis of clinical outcome in patients with total intestinal aganglionosis. Pediatr Surg Int 25: 833 – 839.

Sadler TW, Leland J, Sadler S. (2010) Embriologia Médica - Langman. 11ª edição, capítulo 5, página 150 . Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Sato Y, Heuckeroth RO. (2008) Retinoic acid regulates murine enteric nervous system precursor proliferation, enhances neuronal precursor differentiation, and reduces neurite growth in vitro. Dev Biol 320: 185–198.

Schäfer KH, Ginneken CV, Copray S. (2009) Plasticity and neural stem cells in the enteric nervous system. The Anatomical Record 292: 1940 – 1952.

Schärli AF. (1995) Standardization of terminology of intestinal innervation disorders. Pediatr Surg Int 10: 440.

Skabaa R, Frantlova M and Horak J. (2006) Intestinal Neuronal Dysplasia. Eur J Gastroenterol Hepatol 18:699–701.

Taguchi T, Masumoto K, Ieiri S, Nakatsuji T, Akiyoshi J. (2006) New classification of hypoganglionosis: congenital and acquired hypoganglionosis. Journal of Pediatric Surgery, 41:2046-51.

Taraviras S, Marcos-Gutierrez CV, Durbec P, Jani H, Grigoriou M, Sukumaran M, Wang LC, Hynes M, Raisman G, Pachnis V. (1999) Signalling by the RET receptor tyrosine kinase and its role in the development of the mammalian enteric nervous system. Development 126: 2785–2797.

Wallace AS, Barlow AJ, Navaratane L et al. (2009) Inhibition of cell death results in hyperganglionosis: implications for enteric nervous system development. Neurogastroenterol Motil 21:768-77.

Wang H, Hughes I, Planner W, Parsadanian A et al. (2010) The timing and location of glial cell line-derived neurotrophic factor expression determine enteric nervous system structure and function. The Journal of Neuroscience 30 (4): 1523 – 1538.

Wester T, O'Briain S, Puri P. (1998) Morphometric aspects of the submucous plexus in whole-mount preparations of normal human distal colon. J Pediatr Surg 33:619-622.

Wester T, O'Briain DS, Puri P. (1999) Notable postnatal alterations in the myenteric plexus of normal human bowel. Gut 44:666-674.

Widmaier EP, Raff H, Strang KT. (2006) Vander, Sherman & Luciano - Fisiologia Humana – os mecanismos das funções corporais. 9ªedição. Cap. 15, págs 554, 569, 570. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Wood JD. (2008) Enteric nervous system: reflexes, pattern generators and motility. Cuurent Opinion in Gastroenterology 24: 149 – 158.

Yamataka A, Hatano M, Kobayashi H et al. (2001) Intestinal neuronal dysplasia-like pathology in Ncx/Hox11L.1 gene-deficient mice. J Pediatr Surg 36:1293–1296.

Young B, Lowe JS, Stevens A, Heath JW. (2006) Wheater`s functional histology: a text and colour atlas. 5th edition. Chapter 14, pages 264-268; Elsevier.

Zhang HY, Feng JX, Huang L, Wang G, Wei MF, Weng YZ. (2008) Diagnosis and surgical treatment of isolated hypoganglionosis. World J Pediatr 4(4):295-300.

Ziad F, Katchy KC, Ramadan SA, Alexander S, Kumar S. (2006) Clinicopathological features in 102 cases of Hirschsprung disease. Ann Saudi Med 26(3): 200-204.

ANEXO

APARELHO DIGESTIVO

a) Estrutura geral

O sistema digestivo é uma estrutura tubular cilíndrica com uma organização básica constante desde o terço superior do esófago até ao recto. No final, localiza-se o esfíncter anal interno, um espessamento especializado da subcamada muscular circular do recto. A disposição dos componentes musculares permanece constante ao longo do tubo, enquanto a mucosa expõe variações morfológicas acentuadas nas diferentes porções. O sistema digestivo é composto por quatro camadas funcionais distintas: a mucosa, a submucosa, a muscular e a serosa. (Figura 1)

A **mucosa** é formada por três componentes: o epitélio de revestimento, a *lâmina própria*, formada por tecido conjuntivo laxo, e a *muscularis mucosae*, composta por tecido muscular liso (um interno, com disposição circular e outro externo, com disposição longitudinal).

