

Prêmio Pitanga Santos no 46^a Congresso Brasileiro de Colo-Proctologia.

ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES DO ÓXIDO NÍTRICO EM PACIENTES COM MEGACÓLON CHAGÁSICO

ULYSSES RIBEIRO JR. - FSBCP
ADRIANA VAZ SAFATLE-RIBEIRO - FSBCP
ANGELITA HABR-GAMA - TSBCP
JOAQUIM JOSÉ GAMA-RODRIGUES - TSBCP
JACKIE SOHN
JAMES C. REYNOLDS

RIBEIRO Jr. U, SAFATLE-RIBEIRO AV, HABR-GAMA A, GAMA-RODRIGUES JJ, SOHN J & REYNOLDS JC - Análise das alterações do óxido nítrico em pacientes com megacólon chagásico. *Rev bras Colo-Proct*, 1998; 18(1): 52-57

RESUMO: A fisiopatologia da Doença de Chagas ainda não está completamente esclarecida. O óxido nítrico (NO) tem sido citado como neurotransmissor responsável pelo relaxamento do esfíncter interno do ânus no indivíduo normal. Neuronal nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) diaforase pode ser usado como marcador neuronal do NO. **Objetivos:** Examinar as alterações nos neurônios produtores de NO do cólon de pacientes submetidos à ressecção por megacólon avançado e comparar com o intestino delgado dos mesmos pacientes e com controles. **Métodos:** Espécimes obtidos da ressecção do reto e biópsias extramucosas do intestino delgado de 11 pacientes chagásicos foram comparadas a 10 pacientes controles com câncer de cólon. Os tecidos foram fixados em solução de Zamboni e submetidos à histoquímica para neurônios contendo NADPH diaforase. A reatividade foi avaliada utilizando-se uma escala de 0 a 4 nas diversas camadas da parede intestinal: musculatura lisa longitudinal (ML), plexo mioentérico (PM), musculatura lisa circular (MC), plexo submucoso (PSM), e mucosa (M). **Resultados:** Os casos controles mostraram os plexos mioentérico e submucoso bem corados e uma rica rede de terminações nervosas nas camadas musculares. Os espécimes provenientes de doentes chagásicos revelaram uma diminuição da reatividade e da coloração em todas as camadas do intestino. De maneira geral, houve uma diminuição estatisticamente significativa nos neurônios contendo NADPH diaforase. O intestino delgado clinicamente não envolvido também demonstrou diminuição da reatividade, porém em menor grau. **Conclusões:** A atividade da NADPH diaforase está diminuída em pacientes com megacólon avançado, especialmente no plexo mioentérico e na camada muscular lisa; 2. Houve também uma diminuição da atividade neuronal do NO no jejuno clinicamente não envolvido pela doença, mas em menor grau.

UNITERMOS: doença de Chagas; óxido-nítrico; neuronal nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) diaforase; megacólon

Na doença de Chagas, as lesões do sistema nervoso autonômico central e periférico são responsáveis pela maioria das desordens anatômicas e funcionais que ocorrem nos órgãos musculares ocultos, tais como: coração, esôfago, estômago, intestino delgado, cólon, vesícula biliar, e menos frequentemente nos brônquios, ureteres e bexiga urinária^(1, 2). Apesar da fisiopatologia da doença de Chagas ainda não estar completamente elucidada, na fase crônica da doença, o achado mais visível na parede intestinal é a diminuição do número de células ganglionares na submucosa e no plexo mioentérico, assim como nas camadas musculares^(1, 2). Nessa doença, uma porção do cólon, usualmente a parte distal (sigmóide-reto), é incapaz de relaxar durante a peristalse ocasionando uma obstrução mecânica com posterior dilatação do segmento colônico à montante⁽³⁾.

Os nervos inibitórios responsáveis pelo relaxamento da musculatura lisa intestinal não estão completamente identificados. Os neurotransmissores liberados por estes neurônios inibitórios intestinais são não-adrenérgicos e não-colinérgicos (NANC). A adenosina-trifosfato e o polipeptídeo intestinal vasoativo foram sugeridos como neurotransmissores NANC, mas no homem não se tem evidências concretas desse fato^(4, 5).

