



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE CIRURGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA**  
**MESTRADO EM CIRURGIA**

**FABIOLA ARAUJO CAPETO**

**ESTUDO DA CONTRATILIDADE DE SEGMENTOS ISOLADOS DE ESÔFAGO E  
ESTÔMAGO DE FETOS DE RATAS SUJEITOS A MODELO EXPERIMENTAL DE  
ATRESIA DE ESÔFAGO INDUZIDA POR DOXORRUBICINA**

**FORTALEZA**

**2014**

FABIOLA ARAUJO CAPETO

ESTUDO DA CONTRATILIDADE DE SEGMENTOS ISOLADOS DE ESÔFAGO E  
ESTÔMAGO DE FETOS DE RATAS SUJEITOS A MODELO EXPERIMENTAL DE  
ATRESIA DE ESÔFAGO INDUZIDA POR DOXORRUBICINA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Cirurgia, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Cirurgia.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Aldo Melo Filho.

FORTALEZA

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca de Ciências da Saúde

---

C241e Capeto, Fabiola Araujo.  
Estudo da contratilidade de segmentos isolados de esôfago e estômago de fetos de ratas sujeitos a modelo experimental de atresia de esôfago induzida por doxorubicina. / Fabiola Araujo Capeto. – 2014.  
89 f.: il. color., enc.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Cirurgia, Programa de Pós-Graduação em Cirurgia, Mestrado em Cirurgia, Fortaleza, 2014.

Área de Concentração: Metabolismo e Comportamento Biocelular no Estresse.  
Orientação: Prof. Dr. Antonio Aldo Melo Filho.

1. Atresia Esofágica. 2. Doxorubicina. 3. Carbacol. I. Título.

---

CDD 616.32

FABIOLA ARAUJO CAPETO

ESTUDO DA CONTRATILIDADE DE SEGMENTOS ISOLADOS DE ESÔFAGO E  
ESTÔMAGO DE FETOS DE RATAS SUJEITOS A MODELO EXPERIMENTAL DE  
ATRESIA DE ESÔFAGO INDUZIDA POR DOXORRUBICINA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Cirurgia, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Cirurgia.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Aldo Melo Filho.

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Antônio Aldo Melo Filho (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Armenio Aguiar dos Santos  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Olivia Andrea Alencar Costa Bessa  
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

À Deus,  
Ao meu marido, Jorge,  
À minha filha, Maria Claudia,  
À minha mãe, Fatima,  
À toda minha família e amigos.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Professor Dr. ANTÔNIO ALDO MELO FILHO, pela orientação.

Aos professores Dr. PEDRO JORGE CALDAS MAGALHÃES e Dr. ARMENIO AGUIAR DOS SANTOS, pela ajuda e incentivo.

Às professoras Dra. GUTENCILDA COLARES DE VASCONCELOS e Dra. GERLY ANNE DE CASTRO BRITO, pelo apoio e disponibilidade.

Aos colegas FABRÍCIO DE LAMARE RAMOS, FRANCISCO JOSE BATISTA DE LIMA, WILLY OKOBA, THAÍS FERNANDES DE ALMEIDA MESSIAS, e GABRIELA ABUD RIGONATTO, pelo tempo, pelas colaborações e pelos experimentos.

Aos funcionários dos laboratórios, em especial VANDA e SOCORRO, pelo suporte nos experimentos.

Aos funcionários do Programa de Pós-graduação em Cirurgia, em especial LUCIENE e MAGDA, pela atenção e ajuda.

À todas as pessoas que contribuíram direta e indiretamente para a conquista deste trabalho.

“O conhecimento nos faz responsáveis.”

(Che Guevara)

## RESUMO

A Atresia de esôfago (AE) é uma anomalia estrutural que acontece em fetos quando não ocorre a septação completa do septo esofagotraqueal. Estudou-se a repercussão da AE induzida por Doxorubicina (Doxo) na contratilidade *in vitro* do esôfago distal e fundo de estômago. 26 Ratas *wistar* (267 g), com acasalamento controlado, nos dias 8 e 9 de gestação receberam 2,2 mg/Kg de Doxo intraperitonealmente, enquanto 13 ratas controle receberam o mesmo volume de NaCl 0,9%. No dia 21,5 as ratas foram submetidas a cesariana, análise dos fetos para confirmação da AE e divisão em 3 grupos: controle, cujas mães receberam apenas NaCl 0,9%; Doxo sem AE, cujas mães receberam Doxo, mas não desenvolveram AE; e Doxo com AE, os que desenvolveram AE. Foram montados em sistema para banho de órgão isolado os anéis de fundo de estômago dos fetos e em sistema miógrafo de agulha os segmentos de esôfago distal, ambos contendo solução fisiológica Tyrode a 37 °C, pH 7,4 e oxigenação constante, tensão basal de 1 g para estômago e 8 mN para esôfago. Realizou-se curva concentração-efeito ao agonista colinérgico Carbacol (CCh) (0,01 – 300 µM) em ambos os tecidos nos 3 grupos. Em seguida, agora apenas nos segmentos de esôfago isolado, foi construída uma curva concentração-efeito ao KCl (10 – 100 mM), em que a contração se deve prioritariamente à entrada de cálcio do meio extracelular por meio de canais operados por voltagem (VOC). A análise estatística foi determinada utilizando *two-way* análise de variância (ANOVA) e a significância foi testada pelo *Student-Newman-Keuls test*. No fundo de estômago não houve diferença estatística entre os grupos na resposta contrátil ao CCh ( $p > 0,05$ , ANOVA), os valores da  $CE_{50}$  dos animais controle foram 2,17 [1,03 – 4,58] µM e  $E_{max}$  0,084 ± 0,016 g/mg de tecido (n=7); Doxo sem AE 1,47 [0,83 – 2,61] µM e 0,068 ± 0,006 g/mg de tecido (n=12); Doxo com AE 3,26 [1,90 – 5,60] µM e 0,070 ± 0,022 g/mg de tecido (n=6). No esôfago, animais controle com  $E_{max}$  5,97 ± 0,58 mN (n=11) foram estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ , ANOVA) dos grupos Doxo sem AE 4,48 ± 0,34 mN (n=11) e Doxo com AE 4,42 ± 0,68 mN (n=8), enquanto a  $CE_{50}$  não apresentou diferença estatística significativa entre os grupos ( $p > 0,05$ , ANOVA) controle 190 [96 – 379] nM, Doxo sem AE 228 [125 – 418] nM e Doxo com AE 439 [206 – 936] nM, quanto a resposta contrátil ao CCh. Na resposta ao KCl houve incremento de tensão inferior ao observado com CCh sem diferença entre os três grupos ( $p > 0,05$ , ANOVA),



valores de  $E_{max}$  foram no controle  $1,31 \pm 0,14$  mN (n=5), Doxo sem AE  $1,27 \pm 0,42$  mN (n=7) e Doxo com AE  $1,21 \pm 0,20$  mN (n=7). Concluiu-se que o tratamento de ratas com Doxo durante o período gestacional leva a uma diminuição da contratilidade de esôfago isolado de seus fetos, independente do desenvolvimento de AE. Aparentemente, essa diminuição não se deve a uma menor funcionalidade dos canais VOC. O fundo de estômago isolado não apresentou alterações da resposta contrátil.

**Palavras-chave:** Atresia de esôfago. Doxorubicina. Contratilidade. Carbacol. KCl. Rato.

## ABSTRACT

Esophageal atresia (EA) is a structural anomaly that results from an incomplete esophago-traqueal septation in the fetus during intrauterine development. The *in vitro* contractility of the distal esophagus and gastric fundus of fetuses with esophageal atresia induced by Doxorubicin (Doxo) was studied. 26 Female Wistar rats (267 g), were subjected to date-controlled mating, subsequently receiving 2.2 mg/kg Doxo intraperitoneally on days 8 and 9 of pregnancy, while a controlled group of 13 rats received the same volume of 0.9% NaCl. On day 21.5 the pregnant rats were submitted to a cesarean surgery, with the fetuses analysed to confirm EA and thereafter divided into 3 groups: control, whose mothers received only 0.9% NaCl; Doxo without EA, whose mothers received Doxo but not developed EA; Doxo with EA, who developed EA. After being sacrificed, ring-strips of the gastric fundus were obtained from the fetuses and mounted in isolated organ bath, while the distal esophageal strips were mounted in wire myograph system; both strips contained a standard Tyrode solution maintained at 37 °C, pH 7.4, in addition to constant oxygenation and a basal tension of 1 g for the fundic strips and 8 mN for the esophagus. For each set up, we carried out a cholinergic-agonist concentration-effect curve with Carbachol (CCh) (0.01 – 300 µM) in both tissue in the three groups. The participation of voltage-operated channels (VOCs) was studied; a KCl-concentration-effect curve (10 – 100 mM) was conducted on isolated esophageal strips. Collected data was subjected to two-way analysis of variance (ANOVA) and the significance was tested using Student-Newman-Keuls test. There was not significant statistical difference in fundic strips' contractility in response to CCh ( $p > 0.05$ , ANOVA), the  $EC_{50}$  values of the control animals were 2.17 [1.03 – 4.58] µM and  $E_{max}$  0.084 ± 0.016 g/mg tissue (n=7); Doxo without EA 1.47 [0.83 – 2.61] µM and 0.068 ± 0.006 g/mg tissue (n=12); Doxo with EA 3.26 [1.90 – 5.60] µM and 0.070 ± 0.022 g/mg tissue (n=6). However, significant statistical difference was noted ( $p < 0.05$ , ANOVA), in esophageal strips' contractility in response to CCh in the  $E_{max}$  value of control 5.97 ± 0.58 mN (n=11), vs Doxo without EA 4.48 ± 0.34 mN (n=11) and Doxo with EA 4.42 ± 0.68 mN (n=8), while there was not significant statistical difference ( $p > 0.05$ , ANOVA) in the  $EC_{50}$  value of control 190 [96 – 379] nM, Doxo without EA 228 [125 – 418] nM and Doxo with EA 439 [206 – 936] nM. Tensional response to KCl were present in all groups, though lower than that seen in response

to CCh, however not statistically different when comparing all the three groups ( $p > 0.05$ , ANOVA),  $E_{max}$  of control was  $1.31 \pm 0.14$  mN ( $n=5$ ), Doxo without EA  $1.27 \pm 0.42$  mN ( $n=7$ ) and Doxo with EA  $1.21 \pm 0.20$  mN ( $n=7$ ). It is possible to conclude that the treatment of rats with Doxo during pregnancy leads to decrease contractility of isolated esophagus of their fetuses, independent of the development of EA. Apparently, such a decrease is not due to a lower functionality of VOC channels. The isolated gastric fundus strips showed no change in contractile response.

**Keywords:** Esophageal atresia. Doxorubicin. Contractility. Carbachol. KCl. Rat.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Tabela 1	- Descrição anatômica e frequência da AE.....	17
Fluxograma 1	- Delineamento experimental para contratilidade esofágica e gástrica.....	47
Fluxograma 2	- Fluxograma da divisão das ratas e dos fetos entre os grupos Doxo e Controle.....	54
Gráfico 1	- Comparação da resposta induzida pelo Carbacol em segmentos de esôfago distal em fetos de ratos.....	56
Gráfico 2	- Comparação da resposta induzida pelo KCl em segmentos de esôfago distal em fetos de ratos.....	57
Gráfico 3	- Comparação da resposta induzida pelo Carbacol em segmentos de fundo gástrico em fetos de ratos.....	58
Tabela 2	- Propriedades da contratilidade da musculatura lisa nos segmentos de esôfago e estômago de fetos de ratos.....	59

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Identificação da AE e FTE de acordo com Rao (a) e Gross (b).....	18
Figura 2	- Esquema mostrando a cronologia do período gestacional e procedimentos experimentais.....	43
Figura 3	- Fotografia de um feto do grupo Doxo exibindo a grande incisão cérvico-tóraco-laparotomia.....	45
Figura 4	- Modelo de coleta para contratilidade de feto controle.....	46
Figura 5	- Sistema utilizado nos experimentos de contratilidade <i>in vitro</i> em esôfagos de ratos.....	49
Figura 6	- Esquema mostrando a montagem de anéis de fundo de estômago no sistema de contratilidade <i>in vitro</i> .....	50
Figura 7	- Sistema utilizado na avaliação da contratilidade gástrica.....	50
Figura 8	- Fotografia de uma porção anatômica do esôfago e da traqueia de feto normal (A), e de AE com FTE distal, tipo C de Gross (1953) (B).....	54

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AE	Atresia de Esôfago
ANOVA	Análise de Variância
CCE	Curva concentração-efeito
CCh	Carbacol
CEPA	Comissão de Ética em Pesquisa Animal
CE <sub>50</sub>	Concentração do agente contraturante necessária para produzir metade da resposta máxima
Doxo	Doxorrubicina
DRGE	Doença do refluxo gastroesofágico
EEl	Esfíncter Esofágico Inferior
EES	Esfíncter Esofágico Superior
E <sub>max</sub>	Efeito Máximo
E.P.M.	Erro padrão da média
FTE	Fístula Traqueo-esofágica
IA	Intestino Anterior
ICC	Células Intersticiais de Cajal
IP	Intestino Posterior
LAFARMULI	Laboratório de Farmacologia do Músculo Liso
LAFICA	Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer
NO	Óxido Nítrico
Nog	Noggin
RGE	Refluxo Gastroesofágico
SET	Septo Esofagotraqueal
Shh	<i>Sonic hedgehog</i>
SNE	Sistema nervoso entérico
TGI	Trato Gastrointestinal
UFC	Universidade Federal do Ceará
VACTERL ou VATER	Anomalias Vertebrais, Anorretal, Cardíaca, Traqueo-esofágica, Renal e Membros ( <i>Limb</i> )
VIP	Peptídeo intestinal vasoativo
VOC	Canais para Ca <sup>2+</sup> operados por voltagem

## LISTA DE SÍMBOLOS

®	Marca registrada
CaCl <sub>2</sub>	Cloreto de cálcio
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
°C	Graus Celsius
g	Grama
KCl	Cloreto de potássio
kg	Kilograma
K <sup>+</sup>	Íon de Potássio
mg	Miligrama
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de magnésio
ml	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimol
mN	MiliNewtom
mV	Milivolts
NaCl	Cloreto de sódio
NaHCO <sub>3</sub>	Bicarbonato de sódio
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Diidrogeno fosfato de sódio
nM	Nanomol
O <sub>2</sub>	Oxigênio
µm	Micrômetro
µM	Micromol

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
1.1	Atresia de esôfago em humanos.....	17
1.1.1	<i>Definição e tipos.....</i>	17
1.1.2	<i>Embriologia.....</i>	18
1.1.2.1	<i>Embriologia normal do esôfago.....</i>	18
1.1.2.2	<i>Embriologia na atresia de esôfago.....</i>	20
1.1.3	<i>Incidência e aspectos epidemiológicos.....</i>	21
1.1.4	<i>Diagnóstico.....</i>	22
1.1.4.1	<i>Pré-natal.....</i>	22
1.1.4.2	<i>Pós-natal.....</i>	22
1.1.5	<i>Tratamento.....</i>	23
1.1.6	<i>Evolução e prognóstico.....</i>	24
1.2	Motilidade do esôfago e estômago.....	26
1.2.1	<i>Sistema nervoso autônomo.....</i>	26
1.2.2	<i>Sistema nervoso entérico.....</i>	26
1.2.3	<i>Motilidade normal do esôfago e estômago.....</i>	29
1.2.4	<i>Motilidade do esôfago e estômago na atresia de esôfago.....</i>	31
1.2.4.1	<i>Doença do Refluxo Gastroesofágico pós-operatório na atresia de esôfago.....</i>	32
1.3	Modelos experimentais de atresia de esôfago.....	34
1.3.1	<i>Modelo da Doxorrubicina.....</i>	35
2	OBJETIVOS.....	39
2.1	Objetivo geral.....	40
2.2	Objetivos específicos.....	40
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	41
3.1	Animal.....	42
3.2	Locais de realização do estudo.....	42
3.3	Modelo experimental.....	42
3.4	Coleta das amostras.....	44
3.5	Delineamento experimental.....	46
3.6	Estudo da contratilidade.....	47
3.6.1	<i>Análise da contratilidade esofágica.....</i>	47



3.6.2	<i>Análise da contratilidade gástrica</i> .....	49
3.7	Análise estatística.....	51
4	RESULTADOS.....	52
4.1	Resultados do procedimento cirúrgico.....	53
4.2	Resultados da contratilidade esofágica e gástrica.....	55
5	DISCUSSÃO.....	60
6	CONCLUSÃO.....	66
	REFERÊNCIAS.....	68
	APÊNDICE A – AMPLITUDES DAS CONTRAÇÕES DO ESÔFAGO DISTAL EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CARBACOL NOS GRUPOS CONTROLE, DOXO COM AE E DOXO SEM AE.....	83
	APÊNDICE B – AMPLITUDES DAS CONTRAÇÕES DO ESÔFAGO DISTAL EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE KCI NOS GRUPOS CONTROLE, DOXO COM AE E DOXO SEM AE.....	85
	APÊNDICE C – AMPLITUDES DAS CONTRAÇÕES DO FUNDO GÁSTRICO EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CARBACOL NOS GRUPOS CONTROLE, DOXO COM AE E DOXO SEM AE.....	86
	APÊNDICE D – COMPROVANTE DO ENVIO DO ARTIDO PARA PUBLICAÇÃO.....	87
	ANEXO A – APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL – CEPA.....	89

# INTRODUÇÃO

---

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Atresia de esôfago em humanos

### 1.1.1 Definição e tipos

A atresia de esôfago (AE) é uma anomalia estrutural caracterizada por uma interrupção congênita da continuidade do esôfago (LIMA, 1999). Além da ausência de parte do órgão, as regiões esofágicas que se formam apresentam dano morfológico e funcional (BOLEKEN *et al.*, 2007; TOVAR; FRAGOSO, 2013; ZUCARELLO *et al.*, 2009).

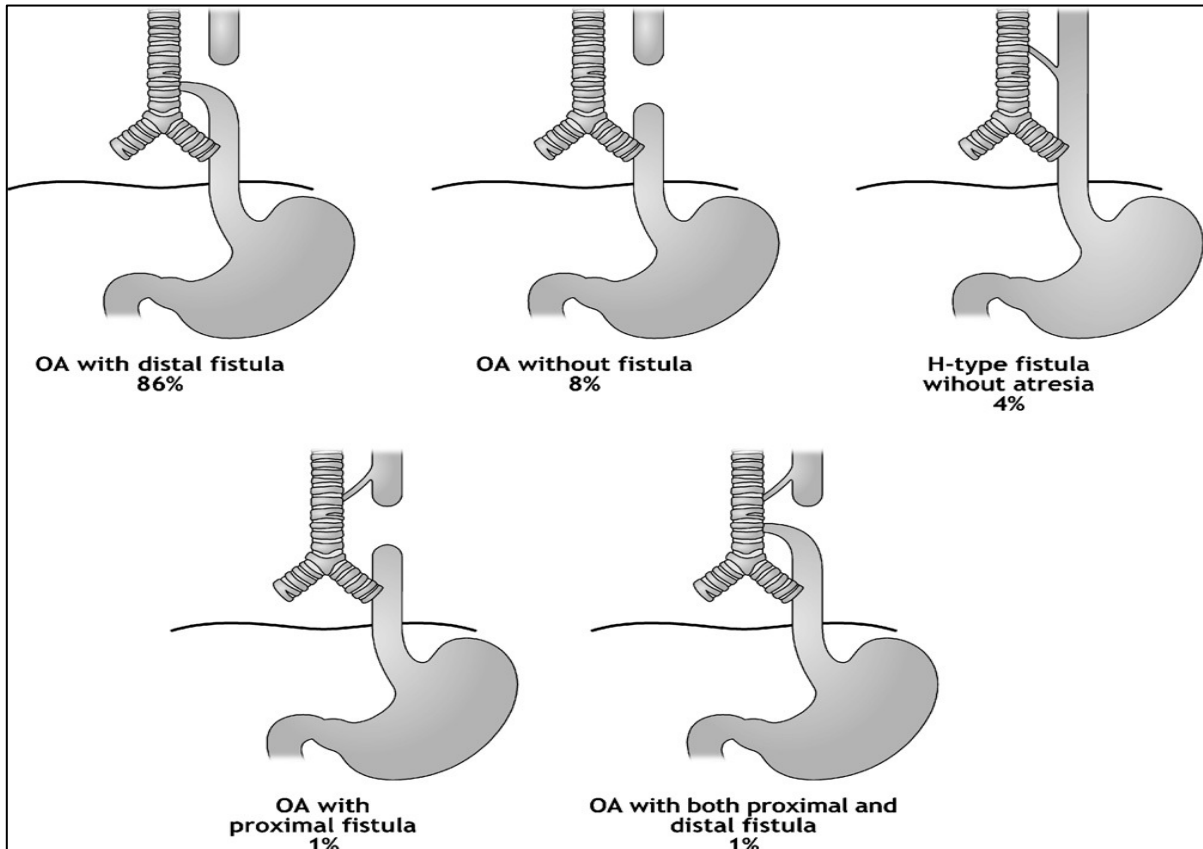
Diversos autores, empregando letras e/ou números, classificaram os diferentes tipos de AE (TABELA 1) (FIGURA 1) (GROSS, 1953; LEONIDAS; SINGH; SLOVIS, 2004; RAO, 2006; SINHA; SPITZ, 2010; VOGT, 1929). Independente da nomenclatura utilizada, o tipo mais frequente (aproximadamente 86%) de AE apresenta-se com o esôfago superior atrésico e o coto esofágico distal comunica-se com a traqueia. Tal comunicação chama-se fístula traqueo-esofágica (FTE). No segundo tipo mais frequente (8%), a atresia ocorre de forma isolada, sem FTE ou qualquer outra comunicação anômala com o trato respiratório. Os demais subtipos, por sua vez, são bem mais raros (LIMA, 1999; RAO, 2006; VOGT, 1929).

**TABELA 1 – Descrição anatômica e frequência da AE.**

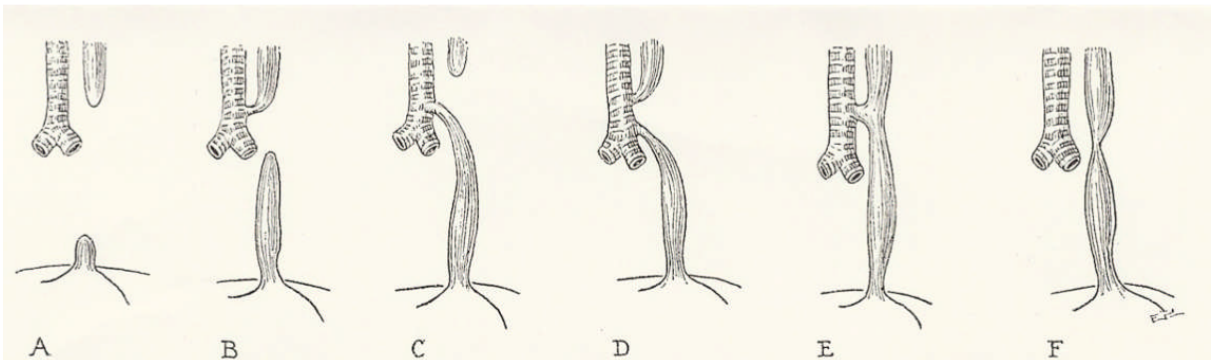
TIPOS	DESCRIÇÃO	FREQUENCIA (%)	VOGT	GROSS
III	AE e FTE distal	86	IIIb	C
I	AE isolada (sem FTE)	8	II	A
V	FTE tipo “H” sem AE	4		E
II	AE e FTE proximal	1	III	B
IV	AE e FTE proximal e distal	1	IIIa	D

FONTE: GROSS, 1953; RAO, 2006; SINHA; SPITZ, 2010; VOGT, 1929.

**FIGURA 1 – Identificação da AE e FTE de acordo com Rao (a) e Gross (b).**



FONTE: (a) RAO, 2006.