A **submucosa** sustenta a mucosa e consiste em tecido conjuntivo denso, no GALT (gut-associated lymphoid tissue) – tecido linfóide associado ao tubo digestivo, e no plexo de Meissner (submucoso), associado a vasos sanguíneos e linfáticos. O plexo de Meissner inerva o epitélio glandular, as células endócrinas intestinais e os vasos sanguíneos submucosos e, por isso, é importante no controlo da secreção glandular gastrointestinal, na alteração da quantidade de água e de electrólitos transportados, na regulação do fluxo sanguíneo local e na actividade da *muscularis mucosae*. Apresenta-se subdividido em dois subplexos – o verdadeiro plexo de Meissner, localizado perto da mucosa e o plexo de Schabadasch, perto da subcamada muscular lisa circular. (Figura 1)

A **camada muscular externa** (*muscularis externa ou muscularis propria*) é constituída por músculo liso. Está subdividida numa camada interna com fibras musculares dispostas circularmente e numa camada externa longitudinal. Entre as duas camadas musculares localiza-se o plexo de Auerbach (mioentérico). No entanto, as duas camadas possuem diferentes funções: a circular, ao contrair, promove a mistura do

alimento ou das fezes; a longitudinal impulsiona esse conteúdo, para que progrida ao longo do tubo digestivo. O plexo de Auerbach inerva as camadas musculares longitudinal e circular e, assim, controla a actividade da túnica muscular. (Figura 1)

A **serosa** ou peritoneu visceral é constituída por tecido conjuntivo laxo e revestida por epitélio simples pavimentoso (mesotélio). (Young et al., 2006; Porth & Matfin, 2009)

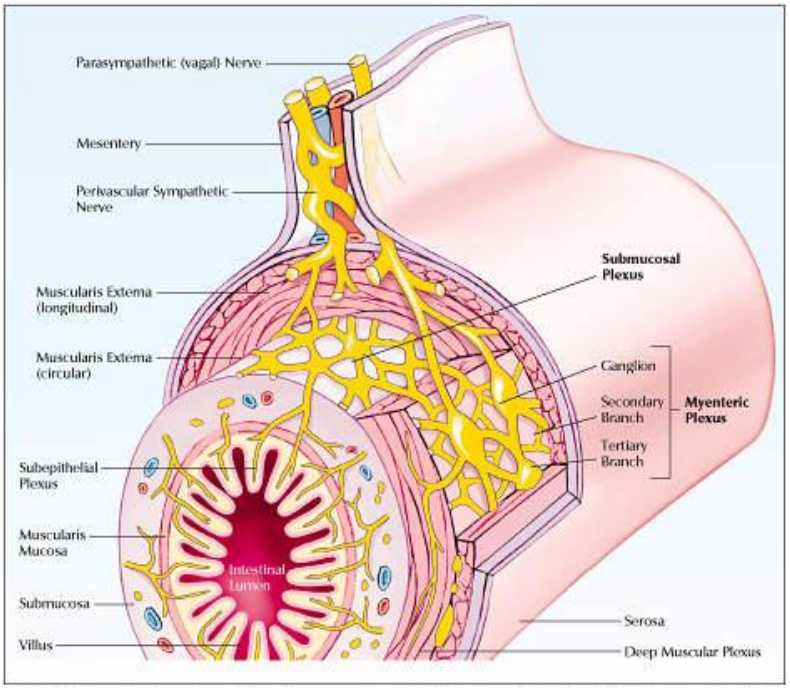


Figura 1. Representação ilustrativa das camadas da parede do tubo digestivo: mucosa, submucosa, muscular e serosa. Também são perceptíveis os plexos mioentérico e submucoso. Adaptado de Gershon and Erde (1981)

b) Função

O tubo digestivo está organizado de modo a optimizar a digestão dos alimentos e a absorção dos seus nutrientes, com consequente propulsão dos alimentos não digeridos pelo cólon, através da motricidade da parede intestinal. (Porth & Matfin, 2009)

c) Controlo da função

A regulação da motilidade intestinal é possível graças ao resultado da conjugação do sistema nervoso entérico (SNE), do sistema nervoso autónomo (SNA) e da actividade pacemaker das células intersticiais de Cajal (CIC).

- Células Intersticiais de Cajal

As CIC são células do tecido conjuntivo, com características semelhantes às do músculo liso, localizadas nas zonas conjuntivas intersticiais. Encontram – se desde o esófago até ao recto, entre as subcamadas musculares circular e longitudinal. Executam a função de "pacemaker", pois geram oscilações eléctricas excitatórias, rítmicas e espontâneas no potencial de membrana do músculo liso (denominadas ondas lentas) que, caso o seu limiar seja atingido, accionam potenciais de acção que aumentam as contracções musculares.

A amplitude e a frequência das ondas lentas podem ser moduladas pelo SNE e pelo sistema parassimpático e simpático do SNA. Normalmente, o sistema simpático decresce ou anula a amplitude das ondas, enquanto o sistema parassimpático as aumenta.