No trato gastrointestinal, o óxido nítrico (NO) tem sido descrito como o principal neurotransmissor dos neurônios intrínsecos inibitórios NANC⁽⁶⁻¹¹⁾. Isto também é válido para o cólon, cujo relaxamento é mediado, pelo menos em parte, pelos nervos NANC que liberam NO depois da sua produção pela enzima óxido-nítrico-synthase (NO-synthase)⁽⁹⁾.

O óxido nítrico, através da demonstração histoquímica, está presente nos nervos entéricos de vários mamíferos⁽¹²⁻¹⁵⁾ e localiza-se especificamente com uma outra enzima chamada Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) diaforase⁽¹⁴⁻¹⁷⁾. A presença da enzima NADPH diaforase pode

ser caracterizada através da imuno-histoquímica, correlacionando-se com a presença da NO-synthase⁽¹⁸⁾.

Devido à característica de neurônio inibidor, o NO pode também estar envolvido na patogênese desta doença. O tipo e a intensidade do dano neuronal podem permitir um melhor entendimento dos mecanismos de doença assim como guiar o tratamento.

O objetivo deste estudo foi, portanto, determinar se neurônios contendo NO estão alterados no sistema nervoso entérico de pacientes com megacólon chagásico avançado, usando imuno-histoquímica para (NADPH) diaforase. Objetivou-se, ainda, estudar o intestino delgado clinicamente não envolvido pela doença e compará-lo com o megacólon e com tecidos controles.

MATERIAL E MÉTODOS

Todos os pacientes chagásicos eram provenientes de zona endêmica da doença e apresentavam reação de fixação de complemento positiva (Teste de Machado-Guerreiro). Este estudo recebeu aprovação da Comissão Ética e Científica de ambas as Universidades, assim como consentimento pelos pacientes. Espécimes de retos ressecados (todos os pacientes submetem-se à retossigmoidectomia abdominal com anastomose mecânica) e biópsia extramucosa de intestino delgado de 11 pacientes chagásicos foram comparados com 10 controles (pacientes com tumores de cólon esquerdo). A média de idade para o grupo dos chagásicos foi de $50,3 \pm 17,7$ anos sendo sete (63,6%) mulheres, enquanto que a média de idade do grupo controle foi de $57,4 \pm 15,5$ anos, sendo seis (60%) mulheres. Os pacientes chagásicos apresentavam história de constipação de longa duração, fazendo uso constante de enemas e laxativos.

Os tecidos (três a quatro amostras de 1 x 1 cm de parede total do cólon e biópsia extramucosa de 0,3 x 0,5 cm de intestino delgado a 40 cm do ângulo de Treitz de cada paciente) foram fixados em solução de Zamboni (paraformaldeído a 2%, ácido pícrico e solução tampão) e avaliados por imuno-histoquímica para neurônios contendo NADPH-diaforase.

Coloração de NADPH-diaforase

Os tecidos foram processados, congelados e submetidos a secções. Pequenos blocos de tecidos foram congelados em nitrogênio líquido, submetidos a secções com 10 µm de espessura e montadas em lâminas recobertas com poly-L-lysine.

A coloração histoquímica para atividade da NADPH-diaforase foi realizada conforme descrito anteriormente^(15, 17). Resumidamente, aplicou-se a solução de NADPH (10 ml de Tris solução salina tamponada a 0,05 M, 8,3 mg NADPH e 75 µl de 4-nitroblue tetrazolium chloride) so-

bre o tecido seccionado, por 40 minutos. As lâminas foram lavadas com solução tampão para bloquear a reação e recobertas com Tris tampão e mistura de glicerol (1:3) sendo estocadas no refrigerador.

A intensidade e distribuição de NO-synthase foi verificada através do exame das lâminas sob microscópio óptico.