FONTE: (b) GROSS, 1953.

## 1.1.2 Embriologia

### 1.1.2.1 Embriologia normal do esôfago

Teorias que buscaram esclarecer como surge a divisão entre o trato gastrointestinal (TGI) (esôfago) e o trato respiratório, partindo da porção cranial até o local onde inicia o broto broncopulmonar, acabam por apresentar conflitos

(IOANNIDES; COPP, 2009). Uma teoria preconiza o desenvolvimento do sistema respiratório conseqüentemente ao acelerado crescimento do intestino anterior (IA) (SASAKI; KUSAFUKA; OKADA, 2001). Assim como acontece com o desenvolvimento de outros tratos como tireóide, timo e glândulas paratireóides, onde crescem rapidamente e distalmente do intestino, perdendo seus vínculos com ele. Esta teoria consolida a idéia padrão do acelerado crescimento longitudinal nas extremidades distais das estruturas broncopulmonares em desenvolvimento. Assim a traqueia brota do IA ventral e permanece separada deste durante toda a fase do desenvolvimento (IOANNIDES; COPP, 2009). Outra teoria propõe que a separação do lúmen do IA é feita em estruturas ventral (respiratória) e dorsal (gastrointestinal) (AREY, 1966; GRAY; SKANDALAKIS, 1972). Esta teoria pressupõe que o septo é formado por mesenquimas epiteliais opostos que crescem e se juntam na linha média, o que resulta na separação. Tal septo esofagotraqueal (SET) foi descrito como ascendente, onde a separação é realizada distalmente, ao nível dos brotos broncopulmonares (IOANNIDES; COPP, 2009).

Acredita-se que, em torno de três semanas da vida embrionária humana, parte da cavidade do saco vitelínico revestida por endoderma é envolvida pelo pequeno embrião para formar o intestino primitivo. Este se desenvolve e forma um tubo de extremidades cegas, sendo que na extremidade cefálica forma-se o IA e, na caudal, o intestino posterior (IP). A região intermediária do IP, o intestino médio, ainda permanece ligada ao saco vitelínico pelo ducto vitelínico. Por volta de quatro semanas, o divertículo respiratório ou traqueobrônquico surge na porção ventral do IA e é gradativamente separado pelo SET, dividindo o IA em ventral, que irá formar o trato respiratório e dorsal, que irá formar o esôfago (trato digestivo) (KLUTH; STEDING; SEIDL, 1987; MEREI *et al.*, 1999; SADLER, 1995; TEN HAVE-OPBROEK, 1991).

O SET é constituído pela junção medial de pregas, fendas ou invaginações laterais que surgem ao longo do IA quando dividido. Enquanto que o divertículo traqueal, quando na porção ventral, se estica e se separa distalmente em brotos pulmonares direito e esquerdo. Portanto, defeitos no desenvolvimento embrionário causam muitas malformações esôfago-traqueais. O surgimento da traqueia acontece no 22º dia embrionário e surge a partir de uma porção ventral do IP no qual foi dividido longitudinalmente e alongado, e o esôfago brota de uma porção dorsal do IP (O'RAHILLY; MÜLLER, 1984; SINHA; SPITZ, 2010).

Há ainda uma terceira teoria que agrega os princípios das duas principais, propõe que o desmembramento entre a traqueia e o esôfago seja o produto do desenvolvimento das dobras do IA (KLUTH; FIEGEL, 2003; KLUTH; STEDING; SEIDL, 1987).

De todo modo, ainda há muito a ser desvendado sobre a embriogênese do IA, notadamente os mecanismos de sinalização celular envolvidos (IOANNIDES; COPP, 2009; KLUTH; STEDING; SEIDL, 1987; MAEDA; DAVÉ; WHITSETT, 2007; MEREI *et al.*, 1999; XIA *et al.*, 1999b).

### 1.1.2.2 Embriologia na atresia de esôfago

As bases celulares e moleculares para o desenvolvimento normal da traqueia e do esôfago bem como para explicar a AE e a FTE ainda são pouco conhecidas. A priori, a AE surgiria quando não ocorre a septação completa do SET, mas com causa ainda indeterminada (LIMA, 1999). Mudanças no endoderma são obviamente críticas para a morfogênese do intestino primitivo. Contudo, acredita-se que o mesoderma também participe do processo normal, através de fatores de sinalização celular. Neste sentido, alguns investigadores sugerem que exista uma condensação mesenquimal no sítio da separação traqueo-esofágica (SASAKI; KUSAFUKA; OKADA, 2001). Outra questão a ser definida é o eventual papel de alterações no padrão normal de apoptose como fator causal para formação da AE e FTE (ORFORD *et al.*, 2001; WILLIAMS; QI; BEASLEY, 2000; ZHOU *et al.*, 1999).

Diversas vias de sinalização celular em tecidos embrionários têm sido estudadas, no intuito de esclarecer a patogênese da AE e FTE. Há demonstrações, por exemplo, em ratos, que a deleção do gene *sonic hedgehog* (Shh) seria uma via importante envolvida nestas afecções (LITINGTUNG *et al.*, 1998). Mais recentemente, Que *et al.* (2006), por sua vez, descreveram que 70% dos embriões de camundongos com AE com ou sem FTE são homozigotos para deleção do *Nog*, um gene que codifica o noggin, uma antagonista da proteína morfogenética de osso (Bmp). Este fenótipo parece estar associado com anormalidades na morfogênese da notocorda e defeitos na separação do endoderma. Li Y. *et al.* (2007) complementaram esta descoberta associando seus resultados a mecanismos de apoptose.

### 1.1.3 Incidência e aspectos epidemiológicos

As anomalias congênitas do tubo digestivo são frequentes, com incidência em torno de 1:3000 – 4000 nascido-vivos (LIMA, 1999; PINUS, 1998; SINHA; SPITZ, 2010). Especificamente, a AE incide em 1:2500 a 4500 nascido-vivos e apresenta-se associada a outras malformações neonatais em 50 a 80% das vezes, notadamente as cardiovasculares (MYERS, 1974; Qi *et al.*, 1996; SHAW-SMITH, 2006; SPITZ *et al.*, 1993).

A taxa de risco de surgimento de AE na população normal é de 1%, com discreto predomínio no sexo masculino. É também mais elevado em fetos de mães de primeira gestação, idade avançada, diabetes melito e que tiveram contato prolongado com drogas como contraceptivos orais e talidomida (HARMON; CORAN, 1998).

A AE pode surgir isolada (50% dos casos) ou associada a anomalias congênitas (também 50% dos casos). Entre as anomalias associadas figuram (BEASLEY; ALLEN; MYERS, 1997; CHITTMITRAPAP *et al.*, 1989; LIMA, 1999; PINUS, 1998; SINHA; SPITZ, 2010):

- ✓ doenças cardíacas congênitas (aproximadamente 30%), como comunicação intraventricular (CIV), tetralogia de Fallot ou atresia tricúspide (cerca de 50%);
- ✓ anomalias gastrointestinais (10 – 15%), como obstrução duodenal congênita e imperfuração anal (20%);
- ✓ anomalias genito-urinárias (10 – 15%), incluindo anormalidades uretrais, hidronefrose e agenesia renal;
- ✓ anomalias traqueo-bronco-pulmonares como por exemplo, traqueomalácia e agenesia / hipoplasia pulmonar;
- ✓ anomalias esqueléticas, por exemplo, anomalias vertebrais e de costelas, ausência do radio, ausência dos membros e agenesia sacral;
- ✓ anomalias cromossômicas (em até 20%), como a síndrome de Down (trissomia do cromossomo 21), síndrome de Patau (trissomia do cromossomo 13) e síndrome de Edwards (trissomia do cromossomo 18).

A síndrome de VATER ou VACTERL caracteriza padrão bem conhecido de associação da AE com anomalias vertebrais, anorretal, cardíaca, traqueoesofágica, renal e em membros (ORFORD; CASS, 1999).

## **1.1.4 Diagnóstico**

### **1.1.4.1 Pré-Natal**

O diagnóstico de AE é passível de ser suspeitado por ultrassonografia pré-natal através da visualização do estômago (bolha gástrica) reduzido de tamanho ou ausente associado a polidrâmnio (aumento do líquido amniótico) após a 18<sup>o</sup> semana gestacional (RAO, 2006; SINHA; SPITZ, 2010; STRINGER *et al.*, 1995). Além disto, na região cervical fetal, por vezes se consegue identificar a porção superior do esôfago terminando em fundo cego e imagem de deglutição fetal seguida de refluxo quando o conteúdo deglutido encontra o esôfago atrésico. A ressonância magnética também pode ser utilizada para complementar o diagnóstico (LANGER *et al.*, 2001; SHULMAN *et al.*, 2002).

### **1.1.4.2 Pós-Natal**

Após o nascimento, os neonatos portadores de AE apresentam um espectro de sinais e sintomas, consoante a presença ou não da FTE, as vezes aparente nas primeiras 24 horas de vida. Entre os sintomas estão: salivação excessiva e espumosa devido a presença de ar e desconforto respiratório (HOLDER, 1986; LIMA, 1999; RAO, 2006; SINHA; SPITZ, 2010).

Diante de suspeita pré-natal ou evidência de salivação excessiva após o nascimento, a passagem de uma sonda nasogástrica pelo médico ainda na sala de parto permite identificar ou suspeitar fortemente da AE (LIMA, 1999; PINUS, 1998). Por outro lado, se a AE não for logo identificada, complicações podem sobrevir como tosse, cianose, dispneia, sufocação e aspiração do leite nas primeiras amamentações, além de pneumonia do lobo superior direito frequentemente nos casos com mais de um dia de vida (PINUS, 1998; RAO, 2006).

Com a suspeita, o diagnóstico radiológico poderá ser obtido por meio da passagem de uma sonda nasogástrica e injeção de 2 ml de ar na intenção de provocar uma pequena dilatação na parte próxima a AE. Seguidamente, é realizado um exame de Raios-X no qual a sonda indicará o nível da atresia. Se presença de FTE, um exame de Raios-X simples de abdome mostrará ar no estômago; se for uma AE isolada, ausência de ar em todo o abdome. O exame de Raios-X também



poderá auxiliar na identificação de anomalias associadas como cardiopatias congênitas ou arco aórtico para o lado direito pelo achado de aumento da área cardíaca, além de malformações esqueléticas como hemivértebras. O ecocardiograma também é importante, na medida em que define a anatomia cardíaca e o posicionamento do arco aórtico (LIMA, 1999; RAO, 2006; SINHA; SPITZ, 2010).

### 1.1.5 Tratamento

A medida inicial mais importante é a manutenção de aspiração contínua do esôfago proximal atrésico, no sentido de prevenir broncoaspiração de saliva. Neste sentido, deve-se evitar ainda o uso da posição de Trendelenburg (SINHA; SPITZ, 2010). Nos casos de presença da FTE pode ocorrer a passagem do líquido gástrico para a traqueia e pulmões, ocasionando uma pneumonia química secundária que, depois, pode se tornar bacteriana: um grande problema no tratamento da AE (LIMA, 1999).

A primeira cirurgia de atresia de esôfago com sucesso foi realizada em 1941 por Cameron Haight da Universidade de Michigan, EUA, em um bebê do sexo feminino e com 12 dias de vida que permaneceu vivo após a cirurgia (HAIGHT; TOWSLET, 1943). Haight já havia tentando a cirurgia antes por cinco anos, de 1935 a 1939, e cinco vezes a correção da AE com FTE, sem êxito. Acredita-se que este foi o ano do surgimento da cirurgia neonatal atual. Adicionalmente, estudos mostram que muitos fatores foram refinados, permitindo uma sobrevida para estas crianças de até 100% na ausência de outras malformações (DEURLOO *et al.*, 2002; HOLDER, 1986; LOPEZ *et al.*, 2006; SHAW-SMITH, 2006; SINHA; SPITZ, 2010).

A correção primária da AE através de anastomose primária dos cotos esofágicos é considerada uma cirurgia semi-eletiva, onde se faz uma toracotomia póstero-lateral extrapleural ou transpleural do lado direito e expõe a parte proximal do esôfago. Quando existe a FTE, como na maioria dos casos, esta é dividida próxima à traqueia e então fechada com suturas preferencialmente não absorvíveis. Em seguida esta porção superior da traqueia proximal é mobilizada e depois realizada anastomose com uma única camada de suturas. Quando a criança apresenta anastomose sob tensão, deve ser mantida em ventilador mecânico com pescoço fletido por aproximadamente 4 – 5 dias (SINHA; SPITZ, 2010). As

alimentações nasogástricas podem ser iniciadas no segundo ou terceiro dia de pós-operatório e a alimentação oral usualmente após 7 dias de pós-operatório, depois do controle radiológico da anastomose (SPITZ *et al.*, 1993).

Nos casos sem fístula, não é possível fazer a anastomose de imediato sendo inicialmente procedido uma gastrostomia para alimentação e esofagostomia para drenagem da saliva deglutida. *A posteriori*, é procedida uma substituição do esôfago, usualmente pelo cólon ou estômago (LIMA, 1999; SINHA; SPITZ, 2010).

### 1.1.6 Evolução e prognóstico

Dependendo do peso do bebê ao nascer e das anomalias associadas, normalmente o prognóstico é bom. A sobrevida chega a 95% dos casos de recém-nascidos com mais de 2 kg e na ausência de anomalias associadas quando submetidos a cirurgia. Já os recém-nascidos com menos de 2 kg e com anomalias associadas a sobrevida diminui para 50%. A qualidade do serviço de cirurgia neonatal é avaliada pelo índice de sobrevida na AE (sendo superior a 85%) (LIMA, 1999).

Parte dos pacientes apresenta um pós-operatório sem grandes intercorrências. No entanto, outra manifesta inúmeras complicações esofágicas e respiratórias que acometem consideravelmente seu estado geral de saúde (CASTILLOUX; NOBLE; FAURE, 2010).

Várias complicações cirúrgicas podem ocorrer como:

- a) fístula anastomótica (15 – 20% dos casos): ocorre precocemente (< 48 h) e deve-se suspeitar se ocorrer pneumotórax. São indicadas drenagem torácica e exploração. Fístulas tardias podem ter tratamento conservador, embora possam ser seguidas pela formação de estenoses, e ainda fístulas pequenas devem ser vistas em exames de rotina feitos no 5 – 7º pós-operatório (CHITTMITTRAPAP *et al.*, 1992);
- b) fístula de repetição (5 – 14% dos casos): suspeita-se quando a criança apresenta tosse e asfixia durante a alimentação oral, ou ainda a criança apresenta infecção respiratória frequente mesmo após cirurgia reparadora de AE aparentemente bem sucedida. Pode-se examinar com esofagograma e broncoscopia (GHANDOUR *et al.*, 1990);

- c) estenose da anastomose (30 – 40% dos casos): ocorre quando uma alimentação precoce torna-se difícil. Várias crianças respondem bem a dilatação por balão, porém devem ser feitos acompanhamentos (CHITTMITTRAPAP *et al.*, 1990);
- d) refluxo gastroesofágico (RGE) ( $\pm$  40% dos casos): mais comum, sendo a maioria tratada com medicações e, por vezes, sendo necessário tratamento cirúrgico (PARKER; CHRISTIE; CAHILL, 1979; SPITZ, 1996);
- e) traqueomalácia ( $\pm$  10% dos casos): necessita de investigação através da broncoscopia por apresentar um colapso das vias aéreas, muitas vezes tratada por traqueostomia (FILLER; MESSINEO; VINOGRAD, 1992).

No estudo de Castilloux, Noble e Faure (2010), a explicação da mortalidade em crianças com AE e FTE abrange anomalias cromossômicas, insuficiência de múltiplos órgãos, hidropsia fetal, anencefalia, atresia traqueal e insuficiência respiratória. Neste estudo verificou-se, segundo a classificação de Gross (1953), que 84% dos pacientes possuíam AE tipo C, 7% possuíam tipo A, 6% possuíam tipo E (fístula isolada), 2% possuíam AE tipo B, e 1% possuíam AE tipo D. Com isso, verificou-se uma complexa evolução no primeiro ano de vida destas crianças e também após o primeiro ano, onde a mortalidade é devido a fatores prévios como complicações respiratórias e digestivas (CASTILLOUX; NOBLE; FAURE, 2010).

Existem várias características e classificações para distinguir o grupo de pacientes de alto e baixo risco. No geral, são considerados bebês de alto risco com AE aqueles com menos de 1,5 kg, prematuros (menos de 37 semanas gestacionais), portadores de doenças congênitas cardíacas associadas, pneumonias associadas e hiato alto. No outro grupo de alto risco estão as crianças que apresentam desnutrição e desidratação, casos de AE não diagnosticados e que o bebê é alimentado, casos de AE que necessitam percorrer longos caminhos em busca de cuidados terciários sem a supervisão necessária, recém-nascidos de mães anêmicas e desnutridas, e bebês cuidados em situações sem higiene e sem aspiração da porção superior (GUPTA; SHARMA, 2008).

Alguns autores classificam o prognóstico dos pacientes em grupos baseados no peso ao nascer, presença de pneumonia e outras anomalias congênitas (WATERSTON; CARTER; ABERDEEN, 1962). Spitz *et al.* (1994) reduzem a

classificação, porém mantêm os critérios de peso ao nascimento e presença de anomalias cardíacas. Segundo Teich *et al.* (1997), em 1993, Montreal incluiu os critérios da dependência do ventilador mecânico e principais anomalias associadas. Outros autores incluem também complicações pós-operatórias (SINHA; SPITZ, 2010).

A longo prazo, no entanto, as queixas mais comuns estão relacionadas a alterações na motilidade esôfago-gástrica, como disfagia e doença do refluxo gastroesofágico (DRGE). Estes podem mesmo persistir na idade adulta, repercutindo negativamente na qualidade de vida de tais pacientes (GUPTA; SHARMA, 2008; IJSSELSTIJN; VAN BEELEN; WIJNEN, 2013; KOIVUSALO; PAKARINEN; RINTALA, 2007; ORRINGER; KIRSH; SLOAN, 1977; TOVAR; FRAGOSO, 2013). Neste sentido, uma vertente de estudos relacionados à AE com FTE reside no intuito de esclarecer o déficit motor esofágico usualmente presente nestes pacientes.

## **1.2 Motilidade do esôfago e estômago**

### **1.2.1 Sistema nervoso autônomo**

O sistema nervoso autônomo usualmente se refere aos sistemas nervoso simpático e parassimpático. Estes sistemas possuem uma via motora com dois neurônios sendo um pré-ganglionar e o outro pós-ganglionar. Estes neurônios controlam muitos órgãos de forma antagônica, onde em alguns momentos obedecem o sentido toracolombar e em outros o craniossacral (BERNE *et al.*, 2004).

### **1.2.2 Sistema nervoso entérico**

O SNE compreende um amplo agrupamento de plexos ganglionares dentro das paredes do TGI (FURNESS, 2006, 2012). Esses plexos entéricos são muito mais complexos do que os outros elementos do sistema nervoso periférico e utilizam uma enorme diversidade de transmissores altamente coordenados de maneira específica (BROOKES, 2001; COSTA *et al.*, 1996; FURNESS, 2006, 2012).

Grande parte do TGI possui dois principais agrupamentos de gânglios interligados: o plexo mioentérico ou plexo de *Auerbach* situado entre as camadas

musculares longitudinal e circular; e o plexo submucoso ou plexo de *Meissner*, localizado na camada de tecido conjuntivo entre o epitélio da mucosa e a camada circular. O plexo mioentérico, no TGI humano, é desenvolvido em torno da 2<sup>a</sup> a 3<sup>a</sup> semanas gestacionais antes do plexo submucoso, sendo este último plexo formado a partir de células migratórias da camada muscular circular da região mioentérica (FU *et al.*, 2004; RADENKOVIC *et al.*, 2010; WALLACE; BURNS, 2005). O plexo mioentérico controla a motilidade, enquanto o plexo submucoso regula a secreção e o fluxo sanguíneo local. Particularmente, o plexo mioentérico não somente possui múltiplas classes de neurônios motores excitatórios e inibitórios que regulam a atividade do músculo liso, como também várias populações de interneurônios (FURNESS, 2006, 2012).

A motilidade do TGI se dá pelo controle de duas camadas musculares. A camada muscular da mucosa é uma camada fina de músculo liso localizada abaixo do lúmen da mucosa ao longo do trato digestivo. A camada muscular longitudinal é innervada pelos nervos colinérgicos excitatórios pós-ganglionares através do plexo mioentérico e submucoso do nervo vago em todas as espécies animais (HUSSAIN *et al.*, 2011).

A contração ou relaxamento, e indiretamente, a modulação da liberação do mediador inibitório ou excitatório, são causadas por muitas substâncias que são reconhecidas no SNE de mamíferos e se envolvem no controle da motilidade gastrointestinal atuando de modo direto no músculo liso gastrointestinal (FURNESS, 2006). Assim, ao contrário dos músculos esqueléticos, nem todo miócito gastrointestinal é innervado, os nervos extra e intramurais liberam neurotransmissores distintos tanto fisiologicamente (excitatórios, inibitórios) como farmacologicamente (adrenérgicos, colinérgicos, não-adrenérgico não-colinérgicos) e que se distribuem por intervalos maiores (SANTOS, 2009).

Em muitos reflexos podemos identificar a inibição da musculatura lisa do TGI, como por exemplo: relaxamento descendente do esôfago, relaxamento do esfíncter esofágico inferior (EEI) durante a deglutição, relaxamento receptivo no fundo do estômago, relaxamento do piloro e duodeno, relaxamento durante o reflexo peristáltico, relaxamento da válvula íleo cecal e relaxamento do esfíncter anal interno (FURNESS, 2006).

Podemos encontrar na musculatura do TGI até o SNE, as células intersticiais de Cajal (ICC), que são vários tipos de grupos de células diferentes e específicas na

população humana, morfológicamente e funcionalmente alternadas entre os segmentos do SNE e as células musculares lisas (SANDERS, 1996; THUNEBERG, 1982; WARD, 2000; WARD; SANDERS, 2001). Estas ICC são encontradas no trato digestivo humano, como por exemplo, no esôfago, estômago, intestino delgado e grosso até o esfíncter interno do ânus (BECKETT *et al.*, 2005; FAUSSONE-PELLEGRINI; CORTESINI, 1985; TORIHASHI; HORISAWA; WATANABE, 1999). No estômago humano encontramos menos ICC no fundo do que no corpo e no antro gástricos (KOMURO, 1999; MAZET; RAYNIER, 2004; MITSUI; KOMURO, 2003; STREUTKER *et al.*, 2007). Análises de estudos demonstraram que estas células são originadas no mesoderma e não são decorrentes da crista neural (TORIHASHI; WARD; SANDERS, 1997; YOUNG *et al.*, 1996).

As ICC possuem um importante papel na investigação das contrações gastrointestinais e na etiologia e patogênese de vários distúrbios da motilidade. Estes distúrbios, que são principalmente no estômago, são evidenciados pela frequência ou amplitude anormal das ondas lentas e podem estar associados a anomalias das ICC (CHEN *et al.*, 1996; LIN; CHEN, 2001).

Assim, os neurônios motores excitatórios liberam acetilcolina para os receptores muscarínicos nas células musculares lisas, além de liberar substância P, e os neurônios motores inibitórios liberam peptídeo intestinal vasoativo (VIP) e óxido nítrico (NO) (BERNE *et al.*, 2004).

Os resultados de Radenkovic *et al.* (2010) concordam com estudos anteriores que, no final do período embrionário do estômago (7<sup>a</sup> e 8<sup>a</sup> semanas), existem células c-kit imunorreativas na porção externa da parede gástrica humana e que estas células estão presentes no plexo mioentérico ao nível da cárdia no final da embriologia e início da fase fetal (FAUSSONE-PELLEGRINI *et al.*, 2007; KENNY *et al.*, 1999; WALLACE; BURNS, 2005; WESTER *et al.*, 1999). Segundo Kenny *et al.* (1999), estas células estão presentes na 9,5<sup>a</sup> semana gestacional na camada muscular longitudinal, porém estão ausentes na 12<sup>a</sup> semana. Contudo, no mesmo estudo de Radenkovic *et al.* (2010), eles constataram que a camada muscular longitudinal surge depois da muscular circular, indo contra o que tem sido citado por Fu *et al.* (2004) e Wallace e Burns (2005), que dizem que as camadas musculares longitudinal e circular surgem ao mesmo tempo no TGI humano.