- Sistema Nervoso Entérico

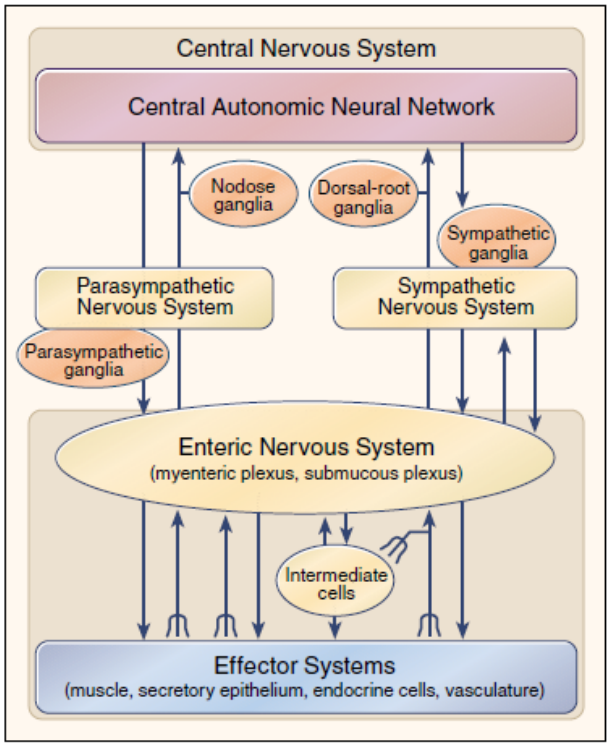
O sistema nervoso entérico é a parte mais complexa do Sistema Nervoso Periférico, composto por neurónios sustentados pelas células gliais, organiza-se em gânglios interligados (Laranjeira et al., 2009).

O componente intramural ou entérico da inervação intestinal é constituído pelos grupos de neurónios que formam o plexo nervoso mioentérico (Auerbach) e o plexo nervoso submucoso (Meissner). (Young et al., 2006) Este sistema contém cerca de 100 milhões de neurónios sensitivos (aferentes primários intrínsecos), interneurónios (ascendentes e descendentes) e neurónios motores (excitatórios e inibitórios) (Furness, 2000) – tanto quanto o número encontrado em toda a medula espinhal – sendo provavelmente mais adequado considerar o sistema como uma parte deslocada do sistema nervoso central (SNC), envolvida na regulação da função gastrointestinal. Também é o modulador da imunidade intestinal, graças às concentrações linfáticas na parede intestinal, que regulam a reacção inflamatória e a secreção de imunoglobulinas. (Ganong, 2006)

O sistema nervoso entérico está conectado ao SNC pelas fibras parassimpáticas e simpáticas. Possui a capacidade de receber vários estímulos, processá-los e produzir os efeitos adequados à função digestiva, de forma independente do sistema nervoso central.

Uma particularidade que contribui para a complexidade do SNE é a ausência de núcleos bem reconhecidos, ou seja, nomeadamente neurónios que partilhem características morfológicas e funcionais. Cada gânglio contém os corpos celulares de neurónios, localizados fora do SNC e associados a nervos, e encontram-se subtipos de neurónios diferentes. Mas qualquer subtipo de neurónio pode ser encontrado na maioria dos gânglios ao longo do intestino. (Furness, 2000)

Os plexos nervosos contêm alguns neurónios sensitivos que recebem informações de terminações nervosas próximas da camada epitelial e na camada do músculo liso em relação à composição do conteúdo intestinal (quimiorreceptores) e ao grau de expansão da parede intestinal (mecanorreceptores), respectivamente. As outras células nervosas são efectoras (motoras) e inervam as camadas musculares e as células secretoras de hormonas. (Esquema 1) Os interneurónios formam uma rede de comunicação e de integração da informação entre os neurónios sensitivos e os neurónios motores. A inervação intrínseca formada por estes plexos é responsável pelas contracções intestinais que ocorrem na ausência total de inervação extrínseca (SNA). (Costa et al., 2000; Furness, 2000)



Esquema 1. Inervação no tubo digestivo. O símbolo  representa o final da via aferente e as setas mostram a direcção da transmissão neural. Adaptado de Goyal & Hirano (1996).

Para além disso, existem os neurónios nitrérgicos (isto é, libertam óxido nítrico-NO), constituem cerca de 40% dos neurónios presentes no plexo mioentérico. Como não libertam neurotransmissores clássicos, como noradrenalina ou acetilcolina, são designados por neurónios NANC (NonAdrenergic NonCholinergic).

Os neurotransmissores envolvidos neste sistema incluem a acetilcolina, as aminas norepinefrina e somatostatina, o aminoácido GABA (ácido gama aminobutírico), a purina ATP (adenosina trifosfato), os gases NO (óxido nítrico) e CO_2 (dióxido de carbono), bem como outros peptídios e polipeptídios (endotelina-2, neuropeptídeo Y, substância P, VIP - Peptídeo Intestinal Vasoactivo). O óxido nítrico (NO) é um importante neurotransmissor que medeia o relaxamento do músculo liso no tubo digestivo. (Ganong, 2006)