Nos neurônios positivos para o NO, ocorreu precipitação de tinta azul no citoplasma celular, como se fossem partículas. Padrão similar de coloração ocorreu ao longo das terminações nervosas. O núcleo não se corou, permanecendo pálido. Em algumas secções o epitélio mostrou um fundo azul claro. Nenhuma outra estrutura se corou para a atividade do NADPH-diaforase.

A reatividade foi avaliada numa escala de zero a quatro para intensidade e distribuição na musculatura longitudinal (ML), plexo mioentérico (PM), musculatura circular (MC), plexo submucoso (PS) e mucosa (M).

RESULTADOS

As alterações ganglionares foram confirmadas em cada espécime através da coloração pela hematoxilina & eosina. Os tecidos corados pela H&E revelaram diminuição dos gânglios nervosos nos plexos de Meissner e de Auerbach nos pacientes com doença de Chagas. Os casos controles mostraram neurônios dos plexos mioentérico e submucoso intensamente corados, e uma rica rede de terminais nervosos nas camadas musculares (Fig. 1). Coloração intensa foi observada na camada muscular circular, com terminações nervosas abundantes contendo numerosas vesículas pequenas e localizadas entre os fascículos da camada muscular circular. A camada muscular longitudinal apresentou coloração consideravelmente menos intensa pela diaforase quando comparada à camada circular. Entre estas duas camadas musculares, observaram-se áreas com coloração intensa, áreas estas correspondentes à mesma localização dos gânglios do plexo mioentérico detectados na coloração de H&E. Estes gânglios continham numerosos corpos celulares que foram corados pela NADPH-diaforase, demonstrando a presença do NO-synthase.

Os espécimes de pacientes com doença de Chagas tiveram uma diminuição da coloração em todas as camadas do intestino (Fig. 1). De maneira geral, houve uma diminuição estatisticamente significativa dos neurônios contendo NADPH-diaforase (Tabela 1). Foram observadas terminações nervosas esparsas, fracamente coradas, localizadas primariamente na submucosa e raramente na camada muscular do cólon. Poucos corpos celulares foram identificados nos plexos mioentéricos.

Biópsias de intestino delgado clinicamente não afetados também demonstraram diminuição da reatividade para a NADPH-diaforase, mas em menor grau (Tabela 2).