Descobertas mais atuais constataram que as alterações das ICC estão relacionadas a várias doenças intestinais, como estenose hipertrófica pilórica infantil,

dilatação gástrica idiopática e perfuração (ausência ou diminuição do número de ICC na musculatura longitudinal, circular e mucosa), doença de Hirschsprung (diminuição do número de ICC no plexo mioentérico), doença de Chagas, pseudo-obstrução e colite ulcerativa (OHSHIRO *et al.*, 2000; ROLLE *et al.*, 2002; STREUTKER *et al.*, 2007).

### 1.2.3 Motilidade normal do esôfago e estômago

O esôfago é um órgão longo, muscular e na forma de um tubo que se inicia na junção esôfago-faríngea no nível da sexta vértebra cervical e se estende até a junção esofagogástrica, com a finalidade de guiar o alimento da faringe até o estômago (responsável por acumular o alimento). É composto por três regiões anatômicas: esfíncter esofágico superior (EES), corpo do esôfago e EEI. Estes dois esfíncteres do esôfago tem uma fase de repouso, que relaxam em resposta à deglutição, e o corpo do esôfago tem contrações que se propagam (NURKO, 2008).

Funcionalmente o esôfago se divide em proximal e distal, onde devido a motilidade do tipo peristáltica, o alimento se move através das contrações peristálticas ao longo do esôfago, tendo o EES localizado na porção proximal e o EEI na porção distal do esôfago (SANTOS, 2009). Além disso, o nervo vago é responsável pela inervação da musculatura esofagiana, onde os músculos estriados são inervados por nervos excitatórios que liberam acetilcolina e por nervos inibitórios que liberam NO. Já o músculo liso é inervado por nervos motores viscerais, ou seja, fibras parassimpáticas pré-ganglionares, que fazem sinapse primariamente com as células nervosas do plexo mioentérico (BERNE *et al.*, 2004).

A motilidade esofágica humana distingue-se na porção estriada do esôfago (músculo estriado) e no músculo liso. Na parte cervical, o peristaltismo do esôfago é interposto por fibras vagais que fazem contato direto com o músculo estriado através da placa motora, e a acetilcolina é o principal neurotransmissor excitatório neste nível, agindo sobre os receptores colinérgicos nicotínicos (FARRÉ *et al.*, 2006). A atividade do músculo liso intrínseco, as vias nervosas intrínsecas ricas em neuropeptídeos e os nervos extrínsecos que se originam do sistema nervoso central comandam a motilidade do esôfago (DURANCEAU *et al.*, 1977; LEENDERTSE-VERLOOP *et al.*, 1987; PARKER; CHRISTIE; CAHILL, 1979; SHERMETA *et al.*, 1977; SPITZ; KIELY; BRERETON, 1987). Depois da primeira semana de vida,

ocorre um aumento na velocidade das ondas peristálticas no esôfago distal e uma leve mudança na pressão normal com a idade (JOLLEY; BARON, 1998).

As anormalidades motoras da motilidade esofágica incluem: relaxamentos incompletos dos EES e EEI, pressão diminuída do EEI e anormalidades na amplitude ou coordenação das ondas peristálticas no corpo do esôfago restaurado (ORRINGER; KIRSH; SLOAN, 1977; ROMEO *et al.*, 1987).

O estômago é dividido em três regiões diferentes: estômago proximal (incorporando o cárdia, fundo, e corpo proximal), estômago distal (corpo distal e antro) e piloro. Além disso possui três tipos de funções motoras: (1) armazenamento do alimento no fundo e corpo do estômago, (2) mistura dos alimentos através das contrações peristálticas que ocorrem no corpo gástrico e se movem em direção ao antro, e (3) esvaziamento do quimo (mistura resultante do alimento e secreções do estômago) a partir do estômago para o duodeno (IVATURY *et al.*, 2014; KOMORI; SUZUKI, 1986; XUE *et al.*, 1996). Funcionalmente, portanto, há duas áreas motoras distintas no estômago: fundo e antro.

As funções do estômago são conduzidas pela diferente atividade elétrica das células musculares lisas em várias regiões do estômago. No fundo, as células musculares lisas são eletricamente inativas ou, em algumas ocasiões, geram descarga de ruído de membrana (potenciais unitários). No corpo, as células musculares lisas produzem pequena amplitude de ondas lentas (até 15 mV) em uma elevada frequência. No antro, a amplitude das ondas lentas são de 20 – 30 mV e baseiam-se em dois componentes juntamente com os potenciais de pico na parte superior do componente secundário. O potencial de membrana de repouso das células do músculo liso são mais negativos no antro do que no fundo gástrico (KOMORI; SUZUKI, 1986; XUE *et al.*, 1996).

Durante a comunicação entre o SNE e as células efetoras surgem, em meados da 25<sup>a</sup> semana gestacional, os sinais iniciais de motilidade gástrica em fetos humanos. O Complexo Motor Migratório, que são as contrações cíclicas vistas no estômago e duodeno, aparecem com as ICC no decorrer da 32<sup>a</sup> semana gestacional (RADENKOVIC *et al.*, 2010). A maturidade funcional do sistema digestivo ocorre no decorrer da gestação e nos primeiros meses depois do nascimento (MEI *et al.*, 2009).



As desordens da motilidade, frequentes no estômago, são evidenciadas pela frequência anormal ou amplitude de ondas lentas e podem estar interligadas a anomalias das ICC (RADENKOVIC *et al.*, 2010).

#### **1.2.4 Motilidade do esôfago e estômago na atresia de esôfago**

O esôfago atrésico apresenta lesão em sua anatomia e fisiologia tanto em momento precoce (secundária a alteração embriológica) como em momento tardio, após correção cirúrgica (seja pela manipulação cirúrgica em si, seja por complicações futuras possíveis como esofagite pós-operatória). Acredita-se que alterações do SNE possam justificar tal quadro (CHENG *et al.*, 1997). Li K. *et al.* (2007) demonstraram, por exemplo, em esôfagos de humanos com AE e FTE, displasia intrínseca de plexos nervosos e aumento de expressão de alguns neuropeptídeos, como VIP e NO. Desta forma, a correção primária da AE recompõe o curso do trato alimentar, porém não corrige a normalidade e a função motora normal esofágica (DURANCEAU *et al.*, 1977; LEENDERTSE-VERLOOP *et al.*, 1987; PARKER; CHRISTIE; CAHILL, 1979; SHERMETA *et al.*, 1977; SHONO *et al.*, 1993; SPITZ; KIELY; BRERETON, 1987).

A longo prazo, muitas crianças retornam a alimentação normal permitindo seu crescimento e desenvolvimento normais, provavelmente ocorre um atraso na ingestão de alimentos sólidos neste grupo. O ato de engolir é eficaz porém não é normal. Com isso o peristaltismo encontra-se debilitado ou ausente e várias crianças desenvolvem a habilidade de mastigar bem e beber líquidos durante as refeições (SINHA; SPITZ, 2010).

Adicionalmente, estas crianças apresentam constantes problemas respiratórios como infecções torácicas de repetição e asfixia durante a alimentação, notadamente nos três primeiros anos de vida. A etiologia destas pode ser oriunda da dismotilidade esofágica e/ou DRGE com aspiração recorrente ou ainda anormalidades primárias respiratórias (SPITZ, 2007).

A dismotilidade é um grande fator causal no problema da deglutição a longo prazo vista nestas crianças, uma vez que atinge o esôfago distal apresentando uma coordenação anormal de contrações (DURANCEAU *et al.*, 1977). Isto parece se correlacionar também com maior incidência de DRGE, incluindo esôfago de Barrett,

tanto na infância como na vida adulta (TAYLOR *et al.*, 2007; ZHOU; HUTSON; MYERS, 2001).

As desordens na motilidade gástrica a longo prazo foram estudadas pelo esvaziamento gástrico em pacientes com AE e FTE por Romeo *et al.* (2000) através da cintigrafia gástrica comparando estes resultados à dados manométricos gástricos. A disfagia e dispepsia foram as maiores queixas, presentes em 20% e 40%, respectivamente, dos pacientes operados depois de 15 – 25 anos após a cirurgia inicial. E este estudo certificou-se que alteração na motilidade gástrica vistas em FTE permanecem na fase adulta (ROMEO *et al.*, 2000).

A medida que estas crianças avançam na idade, estes problemas tendem a diminuir devido ao crescimento da via aérea e melhora da estabilidade do lúmen, porém esse risco na fase adulta permanece, repercutindo negativamente na qualidade de vida de tais pacientes (SINHA; SPITZ, 2010).

#### **1.2.4.1 Doença do Refluxo Gastroesofágico pós-operatório na atresia de esôfago**

A complicação mais frequente em pacientes com AE corrigida é a DRGE, por vezes associada a esofagite (BERGMEIJER; TIBBOEL; HAZEBROEK, 2000; LEENDERTSE-VERLOOP *et al.*, 1987; LIMA, 1999; PARKER; CHRISTIE; CAHILL, 1979; ZHOU; HUTSON; MYERS, 2001).

Há diversidade de fatores que contribuem para a DRGE, entre eles, os relacionados com anormalidades esofágicas (DURANCEAU *et al.*, 1977; ORRINGER; KIRSH; SLOAN, 1977; ROMEO *et al.*, 1987; SHONO *et al.*, 1993). Estes fatores incluem: EEI e função crural (hérnia de hiato), relaxamento do EEI transitório, mecanismo de liberação esofageal (motilidade esofágica, saliva), reflúidos (ácido gástrico, bile, enzimas), resposta da mucosa para reflúido, medicamentos que afetam a barreira anti-refluxo (nitratos, antagonistas do cálcio) e dieta (gordura, cafeína) (BANKS, 2009).

Especificamente na AE, entende-se que uma das principais causas para o surgimento de DRGE seria alterações na junção esofagogástrica com consequente redução da eficiência da barreira anti-refluxo (TOVAR; FRAGOSO, 2013). Por sua vez, também o clearance esofágico nestes pacientes, outra importante barreira contra o RGE, é significativamente reduzido no pós-operatório (CATALANO *et al.*,

2011; DI PACE *et al.*, 2011; FRÖHLICH *et al.*, 2008). A porção distal do esôfago de pacientes com AE mostra motilidade deficiente e essa alteração, provavelmente, é crítica para o desenvolvimento de RGE nesses pacientes (DUTTA; RAJANI; BHATNAGAR, 2000; KAWAHARA *et al.*, 2007).

Estudos por combinação de impedância intraluminal multicanal e medição de pH sugerem que muitos episódios de refluxo são fracamente ácidos ou não ácidos e associados a movimentos retrógrados de *bolus* (CATALANO *et al.*, 2011; FRÖHLICH *et al.*, 2008). O estudo de Fröhlich *et al.* (2008) em crianças com idade média de 3,5 anos com AE corrigida, sendo a maioria (87,5%) com FTE distal, classificação IIIb de Vogt (1929), encontraram metade dos episódios de RGE em pacientes do grupo AE somente pela impedância intraluminal multicanal. Já o estudo retrospectivo de Catalano *et al.* (2011), em pacientes com idade média de 15 meses com AE e RGE, demonstrou refluxos não ácidos na maioria dos pacientes (76,4%).

Particularmente, uma falha nas contrações esofágicas distais está significativamente correlacionada com o desenvolvimento do RGE (KAWAHARA *et al.*, 2007). A manometria esofágica pós-operatória convencional ou de alta resolução revela diversas alterações como ausência ou incoordenação de ondas peristálticas, contrações simultâneas, contrações de baixa amplitude e alta pressão da linha de base (ASPIROT; FAURE, 2013; LEMOINE *et al.*, 2013).

No estudo de Lemoine *et al.* (2013), essa manometria esofageana de alta resolução, técnica nunca utilizada previamente neste grupo de pacientes, evidenciaram que nenhum paciente presente em tal estudo apresentou padrão peristáltico normal. Além disso, puderam identificar 3 (três) diferentes padrões peristálticos em crianças com cirurgia de AE corrigida anteriormente: aperistalse completa, pressurização e contração distal. Sendo a pressurização caracterizada como uma contração posterior a deglutição em conjunto ao relaxamento da junção esofagogástrica que acontece junto ao comprimento do corpo esofágico (LEMOINE *et al.*, 2013).

Alguns estudos têm mostrado também um retardo no esvaziamento gástrico em pacientes após reparo de AE e RGE e é controverso sua relação com a DRGE. A etiologia desse atraso não é bem conhecida mas deve ter relação com a própria origem ou ser efeito secundário da cirurgia (ROMEO *et al.*, 2000; YAGI *et al.*, 1997).

O estudo de Bókay, Kis e Verebély (2005) analisou a atividade mioelétrica gástrica através da eletrogastrografia realizada antes e após a amamentação em 15

pacientes com correção cirúrgica de AE e 10 pacientes controle sem alteração gastrointestinal. A idade média foi de 84 dias para o grupo AE e 30 dias para o controle. Durante 24 h, foi avaliado o RGE nessas crianças com AE corrigida através da mensuração do pH no esôfago distal, no qual foi observado depois da alimentação uma redução de taquigastria e um significativo aumento de bradigastria quando comparado ao período pré-prandial, além de uma atividade mioelétrica anormal em 73,33% dos pacientes com AE e 10% nos pacientes controle, durante o jejum. No entanto, eles não conseguiram demonstrar qualquer diferença significativa na atividade mioelétrica gástrica entre RGE-negativo e RGE-positivo em pacientes com AE (BÓKAY; KIS; VEREBÉLY, 2005).

### **1.3 Modelos experimentais de atresia de esôfago**

Por vários anos, cirurgiões pediátricos pesquisadores tentaram desenvolver um modelo animal de AE e FTE seguro e reprodutível. Inicialmente várias técnicas foram utilizadas nas quais foram empregadas uma variedade de espécies animais mais semelhantes à espécie humana (KLECKNER; PRINGLE; CLARK, 1984; TRAHAIR; WING; HORN, 1995; WESSON *et al.*, 1984).

Wilson, Roth e Warkany (1953) e Kalter e Warkany (1957) observaram que a AE e FTE, além das malformações traqueoesofágicas, são ocasionadas pela retirada de vitamina A (riboflavina) da dieta de ratas grávidas. Este modelo exclui qualquer aspecto etiológico molecular e celular destas malformações e não permite compreender a AE e FTE como uma anomalia do desenvolvimento traqueoesofágico.

Outro modelo experimental estudado foi o modelo cirúrgico de AE e FTE, no qual Piekarski e Stephens (1976) empregando a hiperflexão induzida em embriões de galinha através de distúrbio no alinhamento, direção e extensão do intestino anterior e grosso, além de defeitos no septo responsáveis pela maioria das malformações, visualizaram o intestino anterior primitivo durante o período de diferenciação. Este modelo, no entanto, não é confiável pois esta teoria nunca foi comprovada (PIEKARSKI; STEPHENS, 1976). Ainda assim, Kleckner, Pringle e Clark (1984) tentaram testar esta teoria porém obtiveram somente 1 (um) caso de FTE tipo H e não houve desenvolvimento de AE no estudo deles.

Kluth, Steding e Seidl (1987) também estudaram em embriões de galinhas, a região do intestino proposta por Hamburger e Hamilton (1951) através da microscopia eletrônica de varredura e microscopia da luz, um outro modelo cirúrgico, e concluíram que tanto o desenvolvimento do esôfago quanto da traqueia sucedem da diminuição do intestino primitivo.

Outro tipo de modelo experimental estudado foi o modelo *knockout* de VATER. Kim J., Kim P. e Hui (2001) e Kim P., Mo e Hui (2001) encontraram em camundongos mutantes, com ausência do gene *Shh*, anomalias de VATER. Litingtung *et al.* (1998) estudaram homocigotos de camundongos mutantes com *Shh*-nulo e evidenciaram AE com estenose, FTE e anormalidades traqueal e de pulmão, como visto em deformidades de intestino em recém-nascidos humanos, bem como malformações anorretais (MO *et al.*, 2001).

### 1.3.1 Modelo da Doxorrubicina

O modelo experimental mais empregado para estudo da AE e FTE é o de teratogênese por Doxorrubicina (Doxo, também conhecida por Adriamicina) em ratos. O uso nestes animais permite comparação adequada ao padrão humano (MORTELL; MONTEDONICO; PURI, 2006).

Thompson *et al.* (1978) foram os primeiros a descreverem as repercussões da aplicação via intraperitoneal de 2 mg/kg de Doxo por peso de ratas *Sprague Dawley* grávidas, em única dose nos dias 6<sup>o</sup> ao 9<sup>o</sup> de idade gestacional. Malformações viscerais e externas, bem como alteração na divisão do IA provocando AE, são vistas quando aplicada Doxo nesta idade gestacional. Por sua vez, Diez-Pardo *et al.* (1996), mais tarde, caracterizam-no como um modelo experimental em Cirurgia Pediátrica para estudo de AE e FTE. Com o tempo, o modelo se tornou o mais utilizado para pesquisar AE e FTE, em particular para estudar a embriogênese, histopatologia, malformações associadas e sua relação com o padrão humano (MORTELL; MONTEDONICO; PURI, 2006; ORFORD; CASS, 1999; XIA *et al.* 1999a). Além disto, ele é capaz de desencadear outras malformações digestivas, respiratórias, cardiovasculares, urinárias e ósseas (DIEZ-PARDO *et al.*, 1996; MEREI *et al.*, 1997; ORFORD; CASS, 1999; POSSÖGEL *et al.*, 1999; QI *et al.*, 1997a; XIA *et al.*, 1999a,b).

Ajustes no modo de utilização da Doxo foram feitos, no intuito de produzir as alterações desejadas, sem promover óbito fetal (XIA *et al.*, 1999a; ORFORD; CASS, 1999). O óbito ou a reabsorção da maior parte dos fetos acontecem quando a dose aplicada é elevada e em fase muito precoce da gestação. Por outro lado, malformações não são apresentadas quando as doses são inferiores e aplicadas mais tardiamente (BEASLEY *et al.*, 2000). Quando se aplica a dose de Doxo além de 2,5 mg/kg de peso expõe-se à involução ou reabsorção fetal e ao fracasso do teste (ORFORD; CASS, 1999). No sentido de estudar especificamente a AE, o ideal é que se possa obtê-la em feto com baixa associação com anormalidades mais graves, minimizando possíveis confusões na interpretação de resultados.

Para conseguir uma satisfatória quantidade de AE, a maior parte dos estudos empregam dose única diária de Doxo. Esta dose varia de 1,5 a 2,2 mg/kg de peso, sendo aplicada diariamente por via intraperitoneal durante quatro dias: do 6º ao 9º dia gestacional (CRISERA *et al.*, 2000; QI *et al.*, 1996; XIA *et al.*, 1999a).

Xia *et al.* (1999a,b) foram os primeiros autores a restringirem o tempo de aplicação da droga. Eles administraram Doxo em dois dias, 8º e 9º dias gestacionais, 2 mg/kg de peso de rata, via intraperitoneal. Empregando posologia simplificada (aplicação de 2,2 mg/kg de peso da rata de Doxo nos dias 8 e 9 gestacional), França *et al.* (2004) obtiveram, por exemplo, 91% de atresia de esôfago, 92% de atresia duodenal, 95% de hidronefrose e 84% de hipoplasia de bexiga.

A Doxo é um antibiótico glicosídico da classe Antraciclina que atua na fase S do ciclo celular, inibindo a enzima topoisomerase II e a divisão celular (TEWEY *et al.*, 1984). Sua ação nesta fase ativa a apoptose ao interferir na síntese de DNA e RNA, com conseqüente perda celular, particularmente na porção póstero-superior do IA e em outros órgãos, causando também um potencial molecular das malformações encontradas, resultante da conseqüência do fracasso na evolução embriológica do mesoderma (BEASLEY *et al.*, 2000; ORFORD; CASS, 1999; WILLIAMS; QI; BEASLEY, 2000).

Este mesmo modelo pode ser aplicado a camundongos, quando o objetivo é detalhar o mecanismo do dano embriológico, na medida em que, para tal espécie, há maior disponibilidade de apresentação de sondas moleculares e anticorpos (IOANNIDES *et al.*, 2002, 2003). Para estudo das lesões pós-natais, no entanto, face ao tamanho dos órgãos, o rato é mais adequado que o camundongo.

Sabe-se que a anatomia da junção esofagogástrica do rato é externamente muito similar à dos humanos. O segmento intra-abdominal do esôfago é proporcionalmente mais longo e o cárdia localiza-se mais distalmente na pequena curvatura, deixando um amplo fundo gástrico (MONTEDONICO *et al.*, 1999a). Análises da arquitetura muscular e manometria da junção esofagogástrica do rato revelaram também papel conjunto do EEI e crura diafragmática em seu mecanismo anti-refluxo (MONTEDONICO *et al.*, 1999a). Acredita-se que tal barreira seja talvez mais sólida que em humanos (MONTEDONICO; DIEZ-PARDO; TOVAR, 1999). Com tais particularidades anatômicas, o rato tem sido amplamente empregado para pesquisa experimental em diversas situações que facilitam a DRGE em humanos, como hérnia diafragmática congênita (QI *et al.*, 1997b), esôfago curto (MONTEDONICO *et al.*, 1999b) ou obstrução de vias aéreas superiores (WANG *et al.*, 1993).

Segundo estudo de Zhou, Hutson e Myers (2001), empregando o modelo experimental de AE induzido por doxorrubicina, demonstrou que o comprimento do esôfago intra-abdominal é mais curto e o tamanho do hiato esofágico é maior do que nos controles, demonstraram que o comprimento do esôfago intra-abdominal na AE é mais curto e o tamanho do hiato esofágico é maior do que nos controles. Insinuaram ainda que essas diferenças no tamanho das porções do esôfago dos fetos doxo comparados aos controles, sejam devido a anomalias anatômicas de hiato em fetos de ratos com AE e FTE. Tais anomalias representadas por alargamento do hiato esofágico durante a embriogênese anormal seriam relacionadas a maturação anormal diafragmática secundária à exposição a Doxorrubicina (ZHOU; HUTSON; MYERS, 2001). Estas alterações hiatais e esofágicas devem concorrer para que crianças com AE e FTE apresentem frequentes sintomas de RGE, mesmo após operações corretivas.

Como dito anteriormente, a AE cursa com dano à motilidade esofágica inicial e também no pós-operatório. Há vários estudos clínicos e experimentais demonstrando alterações na inervação intrínseca esofágica na AE ainda no pré-operatório (BOLEKEN *et al.*, 2007; CHENG *et al.*, 1999; ZUCCARELLO *et al.*, 2009). Contudo, em relação à motilidade, no âmbito clínico, quase todos os estudos existentes, por questões de limitação técnica, se detiveram em estudar tais órgãos após a correção cirúrgica definitiva: anastomose primária nas AE com fístula traqueoesofágica (ASPIROT; FAURE, 2013; CATALANO *et al.*, 2011; DI PACE *et al.*,

2011; FRÖLICH *et al.*, 2008; LEMOINE *et al.*, 2013). Permanece, assim, a dúvida se as alterações de inervação já trariam repercussão à motilidade esofágica e mesmo gástrica, ainda no pré-operatório, como dano inicial. No sentido de identificar e compreender as alterações de motilidade esofágicas e gástricas ocasionadas apenas pelo dano inicial embriológico, o emprego de modelo experimental de indução AE por Doxo em ratos surge como uma ferramenta bastante útil (DIEZ-PARDO *et al.*, 1996). A partir deste modelo, há apenas dois trabalhos publicados, de um mesmo grupo, analisando contratilidade *in vitro* em tais órgãos (TUGAY *et al.*, 2001, 2003). Haja vista que tais alterações, no âmbito clínico, são significativas, outros estudos que possam colaborar no melhor entendimento deste tema são importantes para a compreensão e manejo da AE tanto a curto quanto a longo prazos.