Os neurónios motores são tanto excitatórios ou inibitórios. Os neurónios motores excitatórios utilizam a acetilcolina e a substância P como neurotransmissores principais, enquanto os neurónios motores inibitórios contêm o VIP e o NO. Os neurónios aferentes primários são colinérgicos, portanto, utilizam a acetilcolina como

neurotransmissor, e podem conter subgrupos de substância P. A descrição dos vários grupos de interneurónios baseia-se no neurotransmissor principal. (Furness, 2000)

- **Reflexo esfíncter anal interno**

É mediado pelo SNE local na parede do recto. Quando as fezes chegam ao recto, provocam a sua distensão e desencadeiam sinais aferentes pelo plexo mioentérico para iniciar ondas peristálticas no cólon descendente e sigmóide e no recto, forçando as fezes na direcção anal. À medida que as ondas peristálticas se aproximam do ânus, o esfíncter anal interno relaxa-se por impulsos inibitórios provenientes do plexo mioentérico, e se o esfíncter anal externo estiver relaxado, ocorre a defecação. (reflexo inibidor recto-anal). (Kenny et al., 2010)

- Sistema Nervoso Autónomo

Embora o SNE funcione de modo independente, também é controlado de forma muito intensa, pelo sistema parassimpático e pelo sistema simpático, componentes do sistema nervoso Autónomo (SNA).

O sistema **parassimpático** é inervado principalmente pelo nervo vago e também pelos nervos sagrados, cujos neurónios pré-ganglionares consistem em cerca de 200 eferentes vagais, além de outros eferentes dos nervos sagrados. Em geral, terminam em células nervosas colinérgicas (libertam acetilcolina) dos plexos submucosos e mioentéricos, cuja acção estimula a actividade digestiva (secreção e motilidade). (Figura 2) (Porth & Matfin, 2009)

A inervação **simpática**, constituída somente por neurónios pós-ganglionares (muitas terminam em neurónios colinérgicos pós-ganglionares), decorre entre os nervos com ligação à medula espinal (cadeia ganglionar torácica) e os gânglios pré-vertebrais (celíacos, mesentéricos superiores e inferiores). O seu efeito inibitório (após libertar norepinefrina) consiste em bloquear a libertação de acetilcolina, e desse modo, impedir a secreção gastrointestinal, a motilidade e a contracção dos esfíncteres gastrointestinais e dos vasos sanguíneos. Algumas fibras nervosas simpáticas terminam directamente nas células musculares lisas. (Figura 2) O seu controle é mediado pela actividade nos plexos intramurais. Deste modo, o SNA exerce um controlo, dito extrínseco sobre o SNE. (Ganong, 2006; Lomax et al., 2010)

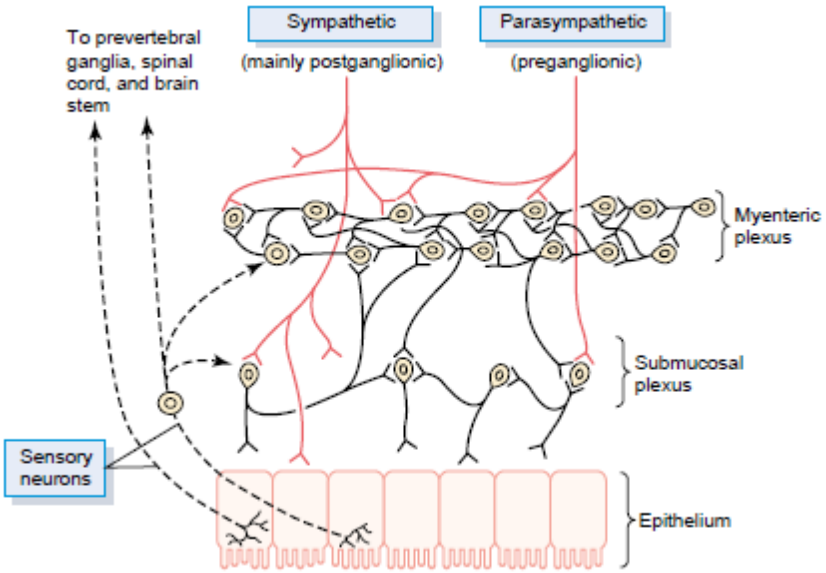


Figura 2. Representação esquemática do controlo neuronal da motricidade da parede intestinal, com ilustração dos plexos nervosos entéricos (a preto), das fibras nervosas parassimpáticas e simpáticas (a vermelho). Os neurónios sensitivos transmitem a informação do epitélio/parede intestinal para os plexos intramurais, e de seguida, para os gânglios e para a medula espinhal. Adaptado de *Textbook of Physiology - Guyton 11th edition.*

Além disso, as fibras nervosas dos ramos simpáticos e parassimpáticos fazem sinapse com os neurónios de ambos os plexos entéricos. E deste modo, o SNC pode influenciar a motilidade e a actividade secretora das vias gastrointestinais.

d) Tipos de movimentos

O ritmo das contracções musculares é estabelecido pela frequência das ondas lentas. A intensidade pode ser alterada pela influência das hormonas, do SNE e da inervação autónoma; a actividade parassimpática aumenta a força de contracção muscular, enquanto a estimulação simpática diminui.