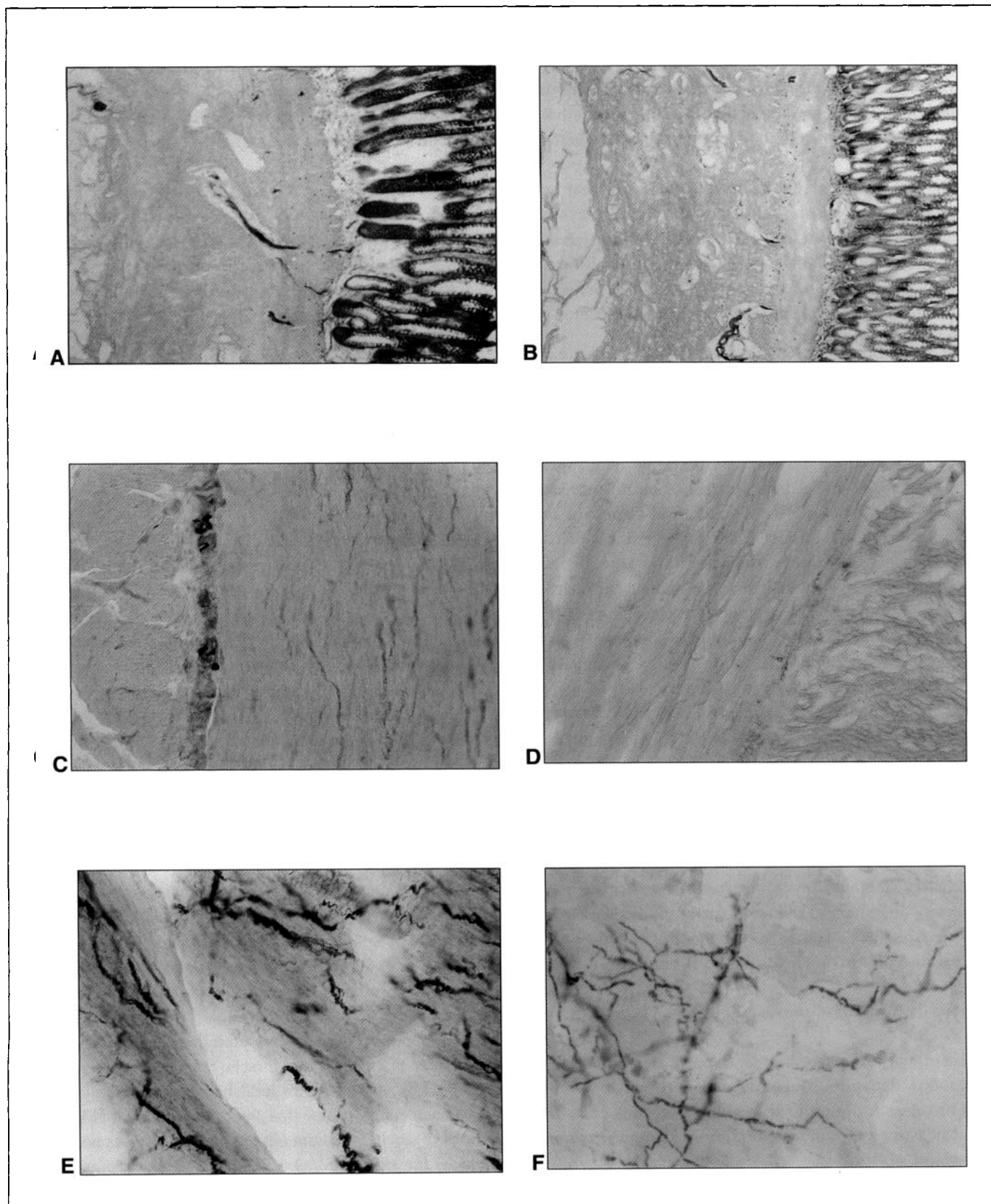


Fig. 1 - Coloração de NADPH-diaforase para NO em controles e em megacólon chagásico. **A** - Secção de parede total do órgão de indivíduo não chagásico, onde observam-se os plexos nervosos de Meissner e Auerbach e a rica rede de terminações nervosas nas camadas musculares (4x); **B** - Secção de parede total de um paciente com megacólon chagásico observando-se diminuição da coloração azulada característica da presença do NO (4x); **C** - Plexo mioentérico de um indivíduo não chagásico (10x); **D** - Plexo mioentérico no indivíduo chagásico, notando-se quase total ausência de coloração (10x); **E** - Terminações nervosas abundantes contendo numerosas vesículas pequenas entre os fascículos da camada muscular circular do cólon de controle (20x); **F** - Secção da camada muscular circular de paciente chagásico (20x).

DISCUSSÃO

O mecanismo exato de dano neuronal na doença de Chagas ainda permanece discutível assim como o mecanismo fisiopatológico pelo qual a destruição neuronal ocasiona dilatação visceral ainda é objeto de muita controvérsia. As lesões neuronais podem primariamente produzir disfunção motora seguida de estase e dilatação, principalmente porque o plexo mioentérico é importante na manutenção do tônus, na coordenação dos movimentos e no controle da peristalse. O músculo denervado é anormalmente sensível aos estímulos e tende a se contrair permanentemente; um pequeno estímulo provoca um complexo de contrações, freqüentes, fortes e irregulares⁽³⁾. No intestino grosso, o primeiro efeito da denervação é a perda da coordenação muscular, e o grau de disfunção varia de acordo com a extensão do processo. A perda de peristalse coordenada e da função esfínteriana atrasam a passagem do conteúdo fecal⁽³⁾.