# **OBJETIVOS**

---

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Estudar a contratilidade esofágica e gástrica no modelo de atresia de esôfago (AE) experimental em fetos de ratas.

### **2.2 Objetivos específicos**

Reproduzir o modelo experimental de desenvolvimento de atresia de esôfago induzida por doxorubicina em fetos de ratas.

Estudar *in vitro* a contratilidade de segmentos isolados de esôfago distal, por estimulação com carbacol e KCl, em modelo experimental de AE.

Estudar *in vitro* a contratilidade de segmentos isolados de fundo gástrico, por estimulação com carbacol, em modelo experimental de AE.

# **MATERIAL E MÉTODOS**

---

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Animal

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*, variedade albino) *Wistar*, machos e fêmeas maduros, de fertilidade comprovada, pesando em torno de 267 g e provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (UFC), sendo utilizados 1 macho para cada 2 fêmeas. Estes machos não foram sacrificados, apenas foram utilizados para acasalamento e não receberam qualquer intervenção. Os animais foram aclimatados com ciclos naturais dia/noite, água e ração à vontade.

O protocolo de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (CEPA/UFC), sob o número de protocolo 27/2011, aprovado em 29/08/2011 (ANEXO A).

#### 3.2 Locais de realização do estudo

- Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA)
- Laboratório de Farmacologia do Músculo Liso (LAFARMULI)

Ambos da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC).

#### 3.3 Modelo experimental

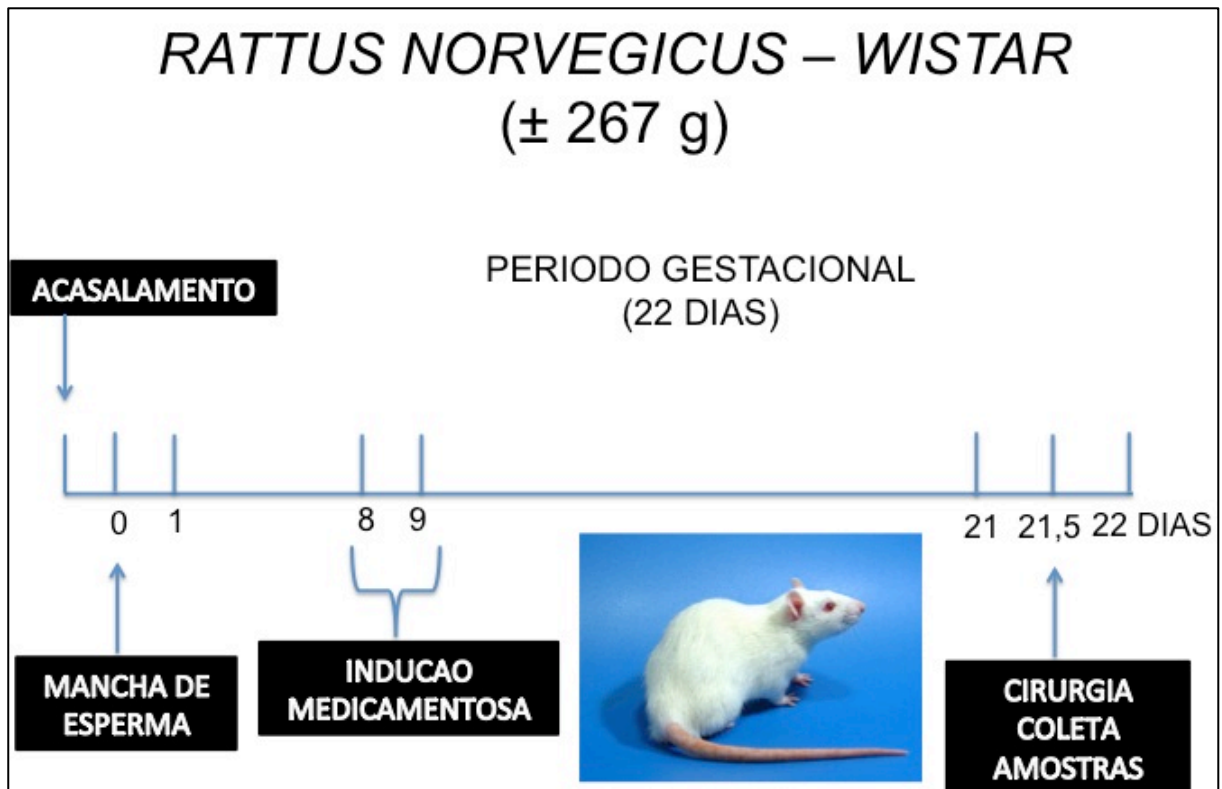
Durante o período noturno, as ratas foram divididas aleatoriamente e transferidas para gaiolas individuais, ratas em estro ou proestro, para acasalamento com machos na proporção de duas fêmeas e um macho por gaiola. Na manhã do dia seguinte ao acasalamento, as ratas foram submetidas a um lavado vaginal, com soro fisiológico e pipeta plástica descartável, e preparada uma lâmina para visualização do lavado em microscópio óptico com aumento de 40X (Model BX41, Olympus Optical Co., Ltd., Tóquio, Japão). Confirmou-se o acasalamento por meio da presença de espermatozóides nesse esfregaço vaginal, e este dia foi então marcado como o dia zero de gravidez (termo da gestação = 22 dias).

As ratas grávidas foram alojadas em gaiolas com oferecimento de ração específica e água *ad libitum*, durante o período gestacional, respeitando novamente os ciclos naturais dia/noite.

Deste modo, 39 ratas revelaram-se grávidas: 26 ratas constituíram o grupo Doxo e 13 ratas o grupo controle, gerando 273 fetos, sendo utilizados 65 deles para o estudo da contratilidade.

No sentido de induzir AE experimental, o presente estudo utilizou o modelo no qual administrou-se nas fêmeas grávidas do grupo Doxo, 2,2 mg/kg de peso de rata de Doxorubicina na forma de Cloridrato de Doxorubicina (10 mg / 5 ml; Doxolem®, Zodiac, Pindamonhangaba, SP, Brasil) diluídos em igual volume de soro fisiológico (solução salina; NaCl 0,9%) por via intraperitoneal, nos dias 8 e 9 de gestação (D8 e D9) como descrito por França *et al.* (2004). O grupo controle foi composto por fêmeas grávidas com a mesma idade gestacional e receberam igual volume de soro fisiológico 0,9%, também via intraperitoneal e do mesmo modo em dois dias consecutivos (FIGURA 2).

**FIGURA 2 – Esquema mostrando a cronologia do período gestacional e procedimentos experimentais.**



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

### 3.4 Coleta das amostras

No dia 21,5 de gestação, as ratas foram submetidas a cesariana com coleta dos fetos. Os experimentos foram realizados no LAFICA – UFC.

As ratas *Wistar* grávidas foram pesadas e submetidas à anestesia geral com injeção intramuscular de Ketamina (50 mg/ml; Ketalar<sup>®</sup>, Cristália, Itapira, SP, Brasil) na dose de 1,25 ml/kg de peso de rata, associada com Xilazina (10 mg/ml; Coopazine<sup>®</sup>, Coopers<sup>®</sup>, Cotia, SP, Brasil) na dose de 0,25 ml/kg por animal aplicada por via intramuscular na musculatura lateral da coxa com seringa de insulina e agulha de calibre 20-G. Esta composição anestésica (1,25 ml/kg de Ketamina e 0,25 ml/kg de Xilazina) mantém o animal sob anestesia intensa durante um período médio de três horas e a cirurgia transcorre de maneira indolor durante todo o período.

Após o procedimento anestésico, foi realizada uma laparotomia mediana e o útero bicorno foi delicadamente exibido. Os embriões ou fetos foram numerados da região proximal para distal em relação ao colo uterino, iniciando-se a contagem pelo corno direito, e divididos em lados direito e esquerdo. Desta forma, o feto mais próximo do colo uterino foi definido como feto número 1 (um).

Após a abertura da musculatura uterina, a bolsa amniótica com o feto ou embrião no seu interior foi removida do útero e aberta, o feto foi retirado, pesado e imediatamente sacrificado por meio de punção occipital com agulha de insulina. Em seguida, foram colocados em pequena mesa de cortiça e fixados com alfinetes. Os pesos de todos os fetos foram catalogados. Analisou-se o feto externamente no intuito de identificar malformações externas e, seguidamente, o mesmo foi aberto por uma incisão partindo do pescoço e indo em direção ao tórax e abdome (cérvico-tóraco-laparotomia) (FIGURA 3) e dissecado com lente cirúrgica de aumento (Magnifier Lamp, Model TL1092, TÜV Rheinland<sup>®</sup>, Cologne, Alemanha). Foram visualizados os pulmões, traqueia, brônquios e o esôfago. Em seguida, o pulmão esquerdo foi destacado de suas aderências junto com o diafragma e a parede torácica, e levado ainda com o brônquio até o lado direito no intuito de visualizar o esôfago ou uma provável AE. O procedimento foi repetido também para o pulmão direito. A traqueia e o esôfago permaneceram unidos na região da laringe, bem como conectados ao estômago, para se obter uma melhor conservação da peça anatômica.

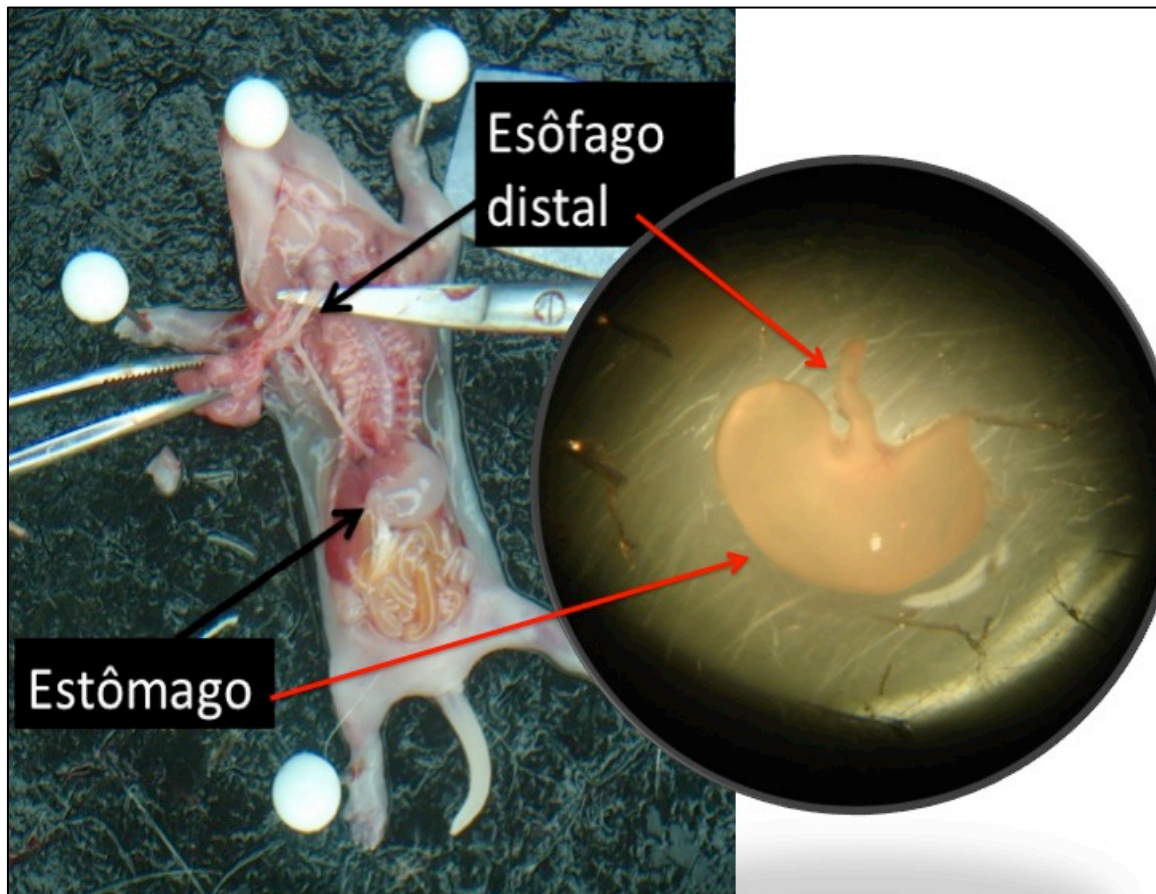
**FIGURA 3 – Fotografia de um feto do grupo Doxo exibindo a grande incisão cérvico-tóraco-laparotomia.**



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Os fetos com esôfago normal e os com AE foram identificados macroscopicamente. Os esôfagos distais e fundos de estômagos foram removidos e acondicionados em solução de Tyrode (mM: NaCl 136,0; KCl 5,0; MgCl<sub>2</sub> 0,98; CaCl<sub>2</sub> 2,0; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,36; NaHCO<sub>3</sub> 11,9 e glicose 5,5) e enviados imediatamente para estudo da contratilidade no LAFARMULI - UFC (FIGURA 4). O sacrifício das mães foi através do deslocamento cervical, uma vez que as mesmas estavam anestesiadas no momento do procedimento.

**FIGURA 4 – Modelo de coleta para contratilidade de feto controle.**



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

### **3.5 Delineamento experimental**

Para os estudos de contratilidade de esôfago distal e fundo gástrico foram operadas 39 ratas, sendo utilizado tecido de esôfago distal de 49 fetos e tecido de fundo de estômago de 25 fetos. Os materiais foram divididos em três grupos, consoante pré-tratamento da rata gestante e achados no feto: Doxo com AE, Doxo sem AE e controle (FLUXOGRAMA 1).

#### **Divisão dos grupos para contratilidade de esôfago distal:**

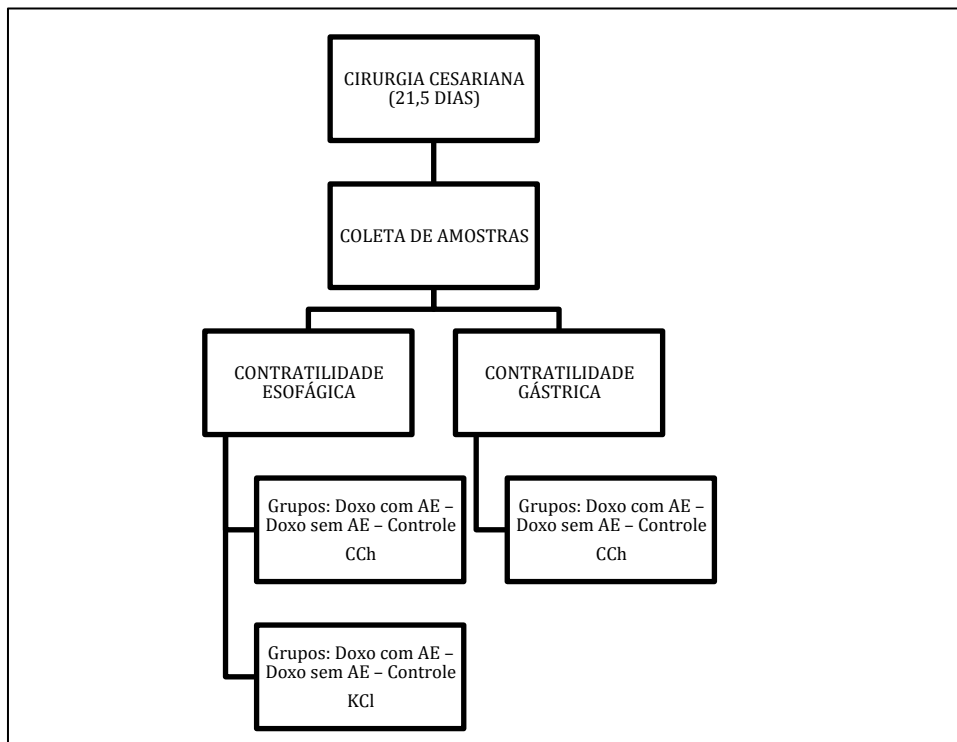
- ✓Doxo com AE (n=15)
- ✓Doxo sem AE (n=18)
- ✓Controle (n=16)



### Divisão dos grupos para contratilidade de fundo gástrico:

- ✓Doxo com AE (n=6)
- ✓Doxo sem AE (n=12)
- ✓Controle (n=7)

### FLUXOGRAMA 1 - Delineamento experimental para contratilidade esofágica e gástrica.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

## 3.6 Estudos de contratilidade

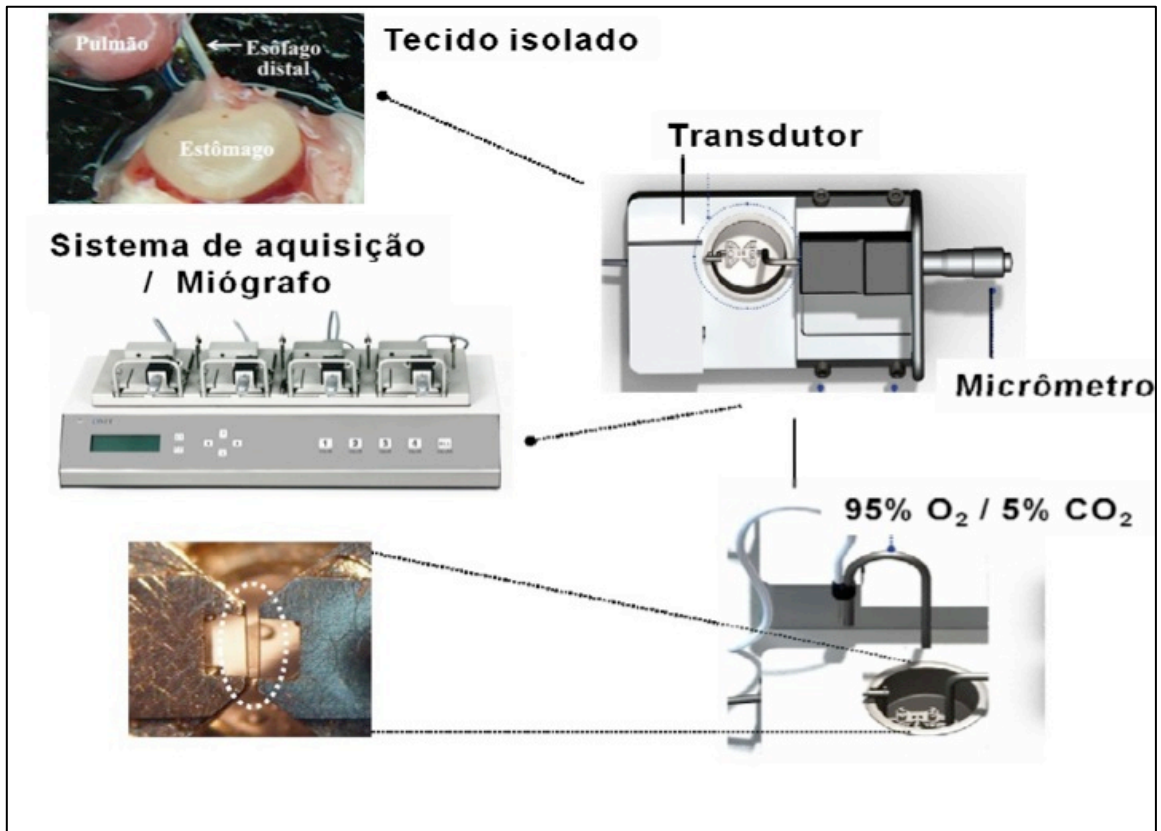
Para estudos de contratilidade *in vitro* foram utilizados segmentos de esôfago distal e fundo de estômago de fetos de cada grupo: Doxo com AE, Doxo sem AE e controle.

### 3.6.1 Análise da contratilidade esofágica

O esôfago distal dos fetos foi isolado e cortado em segmentos na forma de anéis (2 mm comprimento) que foram montados horizontalmente em um sistema Miógrafo de Agulha (610M-DMT; DMT, Aarhus, Dinamarca) (FIGURA 5). Em seguida,

estes anéis foram posicionados em cuba com capacidade para 6 mL de solução fisiológica de modo a captar a contração da camada circular e então conectados a um transdutor de força. Para isso, dois fios de tungstênio (40  $\mu\text{m}$ ) foram mantidos estendidos em paralelo através da luz do segmento esofágico, sendo as extremidades de um deles conectadas a um transdutor de força para registro isométrico de força. As extremidades do segundo fio foram fixadas a um micrômetro para ajustes da distância entre os fios intraluminais. A distância entre eles foi ajustada de forma a que o tecido esofágico fosse submetido a tensão mecânica basal de 8 mN. Esses procedimentos foram realizados com os anéis de esôfago submersos em solução fisiológica de Tyrode, pH 7,4, aquecida a 37 °C e oxigenação constante com 5% de  $\text{CO}_2$  em 95% de  $\text{O}_2$ . Após essa etapa, um período de equilíbrio de 1,5 h foi respeitado para que os experimentos fossem iniciados, mas com troca do líquido da incubação a cada 15 minutos e ajustes na tensão. Para cada segmento, curvas concentração-efeito (CCE) foram obtidas uma vez em resposta à exposição direta do tecido a concentrações cumulativas crescentes de carbacol (CCh; carbamylcholine chloride; Sigma Chemical, St Louis, MO) (0,01 – 100  $\mu\text{M}$ ) ou KCl (10 – 100 mM). O efeito máximo ( $E_{\text{max}}$ ) para a CCE foi atingido quando o aumento na concentração de dada substância não induziu resposta contrátil adicional àquela observada com a concentração anterior. Os valores de  $\text{CE}_{50}$ , ou seja, a concentração do agente contraturante necessária para produzir metade da resposta máxima, foram descritos.

**FIGURA 5 – Sistema utilizado nos experimentos de contratilidade *in vitro* em esôfagos de ratos.**

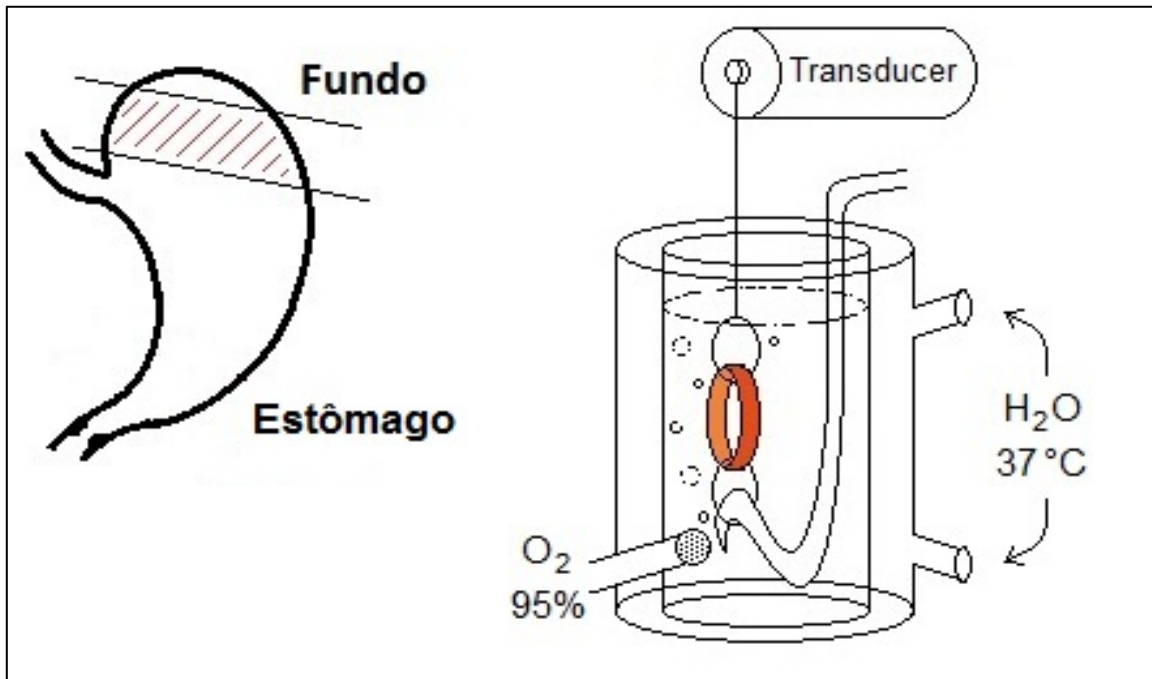


Fonte: Modificado pelo próprio autor, esquema do LAFARMULI cedido por Batista-Lima.