Existem dois tipos de movimentos no tubo digestivo: o peristaltismo e a segmentação. (Figura 3)

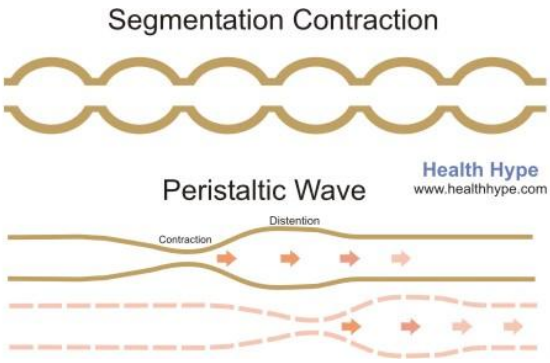


Figura 3. Representação ilustrativa das ondas peristálticas e das ondas de segmentação.

- Peristaltismo

O peristaltismo é uma resposta reflexa desencadeada pela distensão da parede digestiva com conteúdo intestinal, que provoca uma contracção circular atrás do estímulo e uma área de relaxamento à sua frente. A onda de contracção propaga-se na direcção orocaudal, movendo o conteúdo luminal no sentido distal (do intestino delgado para o cólon), numa velocidade que varia de 2 a 25 cm/seg. (Figura 3) (Porth & Matfin, 2009)

O peristaltismo fornece um excelente exemplo da actividade integrada do SNE. A distensão intestinal local liberta serotonina, que activa os neurónios sensitivos, os quais activam o plexo mioentérico. Os neurónios colinérgicos que seguem na direcção retrógrada nesse plexo activam os neurónios que libertam a substância P e a acetilcolina, induzindo à contracção do músculo liso. Ao mesmo tempo, os neurónios colinérgicos que seguem numa direcção anterógrada activam os neurónios que secretam NO, ATP e VIP, provocando relaxamento à frente do estímulo. A contracção sequencial ocorre na subcamada muscular lisa circular. (Ganong, 2006)

Os impulsos nervosos autónomos podem aumentar ou diminuir a actividade peristáltica.

- Segmentação

As contracções segmentares são contracções anulares que surgem a intervalos bastante regulares ao longo do tubo digestivo, que a seguir desaparecem, sendo substituídas por outro grupo de contracções anulares nos segmentos posteriores. (Ganong, 2006) Produzem divisão e subdivisão contínuas do conteúdo intestinal, uma contracção e um relaxamento estacionários rítmicos dos segmentos intestinais,

misturando profundamente o quimo no lúmen e colocando-o em contacto com a mucosa intestinal, onde ocorre a absorção. (Figura 3) (Wood, 2008)

Este movimento tem como base o aumento da contracção da subcamada muscular lisa circular, gerado pela actividade eléctrica das CIC. A intensidade da segmentação pode ser alterada pela influência das hormonas, do SNE e dos nervos autónomos. (Widmaier et al., 2006)

e) Embriologia

1) Análise genética/molecular

Durante a migração, as células progenitoras do SNE ou células da crista neural pré - entéricas (pENCCs) expressam vários marcadores da crista neural, incluindo o factor de transcrição Sox10, e de seguida, o regulador transcripcional Phox2b e o receptor tirosina cinase RET. (EMBRIOLOGIA – Figura 1) Ao invadirem o mesênquima do intestino primitivo, denominam-se células da crista neural entéricas (ENCCs). A partir daí, as ENCCs Sox10+ RET + iniciam uma migração rostrocaudal organizada, que culmina na colonização uniforme de todo o tubo digestivo. (Laranjeira & Pachnis, 2009)

Para o intestino primitivo tornar-se funcional, precisa proliferar, diferenciar em vários tipos de neurónios e tornar-se activo. Vários genes e moléculas são críticos no desenvolvimento do SNE, e estão envolvidos no processo da migração e da diferenciação neuronal. (Tabela 1) (Burzynski et al., 2009, Laranjeira & Pachnis, 2009) Todos eles são importantes na interacção e na conexão celular durante a migração direccional.(Anderson et al., 2006; Burns et al., 2009; Schäfer et al., 2009)

Tabela 1. Genes mais envolvidos no desenvolvimento do sistema nervoso entérico.