Nossos dados mostram claramente que a atividade da NADPH-diaforase está diminuída em pacientes com megacólon chagásico avançado, quando comparado aos controles, especialmente no plexo mioentérico e na camada muscular circular. A imunorreatividade está também diminuída no intestino delgado não afetado clinicamente pela doença, porém em menor intensidade e extensão. Este dado indica a não

seletividade da lesão neuronal. Este é o primeiro estudo correlacionando doença de Chagas e NO. A acuracidade dos dados obtidos por esta coloração está baseada em estudos de localização, além do que sabe-se que a coloração de NADPH-diaforase é virtualmente 100% sensitiva na identificação dos neurônios contendo NO-synthase^(14-16, 19). A ausência de neurônios contendo NO-synthase pode impedir o relaxamento muscular na região do cólon lesado nesses pacientes.

De maneira similar, alterações do NO participam na fisiopatologia da doença de Hirschsprung, na qual ocorre uma ausência congênita dos plexos de Meissner e Auerbach na parede intestinal do cólon distal e reto. Esta doença resulta na inabilidade do cólon comprometido e do esfínter interno do ânus de se relaxar, levando a uma obstrução mecânica⁽²⁰⁾. Ocorre uma redução no número de células neuronais mioentéricas, observadas na H&E, acompanhada de ausência de neurônios contendo NADPH-diaforase (especialmente na camada muscular circular), e um aumento da quantidade de acetilcolinesterase⁽¹⁹⁻²²⁾. Portanto, a presença ou a ausência de neurônios contendo NO-synthase é crucial para a falência do relaxamento do esfínter interno do ânus que caracteriza a doença de Hirschsprung⁽²⁰⁾.

No cólon, os nervos NANC são responsáveis pela inibição descendente e seu relaxamento associado visto durante a peristalse, e pelo relaxamento do esfínter interno do ânus.

Tabela 1 - Média de atividade de NADPH-diaforase em 11 espécimes de megacólon chagásico comparados com 10 controles.

Camadas da parede intestinal		Média	DP	Mínimo	Máximo	Valor de p*
Musculatura longitudinal	Megacólon	1,5	1,8	0	3	0,04
	Controle	3,1	1,1	1	4	
Plexo mioentérico	Megacólon	1,9	1,9	0	3	0,01
	Controle	3,9	0,3	3	4	
Musculatura circular	Megacólon	1,5	1,9	0	3	0,01
	Controle	3,7	0,5	3	4	
Plexo submucoso	Megacólon	1,5	1,7	0	3	0,02
	Controle	3,3	1	2	4	
Mucosa	Megacólon	1,5	1,7	0	3	0,02
	Controle	3,7	0,5	3	4	

DP = Desvio-padrão; * = Teste de Wilcoxon - Signed-Ranks.

Tabela 2 - Média de atividade de NADPH-diaforase em 11 espécimes de megacólon chagásico comparados com oito biópsias extramucosas de intestino delgado clinicamente não envolvido pela doença.

Camadas da parede intestinal		Média	DP	Mínimo	Máximo	Valor de p*
Musculatura longitudinal	Megacólon	1,5	1,8	0	3	0,34
	Intestino delgado	2	1,6	0	4	
Plexo mioentérico	Megacólon	1,9	1,9	0	3	0,52
	Intestino delgado	2,6	1,2	0,5	4	
Musculatura circular	Megacólon	1,5	1,9	0	3	0,29
	Intestino delgado	2,1	1,7	0,5	4	

DP = Desvio-padrão; * = Teste de Wilcoxon - Signed-Ranks.

Existe uma forte evidência mostrando que NO é um dos mais importantes NANC mensageiros químicos.