### 3.6.2 Análise da contratilidade gástrica

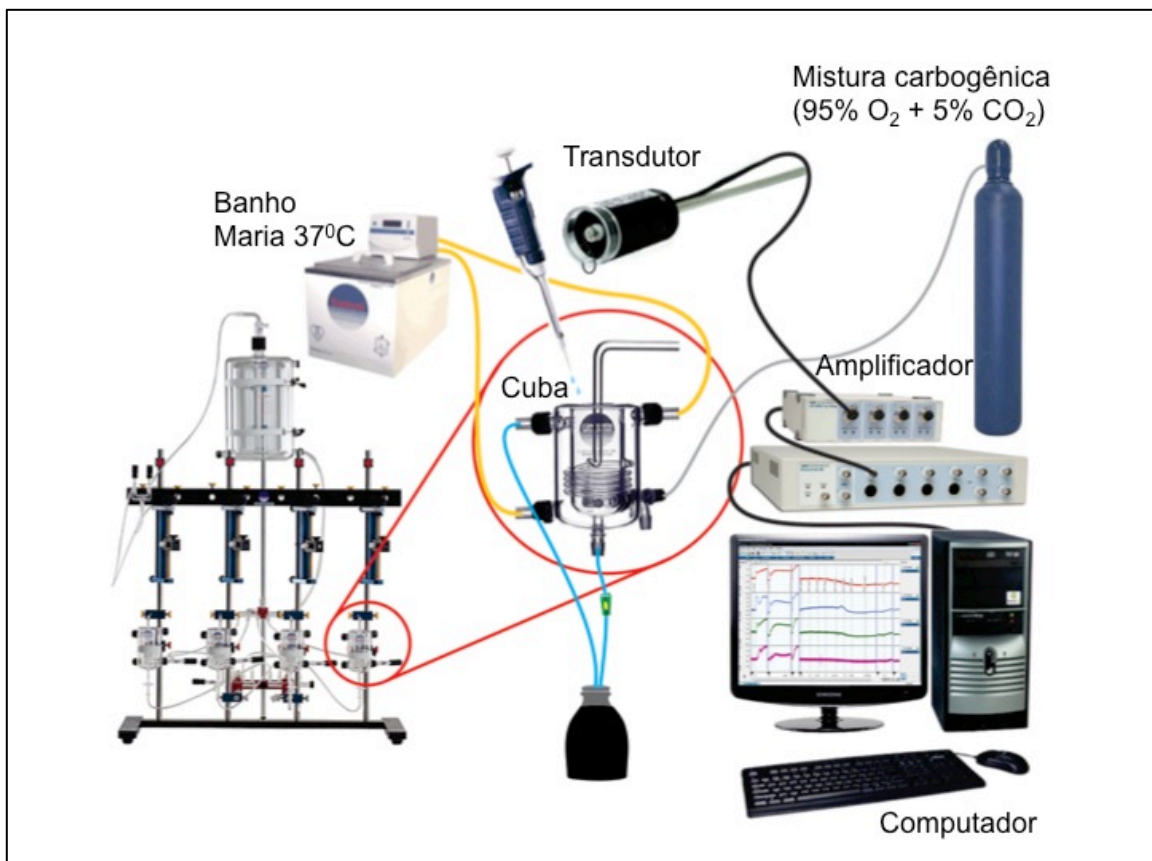
O fundo do estômago de fetos de cada amostra (seccionados em forma de anel) foi isolado e suspenso em dois pontos distais por um fio de algodão não extensível, em um sistema para banho de órgão isolado. Um dos fios foi amarrado a uma haste fixa, sendo o outro amarrado a um transdutor de força isométrico (ML870B60/CV, AD Instruments, Sydney, New South Wales, Austrália) (FIGURA 6) e conectado a um amplificador de um sistema digital de aquisição de dados (PowerLab™ 8/30, AD Instruments, Sydney, New South Wales, Austrália) (FIGURA 7). O banho para órgão isolado continha 5 ml de solução Tyrode em pH 7,4, aquecida a 37 °C e oxigenação constante com 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de O<sub>2</sub>.

**FIGURA 6 – Esquema mostrando a montagem de anéis de fundo de estômago no sistema de contratilidade *in vitro*.**



Fonte: LAFARMULI, cedido por Batista-Lima.

**FIGURA 7 – Sistema utilizado na avaliação da contratilidade gástrica.**



Fonte: Modificado pelo próprio autor, esquema do LAFARMULI.

Depois de montado no sistema, os segmentos foram equilibrados sob tensão de repouso de 1 g por 1 h. Durante este período foi realizada a troca do líquido da incubação a cada 15 minutos e ajustes na tensão. Para avaliar a funcionalidade do tecido, as tiras de fundo de estômago foram repetidamente estimuladas com a adição de 80 mM KCl diretamente na cuba até que duas contrações de mesma magnitude fossem observadas. Cada tecido foi exposto a concentrações cumulativas de CCh (0,01 – 300  $\mu$ M) com o propósito de construir CCE. Após cada protocolo, as tiras de tecido foram pesadas e a força contrátil foi expressa como uma relação com a respectiva massa de tecido (g de tensão / mg de tecido). O  $E_{\max}$  e os valores de  $CE_{50}$  também foram descritos.

### 3.7 Análise estatística

Os dados da contratilidade esofágica e gástrica foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.) (número de experimentos). A análise estatística foi determinada utilizando *two way* análise de variância (ANOVA) e, significância foi testada pelo teste de *Student-Newman-Keuls*. Quanto aos valores da  $CE_{50}$ , estes foram obtidos por interpolação semi-logarítmica e foram relatados através da média geométrica [95% de intervalo de confiança] (número de experimentos). A comparação dos valores da  $CE_{50}$  foi efetuada através do *Mann-Whitney U-test*, com a aplicação do programa de computador SIGMAPLOT versão 12.0 (Systat Software Inc., San Jose, California, EUA). O  $E_{\max}$  alcançado foi obtido através da resposta máxima observada. Determinou-se a significância estatística para um  $p < 0,05$ .

# RESULTADOS

---

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Resultados do procedimento cirúrgico

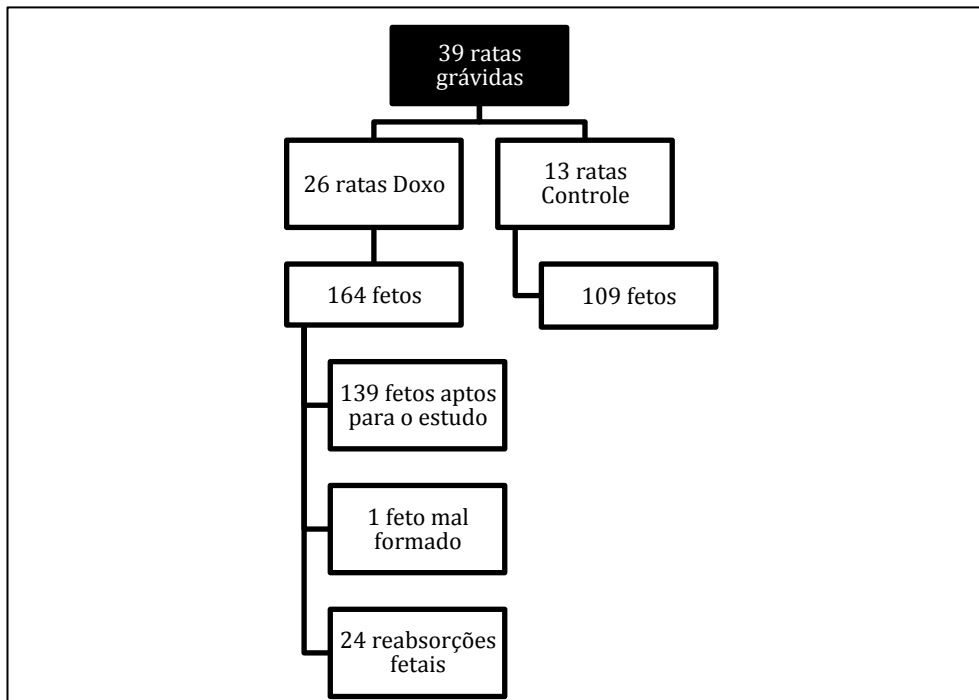
Foram utilizadas 39 ratas grávidas durante todo o período do experimento, com peso médio de  $266,82 \pm 34,63$  g. O número de óbito das ratas foi um escasso episódio, ocorrendo apenas em 01 (uma) rata tratada com Doxorubicina no 18º dia gestacional (2,56% do total). Duas ratas (5,13% do total) apresentaram aborto, sendo uma rata Doxo e a outra controle; estes fetos foram expulsos espontaneamente antes da coleta das amostras e conseqüentemente descartados.

As ratas operadas apresentaram 273 fetos. O índice de sucesso na utilização da Doxo (ou seja, a quantidade de ratas do total que recebeu Doxo e apresentou algum feto com AE) foi de 38,5% sendo todos estes fetos AE e FTE distal, enquanto que o índice de aparecimento de AE em fetos de ratas Doxo foi de 10,36% (FIGURA 8). Além disso também pôde ser visualizado nas ratas Doxo uma taxa de reabsorção fetal ou óbito de 14,63% e 1 feto mal formado, não sendo possível qualificar a malformação (FLUXOGRAMA 2).

O peso médio dos fetos dos grupos controle, Doxo com AE e Doxo sem AE foram  $3,68 \pm 1,05$  g,  $3,36 \pm 0,57$  g e  $3,90 \pm 0,80$  g, respectivamente, não apresentando diferença estatística entre os pesos dos grupos ( $p > 0,05$ , ANOVA, *Student-Newman-Keuls Method*).

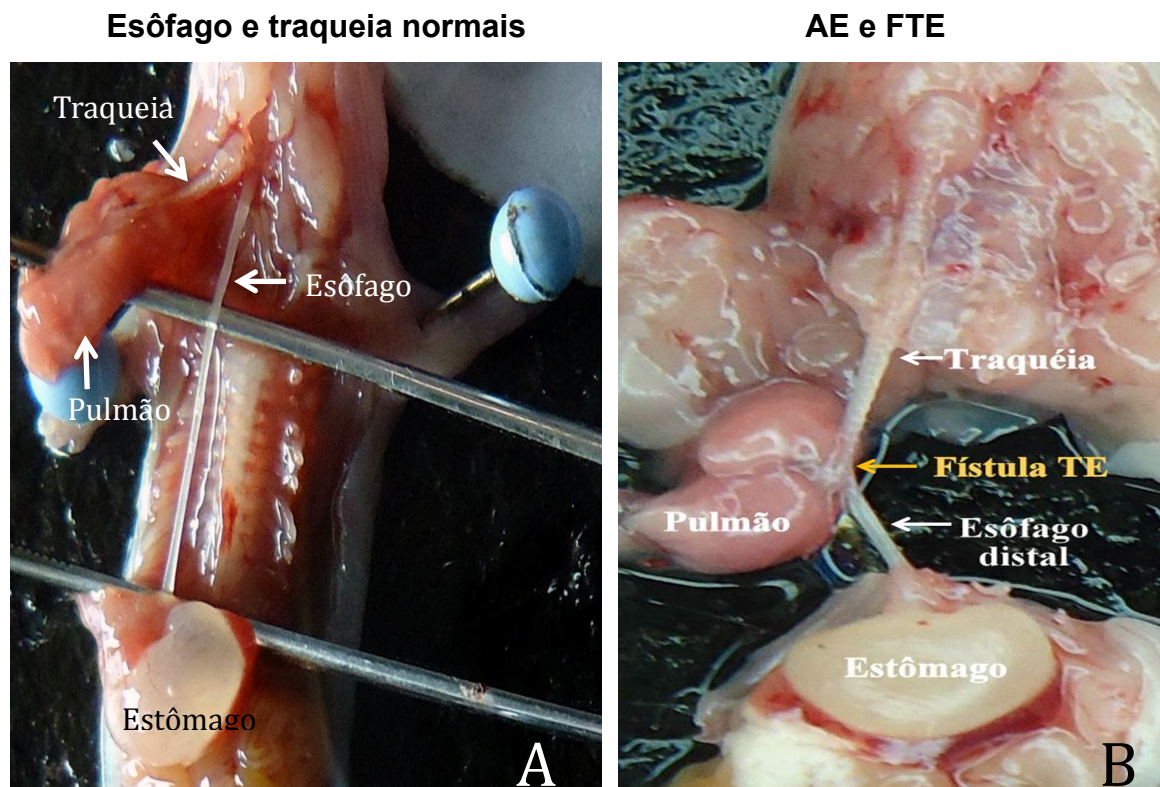
Foram enviados 65 fetos total dos três grupos (23,81%) para estudo de contratilidade esofágica e gástrica. Não foram empregados todos os fetos viáveis porque os sistemas de avaliação de contratilidade possuíam apenas 4 canais, possibilitando estudar, portanto, apenas 4 segmentos em cada sistema por vez. Além disso o sistema miógrafo de agulha exige uma amostra de tecido muito pequena: por vezes, havia rompimento do segmento no momento da preparação no sistema.

**FLUXOGRAMA 2 – Fluxograma da divisão das ratas e dos fetos entre os grupos Doxo e Controle.**



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

**FIGURA 8 – Fotografia de uma porção anatômica do esôfago e da traqueia de feto normal (A), e de AE com FTE distal, tipo C de Gross (1953) (B).**



Fonte: Elaborado próprio autor.



## 4.2 Resultados da contratilidade esofágica e gástrica

Nos segmentos de esôfago distal, o efeito contrátil induzido pelas concentrações cumulativas crescentes de CCh (0,01 – 100  $\mu$ M) nos grupos controle, Doxo com AE e Doxo sem AE, sob condições basais, apresentou resposta crescente de uma maneira dependente da concentração, para os três grupos (GRÁFICO 1). Concentrações cumulativas crescentes de KCl (10 – 100 mM), induzidas nos três grupos, em segmentos de esôfago distal, sob condições basais, apresentaram aumento da tensão de forma dependente da concentração até atingir 60 mM seguido do declínio na curva apresentada (GRÁFICO 2).

Os fetos cujas mães receberam Doxo, independente do desenvolvimento da AE, apresentaram diferença significativa em relação aos fetos controle quando expostos ao CCh ( $p < 0,05$ , *Two Way ANOVA, Student-Newman-Keuls*), porém não apresentaram diferenças significantes entre si ( $p > 0,05$ , ANOVA). A tensão observada nos fetos cujas mães receberam Doxo, independente do desenvolvimento da AE, apresentaram valores de efeitos contrátil inferiores em relação aos fetos controle quando expostos a mesma concentração de CCh.

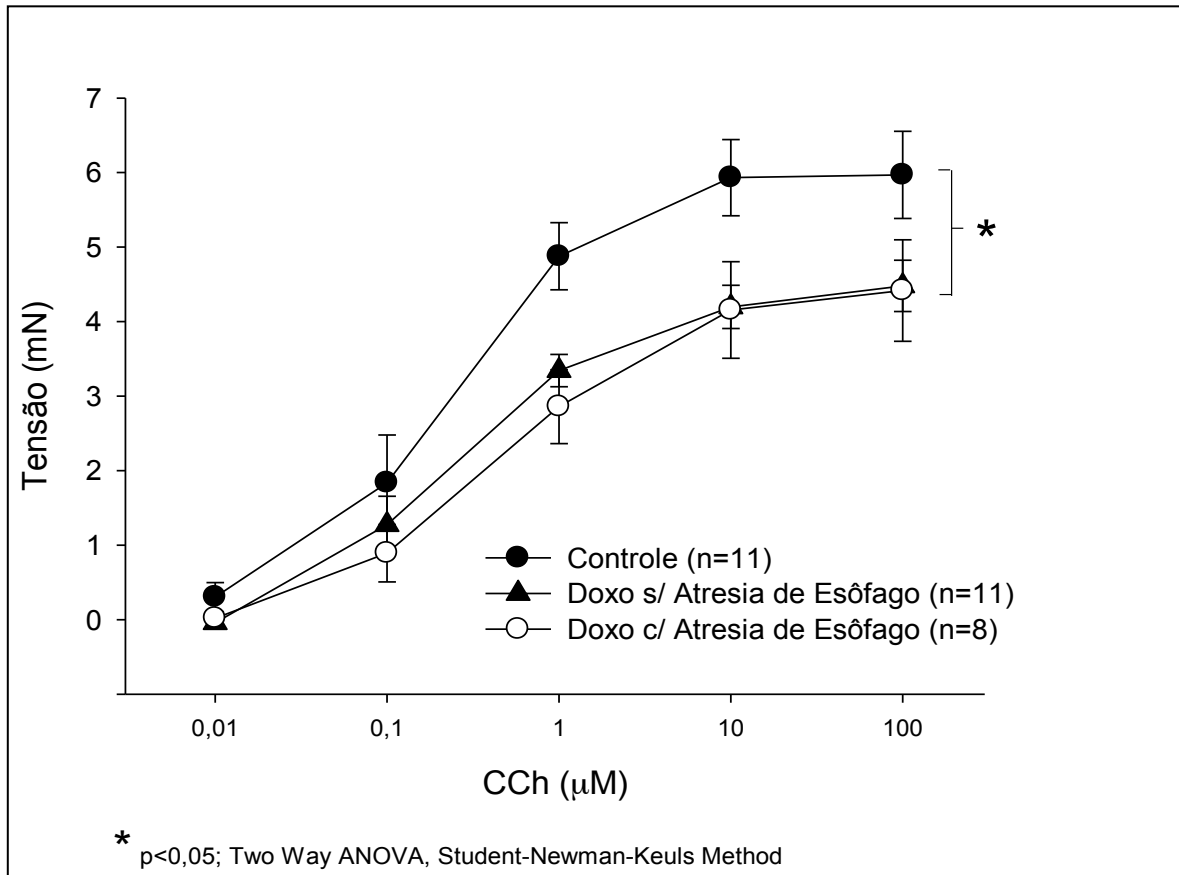
Os fetos expostos a concentrações cumulativas crescentes de KCl (10 – 100 mM) apresentaram aumento na tensão porém inferior ao observado nos fetos expostos ao CCh, não apresentando diferença significativa entre os grupos ( $p > 0,05$ , *Two Way ANOVA, Student-Newman-Keuls*).

Em animais dos grupos controle, Doxo com AE e Doxo sem AE, os valores da  $CE_{50}$ , para fetos expostos ao CCh, obtidos foram de 190 [96 – 379] nM, 439 [206 – 936] nM e 228 [125 – 418] nM, respectivamente (TABELA 2), e não apresentaram diferença significativa entre os três grupos ( $p > 0,05$ , *Mann-Whitney U-test*). O  $E_{max}$  foi obtido em uma concentração de CCh de 100  $\mu$ M e correspondeu a  $5,97 \pm 0,58$ ,  $4,42 \pm 0,68$  e  $4,48 \pm 0,34$  mN nos grupos controle, Doxo com AE e Doxo sem AE, respectivamente, onde o grupo controle apresentou diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ , *Two Way ANOVA, Student-Newman-Keuls Method*) em relação os grupos dos fetos cujas mães receberam Doxo, independente do desenvolvimento da AE.

Na concentração de KCl, o  $E_{max}$  foi alcançado em 60 mM e registrou  $1,31 \pm 0,14$ ,  $1,21 \pm 0,20$  e  $1,27 \pm 0,42$  mN, nos grupos controle, Doxo com AE e Doxo sem AE, respectivamente, sem apresentar diferença estatística significativa entre os grupos ( $p > 0,05$ , *Two Way ANOVA, Student-Newman-Keuls*) (TABELA 2). Não

foram descritos os valores da  $CE_{50}$  nos segmentos de esôfagos distais devido ao formato da curva ao KCl.

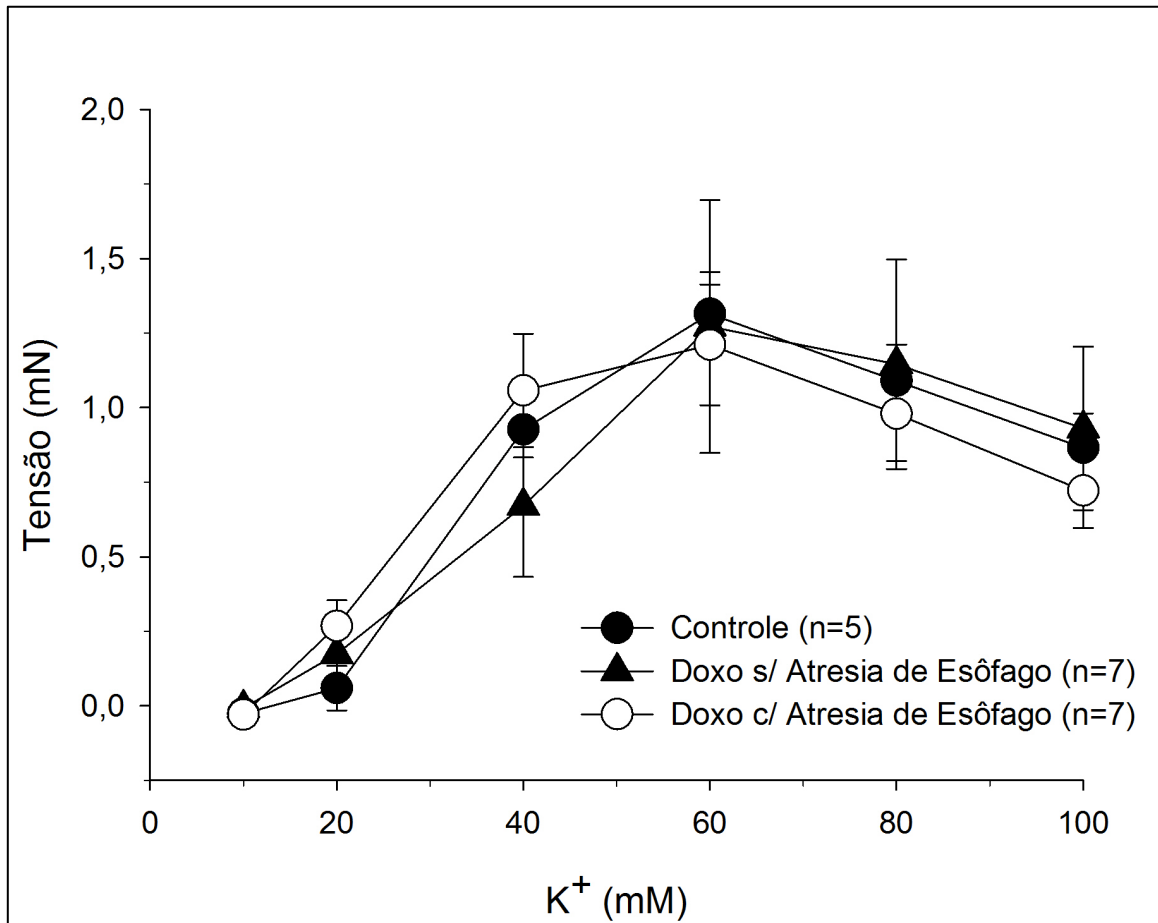
**GRÁFICO 1 – Comparação da resposta induzida pelo Carbacol em segmentos de esôfago distal em fetos de ratos.**



Fonte: Elaborado por Batista-Lima.

Gráfico mostrando valores médios da tensão exercida por segmentos de esôfago distal, sob condições basais, de fetos de ratos submetidos a diferentes concentrações crescentes de CCh (0,01 – 100) expressos em  $\mu\text{M}$ . A tensão foi verificada pico a pico e a amplitude expressa em mN. Valores expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.). A análise estatística entre os grupos foi significativa ( $p < 0,05$ ).