Gene	Localização cromossómica humana	Fenótipo do SNE em ratos cujo gene homozigoto é inactivado
RET	10q11.2	Ausência de neurónios no intestino delgado e no cólon
GDNF	5p12-13.1	Ausência de neurónios no intestino delgado e no cólon
GFRα1	10q25	Ausência de neurónios no intestino delgado e no cólon
ET_B	13q22	Ausência de neurónios no cólon distal
ET- 3	20q13.2 – 13.3	Ausência de neurónios no cólon distal
Phox2b	4p12	Ausência de neurónios no tubo digestivo
SOX10	22q13	Ausência de neurónios no tubo digestivo
PAX3	2q37	Ausência de neurónios no intestino delgado e no cólon
HASH1(*Mash1*)	12	Ausência de neurónios desde o esófago
IHH (*Indian hedgehog*)	2q33→q35	Ausência de neurónios no intestino delgado e no cólon
SHH (*Sonic hedghog*)	7q36	Corpos celulares dos neurónios ectópicos na mucosa
HOX11L1	2p13.1	Hiperplasia no cólon e hipoplasia no intestino delgado

Adaptado de Newgreen & Young, 2002.

O receptor tirosina cinase **RET**, o co-receptor GFRα1 e o ligante GDNF são os reguladores críticos no desenvolvimento do SNE. (Laranjeira & Pachnis, 2009)

i) *GDNF*

O factor neurotrófico derivado da linhagem glial (**GDNF**) é expresso pelo mesênquima intestinal; é uma molécula quimioatractiva, ao induzir e promover a migração rostrocaudal das células vagais NCCs ao longo do tubo digestivo. (Anderson et al, 2006) Também actua como mitogénio, pois estimula a proliferação das células da

crista neural, a diferenciação neuronal e o crescimento de dendrites. Está descrito que o GDNF é o ligante principal do receptor RET. Nos ratos portadores da mutação homozigota nula em GDNF, verifica-se a ausência dos sistemas entérico e renal, confirmando o papel crucial desta molécula no desenvolvimento do SNE. (Newgreen & Young, 2002; Paran et al., 2006)

No entanto, a sinalização deste factor trófico pode regular o número de subtipos de neurónios entéricos e alterar a proporção de neurónios nos plexos submucoso/mioentérico, pela alteração da proliferação celular. (Wang et al., 2010) Por isso, várias transformações na estrutura e na função do SNE, são influenciadas pela modificação da localização, timing e intensidade da sinalização do GDNF. Deste modo, podem contribuir para os distúrbios da motilidade intestinal.

A sinalização através do receptor RET requer co-receptores da família GFRα (receptor α da família do GDNF), que são glicosilinositolfosfatos ancorados à superfície da membrana celular nas células derivadas da crista neural, que expressam o receptor RET. Os quatro ligantes GDNF -related conhecidos são o GDNF, o artemine, o neurturine e a persifina. Cada um tem o seu co-receptor preferido. Tanto o GDNF como os outros ligantes ligam-se primeiro ao co-receptor da família GFRα apropriado, e este complexo, liga-se ao receptor RET e estimula a sua autofosforilação, ou em alternativa, os GFRαs formam primeiro um complexo com o receptor RET, que actua como o sítio de ligação para o GDNF ou os ligantes – related. (Newgreen & Young, 2002)

ii) *RET*

O gene **RET** é um proto-oncogene que codifica um receptor tirosina-cinase, presente na superfície celular, que regula os fenómenos de crescimento e diferenciação celular. O receptor tirosina-cinase RET é uma proteína transmembranar composta por uma porção extracelular, onde estão presentes quatro regiões de adesão celular dependentes de Ca^{2+} - domínio caderina - e uma região rica em cisteína, localizada na porção justa-membranar – domínio cisteína. (Laranjeira & Pachnis, 2009)

É expresso pelas células vagais e do tronco NCC. A sua activação pelo complexo GFRα1/GDNF é crucial para a sobrevivência, proliferação e diferenciação das células da crista neural durante os primeiros estadios do desenvolvimento do SNE.

(Taraviras et al., 1999) Também fornece suporte trófico para os neurónios maduros/diferenciados. (Gariepy, 2001)

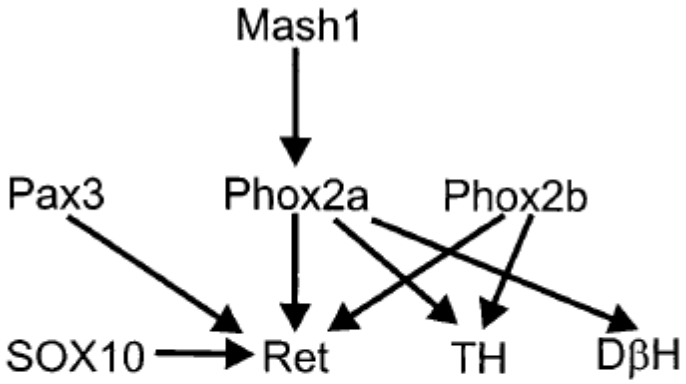
Uma série de estudos, utilizando o rato como modelo experimental, começou a esclarecer os mecanismos pelos quais o RET regula o desenvolvimento do ENS. Na sua ausência, a maioria das ENCCs sofre morte celular por apoptose, conduzindo à eliminação quase completa das células precursoras do ENS de todo o tubo digestivo. (Laranjeira & Pachnis, 2009)