O NO é produzido a partir do aminoácido L-arginina por uma enzima chamada NO-synthase. Esta enzima é dependente do NADPH e Ca/calmodulin, e produz quantidades iguais de NO e L-citrulina como seus produtos. A NO-synthase pode ser competitivamente inibida por um número de análogos da arginina (N^G-nitroarginina methyl ester, N^G-monomethyl-L-arginina, N^G-nitro-L-arginina). Após a sua produção pela NO synthase, o NO é altamente permeável e pode se difundir para fora das células rapidamente. Em condições fisiológicas é muito lábil com uma meia-vida de segundos. Esta meia-vida curta se deve a ligações com a hemoglobina ou à degradação por superóxidos. Quando chega à célula alvo, o NO age no guanylate-cyclase. O NO ativa esta enzima dentro da célula efetora produzindo cGMP através de ligações com a modalidade heme do guanylate-cyclase. O cGMP então promove o relaxamento da musculatura lisa por mecanismos que ainda são pouco conhecidos⁽¹⁹⁾.

O envolvimento do NO na mediação nervosa do relaxamento do esfíncter interno do ânus no homem é comprovado pelo comportamento desse esfíncter *in vitro*^(4, 23). O músculo liso do esfíncter interno do ânus relaxa em resposta ao estímulo nervoso inibitório, sendo este efeito mimetizado pela aplicação do NO proveniente de uma fonte exógena. Adicionalmente, o relaxamento neurogênico pode ser abolido pelo uso de inibidores do NO-synthase, a enzima que catalisa a formação do NO, assim como por agentes que bloqueiam NO do meio extracelular^(4, 23).

Dados recentes oriundos de estudos em mamíferos sugerem que o intestino delgado e o cólon podem ter seu tônus inibitório da musculatura lisa mediado por NO^(20, 24, 25). No intestino grosso normal, a distensão local dentro do lúmen do cólon ou do reto distal induz um reflexo neural que produz contração da musculatura lisa proximal e relaxamento distal ao sítio da distensão⁽¹⁹⁾. No rato, o relaxamento distal à distensão mecânica pode ser inibido pela adição do análogo nitroarginina da arginina. O esfíncter interno do ânus parece ser também similarmente dependente do NO para o relaxamento quando estudado numa preparação de órgão total. Isto é suportado pela demonstração de que o reflexo anorretal pode ser inibido dramaticamente no gambá pela administração de um inibidor do NO synthase, tal como o N^G-nitro-L-arginina⁽²⁶⁾.

Evidências morfológicas também comprovam a existência do NO-synthase no plexo mioentérico anorretal no homem, presente em uma subpopulação discreta mas substancial de neurônios entéricos que também contêm atividade de NADPH-diaforase. Esses neurônios têm a distribuição das terminações e neuroquímica semelhantes aos neurônios motores inibidores que medeiam o reflexo descendente inibitório na peristalse intestinal. Dados morfológicos sugerem ainda que no esfíncter anorretal humano, neurônios contendo NO-synthase e suas terminações têm características e distribuição morfológicas apropriadas para servirem como nervos motores inibitórios que interligam informações entre o reto e o esfíncter interno do ânus⁽²⁷⁾.

É importante salientar que o NO é o principal mediador do reflexo inibitório anorretal, e que na doença de Chagas pode haver acalasia do esfíncter interno do ânus. Tentativas para se corrigir esse distúrbio podem contribuir para aliviar os sintomas desses pacientes. O relaxamento medicamentoso do esfíncter interno do ânus já é possível com o uso tópico do creme de glyceryl trinitrate, um doador de NO, sendo esse tratamento já aplicado nas fissuras anais crônicas, com bons resultados, produzindo diminuição da pressão anorretal e cura das fissuras⁽²⁸⁻³⁰⁾. No futuro, a manipulação do NO através de engenharia genética, inoculação viral, ou uso de medicações que liberem NO talvez sejam opções válidas no tratamento desses pacientes.