**GRÁFICO 2 – Comparação da resposta induzida pelo KCl em segmentos de esôfago distal em fetos de ratos.**



Fonte: Elaborado por Batista-Lima.

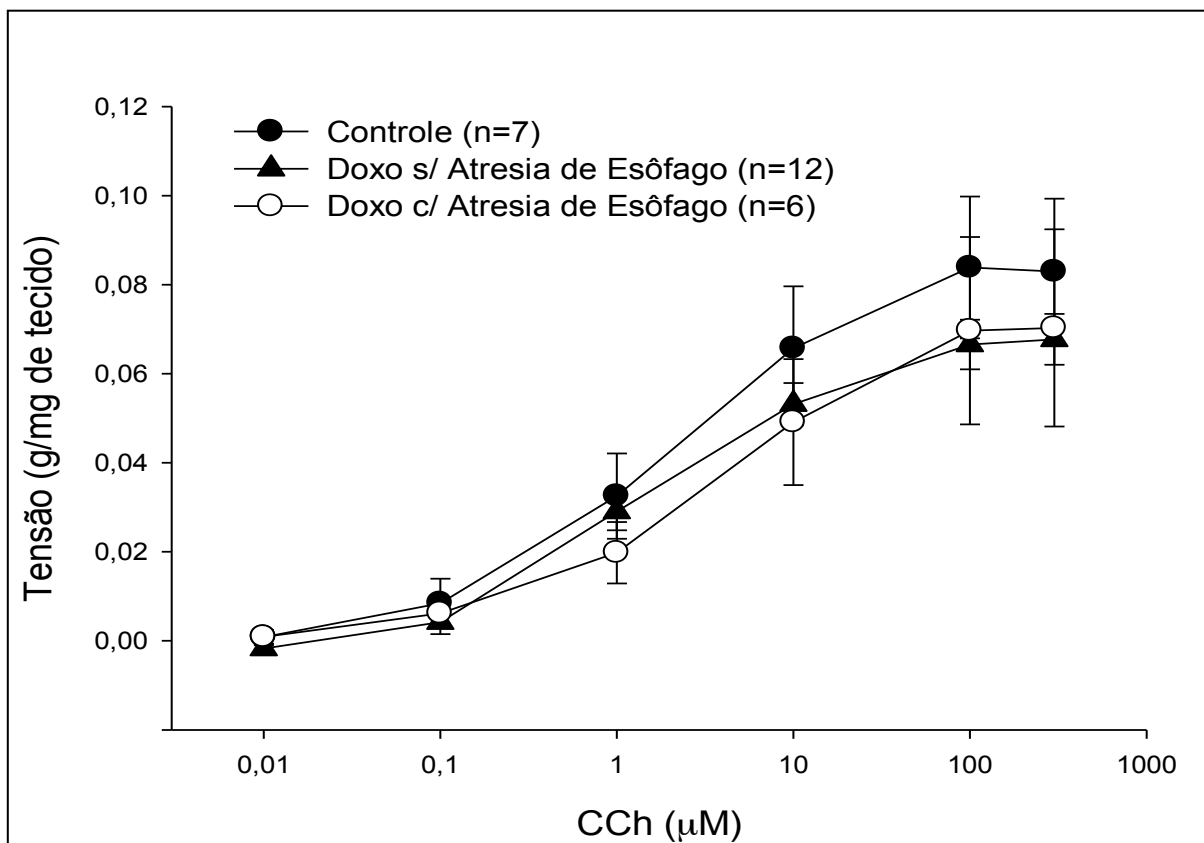
Gráfico mostrando valores médios da tensão exercida por segmentos de esôfago distal, sob condições basais, de fetos de ratos submetidos a diferentes concentrações crescentes de KCl (10 – 100) expressos em mM. A tensão foi verificada pico a pico e a amplitude expressa em mN. Valores expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.). A análise estatística entre os grupos não foi significativa ( $p > 0,05$ ).

Nos segmentos de fundo de estômago foram pesados, ao final de cada protocolo, as massas das tiras utilizadas no estudo da contratilidade e não apresentaram diferença significativa ( $p > 0,05$ , *One Way ANOVA*). As massas das tiras foram  $3,80 \pm 0,33$  mg,  $3,77 \pm 0,44$  mg, e  $4,10 \pm 0,35$  mg, nos fetos controle, Doxo com AE e Doxo sem AE, respectivamente. Sob condições basais, as concentrações crescentes de CCh (0,01 – 300  $\mu$ M) geraram efeito contrátil similar em ambos os segmentos dos fetos Doxo com AE e Doxo sem AE, quando comparados entre si, e discreta redução quando comparados aos fetos controle. Não foi possível visualizar alterações funcionais importantes nos segmentos do fundo de estômagos dos fetos controle e dos fetos Doxo com ou sem AE quando

expostos ao CCh, portanto não apresentaram diferença estatística significativa entre os três grupos ( $p > 0,05$ , *Two Way ANOVA*, *Student-Newman-Keuls Method*) (GRÁFICO 3). Os valores da  $CE_{50}$  no grupo controle, Doxo com AE e Doxo sem AE foram de 2,17 [1,03 – 4,58]  $\mu\text{M}$ , 3,26 [1,90 – 5,60]  $\mu\text{M}$  e 1,47 [0,83 – 2,61]  $\mu\text{M}$ , respectivamente, e não apresentaram diferença significativa entre os três grupos ( $p > 0,05$ , *Mann-Whitney U-test*) (TABELA 2). Quanto ao  $E_{\text{max}}$ , no feto controle foi atingido em 100  $\mu\text{M}$  e marcou  $0,084 \pm 0,016$  g/mg de tecido, enquanto que nos fetos Doxo com AE e Doxo sem AE, o  $E_{\text{max}}$  foi alcançado em 300  $\mu\text{M}$  e marcaram  $0,070 \pm 0,022$  e  $0,068 \pm 0,006$  g/mg de tecido, respectivamente. A semelhança dos valores de  $E_{\text{max}}$  entre os grupos não atingiu significância estatística ( $p > 0,05$ , *Two Way ANOVA*, *Student-Newman-Keuls Method*) (TABELA 2).

Embora não descrito anteriormente, foi realizado também coleta de material histológico. No entanto, não foi possível contar com pesquisador que tivesse experiência em avaliar tais peças.

**GRÁFICO 3 – Comparação da resposta induzida pelo Carbacol em segmentos de fundo gástrico em fetos de ratos.**



Fonte: Elaborado por Batista-Lima.

Gráfico mostrando valores médios da tensão exercida por segmentos de fundo de estômagos, sob condições basais, de fetos de ratos submetidos a diferentes concentrações crescentes de CCh (0,01 – 300) expressos em  $\mu\text{M}$ . A tensão foi verificada pico a pico e a amplitude expressa em g/mg de tecido. Valores expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.). A análise estatística entre os grupos não foi significativa ( $p > 0,05$ ).

**TABELA 2 – Propriedades da contratilidade da musculatura lisa nos segmentos de esôfago e estômago de fetos de ratos.**

	CONTROLE	DOXO COM AE	DOXO SEM AE
Esôfago distal – CCh	(n= 11)	(n= 8)	(n= 11)
<b>E<sub>max</sub></b>	5,97 $\pm$ 0,58 *	4,42 $\pm$ 0,68	4,48 $\pm$ 0,34
<b>CE<sub>50</sub></b>	190 [96 – 379]	439 [206 – 936]	228 [125 – 418]
Esôfago distal – KCl	(n= 5)	(n= 7)	(n= 7)
<b>E<sub>max</sub></b>	1,31 $\pm$ 0,14	1,21 $\pm$ 0,20	1,27 $\pm$ 0,42
Fundo de estômago – CCh	(n= 7)	(n= 6)	(n= 12)
<b>E<sub>max</sub></b>	0,084 $\pm$ 0,016	0,070 $\pm$ 0,022	0,068 $\pm$ 0,006
<b>CE<sub>50</sub></b>	2,17 [1,03 – 4,58]	3,26 [1,90 – 5,60]	1,47 [0,83 – 2,61]

Fonte: Elaborado próprio autor.

\*  $p < 0,05$ , *Two Way ANOVA, Student-Newman-Keuls Method*.

Valores de  $E_{\text{max}}$  no esôfago são expressos em mN, nas concentrações de CCh e KCl;

Valores de  $E_{\text{max}}$  no estômago são expressos em g/mg de tecido;

Valores da  $CE_{50}$  são expressos em nM no esôfago, na concentração de CCh [95% intervalo de confiança];

Valores da  $CE_{50}$  são expressos em  $\mu\text{M}$  no estômago [95% intervalo de confiança].

# DISCUSSÃO

---

## 5 DISCUSSÃO

O presente estudo empregou o modelo experimental de indução de AE por Doxo em fetos de ratos. Após insucesso com esquemas diferentes, o presente estudo optou por seguir o protocolo adotado por França *et al.* (2004). Com isto, obteve-se 10,36% de AE: resultado menos expressivo que os de Xia *et al.* (1999a), Merei *et al.* (1999) e França *et al.* (2004), que alcançaram, respectivamente, 62%, 60% e 91% de AE. Uma das explicações para a menor incidência de aparecimento de AE seria o fato de ter sido empregado ratos *Wistar* no presente estudo, diferente dos outros autores que utilizaram ratos *Sprague Dawley*.

No presente estudo, não foi objetivo a análise de outras malformações além da AE e FTE. Por outro lado, elementos anatômicos favoreceram o emprego de tal modelo no rato com a finalidade de estudar contratilidade esofágica e gástrica na AE e inferências em relação ao RGE visto em humanos.

Entende-se que a intervenção cirúrgica em si para corrigir a AE seria capaz de causar dano à motilidade esofágica, seja, por exemplo, devido a denervação vagal seja por amplas manipulações, anastomoses sob tensão e tração elevada dos cotos esofágicos com conseqüente deslocamento cranial da junção esofagogástrica (MONTEDONICO *et al.*, 1999b; ORRINGER; KIRSH; SLOAN, 1977; ROMEO *et al.*, 1987; SHONO *et al.*, 1993; TOVAR; FRAGOSO, 2013).

No entanto, há fortes evidências de que há um dano congênito primário na natureza. Por exemplo, estudo da pressão intraluminal dos segmentos proximais e distais do esôfago avaliados em neonatos com AE no pré-operatório já revelou anormalidades na motilidade do esôfago. A dismotilidade estava presente em todos os casos estudados, o que sugere que ela pode estar presente também antes da cirurgia em pacientes com AE (ROMEO *et al.*, 1987).

Contribuindo com tais achados, outros autores investigaram, através da manometria esofageal de alta resolução, se a dismotilidade estava presente no esôfago de crianças com FTE pura antes da cirurgia e compararam com pacientes após a cirurgia, concluindo que a dismotilidade esofágica é devido à má formação presente neste distúrbio e não somente conseqüência da intervenção cirúrgica (VALI *et al.*, 2011).

No intuito de melhor esclarecer a etiologia deste dano primário, em estudo empregando o modelo experimental de AE, Qi *et al.* (1997c) identificaram

anormalidade na inervação extrínseca como por exemplo, menos ramos de ambos os nervos laríngeos recorrentes, o desvio do nervo vago esquerdo do seu curso normal para formar um tronco nervoso único no lado direito do esôfago e relativamente poucos ramos do tronco nervoso vagal único.

Diversos estudos clínicos e experimentais revelam também que esta disfunção primária na motilidade do esôfago se correlacionaria a alterações na inervação intrínseca, sendo identificados, entre outros, redução do tamanho e da distribuição bem como imaturidade do tecido nervoso, notadamente no esôfago distal, em situações de AE com FTE (BOLEKEN *et al.*, 2007; CHENG *et al.*, 1999; ZUCARELLO *et al.*, 2009).

Em estudos de imunohistoquímica, Boleken *et al.* (2007) examinaram a extremidade distal do segmento proximal atrésico de recém-nascidos submetidos a correção de AE-FTE através do estudo de marcadores neuronais como neurofilamento (NF), sinaptofisina (SY), S100 e o fator neurotrófico derivado de linhagem de células gliais (GDNF), e comprovaram uma deficiência na distribuição de células ganglionares e algumas fibras nervosas nesta região. Enquanto Zucarello *et al.* (2009) avaliaram tanto o segmento esofágico proximal quanto o distal de recém-nascidos com AE-FTE e confirmaram alterações histomorfológicas nos componentes musculares e nervosos dentro da parede do esôfago nestes pacientes.

Em outro estudo, Cheng *et al.* (1999) estudaram histoquímica com um marcador neuronal geral, produto do gene da proteína geral 9.5 (PGP), em segmentos distais para analisar se a inervação do esôfago atrésico está anormal e visualizaram um defeituoso arranjo de tecido nervoso no esôfago atrésico podendo ser um fator auxiliar na dismotilidade esofágica presente nestes pacientes. Midrio *et al.* (2010) demonstraram ainda, em neonatos com AE/TEF, baixa densidade e células intersticiais de Cajal na extremidade da fístula traqueal.

Os estudos experimentais empregando avaliação de contratilidade *in vitro* representam uma metodologia capaz de colaborar no esclarecimento deste dano primário congênito. Há poucos estudos empregando o mesmo modelo experimental de AE induzida por doxorrubicina, que analisaram a contratilidade, respectivamente do esôfago e estômago, de fetos de ratos (TUGAY *et al.*, 2001, 2003). Para tanto, foram avaliadas respostas específicas mediadas por receptores induzidas por agonistas como CCh, serotonina e isoproterenol, e respostas menos específicas não mediadas por receptores como os estímulos induzidos por KCl e papaverina.



Nesses estudos, os autores demonstraram não haver diferença entre as respostas ao CCh em segmentos isolados de esôfago de fetos controle e aqueles cujas mães receberam Doxo, apesar de terem encontrado uma menor capacidade de relaxamento mediada por serotonina (TUGAY *et al.*, 2001).

Por sua vez, os resultados do presente estudo mostraram que a adição do agonista muscarínico CCh aos banhos contendo órgão isolado foi capaz de induzir contrações de forma dependente de concentração. Entretanto, nos segmentos de esôfago isolado obtidos dos fetos Doxo sem e com AE, a força máxima desenvolvida foi significativamente menor em relação aos valores obtidos pelos tecidos controle. Por outro lado, os valores de  $CE_{50}$  não tiveram diferença significativa. Esses dados revelam que, embora a potência farmacológica do CCh não tenha sido alterada, a capacidade desses receptores causarem efeito contrátil é menor na célula muscular lisa do esôfago distal dos animais tratados com Doxo. Por sua vez, a ocorrência de AE não altera o comportamento contrátil além do detectado em resposta à presença de Doxo, visto que os valores de  $E_{max}$  não diferiram entre os grupos Doxo sem ou com AE. Vale salientar que, empregando o mesmo modelo de indução de AE, Qi *et al.* (1999) detectaram redução na densidade de inervação do plexo mioentérico, e mais especificamente de neurônios produtores de VIP e Substância P, seja nos esôfagos atrésicos, seja nos macroscopicamente normais mas cujos fetos foram expostos à ação da Doxo quando comparados aos animais não-tratados. Tais achados trazem, em consonância, a percepção de que a Doxo venha a causar uma lesão na inervação intrínseca do esôfago ou mesmo na transdução do sinal que essas estruturas medeiam, ainda que o mesmo não venha a perder sua conformação anatômica normal. Contudo, é preciso ser destacada outra característica do presente estudo. Enquanto Tugay *et al.* (2001) utilizaram segmentos isolados de esôfago amarrados de forma a registrar contrações dos feixes de fibras musculares lisas com orientação longitudinal, os presentes resultados mostraram registros de segmentos distais, provavelmente menores em comprimento, que foram presos em miógrafo de agulha de modo a registrar contrações da camada circular. Portanto, é possível que a alteração funcional causada pela Doxo seja seletiva na parede visceral, mais evidente na camada muscular lisa circular do que na longitudinal.

Nos segmentos de esôfago isolado também foram confeccionadas curva concentração-efeito ao KCl, contudo nenhuma diferença foi encontrada entre os três

grupos. Diferente do carbacol, que causa contração por estimular a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  dos estoques intracelulares e também por promover o influxo desse íon por canais metabotrópicos, o incremento da concentração do íon  $\text{K}^+$  no meio extracelular leva à despolarização da membrana da célula, promovendo o influxo do íon  $\text{Ca}^{2+}$  no meio intracelular por canais para  $\text{Ca}^{2+}$  operados por voltagem (VOC) (RIBEIRO-FILHO *et al.*, 2012). Uma vez que não houve diferença na magnitude da resposta contrátil em nenhum dos grupos, pode-se concluir que a Doxo não interferiu na capacidade da célula esofagiana em recrutar canais VOC para induzir motilidade. Esses resultados estão em consonância com o estudo de Tugay *et al.* (2001).

Há alguns poucos estudos clínicos que analisaram a motilidade gástrica em crianças com AE. Empregando métodos como a eletrogastrografia, cintilografia gástrica e manometria, foram identificadas, em alguns pacientes, hipomotilidade antral e retardo do esvaziamento gástrico que não necessariamente contribuiriam para o RGE (BÓKAY; KIS; VEREBÉLY, 2005; ROMEO *et al.*, 2000). Ademais, a real etiologia de tais alterações na motilidade gástrica é desconhecida. É discutível se o SNE no estômago seria também afetado, no desenvolvimento embriológico da AE, ou se tais achados seriam consequência da intervenção cirúrgica que acarreta também tração gástrica. Em fetos com AE induzidos por Doxo, Zhou, Hutson e Myers (2001) encontraram o tamanho do estômago menores do que os dos controles.

Por outro lado, o presente estudo não evidenciou diferença na contratilidade de anéis de fundo gástrico frente ao estímulo com carbacol, entre os três grupos. Por outro lado, Tugay *et al.* (2003) demonstraram uma diferença na contratilidade das tiras de fundo de estômago obtidas de animais filhos de ratas tratadas com Doxo que desenvolveram AE e aqueles que não desenvolveram. Tiras de estômago de animais atresiados contraíram muito mais em resposta ao CCh que aquelas obtidas de animais não atresiados (TUGAY *et al.*, 2003). Uma vez mais, o presente estudo e o de Tugay *et al.* (2003) diferem pela forma de preparo das tiras musculares. O isolamento das tiras de fundo de estômago empregado neste estudo privilegiou a obtenção de tiras contínuas em forma de anéis que permitem o registro preferencial das fibras circulares. Por outro lado, Tugay *et al.* (2003) seguiram o método descrito por Vane (1957) cujo formato privilegia o registro da atividade contrátil das fibras musculares lisas longitudinais do fundo gástrico. Essas diferenças sugerem que no fundo do estômago, ao contrário do observado para o

esôfago distal, a camada longitudinal se torna mais responsiva ao estímulo colinérgico conforme demonstrado por Tugay *et al.* (2003), enquanto os presentes resultados mostram que a camada circular parece permanecer intacta.

É possível que algumas diferenças também se devam à variedade dos animais usados. No presente estudo, foram empregados ratos *Wistar*, enquanto que nos estudos de Tugay *et al.* (2001, 2003) foram usados ratos *Sprague Dawley*. Tal suposição pode ser suportada pelo fato de que a Doxo no presente estudo foi menos agressiva dado o baixo percentual de fetos atresiadados que foi aqui relatado (~10%) quando comparado com outros estudos, como os 57,69% encontrados por Tugay *et al.* (2003). Não obstante, parece-nos claro que o uso de Doxo para induzir AE como modelo experimental é capaz de alterar seletivamente a responsividade esofagiana a agentes contráteis. Apesar disto, mais estudos avaliando outras vias de controle da contratilidade são necessários para determinar os fatores que levam às presentes alterações funcionais.

**CONCLUSÃO**

---

## 6 CONCLUSÃO

O modelo experimental de desenvolvimento de AE com FTE através da administração de 2,2 mg/kg de peso de rata de doxorubicina nos dias 8 e 9 de gestação em ratos *Wistar* se mostrou reprodutível.

O carbacol foi capaz de promover menor resposta contrátil no esôfago distal de fetos que foram expostos no pré-natal à Doxo (independente se com ou sem AE) do que os do grupo controle.

O KCl induziu aumento na tensão contrátil do esôfago distal, porém inferior ao observado nos fetos expostos ao carbacol e sem diferença entre os grupos.

O carbacol induziu contratilidade no fundo gástrico dos fetos, sem diferença de resposta entre os que foram expostos no pré-natal à Doxo (independente se com ou sem AE) e os do grupo controle.

# REFERÊNCIAS

---

## REFERÊNCIAS

- AREY, L.B. **Developmental Anatomy**. 7. ed. Philadelphia, PA: Saunders, 1966. p. 263-5.
- ASPIROT, A.; FAURE, C. Esophageal dysmotility: characterization and pathophysiology. **Dis Esophag.**, v. 26, n. 4, p. 405-9, May-Jun. 2013.
- BANKS, M. The modern investigation and management of gastro-oesophageal reflux disease (GORD). **Clin. Med.**, v. 9, n. 6, p. 600-4, Dec. 2009.
- BEASLEY, S.W.; ALLEN, M.; MYERS, N. The effects of Down syndrome and other chromosomal abnormalities on survival and management in oesophageal atresia. **Pediatr. Surg. Int.**, v. 12, n. 8, p. 550-1, Aug. 1997.
- BEASLEY, S.W.; DIEZ-PARDO, J.; QI, B.Q.; TOVAR, J.A.; XIA, H.M. The contribution of the adriamycin-induced rat model of the VATER association to our understanding of congenital abnormalities and their embryogenesis. **Pediatr. Surg. Int.**, v. 16, n. 7, p. 465-72, Oct. 2000.
- BECKETT, E.A.; TAKEDA, Y.; YANASE, H.; SANDERS, K.M.; WARD, S.M. Synaptic specializations exist between enteric motor nerves and interstitial cells of Cajal in the murine stomach. **J. Comp. Neurol.**, v. 493, n. 2, p. 193-206, Dec. 2005.
- BERGMEIJER, J.H.; TIBBOEL, D.; HAZEBROEK, F.W. Nissen fundoplication in the management of gastroesophageal reflux occurring after repair of esophageal atresia. **J. Pediatr. Surg.**, v. 35, n. 4, p. 573-6, Apr. 2000.
- BERNE, R.M.; LEVY, M.N.; KOEPPEN, B.M.; STANTON, B.A. **Fisiologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Ed. Elsevier, 2004.
- BÓKAY, J.; KIS, É.; VEREBÉLY, T. Myoelectrical activity of the stomach after surgical correction of esophageal atresia. **J. Pediatr. Surg.**, v. 40, n. 11, p. 1732-6, Nov. 2005.
- BOLEKEN, M.; DEMIRBILEK, S.; KIRIMILOGLU, H.; KANMAZ, T.; YUCESAN, S.; CELBIS, O.; UZUN, I. Reduced neuronal innervation in the distal end of the proximal esophageal atretic segment in cases of esophageal atresia with distal tracheoesophageal fistula. **World J. Surg.**, v. 31, n. 7, p. 1512-7. Jul. 2007.
- BROOKES, S.J. Classes of enteric nerve cells in the guinea-pig small intestine. **Anat. Rec.**, v. 262, n. 1, p. 58-70, Jan. 2001.
- CASTILLOUX, J.; NOBLE, A.J.; FAURE, C. Risk Factors for short- and long-term morbidity in children with esophageal atresia. **J. Pediatr.**, v. 156, n. 5, p. 755-60, May 2010.