Um aumento substancial no número de ENCCs é fundamental para a formação normal do ENS e qualquer falha num período de desenvolvimento relativamente curto, irá restringir a fonte de células progenitoras para a geração dos neurónios ou das células gliais. Mas a proliferação das ENCCs parece também desempenhar um papel activo na formação dos plexos entéricos. (Laranjeira & Pachnis, 2009) Através de modelos matemáticos, previu-se que a invasão direccional das células da crista neural e a colonização uniforme da parede intestinal são principalmente, impulsionadas pela proliferação celular. (Landman et al., 2007) Barlow et al. (2008) indicaram que é necessário um número mínimo de ENCCs para a colonização do tubo digestivo. Logo, o tamanho da população ENCC pode afectar a sua capacidade de progressão orodistal.(Gershon, 2010)

Assim, se o pool de células progenitoras é diminuto, a expressão do gene RET é deficiente para colonizar todo o intestino primitivo, e por esse motivo, Delalande et al. (2008) sugeriram que os níveis de expressão diferencial do receptor RET nas células vagais e sagradas NCC têm um papel crítico na proliferação celular, isto é, as células vagais apresentam maior expressão do gene RET do que as células sagradas, e por isso, são mais eficientes em colonizar o intestino. Mas caso se aumente a expressão do gene RET nas células sagradas, o seu potencial de colonização aumenta. Para além deste, as células sagradas também expressam o gene Sox10 e o gene EDNRB. (Gershon, 2010)

O papel da morte celular por apoptose na crista neural vagal é impreciso, mas poderá contribuir para a regulação do tamanho das ENCCs, e por sua vez, determinar o número final de neurónios entéricos no pós-natal (Enomoto, 2009). O efeito pró-apoptótico do receptor RET poderá fornecer a explicação para a morte neuronal no intestino primitivo posterior (*hindgut*), verificado em ratos no qual o co-receptor GFRα1 foi ablacionado na fase final da gestação. (Laranjeira & Pachnis, 2009)

Embora o EdnrB e o Sox10 co-operem com o receptor RET e reforcem a sua actividade, estudos recentes levantam a possibilidade de que reguladores negativos da actividade do receptor RET também possam estar envolvidos na formação e na organização funcional do ENS. (Esquema 2) (Laranjeira & Pachnis, 2009)



Esquema 2. Interacções entre os factores transcripcionais Mash1, Phox2a, Phox2b, Pax3 e Sox10 com o receptor Ret e as enzimas de síntese de catecolaminas, tirosina hidroxilase (TH) e a dopamina β hidroxilase (DβH). A expressão do receptor Ret é regulada de modo positivo, directa ou indirectamente, pelos factores transcripcionais descritos. Adaptado de Newgreen & Young, 2002.

iii) Endotelinas

As **endotelinas (**EDN1, EDN2 e EDN3) são mensageiros locais intercelulares que actuam através de receptores da superfície celular, EDNRA ou ET_A e EDNRB ou ET_B. O principal ligando do ET_B é a EDN3, visto que é a única endotelina produzida pelas células do mesênquima no intestino primitivo. (Newgreen & Young, 2002) As endotelinas são formadas como pré-peptídeos inactivos, que após a clivagem pela enzima de conversão de endotelinas (ECE), produz as endotelinas biologicamente activas. Os genes que as expressam são o *ece1* e o *ece2*. (Gariepy, 2001)

O complexo EDN3-ET_B executa funções na migração e no desenvolvimento do SNE. Estudos recentes indicam que a ET-3 age sobre as células da linhagem da crista neural, para evitar ou retardar a diferenciação neuronal. (Newgreen & Young, 2002). Na ausência de sinalização através desta via, os neurónios diferenciam-se muito cedo. O resultado é um défice de células progenitoras para a migração e proliferação, para conclusão da colonização do intestino primitivo distal. Isso explicaria a ausência de neurónios no intestino posterior distal em ratos ou em humanos com mutações nos genes que codificam tanto o ETB ou a EDN-3. (Newgreen & Young, 2002) Esta teoria é

consistente com experiências em ratos, cujo gene EDN3 ou EDNRB são inexpressos, que exibem aganglionose do cólon. (Paran et al., 2006)

Deste modo, a ausência de sinalização do EDNRB pelas ENCCs para colonizar a região pericecal conduz a défices, que vão desde a aganglionose distal do cólon até à aganglionose total do cólon/distal ao íleo. (Gariepy, 2001)

iv) *Sinais hedgehog*

Os membros da família **hedgehog** são proteínas que participam em processos vitais ao desenvolvimento do SNE. Dois membros desta família foram descritos, o Indian hedgehog (**Ihh**) e o Sonic hedgehog (**Shh**). Ensaios experimentais demonstraram que ratos Ihh+/- exibiam partes do cólon dilatado e não dilatado, o que significa que as ENCCs migram para o intestino, mas não conseguem sobreviver e / ou diferenciar na ausência de Ihh. (Newgreen & Young, 2002)