RIBEIRO Jr. U, SAFATLE-RIBEIRO AV, HABR-GAMA A, GAMA-RODRIGUES JJ, SOHN J & REYNOLDS JC -

SUMMARY: The pathophysiology of Chagas' disease is incompletely understood. Nitric oxide synthase neuron has been cited as a candidate neurotransmitter responsible for relaxation of the internal anal sphincter and could be involved in this disease. Neuronal Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) diaforase can be used as a marker for neuronal NO-synthase. *Aim:* To examine the alterations in the nitric oxide-synthase neurons of the colon of patients who underwent resections for advanced megacolon and to compare with small bowel of the same patients and with controls. *Methods:* Specimens from resected rectum and extramucosal small bowel biopsies of 11 chagasic patients were compared to 10 controls with colon cancer. Tissues were fixed in Zamboni's solution and evaluated by immunohistochemistry for NADPH diaforase-containing neurons. Immunoreactivity was evaluated on a 0 to 4 scale in the longitudinal muscle (LM), myenteric plexus (MP), circular muscle (CM), submucosal plexus (SMP), and mucosa (M). *Results:* Control cases showed well-stained myenteric and submucosal neurons, and a rich network of terminal nerve fibers in the muscle layers. Chagasic specimens had decreased immunostain in all layers of the gut. Overall there was a statistically significant decrease in NADPH diaforase-containing neurons. Clinically uninvolved small bowel biopsies also showed decreased immunoreactivity, but to a lesser degree. *Conclusions:* 1. NADPH diaforase activity is decreased in patients with advanced megacolon, especially in the myenteric plexus and the circular muscle. 3. Immunoreactivity is also diminished in the clinically uninvolved small bowel, but to a lesser extent.

KEY WORDS: Chagas' disease; nitric oxide synthase neuron; neuronal nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) diaforase; megacolon

REFERÊNCIAS

1. Okumur M, Corrêa-Neto A. Produção experimental de megas em animais inoculados com *Trypanosoma cruzi*. Rev Hosp Clín Fac Med São Paulo 1961; 18: 5.
2. Koberle F. Chaga's Disease and Chagas' Syndrome. The Pathology of American Trypanosomiasis. Adv Parasitol 1968; 6: 63-116.
3. Habr-Gama A, Raia A, Corrêa Neto A. Motility of the sigmoid colon and rectum. Contribution to the physiopathology of megacolon in Chagas' disease. Dis Colon & Rectum 1971; 14: 291-304.
4. Burleigh DE, D'Mello A, Parks AG. Responses of isolated human internal anal sphincter to drugs and electrical field stimulation. Gastroenterology 1979; 77: 484-90.