- CATALANO, P.; DI PACE, M.R.; CARUSO, A.M.; CASUCCIO, A.; DE GRAZIA, E. Gastroesophageal reflux in young children treated for esophageal atresia: evaluation with pH-multichannel intraluminal impedance. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, v. 52, n. 6, p. 686-90, Jun. 2011.
- CHEN, J.D.; LIN, Z.; PAN, J.; MCCALLUM, R.W. Abnormal gastric myoelectrical activity and delayed gastric emptying in patients with symptoms suggestive of gastroparesis. **Dig. Dis. Sci.**, v. 41, n. 8, p. 1538-45, Aug. 1996.
- CHENG, W.; BISHOP, A.E.; SPITZ, L.; POLAK, J.M. Abnormal enteric nerve morphology in atretic esophagus of fetal rats with adriamycin-induced esophageal atresia. **Pediatr. Surg. Int.**, v. 15, n. 1, p. 8-10, Jan. 1999.
- CHENG, W.; BISHOP, A.E.; SPITZ, L.; POLAK, J.M. Abnormalities of neuropeptides and neural markers in the esophagus of fetal rats with adriamycin-induced esophageal atresia. **J. Pediatr. Surg.**, v. 32, n. 10, p. 1420-3, Oct. 1997.
- CHITTMITRAPAP, S.; SPITZ, L.; KIELY, E.M.; BRERETON, R.J. Anastomotic leakage following surgery for esophageal atresia. **J. Pediatr. Surg.**, v. 27, n. 1, p. 29-32, Jan. 1992.
- CHITTMITRAPAP, S.; SPITZ, L.; KIELY, E.M.; BRERETON, R.J. Anastomotic stricture following repair of esophageal atresia. **J. Pediatr. Surg.**, v. 25, n. 5, p. 508-11, May 1990.
- CHITTMITRAPAP, S.; SPITZ, L.; KIELY, E.M.; BRERETON, R.J. Oesophageal atresia and associated anomalies. **Arch. Dis. Child.**, v. 64, n. 3, p. 364-8, Mar. 1989.
- COSTA, M.; BROOKES, S.J.; STEELE, P.A.; GIBBINS, I.; BURCHER, E.; KANDIAH, C.J. Neurochemical classification of myenteric neurons in the guinea-pig ileum. **Neuroscience**, v. 75, n. 3, p. 949-67, Dec. 1996.
- CRISERA, C.A.; MALDONADO, T.S.; KADISON, A.S.; LI, M.; LONGAKER, M.T.; GITTES, G.K. Patterning of the "distal esophagus" in esophageal atresia with tracheo-esophageal fistula: Is Thyroid Transcription Factor 1 a player? **J. Surg. Res.**, v. 92, n. 2, p. 245-49, Aug. 2000.
- DEURLOO, J.A.; EKKELKAMP, S.; SCHOORL, M.; HEIJ, H.A.; ARONSON, D.C. Esophageal atresia: historical evolution of management and results in 371 patients. **Ann. Thorac. Surg.**, v. 73, n. 1, p. 267-72, Jan. 2002.
- DIEZ-PARDO, J.A.; BOAQUAN, Q.; NAVARRO, C.; TOVAR, J.A. A new rodent experimental model of esophageal atresia and tracheoesophageal fistula: preliminary report. **J. Pediatr. Surg.**, v. 31, n. 4, p. 498-502, Apr. 1996.
- DI PACE, M.R.; CARUSO, A.M.; CATALANO, P.; CASUCCIO, A.; CIMADOR, M.; DE GRAZIA, E. Evaluation of esophageal motility and reflux in children treated for esophageal atresia with the use of combined multichannel intraluminal impedance and pH monitoring. **J. Pediatr. Surg.**, v. 46, n. 3, p. 443-51, Mar. 2011.



- DURANCEAU, A.; FISHER, S.R.; FLYE, M.; JONES, R.S.; POSTLETHWAIT, R.W.; SEALY, W.C. Motor function of the esophagus after repair of esophageal atresia and tracheoesophageal fistula. **Surgery**. v. 82, n. 1, p. 116-23, Jul. 1977.
- DUTTA, H.K.; RAJANI, M.; BHATNAGAR, V. Cineradiographic evaluation of postoperative patients with esophageal atresia and tracheoesophageal fistula. **Pediatr. Surg. Int.**, v. 16, n. 5-6, p. 322-5, Jul. 2000.
- FARRÉ, R.; AULÍ, M., LECEA, B.; MARTÍNEZ, E.; CLAVÉ, P. Pharmacologic characterization of intrinsic mechanisms controlling tone and relaxation of porcine lower esophageal sphincter. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 316, n. 3, p. 1238-48, Mar. 2006.
- FAUSSONE-PELLEGRINI, M.S.; CORTESINI, C. Ultrastructural features and localization of the interstitial cells of Cajal in the smooth muscle coat of human esophagus. **J. Submicrosc. Cytol.**, v. 17, n. 2, p. 187-97, Apr. 1985.
- FAUSSONE-PELLEGRINI, M.S.; VANNUCCHI, M.G.; ALAGGIO, R.; STROJNA, A.; MIDRIO, P. Morphology of the interstitial cells of Cajal of the human ileum from foetal to neonatal life. **J. Cell. Mol. Med.**, v. 11, n. 3, p. 482-94, May-Jun. 2007.
- FILLER, R.M.; MESSINEO, A.; VINOGRAD, I. Severe tracheomalacia associated with esophageal atresia: results of surgical treatment. **J. Pediatr. Surg.**, v. 27, n. 8, p. 1136-41, Aug. 1992.
- FRANÇA, W.M.; GONÇALVES, A.; MORAES, S.G.; PEREIRA, L.A.; SBRAGIA, L. Esophageal atresia and other visceral anomalies in a modified Adriamycin rat model and their correlations with amniotic fluid volume variations. **Pediatr. Surg. Int.**, v. 20, n. 8, p. 602-8, Aug. 2004.
- FRÖHLICH, T.; OTTO, S.; WEBER, P.; PILIC, D.; SCHMIDT-CHOUDHURY, A.; WENZL, T.G.; KÖHLER, H. Combined esophageal multichannel intraluminal impedance and pH monitoring after repair of esophageal atresia. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, v. 47, n. 4, p. 443-9, Oct. 2008.
- FU, M.; TAM, P.K.; SHAM, M.H.; LUI, V.C. Embryonic development of the ganglion plexuses and the concentric layer structure of human gut: a topographical study. **Anat. Embryol.**, v. 208, n. 1, p. 33-41, Apr. 2004.
- FURNESS, J.B. **The Enteric Nervous System**. Oxford: Wiley-Blackwell, 2006.
- FURNESS, J.B. The enteric nervous system and neurogastroenterology. **Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 9, n. 5, p. 286-94, Mar. 2012.
- GHANDOUR, K.E.; SPITZ, L.; BRERETON, R.J.; KIELY, E.M. Recurrent tracheoesophageal fistula: experience with 24 patients. **J. Paediatr. Child Health**, v. 26, n. 2, p. 89-91, Apr. 1990.
- GRAY, S.W.; SKANDALAKIS, J.E. **Embryology for Surgeons**. Philadelphia, PA: WB Saunders, 1972. p. 63-100.

GROSS, R.E. **The surgery of infancy and childhood**. Philadelphia: WB Saunders, 1953.

GUPTA, D.K.; SHARMA, S. Esophageal atresia: the total care in a high-risk population. **Semin. Pediatr. Surg.**, v. 17, n. 4, p. 236-43, Nov. 2008.

HAIGHT, C.; TOWSLEY, H. Congenital atresia of the oesophagus with tracheoesophageal fistula. Extrapleural ligation of fistula and end to end anastomosis of esophageal segments. **Surg. Gynecol. Obstet.**, v. 76, p. 672-88, Jun. 1943.

HAMBURGER, V.; HAMILTON, H.L. A series of normal stages in the development of the chick embryo. **J. Morph.**, v. 88, n. 1, p. 49-92, Jan. 1951.

HARMON, C.M.; CORAN, A.G. Congenital anomalies of the esophagus. In: O'NEILL, J.A. Jr. *et al.*, **Pediatric Surgery**, 5. ed., St. Louis, USA: Ed. Mosby-Year Book, 1998. p. 941-67.

HOLDER, T.M. Esophageal atresia and tracheoesophageal fistula. In: ASHCRAFT, K.W.; HOLDER, T.M. **Pediatric Surgery**, 1. ed., Orlando, FL: Ed. Grune & Stratton, Inc., 1986, p. 29-52.

HUSSAIN, K.; BILAL, F.; PATEL, H.; VEGESNA, A.K.; KISSEL, M.J.; MAKIPOUR, K.; DAI, Q.; MILLER, L.S. Assessment of mucosal movement in the gastroesophageal junction high-pressure zone during swallowing using simultaneous endoluminal ultrasound and manometry. **Gastroenterol.**, v. 140, n. 5, p. 471, May 2011.

IJSSELSTIJN, H.; VAN BEELEN, N.W.; WIJNEN, R.M. Esophageal atresia: long-term morbidities in adolescence and adulthood. **Dis. Esophagus**, v. 26, n. 4, p. 417-21, May-Jun. 2013.

IOANNIDES, A.S.; CHAUDHRY, B.; HENDERSON, D.J.; SPITZ, L.; COPP, A.J. Dorsoventral patterning in oesophageal atresia with tracheo-oesophageal fistula: Evidence from a new mouse model. **J. Pediatr. Surg.**, v. 37, n. 2, p. 185-91, Feb. 2002.

IOANNIDES, A.S.; COPP, A.J. Embryology of oesophageal atresia. **Semin. Pediatr. Surg.**, v. 18, n. 1, p. 2-11, Feb. 2009.

IOANNIDES, A.S.; HENDERSON, D.J.; SPITZ, L.; COOP, A.J. Role of Sonic hedgehog in the development of the trachea and oesophagus. **J. Pediatr. Surg.**, v. 38, n. 1, p. 29-36, Jan. 2003.

IVATURY, R.R.; MOORE, F.A.; BIFFL, W.; LEPPENIEMI, A.; ANSALONI, L.; CATENA, F.; PEITZMAN, A.; MOORE, E.E. Oesophageal injuries: Position paper, WSES, 2013. **World J. Emerg. Surg.**, v. 9, n. 1, p. 1-7, Jan. 2014.

JOLLEY, S.G.; BARON, H.I. Disorders of esophageal function. In: O'NEILL, J.A.; ROWE, M.I.; GROSFELD, J.L.; FONKALSRUD, E.W.; CORAN, A.G.; editors. **Pediatric Surgery**. 5. ed., St. Louis, USA: Ed. Mosby-Year Book, 1998. p. 997–1005.

KALTER, H.; WARKANY, J. Congenital malformations in inbred strains of mice induced by riboflavin-deficient, galactoflavin-containing diets. **J. Exp. Zool.**, v. 136, n. 3, p. 531-65, Dec. 1957.

KAWAHARA, H.; KUBOTA, A.; HASEGAWA, T.; OKUYAMA, H.; UENO, T.; WATANABE, T.; MORISHITA, Y.; SAKA, R.; FUKUZAWA, M. Lack of distal esophageal contractions is a key determinant of gastroesophageal reflux disease after repair of esophageal atresia. **J. Pediatr. Surg.**, v. 42, n. 12, p. 2017-21, Dec. 2007.

KENNY, S.E.; CONNELL, G.; WOODWARD, M.N.; LLOYD, D.A.; GOSDEN, C.M.; EDGAR, D.H.; VAILLANT, C. Ontogeny of interstitial cells of Cajal in the human intestine. **J. Pediatr. Surg.**, v. 34, n. 8, p. 1241–7, Aug. 1999.

KIM, J.; KIM, P.; HUI, C.C. The VACTERL association: lessons from the Sonic hedgehog pathway. **Clin. Genet.**, v. 59, n. 5, p. 306–15, May 2001.

KIM, P.C.; MO, R.; HUI, C.C. Murine models of VACTERL syndrome: Role of sonic hedgehog signalling pathway. **J. Pediatr. Surg.**, v. 36, n. 2, p. 381–4, Feb. 2001.

KLECKNER, S.C.; PRINGLE, K.C.; CLARK, E.B. The effect of chick embryo hyperflexion on tracheoesophageal development. **J. Pediatr. Surg.**, v. 19, n. 4, p. 340-4, Aug. 1984.

KLUTH, D.; FIEGEL, H. The embryology of the foregut. **Semin. Pediatr. Surg.**, v. 12, n. 1, p. 3-9, Feb. 2003.

KLUTH, D.; STEDING, G.; SEIDL, W. The embryology of foregut malformations. **J. Ped. Surg.**, v. 22, n. 5, p. 389-93, May 1987.

KOIVUSALO, A.; PAKARINEN, M.P.; RINTALA, R.J. The cumulative incidence of significant gastroesophageal reflux in patients with oesophageal atresia with a distal fistula--a systematic clinical, pH-metric, and endoscopic follow-up study. **J. Pediatr. Surg.**, v. 42, n. 2, p. 370-4, Feb. 2007.

KOMORI, K.; SUZUKI, H. Distribution and properties of excitatory and inhibitory junction potentials in circular muscle of the guinea-pig stomach. **J. Physiol.**, v. 370, p. 339–55, Jan. 1986.

KOMURO, T. Comparative morphology of interstitial cells of Cajal: ultrastructural characterization. **Microsc. Res. Tech.**, v. 47, n. 4, p. 267–85, Nov. 1999.

LANGER, J.C.; HUSSAIN, H.; KHAN, A.; MINKES, R.K.; GRAY, D.; SIEGEL, M.; RYAN, G. Prenatal diagnosis of esophageal atresia using sonography and magnetic resonance imaging. **J. Pediatr. Surg.**, v. 36, n. 5, p. 804-7, May 2001.

LEENDERTSE-VERLOOP, K.; TIBBOEL, D.; HAZEBROEK, F.W.J.; MOLENAAR, J.C. Postoperative morbidity in patients with esophageal atresia. **Pediatr. Surg. Int.**, v. 2, n. 1, p. 2-5, Jan. 1987.

LEMOINE, C.; ASPIROT, A.; LE HENAFF, G.; PILOQUET, H.; LÉVESQUE, D.; FAURE, C. Characterization of esophageal motility following esophageal atresia repair using high-resolution esophageal manometry. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, n. 6, v. 56, Jun. 2013.

LEONIDAS, J.C.; SINGH, S.P.; SLOVIS, T.L. Congenital anomalies of the gastrointestinal tract. *In*: KUHN, J.P.; SLOVIS, T.L.; HALLER, J.O.; editors. **Caffey's pediatric diagnostic imaging**. Mosby: 2004. p. 113-63.

LI, K.; ZHENG, S.; XIAO, X.; WANG, Q.; ZHOU, Y.; CHEN, L. The structural characteristics and expression of neuropeptides in the esophagus of patients with congenital esophageal atresia and tracheoesophageal fistula. **J. Pediatr. Surg.**, v. 42, n. 8, p. 1433-8, Aug. 2007.

LI, Y.; LITINGTUNG, Y.; TEN DIJKE, P.; CHIANG, C. Aberrant Bmp signaling and notochord delamination in the pathogenesis of esophageal atresia. **Dev. Dyn.**, v. 236, n. 3, p. 746-54, Mar. 2007.

LIMA, A.J. **Pediatria Essencial**. 5. ed. Rio de Janeiro: Ed. Atheneu, 1999.

LIN, X.; CHEN, J.Z. Abnormal gastric slow waves in patients with functional dyspepsia assessed by multichannel electrogastronomy. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 280, n. 6, p. 1370-5, Jun. 2001.

LITINGTUNG, Y.; LEI, L.; WESTPHAL, H.; CHIANG, C. Sonic hedgehog is essential to foregut development. **Nat. Genet.**, v. 20, n. 1, p. 58-61, Sep. 1998.

LOPEZ, P.J.; KEYS, C.; PIERRO, A.; DRAKE, D.P.; KIELY, E.M.; CURRY, J.I.; SPITZ, L. Oesophageal atresia: improved outcome in high-risk groups? **J. Pediatr. Surg.**, v. 41, n. 2, p. 331-4, Feb. 2006.

MAEDA, Y.; DAVÉ, V.; WHITSETT, J.A. Transcriptional control of lung morphogenesis. **Physiol. Rev.**, v. 87, n. 1, p. 219-44, Jan. 2007.

MAZET, B.; RAYNIER, C. Interstitial cells of Cajal in the guinea pig gastric antrum: distribution and regional density. **Cell. Tissue Res.**, v. 316, n. 1, p. 23-34, Apr. 2004.

MEI, F.; ZHU, J.; GUO, S.; ZHOU, D.S.; HAN, J.; YU, B.; LI, S.F.; JIANG, Z.Y.; XIONG, C.J. An age-dependent proliferation is involved in the postnatal development of interstitial cells of Cajal in the small intestine of mice. **Histochem. Cell Biol.**, v. 131, n. 1, p. 43-53, Jan. 2009.

MEREI, J.; HASTHORPE, S.; FARMER, P.; HUTSON, J.M. Visceral anomalies in prenatally adriamycin-exposed rat fetuses: a model for the VATER association. **Pediatr. Surg. Int.**, v. 15, n. 1, p. 11-6, Jan. 1999.

MEREI, J.; KOTSIOS, C.; HUTSON, J.M.; HASTHORPE, S. Histopathologic study of oesophageal atresia and tracheoesophageal fistula in an animal model. **J. Pediatr. Surg.**, v. 32, n. 1, p. 12-4, Jan. 1997.

MIDRIO, P.; ALAGGIO, R.; STROJNA, A.; GAMBA, P.; GIACOMELLI, L.; PIZZI, S.; FAUSSONE-PELLEGRINI, M.S. Reduction of interstitial cells of Cajal in esophageal atresia. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, v. 51, n. 5, p. 610-7, Nov. 2010.

MITSUI, R.; KOMURO, T. Distribution and ultrastructure of interstitial cells of Cajal in the gastric antrum of wild-type and Ws/Ws rats. **Anat. Embryol.**, v. 206, n. 6, p. 453-60, May 2003.

MO, R.; KIM, J.H.; ZHANG, J.; CHIANG, C.; HUI, C.C.; KIM, P.C. Anorectal malformations caused by defects in sonic hedgehog signaling. **Am. J. Pathol.**, v. 159, n. 2, p. 765-74, Aug. 2001.

MONTEDONICO, S.; DIEZ-PARDO, J.A.; POSSOGEL, A.K.; TOVAR, J.A. Effects of esophageal shortening on the gastroesophageal barrier: an experimental study on the causes of reflux in esophageal atresia. **J. Pediatr. Surg.**, v. 34, n. 2, p. 300-3, Feb. 1999b.

MONTEDONICO, S.; DIEZ-PARDO, J.A.; TOVAR, J.A. Gastroesophageal reflux after combined lower esophageal sphincter and diaphragmatic crural sling inactivation in the rat. **Dig. Dis. Sci.**, v. 44, n. 11, p. 2283-9, Nov. 1999.

MONTEDONICO, S.; GODOY, J.; MATE, A.; POSSÖGEL, A.K.; DIEZ-PARDO, J.A.; TOVAR, J.A. Muscular architecture and manometric image of gastroesophageal barrier in the rat. **Dig. Dis. Sci.**, v. 44, n. 12, p. 2449-55, Dec. 1999a.

MORTELL, A.; MONTEDONICO, S.; PURI, P. Animal models in pediatric surgery. **Pediatr. Surg. Int.**, v. 22, p. 111-28, Feb. 2006.

MYERS, N.A. Oesophageal atresia: the epitome of modern surgery. **Ann. R. Coll. Surg. Engl.**, v. 54, n. 6, p. 227-87, Jun. 1974.

NURKO, S. Gastrointestinal manometry: methodology and indication. In: KLEINMAN, R.E.; SANDERSON, I.R.; GOULET, O.; SHERMAN, P.M.; MIELI-VERGANI, G.; SHNEIDER, B.L.; eds. **Walker's Pediatric Gastrointestinal Disease**. Hamilton: BC Decker Inc., p. 1375-92, 2008.

OHSHIRO, K.; YAMATAKA, A.; KOBAYASHI, H.; HIRAI, S.; MIYAHARA, K.; SUEYOSHI, N.; SUDA, K.; MIYANO, T. Idiopathic gastric perforation in neonates and abnormal distribution of intestinal pacemakers cells. **J. Pediatr. Surg.**, v. 35, n. 5, p. 673-6, May 2000.

O'RAHILLY, R.; MÜLLER, F. Chevalier Jackson lecture. Respiratory and alimentary relations in staged human embryos. New embryological data and congenital anomalies. **Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.**, v. 93, n. 5, p. 421-9, Sep-Oct. 1984.

ORFORD, J.; CASS, D.T. Dose response relationship between adriamycin and birth defects in a rat model of VATER association. **J. Pediatr. Surg.**, v. 34, n. 3, p. 392-8, Mar. 1999.

ORFORD, J.; MANGLICK, P.; CASS, D.T.; TAM, P.P. Mechanisms for the development of esophageal atresia. **J. Pediatr. Surg.**, v. 36, n. 7, p. 985-94, Jul. 2001.

ORRINGER, M.B.; KIRSH, M.M.; SLOAN, H. Long-term esophageal function following repair of esophageal atresia. **Ann. Surg.**, v. 186, n. 4, p. 436-43, Oct. 1977.

PARKER, A.F.; CHRISTIE, D.L.; CAHILL, J.L. Incidence and significance of gastroesophageal reflux following repair of esophageal atresia and tracheoesophageal fistula and the need for anti-reflux procedures. **J. Pediatr. Surg.**, v. 14, n. 1, p. 5-8, Feb. 1979.

PIEKARSKI, D.H.; STEPHENS, F.D. The association and embryogenesis of tracheo-oesophageal and anorectal anomalies. **Prog. Pediatr. Surg.**, v. 9, p. 63-76, Feb. 1976.

PINUS, J. Atresia do Esôfago. In: MAKSOUD, J.J., **Cirurgia Pediátrica**. 1. ed. Rio de Janeiro, 1998, p. 502-17.

POSSÖGEL, A.K.; DIEZ-PARDO, J.A.; MORALES, C.; TOVAR, J.A. Notochord involvement in experimental esophageal atresia. **Pediatr. Surg. Int.**, v. 15, n. 3-4, p. 201-5, May 1999.

QI, B.Q.; DIEZ-PARDO, J.A.; NAVARRO, C.; TOVAR, J.A. Narrowing the embryologic window of the adriamycin-induced fetal rat model of esophageal atresia and tracheoesophageal fistula. **Pediatr. Surg. Int.**, v. 11, n. 7, p. 444-7, Aug. 1996.

QI, B.Q.; MEREI, J.; FARMER, P.; HASTHORPE, S.; MYERS, N.A.; BEASLEY, S.W.; HUTSON, J.M. Cardiovascular malformations in rat fetuses with oesophageal atresia and tracheo-oesophageal fistula induced by adriamycin. **Pediatr. Surg. Int.**, v. 12, n. 8, p. 556-64, Aug. 1997a.

QI, B.Q.; MEREI, J.; FARMER, P.; HASTHORPE, S.; MYERS, N.A.; BEASLEY, S.W.; HUTSON, J.M. The vagus and recurrent laryngeal nerves in the rodent experimental model of esophageal atresia. **J. Pediatr. Surg.**, v. 32, n. 11, p. 1580-6, Nov. 1997c.

QI, B.; SOTO, C.; DIEZ-PARDO, J.A.; TOVAR, J.A. An experimental study on the pathogenesis of gastroesophageal reflux after repair of diaphragmatic hernia. **J. Pediatr. Surg.**, v. 32, n. 9, p. 1310-3, Sep. 1997b.

QI, B.Q.; UEMURA, S.; FARMER, P.; MYERS, N.A.; HUTSON, J.M. Intrinsic innervation of the oesophagus in fetal rats with oesophageal atresia. **Pediatr. Surg. Int.**, v. 15, n. 1, p. 2-7, Jan. 1999.

QUE, J.; CHOI, M.; ZIEL, J.W.; KLINGENSMITH, J.; HOGAN, B.L. Morphogenesis of the trachea and esophagus: current players and new roles for noggin and Bmps. **Differentiation**, v. 74, n. 7, p. 422-37, Sep. 2006.

RADENKOVIC, G.; SAVIC, V.; MITIC, D.; GRAHOVAC, S.; BJELAKOVIC, M; KRSTIC, M. Development of c-kit immunopositive interstitial cells of Cajal in the human stomach. **J. Cell. Mol. Med.**, v. 14, n. 5, p. 1125-34, Jan. 2010.