Acredita-se que a via de sinalização Shh é importante para a disposição radial das células musculares lisas e dos neurónios no tubo digestivo, de modo que diferenciem-se apenas nas camadas mais externas. A presença de neurónios perto do lúmen intestinal em Shh +/- é compatível com essa hipótese, embora seja preciso explicar quais os mecanismos que induzem as células progenitoras a migrar para a superfície luminal. (Newgreen & Young, 2002)

v) Factores de transcrição

Os factores de transcrição são proteínas que regulam a expressão de genes através da ligação a elementos de regulação do ADN, promovendo ou reprimindo a transcrição do gene em si. Os factores de transcrição muitas vezes, ligam-se a sequências de ADN relativamente inespecíficas, mas normalmente, combinam-se com outros factores de transcrição para formar um complexo molecular, que tem como alvo os elementos de regulação de genes específicos ou conjuntos específicos de genes.

O gene **Phox2b** é um factor de transcrição cujo homeodomínio está envolvido na neurogénese e regula a expressão do RET. (Figura 3) (Paran et al., 2006) A sua expressão começa nas células vagais e do tronco NCC à medida que invadem o mesênquima intestinal e continuam nos plexos submucoso e mioentérico nos adultos.

(Gariepy, 2001) Em ratos Phox2b -/-, o SNA periférico está ausente. (Newgreen & Young, 2002)

O gene **SOX10** (na região Y-box que determina o sexo) ou também conhecido como gene do megacólon dominante, é expresso nas células derivadas da crista neural, contribuindo para a formação do sistema nervoso periférico. O seu envolvimento na constituição do SNE foi demonstrado através do rato Dom, um modelo experimental natural da doença de Hirschsprung, cuja mutação no gene SOX10, expôs aganglionose dominante no intestino distal. (Paran et al., 2006)

Vários estudos sugeriram que o Sox10 é um factor crítico para a manutenção e a auto-renovação das ENCCs. A redução dos seus níveis conduz a uma redução no tamanho do pool de células progenitoras e na diferenciação prematura dos neurónios entéricos. (Bondurand et al., 2006) A mutação em heterozigotia produz um fenótipo letal em modelos animais. (Gariepy, 2001)

O **Pax3** é essencial para o início da expressão do receptor RET pelas ENCCs (Esquema 2) e por isso, nos ratos Pax3 -/- não há expressão do receptor RET distalmente ao estômago. (Newgreen & Young, 2002)

Um estudo sobre o papel in vivo do gene **Mash1** mostrou que a sua eliminação evidenciou um atraso temporário na migração e na diferenciação das primeiras células da crista neural em neurónios. (Laranjeira & Pachnis, 2009) Indirectamente interpela na regulação do receptor RET, através da molécula Phox2a, e desse modo pertence à mesma cascata de sinalização do receptor RET. (Esquema 2) O homólogo humano deste gene, o **HASH1**, é expresso pelos neurónios precursores simpáticos, pela 6ª – 7ª semana de desenvolvimento e pelas células neuroendócrinas fetais no pulmão. É importante no desenvolvimento do sistema nervoso autónomo. (Newgreen & Young, 2002)

A homebox **Hox11L1** ou **Ncx** é um gene envolvido no desenvolvimento do sistema nervoso periférico e desempenha funções na proliferação e na diferenciação das células da crista neural. Nos adultos é expresso nos plexos mioentérico e submucoso no íleo distal, no cólon e no recto. (Gariepy, 2001) Os modelos de rato *knockout* Hox11L1 (ratos homozigotos mutantes) desenvolveram megacólon entre a 3ª e a 5ª semana de idade, com hiperplasia do cólon e hipoplasia do íleo, seguido pela morte de alguns neurónios. Também é um regulador importante da apoptose pós-natal do SNE. (Newgreen & Young, 2002; Paran et al., 2006)

vi) Hand2

A supressão específica do gene **Hand2** nas células da crista neural conduziu a uma dramática redução da capacidade de diferenciação neuronal, mas sem afectar a sua capacidade de colonização ou de diferenciação em células gliais. (Hendershot et al., 2007) É fortemente sugerido que o Hand2 é solicitado para a diferenciação terminal dos neurónios progenitores em neurónios entéricos maduros.(Laranjeira & Pachnis, 2009)

Recentemente, as proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs) (Faure et al., 2007), o ácido retinóico (Sato & Heuckeroth, 2008) e a vitamina A (Fu et al., 2010) têm sido questionados e estudados no envolvimento da embriogénese e da diferenciação do SNE. (Gershon, 2004)