5. Burleigh DE. Non-adrenergic non-cholinergic inhibitory neurons in the human internal anal sphincter muscle. *J Pharm Pharmacol* 1983; 35: 258-60.
6. Gillespie JS, Xiu X, Martin W. The effects of L-arginine and N^o-monomethyl L-arginine on the response of the rat anococcygeus muscle to NANC nerve stimulation. *Br J Pharmacol* 1989; 98: 1080-2.
7. Li CG, Rand MJ. Evidence for a role of nitric oxide in the neurotransmitter system mediating relaxation of the rat anococcygeus muscle. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1989; 16: 933-8.
8. Bult H, Boeckxstaens GE, Pelckmans PA, Jordaens FH, Van Maercke YM, Herman AG. Nitric oxide as an inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitter. *Nature* 1990; 345: 346-7.
9. Sanders KM, Ward SM. Nitric oxide as a mediator of nonadrenergic noncholinergic neurotransmission. *Am J Physiol* 1992; 262: G379-92.
10. Keef KD, Du C, Ward SM, McGregor . Sanders KM. Enteric inhibitory neural regulation of human colonic muscle: the role of nitric oxide. *Gastroenterology* 1993; 105: 1009-16.
11. Stebbing JF, Brading AF, Mortensen NJM. Nitroergic innervation and relaxant response of rectal circular smooth muscle. *Dis Colon & Rectum* 1996; 39: 294-99.
12. Brecht DS, Hwang PM, Snyder SH. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature* 1990; 347: 768-70.
13. Costa M, Furness JB, Pompolo S, et al. Projections and chemical coding of neurons with immunoreactivity for nitric oxide synthase in the guinea-pig small intestine. *Neurosci Lett* 1992; 148: 121-5.
14. Young HM, Furness JB, Shuttleworth CW, Brecht DS, Snyder SH. Colocalization of nitric oxide synthase immunoreactivity and NADPH diaphorase staining in neurons of the guinea pig intestine. *Histochemistry* 1992; 97: 375-8.
15. Ward S, Xue C, Shuttleworth CW, Brecht DS, Snyder SH, Sanders KM. NADPH diaphorase and nitric oxide synthase co-localization in enteric nerves of the canine proximal colon. *Am J Physiol* 1992; 263: G2: 77-84.
16. Dawson TM, Brecht DS, Fotuhi M, Hwang PM, Snyder SH. Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 7797-801.
17. Hope BT, Michael GJ, Knigge KM, Vincent SR. Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. *Proc Acad Sci USA* 1991; 88: 2811-4.
18. O'Kelly T, Brading A, Mortensen N. Nerve mediated relaxation of the human internal sphincter: the role of nitric oxide. *Gut* 1993; 34: 689-93.
19. Bealer JF, Natuzzi ES, Buscher C, Ursell PC, Flake AW, Adzick NS, Harrison MR. Nitric oxide synthase is deficient in the aganglionic colon of patients with Hirschsprung's disease. *Pediatrics* 1994; 93: 647-651.
20. Moore BG, Singaram C, Eckhoff DE, Gaumnitz EA, Starling JR. Immunohistochemical evaluation of ultrashort-segment Hirschsprung's disease: report of three cases. *Dis Colon Rectum* 1996; 39: 817-822.
21. Cuffari C, Rubin SZ, Krantis A. Routine use of the nitric oxide stain in the differential diagnosis of Hirschsprung's disease. *J Pediatr Surg* 1993; 28: 1202-4.
22. Vanderwinden JM, De Laet MH, Schiffmann SN, et al. Nitric oxide synthase distribution in the enteric nervous system of Hirschsprung's disease. *Gastroenterology* 1993; 105: 969-73.
23. O'Kelly TJ, Brading AF, Mortensen NJ. Nerve mediated relaxation of the human internal anal sphincter: the role of nitric oxide. *Gut* 1993; 34: 689-93.
24. Gustafsson BI, Delbro DS. Tonic inhibition of small intestinal motility by nitric oxide. *J Auton Nerv Syst* 1993; 44: 179-87.
25. Middleton SJ, Cuthbert AW, Shorthouse M, Hunter JO. Nitric oxide affects mammalian distal colonic muscle by tonic neural inhibition. *Br J Pharmacol* 1993; 108: 974-9.
26. Rattan S, Sarkar A, Chadker S. Nitric oxide pathway in rectoanal inhibitory reflex of opossum internal anal sphincter. *Gastroenterology* 1992; 103: 43-50.
27. O'Kelly TJ, Davies JR, Brading AF, Mortensen NJ. Distribution of nitric oxide synthase containing neurons in the rectal myenteric plexus and anal canal: morphologic evidence that nitric oxide mediates the rectoanal inhibitory reflex. *Dis Colon Rectum* 1994; 37: 350-7.
28. Loder PB, Kamm MA, Nicholls RJ, Phillips RK. Reversible chemical sphincterotomy by local application of glyceryl trinitrate. *Br J Surg* 1994; 81: 1386-9.
29. Lund JN, Sholefield JH. A randomised, prospective, double-blind, placebo-controlled trial of glyceryl trinitrate ointment in treatment of anal fissure. *Lancet* 1997; 349: 11-14.
30. Schouten WR, Briel JW, Boerma MO, Auwerda JJ, Wilms EB, Graatsma BH. Pathophysiological aspects and clinical outcome of intra-anal application of isosorbide dinitrate in patients with chronic anal fissure. *Gut* 1996; 39: 465-9.

Endereço para correspondência:
Ulysses Ribeiro Junior
Rua Treze de Maio, 1954, Cj. 54
01327-002 - São Paulo - SP