RAO, P. Neonatal gastrointestinal imaging. **Eur. J. Radiol.**, v. 60, n. 2, p. 171-86, Nov. 2006.

RIBEIRO-FILHO, H.V.; BRITO, T.S.; LIMA, F.J.B.; PINHO, J.P.M.; SOUSA, D.F.; SILVA, M.T.B.; DE SIQUEIRA, R.J.B.; COSKER, F.; BASTOS, V.P.D.; SANTOS, A.A.; MAGALHÃES, P.J.C. Talking about bioelectrical potentials using rings of the mesenteric artery without glass micropipettes. **Adv. Physiol. Educ.**, v. 36, n. 4, p. 336-44, Dec. 2012.

ROLLE, U.; PIOTROWSKA, A.P.; NEMETH, L.; PURI, P. Altered distribution of interstitial cells of Cajal in Hirschsprung disease. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, v. 126, n. 8, p. 928-33, Aug. 2002.

ROMEO, C.; BONANNO, N.; BALDARI, S.; CENTORRINO, A.; SCALFARI, G.; ANTONUCCIO, P.; CENTONZE, A.; GENTILE, C. Gastric motility disorders in patients operated on for esophageal atresia and tracheoesophageal fistula: long-term evaluation. **J. Pediatr. Surg.**, v. 35, n. 5, p. 740-4, May 2000.

ROMEO, G.; ZUCCARELLO, B.; PROIETTO, B.; ROMEO, C. Disorders of the esophageal motor activity in atresia of the esophagus. **J. Pediatr. Surg.**, v. 22, n. 2, p. 120-4, Feb. 1987.

SADLER, T.W. Sistema digestivo. In: **Langman Embriologia Médica**, 7. ed. Maryland, USA: Ed. G. Koogan, 1995. p. 153-6.

SANDERS, K.M. A case for interstitial cells of Cajal as pacemakers and mediators of neurotransmission in the gastrointestinal tract. **Gastroenterol.**, v. 111, n. 2, p. 492-515, Aug. 1996.

SANTOS, A. A. Motilidade gastrointestinal. In: CURI, R.; ARAUJO-FILHO, J. P. (Org.). **Fisiologia Básica**. 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. p. 609-624.

SASAKI, T.; KUSAFUKA, T.; OKADA, A. Analysis of the development of normal foregut an tracheoesophageal fistula in an adriamycin rat model using three-dimensional image reconstruction. **Surg. Today**, v. 31, n. 2, p.133-9, Feb. 2001.

SHAW-SMITH, C. Oesophageal atresia, tracheo-oesophageal fistula, and the VACTERL association: review of genetics and epidemiology. **J. Med. Genet.**, v. 43, n. 7, p. 545-54, Jul. 2006.

SHERMETA, D.W.; WHITINGTON, P.F.; SETO, D.S.; HALLER, J.A. Lower esophageal sphincter dysfunction in esophageal atresia: nocturnal regurgitation and aspiration pneumonia. **J. Pediatr. Surg.**, v. 12, n. 6, p. 871-6, Dec. 1977.

SHONO, T.; SUITA, S.; ARIMA, T.; HANDA, N.; ISHII, K.; HIROSE, R.; SAKAGUCHI, T. Motility function of the esophagus before primary anastomosis in esophageal atresia. **J. Pediatr. Surg.**, v. 28, n. 5, p. 673-6, May 1993.

SHULMAN, A.; MAZKERETH, R.; ZALEL, Y.; KUINT, J.; LIPITZ, S.; AVIGAD, I.; ACHIRON, R. Prenatal identification of esophageal atresia: the role of ultrasonography for evaluation of functional anatomy. **Prenat. Diagn.**, v. 22, n. 8, p. 669-74, Aug. 2002.

SINHA, C.K.; SPITZ, L. Esophageal Atresia. *In: Handbook of Pediatric Surgery*. DOI: 10.1007/978-1-84882-132-3\_3.3. London: Springer-Verlag, 2010. p. 77-83, cap. 3.3.

SPITZ, L. Esophageal atresia: past, present, and future. **J. Pediatr. Surg.**, v. 31, n. 1, p. 19-25, Jan. 1996.

SPITZ, L. Esophageal atresia: review. **Orphanet J. Rare Dis.**, v. 2, n. 24, May 2007. Disponível em: <http://www.OJRD.com/content/2/1/24>.

SPITZ, L.; KIELY, E.; BRERETON, R.J.; DRAKE, D. Management of esophageal atresia. **World J. Surg.**, v. 17, n. 3, p. 296-300, May-Jun. 1993.

SPITZ, L.; KIELY, E.; BRERETON, R.J. Esophageal atresia: five year experience with 148 cases. **J. Pediatr. Surg.**, v. 22, n. 2, p. 103-8, Feb. 1987.

SPITZ, L.; KIELY, E.; MORECROFT, J.A.; DRAKE, D. Oesophageal atresia: at-risk groups for the 1990s. **J. Pediatr. Surg.**, v. 29, n. 6, p. 723-5, Jun. 1994.

STREUTKER, C.J.; HUIZINGA, J.D.; DRIMAN, D.K.; RIDDELL, R.H. Interstitial cells of Cajal in health and disease. Part I: normal ICC structure and function with associated motility disorders. **Histopath.**, v. 50, n. 2, p. 176-89, Jan. 2007.

STRINGER, M.D.; MCKENNA, K.M.; GOLDSTEIN, R.B.; FILLY, R.A.; ADZICK, N.S.; HARRISON, M.R. Prenatal diagnosis of esophageal atresia. **J. Pediatr. Surg.**, v. 30, n. 9, p. 1258-63, Sep. 1995.

TAYLOR, A.C.; BREEN, K.J.; AULDIST, A.; CATTO-SMITH, A.; CLARNETTE, T.; CRAMERI, J.; TAYLOR, R.; NAGARAJAH, S.; BRADY, J.; STOKES, K. Gastroesophageal reflux and related pathology in adults who were born with esophageal atresia: a long-term follow-up study. **Clin. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 5, n. 6, p. 702-6, Jun. 2007.

TEICH, S.; BARTON, D.P.; GINN-PEASE, M.E.; KING, D.R. Prognostic classification for esophageal atresia and tracheoesophageal fistula: Waterston versus Montreal. **J. Pediatr. Surg.**, v. 32, n. 7, p. 1075-80, Jul. 1997.



TEN HAVE-OPBROEK, A.A.W. Lung development in the mouse embryo. **Exp. Lung Res.**, v. 17, n. 2, p. 111-30, Mar.-Apr. 1991.

TEWEY, K.M.; ROWE, T.C.; YANG, L.; HALLIGAN, B.D.; LIU, L.F. Adriamycin-induced DNA damage mediated by mammalian DNA topoisomerase II. **Science**, v. 226, n. 4673, p. 466-8, Oct. 1984.

THOMPSON, D.J.; MOLELLO, J.A.; STREBING, R.J.; DYKE, I.L. Teratogenicity of adriamycin and daunomycin in the rat and rabbit. **Teratology**, v. 17, n. 2, p. 151-7, Apr. 1978.

THUNEBERG, L. Interstitial cells of Cajal: intestinal pacemaker cells? **Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.**, v. 71, n. 1, p. 1-130, Jun. 1982.

TORIHASHI, S.; HORISAWA, M.; WATANABE, Y. c-Kit immunoreactive interstitial cells in the human gastrointestinal tract. **J. Auton. Nerv. Syst.**, v. 75, n. 1, p. 38-50, Jan. 1999.

TORIHASHI, S.; WARD, S.M.; SANDERS, K.M. Development of c-Kit-positive cells and the onset of electrical rhythmicity in murine small intestine. **Gastroent.**, v. 112, n. 1, p. 144-55, Jan. 1997.

TOVAR, J.A.; FRAGOSO, A.C. Anti-reflux surgery for patients with esophageal atresia. **Dis. Esophag.**, v. 26, n. 4, p. 401-4, May-Jun. 2013.

TRAHAIR, J.F.; WING, S.J.; HORN, J.L. Failure of short-term luminal IGF-I to protect against atrophy in a model of fetal esophageal atresia. **J. Pediatr. Surg.**, v. 30, n. 11, p. 1564-70, Nov. 1995.

TUGAY, M; YILDIZ, F.; UTKAN, T.; SARLOGLU, Y.; GACAR, N. Gastric Smooth Muscle Contractility Changes in the Esophageal Atresia Rat Model: An In Vitro Study. **J. Pediatr. Surg.**, v. 38, n. 9, p. 1366-70, Sep. 2003.

TUGAY, M; YILDIZ, F.; UTKAN, T.; ULAK, G.; GACAR, N.; ERDEN, F. Impaired Esophageal Reactivity in Adriamycin-Induced Rat Esophageal Atresia: An In Vitro Study. **J. Pediatr. Surg.**, v. 36, n. 10, p. 1569-73, Oct. 2001.

VANE, J.R. A sensitive method for the assay of 5-hydroxytryptamine. **Br. J. Pharmacol. Chemother.**, v. 12, n. 3, p. 344-9, Sep. 1957.

VALI, K.; ASPIROT, A.; MORRIS, M.; LEMOINE, C.; GIGUÈRE, L.; FAURE, C. Evidence of primary esophageal dysmotility in children with pure tracheo-esophageal fistula. **Neurogastroenterol. Motil.**, v. 23, n. s1, p. 14-51, Sep. 2011.

VOGT, E.C. Congenital esophageal atresia. **Am. J. Roentgenol.**, v. 22, p. 463-5, Nov. 1929.

WALLACE, A.S.; BURNS, A.J. Development of the enteric nervous system, smooth muscle and interstitial cells of Cajal in the human gastrointestinal tract. **Cell. Tissue Res.**, v. 319, n. 3, p. 367-82, Mar. 2005.

WANG, W.; TOVAR, J.A.; EIZAGUIRRE, I.; ALDAZABAL, P. Airway obstruction and gastroesophageal reflux: an experimental study on the pathogenesis of this association. **J. Pediatr. Surg.**, v. 28, n. 8, p. 995-8, Aug. 1993.

WARD, S.M. Interstitial cells of Cajal in enteric neurotransmission. **Gut**, v. 47, n. 4, p. 40-3, Dec. 2000.

WARD, S.M.; SANDERS, K.M. Physiology and pathophysiology of the interstitial cells of Cajal: from bench to bedside. I. Functional development and plasticity of interstitial cells of Cajal networks. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 281, n. 3, p. 602-11, Sep. 2001.

WATERSTON, D.J.; CARTER, R.E.; ABERDEEN, E. Oesophageal atresia: tracheo-esophageal fistula. A study of survival in 218 infants. **Lancet**, v. 279, n. 7234, p. 819-22, Apr. 1962.

WESSON, D.E.; MURAJI, T.; KENT, G.; FILLER, R.M.; ALMALCHI, T. The effect of intrauterine esophageal ligation on growth of fetal rabbits. **J. Pediatr. Surg.**, v. 19, n. 4, p. 398-9, Aug. 1984.

WESTER, T.; ERIKSSON, L.; OLSSON, Y.; OLSEN, L. Interstitial cells of Cajal in the human fetal small bowel as shown by c-kit immunohistochemistry. **Gut**, v. 44, n. 1, p. 65-71, Jan. 1999.

WILLIAMS, A.K.; QI, B.Q.; BEASLEY, S.W. Temporospacial aberrations of apoptosis in the rat embryo developing esophageal atresia. **J. Pediatr. Surg.**, v. 35, n. 11, p. 1617-20, Nov. 2000.

WILSON, J.G.; ROTH, C.B.; WARKANY, J. An analysis of the syndrome of malformations induced by maternal vitamin A deficiency. Effects of restoration of vitamin A at various times during gestation. **Am. J. Anat.**, v. 92, n. 2, p. 189-217, Mar. 1953.

XIA, H.; MIGLIAZZA, L.; MONTEDONICO, S.; RODRIGUEZ, J.I.; DIEZ-PARDO, J.A.; TOVAR, J.A. Skeletal malformations associated with esophageal atresia: clinical and experimental studies. **J. Pediatr. Surg.**, v. 34, n. 9, p. 1385-92, Sep. 1999b.

XIA, H.; OTTEN, C.; MIGLIAZZA, L.; DIEZ-PARDO, J.A.; TOVAR, J.A. Tracheobronchial malformations in experimental esophageal atresia. **J. Pediatr. Surg.**, v. 34, n. 4, p. 536-9, Apr. 1999a.

XUE, L.; FUKUTA, H.; YAMAMOTO, Y.; SUZUKI, H. Properties of junction potentials in gastric smooth muscle of the rat. **Jpn. J. Physiol.**, v. 46, n. 2, p. 123-30, Apr. 1996.

YAGI, M.; HOMMA, S.; IWAFUCHI, M.; UCHIYAMA, M.; MATSUDA, Y.; MARUTA, T. Electrogastrography after operative repair of esophageal atresia. **Pediatr. Surg. Int.**, v. 12, n. 5-6, p. 340-3, Jul. 1997.

YOUNG, H.M.; CIAMPOLI, D.; SOUTHWELL, B.R.; NEWGREEN, D.F. Origin of interstitial cells of Cajal in the mouse intestine. **Dev. Biol.**, v. 180, n. 1, p. 97–107, Nov. 1996.

ZHOU, B.; HUTSON, J.M.; FARMER, P.J.; HASTHORPE, S.; MYERS, N.A.; LIU, M. Apoptosis in traqueosophageal embryogenesis in rat embryos with or without adriamycin treatment. **J. Pediatr. Surg.**, v. 34, n. 5, p. 872-5, May 1999.

ZHOU, B.; HUTSON, J.M.; MYERS, N.A. Investigation of the intra-abdominal oesophagus and hiatus in fetal rats with oesophageal atresia and tracheo-oesophageal fistula. **Pediatr. Surg. Int.**, v. 17, p. 97-100, Mar. 2001.

ZUCCARELLO, B.; SPADA, A.; TURIACO, N.; VILLARI, D.; PARISI, S.; FRANCICA, I.; FAZZARI, C.; PEDERIVA, F.; TOVAR, J.A. Intramural ganglion structures in esophageal atresia: a morphologic and immunohistochemical study. **Int. J. Pediatr.**, v. 2009, ID: 695837, p. 1-7, Jul. 2009.

# APÊNDICES

---

**APÊNDICE A - AMPLITUDES DAS CONTRAÇÕES DO ESÔFAGO DISTAL EM  
DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CARBACOL NOS GRUPOS CONTROLE,  
DOXO COM AE E DOXO SEM AE**

CONTROLE	Basal	0,01µM	0,1µM	1µM	10µM	100µM
Animal 1	7.009	7.281	11.67	14.22	16.55	17.28
Animal 2	3.032	3.653	5.643	7.459	7.714	7.416
Animal 3	4.397	6.52	9.493	11.78	12.14	12.01
Animal 4	7.087	7.562	9.409	10.93	11.55	11.32
Animal 5	4.873	4.885	4.951	8.427	10.2	10.66
Animal 6	10.09	10.14	10.25	13.12	14.25	15.23
Animal 7	1.926	1.843	6.582	7.58	9.145	10.01
Animal 8	3.163	3.163	3.912	9.028	9.904	8.983
Animal 9	0.934	0.897	0.902	6.026	6.825	6.632
Animal 10	2.375	2.335	2.361	6.46	6.854	6.488
Animal 11	4.377	4.319	4.302	7.884	9.393	8.886
DOXO COM AE	Basal	0,01µM	0,1µM	1µM	10µM	100µM
Animal 1	4.932	4.91	5.347	7.134	8.834	9.233
Animal 2	-0.057	-0.149	1.783	4.633	6.192	6.331
Animal 3	2.409	2.435	5.453	6.405	7.421	7.36
Animal 4	6.729	6.792	6.964	7.146	7.415	7.408
Animal 5	3.009	3.018	4.323	5.798	8.277	9.15
Animal 6	3.907	3.963	4.008	7.805	9.284	9.401
Animal 7	5.240	5.311	5.310	6.883	7.530	7.781
Animal 8	3.232	3.275	3.352	6.472	7.705	8.074
DOXO SEM AE	Basal	0,01µM	0,1µM	1µM	10µM	100µM
Animal 1	2.466	2.398	4.245	5.865	6.805	7.123
Animal 2	4.302	4.212	5.808	6.947	7.637	8.037
Animal 3	5.668	5.651	5.648	10.1	11.36	12.02
Animal 4	2.731	2.731	2.731	6.111	6.956	7.351
Animal 5	5.262	5.262	5.238	7.867	9.013	9.658
Animal 6	4.905	4.732	5.128	9.372	9.901	9.843
Animal 7	9.996	10	10.2	12.44	12.79	12.51
Animal 8	3.162	3.078	4.856	5.852	6.715	7.269

Animal 9	5.33	5.34	7.87	8.44	8.61	8.64
Animal 10	4.926	4.876	8.286	8.754	9.482	9.261
Animal 11	2.517	2.536	5.286	6.290	8.170	8.827

**APÊNDICE B - AMPLITUDES DAS CONTRAÇÕES DO ESÔFAGO DISTAL EM  
DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE KCl NOS GRUPOS CONTROLE, DOXO  
COM AE E DOXO SEM AE**


CONTROLE	Basal	10mM	20mM	40mM	60mM	80mM	100mM
Animal 1	5.209	5.187	5.392	6.350	6.456	6.322	6.091
Animal 2	8.005	8.002	7.98	8.872	9.101	8.978	8.744
Animal 3	1.178	1.210	1.464	1.839	3.006	2.651	2.446
Animal 4	9.826	9.742	9.723	10.964	11.191	10.988	10.691
Animal 5	3.64	3.588	3.595	4.466	4.677	4.369	4.211
DOXO COM AE	Basal	10mM	20mM	40mM	60mM	80mM	100mM
Animal 1	5.344	5.329	5.970	7.057	7.045	6.644	6.355
Animal 2	3.366	3.340	3.829	4.678	5.208	4.793	4.374
Animal 3	2.868	2.831	3.168	4.437	4.387	4.221	3.920
Animal 4	2.218	2.177	2.306	2.590	2.650	2.601	2.534
Animal 5	1.568	1.550	1.596	2.592	2.900	2.692	2.414
Animal 6	3.168	3.137	3.214	4.026	4.177	3.855	3.620
Animal 7	1.595	1.551	1.918	2.152	2.235	2.177	1.959
DOXO SEM AE	Basal	10mM	20mM	40mM	60mM	80mM	100mM
Animal 1	2.350	2.354	2.359	2.452	3.479	3.894	3.868
Animal 2	6.742	6.736	6.751	7.097	7.893	8.298	7.944
Animal 3	3.432	3.468	3.634	5.333	7.136	6.297	5.562
Animal 4	3.871	3.846	3.843	4.052	4.210	4.080	4.017
Animal 5	4.734	4.701	5.470	5.535	5.489	5.312	5.268
Animal 6	2.484	2.502	2.687	3.472	3.721	3.416	3.242
Animal 7	1.894	1.848	1.981	2.262	2.484	2.229	2.12

**APÊNDICE C - AMPLITUDES DAS CONTRAÇÕES DO FUNDO GÁSTRICO EM  
DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CARBACOL NOS GRUPOS CONTROLE,  
DOXO COM AE E DOXO SEM AE**

CONTROLE	Basal	0,01µM	0,1µM	1µM	10µM	100µM	300µM	Peso (mg)
Animal 1	0.451	0.450	0.499	0.668	0.829	0.939	0.939	3.6
Animal 2	0.438	0.493	0.658	0.838	1.115	1.257	1.257	5.6
Animal 3	0.582	0.578	0.606	0.721	0.879	0.944	0.944	4
Animal 4	0.550	0.550	0.550	0.552	0.635	0.719	0.729	3.7
Animal 5	0.542	0.545	0.546	0.604	0.678	0.739	0.743	3.3
Animal 6	0.502	0.500	0.508	0.584	0.682	0.694	0.692	2.9
Animal 7	0.574	0.564	0.563	0.621	0.690	0.723	0.691	3.5
DOXO COM AE	Basal	0,01µM	0,1µM	1µM	10µM	100µM	300µM	Peso (mg)
Animal 1	0.557	0.557	0.597	0.691	0.794	0.875	0.875	2.8
Animal 2	0.529	0.530	0.527	0.566	0.635	0.670	0.658	4.8
Animal 3	0.421	0.413	0.442	0.499	0.675	0.807	0.823	2.5
Animal 4	0.509	0.511	0.522	0.571	0.666	0.696	0.691	5.2
Animal 5	0.375	0.375	0.382	0.384	0.464	0.520	0.520	3.5
Animal 6	0.603	0.634	0.643	0.669	0.72	0.769	0.771	3.8
DOXO SEM AE	Basal	0,01µM	0,1µM	1µM	10µM	100µM	300µM	Peso (mg)
Animal 1	0.532	0.532	0.569	0.655	0.725	0.812	0.829	5.1
Animal 2	0.578	0.578	0.610	0.687	0.801	0.923	0.955	4.3
Animal 3	0.443	0.426	0.433	0.545	0.684	0.748	0.749	3.1
Animal 4	0.661	0.653	0.658	0.744	0.864	0.923	0.923	3.6
Animal 5	0.485	0.479	0.480	0.515	0.647	0.715	0.716	3.9
Animal 6	0.623	0.599	0.604	0.759	0.884	0.954	0.959	4.7
Animal 7	0.562	0.561	0.633	0.786	0.930	0.986	0.989	6.9
Animal 8	0.695	0.686	0.781	0.904	0.949	0.964	0.964	3.1
Animal 9	0.575	0.564	0.557	0.654	0.719	0.760	0.760	2.1
Animal 10	0.433	0.442	0.455	0.493	0.538	0.582	0.582	3.7
Animal 11	0.527	0.527	0.544	0.622	0.692	0.724	0.727	4.6
Animal 12	0.587	0.587	0.609	0.719	0.786	0.767	0.767	4.1



## APENDICE D – COMPROVANTE DO ENVIO DO ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO


Antônio Aldo Melo Filho <aamelofilho@gmail.com>

---

**Submission Confirmation**

---

**Journal of Pediatric Surgery** <jpedsurg@iupui.edu> 27 de maio de 2014 18:41  
 Para: aamelofilho@gmail.com, aldo.melo@cnpq.br

Dear Aldo,

We have received your article "THE PROFILE OF GASTRIC AND ESOPHAGIC CONTRACTILITY IN EXPERIMENTAL DOXORUBICIN-INDUCED ESOPHAGEAL ATRESIA" for consideration for publication in Journal of Pediatric Surgery.

Your manuscript will be given a reference number once an editor has been assigned.

To track the status of your paper, please do the following:

1. Go to this URL: <http://ees.elsevier.com/jpedsurg/>
2. Enter the login details.  
 Your username is: [aamelofilho@gmail.com](mailto:aamelofilho@gmail.com)  
 If you need to retrieve password details, please go to: [http://ees.elsevier.com/JPEDSURG/automail\\_query.asp](http://ees.elsevier.com/JPEDSURG/automail_query.asp).
3. Click [Author Login]  
 This takes you to the Author Main Menu.
4. Click [Submissions Being Processed]

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System  
 Journal of Pediatric Surgery

\*\*\*\*\*

Please note that the editorial process varies considerably from journal to journal. To view a sample editorial process, please click here:  
[http://help.elsevier.com/app/answers/detail/p/7923/a\\_id/160](http://help.elsevier.com/app/answers/detail/p/7923/a_id/160)

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

**ANEXOS**

---

## ANEXO A – APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL - CEPA



Universidade Federal do Ceará  
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA  
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo  
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE  
Tel: (85) 3366.8331 Fax: (85) 3366.8333

### DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação n° 27/2011, sobre o projeto intitulado: **“ESTUDO DA MOTILIDADE ESOFÁGICA E GÁSTRICA EM MODELO EXPERIMENTAL DE ATRESIA DE ESÔFAGO INDUZIDA POR ADMICINA EM FETOS DE RATOS”**, de responsabilidade de Antonio Aldo Melo Filho, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA – em reunião realizada em 29 de agosto de 2011.

Fortaleza, 28 de setembro de 2011.

  
Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar  
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA